

YY1 在胃癌组织中的表达及其对 SGC-7901 细胞株增殖和凋亡的影响

谢坤领^{1,2},张静静¹,朱毅¹,徐泽宽^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院普外科,江苏 南京 210029;²亳州市人民医院普外科,安徽 亳州 236800)

[摘要] 目的:检测 YY1 在胃癌组织中的表达情况,探讨 YY1 对人胃癌细胞株 SGC-7901 增殖、凋亡的影响以及可能的机制。方法:利用定量 PCR 和免疫组织化学分别检测标本中 YY1 的 mRNA 和蛋白表达水平。利用慢病毒表达载体系统在胃癌细胞株 SGC-7901 中上调 YY1,运用 CCK-8、流式细胞术、平板克隆实验检测 YY1 对细胞的增殖、凋亡以及克隆形成能力的影响。结果:胃癌组织中 YY1 的 mRNA 和蛋白表达水平明显低于癌旁组织。与空载对照组(SGC-7901-Empty Vector,SGC-7901-EV)和与正常对照组(SGC-7901)相比,过表达 YY1 组细胞(SGC-7901-YY1)的增殖和平板克隆形成能力明显减弱,细胞凋亡增加。结论:YY1 与胃癌的发生发展有一定的关系,可能起到抑癌基因的作用,YY1 基因可能成为胃癌靶向治疗的新的潜在靶点。

[关键词] 胃癌;YY1;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] Q257

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)08-1010-06

doi:10.7655/NYDXBNS20140802

Expression of YY1 in gastric cancer and its effect on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line SGC-7901

Xie Kunling^{1,2},Zhang Jingjing¹,Zhu Yi¹,Xu Zekuan^{1*}

(¹Department of General Surgery,the First Affiliated Hospital,NJMU,Nanjing 210029;²Department of General Surgery, the People's Hospital of Bozhou,Bozhou 236800,China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the expression level of YY1 in gastric cancer,and then detect the effect of YY1 on the proliferation and apoptosis in SGC-7901 cell lines and its possible mechanism. **Methods:**mRNA and protein expressions of YY1 in cancer and paired adjacent tissues were detected by real-time PCR and immunohistochemistry, respectively. YY1 was up-regulated by a lentiviral vector expression system in gastric cancer cell line SGC-790. CCK-8 was performed to detect cell proliferation,and colony formation assay was performed to evaluate cell growth. Apoptosis was detected by flow cytometry. **Results:**The expression of YY1 in paired adjacent tissues had a higher level than that in tumor tissues. Compared to the empty vector group (SGC-7901-Empty Vector/SGC-7901-EV) and the normal control group (SGC-7901),the cell proliferation and clonogenicity were significantly decreased as well as cell apoptosis was increased in the over-expressed YY1 group (SGC-7901-YY1). **Conclusion:**YY1 may participate in the development of gastric cancer. YY1 can play a role as a cancer suppressor gene in the development of gastric cancer,which suggests that YY1 may be a new therapeutic target for gastric cancer.

[Key words] YY1;gastric cancer;cell proliferation;cell apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(08):1010-1014,1024]

在恶性肿瘤致死的病例中,胃癌在男性和女性中分别排名第3位和第4位,在东亚的发病率和病死率最高,且其发病率呈逐年上升趋势^[1]。随着手术

技术的改进以及新辅助化疗的应用,胃癌的病死率已经大幅下降^[2],但其5年生存率依然较低,早期发现仍是提高长期生存率最有效的方法,分子靶向治疗为抗肿瘤治疗提供了新的空间和曙光。

Yin Yang 1 (YY1)是一个具有多重复杂功能的转录因子,既可以激活又可以抑制相应的基因转录,因此得名阴阳。YY1首先是作为DNA结合蛋白于1991年被发现^[3],其DNA结合区存在于C端的

[基金项目] 国家自然科学基金(81361120398,81072031,81272712)

