

· 基础研究 ·

YAP通过调控EEF1A2的表达促进肝癌细胞的迁移和侵袭

田 祯, 庄皓冉, 江楚雯, 尹 靖, 韦晓莹, 张枝林, 史 琳, 张 育, 沈维干*

扬州大学医学院, 江苏 扬州 225000

[摘要] 目的: 研究Yes相关蛋白(yes-associated protein, YAP)通过调控真核细胞翻译延伸因子1A2(eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2, EEF1A2)的表达促进肝癌细胞迁移和侵袭的机制。方法: 通过建立YAP和EEF1A2干扰表达或过表达的SMMC-7721和SK-HEP1肝癌细胞模型, 采用Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力的改变; 应用反转录和实时定量PCR(reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)和Western blot法检测相关基因的mRNA和蛋白表达水平; 利用染色质靶向酶切检测(cleavage under targets and release using nuclease, CUT&RUN)-qPCR实验检测YAP能否与EEF1A2基因的启动子序列结合。结果: EEF1A2在肝癌组织中高表达, 并与肝癌细胞的迁移能力呈正相关; EEF1A2可以促进低迁移能力的SMMC-7721细胞和高迁移能力的SK-HEP1细胞迁移和侵袭, 调控细胞中上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关标志物Snail和E-cadherin的表达; YAP可以上调EEF1A2的表达而促进肝癌细胞的迁移和侵袭; CUT&RUN-qPCR实验结果显示YAP可以与EEF1A2基因的启动子序列结合。结论: YAP可以通过与EEF1A2基因的启动子序列结合, 促进EEF1A2的表达, 进一步促进肝癌细胞的迁移和侵袭。

[关键词] 真核细胞翻译延伸因子1A2; Yes相关蛋白; 细胞迁移; 细胞侵袭; 肝癌细胞

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)01-008-09

doi: 10.7655/NYDXBNS20230102

YAP promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through regulating the expression of EEF1A2

TIAN Zhen, ZHUANG Haoran, JIANG Chuwen, YIN Jing, WEI Xiaoying, ZHANG Zhilin, SHI Lin, ZHANG Yu, SHEN Weigan*

School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of yes-associated protein (YAP) in promoting the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through regulating the expression of eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (EEF1A2). **Methods:** YAP and EEF1A2 were knockdown or overexpressed in human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines (SMMC-7721 and SK-HEP1) respectively. Transwell assays were performed to examine the changes of the migratory and invasive ability of the HCC cells. Reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were conducted to evaluate the expression of the indicated genes in HCC cells. Cleavage under targets and release using nuclease (CUT&RUN)-qPCR assay was performed to evaluate whether YAP interacts with the promoter of EEF1A2. **Results:** Upregulation of EEF1A2 was shown in HCC tissues, and the expression of YAP and EEF1A2 was positively correlated with the spontaneous migratory potential of HCC cell lines. EEF1A2 facilitated the migration and invasion of the low migratory potential SMMC7721 cells and the high migratory potential SK-HEP1 cells and regulated the expression of Snail and E-cadherin, which are two well-characterized epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers. The results further showed that YAP regulated HCC cell migration and invasion by up-regulating EEF1A2. In addition, CUT&RUN-qPCR analysis demonstrated YAP occupancy at the promoter of the EEF1A2 in HCC cells. **Conclusion:** YAP up-regulates the expression of EEF1A2 through interacting with the sequence on the promoter of the EEF1A2, and subsequently promotes HCC cell migration and invasion.

[基金项目] 国家自然科学基金(81672336);江苏省大学生创新创业训练计划项目(202011117056Y, 202111117038Z)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: shenwg@yzu.edu.cn

[Key words] eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2; yes-associated protein; cell migration and invasion; hepatocellular carcinoma cell

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(01):008-016]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的原发性肝癌,全球每年HCC患者死亡人数超过80万^[1]。HCC的发生和发展是一个多步骤的过程,涉及众多基因和相关信号通路。研究表明, Hippo 信号通路中的上游因子通过一系列激酶级联反应转录激活下游终末效应分子 Yes 相关蛋白(yes-associated protein, YAP)和具有 PDZ 结合基序的转录共活化因子(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ),进而调控下游影响细胞增殖、上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及肿瘤转移等相关基因的表达,从而在肝癌的发生和发展进程中发挥关键作用^[2]。真核细胞翻译延伸因子1 α (EEF1A)的两个亚型 EEF1A1 和 EEF1A2,通过促进氨酰基 tRNA 与核糖体 A 位点的结合,在蛋白质合成过程中对新生多肽的延伸发挥重要作用^[3]。EEF1A1 为广泛表达的蛋白,而 EEF1A2 的表达具有组织特异性。研究发现, EEF1A2 在多种肿瘤(包括卵巢癌、乳腺癌、肺癌等)中高表达,并与肿瘤的发生和发展密切相关^[3-4]; EEF1A2 在肝癌组织中高表达,并可通过 EEF1A2/PI3K/AKT 信号轴调控肝癌的发生和发展^[5-6],但是有关 EEF1A2 在肝癌发生和发展过程中的作用方式及其机制仍然有待进一步研究。研究发现 YAP 在肝癌组织中高表达,并与肝癌的发生和发展密切相关^[7-9],然而,目前尚不清楚 YAP 能否通过调控 EEF1A2 的表达影响肝癌的发生和发展。

本研究通过 YAP 和 EEF1A2 干扰表达和过表达,建立不同迁移能力的肝癌细胞模型,阐明 YAP 通过调控 EEF1A2 促进肝癌细胞迁移和侵袭的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 HepG2、SMMC7721、Hep3B、HCCLM3、SK-HEP1 和 HEK293T 细胞由本实验室保存;DMEM 培养基和胎牛血清(Gibco 公司,美国);100 \times 青霉素/链霉素双抗、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量检测试剂盒、蛋白上样缓冲液、超敏 ECL 化学发光试剂盒(苏州新赛美生物公司);pLent-U6-Puro

