

LATS1过表达对肺癌A549细胞增殖及周期的影响

熊伟 吴庆琛* 张诚

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

摘要 通过过表达手段上调大肿瘤抑制因子1(large tumor suppressor gene 1, *LATS1*)基因在A549细胞中的表达, 研究LATS1对A549细胞生长和细胞周期调控的作用。构建过表达LATS1基因的慢病毒载体, 转染A549细胞株, 采用RT-PCR和蛋白质印迹法检测转染后A549细胞中LATS1、YAP mRNA和蛋白的表达效率; 流式细胞术检测细胞凋亡、周期情况; CCK-8检测细胞的增殖水平变化。结果发现, 过表达LATS1慢病毒载体转染A549细胞株后, LATS1 mRNA及蛋白表达水平高于未处理组及转染空载体组, YAP mRNA及蛋白表达水平低于未处理组及转染空载体组; 过表达LATS1慢病毒转染后, A549细胞增殖率从第五天开始低于对照组($P<0.05$), 过表达组细胞G₁期比例明显增高($P<0.05$), 凋亡率明显增加($P<0.05$), 差异均有统计学意义。以上结果提示, LATS1可通过下调YAP的表达水平促进A549细胞的凋亡, 诱导G₁期阻滞, 降低细胞的增殖能力。

关键词 非小细胞肺癌; HIPPO; LATS1; YAP

Effect of *LATS1* Over-Expression on Proliferation and Cell Cycle Regulation of A549 Cells

Xiong Wei, Wu Qingchen*, Zhang Cheng

(Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract By over-expressing large tumor suppressor gene 1 (*LATS1*), we aimed to investigate its effect on the proliferation and cell cycle regulation in lung cancer cell A549. *LATS1* gene coding region was cloned into lentivirus vector, and then lentivirus particles were transfected into A549 cells to up-regulate the expression of *LATS1* gene. The expression of LATS1 and YAP were detected at both mRNA and protein levels by RT-PCR and Western blot. The apoptosis and cycle of cells were detected by flow cytometry. The proliferation level of cells was detected by CCK-8. The expression levels of LATS1 mRNA and protein were up-regulated significantly after the lentivirus vector of *LATS1* over expression transfected into A549 cells. Meanwhile, the expression levels of YAP mRNA and protein were down-regulated. 5th days after transfection with lentivirus vector of *LATS1* over expression, the proliferation rate of transfected cells was lower than untransfected cells ($P<0.05$). Flow cytometry showed that more cells of transfected went into phase G₁ and fewer cells went into phase S. Moreover, apoptosis rate was significant increased in transfected cells ($P<0.05$). The results demonstrate that LATS1 can promote A549 cells apoptosis, induce G₁ phase arrest and inhibit the cell proliferation by down-regulating the expression of YAP.

Key words NSCLC; HIPPO; LATS1; YAP

收稿日期: 2013-08-29 接受日期: 2013-11-04

重庆市科委科研项目(批准号: CSTC,2008BB5215)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89011132, E-mail: wuqc6@hotmail.com

Received: August 29, 2013 Accepted: November 4, 2013

This work was supported by Science and Technology Commission of Chongqing Project (Grant No.CSTC,2008BB5215)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011132, E-mail: wuqc6@hotmail.com

网络出版时间: 2013-12-11 15:41

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0273.html>

肺癌是二十一世纪以来发病率和死亡率都极高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌为主流群体,病例数量大,一直以来都是研究的难点和热点。全世界每年都会新增上百万的肺癌患者。近年来,我国肺癌死亡率仍以每年4.5%的速度增加,到2030年我国每年将会有170万中年人死于肺癌^[1-2]。在肺癌患者中非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)占80%以上。虽然近年来对肺癌的治疗方面取得了一定进步,但患者5年生存率仍较低。肺癌的发病过程是一个集遗传、环境及生活习惯等多因素于一体的复杂过程,其确切分子机制仍不清楚。

