

Yes相关蛋白在结直肠癌组织中的表达及其临床意义

陈志山, 洪黎清, 杨昌毅, 林再全

■背景资料

Yes相关蛋白是一种具有多种功能的细胞内连接蛋白和转录共激活因子, 其表达增高以及活性增强可促进肿瘤的发生和发展, 提示其潜在的致癌性。结直肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 对结直肠癌组织中Yes相关蛋白进行研究有助于结直肠癌的诊断并明确结直肠癌的发病机制。

陈志山, 洪黎清, 杨昌毅, 林再全, 福建省南安市医院外一科
福建省南安市 362300

泉州市科技计划课题基金资助项目, No. 2010Z75

作者贡献分布: 此课题由陈志山、洪黎清、杨昌毅及林再全设计; 研究过程由陈志山完成, 数据分析由陈志山与洪黎清完成, 论文完成由陈志山完成。

通讯作者: 陈志山, 医师, 362300, 福建省南安市, 福建省泉州市南安溪美街道新华街330号南安市医院外一科。

chenzhishan_nn@163.com

收稿日期: 2011-07-06 修回日期: 2011-09-07

接受日期: 2011-09-22 在线出版日期: 2011-09-28

Clinical significance of expression of Yes-associated protein in colorectal carcinoma

Zhi-Shan Chen, Li-Qing Hong, Chang-Yi Yang, Zai-Quan Lin

Zhi-Shan Chen, Li-Qing Hong, Chang-Yi Yang, Zai-Quan Lin, Department of Surgery (Division I), the Hospital of Nan'an City, Nan'an 362300, Fujian Province, China
Supported by: the Science and Technology Program of Quanzhou City, No. 2010Z75

Correspondence to: Zhi-Shan Chen, Department of Surgery (Division I), the Hospital of Nan'an City, Nan'an 362300, Fujian Province,

China. chenzhishan_nn@163.com

Received: 2011-07-06 Revised: 2011-09-07

Accepted: 2011-09-22 Published online: 2011-09-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of Yes-associated protein (YAP) in colorectal carcinoma and to analyze its clinical significance.

METHODS: The expression of YAP protein and mRNA was detected by immunohistochemistry and *in situ* hybridization in 80 colorectal carcinoma specimens taken from patients who were treated at the Hospital of Nan'an City of Fujian Province and the First affiliated Hospital of Fujian Medical University from March 2010 to March 2011. The expression of Yes-associated protein and mRNA was also detected in pericancerous tissue and normal colorectal tissue specimens taken from 20 patients.

RESULTS: The positive rates of YAP protein and mRNA expression were 66.25% and 68.75%

in colorectal carcinoma, 20.0% and 25.0% in pericancerous tissue, and 10.0% and 15.0% in normal colorectal tissue. The positive rates of Yes-associated protein and mRNA expression were significantly higher in colorectal carcinoma than in pericancerous tissue and normal colorectal tissue (all $P < 0.01$) but showed no significant differences between pericancerous tissue and normal colorectal tissue (both $P > 0.05$). YAP protein and mRNA expression were not significantly associated with age, gender or tumor site, but were significantly correlated with tumor differentiation and stage (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: YAP expression is related to the occurrence and progression of human colorectal carcinoma and may be used as an accessory parameter for diagnosis of colorectal carcinoma.

Key Words: Yes-associated protein; mRNA; Colorectal carcinoma; *In situ* hybridization; Immunohistochemistry

Chen ZS, Hong LQ, Yang CY, Lin ZQ. Clinical significance of expression of Yes-associated protein in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(27): 2890-2894

摘要

目的: 研究结直肠癌变组织中Yes相关蛋白及mRNA的表达, 探讨其临床意义。

方法: 收集2010-03/2011-03福建省南安市医院普外科及福建医科大学附属第一医院普外科80例结直肠癌患者术中切除的癌组织, 同时收集20例癌旁组织和正常结直肠组织, 应用免疫组织化学S-P法和原位杂交方法检测结直肠癌组织、癌旁组织和正常组织中Yes相关蛋白及mRNA的表达。原位杂交法和免疫组织化学S-P法均严格按照试剂盒说明操作。