载体(ViGene Biosciences 公司,美国);pMD2.G 和 psPAX2(Addgene 公司,美国);TRIzol(Invitrogen 公司,美国);Lenti-Pac 慢病毒包装试剂盒(GeneCopoeia 公司,美国);Transwell 细胞培养小室(Corning 公司,美国);HiScript Q RT SuperMix for qPCR 和 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix(南京诺唯赞生物公司);兔抗人 EEF1A2 多克隆抗体(上海爱必信生物公司);小鼠抗人 E-Cadherin 单克隆抗体(BD 公司,美国);兔抗人 YAP/TAZ、YAP、Snail 单克隆抗体以及 HRP 标记的抗兔 IgG 和抗小鼠 IgG 以及染色质靶向酶切检测(cleavage under targets and release using nuclease, CUT&RUN)试剂盒(CST 公司,美国);小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(上海康成生物公司);表达 YAP 的腺病毒、表达 EEF1A2 的腺病毒以及对照腺病毒(山东维真生物科技有限公司);靶向 YAP、EEF1A2 的寡核苷酸引物、对照引物以及定量 PCR 引物均由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

所有细胞常规培养于含 10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 慢病毒载体的构建、包装和稳定株的筛选

合成靶向 YAP(正义链序列 5'-GATCCGCTGGTC-AGAGATACTTCTTAATTCAAGAGATTAGAAGTAT-CTCTGACCAGCTTTTTTA-3';反义链序列 5'-CGCG-TAAAAAGCTGGTCAGAGATACTTCTTAATCTCTT-GAATTAAGAAGTATCTCTGACCGCG-3')和 EEF1A2(正义链序列 5'-GATCCTTCACCTCCCAGGTCAT-CATCCTCGAGGATGATGACCTGGGAGGTGAATTT-TTA-3';反义链序列 5'-CGCGTAAAAATTCACC-TCCCAGGTCATCATCCTCGAGGATGATGACCTGG-GAGGTGAAG-3')的寡核苷酸引物以及对照引物(正义链序列 5'-GATCCTGGTTTACATGTCGACTA-ATTCAAGAGATTAGTCGACATGTAAACCATTTTTT-A-3';反义链序列:5'-CGCGTAAAAATGGTTTACATGTCGACTAATCTCTTGAATTAGTCGACATGTA-AACCACG-3');分别克隆到 pLent-U6-Puro 载体的 BamH I 和 Mlu I 位点间,经测序成功后,与 pMD2.G

和 psPAX2 共转染 HEK293T 细胞进行慢病毒的包装,转染 60 h 后收集细胞上清并用 0.45 μm 的滤器过滤;使用慢病毒液分别感染 SMMC7721 和 SK-HEP1 肝癌细胞后,采用嘌呤霉素筛选 14 d 获得稳定细胞株。

1.2.3 实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测相关基因的 mRNA 表达水平

TRIzol 试剂盒提取对数生长期的各组细胞的总 RNA 后,采用 HiScript Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒和 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒分别进行逆转录和 qPCR。qPCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环。EEF1A2 的上游引物序列为 5'-GGACCATTGAGAA GTTCGAGA-3', 下游引物序列为 5'-AGCACCCAG-GCATACTTGAA-3'; Snail 的上游引物序列为 5'-AATCGGAAGCCTAACTACAGCG-3', 下游引物序列为 5'-GT CCCAGATGAGCATTGGCA-3'; E-cadherin 的上游引物序列为 5'-CAAGTGACC ACCTTAGAG-3', 下游引物序列为 5'-GAATTTGCAATCCTGCTT-3'; GAPDH 上游引物序列为 5'-GCACCGTCAAGGCT-GAGAAC-3', 下游引物序列为 5'-TGGTGAAGACGC-CAGTGGA-3'。使用 LightCycler[®]96 软件进行数据分析,以 GAPDH 为内参,按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算出目的基因的相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测相关基因的蛋白表达水平

采用 RIPA 裂解液提取各组细胞中的总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量、变性后进行 SDS-PAGE,样品转膜至 PVDF 膜上,采用 5% 的脱脂奶粉封闭后与相应的一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加入相应二抗室温孵育后,滴加 ECL 发光液,于全自动化学发光仪成像。

1.2.5 细胞迁移与侵袭实验

实验按文献^[10]的方法进行,简要过程如下:选择血清饥饿过夜后的各组细胞,制备细胞悬液;细胞计数后,用不含胎牛血清的 DMEM 培养基将 SMMC-7721 细胞调整为 1.5×10^5 个/mL, SK-HEP1 细胞调整为 1.0×10^5 个/mL;分别取 200 μL 的上述细胞悬液接种到预先铺有 Matrigel 或未铺 Matrigel 的 Transwell 小室中,然后将 Transwell 小室放入含 600 μL 完全培养基的 Transwell 下室中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 24 h。取出 Transwell 小室置于 4% 多聚甲醛固定液中室温固定后,用棉签拭去小室内侧的细胞,采用结晶紫染液染色迁移和侵袭的细胞,于倒置相差显微镜下观察并统计迁移和侵袭的细胞数。

1.2.6 CUT&RUN-qPCR 实验

CUT&RUN 试剂盒为美国 CST 公司产品,按照试剂盒操作说明书操作。简要过程如下: SMMC7721 细胞与磁珠孵育后,加入兔抗人 YAP 单克隆抗体与细胞中 YAP 结合,与二抗孵育后加入 Protein A/G-Tn5 转座体与抗体结合后,再加入 Mg^{2+} 激活转座体,使得 DNA 片段化,提取 DNA 进行 qPCR 验证,qPCR 上游引物序列为 5'-CATGGTGC-GCCCAGGAG-3', 下游引物序列为 5'-GGCCT-CAGGTTGAAATCTG-3'。分别计算 YAP 抗体和 IgG 富集后扩增的 DNA 占输入染色质的比值,实验结果用 YAP 抗体富集的 DNA 与 IgG 富集的 DNA 的倍数表示。

