

CRISPR/Cas9 介导的 LATS1/2 敲除抑制卵巢癌细胞 ES-2 增殖

林仙德[#], 胡灵灵[#], 陈子彦, 胡汉寅, 杨柳青, 王卓文, 钱若文轩,
刘胜兵, 潘巍巍^{*}

(嘉兴学院 医学院生物教研室, 浙江 嘉兴 314001)

摘要 Hippo 信号通路在哺乳动物肝脏发育、动态平衡、再生和疾病中发挥非常重要的作用。大肿瘤抑制基因 1/2 (large tumor suppressor 1/2, LATS1/2) 激酶是 Hippo 信号通路的关键激酶, 可以磷酸化 YES 相关蛋白 (yes-associated protein, YAP), 从而调节 YAP 的核质定位和降解。本文采用 CRISPR/Cas9 方法构建慢病毒介导的 *Last1/2* 基因敲除的载体, 通过包装、感染和嘌呤霉素筛选, 获得 LATS1/2 部分敲除的人卵巢癌 ES-2 和 H08910 细胞, 免疫印迹方法检测 LATS1/2 表达明显减少。细胞增殖实验检测 LATS1/2 缺失明显抑制 ES-2 和 H08910 细胞增殖。软琼脂克隆形成实验表明, LATS1/2 缺失抑制卵巢癌 ES-2 细胞的克隆形成能力。细胞划痕和 Transwell 实验证明, LATS1/2 缺失明显抑制卵巢癌 ES-2 细胞迁移。流式细胞检测发现, LATS1/2 敲除促进卵巢癌 ES-2 细胞凋亡并影响细胞周期。裸鼠成瘤实验表明, LATS1/2 缺失明显抑制体内肿瘤组织增殖。分子机制研究表明, LATS1/2 敲除促进卵巢癌 ES-2 细胞中胶原 I 型 $\alpha 1$ (collagen type I $\alpha 1$, Col1 $\alpha 1$) 基因表达量增加, 在卵巢癌 ES-2 细胞中同时敲除 LATS1/2 和 COL1A1, 可以促进细胞克隆形成。综上所述, 人卵巢癌 ES-2 细胞中 LATS1/2 缺失能促进 COL1A1 表达增加, 从而抑制细胞增殖、转移和克隆形成, 并影响细胞周期和促进细胞凋亡。

关键词 大肿瘤抑制基因 1/2 (LATS1/2); 卵巢癌; 细胞增殖; 凋亡

中图分类号 R373.39

CRISPR/Cas9-mediated LATS1/2 Knock-out Inhibits Proliferation of ES-2 Ovarian Cancer Cells

LIN Xian-De[#], HU Ling-Ling[#], CHEN Zi-Yan, HU Han-Yin, YANG Liu-Qing,
WANG Zuo-Wen, QIANRUO Wen-Xuan, LIU Sheng-Bing, PAN Wei-Wei^{*}

(College of Medicine, Jiaxing University, Jiaxing 314001, Zhejiang, China)

Abstract The Hippo signaling pathway plays essential roles in mammalian liver development, homeostasis, regeneration and disease. Large tumor suppressor 1 and 2 (LATS1/2) are core kinases of the Hippo signaling pathway, which subsequently phosphorylate transcriptional co-activators, Yes-

收稿日期: 2018-11-29; 修回日期: 2019-02-23; 接受日期: 2019-03-12

国家自然科学基金 (No.81402162 和 No.31871402); 浙江省自然科学基金 (No.LY17H160060); 浙江省大学生科技创新项目 (No. 2018R417024) 和 重点 SRT 项目 (No.NH85178445) 资助

^{*} 通讯作者 Tel: 0573-83643850; E-mail: wwpan@mail.zjxu.edu.cn

[#] 共同第一作者

Received: November 29, 2018; Revised: February 23, 2019; Accepted: March 12, 2019

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.31871402 and 81402162); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY17H160060); College Students' Science and Technology Innovation Project (No. 2018R417024) and Student Research Training project (No. NH85178445)

^{*} Corresponding author Tel: 0573-83643850; E-mail: wwpan@mail.zjxu.edu.cn

[#] Co-first author

associated protein (YAP) and regulated nucleus location. In this study, we constructed a CRISPR/Cas9 *Lats1/2* gene double knock-out (LATS1/2 KO) lentiviral vector, packaged lentiviral particles, then infected ES-2 cells, cells were cultured in DMEM medium with puromycin (2μg/mL) for 3 days. Western blotting result showed that LATS1/2 protein expression was significantly decreased. LATS1/2 deletion inhibited ES-2 cell proliferation, colony formation, and cell migration. In addition, LATS1/2 deletion promoted ES-2 cell apoptosis. Deletion of LATS1/2 also inhibited the tumorigenic capacity in vivo. Molecular mechanism studies have shown that LATS1/2 deletion significantly increased COL1A1 expression. Deletion of COL1A1 partially restored the anchorage independent growth of LATS1/2 deleted ES-2 cells. In conclusion, LATS1/2 deletion inhibited cell proliferation, migration and colony forming, and promoted cell apoptosis through up-regulating COL1A1 expression.

Key words large tumor suppressor 1/2(LATS1/2); ovarian cancer; proliferation; apoptosis

卵巢癌是妇科的恶性疾病,致死率在所有妇科癌症中居第 1 位。由于缺少特殊的临床症状和有效的筛检手段,患者被确诊为卵巢癌时往往已是晚期,预后亦比其他癌症差。因此,发现新的卵巢癌治疗靶点对于治疗显得尤为重要。

Hippo 信号通路 with 癌症发生密切相关。在哺乳动物中,Hippo 信号通路的主要功能是抑制转录调节因子 YES 相关蛋白 (yes-associated protein, YAP) 和转录共激活 PDZ 结合域蛋白 (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ) 的活性^[1,2]。其核心组成元件为哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 (mammalian STE20-like protein kinase 1/2, Mst1/2)^[3],大肿瘤抑制基因 1/2 (large tumor suppressor 1/2, LATS1/2)^[4,5] 以及它们的适配器蛋白质 SAV (Sav family WW domain-containing protein 1, Salvador1)^[6] 和 MOB1 (mps one binder kinase activator-like 1)^[7]。LATS1/2 被 MST1/2 磷酸化,可能也有自磷酸化作用。具有活性的 LATS1/2 可以磷酸化 YAP,并转录共激活 TAZ 蛋白的 PDZ 结合域来维持组织器官大小,影响癌症发生。

LATS1/2 分别定位于 6q25.1 和 13q12.11 染色体上,具有调控细胞周期和 DNA 损伤信号通路的作用^[8]。LATS1/2 可以结合有丝分裂器,通过 G₂/M 期阻滞和 G₁/S 期阻滞调控细胞周期^[9, 10]。LATS1/2 不仅作为肿瘤抑制基因发挥作用,同时也影响正常细胞的命运。此外,LATS1/2 通过 Chk1-Lats2-14-3-3 和 Chk1-Lats2-p21 轴参与 DNA 损伤过程^[11, 12]。Zhou 等^[13]研究表明,LATS1 蛋白在胃癌组织中低表达,Xu 等^[14]研究表明,LATS1 在卵巢癌组织中的表达与 YAP 呈负相关。LATS1/2 在卵巢癌中的作用研究较少且至今尚不清楚。本研究通过 CRISPR/Cas9-LATS1/2 基因敲除的慢病毒感染卵巢癌 ES-2 和 HO8910 细胞,获得 LATS1/2 基因敲除

