

上皮性卵巢癌 YAP 核表达及肿瘤大小与预后的关联性研究

李泽莲,肖 兰,江 玉,季维雪,陈 颖,杨媛媛,曹云霞

摘要 目的 探讨上皮性卵巢癌(EOC)中 YES 相关蛋白(YAP)核表达与肿瘤大小及预后关系及 YAP 作用。方法 120 例 EOC 患者组织标本为实验组,其中早期(I + II)和晚期(III + IV)EOC 分别为 38 和 82 例,30 例选自子宫肌瘤患者的正常卵巢组织为对照组。免疫组织化学染色法检测 YAP 蛋白定位及表达,回顾性分析 120 例 EOC 患者临床资料,YAP 核表达与 EOC 病理参数及患者预后相关性;不同初始细胞量培养 EOC 细胞系 C13K 及 OV2008,使用免疫荧光及克隆形成实验分别检测 Ki67 表达及增殖情况;EOC 细胞分别培养至汇合度为 60% (低密度组)和 90% (高密度组),q-PCR 及 Western blot 分别检测 YAP mRNA 及蛋白在 EOC 细胞中表达。结果 YAP 蛋白在 EOC 组织中胞核阳性表达率高于正常卵巢组织($P < 0.05$);I + II 期 EOC 肿瘤平均直径大于 III + IV 期 EOC ($P < 0.01$);YAP 核高表达与病理学分级、临床分期、糖类抗原 125(Ca125 $> 1\ 000$ IU/ml)呈正相关,而与肿瘤大小呈负相关(P 均 < 0.05);生存分析提示肿瘤直径较小(< 10 cm)及 YAP 核高表达与 EOC 术后 3 年生存率呈负相关($P < 0.01$)。低密度组培养 C13K 及 OV2008 细胞克隆形成数目多,Ki67 及 YAP 表达高($P < 0.01$);敲低 YAP 表达可降低两种培养密度细胞的增殖能力($P < 0.05$)。结论 YAP 核高表达及肿瘤直径小与 EOC 患者预后负相关,降低 YAP 核表达可使 EOC 细胞增殖能力减弱。**关键词** YAP;上皮性卵巢癌;细胞增殖;肿瘤大小;细胞密度;预后
中图分类号 R 341.2;R 361.2;R 737.31;R 737.33
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0298-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.019

上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)死亡率居妇科恶性肿瘤首位,晚期 EOC 患者 5 年生存率低于 30%^[1-2]。早期 EOC 无远处播散转移,且瘤体多较大;晚期 EOC 尽管已远处播散转移,但瘤体却较小。EOC 瘤体大小与肿瘤分期呈相反趋势,且调控 EOC 生长的机制亦未知。YES 相关蛋白

(yes-associated protein, YAP)是 Hippo 信号通路下游效应分子,研究^[3-4]表明,Hippo-YAP/TAZ 通路过度活化可使肿瘤细胞克服接触抑制,强化其增殖能力。有研究^[5]提示 YAP 蛋白在肝癌、乳腺癌、结肠癌等实体肿瘤中高表达。但 YAP 蛋白在 EOC 中表达及其作用仍有待研究。该研究从组织学水平检测 EOC 及正常卵巢上皮组织中 YAP 蛋白表达并分析 YAP 蛋白表达与患者临床病理特征及预后的关系;从细胞学水平探讨 YAP 对 EOC 细胞生长的调控作用,以期对 EOC 预后评估及治疗提供新方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与主要试剂 卵巢癌细胞株 C13K 及 OV2008 为本实验室保存。RPMI-1640 培养基及磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;TR-Izol 试剂及 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒、SYBR Green MasterMix 购自日本 TaKaRa 公司;DAB 显色试剂及 TritonX-100 通透液均购自山东思科捷生物技术有限公司;鼠抗人 Ki67 单克隆抗体购自英国 abcam 公司;兔抗人 YAP 多克隆抗体购自美 Santa Cruz 公司;荧光抗鼠、抗兔二抗购自上海碧云天生物技术有限公司;Cell-Light™ EdU 流式细胞仪检测试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司;靶向 YAP1 的 siRNA-YAP1 序列由上海吉玛公司设计并合成。

1.1.2 组织标本 选取 2015 年 5 月至 2021 年 12 月于安徽医科大学第一附属医院行手术治疗且经病理学明确诊断的 EOC 患者 120 例,FIGO 分期:I + II 期 38 例,III + IV 期 82 例,同期良性肿瘤(子宫肌瘤)患者 30 例(取正常卵巢上皮)。EOC 组患者纳入标准为:①病理明确诊断为 EOC;②排除自身免疫病及其他系统肿瘤;③术前均未接受新辅助化疗、免疫及靶向治疗;④手术行肿瘤分期或肿瘤减灭术。入选者均签署知情同意书,并通过安徽医科大学第一附属医院伦理委员会审查。