1.3 统计学方法

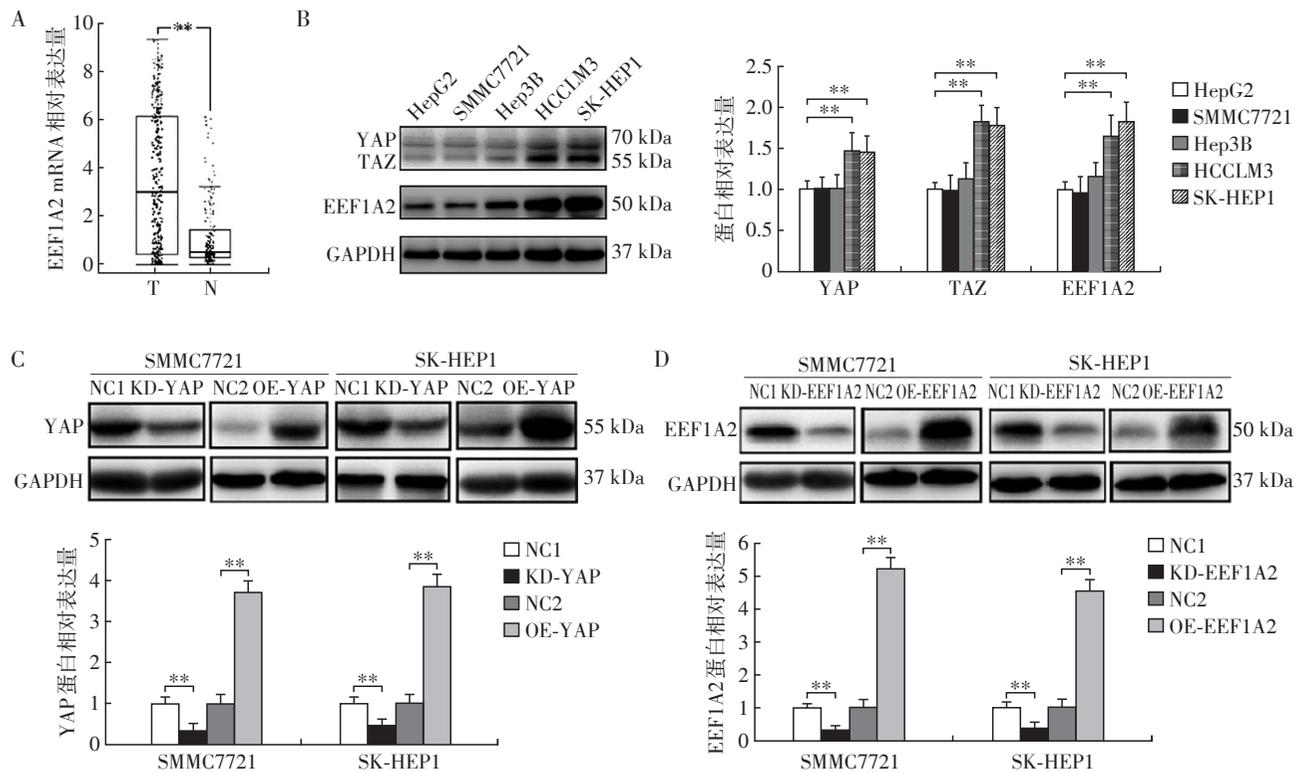
应用软件 SPSS19.0 和 Excel 2013 对数据进行分析,数据采用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 YAP 和 EEF1A2 对不同迁移能力的肝癌细胞迁移和侵袭的影响

通过查阅癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库(<http://gepia.cancerpku.cn/index.html>)分析 EEF1A2 在肝癌组织以及癌旁组织中的表达,结果显示 EEF1A2 在肝癌组织中的 mRNA 水平显著高于癌旁组织($P < 0.01$, 图 1A)。Western blot 法检测不同迁移能力的肝癌细胞系(低迁移能力的 HepG2、SMMC7721 和 Hep3B 细胞系以及高迁移能力的 HCCLM3 和 SK-HEP1 细胞系)中 YAP/TAZ 和 EEF1A2 的表达,结果显示 YAP/TAZ 和 EEF1A2 在高迁移能力的肝癌细胞 HCCLM3 和 SK-HEP1 中的表达均高于低迁移能力的肝癌细胞 HepG2、SMMC7721 和 Hep3B(图 1B),该结果表明 YAP/TAZ 和 EEF1A2 的表达可能与肝癌细胞的迁移能力相关。

为了研究 YAP 和 EEF1A2 对肝癌细胞迁移和侵袭的影响,本研究制备干扰 YAP 表达和干扰 EEF1A2 表达的重组慢病毒以及对照慢病毒,分别感染低迁移能力的 SMMC-7721 细胞和高迁移能力的 SK-HEP1 细胞,采用嘌呤霉素筛选 2 周后,建立了稳定干扰表达细胞模型;其次,通过在 SMMC7721 和 SK-HEP1 细胞中分别感染表达 YAP、EEF1A2 的腺病毒,构建了 YAP 和 EEF1A2 过表达的肝癌细胞模型;采用 Western blot 方法进行基因表达鉴定,结果



A: TCGA 数据库分析 EEF1A2 mRNA 在肝癌组织以及癌旁组织中的表达, T: 肝癌组织($n=369$), N: 癌旁组织($n=150$), 两组比较, $^{**}P < 0.01$; B: Western blot 检测低迁移能力的 HepG2、SMMC7721 和 Hep3B 细胞以及高迁移能力的 HCCLM3 和 SK-HEP1 细胞中 YAP/TAZ 和 EEF1A2 的蛋白表达, GAPDH 为内参, 两组比较, $^{**}P < 0.01, n=3$; C、D: Western blot 检测干扰或过表达 YAP 和 EEF1A2 的 SMMC-7721 和 SK-HEP1 肝癌细胞模型中 YAP 和 EEF1A2 表达的鉴定结果, NC1 为干扰表达对照组, NC2 为过表达对照组, KD-YAP 为 YAP 干扰表达组, OE-YAP 为 YAP 过表达组, KD-EEF1A2 为 EEF1A2 干扰表达组, OE-EEF1A2 为 EEF1A2 过表达组。GAPDH 为内参, 两组比较, $^{**}P < 0.01, n=3$ 。

图 1 EEF1A2 和 YAP 在肝癌细胞系中的表达
Figure 1 Expression of EEF1A2 and YAP in HCC cell lines