的 ES-2 和 HO8910 细胞,通过细胞增殖、克隆形成和细胞迁移,研究 LATS1/2 缺失在卵巢癌中的作用,为进一步研究 Hippo 信号通路关键蛋白质抑制剂在卵巢癌治疗中的作用奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

TAKARA PrimerSTAR HS 高保真酶、5×PS 缓冲液、T4 DNA 连接酶和氨苄霉素均购自大连宝生物公司。T4 PNK 和 BsmB1 购自 NEB 公司。DL10000 DNA Marker、PCR 产物回收试剂盒、DNA 小量胶回收纯化试剂盒和质粒提取试剂盒均购自 Axygen biosciences 公司。*E. coli* DH5α 由本实验室保存。Polybrene 购自 Sigma; poly Jeit 购自 SignaGen; FBS 购自 Gibco; DMEM/F12 和 RPIM1640 细胞培养液, PBS、胰蛋白酶、青链霉素购自 Hyclone 公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;cDNA 逆转录试剂盒和 Q-PCR 试剂盒购自大连宝生物;β-肌动蛋白、LATS1、LATS2、p-YAP、p-ERK1/2 和 ERK1/2 抗体购自 Cell signaling 公司;COL1A1 抗体和 YAP/TAZ 抗体购自 Santa Cruze; 各种二抗购自 Jackson labs。lentiCRISPR v2、psPAX2 和 pMD2.G 质粒由美国加州大学圣地亚哥分校管坤良教授赠送。

1.2 细胞培养

卵巢癌 ES-2 和 HO8910 细胞购自中科院上海细胞所。取 - 80℃ 下保存的细胞复苏至 10 cm 的培养皿,以含有 10% FBS、1% 青链霉素的 DMEM/F12 细胞培养液,于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,每 d 换液。当细胞密度达 90%时,以 1:3 的比例接种到 2 个 10 cm 培养皿,每 1~2 d 换新鲜培养液,供后续实验使用。

1.3 基因敲除的 sgRNA 序列

hLast1: 5'-ACAAGAAAGATGAAGAGCGA-3';

hLast1: 5'-AAATCCATGCTATCTTGCCG-3';
hLast2: 5'-GTAGGACGCAAACGAATCGC-3';
hLast2: 5'-TCCAAACTACATCGCACCCG-3'
hcol1a1-1: 5'-GACGGGACAGCACTCGCCCT-3';
hcol1a1-2: 5'-GCAGGAGATTACCTCGACGC-3'

1.4 CRISPR/Cas9 慢病毒载体构建

上下游引物混合物退火体系:上游引物 5 μL (100 μmol/L), 下游引物 5 μL (100 μmol/L), 5×退火缓冲液 10 μL, 无菌水 30 μL, 共 50 μL 体系。退火条件:95 ℃ 2 min, 每 90 s 降低 1 ℃。退火引物的磷酸化:上游引物 1 μL (100 μmol/L), 下游引物 1 μL (100 μmol/L), 10×T4 连接缓冲液 1 μL, T4 PNK 0.5 μL, 无菌水 6.5 μL, 共 10 μL。使用 *BsmB1* 酶切 lentiCRISPR v2 空载体, 琼脂糖凝胶电泳酶切产物, 胶回收酶切后的空载体 lentiCRISPR v2/*BsmB1*, 核酸定量分析仪测回收空载体浓度, 取回收的空载体 50 ng, 空载酶切产物与目的基因酶切产物连接, 16 ℃, 8 h 连接过夜, 连接产物于 4 ℃ 保存。将重组连接产物转化 *E coli* DH5α 感受态细胞, 并同时设置阴性和阳性对照, 涂布于含氨苄抗性的 LB 培养基, 于 37 ℃ 恒温培养箱中培养过夜。挑取含重组连接产物的单克隆, 接种于含氨苄抗性的 LB 培养液, 于 37 ℃ 恒温摇床 300 r/min 摇过夜。离心, 弃去上清至剩一滴菌液, 用质粒提取试剂盒 40 μL 洗提液水抽提。Lenti-lats1/2 质粒送至上海生物科技有限公司测序。

1.5 病毒包装和 LATS1/2 敲除的卵巢癌细胞筛选

接种 1.0×10⁵ 293T 细胞至 6 孔板过夜培养。第 2 d 加质粒前, 给 293T 细胞换上新鲜 DMEM 培养液, 再将 poly Jet 与病毒空载或含有 Lenti-Lats1 KO 病毒质粒, 或 Lenti-Lats2 KO 病毒质粒混合均匀 (lenti-lats1 KO 400 ng, psPAX2 200 ng 和 pMD2G 200 ng 和 2.4 μL poly Jet), 轻轻加入到 293T 细胞中, 并使其均匀分布于细胞上。置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中过夜培养。同时, 将 1×10⁵ 个 ES-2 细胞种于 6 孔板。第 3 d, 使用 0.45 μm 过滤器过滤病毒上清 (空载病毒和 LATS1/2 双基因敲除病毒), 使其感染 ES-2 细胞, 并在病毒上清中加入 Polybrene。病毒感染 24 h 后, 换成含嘌呤霉素 (2 μg/mL) 的培养液, 筛选对照细胞 (感染病毒空载) LATS1/2 基因敲除细胞。*Col1a1* 基因敲除的卵巢癌 ES-2 细胞获取过程同上。

1.6 YAP5SA 过表达细胞

接种 1.0×10⁵ 293T 细胞至 6 孔板过夜培养。第 2 d 加质粒前, 给 293T 细胞换上新鲜 DMEM 培养

液, 再将 poly Jet 与逆转录病毒空载体 pQCXIH 或 pQCXIH-YAP5SA 载体混匀, 加入到 293T 细胞中, 并使其均匀分布于细胞上。48 h 后, 使用 0.45 μm 的过滤器过滤病毒上清 (空载病毒和 YAP5SA 过表达病毒) 使其感染 ES-2 细胞, 并在病毒上清中加入 Polybrene。病毒感染 48 h 后, 换成含潮霉素 (50 μg/mL) 的培养液, 筛选对照细胞 (感染病毒空载) 和 YAP5SA 过表达细胞。

1.7 细胞连续 3 d 计数

血细胞计数板计数, 分别取 1×10⁵ 个细胞/孔对照细胞与 LATS1/2 基因敲除的卵巢癌 ES-2 细胞接种于 6 孔板过夜培养, 换成新鲜培养基或无血清培养基连续 3 d 计数, 每 d 计数前用倒置荧光显微镜拍照。

1.8 TRIzol 法提取细胞总 RNA 和定量 PCR

用 TRIzol 法提取卵巢癌细胞总 RNA, 过程详见试剂说明。使用核酸定量分析仪测 RNA 浓度。逆转录过程如下: 65 ℃ 保温 5 min, 冰上迅速冷却, 98 ℃ 10 s, 55 ℃ 15 s, 72 ℃ 60 s, 30 个循环。将 cDNA 以 1:5 比例用 DEPC 水稀释, 对照组 cDNA 和实验组 cDNA 用实时荧光定量 PCR 检测。

