

肺癌组织中 Yes 相关蛋白的表达与临床特征相关^{*}邓科兰 厉银平 刘桂霞 彭清臻^{*},湖北孝感 432000

武汉科技大学附属孝感医院呼吸与危重症医学科

摘要 目的:探讨肺癌组织中转录共激活因子蛋白(YAP)的表达与临床特征的关系及对预后的预测价值。方法:选取孝感市中心医院2015年4月-2016年12月收治的50例手术切除新鲜肺癌标本和癌旁组织标本及同期50例肺部良性病变患者经皮肺穿刺活检获得的正常肺组织标本,采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SP)法和Westernblot法检测标本中YAP的表达水平,分析其与肺癌临床病理特征及预后的相关性。结果:①免疫组化结果:YAP在36例肺癌组织中呈强阳性表达,在14例肺癌组织中呈阴性或弱阳性表达,在癌旁组织与正常组织中均呈阴性或弱阳性表达,差异有统计学意义(P 均 <0.05);②Westernblot结果显示,肺癌组织中YAP的相对表达量明显高于癌旁组织与正常组织,差异有统计学意义(P 均 <0.05);③在肺癌组织中YAP的表达水平与患者的性别、年龄、肿瘤类型、病灶直径、TNM分期、分化程度、胸壁转移及血清细胞角蛋白19可溶性片段(CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、糖类抗原125(CA125)水平无关(P 均 >0.05),与淋巴结转移有关($P<0.05$);④YAP高表达组与低表达组的无复发生存率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);⑤肺癌预后与TNM分期、淋巴结转移有关(P 均 <0.05),与YAP表达水平无关($P>0.05$)。结论:在肺癌组织中YAP的表达上调,与肺癌生物学行为有一定关系,但在预测肺癌预后中的价值有限。

关键词 Yes 相关蛋白; 肺癌; 临床特征; 预后预测

中图分类号 R734.2

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20210314

The expression of YAP in lung cancer tissues associate with clinical characteristics DENG Ke-lan, LI Yin-ping, LIU Gui-xia, PENG Qing-zhen^{*}. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Xiaogan 432000, China

Corresponding author: PENG Qing-zhen, E-mail: qingzhengp@tom.com

Abstract Objective: To investigate the relationship between the expression of YAP in lung cancer tissues and clinical characteristics and its prognostic value. Methods: A total of 50 fresh lung cancer specimens and paracancer tissue specimens from April 2015 to December 2016 were resected surgically and 50 normal tissue samples with benign lung lesions were obtained by percutaneous lung biopsy. The expression of YAP in the samples was detected by immunohistochemical SP method and Western blotting, and its correlation with clinicopathological features and prognosis of lung cancer was analyzed. Results: ① Immunohistochemical results revealed that YAP showed strong positive expression in 36 lung cancer tissues, negative or weak positive expression in 14 lung cancer tissues, negative or weak positive expression in paracancer tissues and normal tissues, and the difference was statistically significant (all $P < 0.05$). ② Western blotting results showed the relative expression of YAP in lung cancer tissues was significantly higher than that in paracancer tissues and normal tissues ($P < 0.05$). ③ The expression level of YAP in lung cancer tissues was not related to patients' gender, age, tumor type, diameter, TNM stage, differentiation degree, chest wall metastasis, serum cyfra21-1, NSE and CA125 levels (all $P > 0.05$), but to lymph node metastasis ($P < 0.05$). ④ There was no statistically significant difference in relapse-free survival between the high expression group of YAP and the low expression group ($P > 0.05$). ⑤ The prognosis of lung cancer was related to TNM stage and lymph node metastasis (all $P < 0.05$), while not to the expression level of YAP ($P > 0.05$). Conclusion: The expression of YAP in lung cancer was up-regulated, and is related to the biological behavior of lung cancer, while has limited value in predicting the prognosis of lung cancer.