HIPPO信号转导通路对调节器官大小发育有着重要的作用。其最初发现于果蝇体内,而后进一步研究发现,人类机体中也存在着具有与果蝇HIPPO通路中各个因子相同功能的组件^[3-4]。近年来研究认为, HIPPO能促进细胞凋亡并对器官的大小产生重要的影响^[5]。研究表明, HIPPO信号转导通路由 *LATS1*等数种抑癌因子及一种癌基因 *YAP* 构成,但目前关于HIPPO通路的研究还较少,特别是在非小细胞肺癌方面还十分欠缺。因此我们在本研究中通过慢病毒载体使A549细胞中*LATS1*过表达,探究其对A549细胞生长和细胞周期调控的作用,为*LATS1*在NSCLC的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

*LATS1*兔抗人多克隆抗体购自Abnova试剂公司, *YAP*兔抗多克隆抗体购自Santa Cruz公司; *LATS1*过表达慢病毒载体由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。DL1000 DNA Marker、RNAiso Plus Total RNA提取试剂、Premix Taq购自TaKaRa公司; CCK-8细胞增殖/毒性检测试剂购自广州奕源生物科技有限

公司; 蛋白提取及BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒一抗稀释液、超敏ECL化学发光试剂盒购自碧云天; 抗 β -actin兔多克隆抗体购自北京康为世纪科技有限公司; 非小细胞肺癌细胞株A549为本科室冻存。

1.2 方法

1.2.1 过表达*LATS1*慢病毒载体转染A549细胞 将A549细胞分为3组: 未转染组(未进行处理的A549细胞); 空载体组(用空白病毒转染的A549细胞); *LATS1*组(用过表达*LATS1*慢病毒载体转染的A549细胞)。先于培养瓶中培养A549细胞株,待细胞状态良好处于对数生长期时,以每孔 1×10^5 细胞数接种6孔板,培养液2 mL,置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。24 h后,弃旧培养液,每孔加新鲜培养液1 mL,病毒稀释后以MOI值20的病毒数量加入培养孔中,另外每个培养孔加入稀释好的Polybrene以增强转染效果,小心混匀,继续培养12 h后弃去含病毒的培养液,换新鲜培养液继续培养,常规换液,培养96 h,正置荧光显微镜下观察荧光表达情况,转染效率大于80%认为转染成功,转至培养瓶继续培养。

1.2.2 RT-PCR检测各组细胞*LATS1*及*YAP* mRNA表达情况 *LATS1*、*YAP*引物构建于金斯瑞生物科技公司, *GAPDH*为内参(表1)。细胞达到一定数量后用0.25%的胰蛋白酶进行消化,离心收集细胞,加Trizol进行裂解,提取总RNA, RNA浓度测定合格后进行逆转录,扩增,电泳,再利用Gene Tools软件进行灰度值分析,实验重复3次。

1.2.3 Western blot检测*LATS1*与*YAP*蛋白表达 将未转染组、空载体组、*LATS1*组细胞进行消化离心后以预冷的PBS清洗细胞两次,转至EP管离心弃上清后加入适量蛋白裂解液及1%体积的蛋白酶抑制剂,冰上裂解30 min,再4 °C、12 000 r/min离心15 min得到

表1 RT-PCR引物
Table 1 Primer pairs for RT-PCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	产物大小 Product size
<i>YAP</i>	上游5'-TGA ACA AAC GTC CAG CA A GAT AC-3'	165 bp
	下游5'-CAG CCC CCA AAA TGA ACA GTA G-3'	
<i>LATS1</i>	上游5'-CCA CCC TAC CCA AAA A CAT CTG-3'	302 bp
	下游5'-CGC TGC TGA TGA GAT TTG AGT AC-3'	
<i>GAPDH</i>	上游5'-ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG-3'	528 bp
	下游5'-CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC-3'	

总蛋白。BCA法测蛋白浓度;取总蛋白50 μg , 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移到PVDF膜上, 50 g/L脱脂牛奶封闭2 h后加一定比例稀释的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后TBST室温摇床洗膜5 \times 5 min, 加入相应稀释的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, TBST室温摇床洗膜5 \times 5 min, 加ECL发光试剂后凝胶成像显色, β -actin为内参, 对条带进行统计分析。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡情况 培养细胞至铺板70%~80%, 换无血清培养基培养24 h, 然后换正常培养液培养24 h, 消化、离心收集细胞, 预冷PBS洗两次后加入预冷70%乙醇(充分吹打)固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 离心弃固定液后加入RNase和PI, 避光染色30 min, 流式细胞仪检测周期分布。实验重复3次。