1.9 免疫印迹检测

将对照细胞与 LATS1/2 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞过夜培养, 计数, 分别收集 3×10⁵ 个对照细胞与 LATS1/2 敲除的卵巢癌细胞于 1.5 mL 的离心管中, 12 000 r/min 离心 2 min 弃培养液, 加 100 μL RIPA 蛋白质裂解液重悬细胞, 提取细胞总蛋白质, 再加 25 μL 5×蛋白质上样缓冲液混匀, 置于金属浴上 95 ℃ 加热 5 min 后取出放冰上迅速冷却。将制好的蛋白质样品用微孔进样针, 各吸取 15 μL 加入到浓缩胶的上样孔中。电泳 90 min, 湿转 60 min, 将蛋白质转到 PVD 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 1×PBST 洗 2 次, 每次 7 min。然后, 按照需要对膜进行裁剪, 分别与 β-肌动蛋白 (1:2 000), LATS1 (1:2 000), LATS2 (1:2 000), p-YAP (1:2 000), COL1A1 (1:100) 一抗 4 ℃ 孵育过夜。第 2 d, 将膜取出, 用 PBST 洗膜 3 次, 10 min/次。再用二抗室温孵育 1 h (二抗按 1:5 000 配到 5% 脱脂奶粉中), 再用 PBST 洗膜 3 次, 10 min/次。杂交反应后, 应用 ECL Western 印迹化学发光试剂盒暗房显影。

1.10 PE-Annexin V 染色检测细胞凋亡

将对照细胞与 LATS1/2 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞过夜培养, 计数, 分别收集 1×10⁶ 个细胞于 15 mL 的离心管中 (对照卵巢癌 ES-2 细胞需要 2 管)。用

预冷 1×PBS 补足至 2 mL, 800 r/min 离心 5 min 弃上清, 再用预冷的 2 mL 1×PBS 洗涤 2 次, 用 1 mL 1×结合缓冲液重悬细胞, 取 1×10^5 个细胞 (即 100 μL 液体) 放置到 1.5 mL 离心管中, PE-Annexin V 染色按照试剂盒说明操作, 设置对照, 室温避光放置 15 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.11 软琼脂克隆形成实验

配置 0.5% 下层胶, 取 1.5 mL 混合液于 6 孔板, 配制底层胶, 室温静置 15 min, 待胶凝固。将对照细胞与 LATS1/2 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞, 用培养液将细胞吹打成单细胞悬液, 血细胞计数板计数, 与 0.35% 顶层胶混合, 接种于 6 孔板, 细胞数为 2 500/孔。室温静置 15 min 待胶凝固, 在上层放入 2 mL 新鲜 DMEM 培养液, 每 2~3 d 换新鲜 DMEM 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养 14~20 d, 用结晶紫染色后计算克隆数 (细胞数目大于 50 cells/colony), 每组设 3 个重复, 实验重复 3 次。

1.12 细胞划痕实验

将对照细胞与 LATS1/2 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞接种于 6 孔板过夜培养, 待细胞密度达到 80%, 用枪头在细胞表面划过, 使细胞形成划痕。给细胞换成无血清培养液, 分别在 0 和 20 h 在同一位置照相, 观察细胞的迁移。

1.13 免疫荧光

分别取 1×10^5 对照细胞与 LATS1/2 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞, 接种于放置玻片的 24 孔板, 细胞过夜培养, PBS 洗 1 次, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗 3 次。用含 5% BSA /PBST 的封闭液室温封闭 1 h, 弃封闭液加入 YAP/TAZ 一抗 (1:200) 室温 1 h, PBS 洗 3 次。加入 150 μL 二抗, 室温避光 1 h, DAPI 复染 5 min, PBS 洗 3 遍, 封片, 观察。

1.14 PI 染色检测细胞周期

将对照细胞与 LATS1/2 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞过夜培养, 计数。分别收集 1×10^6 个细胞于 1.5 mL 的离心管中, 800 r/min 离心 6 min, 弃上清。再用预冷的 1 mL 1×PBS 洗涤 1 次。用 300 μL 预冷的 1×PBS 重悬细胞, 然后缓慢加入到含有 700 μL 预冷的无水乙醇的 1.5 mL 的离心管中, 固定过夜。第 2 d, 将含有细胞的 1 mL 固定液转移到 15 mL 的离心管中, 补加 2 mL 预冷的 1×PBST, 1 000 r/min 离心 8 min 弃上清, 用仪器检测细胞周期。

1.15 裸鼠荷瘤模型

雌性裸鼠 10 只, SPF 级饲养 (6~8 周龄)。将裸鼠分成 2 组, 每组各 5 只。无菌的条件下分别给

第 1 组, 每只裸鼠的背部皮下注射 5×10^5 个对照 ES-2 细胞。第 2 组, 每只裸鼠背部注射 5×10^5 LATS1/2 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞。1 周后, 使用游标卡尺测量裸鼠肿瘤大小。待肿瘤直径 ≥ 15 mm, 处死裸鼠。取出裸鼠皮下肿瘤称重。

1.16 Transwell 细胞迁移实验

将对照细胞与 LATS1/2 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞过夜培养, 计数。Transwell 培养板上室加入 100 μL 单细胞悬液 (2.5×10^3), 并加入无血清培养基 200 μL 。Transwell 培养板下室加入 500 μL 无血清培养液, 细胞培养 12 h 后用湿棉签轻轻擦去表面细胞。预冷的冰甲醇固定 30 min, 苏木精染色 30 s, 细胞在高倍镜下随机取 10 个视野计数, 取平均值。

1.17 统计学方法

数据用均数 \pm 标准差表示, 两组间比较采用 *t* 检验分析和 One-way ANOVA 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 Lats1/2 基因敲除的人卵巢癌 ES-2 细胞的构建和鉴定

为研究 LATS1/2 在人卵巢癌中的作用, 构建了 LATS1/2 基因敲除的慢病毒载体, 通过包装、感染人卵巢癌 ES-2 和 HO8910 细胞, 获得稳定敲除 LATS1/2 的细胞池。Fig. 1 A 所示, 分别针对人 *Last1* 和 *Lats2* 基因各设计了 2 个不同的敲除序列, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, Lenti-Lats1/2 敲除载体构建成功。如 Fig. 1B 和 1E 所示, 通过免疫印迹, 检测 *Lats1/2* 基因敲除人卵巢癌 ES-2 和 HO8910 细胞中, LATS1 和 LATS2 蛋白表达显著降低, 磷酸化 YAP 表达量也降低。LATS1/2 主要通过磷酸化 YAP, 调节 YAP 的细胞质和细胞核定位。免疫荧光检测发现, LATS1/2 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞中, YAP 蛋白在细胞核表达增加 (Fig. 1C)。定量 PCR 检测结果显示, LATS1/2 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞中, YAP/TAZ 下游基因 *Ctgf* 和 *Amotl2* 表达量明显增加。这些结果表明, 我们成功获得了 LATS1/2 敲除的人卵巢癌 ES-2 和 HO8910 细胞池。

