

YAP1 和 β -catenin 在大肠癌中的表达及相关性研究

陈顺华^{1,2}, 尹玉^{1,2}, 曹立宇^{1,2}, 张聪^{1,2}, 李玉洁^{1,2}

摘要 目的 探讨 Yes 相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP1) 和 β -连环蛋白 (β -catenin) 在大肠癌组织中的表达及其与肠癌患者临床病理因素间的关系。方法 应用免疫组织化学 Envision 二步法检测 YAP1 和 β -catenin 在 99 例人大肠癌组织及 30 例正常肠黏膜组织中的表达状况。结果 YAP1 蛋白在大肠癌组织中的阳性表达率为 56.57% (56/99), 显著高于正常肠黏膜组织 16.67% (5/30) ($\chi^2 = 14.704, P < 0.01$); β -catenin 蛋白在大肠癌组织中的异位 (细胞质/核) 表达率为 51.52% (51/99), 明显高于正常肠黏膜组织 0% (0/30) ($\chi^2 = 25.559, P < 0.01$)。YAP1 蛋白的表达与患者性别、年龄、肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移及临床 Duke's 分期均无关; β -catenin 蛋白的细胞核表达与大肠癌的分化程度及浸润深度相关 ($\chi^2 = 6.641, 4.229, P < 0.05$); β -catenin 蛋白的细胞质表达水平与大肠癌的分化程度相关 ($\chi^2 = 6.761, P < 0.05$); β -catenin 蛋白的细胞膜表达水平与临床病理因素均无关。 β -catenin 蛋白细胞质、细胞核的表达与 YAP1 细胞核、细胞质/核的表达呈正相关性 ($P < 0.05$); β -catenin 蛋白细胞核表达与 YAP1 细胞质的表达呈正相关性 ($P < 0.05$)。结论 YAP1 和 β -catenin 在大肠癌的发生发展中均具有重要作用, β -catenin 细胞的核表达可能有助于大肠癌的预后判断。

关键词 大肠癌; YAP1; β -catenin; 免疫组织化学

中图分类号 R 735.34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)06-0836-05

大肠癌 (colorectal carcinoma, CRC) 是人类最常见的恶性肿瘤之一, 其发生、发展与个体因素及环境因素有关, 在这一过程中有一系列与信号传导通路有关的基因参与^[1]。Wnt 信号传导通路控制细胞的增殖、分化和形态形成, β -连环蛋白 (β -catenin) 作为 Wnt 信号通路的重要成员, 介导 Wnt 信号通路的异

常激活, 与大肠癌的发生关系密切^[2]。Hippo 信号通路最初在果蝇体内发现, 是调节细胞增殖与凋亡的重要的信号传导通路。Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 是 YAP1 基因的编码产物, 因此 YAP 也被称为 YAP1。YAP1 (Yes-associated protein 1) 是 Hippo 通路的下游信号分子, 具有促进细胞增殖、抑制凋亡的作用。Hippo 通路中的其它因子可通过磷酸化负性调控 YAP, 而该通路的异常调节可促进 YAP 的过表达, 见于多个人类肿瘤包括结肠癌^[3-4]。国外最新研究^[5]提示 YAP 过表达可协同 β -catenin 促进肠道干细胞及肿瘤细胞的增殖。该实验采用免疫组织化学法检测 YAP1 和 β -catenin 在大肠癌中的表达, 探讨 Hippo 及 Wnt 信号通路在大肠癌发生发展中的作用、相互关系及临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 收集安徽医科大学第一附属医院病理科 2010 年 7 月~2013 年 12 月间大肠癌手术切除标本 99 例, 所有病例术前未接受放疗、化疗及其它针对肿瘤的特殊治疗, 术后均经病理证实。另取 30 例距大肠癌灶边缘 5 cm 以上的正常大肠黏膜组织作为对照。所有标本经 10% 中性福尔马林液固定, 石蜡包埋, 常规 4 μ m 连续切片, 分别作 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 YAP1 多克隆抗体和兔抗人 β -catenin 多克隆抗体均购自英国 Abcam 公司; 免疫组织化学 Envision 二步法染色试剂盒及柠檬酸修复液 (pH 6.0) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2 实验方法 免疫组织化学染色 (Envision 二步法) 参照试剂盒说明书操作, 用已知阳性切片作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定 YAP1 免疫组化染色表达主要定位于细胞质及细胞核内, β -catenin 可定位于细胞膜、细胞质及细胞核内, 阳性细胞呈黄/棕黄色颗粒。采用半定量方法^[6]判断结果: ① 按细胞染色强弱评