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

锌指结构中。YY1是一个进化非常保守的蛋白,人源YY1由414个氨基酸组成^[4]。作为转录因子可以通过调节相应关键性基因参与正常细胞的增殖、分化^[5]。近来YY1在肿瘤发生发展中的作用被深入研究,在肿瘤细胞中YY1被认为参与存活素的调控^[6]。研究发现在肾细胞癌中,YY1可以通过阻断C/EBP α 来抑制miR-34a的表达,同时YY1又是miR-34a下游的靶基因,这种反馈促进了肾细胞癌的恶性进展^[7]。在一些肿瘤如前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤中YY1是高表达的,且其高表达有重要的临床意义,例如在乳腺癌中与HER2的过表达及不良预后正相关^[8],在宫颈癌中与疾病的进展正相关^[9],在前列腺癌中与转移正相关,且在非恶性前列腺细胞中,YY1主要存在于腺上皮和基底细胞的胞核中,在95%恶性样本中发现YY1在胞浆中的染色很明显^[10]。然而在卵巢癌中YY1的过表达却与患者的长期存活正相关^[11]。

YY1不仅可以通过激活致癌基因(如B23、c-Myc、HER2、c-Fos)和抑制抑癌基因(如CEBPD、DR5、microRNA-29、micro-2061)起到促进肿瘤的作用,同样也可以通过激活抑癌基因(如BRCA1、ER-GIC-53、HLJ1)和抑制致癌基因(如interferon β 、Has2、HOXB13)起到抑制肿瘤的作用^[12]。YY1在肿瘤的发生发展中起到很重要的作用,且在不同类型的肿瘤中起到的作用有显著差异,越来越多的证据提示YY1是潜在诊断、预后指标以及靶向治疗的新靶点,然而YY1在胃癌中的表达情况及可能参与胃癌发生发展的机制仍然不明确。本课题组利用定量PCR、免疫组织化学检测YY1在胃癌与对应癌旁组织中的表达情况,利用慢病毒载体表达系统构建YY1上调细胞株模型,通过体外实验研究YY1对胃癌细胞株SGC-7901的增殖及凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本

2011年6月~2012年6月,在南京医科大学第一附属医院行胃癌根治手术切除后,经病理证实为胃腺癌的胃癌组织和对应的癌旁组织标本21对。其中男14例,女7例,年龄45~79岁,平均年龄63.3岁。所有患者术前未接受新辅助化疗和放疗。人胃癌细胞系(SGC-7901、BGC-823、AGS)及胃正常黏膜上皮细胞GES-1由南京医科大学第一附属医院普外科实验室保存。

1.1.2 主要试剂

RPMI1640培养基及胰酶(美国HyClone公司);胎牛血清(FBS,美国Gibco公司);慢病毒转染试剂(中国上海生博公司);RNA TRIzol、结晶紫(日本TaKaRa公司);SYBR Premix Ex Taq试剂(德国Roch公司);小鼠抗人GAPDH单克隆抗体、兔抗人YY1单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶(HRP,美国Millipore公司);ECL蛋白印迹底物(美国Thermo公司);雷素青、链霉素(美国HyClone公司);CCK8(日本同仁DojinDO公司);凋亡检测试剂盒(加拿大Biolegend公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素的培养液中,置37℃5%CO₂培养箱中,0.25%的胰酶消化传代。

1.2.2 细胞感染

培养SGC-7901细胞生长至对数生长期,细胞融合至70%~80%时,0.25%胰酶消化细胞,铺入6孔板中,24 h待细胞充分贴壁,细胞融合率达40%~50%时进行感染,参照慢病毒感染试剂说明书分别转染YY1病毒和空载对照病毒。