2.2 LATS1/2 敲除抑制卵巢癌 ES-2 细胞增殖, 克隆形成和迁移

为进一步研究 LATS1/2 在人卵巢癌 ES-2 和 HO8910 细胞中的作用, 通过连续 3 d 细胞计数发现, LATS1/2 敲除细胞在有血清和无血清环境下增殖明显比对照细胞慢 (Fig. 2A-2C)。这表明, LATS1/

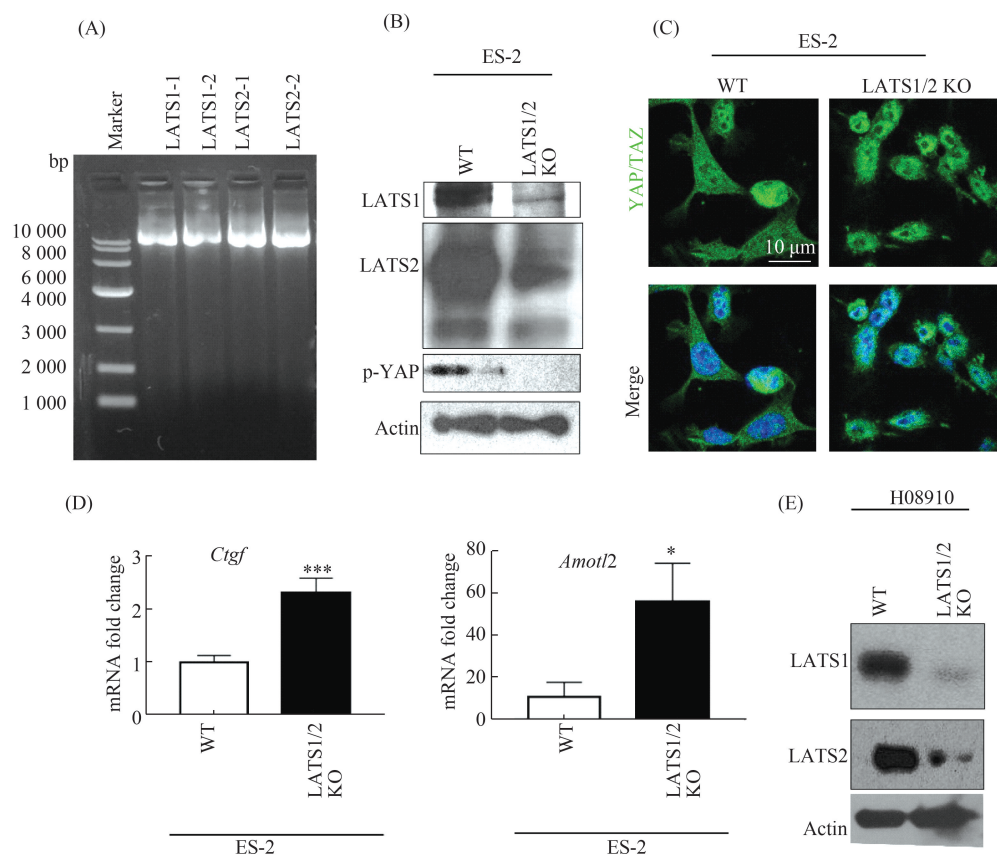


Fig.1 Identification of LATS1/2 knock out (LATS1/2 KO) cells (A) Plasmid of pLentiv2-*lats1/2* vector. Different plasmids were extracted as manufacturer instruction and separated by 1% agarose gel. M:10 000 bp DNA marker; 1; Lenti v2-*Lats1* guide sequence-1; 2; Lenti v2-*Lats1* guide sequence-2; 3; Lenti v2-*Lats2* guide sequence-1; 4; Lenti v2-*Lats2* guide sequence-2. (B) LATS1/2 deleted cells were subjected to immunoblot analysis with antibodies to LATS1, LATS2, p-YAP and Actin. ES-2 cells were transfected with lentivirus and selected by puromycin, and protein was isolated. (C) YAP/TAZ location was detected by immunofluorescence in control cell and *Lats1/2* KO cells. Control cells and LATS1/2 deletion cells were subjected to immunostaining with the YAP/TAZ antibody (green) along with DAPI for DNA (blue). Scar bar: 10 μ m. (D) YAP/TAZ target genes *Ctgf* and *Amotl2* expression was analyzed by Q-PCR. ES-2 cells were transfected with lentivirus and selected by puromycin, and total mRNA was isolated. Quantitative RT-PCR for *Ctgf* and *Amotl2* mRNA expression levels in cultured cells. The error bars represent SD. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs WT. Student's *t*-test was applied. $n = 3$. (E) LATS1/2 deleted cells were subjected to immunoblot analysis with antibodies to LATS1, LATS2 and Actin. H08910 WT and LATS1/2 deletion cells were performed as indicated

2 敲除抑制人卵巢癌 ES-2 和 H08910 细胞的增殖。肿瘤细胞在软琼脂里形成克隆能力可体现肿瘤细胞恶性程度高低。通过软琼脂克隆形成实验发现, *LATS1/2* 敲除细胞克隆形成能力降低 (Fig.2D)。这表明, *LATS1/2* 敲除抑制肿瘤细胞恶性转化。本文通过细胞划痕实验和 Transwell 小室实验, 检测 *LATS1/2* 敲除可抑制人卵巢癌细胞的迁移 (Fig.2E-2F)。综上所述, *LATS1/2* 敲除可抑制人卵巢癌 ES-2 和 H08910 细胞的增殖、克隆形成和迁移能力。

2.3 LATS1/2 敲除促进卵巢癌 ES-2 细胞凋亡和影响细胞周期

上述结果验证了 *LATS1/2* 敲除抑制卵巢癌细胞增殖和克隆形成。本文还通过流式细胞仪检测细

胞周期和凋亡的变化。结果表明, *LATS1/2* 敲除使 G_1 和 G_2 期细胞减少, S 期细胞增加 (Fig.3 A, 3B), *LATS1/2* 敲除还促进 ES-2 细胞凋亡 (Fig.3C, 3D)。p53 和 p16/pRB 轴是影响细胞衰老及细胞周期调控的重要信号通路^[15]。Fig.3 A, 3B 结果显示, *LATS1/2* 缺失影响了卵巢癌 ES-2 细胞周期。为进一步在分子水平检测 *LATS1/2* 缺失是否可影响细胞周期相关基因表达, 通过定量 PCR 检测发现, *LATS1/2* 敲除影响了 P53 下游基因 *NOXA* 和 *P16* 表达。MAPK 信号通路参与细胞增殖分化调控过程, 丝裂酶原活化蛋白激酶 ERK1/2 作为细胞增殖调节的关键蛋白质, 广泛存在于各种组织中。通过蛋白质水平检测发现, *LATS1/2* 敲除的卵巢癌细胞中, p-ERK