结果: 结直肠癌组织中Yes相关蛋白及mRNA的阳性表达率分别为66.25%和68.75%, 癌旁组织中Yes相关蛋白及mRNA

■同行评议者

郝立强, 副教授,
上海长海医院普
外科

的阳性表达率分别为20.0%和25.0%和正常结直肠黏膜组织Yes相关蛋白及mRNA的阳性表达率分别为10.0%和15.0%。结直肠癌组织中Yes相关蛋白及mRNA的阳性表达率明显高于癌旁组织和正常结直肠黏膜组织($P<0.01$)，癌旁组织与正常结直肠黏膜组织中Yes相关蛋白及mRNA阳性表达率比较差别无统计学意义。Yes相关蛋白及mRNA阳性表达率与年龄、性别、肿瘤部位之间比较差异无统计学意义，但与肿瘤分化程度和肿瘤分期等之间比较差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01)。

结论：Yes相关蛋白和mRNA表达与结直肠癌的发生与发展相关，可作为诊断结直肠癌的辅助检查。

关键词：Yes相关蛋白；mRNA；结直肠癌；原位杂交；免疫组织化学

陈志山, 洪黎清, 杨昌毅, 林再全. Yes相关蛋白在结直肠癌组织中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(27): 2890-2894
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2890.asp>

0 引言

Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)是一种具有多种功能的细胞内连接蛋白和转录共激活因子，最早由Sudol发现^[1]。近年研究发现，Yes相关蛋白的表达增高以及活性增强可促进肿瘤的发生和发展，提示其潜在的致癌性^[2]。据文献报道，Yes相关蛋白在肝癌、胃癌等肿瘤组织中表达水平增高、活性增强^[3,4]。本实验通过免疫组织化学方法和原位杂交方法对结直肠癌变组织中Yes相关蛋白及其mRNA的表达进行研究，探讨Yes相关蛋白及其mRNA与结直肠癌的临床相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2010-03/2011-03福建省南安市医院普外科及福建医科大学附属第一医院普外科80例结直肠癌患者，临床分期采用Dukes法：A期13例，B期26例，C期29例，D期12例。其中男53例，女27例；年龄34-79(平均年龄 58.4 ± 14.3)岁；结肠癌34例，直肠癌46例，全部患者术前未经过化疗，取术中切除的癌组织。同时收集20例癌旁组织(距癌组织约0.5 cm)、20例正常结直肠组织。取标本后分别放置于PBS溶液中，立即进行

后续的处理。所有标本染色后经病理专家证实。兔抗人Yes相关蛋白多克隆抗体和Yes相关蛋白mRNA原位杂交试剂盒，均由Santa Cruz Biotechnology提供；焦炭酸二乙酯，由美国Fluka公司提供；辣根过氧化物酶标记的抗兔IgG抗体、二氨基联苯胺酶底物显色试剂盒由福州迈新生物公司提供。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交：原位杂交严格按照试剂盒说明进行操作。切片脱蜡、水化；经PBS漂洗漂洗后用3%过氧化氢溶液室温孵育5-10 min；用3%柠檬酸配制的胃蛋白酶于37℃的恒温箱孵育30 min；滴加20 μL预杂交液于42℃预杂交4 h后，加杂交液于42℃湿盒内杂交过夜；0.2×柠檬酸盐洗涤后滴加封闭液于37℃孵育30 min；滴加碱性磷酸酶标记的地高辛抗体后于37℃孵育60 min；滴加SABC-AP后37℃放置30 min；加入硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐显色。同时以不含探针的标本做阴性对照。

1.2.2 免疫组织化学：采用免疫组织化学S-P法，严格按照试剂盒操作说明进行。切片脱蜡、水化；经PBS漂洗漂洗后用3%过氧化氢溶液室温孵育5-10 min；用抗原修复液修复抗原后用山羊非免疫血清工作液封闭；滴加一抗工作液后于4℃过夜；PBS漂洗后二抗工作液以及链酶卵白素工作液；二氨基联苯胺显色后苏木素复染细胞核。