1.2.3 定量PCR检测基因mRNA水平表达

实时荧光定量聚合酶链反应(q-PCR)检测YY1基因mRNA的表达水平,引物由美国Invitrogen公司合成。取对数生长期的细胞,按TRIzol试剂说明书提取总RNA。 β -actin引物序列,正义链:5'-GCTGTGCTATCCCTGTACGC-3';反义链:5'-TGC-CTCAGGGCAGCGGAACC-3'。YY1引物序列,正义链:5'-ACGGCTTCGAGGATCAGATTC-3';反义链:5'-TGACCAGCGTTTGTTCATGT-3'。反应体系20 μ l, SYBR 10 μ l,前后引物各0.4 μ l, cDNA 2 μ l,灭菌蒸馏水7.2 μ l。反应条件:预变性95℃30 s,变性95℃5 s,退火60℃30 s,共40个循环,在Step One Plus™ Real Time PCR System上完成。计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为YY1基因的相对表达量。

1.2.4 Western blot检测蛋白表达

按照蛋白提取试剂盒说明书分别提取待测细胞的总蛋白。取等量待测蛋白样品及蛋白Marker上样,进行SDS-PAGE凝胶电泳分离,转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入抗YY1抗体,4℃孵育过夜,TBST清洗3次,10 min/次,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗室温孵育2 h, TBST清洗3次后在ECL溶液中显色。GAPDH作为

内参对照。

1.2.5 免疫组织化学

采用免疫组织化学 SP 试剂盒检测,严格按照说明执行实验步骤,60℃烤片 2 h 常规脱蜡,3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶,山羊血清封闭 30 min,1:500 稀释的 YY1 兔抗人单克隆抗体 4℃孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,滴加羊抗兔二抗及链霉素抗生素蛋白过氧化物酶复合物,PBS 洗涤 3 次,DAB 显色。然后于正置显微镜下观察拍照。

1.2.6 CCK-8 和平板克隆实验检测细胞的增殖活性

取对数生长期的 3 组细胞制成单细胞悬液,分别以每孔 2×10^4 个/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板(100 μ l/孔)后继续培养,培养液为空白对照,四周的孔用 PBS 填充。每隔 24 h 检测 1 次,连续培养 6 d,每次各组随机选择 3 个孔,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,培养 2 h 后酶标仪测定波长 450 nm 处各孔的吸收值,绘制细胞生长曲线;平板克隆实验,6 孔板每孔中接种 200 个细胞,正常换液、培养 2 周后结晶紫染色、拍照,计算克隆形成数。

1.2.7 细胞凋亡的检测

Alexa Fluor 647 Annexin V 和 7-ADD 凋亡染色试剂盒用于凋亡的检测,严格按照实验步骤进行实

验,细胞接种于 6 孔板(3×10^5 个/孔),贴壁后更换无血清培养基饥饿 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化收获细胞,PBS 洗涤后加入固定液,加入 Alexa Fluor 647 AnnexinV 和 7-ADD 各 5 μ l,旋涡混匀后避光反应 15 min 上机检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计学软件进行数据分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,癌组织与癌旁组织间的表达差异采用配对 t 检验,其他组间差异采用独立样本 t 检验计算, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 YY1 在胃癌和相应癌旁组织中的表达

定量 PCR 实验结果显示,YY1 在 21 例胃癌和相应癌旁组织中都有表达,癌旁组织和癌组织的平均表达量(相对于各自内参基因 β -actin)分别为 0.043 ± 0.053 和 0.017 ± 0.016 ,两组比较差异有统计学意义($t = 2.726, P = 0.013$)。有 16 例患者癌组织表达量低于癌旁组织,免疫组织化学检测也显示 YY1 在癌组织中的表达低于癌旁组织,且提示在癌旁组织中 YY1 主要存在于腺体细胞的细胞核中,在癌组织中主要存在于细胞质中(图 1)。

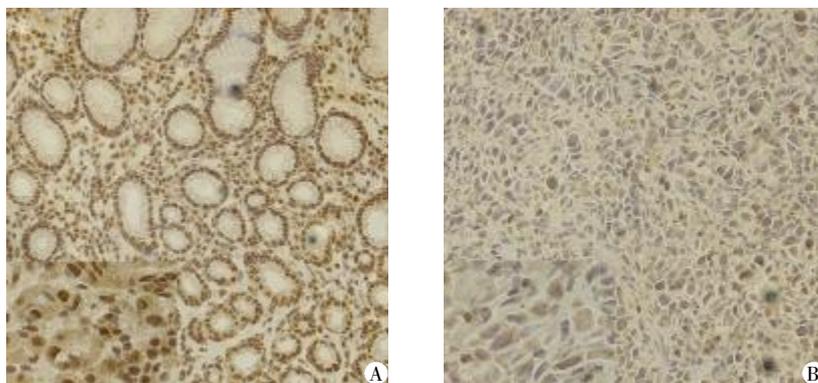


图 1 免疫组织化学检测 YY1 蛋白在癌旁(A)及癌组织(B)中的表达($\times 200$)