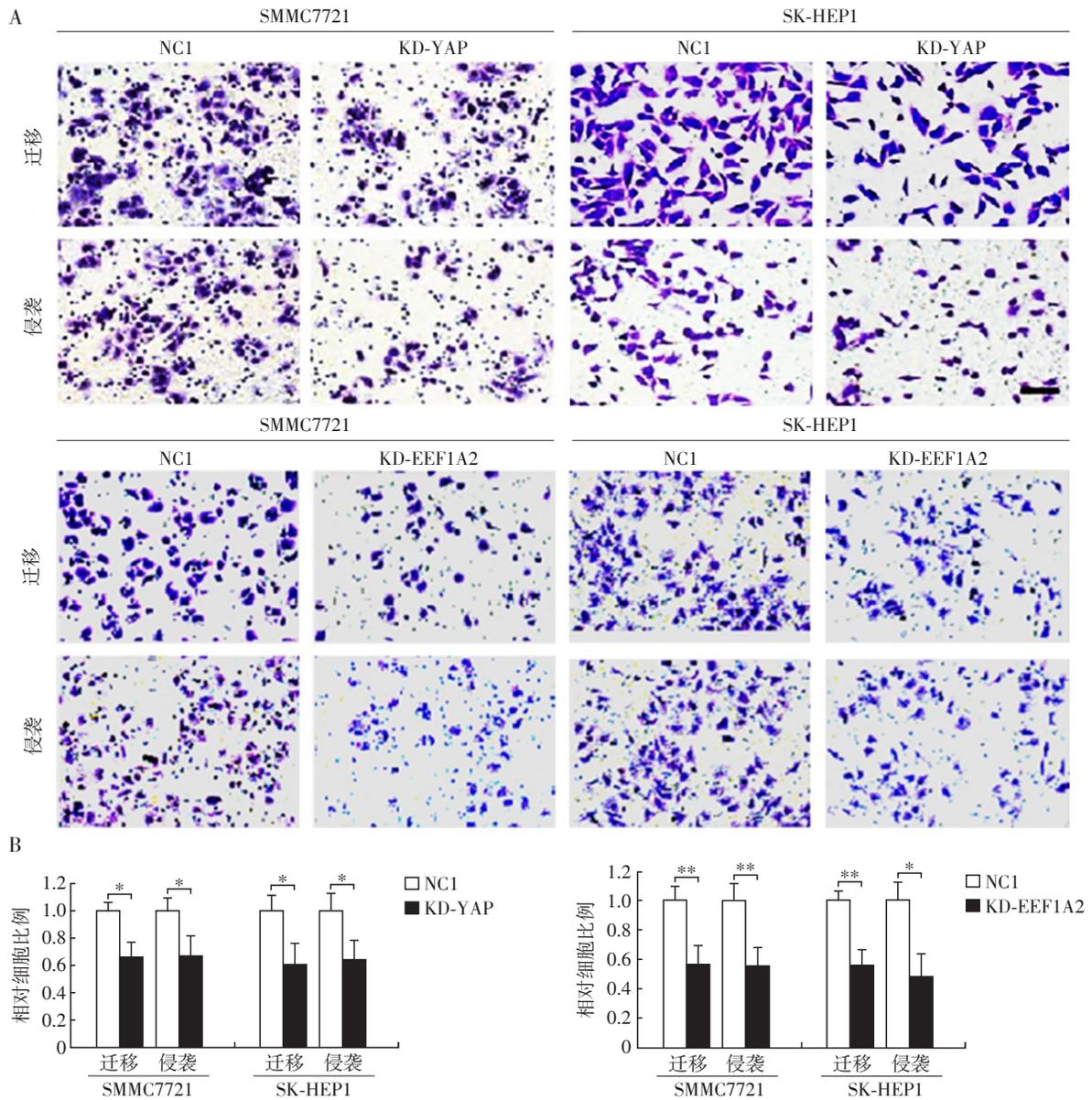
如图 1C、D 可见, 与干扰对照组(NC1)相比, 敲低 YAP(KD-YAP)和 EEF1A2(KD-EEF1A2)均显著降低 SMMC-7721 细胞和 SK-HEP1 细胞中 YAP 和 EEF1A2 表达; 与过表达对照组(NC2)相比, 过表达 YAP(OE-YAP)和 EEF1A2(OE-EEF1A2)均显著上调细胞中 YAP 和 EEF1A2 表达。该结果表明, 本研究成功建立了 YAP 和 EEF1A2 干扰和过表达的肝癌细胞模型, 可用于后续实验研究。

基于 YAP 和 EEF1A2 在肝癌中高表达^[5-9], 本研究进一步利用 Transwell 细胞迁移和侵袭实验观察干扰 YAP 和 EEF1A2 表达对低迁移能力的 SMMC7721 细胞和高迁移能力的 SK-HEP1 细胞迁移和侵袭的影响。结果显示, 与各自对照组细胞相比, 干扰 YAP 表达和干扰 EEF1A2 表达均可以显著抑制 SMMC7721 细胞和 SK-HEP1 细胞的迁移和侵袭(图 2A、B, YAP 干扰表达细胞与各自对照组迁移和侵袭的相对细胞比例: SMMC7721 细胞为 0.663 ± 0.110 vs. 1.002 ± 0.067 和 0.603 ± 0.156 vs.

1.004 ± 0.117 ; SK-HEP1 细胞为 0.665 ± 0.153 vs. 1.003 ± 0.094 和 0.637 ± 0.147 vs. 1.007 ± 0.125 。干扰 EEF1A2 表达细胞与各自对照组迁移和侵袭的相对细胞比例: SMMC7721 细胞为 0.563 ± 0.131 vs. 1.006 ± 0.088 和 0.561 ± 0.102 vs. 1.004 ± 0.065 ; SK-HEP1 细胞为 0.549 ± 0.132 vs. 1.002 ± 0.117 和 0.479 ± 0.162 vs. 1.001 ± 0.127 ; $P < 0.05$)。该结果表明, YAP 和 EEF1A2 在肝癌细胞迁移和侵袭过程中发挥重要调控作用。