Key words Yes-associated protein; Lung cancer; Clinical features; Prognostic

Hippo 信号通路最初是在果蝇中发现的,该信号通路可通过调控细胞增殖、凋亡和分化来调控器官大小,进而与多种疾病的发生密切关系^[1]。Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)是 Hippo 通

路的核心效应因子, Kim 等^[2]发现在肝癌、胃癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中均存在 Hippo-YAP 通路调控异常的情况, YAP 呈过度表达。有文献报道, YAP 在肺腺癌中亦呈高表达状态, 且与丝裂原活化蛋白

^{*}基金项目:湖北省自然科学基金项目(No:2014CFC1059)

^{*}通信作者:彭清臻, E-mail: qingzhengp@tom.com, 湖北省孝感市孝南区广场街6号

激酶、细胞周期因子 Cyclin A 呈正相关,YAP 在肺癌研究领域中具有很大的潜在价值,但目前国内相关的研究并不丰富且存在一定争议^[3,4]。本研究通过检测不同肺组织标本中 YAP 的表达水平及与肺癌临床病理学特征和预后之间的关系,探讨其对肺癌诊治及预后预测的临床价值。

材料与方法

材料收集 选取孝感市中心医院 2015 年 4 月-2016 年 12 月收治的 50 例经手术病理证实的肺癌患者,其中鳞癌 24 例,腺癌 26 例。取手术切除新鲜肺癌标本和癌旁组织标本(距肿瘤边缘 5~8 cm)各 1 块。另取同期 50 例肺部良性病变患者经皮肺穿刺活检获得的正常组织标本各 1 块。所有患者均具有完整的临床资料,术前均未接受过放、化疗及免疫治疗等,标本一经离体,即经福尔马林固定,石蜡包埋,4μm 连续切片、备用。

方法

1. 主要试剂。兔抗人 YAP 多克隆抗体(Santa-Cruz 公司);SP 试剂盒(北京中衫金桥生物技术有限公司);DAB 显色试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Bio-Rad 公司)等。

2. 免疫组化 SP 法。兔抗人 YAP 多克隆抗体以 1:600 稀释,操作按试剂盒说明进行,包括脱蜡、水化,高压抗原修复,3% H₂O₂ 孵育,山羊血清封闭,滴加一抗室温孵育 1 h,二抗室温孵育 0.5 h,DAB 显色,苏木素复染,盐酸乙醇分化,脱水、二甲苯透明、封片等操作。

3. 结果判定。由 2 位观察者采用双盲法对结果进行判定,显微镜 400 倍视野下,20 个视野,YAP 为细胞核或细胞质染色,按染色强度分别计 0、1、2、3 分。同时计数整个视野中染色的细胞数,阳性细胞数所占比例为 0~5% 计 0 分,占 6%~25% 计 1 分,占 26%~50% 计 2 分,占 51~75% 计 3 分,>75% 计 4 分。将染色强度的分数与阳性细胞数所占的比例的分数相乘,0~1 分为(-),2~5 分为(+),6~8 分为(++),9~12 分为(+++)。按 Fromowitz 标准,(-)、(+)为低表达,(++),(++)为高表达^[5]。

4. Westernblot 法。取新鲜肺癌组织提取总蛋白,用 BCA 法定量,电泳转移到 PVDF 膜上,4℃ 孵育过夜,室温孵育 1 h,曝光,用 Quantityone 软件分析条带灰度值。目的蛋白的相对表达水平 = 目的条

带灰度值/β-actin 灰度值。

5. 随访。肺癌患者术后第 1 年每个月进行随访 1 次,之后每 3 个月进行随访 1 次,3 年后每年进行随访 1 次。无复发生存期定义为手术病理确诊日期起至疾病复发的时间,按月计算,本组随访 16~38 个月,平均(21.62±3.18)个月,无失访者,无非肿瘤相关原因死亡者。

统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件,计数资料以百分数(%)表示,采用卡方检验。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验。等级资料采用 Mann-Whitney 检验。绘制 Kaplan-Merier 生存曲线,采用对数秩和检验。采用 Cox 比例风险模型分析影响肺癌预后的相关因素。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