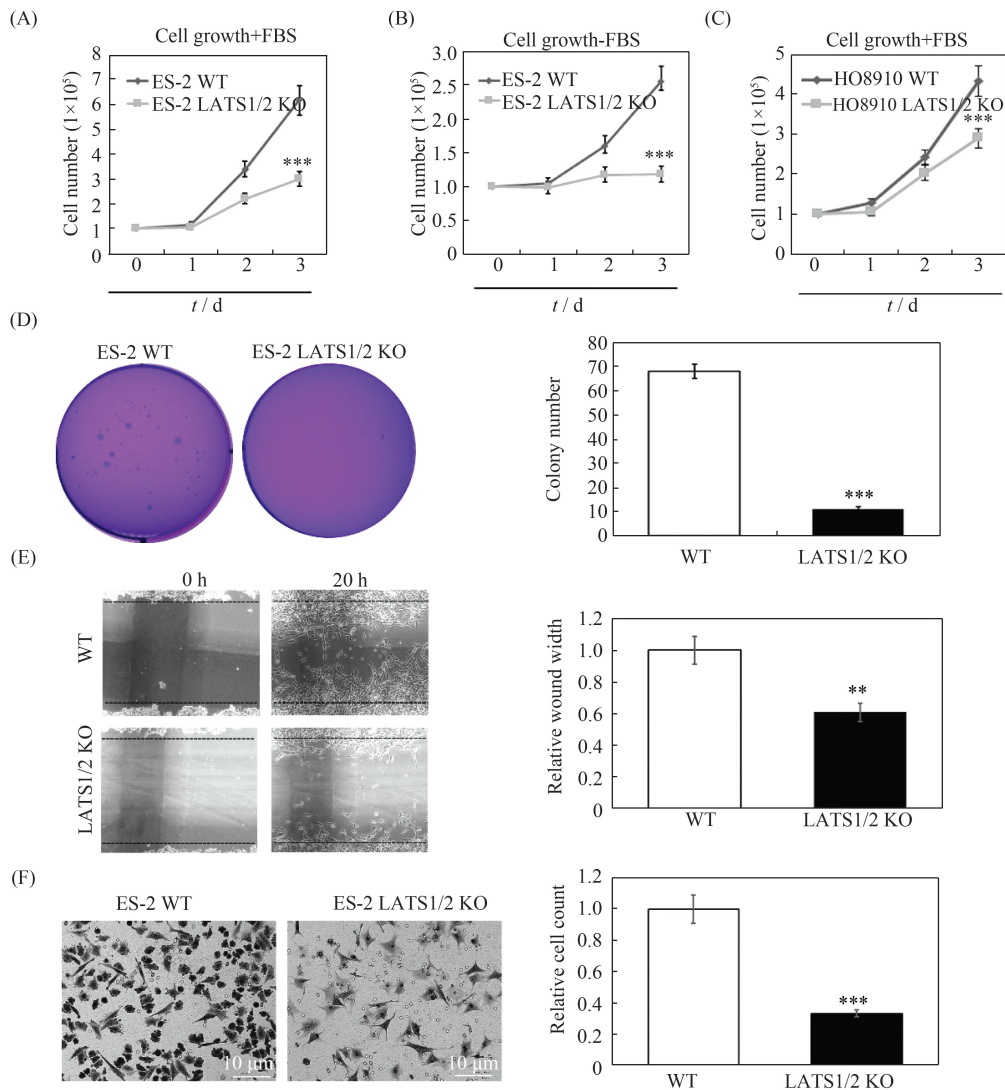


Fig.2 LATS1/2 deletion inhibited cell proliferation, colony formation and cell migration (A-C) LATS1/2 deletion inhibited cell proliferation with or without serum (+FBS/-FBS). Cells (1×10^5) were plated in 6-well culture dishes and cell number was determined with trypan blue staining. (D) LATS1/2 deletion inhibited colony number. ES-2 WT and LATS1/2 deletion cells (2.5×10^3) were plated in 6-well culture dishes for 14 days. The colonies were stained with crystal violet for quantification. (E) LATS1/2 deletion inhibited cell migration. Cells (8×10^5) were plated in 6-well culture dishes and scratched with 200 μ L tips. Pictures were obtained at 0 hour and 20 hours. Three replicates were included in this experiment. (F) Transwell experiment for the migration capability of ES-2 cells and LATS1/2 deletion cells. Cells were added to transwells and allowed to migrate for 12 hours. Cells at the upper surface of the membrane were removed with cotton swabs, and the cells on the bottom surface were stained with hematoxylin and eosin. Numbers of cells on the bottom surface were counted and were compared with the control group. The error bars represent SD *** $P < 0.001$. ** $P < 0.01$. $n = 3$. Student's t -test was applied

明显减少,并且与增殖相关蛋白质 p-Histon H3 表达也显著降低。这些结果表明,人卵巢癌 ES-2 细胞中,敲除 *LATS1/2* 可通过影响多个信号通路促进细胞凋亡,与影响细胞周期,从而抑制细胞增殖。

2.4 *LATS1/2* 敲除通过激活 YAP 转录活性调节 *Col1a1* 基因的表达从而影响肿瘤细胞增殖

LATS1/2 敲除直接影响 YAP 转录活性。为进一步验证 *LATS1/2* 敲除是通过调节 YAP 转录活性

影响细胞增殖,通过逆转录病毒在卵巢癌 ES-2 细胞中过表达持续激活型 YAP (YAP-5SA),免疫印迹结果显示,与对照组相比较,过表达组 YAP 蛋白表达量明显增加 (Fig.4 A)。细胞增殖检测发现,过表达持续激活型 YAP (YAP-5SA) 明显抑制卵巢癌细胞增殖 (Fig.4B)。这一结果表明,*LATS1/2* 敲除是通过激活 YAP 转录活性从而影响细胞增殖。