2.2 YAP 对肝癌细胞中 EEF1A2 及 EMT 相关基因表达的影响

本课题组前期建立了 Hippo 通路下游效应分子 YAP 和 TAZ 干扰表达的 SMMC7721 细胞模型, 并通过 RNA 测序(RNA-sequencing, RNA-seq)对干扰 YAP、TAZ 和空载对照的 SMMC7721 细胞进行了转录组分析^[11]。本研究进而对干扰 YAP 和 TAZ 所得的差异表达基因取交集, 发现有 432 个重叠基因(图 3A); 基因功能富集分析显示, 这些重叠基因参与调



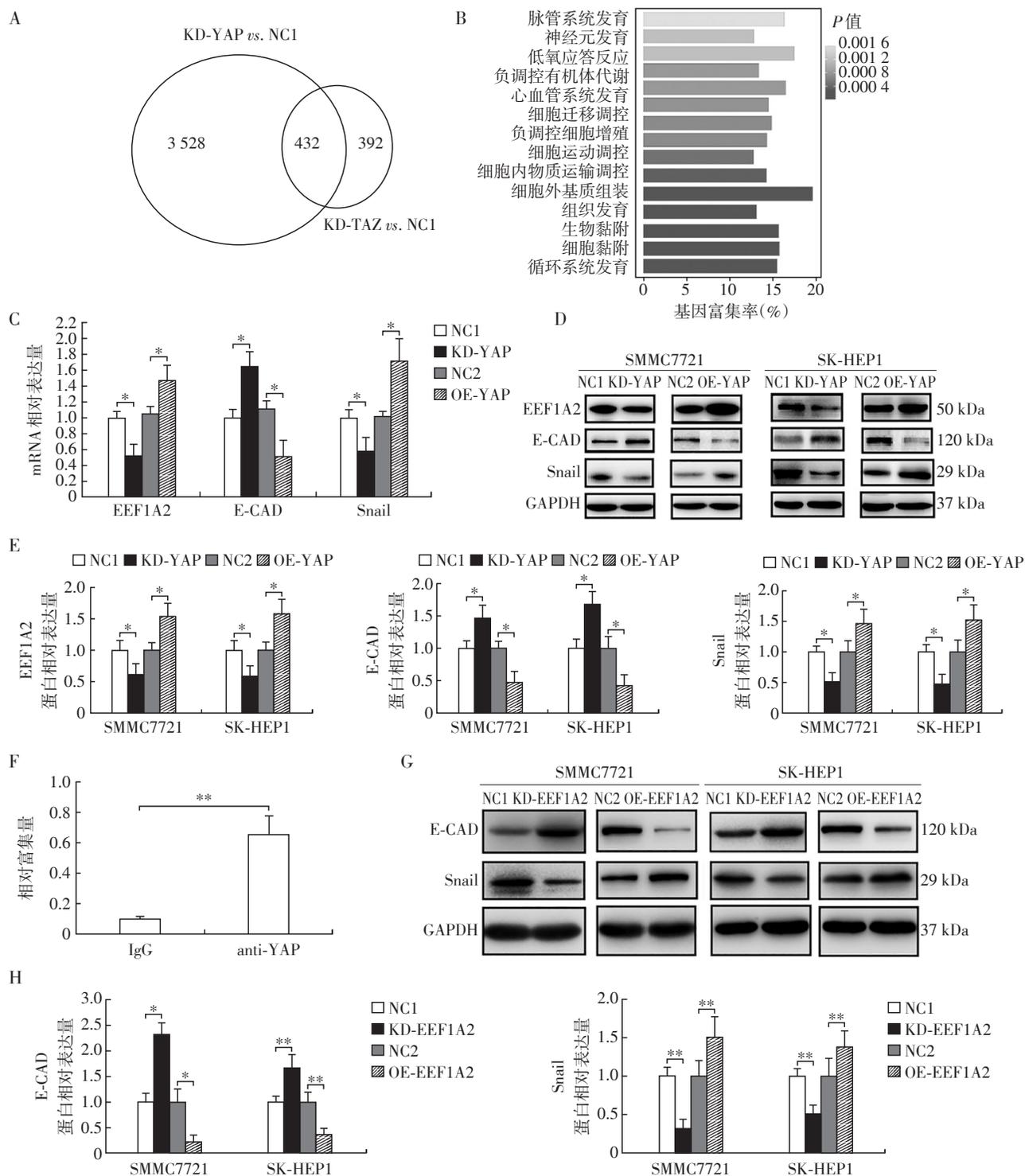
A, B: Transwell 实验检测 YAP 和 EEF1A2 干扰表达对于肝癌细胞 SMMC7721 和 SK-HEP1 迁移和侵袭的影响 (×200), NC1 为干扰表达对照组, KD-YAP 为 YAP 干扰表达组, KD-EEF1A2 为 EEF1A2 干扰表达组。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=3$ 。

图2 干扰 YAP 和 EEF1A2 表达对于肝癌细胞迁移和侵袭的影响

Figure 2 Effect of YAP and EEF1A2 knockdown on the migration and invasion of HCC cells

控细胞迁移、细胞运动和细胞增殖(图 3B),其中包括 EEF1A2 以及与 EMT 相关的 SNAIL 和 CDH1 等。为了证实 YAP 对 EEF1A2、SNAIL 和 CDH1 表达的影响,我们首先采用 RT-qPCR 验证了 YAP 对 SMMC7721 细胞中 EEF1A2、Snail (SNAIL 的表达产物)和 E-cadherin (E-CAD, CDH1 的表达产物)mRNA 水平的影响,检测结果与 RNA-seq 结果相一致, YAP 干扰表达可以下调 EEF1A2 和 Snail 的 mRNA 水平,上调 E-CAD 的 mRNA 水平(图 3C, YAP 干扰和过表达的 SMMC7721 细胞与各自对照组细胞中 EEF1A2、E-cadherin 和 Snail 的 mRNA 相对表达量:

EEF1A2 为 0.521 ± 0.150 vs. 1.001 ± 0.083 和 1.482 ± 0.182 vs. 1.053 ± 0.093 ; E-cadherin 为 1.651 ± 0.192 vs. 1.002 ± 0.113 和 0.522 ± 0.202 vs. 1.113 ± 0.103 ; Snail 为 0.581 ± 0.173 vs. 1.013 ± 0.103 和 1.723 ± 0.282 vs. 1.016 ± 0.073 , $P < 0.05$);其次,应用建立的 YAP 干扰和过表达的 SMMC-7721 和 SK-HEP1 肝癌细胞模型,通过 Western blot 方法检测了 YAP 干扰和过表达对于细胞中 EEF1A2、Snail 以及 E-CAD 蛋白表达水平的影响,检测结果与 RT-qPCR 验证结果相一致,干扰 YAP 表达可以下调 EEF1A2 和 Snail,上调 E-CAD,而 YAP 过表达则可以上调 EEF1A2 和



A: 干扰YAP表达和干扰TAZ表达的SMMC-7721细胞中RNA-seq检测差异表达基因的韦恩图中显示有432个重叠基因; B: 重叠基因功能富集分析结果; C: RT-qPCR检测YAP干扰和过表达对SMMC7721细胞中EEF1A2和EMT标志物Snail与E-CAD mRNA表达水平的影响, GAPDH为内参, 两组比较, $P < 0.05, n=4$; D、E: Western blot检测YAP干扰和过表达对SMMC7721和SK-HEP1细胞中EEF1A2、Snail和E-CAD蛋白表达水平的影响, GAPDH为内参, 两组比较, $P < 0.05, n=3$; F: CUT&RUN-qPCR检测SMMC7721细胞中EEF1A2启动子的富集情况, 两组比较, $**P < 0.01, n=3$; G、H: Western blot检测EEF1A2干扰和过表达对SMMC7721和SK-HEP1细胞中Snail和E-CAD表达的影响, GAPDH为内参, $**P < 0.01, n=3$. NC1为干扰表达对照组, NC2为过表达对照组, KD-YAP为YAP干扰表达组, OE-YAP为YAP过表达组, KD-EEF1A2为EEF1A2干扰表达组, OE-EEF1A2为EEF1A2过表达组。

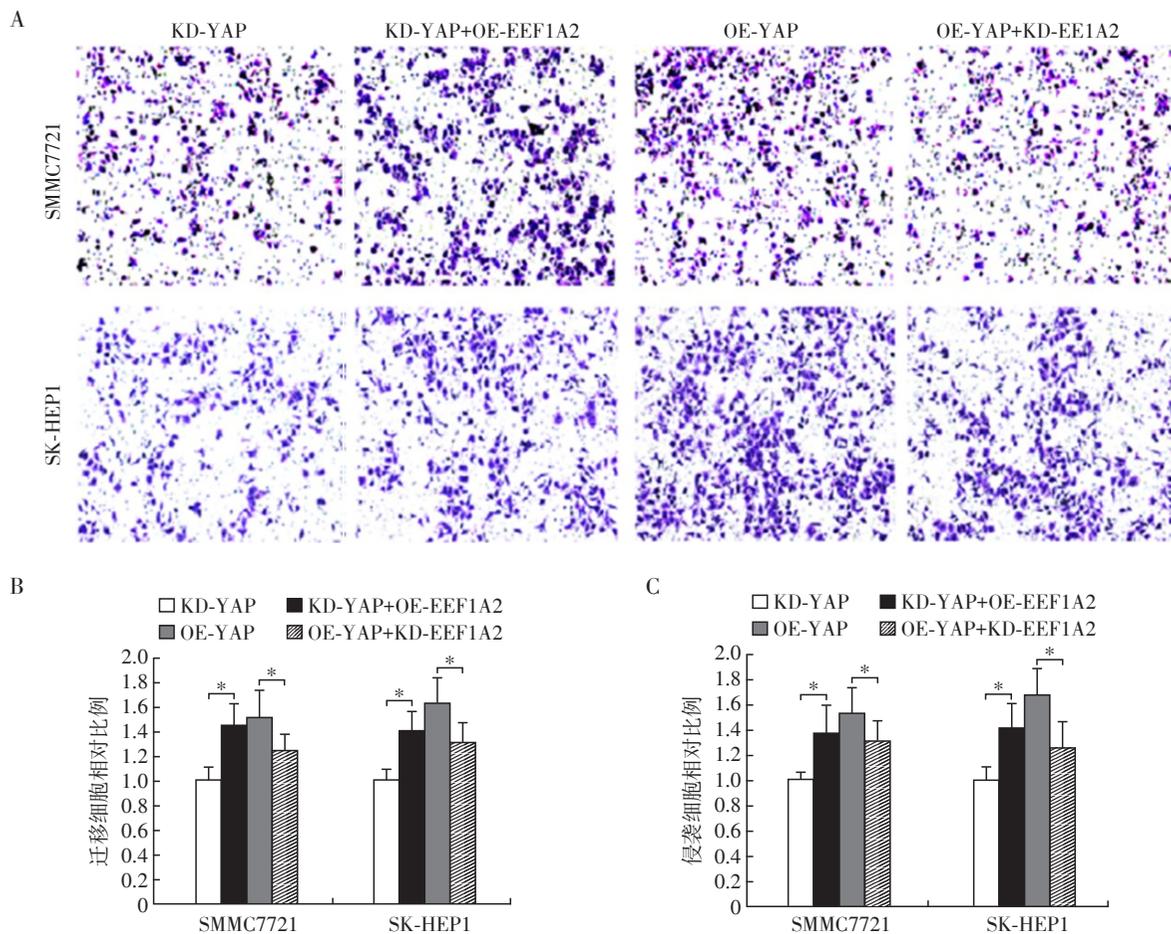
图3 YAP可以调控肝癌细胞中EEF1A2的表达

Figure 3 YAP regulated the expression of EEF1A2 in HCC cells

Snail, 下调 E-CAD(图 3D、E)。上述实验结果表明, YAP 可以调控肝癌细胞中 EEF1A2 的表达。为了探究 YAP 是否通过转录调控 EEF1A2 的表达, 进一步开展了 CUT&RUN 结合 qPCR 实验, 由图 3F 可见, EEF1A2 基因的启动子序列可以被抗 YAP 的单克隆抗体富集(细胞中 EEF1A2 启动子的 Anti-YAP 与 IgG 的相对富集量为 6.501 ± 1.250 vs. 1.001 ± 0.101 , $P < 0.01$), 该结果证实 YAP 可以与 EEF1A2 基因的启动子序列结合, 促进 EEF1A2 的表达。此外, 本研究进一步采用 Western blot 方法检测了 EEF1A2 干扰和过表达对 SMMC-7721 和 SK-HEP1 细胞中 EMT 相关的 Snail 和 E-CAD 表达的影响, 结果显示干扰 EEF1A2 可以下调细胞中 Snail、上调 E-CAD 的水平, 而 EEF1A2 过表达则可以上调细胞中 Snail、下调 E-CAD(图 3G、H), 该结果表明 EEF1A2 可以调控肝癌细胞的 EMT 进程。