2016-03-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81201536); 安徽省高校省级自然科学基金研究项目 (编号: KJ2013A150)

作者单位: ¹安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230022

作者简介: 陈顺华, 女, 硕士研究生;

尹玉, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: aydy-inyu@aliyun.com;

曹立宇, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ca-oliyuhf@163.com

分:0分不着色;1分浅黄色;2分棕黄色;3分棕褐色;②选取5个高倍视野($\times 400$),计数阳性染色细胞占细胞总数的百分比:0分, $<10\%$;1分, $10\% \sim 25\%$;2分, $25\% \sim 50\%$;3分, $50\% \sim 75\%$;4分, $>75\%$ 。按①、②乘积判断结果:0~4为阴性,5~12为阳性。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件进行分析。计数资料采用 χ^2 检验方法及 Fisher 精确概率法比较各组间的差异,相关性分析采用 Pearson 检验。

2 结果

2.1 YAP1 和 β -catenin 蛋白在大肠癌组织和正常大肠黏膜组织中的表达 在大肠癌组织中,YAP1 可定位于细胞质及细胞核,其阳性表达率为 56.57% (56/99),其中细胞质、细胞核及细胞质/核同时表达的阳性表达率分别为 56.57% (56/99)、44.44% (44/99)、44.44% (44/99);在大肠癌组织中, β -catenin 可定位于细胞膜、细胞质及细胞核,其异位(细胞质/核)表达率为 51.52% (51/99),其中细胞膜、细胞质、细胞核及核质同时表达的阳性表达率分别为 52.53% (52/99)、32.32% (32/99)、37.37% (37/99)、18.18% (18/99)。YAP1 和 β -catenin 蛋白在 30 例正常大肠黏膜组织中的表达率分别为 16.67% (5/30)、0% (0/30)。YAP1 蛋白在大肠癌组织中的表达显著高于正常大肠黏膜组织 ($\chi^2 = 14.704, P < 0.01$), β -catenin 蛋白在大肠癌组织中的异位表达显著高于正常大肠黏膜组织 ($\chi^2 = 25.559, P < 0.01$)。见图 1~2。

2.2 大肠癌中 YAP1 和 β -catenin 蛋白表达与临床病理因素之间的关系 YAP1 蛋白表达水平与临床病理因素均无关(表 1)。 β -catenin 蛋白的细胞核表达水平与大肠癌的分化程度及浸润深度相关 ($\chi^2 = 6.641, 4.229, P < 0.05$),与患者性别、年龄、淋巴结转移及临床 Duke's 分期均无关; β -catenin 蛋白的细胞质表达水平与大肠癌的分化程度相关 ($\chi^2 = 6.761, P < 0.05$),与其它临床病理因素无关; β -catenin 蛋白的细胞膜表达水平与临床病理因素均无关,见表 2。

2.3 YAP1 和 β -catenin 蛋白在大肠癌组织中表达之间的关系 YAP1 和 β -catenin 蛋白在大肠癌组织中的表达经 Pearson 等级相关分析处理后显示: β -catenin 细胞质的表达与 YAP1 细胞核及 YAP1 细胞质/核的表达呈正相关性 ($r = 0.208, P = 0.039$);