消化离心收集各组细胞约 1×10^6 个, PBS洗2次, 加500 μL binding buffer重悬细胞, 然后加入2 μL Annexin V-FITC混匀, 加入5 μL 碘化丙啶, 混匀。避光、室温反应5 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复3次。

1.2.5 CCK-8检测细胞增殖能力 将对数期生长的A549细胞按1 000/孔接种于96孔板中, 分三组(未处理组、空载体组、过表达组), 每组设5个复孔, 孔板中培养液体积100 μL , 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养24 h。分别进行空载体及过表达载体的细胞转

染操作, 方法同前。转染后1 d开始进行检测, 在固定时间向待测孔加入10 μL CCK8溶液, 避光37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h后用酶标仪测定吸光度(D)值, 数据处理时去掉最大值和最小值。实验重复3次。

1.2.6 统计学分析 采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组均数比较采用 t 检验; 多组间单因素分析采用one-way ANOVA检验; $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

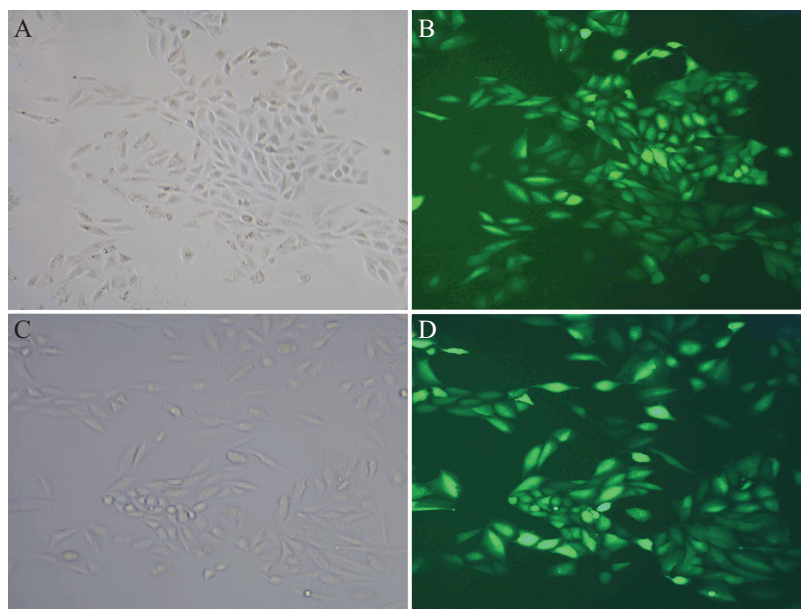
2 结果

2.1 慢病毒转染获得稳定过表达LATS1的A549细胞株

转染操作后96 h于正置荧光显微镜下观察荧光情况, 空载体组细胞荧光强, 转染效率95%以上, 细胞生长良好; 过表达LATS1组细胞荧光稍弱, 转染效率约90%, 转入培养瓶中持续培养, 得到稳定株(图1)。

2.2 RT-PCR检测细胞转染前后LATS1、YAP mRNA表达情况

未转染组与空载体组LATS1 mRNA的表达量无统计学差异($P<0.05$), 而LATS1转染组LATS1 mRNA的表达量明显高于未处理组及空载体组($P<0.05$), 结果有统计学意义(图2A, 表2); 未转染组与空载体组YAP mRNA的表达量无统计学差异($P<0.05$), LATS1转染组



A: 光镜下的空载体组; B: 荧光显微镜下的空载体组; C: 光镜下的LATS1转染组; D: 荧光显微镜下LATS1转染组。

A: the empty vector transfected group under optical microscope; B: the empty vector transfected group under fluorescence microscope; C: LATS1 transfected group under optical microscope; D: LATS1 transfected group under fluorescence microscope.