1.1.3 资料收集及随访统计 患者的临床资料 记

2024-01-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81603138)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

作者简介:李泽莲,女,主治医师;

曹云霞,女,主任医师,教授,责任作者,E-mail: caoyunxia6@126.com

录患者的年龄、肿瘤分期、腹水量、病理类型、分化程度、肿瘤直径及 CA125 水平。根据术中记录的肿瘤病灶各个径线大小,计算平均值即为肿瘤大小,参考已发表文献证据^[6],根据肿瘤大小将患者分为两组:肿瘤大小 ≥ 10 cm,肿瘤大小 < 10 cm。

1.1.4 随访门诊及电话等方式进行随访 随访内容为患者生存情况,随访时间截止 2022 年 6 月,中位随访时间 42 个月。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 肿瘤组织以及正常对照组标本采用福尔马林固定,石蜡包埋,标本连续切片,切片厚 4 μm ,一抗 YAP-D1 (1 : 500) 孵育 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日,抗兔二抗(1 : 2 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,冲洗,显微镜下加 DAB(5%) 显色,苏木精复染。免疫组织化学结果中,细胞质或细胞核中出现棕黄色颗粒为 YAP 蛋白表达阳性细胞,每例均随机观察 10 个高倍视野($\times 200$),镜下未观察到阳性细胞为阴性(-),镜下阳性细胞数 $< 5\%$ 为弱阳性(1+),镜下阳性细胞数 5% ~ 25% 为阳性(2+),镜下阳性细胞数 $> 25\%$ 为强阳性(3+)。

1.2.2 细胞培养及转染细胞 使用含 10% 小牛血清 1640 培养液,5% CO_2 浓度及 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育培养,其中细胞汇合度为 60% (低密度培养组) 和 90% (高密度培养组);分别取对数生长期低密度、高密度培养两株细胞,弃上层培养液;各自转染 siRNA-YAP1 及阴性 siRNA (siRNA-NC)。具体操作按 Lipofectamine 2000 说明书进行,6 h 后更换含 10% 小牛血清培养液继续培养 48 h。

1.2.3 细胞克隆实验 高密度和低密度培养 C13K 及 OV2008 细胞,分别制备成低接种量 ($5 \times 10^3/\text{cm}^2$) 和高接种量 ($1 \times 10^4/\text{cm}^2$) 细胞悬液,以 1 ml/孔将细胞接种于 6 孔板,继续培养至肉眼可见细胞集落时,吉姆萨染色,显微镜下观察并计数(每孔随机选取 5 个视野),实验重复 3 次。

1.2.4 免疫荧光检测细胞 Ki67 表达 培养 C13K 及 OV2008 细胞至对数期,0.25% 胰酶消化、分别以低接种量 ($5 \times 10^3/\text{cm}^2$) 和高接种量 ($1 \times 10^4/\text{cm}^2$) 接种于 6 孔培养板,放入盖玻片。置于 5% CO_2 浓度、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中进行细胞爬片,48 h 取出盖玻片,4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷丙酮固定 10 min,PBS 洗 5 min $\times 3$ 次。2.5 g/L 的 TritonX-100 破膜 5 min,PBS 洗 5 min $\times 3$ 次。加 Ki67 抗体 (1 : 100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 洗 10 min $\times 3$ 次。加 FITC 标记的稀释兔抗鼠 IgG (1 : 100),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h,PBS 洗 10 min $\times 3$ 次,

吸干 PBS,加入抗荧光淬灭剂,荧光显微镜观察拍照。

1.2.5 qRT-PCR 检测 YAP mRNA 表达 TRIzol 提取细胞 RNA,逆转录后按照 SYBR Green Real-time PCR 试剂盒说明书操作,ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行实时荧光定量聚合酶链反应。以 U6 为实验内参,PCR 引物序列 YAP 上游 5'-CGCTCTTCAACGCCGTC-3',下游 5'-AGTACTGGCCTGTCGGGAGT-3';U6 上游 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3',下游 5'-CGAACGCTTCACGAATTTG-3';条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 34 s,重复 2、3 步骤 40 个循环,YAP 表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。

1.2.6 Western blot 检测 YAP 蛋白水平 RIPA 裂解液裂解细胞,BCA 试剂盒定量,SDS-PAGE 中行电泳分离,转移至 PVDF 膜。用封闭液封闭 1 h,之后加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,用成像系统检测印迹并拍照,使用 Image J 分析 YAP 蛋白灰度值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验,计数资料比较用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Kaplan-Meier 法计算生存率和生存时间,并根据这些数据绘制生存曲线,使用 Log-rank 检验进行生存比较和生存差异的评估。Cox 风险回归模型进行多因素分析各临床病理特征与预后的关系。