为了进一步寻找 *LATS1/2* 敲除抑制细胞增殖

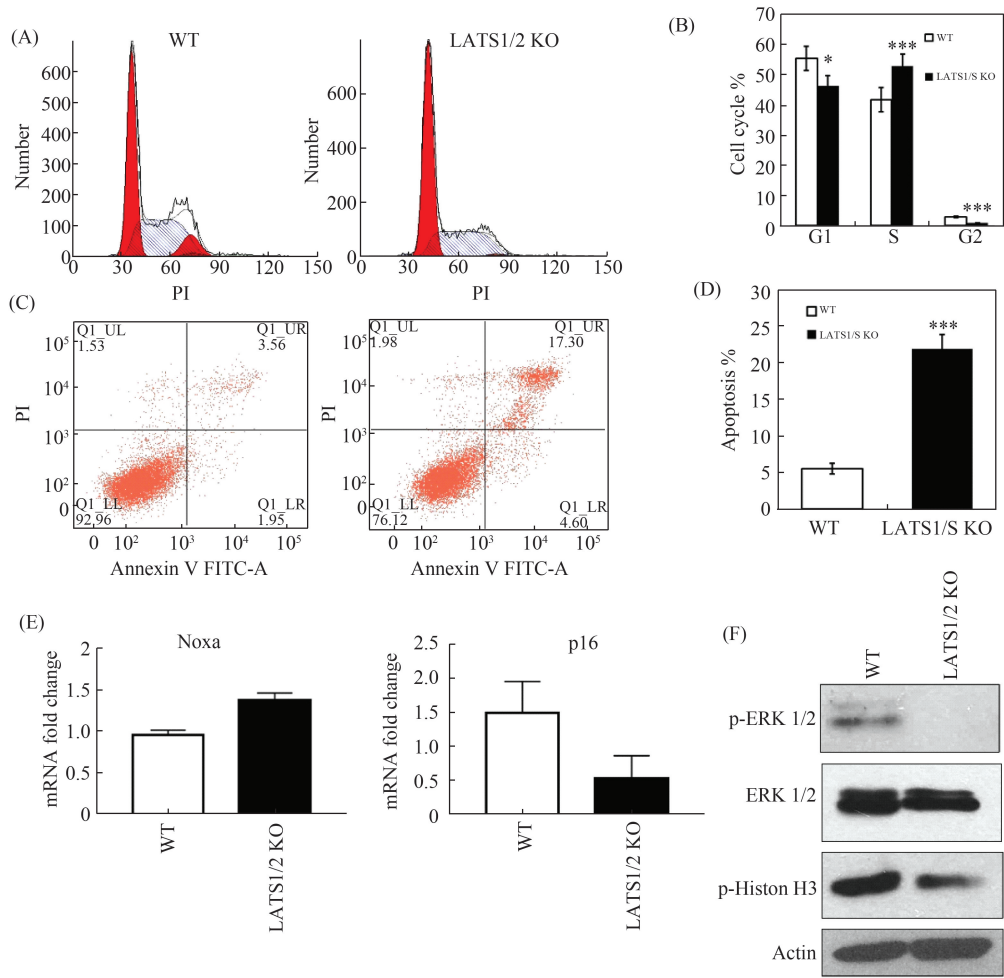


Fig.3 LATS1/2 deletion promoted ES-2 cells apoptosis and affected cell cycle (A) Cell cycle phase determined by flow cytometry. Cells (1×10^6) were cultured overnight, and subjected to PI staining and FACS analysis at the indicated time points. (B) The percentages of cells in the G₁, S, and G₂/M phase were indicated. (C) Cell apoptosis were detected by PE-Annexin V. Totally 1×10^5 cells were stained with PE/Annexin V and analyzed by FACS within 1 hour. (D) Quantification of apoptosis cells; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. $n = 3$. Student's t -test was applied. (E) The mRNA levels of *Noxa* and *p16* were determined by Q-PCR. (F) *LATS1/2* double knockout ES-2 cells were subjected to immunoblot analysis with antibodies. Western blot was performed as indicated

的下游分子,经查阅文献发现,在小鼠的结肠癌 MC38 细胞中敲除 *LATS1/2* 可以影响许多基因表达^[8]。选取该文献中表达变化大的基因,通过定量 PCR 进行验证。结果(Fig.4C,4D)表明,*Adams16*、*Ldhb*、*Pnma5*、*Jup*、*Rassf4* 和 *Zfp571* 基因在 *LATS1/2* 敲除的 ES-2 细胞中低表达,而 *Col1a1* 基因在 *LATS1/2* 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞中高表达。这一结果表明,在卵巢癌 ES-2 细胞中,*Col1a1* 基因很可能是 *LATS1/2* 和 YAP 的下游靶基因。为了进一步验证 *LATS1/2* 敲除是通过增加 COL1A1 蛋白的表达,从而抑制卵巢癌 ES-2 细胞增殖和克隆形成,在 *LATS1/2* 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞中敲除 *COL1A1* 的表达。如 Fig.4E 所示,COL1A1 表达量降低,可恢复

卵巢癌 ES-2 *LATS1/2* 敲除细胞的克隆形成能力。综上所述,在人卵巢癌 ES-2 细胞中,敲除 *LATS1/2* 蛋白可激活 YAP 蛋白的转录活性,促进 *Col1a1* 基因高表达,从而抑制卵巢癌细胞增殖和克隆形成。

2.5 裸鼠皮下成瘤实验体内验证 LATS1/2 敲除抑制卵巢癌细胞增殖

上述结果显示,*LATS1/2* 敲除抑制卵巢癌细胞的增殖、克隆形成,促进卵巢癌细胞凋亡。为进一步在体内验证 *LATS1/2* 缺失对卵巢癌细胞增殖的影响。给裸鼠分别注射对照细胞和 *LATS1/2* 基因敲除细胞,定期测量肿瘤大小。如 Fig.5 A,5B 所示,*LATS1/2* 敲除明显抑制肿瘤细胞增殖。通过定量 PCR 检测发现,YAP 下游基因 *Cyr61* 和 *Amotl2* 在

LATS1/2 敲除的肿瘤组织中高表达。并且发现,在 *LATS1/2* 基因敲除的肿瘤组织中, *Col1a1* 基因也高表达,而 *Dik1* 和 *Pnm5a* 低表达 (Fig.5C)。这些结果