Figure 1 The expressions of YY1 mRNA level in paired adjacent (A) and gastric cancer (B) tissues by immunohistochemistry ($\times 200$)

2.2 YY1 在胃癌细胞株和正常黏膜上皮细胞中的表达

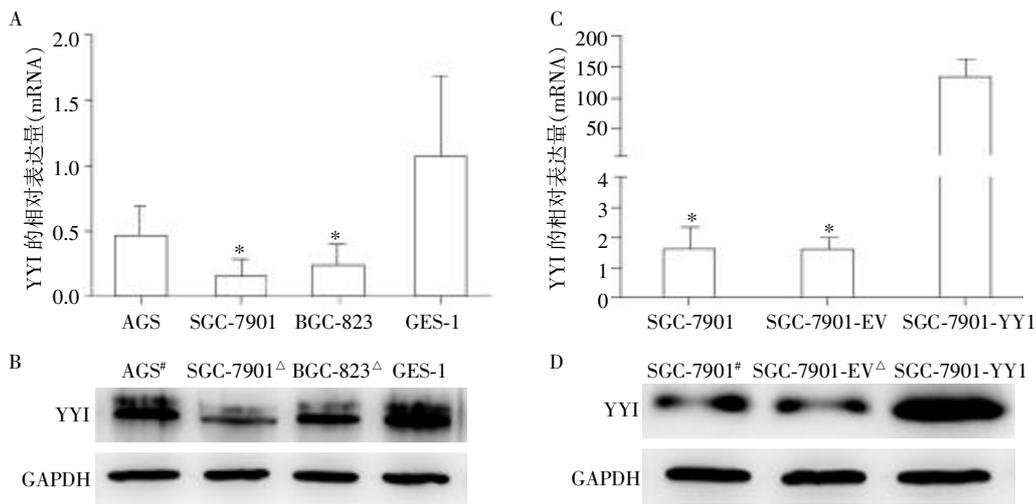
利用定量 PCR 和 Western blot 检测了 YY1 在胃癌细胞株和正常黏膜上皮细胞中的表达情况,结果显示 YY1 在正常黏膜上皮细胞株 GES-1 中的表达量最高。其中 mRNA 水平上 YY1 在 GES-1、AGS、SGC-7901 与 BGC-823 中的相对表达量分别为 0.87 ± 0.28 、 0.49 ± 0.21 、 0.17 ± 0.13 和 0.25 ± 0.16 ,后三者分别与 GES-1 相比,其表达存在差异(t 值分别

为 -0.19 、 -3.91 、 -3.34 , P 值分别为 0.132 、 0.017 、 0.029 ,图 2A)。蛋白水平上 YY1 在 GES-1、AGS、SGC-7901 及 BGC-823 中的相对表达量分别为 2.43 ± 0.15 、 1.65 ± 0.18 、 0.48 ± 0.16 和 0.98 ± 0.16 ,后三者分别与 GES-1 比较,其表达差异有统计学意义(t 值分别为 -6.67 、 -14.69 、 -11.75 , P 值分别为 0.003 、 0.000 、 0.000 ,图 2B)。