图1 A549细胞的慢病毒转染结果(200 \times)

Fig.1 Lentiviral vector transfection into A549 cells (200 \times)

YAP mRNA的表达量明显低于未处理组及空载体组 ($P<0.05$), 结果有统计学意义(图2B, 表2)。

2.3 Western blot检测各组细胞LATS1及YAP蛋白的表达情况

未转染组和空载体组细胞LATS1、YAP蛋白表达无明显差异($P<0.05$); *LATS1*转染组LATS1蛋白表达量明显高于未转染组和空载体组($P<0.05$), 证明转染有效, 而*LATS1*转染组的YAP蛋白表达量低于未转染组和空载体组($P<0.05$), 差异有统计学意义(图3和表2)。

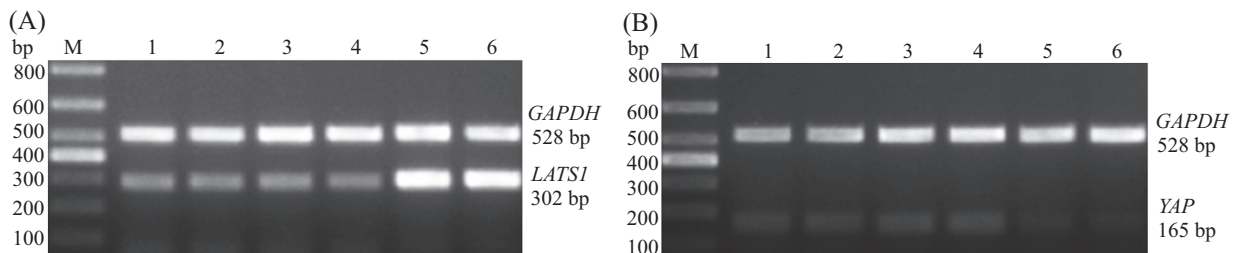
2.4 过表达*LATS1*基因对A549细胞生长的影响

CCK-8检测结果显示, 在转染前4 d, 未转染组、

*LATS1*转染组在每个时间点的D值之间无明显差异 ($P<0.05$), 在转染后第5 d开始, *LATS1*转染组的细胞增殖率开始明显低于未处理组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$, 图4), 表明LATS1具有抑制A549细胞增殖的作用。

2.5 过表达*LATS1*基因对A549细胞周期的影响

采用流式细胞术对各组细胞进行周期分析, 结果与未转染组及空载体组相比, *LATS1*转染组G₁期细胞比例增多, 差异具有统计学意义($P<0.05$), S期细胞比例明显降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$), G₂期无明显差异($P>0.05$, 图5, 表3)。



M: marker; 1,2: 未转染组; 3,4: 空载体组; 5,6: *LATS1*转染组。

M: marker; 1,2: untransfected group; 3,4: empty vector transfected group; 5,6: *LATS1* transfected group.

图2 *LATS1*、*YAP*在三组细胞中的转录水平

Fig.2 *LATS1* and *YAP* transcriptional levels in the three group cells

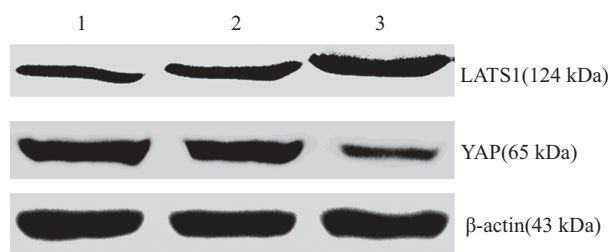
表2 转染前后三组细胞间的LATS1和YAP mRNA和蛋白质水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 The expression of *LATS1* and *YAP* in mRNA and protein levels in the three group cells ($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	未转染组 Untransfected group	空载体组 Empty vector transfected group	<i>LATS1</i> 转染组 <i>LATS1</i> transfected group
<i>LATS1</i> mRNA	0.659 8±0.037 3	0.604 7±0.009 2	1.184 9±0.091 7*
<i>YAP</i> mRNA	0.552 8±0.031 4	0.538 4±0.009 3	0.406 3±0.020 3*
LATS1 protein	1.016 8±0.012 1	0.991 4±0.016 7	1.574 4±0.074 6*
YAP protein	1.262 3±0.080 2	1.185 2±0.072 2	0.889 9±0.070 3*

* $P<0.05$, 与其他组比较。

* $P<0.05$ vs other groups.