进一步证明,在体内 *LATS1/2* 基因敲除抑制肿瘤细胞增殖,该抑制作用是通过增加 YAP 转录活性,从而影响 *Col1a1* 等基因的表达实现的。

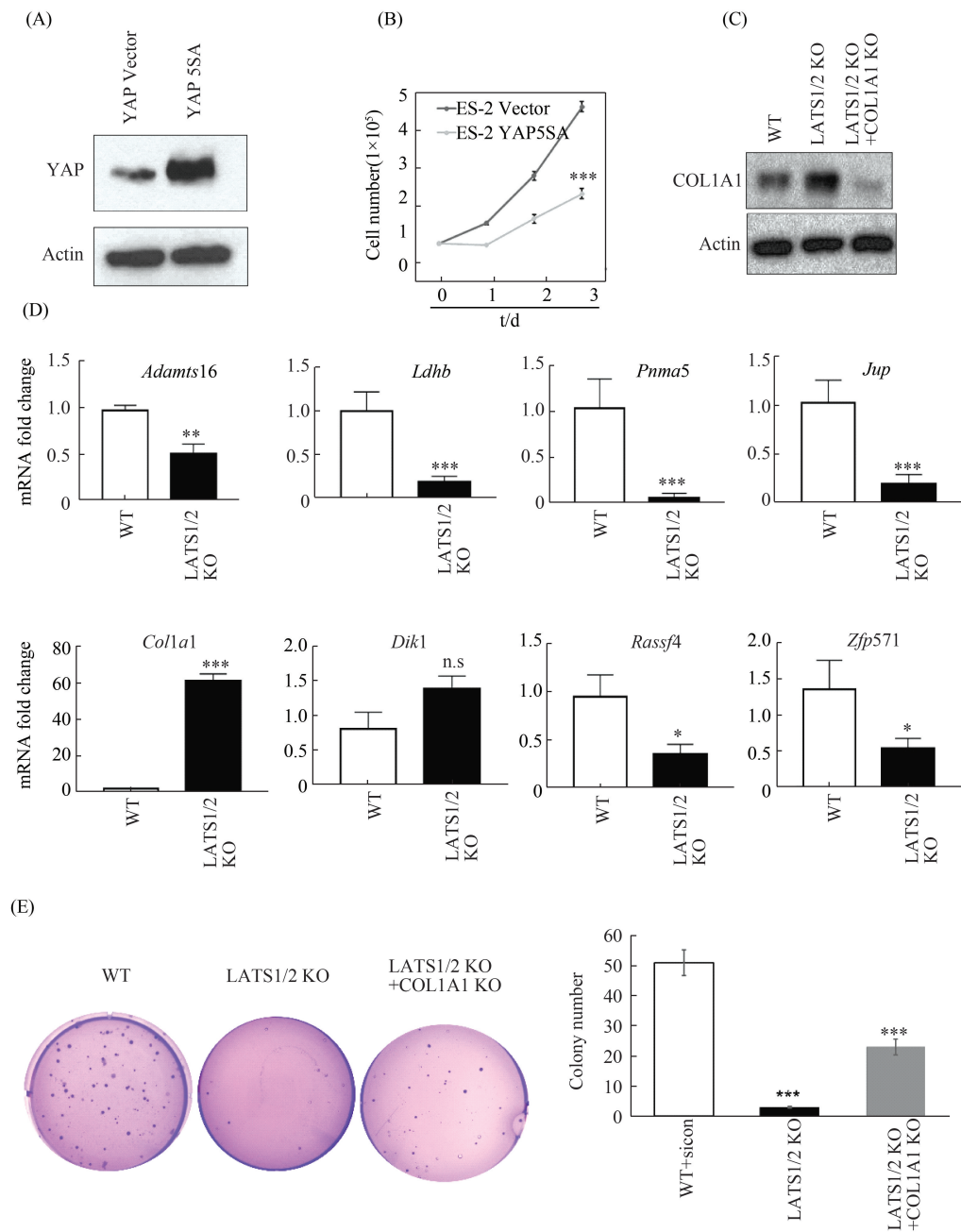


Fig.4 YAP 5SA overexpression inhibited cell growth (A) YAP protein expression was detected by Western blot. YAP (5SA) are active mutants of YAP/TAZ with all five LATS1/2 phosphorylation sites mutated to alanine, thereby unresponsive to inhibition by the LATS1/2 kinase. ES-2 cells stably expressing YAP (5SA) or control vector were subjected to immunoblot analysis with antibodies to the indicated proteins. (B) YAP 5SA overexpression reduced cell growth. Cells (1×10^5) were plated in 6-well culture dishes and cell number was determined with trypan blue staining. (C) COL1A1 protein expression was detected by Western blot. The signal of COL1A1 was increased in LATS1/2 double knockout (KO) cells but decreased in LATS1/2 KO and COL1A1 knockout cells comparing with control cells. (D) LATS1/2 deletion increased *Col1a1* gene expression. Total mRNA was isolated. Quantitative RT-PCR for mRNA expression levels of *Adamts16*, *Ldhb*, *Pnma5*, *Jup*, *Col1a1*, *Dik1*, *Rassf4*, *Zfp5712* and Actin in cultured cells. The error bars represent SD. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs WT. $n = 3$. Student's *t*-test was applied. (E) Deletion of *col1a1* restored anchorage-independent growth of LATS1/2 deletion cells. Cells (5×10^3) were plated in 6-well culture dishes for 14 days, and the colonies were stained with crystal violet for quantification. Dates are mean \pm SD from three independent experiments. *** $P < 0.001$ vs WT. $n = 3$. One-way ANOVA test

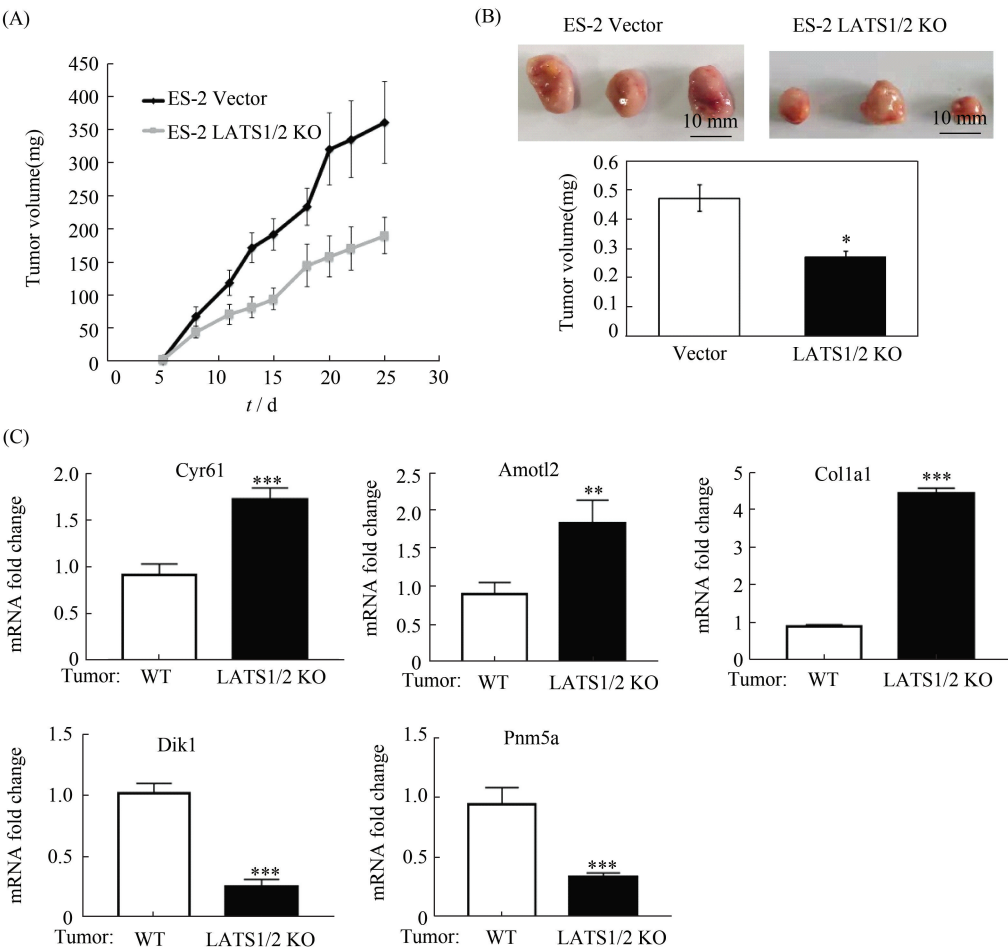


Fig.5 LATS1/2 deletion inhibited tumor growth *in vivo* (A,B) LATS1/2 deletion in ES-2 cells inhibited tumor growth *in vivo*. ES-2 WT and LATS1/2 deletion cells (0.5×10^6 cells for each injection) were implanted subcutaneously into nude mice. Tumor volume was monitored and tumor weight was determined at the end of experiment. (C) Increased expression of YAP/TAZ target genes *Cyr61*, *Amotl2* and *Colla1*; and decreased expression of *Dik1*, *Pnm5a* in the LATS1/2 deleted tumors. The error bars represent SD. *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$ vs WT. $n=6$. Student's *t*-test was applied

3 讨论

癌症是目前人类尚未攻克的重大疾病,癌症的发生机制尚未被完全阐明,其难点之一在于不同组织细胞类型中癌症的发生机制可能有所区别。卵巢癌症是妇科恶性疾病,其致死率在所有妇科癌症中居于第一位。但是,目前对卵巢癌症的发生机制所知甚少,治疗手段也很不完备,特别是缺少早期卵巢癌细胞的检测分子。人卵巢癌症多发于女性更年期(45~50岁),而且90%以上起源于卵巢表面的上皮细胞。但是,对于卵巢表面上皮增殖与分化的调控机制仍不清楚^[16]。近年来的研究表明,正常的卵巢表面上皮中可能存在可以自我更新的干细胞^[17]。同时,在卵巢癌细胞系中,可能也存在具有增殖、分化潜能并对化疗药物具有耐受力的卵巢癌干细胞^[18]。虽然目前已有多种卵巢癌症临床治疗的技