2 结果

2.1 YAP 表达与 EOC 临床病理特征的关系 如图 1 所示,EOC 组织胞质及核中均有 YAP 阳性染色,为棕黄色染色,主要位于细胞核。正常卵巢上皮组织中 YAP 染色着色淡,主要位于细胞质中,细胞核表达极低。EOC 组织 YAP 阳性表达率(70.8%) 高于正常卵巢上皮组织阳性表达率(23.3%) ($P < 0.05$),肿瘤大小 ≥ 10 cm 的 EOC 中 YAP 核表达低于肿瘤大小 < 10 cm 的 EOC ($P < 0.05$)。I + II 期 EOC 肿瘤平均直径大于 III + IV 期 EOC ($P < 0.01$) (表 1)。临床病理学分析提示:YAP 核高表达与肿瘤大小(< 10 cm)、肿瘤分期、组织学分化程度及 CA125 水平($> 1 000$ IU/ml) 相关($P < 0.05$),而与患者年龄、腹水以及病理类型的相关性差异无统计学意义($P > 0.05$) (表 2)。

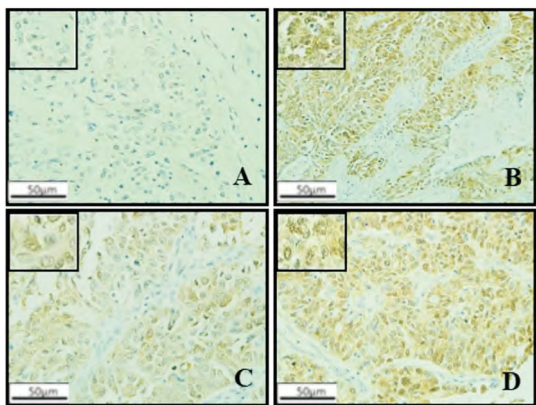


图1 不同卵巢组织及不同肿瘤大小 YAP 表达比较 ×200
A: 正常卵巢上皮; B: EOC; C: EOC(≥10 cm); D: EOC(<10 cm)

表1 两组 EOC 患者肿瘤大小比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	肿瘤大小(cm)	t 值	P 值
早中期 EOC	38	14.01 ± 2.48	21.89	<0.01
晚期 EOC	82	7.15 ± 0.94		

表2 YAP 核表达与 EOC 患者临床病理特征的关系

临床病理特征	n	YAP		χ^2 值	P 值
		阳性(85)	阴性(35)		
年龄(岁)					
≥50	89	65	24	0.807	0.668
<50	31	20	11		
FIGO 分期					
I ~ II 期	38	21	17	6.525	0.011
III ~ IV 期	82	64	18		
腹水(ml)					
≥1 000	64	42	22	1.801	0.180
<1 000	56	43	13		
病理组织类型					
浆液性	98	68	30	0.541	0.462
非浆液性	22	17	5		
分化程度					
G1	18	8	10	9.143	0.000
G2	6	3	3		
G3	96	74	22		
肿瘤大小(cm)					
≥10	43	23	20	9.758	0.002
<10	77	62	15		
CA125 (IU/ml)					
≥1 000	34	29	5	4.802	0.028
<1 000	86	56	30		

2.2 YAP 核表达、临床病理参数及 EOC 患者预后关系 根据肿瘤直径大小(≥10 cm 或 <10 cm)将 120 例 EOC 患者分为两组进行随访。多因素回归分析提示: YAP 核高表达、FIGO 分期、腹水 ≥ 1 000 ml、组织分化差、CA125 ≥ 1 000 IU/ml 以及肿瘤大小 <10 cm 是 EOC 不良愈后的独立因素(表

3)。Kaplan-Meier 法进一步分析显示: YAP 核低表达且肿瘤大小 ≥ 10 cm 患者的 3 年生存率最高(79.1%), YAP 核高表达且肿瘤大小 <10 cm 患者的 3 年生存率最低(28.7%), YAP 核高表达且肿瘤大小 ≥ 10 cm 及 YAP 核低表达且肿瘤大小 <10 cm 患者的 3 年生存率居中, 约为 51% (图 2)。以上结果提示肿瘤直径较小(<10 cm)及 YAP 核高表达是 EOC 患者预后的独立危险因素。