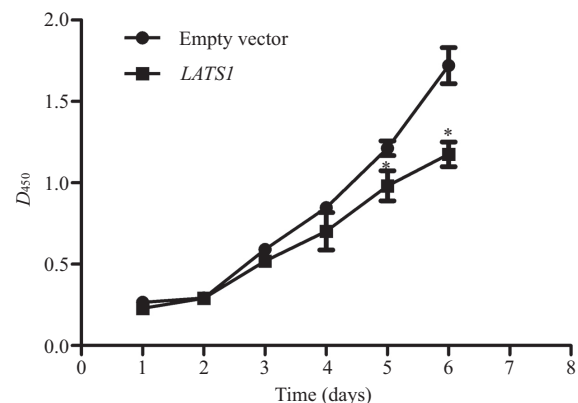


1: 未转染组; 2: 空载体组; 3: *LATS1*转染组。

1: untransfected group; 2: empty vector transfected group; 3: *LATS1* transfected group.

图3 *LATS1*、*YAP*蛋白在三组细胞中的表达情况

Fig.3 *LATS1* and *YAP* protein expressions in the three group cells

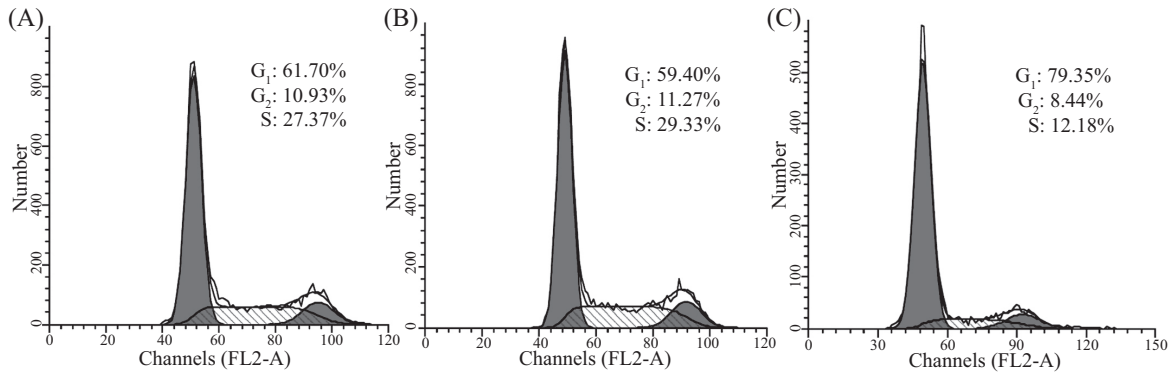


* $P<0.05$, 与空载体组比较。

* $P<0.05$ vs empty vector group.

图4 *LATS1*基因过表达对A549细胞生长的影响($\bar{x}\pm s$)

Fig.4 Effect of *LATS1* over-expression on the proliferation of A549 cells ($\bar{x}\pm s$)

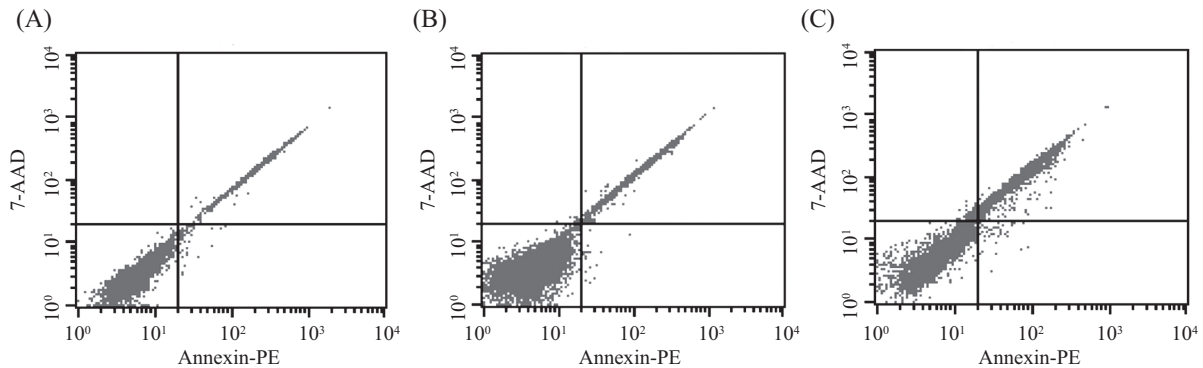


A: 未转染组; B: 空载体组; C: *LATS1*转染组。

A: untransfected group; B: empty vector transfected group; C: *LATS1* transfected group.