定量 PCR、Western blot 验证了过表达细胞株 SGC-7901-YY1 中 YY1 的过表达情况,其中 YY1 在

细胞系 SGC-7901、SGC-7901-EV 及 SGC-7901-YY1 中 mRNA 的相对表达量分别为 1.94 ± 1.90 、 1.62 ± 0.65 及 132.60 ± 52.97 ，SGC-7901 及空载对照 SGC-7901-EV 与 SGC-7901-YY1 相比差异具有统计学意义 (t 值分别为 -4.27 和 -4.28 ， P 值分别为 0.013 和 0.013 ，图 2C)。YY1 在细胞系 SGC-7901、SGC-7901-

EV 及 SGC-7901-YY1 中蛋白水平上的相对表达量分别为 0.81 ± 0.40 、 0.67 ± 0.05 及 2.29 ± 0.12 ，SGC-7901-YY1 与 SGC-7901 及空载对照 SGC-7901-EV 相比，在蛋白表达量水平上明显上调 (t 值分别为 19.15 和 20.64 ， P 值分别为 0.0030 、 0.0001 ，图 2D)。



A、B:与GES-1比较,* $P < 0.05$,* $P < 0.01$, $\Delta P < 0.001$;C、D:与SGC-7901-YY1比较,* $P < 0.05$,* $P < 0.01$, $\Delta P < 0.001$ 。

图 2 YY1 在正常胃黏膜上皮细胞株和胃癌细胞株中的表达

Figure 2 The mRNA and protein expression levels of YY1 in AGS,SGC-7901,BGC-823,GES-1 cell lines and SGC-7901 cell lines

2.3 YY1 对胃癌细胞株 SGC-7901 增殖活性的影响

利用 CCK-8 及平板克隆形成实验检测 YY1 对胃癌细胞株 SGC-7901 增殖活性的影响。结果显示，YY1 上调后细胞的增殖能力、生长速度明显下降，正常对照组与空载对照组细胞间无明显差异，提示 YY1 抑制胃癌细胞株的生长(图 3、4)。

2.4 YY1 对胃癌细胞株 SGC-7901 凋亡的影响

流式细胞仪检测细胞凋亡显示，相对 SGC-7901 和 SGC-7901-EV 组 (10.82 ± 1.04)% 和 (12.01 ± 0.87)% 的凋亡率，SGC-7901-YY1 组的凋亡率为 (28.53 ± 2.32)% ($P < 0.05$)，且空载对照组与正常组间无明显差异，表明 YY1 可以促进胃癌细胞株的

凋亡(图 5)。

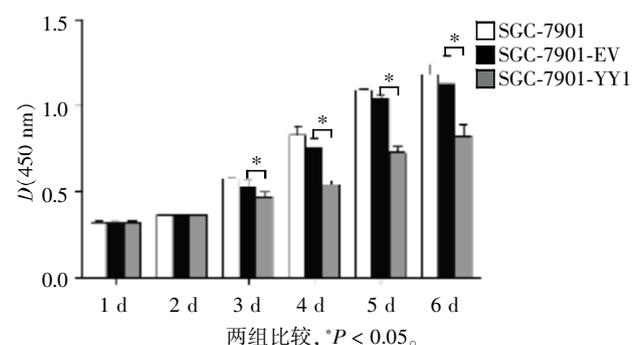


图 3 CCK-8 检测 YY1 对胃癌细胞株增殖的影响

Figure 3 Cell proliferation was detected by CCK-8

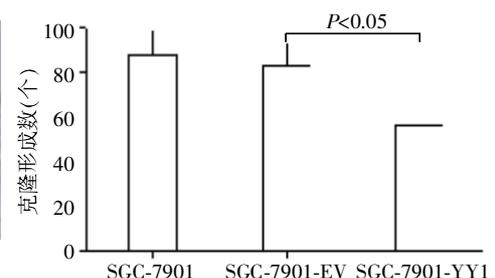
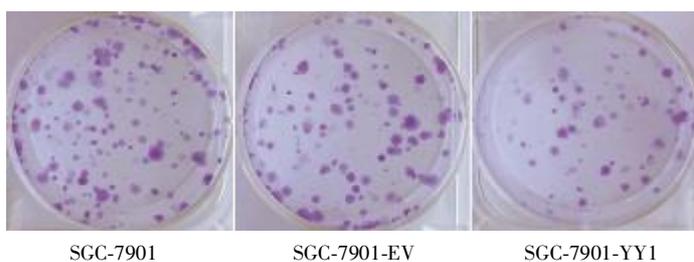