表3 多因素 Cox 比例风险回归模型分析影响

临床病理特征	EOC 患者总生存期的因素					
	多因素回归模型					
	B	SE	Wals	HR	95% CI 上限值 下限值	P 值
YAP 阳性	1.486	0.122	11.620	1.874	2.084 1.043	0.016
年龄 ≥ 50 岁	0.814	0.426	1.224	1.408	2.560 0.712	0.684
FIGO 分期(III ~ IV/ I ~ II)	1.297	0.518	5.459	12.413	18.125 7.459	<0.001
腹水 ≥ 1 000 ml	1.429	0.261	1.109	2.518	3.126 2.105	0.012
组织学浆液性	0.965	0.756	0.845	1.065	1.453 0.624	0.512
分化(G3/G2,G1)	1.624	0.235	4.513	4.476	6.478 3.286	0.001
肿瘤大小 <10 cm	0.812	0.154	3.627	4.415	5.128 2.896	0.028
CA125 ≥ 1 000 (IU/ml)	0.978	0.129	3.165	2.906	4.052 1.987	<0.001

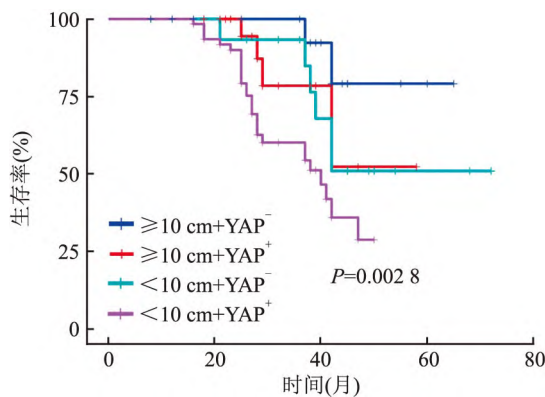


图2 不同 YAP 核表达和肿瘤大小的 EOC 患者生存曲线

2.3 卵巢癌细胞生长受细胞密度负调控 与高密度组比较, 低密度组 C13K 及 OV2008 细胞形成克隆数目增多, 差异有统计学意义, 提示细胞在高密度时存在接触抑制现象, 高密度生长时细胞增殖受到抑制($P < 0.01$) (图 3)。

2.4 高密度生长时细胞增殖受到抑制 Ki67 免疫荧光实验结果表明, 与低密度生长细胞相比, 高密度 C13K 及 OV2008 细胞核中 Ki67 荧光表达下降, 提示卵巢癌细胞的增殖能力在高密度生长下减弱(图 4)。

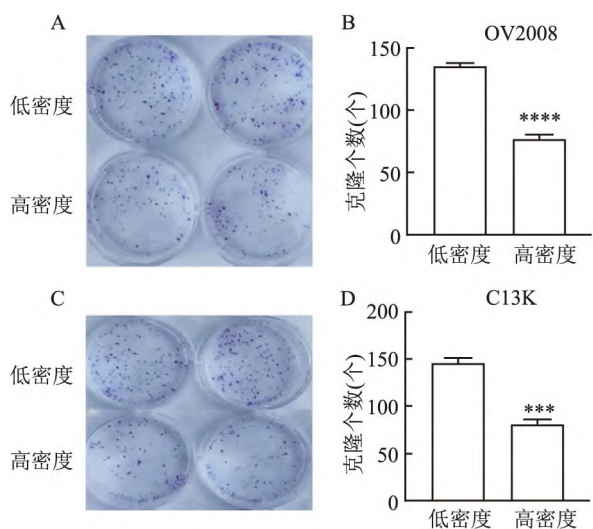


图3 细胞培养密度对 EOC 细胞克隆形成的影响

A、B:OV2008 细胞克隆形成情况;C、D:C13K 细胞克隆形成情况;与低密度比较:*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$

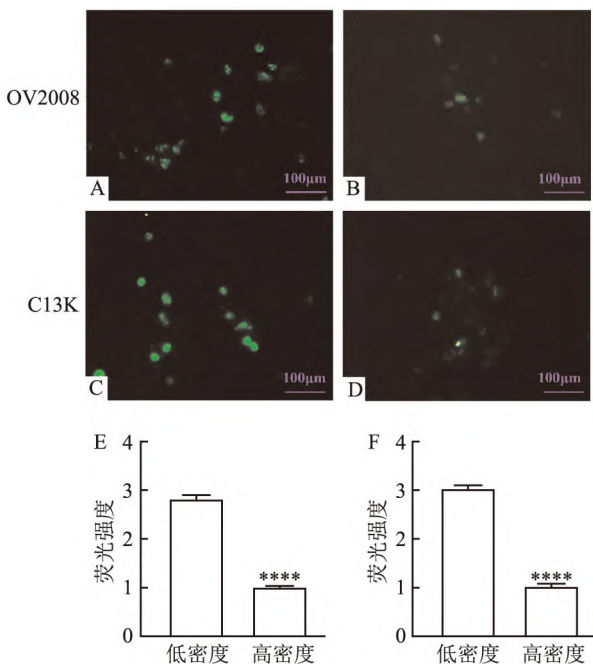


图4 Ki67 的免疫荧光表达 $\times 200$

A、B:低和高密度 OV2008 细胞 Ki67 蛋白的免疫荧光;C、D:低和高密度 C13K 细胞中 Ki67 蛋白免疫荧光;E、F:低密度和高密度 OV2008、C13K 细胞中 Ki67 蛋白的免疫荧光值比较;与低密度比较:**** $P < 0.0001$