β -catenin 细胞质的表达与 YAP1 细胞质的表达无相关性 ($r = 0.126, P = 0.213$)。 β -catenin 细胞核的表达与 YAP1 细胞质、细胞核及细胞质/核的表达均呈正相关性 ($r = 0.214, P = 0.034$; $r = 0.317, P = 0.001$; $r = 0.317, P = 0.001$)。 β -catenin 细胞质/核的表达和 YAP1 细胞质、细胞核、细胞质/核的表达均无相关性 ($r = 0.096, P = 0.344$; $r = 0.158, P = 0.118$; $r = 0.096, P = 0.344$)。见表 3。

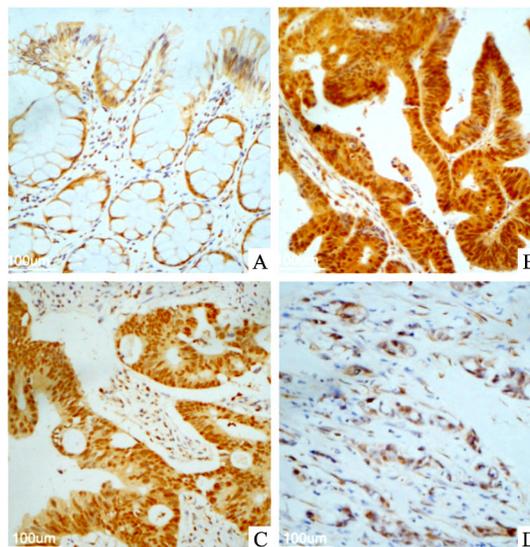


图 1 YAP1 在大肠正常组织和大肠癌组织中的表达 $\times 200$
A: 大肠正常组织; B: 高分化肠癌组织; C: 中分化肠癌组织; D: 低分化肠癌组织

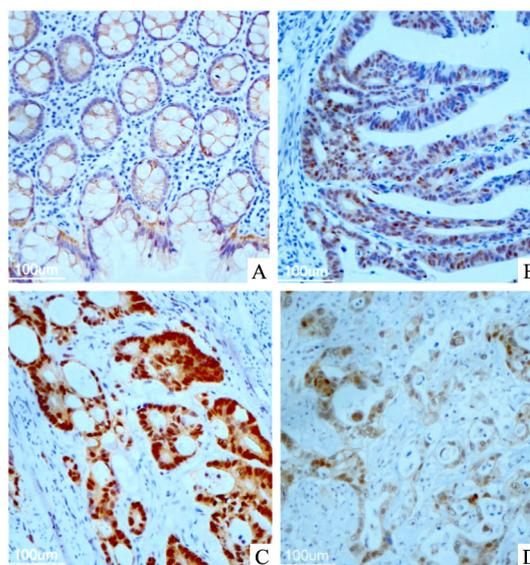


图 2 β -catenin 在大肠正常组织和大肠癌组织中的表达 $\times 200$
A: 大肠正常组织; B: 高分化肠癌组织; C: 中分化肠癌组织; D: 低分化肠癌组织

表1 大肠癌组织中 YAP1 的表达与临床病理参数之间的关系(n)

项目	n	YAP1 细胞核				YAP1 细胞质			
		+(n = 44)	-(n = 55)	χ^2 值	P 值	+(n = 56)	-(n = 43)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)									
<56	30	12	18	0.344	0.557	17	13	0.000	0.989
≥56	69	32	37			39	30		
性别									
男	63	26	37	0.707	0.400	34	29	0.476	0.490
女	36	18	18			22	14		
分化程度									
高	24	12	12	3.467	0.191	13	11	2.364	0.310
中	64	30	34			39	25		
低	11	2	9			4	7		
浸润深度									
T1 ~ T2	33	14	19	0.082	0.775	19	14	0.021	0.886
T3 ~ T4	66	30	36			37	29		
淋巴结转移									
无	47	19	28	0.585	0.444	28	19	0.330	0.566
有	52	25	27			28	24		
Duke's 分期									
A + B	27	12	15	0.000	1.000	16	11	0.110	0.741
C + D	72	32	40			40	32		