YAP 表达的免疫组化结果 YAP 在 36 例肺癌组织中呈强阳性表达,在 14 例肺癌组织中呈阴性或弱阳性表达;而在癌旁组织与正常组织中均呈阴性或弱阳性表达,与癌组织比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 1、表 1。

表 1 YAP 表达的免疫组化结果[例(%)]

组别	例	(-)	(+)	(++)	(+++)
癌组织	50	10(20.0)	4(8.0)	17(3.4)	19(3.8)
癌旁组织	50	37(74.0)*	13(26.0)*	0(0.0)*	0(0.0)*
正常组织	50	44(88.0)*	6(12.0)*	0(0.0)*	0(0.0)*

注:与癌组织比较,**P* < 0.05

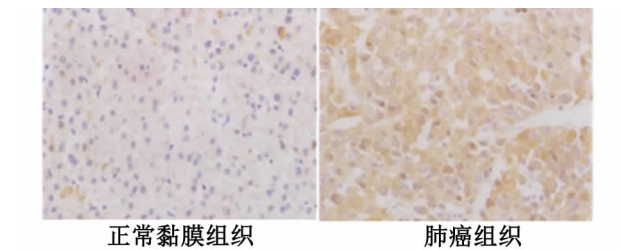


图 1 免疫组化检测正常黏膜组织与肺癌组织中 YAP 的表达

YAP 相对表达量(Westernblot 结果) 肺癌组织中 YAP 的相对表达量明显高于癌旁组织与正常组织,比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 2、表 2。

表 2 不同肺组织中 YAP 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	例	表达量
癌组织	50	1.12±0.26
癌旁组织	50	0.47±0.05*
正常组织	50	0.45±0.08*

注:与癌组织比较,**P* < 0.05

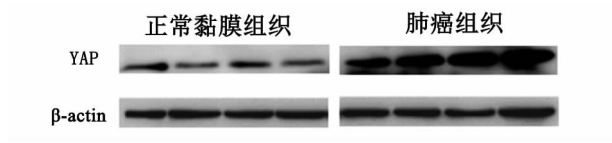


图2 Westernblot 法检测正常黏膜组织与肺癌组织中 YAP 的表达

YAP 与肺癌临床病理特征的关系 YAP 在肺癌组织中的表达水平与患者的性别、年龄、肿瘤的类型、病灶直径、TNM 分期、分化程度、胸壁转移及血清细胞角蛋白 19 可溶性片段 (CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、糖类抗原 125 (CA125) 水平无关 (P 均 >0.05), YAP 的高表达与淋巴结转移有关 ($P<0.05$), 见表 3。

不同 YAP 表达水平患者的无复发生存率比较

表3 YAP 相关蛋白与肺癌临床病理特征的关系[例(%)]

临床特征	例	高表达组($n=36$)	低表达组($n=14$)	χ^2 值	P 值
性别					
男	37	27(75.0)	10(71.4)	0.066	0.796
女	13	9(25.0)	4(28.6)		
年龄(岁)					
<60	10	5(13.8)	5(35.7)	3.001	0.083
≥60	40	31(86.2)	9(64.3)		
肿瘤类型					
鳞癌	24	19(52.7)	5(35.7)	1.175	0.278
腺癌	26	17(47.3)	9(64.3)		
肿瘤直径(cm)					
≤3	20	16(44.4)	4(28.6)	1.058	0.303
>3	30	20(55.6)	10(71.4)		
TNM 分期					
I ~ II 期	25	19(52.7)	6(24.0)	0.396	0.528
III ~ IV 期	25	17(47.3)	8(76.0)		
肿瘤分化程度					
低分化	20	17(47.3)	3(21.4)	2.794	0.094
中、高分化	30	19(52.7)	11(78.6)		
淋巴结转移					
是	19	17(47.3)	2(14.3)	4.641	0.031
否	31	19(52.7)	12(85.7)		
胸壁转移					
是	3	2(5.6)	1(7.1)	0.045	0.831
否	47	34(94.4)	13(92.9)		
血清 CYFRA21-1(ng/mL)					
<3.36	28	21(58.3)	7(50.0)	1.678	0.195
≥3.36	22	15(41.7)	7(50.0)		
血清 NSE(ng/mL)					
<16.3	7	6(16.7)	1(7.1)	0.759	0.383
≥16.3	43	30(83.3)	13(92.9)		
血清 CA125(U/mL)					
<35	35	24(66.7)	11(78.6)	0.680	0.409
≥35	15	12(33.3)	3(22.4)		