1.2.3 结果判断：Yes相关蛋白mRNA以细胞质内有特异性紫蓝色颗粒为阳性表达。Yes相关蛋白表达以细胞质和/或细胞膜有特异性黄色颗粒为阳性表达。首先按染色强度进行评分：未染色为0分，淡黄色为1分，棕黄色为2分，深棕黄色为3分；然后以阳性细胞比例进行评分：阴性细胞为0分，阳性细胞<10%为1分，11%-50%为2分，51%-75%为3分，>75%为4分。免疫组织化学染色结果以染色强度评分与阳性细胞比例评分乘积表示，>3为阳性表达。

统计学处理 采用SPSS10.0软件行统计学分析。计数资料进行 χ^2 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同结直肠组织中Yes相关蛋白及其mRNA的表达 正常组织和癌旁组织中Yes相关蛋白及mRNA的差异无统计学意义($P>0.05$)。癌变组织

■研发前沿

Yes相关蛋白是Hippo信号转导通道的下游转录激活因子，但是Yes相关蛋白的确切作用机制还不是非常明确。

■相关报道

Lam-Himlin研究显示，Yes相关蛋白在肝癌中呈高表达，并且与血清AFP的表达以及肿瘤的分化相关。Xu研究显示，肝癌及前列腺癌中Yes相关蛋白阳性表达率显著高于正常组织。达春丽等研究显示，Yes相关蛋白在胃癌中的表达水平显著高于其在正常胃黏膜中的表达水平。

■创新盘点

应用免疫组织化学S-P法和原位杂交方法检测结直肠癌组织、癌旁组织和正常组织中Yes相关蛋白及mRNA的表达进行研究. 其中原位杂交法对Yes相关蛋白mRNA在结直肠癌中的检测为国内首次报道.

表 1 结直肠不同组织Yes相关蛋白及mRNA的表达 $n(\%)$

分组	n	Yes相关蛋白mRNA		Yes相关蛋白	
		-	+	-	+
癌变组织	80	25(31.25)	55(68.75)	27(33.75)	53(66.25)
癌旁组织	20	15(75.0) ^b	5(25.0) ^b	16(80.0) [*]	4(20.0) ^b
正常组织	20	17(85.0) ^b	3(15.0) ^b	18(90.0) [*]	2(10.0) ^b
χ^2 值		25.8145		28.4246	

^b $P < 0.01$ vs 癌变组织.

表 2 Yes相关蛋白及mRNA表达与结直肠癌临床病理参数之间的关系

分组	n	Yes相关蛋白 mRNA			Yes相关蛋白		
		+ $n(\%)$	χ^2 值	P 值	+ $n(\%)$	χ^2 值	P 值
年龄(岁)							
≥60	46	33 (71.7)	0.1823	>0.05	31 (67.4)	0.0001	>0.05
≤60	34	22 (64.7)			22 (64.7)		
性别							
男	53	37 (69.8)	0.0010	>0.05	36 (67.9)	0.0375	>0.05
女	27	18 (66.7)			17 (63.0)		
肿瘤部位							
结肠	34	24 (70.6)	0.0037	>0.05	22 (64.7)	0.0001	>0.05
直肠	46	31 (67.4)			31 (67.4)		
分化程度							
低	19	18 (94.7)	9.3097	<0.01	18 (94.7)	12.4339	<0.01
中	36	24 (66.7)			24 (66.7)		
高	25	13 (52.0)			11 (44.0)		
肿瘤分期							
A	13	6 (46.2)	9.0079	<0.05	5 (38.5)	10.0066	<0.05
B	26	15 (57.6)			15 (57.6)		
C	29	23 (79.3)			22 (75.8)		
D	12	11 (91.7)			11 (91.7)		

与癌旁组织的Yes相关蛋白及mRNA差异有统计学意义($P < 0.01$), 癌变组织与正常组织Yes相关蛋白及mRNA的差异有统计学意义($P < 0.01$). mRNA表达阳性率略高于蛋白表达阳性率, 但差异无统计学意义($P > 0.05$, 表1).