图5 *LATS1*过表达对A549细胞周期的影响

Fig.5 Impact of *LATS1* over-expression on cell cycle of A549 cells



A: 未转染组; B: 空载体组; C: *LATS1*转染组。

A: untransfected group; B: empty vector transfected group; C: *LATS1* transfected group.

图6 *LATS1*过表达对A549细胞凋亡的影响

Fig.6 Impact of *LATS1* over-expression on cell apoptosis of A549 cells

表3 *LATS1*基因对A549细胞周期及凋亡的影响(% , $n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of *LATS1* on the cell cycle and apoptosis of A549 cells (% , $n=3, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	细胞周期 Cell cycle			凋亡 Apoptosis
	G ₁	S	G ₂	
Untransfected	61.7±1.3	31.5±4.1	6.9±3.6	11.3±0.7
Empty vector transfected	61.0±1.8	31.6±2.4	7.3±3.4	10.9±1.8
<i>LATS1</i> transfected	80.1±1.6*	11.3±3.9*	8.6±2.3	34.6±5.5*

* $P < 0.05$, 与其他组比较。

* $P < 0.05$ vs other groups.

2.6 *LATS1*基因过表达对A549细胞凋亡的影响

流式细胞仪对各组细胞凋亡情况进行检测, 结果显示*LATS1*转染组细胞的凋亡率明显高于未转染组和空载体组($P < 0.05$), 差异有统计学意义; 未转染组和空载体组凋亡率无明显差异($P > 0.05$, 图6, 表3)。

3 讨论

HIPPO信号通路高度保守, 对生物生长控制有

着重要作用并且对器官细胞的增殖和凋亡有关键的调节作用。*LATS1*为HIPPO信号通路中的重要作用元件, 其在多种肿瘤组织中均存在着低表达或者表达缺失现象, 如在乳腺癌^[6]、星型细胞瘤^[7]中启动子的甲基化、宫颈癌^[8]中*LATS1*的缺失; Salah等^[9]认为, *LATS1*能通过诱导G₂~M及G₁~S的静止而对肿瘤细胞的生长产生抑制作用, *LATS1*还可以通过对凋亡蛋白的调节而促进细胞凋亡, 提示*LATS1*在多种

肿瘤组织及相应癌旁组织中有差异性表达,与肿瘤发生密切相关。YAP为HIPPO通路的重要作用靶点,位于LATS1/2下游,研究认为HIPPO通路中的上游转录因子均能通过磷酸化和促进细胞质-细胞核转位而对YAP起负性调节作用^[10]。YAP在多种肿瘤组织中高表达,如肝癌、前列腺癌、食管癌等,目前认为YAP为癌基因。在进一步研究中Overholtzer等^[11]和Liu等^[12]均提出低表达YAP能抑制肝癌细胞的增殖能力;Wang等^[13]提出YAP在NSCLC组织中高表达,并且在体外实验中发现YAP能增加细胞的增殖及侵袭能力,提示了通过对癌基因YAP进行靶向干预来抑制肿瘤细胞的增殖力、侵袭力的可能。研究证明,LATS1、LATS2均能与下游的YAP结合,并对YAP有一定的调控作用,但以LATS1为主,能抑制YAP引起的致瘤改变^[14]。2008年,Zhang等^[15]发现LATS1过表达能有效地抑制YAP的活性,并对乳腺癌细胞中上皮间叶细胞转变、迁移产生了抑制作用。结合目前文献资料,LATS1可能靶向调节YAP并且对某些肿瘤发生发展产生重要的作用,但目前相关研究还较少,需要进一步探讨。