YAP 高表达组与低表达组的无复发生存率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 3。

YAP 在预测肺癌预后中的价值 选取性别、年龄、肿瘤类型、肿瘤直径、TNM 分期、分化程度、淋巴结转移、胸壁转移、YAP 表达水平作为可能影响肺癌预后的因素, 采用 Cox 比例风险模型进行分析, 结果表明, 肺癌预后与 TNM 分期、淋巴结转移有关 (P 均 <0.05), 与 YAP 的表达水平无关 ($P>0.05$), 见表 4。

讨 论

YAP 蛋白一般是以磷酸化形式存在于胞浆中, 而当上游的Hippo信号调控异常时, 就会去磷酸化

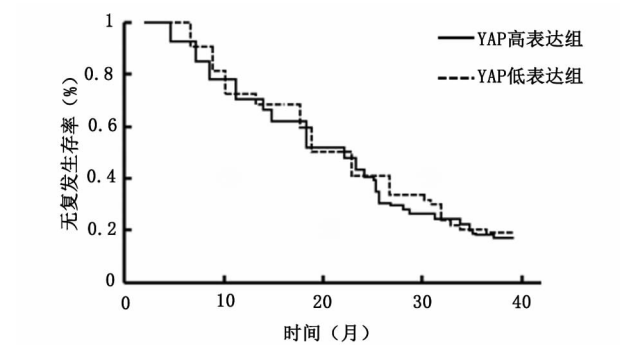


图3 Kaplan-Merier 生存分析

表4 Cox 比例风险模型分析结果

因素	回归系数相对风险	P 值
性别	0.047	0.659
年龄	-0.008	0.794
肿瘤直径	0.154	0.746
肿瘤类型	0.027	0.540
TNM 分期	0.653	0.000
肿瘤分化程度	0.173	0.649
淋巴结转移	0.511	0.000
胸壁转移	0.217	0.095
YAP	0.184	0.631

进入细胞核内,作为转录共激活因子促进细胞增殖,这是多个器官肿瘤发生、进展的一个重要机制^[6],YAP 的磷酸化程度决定了其致癌活性的高低^[7]。动物实验表明,YAP 激活可促进细胞过度增殖、凋亡不足^[8],使细胞间的接触性抑制丧失,推进肿瘤的进展^[9]。阻塞性睡眠呼吸暂停综合征的肿瘤发病率^[10],且与模式间歇低氧有关^[11],体外实验表明,模式间歇低氧可显著上调肺癌细胞系 A549 细胞的 YAP 表达,下调磷酸化 YAP 的表达,提示 YAP 信号通路在模式间歇低氧促进阻塞性睡眠呼吸暂停综合征肿瘤进展的过程中扮演着重要角色^[12]。低浓度的脂多糖可通过上调核内 YAP 的表达诱导肺癌 A549 细胞增殖^[13]。

多个研究表明,YAP 的表达与肺癌 TNM 分期有关^[14~16];而班媛媛等^[17]认为 YAP 的表达与肺癌 TNM 分期无关,与肿瘤的分化程度与淋巴结转移有关。本研究显示 YAP 的表达仅与淋巴结转移有关,而与 TNM 分期、肿瘤分化程度、肿瘤直径及血清标志物等均无关。本研究结果再次提示 YAP 在肺癌的发生、发展中的重要作用,是反映肿瘤浸润与转移的有力指标,并有望成为肺癌治疗的潜在靶点。