2.3 YAP 通过 EEF1A2 调控肝癌细胞的迁移和侵袭

为了研究 YAP 是否可以通过促进 EEF1A2 表达进一步调控肝癌细胞的迁移和侵袭, 本研究分别在干扰 YAP 表达的 SMMC7721 和 SK-HEP1 细胞中联合过表达 EEF1A2、在 YAP 过表达的 SMMC7721 和 SK-HEP1 细胞中联合干扰 EEF1A2 表达后, 利用 Transwell 细胞迁移和侵袭实验观察了细胞迁移和侵袭能力的改变。Transwell 细胞迁移和侵袭实验结果由图 4 可见, 与干扰 YAP 表达细胞组相比, EEF1A2 过表达可以显著促进干扰 YAP 表达的 SMMC-7721 和 SK-HEP1 细胞的迁移和侵袭(在干扰 YAP 表达的细胞中过表达 EEF1A2 与干扰 YAP 表达细胞组迁移和侵袭的相对细胞比例: SMMC7721 细胞为 1.450 ± 0.181 vs. 1.002 ± 0.112 和 1.374 ± 0.224 vs. 1.004 ± 0.059 ; SK-HEP1 细胞为 1.411 ± 0.157 vs. 1.003 ± 0.101 和 1.419 ± 0.224 vs. 1.001 ± 0.105 ; 与



A、B: Transwell 细胞迁移实验检测结果(×200), 两组比较, * $P < 0.05$, $n=3$; C: Transwell 细胞侵袭实验检测的统计结果, 两组比较, * $P < 0.05$, $n=3$ 。KD-YAP 为 YAP 干扰表达组, KD-YAP+OE-EEF1A2 为干扰 YAP 表达的细胞中联合过表达 EEF1A2 组, OE-YAP 为 YAP 过表达组, OE-YAP+KD-EEF1A2 为 YAP 过表达的细胞中联合干扰 EEF1A2 表达组。

图 4 YAP 通过 EEF1A2 调控肝癌细胞的迁移和侵袭

Figure 4 YAP regulated the migration and invasion of HCC cells through EEF1A2

YAP过表达细胞组相比,干扰EEF1A2表达可以显著抑制YAP过表达的SMMC-7721和SK-HEP1细胞的迁移和侵袭(在过表达YAP的细胞中干扰EEF1A2表达后与YAP过表达细胞组迁移和侵袭的相对细胞比例:SMMC7721细胞为 1.246 ± 0.133 vs. 1.519 ± 0.221 和 1.312 ± 0.163 vs. 1.538 ± 0.201 ; SK-HEP1细胞为 1.318 ± 0.155 vs. 1.631 ± 0.213 和 1.250 ± 0.217 vs. 1.683 ± 0.211 , $P < 0.05$)。该研究结果提示YAP可以通过上调EEF1A2而促进肝癌细胞的迁移和侵袭。

3 讨论

人类的EEF1A主要通过与其氨酰基tRNA结合并将其携带到核糖体上,在蛋白质翻译过程中对新生多肽的延伸发挥重要调控作用。在EEF1A的两个亚型中,EEF1A1在人类组织中广泛表达,而EEF1A2表达仅限于心脏、骨骼肌、大脑等组织,具有明显的组织特异性^[12]。人类的EEF1A2基因定位于20q13,研究表明,EEF1A2在卵巢癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌以及肝癌等多种肿瘤中高表达,并与这些肿瘤的发生、发展以及患者的生存期密切相关^[3-6,13-15]。尽管有研究显示,EEF1A2可以通过激活PI3K/AKT信号通路,调控肌动蛋白细胞骨架重塑,促进肿瘤细胞的迁移和侵袭,并证实EEF1A2/PI3K/AKT信号轴在肝癌的发生和发展进程中发挥重要的调控作用^[4-6],但是有关EEF1A2的自身表达调控以及相关作用机制尚不明确。

本研究首先通过查阅TCGA数据库,分析了EEF1A2在肝癌以及癌旁组织中的表达,结果显示EEF1A2在肝癌组织中的表达显著高于癌旁组织,提示EEF1A2可能参与调控肝癌的发生和发展。其次,本研究采用Western blot方法检测了不同迁移能力的肝癌细胞系(低迁移能力的HepG2、SMMC7721和Hep3B以及高迁移能力的HCCLM3和SK-HEP1细胞)中YAP和EEF1A2的表达差异,结果显示YAP和EEF1A2在高迁移能力的肝癌细胞中表达高于低迁移能力的肝癌细胞,提示YAP和EEF1A2的表达可能与肝癌细胞的迁移能力相关。有关YAP干扰表达和过表达对肝癌细胞迁移和侵袭影响的研究已经有相当多研究报道^[16-20],本研究重点围绕YAP能否通过调控EEF1A2的表达而促进肝癌细胞迁移和侵袭开展了进一步探究。基于YAP和EEF1A2在肝癌组织中高表达^[5-9],本研究首先选择低迁移能力的肝癌细胞SMMC-7721和高迁移能力的肝癌细胞

SK-HEP1为研究对象,建立了慢病毒介导的稳定敲低YAP和敲低EEF1A2的细胞模型,采用Transwell细胞迁移和侵袭实验分别检测了干扰YAP和EEF1A2表达对肝癌细胞迁移和侵袭的影响,结果表明干扰YAP和EEF1A2表达均可以显著降低肝癌细胞的迁移和侵袭能力。