图 4 平板克隆形成实验检测细胞的克隆形成能力

Figure 4 Colony formation assay was used to evaluate cell growth

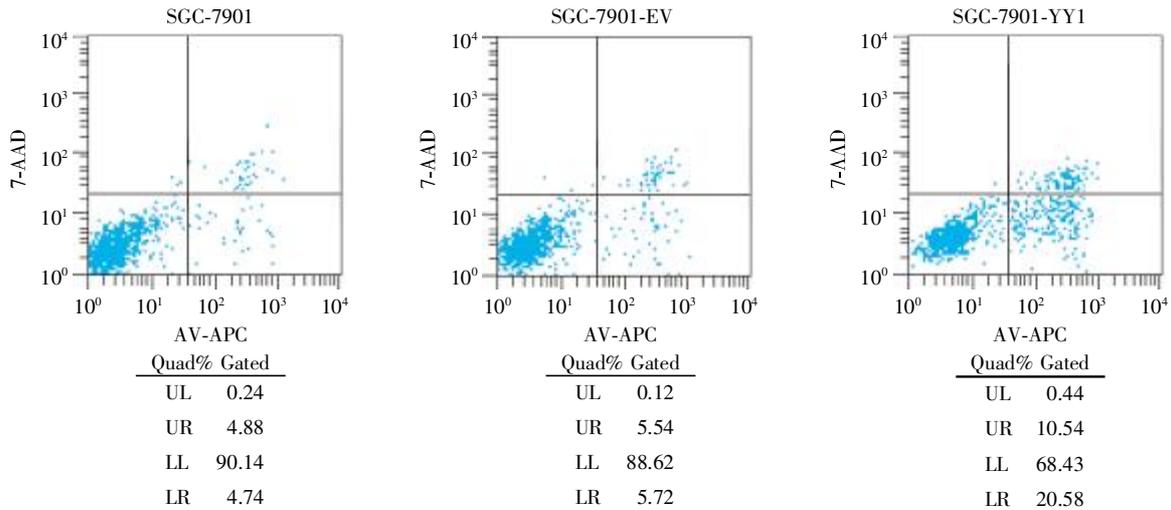


图 5 YY1 上调后细胞凋亡明显增加

Figure 5 Cell apoptosis increased significantly due to the up-expression of YY1

3 讨论

越来越多的证据显示 YY1 在肿瘤的发生发展中扮演重要角色,然而其在各种肿瘤中的具体功能作用是复杂多样甚至是矛盾的,其在胃癌中的表达情况以及相应功能作用目前仍然是不明确的。本课题组发现在胃癌组织中 YY1 的表达相对于癌旁组织下调;在胃癌细胞株 SGC-7901 中过表达 YY1 后,细胞增殖能力减弱,凋亡水平上升。这些数据提示 YY1 在胃癌的发生发展中可能起到抑癌的作用,有望成为胃癌靶向治疗的新靶点。

YY1 作为转录因子可以起到抑制或激活不同靶基因的双重作用,同一靶基因可以因招募的辅助因子不同而起到不同的作用。然而组蛋白的乙酰化和启动子区的甲基化是目前其相关机制研究的热点,基因组的遗传稳定性会因 YY1 对靶基因甲基化水平的影响而改变。在乳腺癌中 YY1 的高表达除了参与 HER2 基因的激活,导致不良预后,同时 YY1 参与的 E-cadherin 基因的甲基化也被认为是 E-cadherin 基因沉默的一个重要机制^[13]。最近在胃癌中发现 Annexin A6 基因的沉默也是由于 YY1 介导的 DNA 甲基化水平上调导致的,研究发现 Annexin A6 在胃癌中是个潜在的抑癌基因,提示 YY1 可能起到抑制 Annexin A6 的作用^[14], 然而其研究发现 Annexin A6 基因的甲基化水平与肿瘤组织的分化及 TNM 分期不相关,而且在本研究中发现胃癌组织中 YY1 是低表达的,其是利用 YY1 的敲除而不是上调 YY1 来研究 YY1 与 Annexin A6 的关系,他们的研究中并没有报道 YY1 在癌与正常组织中的表达情