增殖细胞的数量、增殖程度对肿瘤预后具有预测价值。浦海宏等^[15]研究表明,YAP 是肺癌患者总生存期的独立预测因子。本研究结果显示,无论是

YAP 高表达患者还是低表达患者在随访期间的无复发生存率均很低,Cox 比例风险模型分析显示,肺癌预后与 YAP 的表达水平无关,提示 YAP 在预测肺癌预后中的价值有限,临床医生应结合 TNM 分期、有无淋巴结转移及其它肿瘤标志物等方法综合预测肺癌患者的生存预后,以提高预后判断的准确性。

参 考 文 献

1 Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations [J]. Genes Dev,2013,27(4):355-371.

2 Kim JM, Kang DW, Long LZ, et al. Differential expression of Yes-associated protein is correlated with expression of cell cycle markers and pathologic TNM staging in non-small-cell lung carcinoma [J]. Hum Pathol,2011,42(3):315-323.

3 Gomez M, Gomez V, Hergovich A. The Hippo pathway in disease and therapy: cancer and beyond [J]. Clin Transl Med,2014,3(1):22.

4 邓科兰, 厉银平, 刘桂霞, 等. 肺癌组织中 YAP、Lats1、Mst1 蛋白的表达及其临床意义 [J]. 内科急危重症杂志,2020,26(5):418-432.

5 李兴森, 黄飏, 王德林, 等. YAP 基因及蛋白在肾癌中的表达及意义 [J]. 重庆医科大学学报,2012,37(10):873-876.

6 Chan SW, Lim CJ, Chen L, et al. The hippo pathway in biological control and cancer development [J]. J Cell Physiol,2011,226(4):928-939.

7 Cai H, Xu Y. The role of LPA and YAP signaling in long-term migration of human ovarian cancer cells [J]. Cell Commun Signal,2013,11(1):1-2.

8 胡迎春, 张千, 钟武, 等. YAP1 基因在腺毒血症大鼠中表达的实验研究 [J]. 内科急危重症杂志,2016,22(5):377-378.

9 Dong Q, Zhang Q, Li Z, et al. Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer [J]. Cancer Sci,2010,101(5):1279-1285.

10 刘威. 恶性肿瘤与睡眠障碍关系的研究进展 [J]. 内科急危重症杂志,2017,23(1):61-64.

11 Trzepizur W, Gagnadoux F. Epidemiology of obstructive sleep apnoea syndrome. [J]. Rev Mal Respir,2014,31(6):568-577.

12 薛震, 李莲, 任方元, 等. OSAS 模式 IH 对肺癌细胞系 YAP 以及 P-YAP 表达的影响 [J]. 天津医药,2017,44(12):1414-1417.

13 杨俊俊, 唐敏强, 王芳, 等. Yes 相关蛋白在脂多糖诱导肺癌 A549 细胞增殖中的作用研究 [J]. 医学研究生学报,2017,30(11):1155-1160.

14 Su L, Ma W, Yuan J, et al. Expression of Yes-associated protein in non-small cell lung cancer and its relationship with clinical pathological factors [J]. Chin Med J,2012,125(22):4003-4008.

15 浦海宏, 张明辉, 王艳. Yes 相关蛋白在小细胞肺癌中的表达及意义 [J]. 现代肿瘤医学,2017,25(17):2741-2745.

16 Kim JM, Kang DW, Long LZ, et al. Differential expression of Yes-associated protein is correlated with expression of cell cycle markers and pathologic TNM staging in non-small-cell lung carcinoma [J]. Hum Pathol,2011,42(3):315-323.

17 班媛媛, 张伟, 李道胜. Yes 相关蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 中华临床医师杂志 (电子版),2016,10(23):3734-3738.