2.5 YAP 在低密度和高密度 EOC 细胞中表达及 YAP 敲低效率检测 为探讨 YAP 表达与细胞密度的关系,使用 qRT-PCR 检测 C13K 及 OV2008 细胞中 YAP mRNA 的表达,结果提示:低密度生长的两株细胞中 YAP mRNA 水平均高于高密度生长细胞 ($P < 0.0001$) (图 5)。Western blot 结果也表明低

密度生长的细胞中 YAP 蛋白水平均高于高密度生长细胞(图 6)。

为进一步展示 YAP 蛋白对 EOC 细胞增殖的调控,运用靶向 YAP 的 siRNA 制备 YAP 瞬时敲低 EOC 细胞株,并使用 qRT-PCR 和 Western blot 检测敲低效率,结果表明 YAP mRNA 和蛋白表达水平均显著下降(图 5、6)。

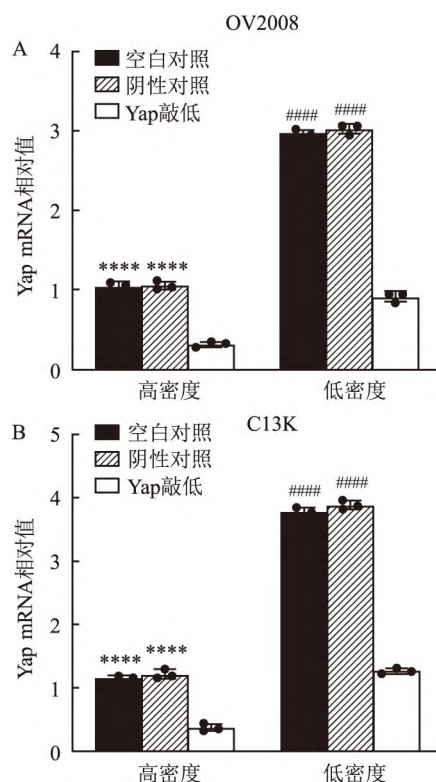


图5 YAP mRNA 在 OV2008 和 C13K 细胞中的表达

A:高、低密度培养的 OV2008 细胞中 Yap mRNA 的相对值;B:高、低密度培养的 C13K 细胞中 Yap mRNA 的相对值;与高密度 Yap 敲低组比较:**** $P < 0.0001$;与低密度 Yap 敲低组比较:#### $P < 0.0001$

2.6 YAP 敲低能减弱 EOC 细胞的增殖能力 为进一步研究 YAP 对 EOC 细胞增殖的影响,将 2 株 EOC 细胞按低密度和高密度接种后培养 2 d 并计数以比较 YAP 敲低前后细胞的增殖能力。结果表明,无论是 C13K 及 OV2008 细胞,YAP 敲低组在低密度和高密度生长时增殖能力均下降,其中低密度生长时下降更为显著($P < 0.01$) (图 7、8)。