术手段,但治愈率较低,特别是对于癌症恶性转移和复发缺乏有效的治疗措施。

Hippo-YAP 信号通路是近年来发现的一个与器官大小维持、干细胞全能性维持和癌症发生密切相关的信号通路。最早是在果蝇中通过筛选抑制细胞无限制增殖的关键基因而发现,并进而在包括人类在内的高等动物中证实,但其在进化过程中的功能高度保守^[19]。该信号通路关键的上游激酶有 MST1/2、LATS1/2 和 MAPK4Ks。YAP 和 TAZ 是 Hippo 信号通路关键效应分子并具有转录活性。大多数研究表明,LATS1/2 是抑癌基因,YAP/TAZ 则是作为原癌蛋白发挥作用。YAP 基因的扩增以及过表达与肿瘤的发生密切相关^[20]。在小鼠肝中诱导 YAP 过表达,肝的体积会增大 4 倍以上,最终导致肝癌的发生^[21]。在多种人类癌症组织中,都能检测到 YAP 在发生癌变的细胞中表达量显著增高^[22],

如肝癌、前列腺癌、结肠癌和卵巢癌。Huang 等^[23]研究表明,YAP 可以通过下调 GPX2 和增加 ROS 抑制肺癌细胞增殖。这表明,YAP 也可以作为抑癌基因发挥作用。此外,我们在 9 种不同的小鼠肿瘤细胞中敲除 *LATS1/2* 发现,在多数肿瘤细胞中,*LATS1/2* 敲除促进肿瘤细胞增殖,然而在小鼠结肠癌 MC38 细胞中,敲除 *LATS1/2* 却抑制肿瘤细胞的增殖。这些研究结果表明,*LATS1/2* 作为癌基因还是抑癌基因发挥作用主要取决于不同的细胞系。Xia 等^[24, 25] 在人卵巢癌 A2780 细胞中过表达 YAP5SA 发现,YAP 蛋白激活可以通过促进卵巢癌细胞的上皮-间质转化,从而影响细胞增殖和迁移。我们的研究表明,在卵巢癌 ES-2 细胞中,敲除 *LATS1/2* 可以抑制肿瘤细胞的增殖和迁移,并且促进细胞凋亡。如 Fig.4E 所示,在 *LATS1/2* 敲除的卵巢癌 ES-2 细胞中敲除 COL1A1 蛋白,并不能完全补救 *LATS1/2* 敲除抑制肿瘤细胞克隆的形成能力。这进一步说明,COL1A1 很可能只是 *LATS1/2* 下游底物之一。Hippo-YAP 信号通路在卵巢癌细胞中可能与多个信号通路相互作用,从而影响细胞存活,如 MAPK 信号通路。因此,敲除 *LATS1/2* 可以通过 p53、Rb/p16 和 MAPK 等信号通路影响卵巢癌细胞周期、细胞增殖及细胞凋亡。此外,Hippo-YAP 信号通路在不同类型的卵巢癌中作用有可能不同。本研究表明,在卵巢癌治疗中,如果联合使用 YAP/TEAD 抑制剂,应先明确 YAP 蛋白的作用。另外,在某些肿瘤中,*LATS1/2* 发挥癌基因作用时,采用 *LATS1/2* 抑制剂可能对于抑制该肿瘤的发展具有一定的治疗作用。

参考文献 (References)

[1] Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, **13**(4): 246-257

[2] Hong W, Guan KL. The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, **23**(7): 785-793

[3] Dan I, Watanabe NM, Kusumi A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades[J]. *Trends Cell Biol*, 2001, **11**(5): 220-230

[4] Hergovich A. Regulation and functions of mammalian LATS/NDR kinases: looking beyond canonical Hippo signalling[J]. *Cell Biosci*, 2013, **3**(1): 32

[5] Hergovich A, Stegert MR, Schmitz D, *et al.* NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans[J]. *Nat*

Rev Mol Cell Biol, 2006, **7**(4): 253-264

[6] Avruch J, Zhou D, Fitamant J, *et al.* Protein kinases of the Hippo pathway: regulation and substrates[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, **23**(7): 770-784

[7] Hergovich A. MOB control: reviewing a conserved family of kinase regulators[J]. *Cell Signal*, 2011, **23**(9): 1433-1440

[8] Najafi M, Kordi-Tamandani DM, Arish M. Evaluation of LATS1 and LATS2 promoter methylation with the risk of Pterygium formation[J]. *J Ophthalmol*, 2016, **2016**: 5431021

[9] Xia H, Qi H, Li Y, *et al.* LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis[J]. *Oncogene* 2002, **21**(8): 1233-1241

[10] Li Y, Pei J, Xia H, *et al.* Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition [J]. *Oncogene*, 2003, **22**(28): 4398-4405

[11] Suzuki H, Yabuta N, Okada N, *et al.* Lats2 phosphorylates p21/CDKN1A after UV irradiation and regulates apoptosis[J]. *J Cell Sci*, 2013, **126**(Pt 19): 4358-4368

[12] Okada N, Yabuta N, Suzuki H, *et al.* A novel Chk1/2-Lats2-14-3-3 signaling pathway regulates P-body formation in response to UV damage[J]. *J Cell Sci*, 2011, **124**(Pt 1): 57-67

[13] Zhou GX, Li XY, Zhang Q, *et al.* Effects of the hippo signaling pathway in human gastric cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, **14**(9): 5199-5205

[14] Xu B, Sun D, Wang Z, *et al.* Expression of LATS family proteins in ovarian tumors and its significance[J]. *Hum Pathol*, 2015, **46**(6): 858-867

[15] Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, **15**(7): 397-408

[16] Vanderhyden BC, Shaw TJ, Ethier JF. Animal models of ovarian cancer[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, **1**: 67

[17] Szotek PP, Chang HL, Brennand K, *et al.* Normal ovarian surface epithelial label-retaining cells exhibit stem/progenitor cell characteristics[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(34): 12469-12473

[18] Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, *et al.* Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(30): 11154-11159

[19] Zhang J, Ji JY, 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): 1444-1450

[20] Huang J, Wu S, Barrera J, *et al.* The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP [J]. *Cell*, 2005, **122**(3): 421-434

[21] Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, *et al.* Expression of Yes-associated protein in common solid tumors [J]. *Hum Pathol*, 2008, **39**(11): 1582-1589

[22] Hall CA, Wang R, Miao J, *et al.* Hippo pathway effector Yap is an ovarian cancer oncogene [J]. *Cancer Res*, 2010, **70**(21): 8517-8525

[23] Huang H, Zhang W, Pan Y, *et al.* YAP suppresses lung squamous cell carcinoma progression via deregulation of the DNP63-GPX2 axis and ROS accumulation [J]. *Cancer Res*, 2017, **77**(21): 5769-5781

[24] Xia Y, Zhang YL, Yu C, *et al.* YAP/TEAD co-activator regulated pluripotency and chemoresistance in ovarian cancer initiated cells[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(11): e109575

[25] Xia Y, Chang T, Wang Y, *et al.* YAP promotes ovarian cancer cell tumorigenesis and is indicative of a poor prognosis for ovarian cancer patients[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(3): e91770