表2 大肠癌组织中 β -catenin 的表达与临床病理参数之间的关系(n)

项目	n	β -catenin 细胞核				β -catenin 细胞质				β -catenin 细胞膜			
		+(n = 37)	-(n = 62)	χ^2 值	P 值	+(n = 32)	-(n = 67)	χ^2 值	P 值	+(n = 52)	-(n = 47)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)													
<56	30	10	19	0.146	0.702	8	22	0.630	0.428	16	14	0.011	0.915
≥56	69	27	43			24	45			36	33		
性别													
男	63	24	39	0.039	0.844	18	46	1.459	0.227	32	31	0.208	0.648
女	36	13	23			14	21			20	16		
分化程度													
高	24	14	10	6.641	0.039	8	16	6.761	0.030	13	11	1.298	0.523
中	64	21	43			24	40			35	29		
低	11	2	9			0	11			4	7		
浸润深度													
T1 ~ T2	33	17	16	4.229	0.040	13	20	1.131	0.287	16	17	0.324	0.569
T3 ~ T4	66	20	46			19	47			36	30		
淋巴结转移													
无	47	17	30	0.055	0.814	13	34	0.890	0.346	25	22	0.016	0.900
有	52	20	32			19	33			27	25		
Duke's 分期													
A + B	27	13	14	1.841	0.175	10	17	0.377	0.539	13	14	0.285	0.593
C + D	72	24	48			22	50			39	33		

3 讨论

Wnt 信号通路是控制细胞增殖、分化和形态形成最重要的通路之一。 β -catenin 最早作为一种黏附因子被发现,主要由 CTNNB1 基因编码。 β -catenin 可存在于细胞的不同部位: ① 和 E-cadherin 相互作用,定位于细胞膜; ② 定位于细胞质; ③ 定位于细胞核。 β -catenin 是 Wnt 信号通路最重要的效

应因子,其稳定性受糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3 β)、结直肠腺息肉肉蛋白 (adenomatous polyposis coli, APC) 以及轴蛋白 (axin) 组成的蛋白复合体即 APC 复合体的调节。在 WNT 受体失活的情况下, β -catenin 定位于细胞膜, APC 复合体中的激酶会磷酸化胞质中的 β -catenin 从而使其迅速降解。相反, WNT 与 Frizzled 和 LRP 共受体结合,可抑制 APC 复合体活性,使 β -catenin 聚

表3 大肠癌组织中 YAP1 和 β -catenin 蛋白表达之间的关系(n)

项目	n	YAP1 细胞质			YAP1 细胞核			YAP1 细胞质/核		
		+(n=56)	-(n=43)	P 值	+(n=44)	-(n=55)	P 值	+(n=44)	-(n=55)	P 值
β -catenin 细胞质										
+	32	21	11	0.213	19	13	0.039	19	13	0.039
-	67	35	32		25	42		25	42	
β -catenin 细胞核										
+	37	26	11	0.034	24	13	0.001	24	13	0.001
-	62	30	32		20	42		20	42	
β -catenin 细胞质/核										
+	18	12	6	0.344	11	7	0.118	11	7	0.118
-	81	44	37		33	48		33	48	

集于细胞质进而转移到细胞核与 T 细胞转录因子 (TCF) / 淋巴增强因子 (LEF) 形成复合体, 刺激下游靶基因的转录。该信号通路参与干细胞和祖细胞的自我更新, 其异常调节会与多种肿瘤发生有关, 见于恶性黑色素瘤、肝癌、甲状腺癌、卵巢癌及结直肠癌等^[7-8]。多种恶性肿瘤中 β -catenin 蛋白的异常改变主要表现为 β -catenin 在细胞质/核的异常累积以及 β -catenin 膜表达的缺失。据研究^[2] 90% 以上的大肠癌中, Wnt/ β -catenin 信号通路中的关键的调节因子都发生了突变, 主要发生在 APC 或者 β -catenin, 从而引起该通路的激活, 80% 以上的大肠癌 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活, 导致 β -catenin 表达于细胞核。本研究结果显示 β -catenin 在大肠癌中的异位(细胞质/核)表达率为 51.52% (51/99), 显著高于正常肠黏膜 0% (0/30), 提示 β -catenin 在大肠癌的发生发展中可能起重要作用。本研究中 β -catenin 的异位表达与肿瘤分化存在相关关系, 提示 β -catenin 异常表达与细胞恶性转化联系紧密, β -catenin 细胞核的表达与肠癌的浸润深度相关, 提示 β -catenin 异常表达与疾病进展联系紧密。