况,这提示 YY1 的绝对表达量可能同样直接影响 YY1 基因本身的功能。另外在前列腺癌中的研究提示 YY1 蛋白在胞核与胞浆中的分布位置不同与样本的良恶性相关,这也提示 YY1 不仅在表达量上,其细胞核内外的分布也是其影响基因具体功能的指标。本研究的临床样本数量有限,细胞功能实验提供了补充,然而 YY1 在胃癌不同分期中的表达情况还有待临床大样本进一步验证,能否成为胃癌靶向治疗的靶点,及其在胃癌中的重要作用及相应分子机制还需要更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90
- [2] Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine [J]. N Engl J Med, 2007, 357(18): 1810-1820
- [3] Shi Y, Seto E, Chang LS, et al. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein [J]. Cell, 1991, 67(2): 377-388
- [4] Thomas MJ, Seto E. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? [J]. Gene, 1999, 236(2): 197-208
- [5] Castellano G, Torrisi E, Ligresti G, et al. The involvement of the transcription factor Yin Yang 1 in cancer development and progression [J]. Cell Cycle, 2009, 8(9): 1367-1372
- [6] Galloway NR, Diaz Osterman CJ, Reiber K, et al. Yin

(下转第 1024 页)

- 社,1993;34-36
- [11] Kristensen JM, Skov V, Petersson SJ, et al. A PGC-1 α - and muscle fibre type-related decrease in markers of mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle of humans with inherited insulin resistance [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(5):1006-1015
- [12] Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes [J]. *Cell*, 2001, 104(4):517-529
- [13] Zhou Y, Lee J, Reno CM. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1 FoxO1 interaction [J]. *Nat Med*, 2011, 17(3):356-365
- [14] Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 8(4):228-236
- [15] Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation [J]. *Diabetes*, 2011, 60(10):2441-2449
- [16] Shao S, Liu Z, Yang Y. SREBP-1c, Pdx-1, and GLP-1R involved in palmitate - EPA regulated glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(3):634-42
- [17] Green CD, Olson LK. Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic β -cells by stearoyl-CoA desaturase and Elovl6 [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 300(4):640-649
- [18] Martinez SC, Tanabe K, Cras-Meneur C, et al. Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *Diabetes*, 2008, 57(4):846-859
- [19] Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(1):C1-C11

[收稿日期] 2014-04-17

(上接第 1014 页)

- Yang 1 regulates the transcriptional repression of survivin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445(1):208-213
- [7] Weng W, Wang M, Xie S, et al. YY1-C/EBP α -miR34a regulatory circuitry is involved in renal cell carcinoma progression [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4):1921-1927
- [8] Allouche A, Nolens G, Tancredi A, et al. The combined immunodetection of AP-2 α and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(1):R9
- [9] Baritaki S, Sifakis S, Huerta-Yepez S, et al. Overexpression of VEGF and TGF- β 1 mRNA in Pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(1):69-79
- [10] Seligson D, Horvath S, Huerta-Yepez S, et al. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer [J]. *Int J Oncol*, 2005, 27(1):131-141
- [11] Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM, et al. Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10):3686-3696
- [12] Zhang Q, Stovall DB, Inoue K, et al. The oncogenic role of Yin Yang 1 [J]. *Crit Rev Oncog*, 2011, 16(3-4):163-197
- [13] 王静萱, 张清媛, 刘姝伶, 等. 乳腺癌组织中 YY1 表达与 E-cadherin 甲基化状态的关系 [J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(16):1169-1179
- [14] Wang X, Zhang S, Zhang J, et al. Annexin A6 is down-regulated through promoter methylation in gastric cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2013, 5(5):555-562

[收稿日期] 2014-03-09