2.2 Yes相关蛋白及mRNA的表达与结直肠癌临床病理参数的关系 Yes相关蛋白及mRNA表达与年龄、性别、肿瘤部位之间的差异无统计学意义($P > 0.05$), 但是与肿瘤分化程度与肿瘤分期之间的差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01 , 表2).

3 讨论

结直肠癌包括结肠癌和直肠癌, 是消化系统常见的恶性肿瘤. 近年来随着人们生活水平的提高和膳食结构的改变, 结直肠癌发生率呈逐年

上升的趋势, 并且表现年轻化^[4,5]. 全世界范围内结直肠癌发病率处于恶性肿瘤第3位, 其发病率及死亡率迅速提高, 但是治疗至今未有突破性进展, 其5年生存率徘徊在25%-50%之间^[6]. 结直肠癌发病率在我国占第4位, 死亡率占第三位^[7]. 结直肠癌的治疗是以手术为主, 化疗对于减少复发与转移、提高其疗效是非常重要的, 癌症的早期发现对于其治疗和预后具有重要的影响^[8].

细胞增殖和凋零的平衡为维持组织正常生长和发挥功能的必不可少的条件. 细胞过度凋亡可打破此平衡而导致组织的过度丧失并伴随功能的丧失^[9]; 然而细胞凋亡不足并伴随不可控制的细胞增殖则会导致肿瘤发生^[10]. Hippo信号转导通路通过多种肿瘤抑制因子(Hpo、Sav、Wts)组成的激酶链, 磷酸化其靶因子YkiS168位

点而抑制其转录共激活活性, 维持细胞增生和凋亡间的平衡, 该通路发生异常和/或Yki基因突变, 导致Yki的活化、细胞增生和凋亡间平衡失调及肿瘤发生^[11]. Hippo信号通路参与器官的发育, 并通过促进细胞凋亡和限制细胞增殖调控器官大小. Yes相关蛋白是一种多功能的细胞内连接蛋白和转录共激活因子, 于1994年首次发现其绑定于非受体酪氨酸蛋白激酶Src家族成员c-Yes的SH3基序, 将其命名为Yes相关蛋白^[12]. Yes相关蛋白是Hippo信号转导通道的下游转录激活因子, 因与非受体酪氨酸激酶c-Yes相结合而最早被克隆^[13]. 虽然Yes相关蛋白的确切作用机制还不是非常明确, 但是Yes相关蛋白有可能提供一种有助于抑制凋亡和促进基因不稳定性的微环境, 加快细胞增殖, 并向恶性转化^[11]. 因此对Yes相关蛋白进行研究可能有助于诊断肿瘤并明确肿瘤的发病机制.

已有研究发现Yes相关蛋白在肝癌中呈高表达, 并且与血清AFP的表达以及肿瘤的分化相关, 是肝癌患者的OS和DFS一个独立的预后指标^[14]; 肝癌及前列腺癌中Yes相关蛋白阳性表达率显著高于正常组织, Yes相关蛋白在胃癌中的表达水平显著高于其在正常胃黏膜中的表达水平^[1,15]. 本研究对结直肠癌变组织中Yes相关蛋白及mRNA的表达进行检测, 以探讨其临床意义.

原位杂交试验结果和免疫组化试验结果显示, 结直肠癌变组织Yes相关蛋白和mRNA的阳性表达显著高于癌旁组织和正常粘膜组织($P<0.01$), 与文献报道一致^[14-16]. 癌变组织Yes相关蛋白和mRNA在癌变组织的高表达, 说明Yes相关蛋白和mRNA与结直肠癌的发生和发展密切相关. Yes相关蛋白mRNA阳性表达率略高于Yes相关蛋白阳性表达率, 可能与原位杂交检测的灵敏度高于免疫组织化学有关.