YAP1 是 Hippo 信号通路的关键的调节蛋白, 其在细胞内的定位主要取决于是否磷酸化。当 Hippo 通路激活, 会使 YAP 磷酸化, 磷酸化的 YAP 与胞质中的 14-3-3 蛋白相互作用并聚集在胞质中。一旦 Hippo 通路失活, YAP 就会转移到细胞核, 与 TEAD 结合, 促进生长相关基因的表达, 如结缔组织生长因子 (CTGF) 及表皮生长因子家族成员之一的双调蛋白 (AREG) 等^[4], 提示 Hippo 信号通路通过磷酸化负调控 YAP, 从而调节细胞的增殖和凋亡, 使其聚集在胞质, 不能转移到细胞核并促进靶基因的表达。在人类多种肿瘤中, 如食道癌、胃癌、卵巢癌、结肠癌

中均可见 YAP 过表达及核定位表达, YAP 在细胞核的高表达可作为评判预后的指标^[3,9-11]。本研究结果显示 YAP1 在大肠癌中的阳性表达率为 56.57% (56/99), 显著高于正常黏膜 16.67% (5/30), 提示 YAP1 在大肠癌的发生发展中可能起重要作用。Wang et al^[12] 应用免疫组化法发现 YAP 在肠癌中的表达与淋巴结转移及 TNM 分期存在显著相关性。而本研究中 YAP1 的表达与临床病理因素间均无相关性, 可能是由于选取病例数量有限, 需通过扩大样本量进一步研究。

有文献^[13]报道, Hippo 信号通路的下调和 β -catenin 信号通路的上调有关, 可见于大肠癌。这一相关关系主要是因为磷酸化的 YAP 可与胞质中的 β -catenin 结合从而阻止 β -catenin 的核转移。有报道^[14]显示 YAP 诱导的肠的发育异常可促使 β -catenin 核定位的增加, 暗示着 Wnt 通路的激活。研究^[15]显示人类大肠癌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号异常可促进 YAP 的表达。本研究结果显示 YAP1 和 β -catenin 呈正相关性, 主要体现在 β -catenin 细胞质的表达与 YAP1 细胞核及 YAP1 细胞质/核的表达呈正相关性; β -catenin 细胞核的表达和 YAP1 细胞质、YAP1 细胞核及 YAP1 细胞质/核的表达呈正相关性。与上述报道的结果一致, 提示 YAP1 和 β -catenin 在大肠癌的发生发展过程中存在协同的作用, 也暗示了 Hippo 信号通路与 Wnt/ β -catenin 信号通路在肠癌的发展过程中存在相互作用。但 YAP1 和 β -catenin 在大肠癌发生发展过程中相互作用的具体机制有待进一步的研究。