3 讨论

在实体肿瘤如宫颈癌、乳腺癌、肝癌中,肿瘤大小多被用于临床分期和患者预后评估,但基于 EOC 肿瘤大小来判断肿瘤分期及预后仍存在较大争议。

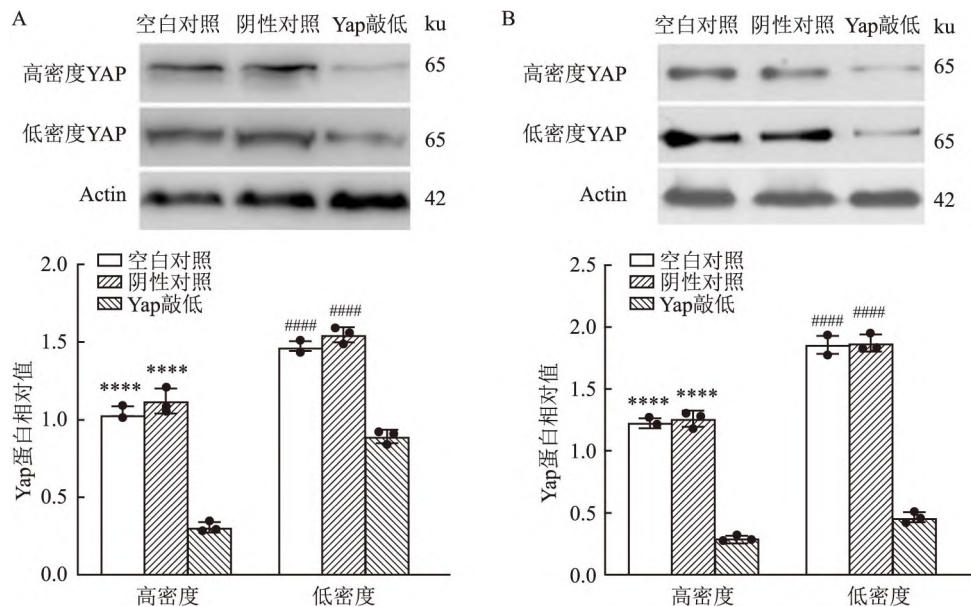


图6 YAP 蛋白在 OV2008 和 C13K 细胞中的表达

A:OV2008 细胞中 Yap 蛋白的表达;B:C13K 细胞中 Yap 蛋白的表达;与高密度 Yap 敲低组比较:**** $P < 0.0001$;与低密度 Yap 敲低组比较:#### $P < 0.0001$

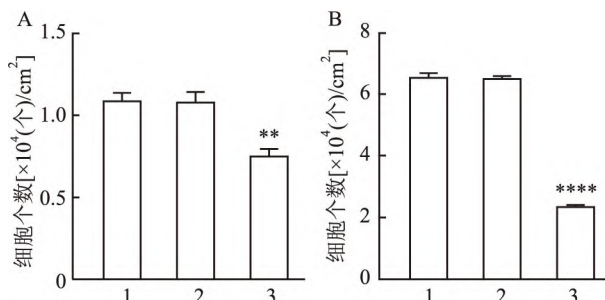


图7 YAP 敲低前后 OV2008 细胞低密度和高密度生长时细胞增殖变化

A:高密度培养的 OV2008 细胞的细胞个数;B:低密度培养的 OV2008 细胞的细胞个数;1:空白对照组;2:阴性对照组;3:Yap 敲低组;与阴性对照组比较:*** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

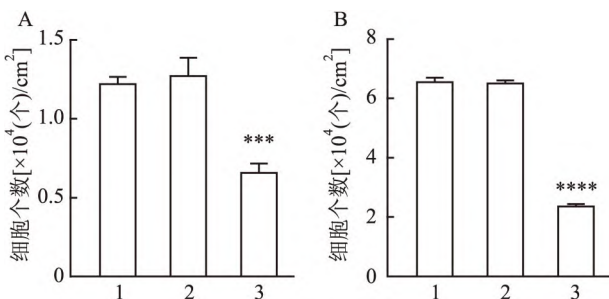


图8 YAP 敲低前后 C13K 细胞低密度和高密度生长时细胞增殖变化

A:高密度培养的 C13K 细胞的细胞个数;B:低密度培养的 C13K 细胞的细胞个数;1:空白对照组;2:阴性对照组;3:Yap 敲低组;与阴性对照组比较:*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

Horvath et al^[6]对 110 例 EOC 的研究发现早期 EOC 肿瘤体积大于晚期 EOC。Paik et al^[7]发现瘤体正常大小的晚期浆液性卵巢癌较之瘤体大者预后更差。一项小样本临床研究则认为晚期 EOC 的初始肿瘤负荷与接受完全性肿瘤细胞减灭术患者的预后相关^[8]。但另一项对 553 例 I/III 期卵巢癌的研究表明 III 期卵巢癌肿瘤体积大于 I 期, III 期卵巢癌患者预后不良与腹腔转移灶大小相关^[9]。鉴于肿瘤大小在 EOC 分期和预后评估中的争议性结果,本研究针对 120 例 EOC 进行分析,包括 38 例 I/II 期 EOC,82 例 III/IV 期 EOC,显示 EOC 早中期肿瘤体积大于晚期肿瘤体积(14.0 cm vs 7.2 cm),且瘤体较小患者预后差于体积较大者。这提示早中期和晚期 EOC 发展可能是两种不同模式,因此,有必要研究 EOC 瘤体大小的调控因素。