同时试验结果显示, Yes相关蛋白和mRNA的产生和发展与年龄、性别无关, 与文献报道吻合^[16], 此外本研究还发现Yes相关蛋白和mRNA的表达与肿瘤部位无关. 但是与肿瘤分化程度有关, 随着肿瘤程度分化程度的增强, Yes相关蛋白和mRNA表达的阳性率随之增加, 与文献报道一致^[15,16]. 同时, Yes相关蛋白和mRNA的产生和发展与肿瘤的Dukes有关, 随着Dukes分期的加重, Yes相关蛋白和mRNA表达的阳性率随

之增加. 因此, 随之结直肠癌病情恶化, Yes相关蛋白和mRNA表达的阳性率增加. 但是此结果与文献报道不一致^[16], 可能与所采用的比较方法不同有关: 本试验将Dukes分期A、B、C和D期分别进行比较, 而文献采用Dukes分期A、B期与C、D期进行比较.

总之, 本研究结果提示, Yes相关蛋白和mRNA表达与结直肠癌的发生与发展相关, 可作为诊断结直肠癌的辅助检查.

4 参考文献

- 1 达春丽, 辛彦, 赵晶, 罗祥东. 胃癌及其癌前病变组织Yes相关蛋白和Survivin的表达及其意义. 中华肿瘤防治杂志 2010; 17: 406-410
- 2 Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Sgroi DC, Deng CX, Brugge JS, Haber DA. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12405-12410
- 3 Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 2007; 21: 2747-2761
- 4 Lam-Himlin DM, Daniels JA, Gayyed MF, Dong J, Maitra A, Pan D, Montgomery EA, Anders RA. The hippo pathway in human upper gastrointestinal dysplasia and carcinoma: a novel oncogenic pathway. *Int J Gastrointest Cancer* 2006; 37: 103-109
- 5 梁冀望, 王振宁, 宋永喜, 徐惠绵. 结直肠癌旁肿瘤沉积的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3620-3622
- 6 王浩斌, 张才全, 王崇树, 赵明才, 谢贤雍, 侯华芳. 大肠癌患者腹腔冲洗液CEA、GCC 和CD44v6 mRNA的检测及其临床意义. 第三军医大学学报 2010; 32: 36-40
- 7 侯彦强, 姜加陶, 彭亮, 周琳, 倪健, 孔宪涛, 仲人前. 结直肠癌组织中ECM1基因水平的测定及临床意义. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1960-1964
- 8 饶敏, 林从尧, 冯茂辉, 李春光, 吴洲清. 结直肠癌P170蛋白表达的检测及意义. 武汉大学学报(医学版) 2010; 31: 58-61
- 9 Song JM, Kelton G, Wang JL. 结直肠癌常用筛查方法综述. 中国全科医学 2008; 11: 1115-1120
- 10 Brunner T, Mueller C. Apoptosis in disease: about shortage and excess. *Essays Biochem* 2003; 39: 119-130
- 11 Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, Dong J, Maitra A, Pan D, Montgomery EA, Anders RA. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum Pathol* 2008; 39: 1582-1589
- 12 Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, Gayyed MF, Anders RA, Maitra A, Pan D. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* 2007; 130: 1120-1133
- 13 Pan D. Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev* 2007; 21: 886-897
- 14 Sudol M. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene*

■应用要点

结直肠癌组织中Yes相关蛋白及mRNA的阳性表达率明显高于癌旁组织和正常结直肠黏膜组织, 可作为诊断结直肠癌的辅助检查.

■同行评价

本文主题明确, 实验方法科学合理, 结果可靠, 论述详细, 有一定的科学应用价值.

- 1994; 9: 2145-2152
- 15 Xu MZ, Yao TJ, Lee NP, Ng IO, Chan YT, Zender L, Lowe SW, Poon RT, Luk JM. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocel-

- lular carcinoma. *Cancer* 2009; 115: 4576-4585
- 16 刘丛丛, 梁建芳, 郑绘霞, 肖虹, 李宁, 程彩霞, 王宏坤, 武丽娜, 张民, 赵玉泽. YAP在结直肠腺癌组织中的表达及意义. *中国药物与临床*, 2011; 11: 23-28

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.