课题组前期分别建立了稳定敲低YAP和敲低TAZ的SMMC7721细胞模型,采用RNA-seq分析了敲低YAP和敲低TAZ的细胞中转录组的改变,通过对二者差异表达基因取交集,发现两组差异表达基因的重叠基因中,除了已经被证明受YAP/TAZ调控的与EMT相关的Snail和E-CAD外^[11,16,21],还包括EEF1A2。本研究采用RT-qPCR和Western blot方法检测显示,干扰YAP表达可以下调EEF1A2,而YAP过表达则可以上调EEF1A2,提示YAP可以调控EEF1A2的表达。基于Hippo通路的下游效应分子YAP作为转录共活化因子可以调控相关基因的表达而促进肿瘤的发生和发展^[19,22],本研究进一步利用CUT&RUN-qPCR实验证实了YAP可以与EEF1A2基因的启动子序列结合。CUT&RUN实验主要用于验证及探寻特定蛋白质和DNA的特定序列的直接相互作用,应用于研究转录调控以及组蛋白修饰调控。与传统的染色质免疫沉淀技术(chromatin immunoprecipitation, ChIP)相比,该技术的优点表现在所需要的细胞样品量低、无需交联、超声打断、背景信号低和重复性好等,近年来已经被研究者广泛使用^[23]。上述研究结果表明,YAP可以通过与EEF1A2的启动子结合而调控EEF1A2的表达。同时,本研究结果显示,EEF1A2可以上调SMMC-7721和SK-HEP1细胞中EMT相关的Snail、下调E-CAD,该结果提示EEF1A2可能通过调控肝癌细胞中EMT相关基因的表达,进一步促进肝癌细胞的迁移和侵袭。为了探究YAP能否通过调控EEF1A2的表达而促进肝癌细胞的迁移和侵袭,本研究通过在YAP干扰和过表达的SMMC7721和SK-HEP1肝癌细胞中分别联合过表达EEF1A2或干扰EEF1A2表达后,采用Transwell实验检测了细胞迁移和侵袭的改变,明确了YAP可以通过EEF1A2促进肝癌细胞的迁移和侵袭。

综上所述,本研究结果表明,EEF1A2在肝癌组织中高表达,YAP和EEF1A2与肝癌细胞的迁移能力相关;YAP可以与EEF1A2基因的启动子序列结合,调控EEF1A2的表达,进一步促进肝癌细胞的迁移和侵袭。本研究结果可以进一步完善我们对

YAP和EEF1A2参与肝癌转移调控的理解,有可能为抗肝癌转移提供新的治疗靶标。

[参考文献]

- [1] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 6
- [2] ZANCONATO F, CORDENONSI M, PICCOLO S. YAP/TAZ at the roots of cancer[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(6): 783-803
- [3] GIUDICI F, PETRACCI E, NANNI O, et al. Elevated levels of eEF1A2 protein expression in triple negative breast cancer relate with poor prognosis[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218030
- [4] AMIRI A, NOEI F, JEGANATHAN S, et al. eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration [J]. *Oncogene*, 2007, 26(21): 3027-3040
- [5] QIU F N, HUANG Y, CHEN D Y, et al. Eukaryotic elongation factor-1 α 2 knockdown inhibits hepatocarcinogenesis by suppressing PI3K/Akt/NF- κ B signaling[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(16): 4226-4237
- [6] PELLEGRINO R, CALVISI D F, NEUMANN O, et al. EEF1A2 inactivates p53 by way of PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of MDM4 in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2014, 9(5): 1886-1899
- [7] LIU Y, HE K, HU Y, et al. YAP modulates TGF- β 1-induced simultaneous apoptosis and EMT through upregulation of the EGF receptor[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45523
- [8] ZHANG S, ZHOU D. Role of the transcriptional coactivators YAP/TAZ in liver cancer [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 61: 64-71
- [9] ZHANG X, LI Y, MA Y, et al. Yes-associated protein (YAP) binds to HIF-1 α and sustains HIF-1 α protein stability to promote hepatocellular carcinoma cell glycolysis under hypoxic stress[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 216
- [10] 马天云, 罗超, 刘龙飞, 等. HMGCS1表达对食管鳞癌细胞转移能力及食管鳞癌患者预后的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(10): 1357-1363
- [11] 周玮. MOB2通过Hippo通路调控肝癌细胞迁移和侵袭及芹菜素干预的机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2021
- [12] LEE S, FRANCOEUR A M, LIU S, et al. Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 alpha gene family[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(33): 24064-24068
- [13] YANG S, LU M, CHEN Y, et al. Overexpression of eukaryotic elongation factor 1 alpha-2 is associated with poorer prognosis in patients with gastric cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(7): 1265-1275
- [14] SCAGGIANTE B, DAPAS B, BONIN S, et al. Dissecting the expression of EEF1A1/2 genes in human prostate cancer cells: the potential of EEF1A2 as a hallmark for prostate transformation and progression [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(1): 166-173
- [15] HU D M, XU C, ZHU Q. eEF1A2 protein expression correlates with lymph node metastasis and decreased survival in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Hepato gastroenterology*, 2013, 60(124): 870-875
- [16] WANG S, LI H, WANG G, et al. Yes-associated protein (YAP) expression is involved in epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(2): 172-177
- [17] HUANG Z, ZHOU J K, WANG K, et al. PDLIM1 inhibits tumor metastasis through activating Hippo signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1643-1659
- [18] HAYASHI H, HIGASHI T, YOKOYAMA N, et al. An imbalance in TAZ and YAP expression in hepatocellular carcinoma confers cancer stem cell-like behaviors contributing to disease progression [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(22): 4985-4997
- [19] LAMAR J M, STERN P, LIU H, et al. The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2012, 109(37): E2441-E2450
- [20] NGO M T, PENG S W, KUO Y C, et al. A Yes-associated protein (YAP) and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) signaling loop is involved in sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(15): 3812
- [21] ZHANG H, VON GISE A, LIU Q, et al. Yap1 is required for endothelial to mesenchymal transition of the atrioventricular cushion[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(27): 18681-18692
- [22] PANCIERA T, AZZOLIN L, CORDENONSI M, et al. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(12): 758-770
- [23] SKENE P J, STEVEN H. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites [J]. *eLife*, 2017, 6: e21856

[收稿日期] 2022-07-26

(责任编辑: 蒋莉)