有研究^[10-13]提示 YAP 是一种致癌因子,在乳腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌以及血液系统肿瘤中均表达升高,其高表达与肿瘤增殖及远处转移等密切相关。本研究通过免疫组化方法研究 EOC 原发灶中 YAP 表达,显示 EOC 组织中 YAP 核阳性率约 70.8%,正常卵巢组织中 YAP 阳性率仅为 23.3%。临床病理资料分析显示 III + IV 期,肿瘤直径 < 10 cm 的 EOC 中 YAP 核表达高于 I + II 期,肿瘤直径 ≥ 10 cm 的 EOC,表明 YAP 核高表达与 EOC 临床分期呈正相关,而与肿瘤大小呈负相关。120 例 EOC 患

者的生存分析结果则表明肿瘤体积较小 (< 10 cm), YAP 核高表达的 EOC 患者 3 年总生存率更低, 提示这两个变量可能是 EOC 患者的独立危险因素。综上, YAP 在 EOC 组织的高表达, 尤其 YAP 核高表达及肿瘤体积较小与 EOC 患者不良预后相关。

本实验观察到体积较小的 EOC 肿瘤组织中 YAP 核表达反而高于体积较大的肿瘤。同时, 体外实验中, 低密度培养的 C13K 及 OV2008 细胞中 YAP 表达高于高密度培养细胞, 且敲低 C13K 和 OV2008 细胞中 YAP 表达可诱导细胞增殖阻滞, 尤其在低密度培养的细胞中该现象更为明显。这表明 YAP 可能参与调控 EOC 细胞的增殖。前期研究提示 YAP 对癌细胞增殖调控的作用与其胞内定位有关, Hoxha et al^[14] 研究发现低密度培养细胞中 YAP/TAZ 主要定位于细胞核, 促进靶基因转录和细胞增殖。相反, 高密度培养细胞中 YAP/TAZ 主要位于细胞质, 参与生长抑制。因此推测, 低密度培养 EOC 细胞可能通过调节某些细胞因子, 使 YAP 发生核转位而促进 EOC 细胞增殖, 具体机制有待深究。

综上所述, YAP 核高表达及肿瘤大小是 EOC 患者的预后影响因素; 细胞低密度培养诱导 YAP 表达上调, 进而促进细胞增殖, 其机制可能与细胞低密度促进 YAP 核转位, 进而促进 YAP 下游靶基因转录相关。目前的研究涉及实验样本较少, 随访时间相对较短, 对相关作用机制的研究较为粗浅, 后续还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584–90.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68

- (6): 394–424.
- [3] Yu F X, Zhao B, Guan K L. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer[J]. *Cell*, 2015, 163(4): 811–28.
- [4] Ibar C, Irvine K D. Integration of hippo-YAP signaling with metabolism[J]. *Dev Cell*, 2020, 54(2): 256–67.
- [5] Mohajan S, Jaiswal P K, Vatanmakarian M, et al. Hippo pathway: regulation, deregulation and potential therapeutic targets in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 507: 112–23.
- [6] Horvath L E, Werner T, Boucher K, et al. The relationship between tumor size and stage in early versus advanced ovarian cancer [J]. *Med Hypotheses*, 2013, 80(5): 684–7.
- [7] Paik E S, Kim J H, Kim T J, et al. Prognostic significance of normal-sized ovary in advanced serous epithelial ovarian cancer[J]. *J Gynecol Oncol*, 2018, 29(1): e13.
- [8] Uzan J, Bonsang-Kitzis H, Rossi L, et al. Prognostic impact of initial tumor load and intraperitoneal disease dissemination patterns in patients with advanced ovarian cancer undergoing complete cytoreductive surgery[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2019, 45(9): 1619–24.
- [9] Petru E, Huber C, Sampl E, et al. Comparison of primary tumor size in stage I and III epithelial ovarian cancer[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(11): 6507–11.
- [10] Thompson B J. YAP/TAZ: drivers of tumor growth, metastasis, and resistance to therapy [J]. *Bioessays*, 2020, 42(5): e1900162.
- [11] Malgundkar S H, Burney I, Al M M, et al. FAT4 silencing promotes epithelial-to-mesenchymal transition and invasion *via* regulation of YAP and beta-catenin activity in ovarian cancer[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 374.
- [12] 张红霞, 吴广胜. miR-1285 通过 YAP 对慢性粒细胞白血病 K562 细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(4): 569–73.
- [13] Piccolo S, Panciera T, Contessotto P, et al. YAP/TAZ as master regulators in cancer: modulation, function and therapeutic approaches[J]. *Nat Cancer*, 2023, 4(1): 9–26.
- [14] Hoxha S, Shepard A, Troutman S, et al. YAP-mediated recruitment of YY1 and EZH2 represses transcription of key cell-cycle regulators[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(12): 2512–22.

The correlation between YAP nuclear expression and tumor size with prognosis of epithelial ovarian cancer

Li Zelian, Xiao Lan, Jiang Yu, Ji Weixue, Chen Ying, Yang Yuanyuan, Cao Yunxia

(Dept of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the correlation between Yes-associated protein (YAP) nuclear expression and tumor size with prognosis of patients with epithelial ovarian cancer (EOC) and to study the role of YAP in EOC.