综上所述, YAP1 和 β -catenin 的异常表达与大肠癌的发生发展有关, 为进一步研究大肠癌发病的分子机制提供理论依据。

参考文献

- [1] 杨 阳, 杨晶晶, 宁 宁 等. YKL-40 和 IL-6 在结肠癌组织中表达变化的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(6): 727 - 30.
- [2] White B D, Chien A J, Dawson D W, et al. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers[J]. *Gastroenterology* 2012, 142(2): 219 - 32.
- [3] Steinhardt A A, Gayyed M F, Klein A P, et al. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors[J]. *Hum Pathol* 2008, 39(11): 1582 - 9.
- [4] Zhang J, Ji J Y, Yu M, et al. YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway[J]. *Nat Cell Biol* 2009, 11(12): 1444 - 50.
- [5] Avruch J, Zhou D, Bardeesy N. Yap oncogene overexpression supercharges colon cancer proliferation[J]. *Cell Cycle* 2012, 11(6): 1090 - 6.
- [6] Gao Z H, Lu C, Wang M X, et al. Differential β -catenin expression levels are associated with morphological features and prognosis of colorectal cancer[J]. *Oncol Lett* 2014, 8(5): 2069 - 76.
- [7] Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease[J]. *Cell* 2006, 127(3): 469 - 80.
- [8] Zhang X, Hao J. Development of anticancer agents targeting the Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Am J Cancer Res* 2015, 5(8): 2344 - 60.
- [9] Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, et al. YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Carcinogenesis* 2011, 32(3): 389 - 98.
- [10] Kang W, Tong J H, Chan A W, et al. Yes-associated protein 1 exhibits oncogenic property in gastric cancer and its nuclear accumulation associates with poor prognosis[J]. *Clin Cancer Res* 2011, 17(8): 2130 - 9.
- [11] Zhang X, George J, Deb S, et al. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene[J]. *Oncogene* 2011, 30(25): 2810 - 22.
- [12] Wang Y, Xie C, Li Q, et al. Clinical and prognostic significance of Yes-associated protein in colorectal cancer[J]. *Tumour Biol* 2013, 34(4): 2169 - 74.
- [13] Imajo M, Miyatake K, Iimura A, et al. A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β -catenin signaling[J]. *EMBO J* 2012, 31(5): 1109 - 22.
- [14] Camargo F D, Gokhale S, Johnmidis J B, et al. YAP1 increases organ size and undifferentiated progenitor cells[J]. *Curr Biol* 2007, 17(23): 2054 - 60.
- [15] Konsavage W M Jr, Kyler S L, Rennoll S A, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells[J]. *J Biol Chem* 2012, 287(15): 11730 - 9.

Expression and relationship of YAP1 and β -catenin in colorectal carcinoma

Chen Shunhua^{1, 2}, Yin Yu^{1, 2}, Cao Liyu^{1, 2}, et al

¹Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of Yes-associated protein 1 (YAP1) and β -catenin in colorectal carcinoma tissues and their association with the clinicopathological features of colorectal carcinoma patients.

Methods The expressions YAP1 and β -catenin in human colorectal carcinoma and colorectal normal tissue (99 cases of human colorectal carcinoma, 30 cases of colorectal normal tissues) were detected by immunohistochemistry Envision two step method.

Results The positive rate of YAP1 in CRC (56. 57%) was higher than that in normal mucosa (16. 67%) ($\chi^2 = 14. 704$, $P < 0. 01$). The abnormal positive rate of β -catenin in CRC (51. 52%) was higher than that in normal mucosa (0%) ($\chi^2 = 25. 559$, $P < 0. 01$). The expression of YAP1 showed no significant correlation with sex, age, differentiation, infiltration, lymph node metastasis and Duke's period. The nuclear β -catenin expression was correlated with the differentiation degree and depth of invasion ($\chi^2 = 6. 641$, $P < 0. 05$). The cytoplasmic β -catenin expression was correlated with the differentiation degree ($\chi^2 = 6. 761$, $P < 0. 05$). The membranous β -catenin expression showed no significant correlation with clinicopathological parameters. The cytoplasmic β -catenin expression and nuclear β -catenin expression was positively correlated with the nuclear YAP1 expression and cytoplasmic/nuclear YAP1 expression ($P < 0. 05$). The nuclear β -catenin expression was positively correlated with the cytoplasmic YAP1 expression ($P < 0. 05$). **Conclusion** YAP1 and β -catenin proteins play important roles together in the carcinogenesis of CRC. The nuclear β -catenin expression may contribute to colorectal carcinoma prognosis judgement.

Key words colorectal carcinoma; YAP1; β -catenin; immunohistochemistry