近来研究指出,LATS1为抑癌因子,但LATS1在NSCLC的研究尚未见报道,本研究通过构建过表达LATS1的慢病毒载体,稳定转染A549细胞株,并采用RT-PCR、Western blot验证LATS1有效的高表达后,YAP mRNA及蛋白的表达量变化,并通过CCK-8实验绘制增殖曲线、流式细胞术检测转染LATS1后A549细胞周期及凋亡情况。结果表明,高表达LATS1使A549细胞G₁期比例明显增高,S期比例明显下降;过表达LATS1的A549细胞的增殖能力明显降低,细胞凋亡率明显增高。实验结果提示,LATS1基因可能通过诱导A549细胞停滞在G₁期,而降低A549细胞增殖能力,并引起A549细胞凋亡率增高。这与LATS1在宫颈癌^[12]方面的研究结果基本符合。另一方面,通过RT-PCR、Western blot检测有效过表达LATS1的A549细胞中YAP mRNA及蛋白的表达,发现YAP mRNA及蛋白的表达量均明显减低,提示在A549细胞中过表达LATS1可能对YAP产生了抑制作用。上调LATS1对A549细胞生物学行为产生的作用可能与癌基因YAP的表达量降低有关。LATS1和YAP相互作用机制还需进一步实验明确。从目前研究结果来看,进一步针对LATS1在NSCLC侵袭能力、体内致瘤性方面的影响及相关机制研究非常必要。

LATS1在非小细胞肺癌的发生、发展过程中可

能起着重要的作用,然而关于LATS1抑癌作用的产生机制及与其他通路的相互作用关系还十分复杂,有待于进一步深入研究。全面深入地研究LATS1可为肺癌的诊断、治疗提供新的策略和靶点。

参考文献 (References)

- 1 Han ZL, Wei XS, Fang MC, Xiang RW, Wei PL, Ai SW. Cigarette smoking status and smoking cessation counseling of chinese physicians in wuhan, hubei province. *Asia pac J public health* 2008; 20(3): 183-92.
- 2 Thomas JL, Bronars CA, Stewart DW, Okuyemi KS, Befort CA, Nazir N, *et al.* Psychometric properties of a brief Smoking consequences questionnaire for adults (SCQ-A) among african American light smokers. *Subst Abuse* 2009; 30(1): 14-25.
- 3 Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK. The drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 2003; 114(4): 457-67.
- 4 Udan RS, Kango SM, Nolo R, Tao C, Halder G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts Pathway. *Nat Cell Biol* 2003; 5(10): 914-20.
- 5 Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: Growth control and beyond. *Development* 2011; 138(1): 9-22.
- 6 Takahashi Y, Miyoshi Y, Takahata C, Irahara N, Taguchi T, Tamaki Y, *et al.* Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4): 1380-5.
- 7 Jiang Z, Li X, Hu J, Zhou W, Jiang Y, Li G, *et al.* Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of LATS1 and LATS2 in human astrocytoma. *Neurosci Res* 2006; 56(4): 450-8.
- 8 Visser S, Yang X. Identification of LATS1 transcriptional targets in heLa cells using whole human genome oligonucleotide microarray. *Gene* 2010; 449(12): 22-9.
- 9 Salah Z, Melino G, Aqeilan RI. Negative regulation of the Hippo pathway by E3 ubiquitin ligase ITCH is sufficient to promote tumorigenicity. *Cancer Res* 2011; 71(5): 2010-20.
- 10 Zeng Q, Hong W. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell* 2008; 13(3): 188-92.
- 11 Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Squi DC, *et al.* Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(33): 12405-10.
- 12 Liu AM, Xu MZ, Chen J, Poon RT, Luk JM. Targeting YAP and Hippo signaling pathway in liver cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(8): 855-68.
- 13 Wang Y, Dong Q, Zhang Q, Li Z, Wang E, Qiu X. Over expression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci* 2010; 101(5): 1279-85.
- 14 Hao Y, Chun A, Cheung K, Rashidi B, Yang X. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J Biol Chem* 2008; 283(9): 5496-509.
- 15 Zhang J, Smolen G A, Haber DA. Negative regulation of YAP by LATS1 underscores evolutionary conservation of the *Drosophila* Hippo pathway. *Cancer Res* 2008; 68(8): 2789-94.