Methods 120 patients with EOC were selected as the experimental group, including 38 patients with early stage (I + II) EOC and 82 patients with advanced stage (III + IV) EOC. 30 normal ovarian tissues obtained from

过表达 NRF1 减轻阿尔茨海默病模型小鼠的线粒体和认知功能障碍

苏立宁¹, 王艳兵², 张永财¹

摘要 目的 探讨核呼吸因子 1 (NRF1) 对阿尔茨海默病疾病 (AD) 模型小鼠线粒体和认知功能障碍的影响。方法 以 5 × FAD 小鼠作为 AD 模型小鼠, 并用脑立体定位注射稀疏标记的过表达 NRF1 的 AAV 病毒 (AAV-NRF1)。Western blot 法测定海马中 NRF1 的表达; 用透射电镜观察海马中线粒体形态; 用激光共聚焦显微镜观察 CA1 区稀疏标记神经元的树突棘并计数; Morris 水迷宫实验评估小鼠认知和记忆功能; 电生理法检测突触效能的长时程增强效应 (LTP)。结果 脑立体注射 AAV-NRF1 后, 海马中 NRF1 表达升高 ($P < 0.001$), 海马神经元中线粒体形态明显改善, 小鼠的认知和记忆功能提高 ($P < 0.01$), 海马 CA1 区神经元的树突棘密度

增加 ($P < 0.001$) 并产生持久稳定的 LTP 且 fEPSP 斜率增高 ($P < 0.01$)。结论 在 5 × FAD 小鼠 AD 模型中, NRF1 过表达触发了线粒体功能障碍的修复, 并改善了突触可塑性, 推测这些改变参与到了过表达 NRF1 对 AD 认知功能障碍改善的治疗效果中。

关键词 阿尔茨海默病; 海马; 核呼吸因子 1; 线粒体; 认知功能; 基因治疗

中图分类号 R 741.02

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0304-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.020

2023-12-19 接收

基金项目: 河北省年度医学科学研究计划项目 (编号: 20200196); 河北北方学院省属高校基本科研项目 (编号: JYT2023002); 河北北方学院校级科研项目 (编号: H2022405030)

作者单位: ¹ 河北北方学院基础医学院, 张家口 075000

² 河北北方学院体育部, 张家口 075000

作者简介: 苏立宁, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: sulining155@126.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的年龄依赖性神经退行性疾病, 目前尚没有治愈的方法^[1]。近来研究^[2]显示, AD 的发病机制不单独是淀粉样 β 蛋白 (amyloid- β protein, A β) 沉积的线性下游结果, 而是一种多种因素共同参与调控的疾病。其中, 线粒体功能障碍可能是驱动更为普遍的散发迟发性 AD 病理生理学的主要损伤, 并将其称为“线粒体级联假说”^[3-4]。线粒体生物发生

patients with uterine leiomyoma were enrolled as the control group. Immunohistochemical (IHC) assay was employed to determine YAP expression and sub-location. The relationship between YAP expression and the pathological parameters of the 120 patients with EOC was analyzed, so as to the prognosis of these patients. EOC cells (C13K and OV2008) were cultured with varying initial cell volumes. Ki67 expression and cell proliferation were tested by immunofluorescence and cloning assay respectively. YAP expression at mRNA and protein levels were detected by q-PCR and Western blot respectively when the cell confluence of EOC cells reached to low (60%) and high (90%) cell density. **Results** The YAP nuclear expression was significantly higher in the EOC group compared to the control group ($P < 0.05$). The average diameter of stage I + II EOC was larger than that of stage III + IV EOC ($P < 0.01$). The high nuclear expression of YAP was positively associated with pathological grade, clinical stage and the level of Ca125 $> 1\ 000$ IU/ml, while negatively correlated with tumor size (all $P < 0.05$). Survival analyses showed that smaller tumor size (< 10 cm) and higher YAP nuclear expression were negatively associated with the 3-year overall survival rate of EOC patients ($P < 0.01$). C13K and OV2008 cells cultured in the low density group exhibited a high number of clone formation, high Ki67 and YAP expression ($P < 0.01$). The down-regulation of YAP expression could decrease the cell viability of EOC cells in the low-and high-density groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Higher level of YAP nuclear expression and smaller tumour size are inversely associated with the clinical prognosis of patients with EOC. Inhibiting YAP nuclear expression leads to a decrease in the proliferation capacity of EOC cells.

Key words YAP; epithelial ovarian cancer; cell proliferation; tumor size; cell density; prognosis