

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.12.005
文章编号: 1005-8982(2020)12-0027-06

宫颈癌组织中 Hippo-Yes 相关蛋白 1 的表达及临床意义

王文慧¹, 邵志叶², 陈豪¹

(1. 杭州市妇产科医院 病理科, 浙江 杭州 310000; 2. 慈溪市妇幼保健院 病理科, 浙江 慈溪 315300)

摘要: 目的 探讨宫颈癌组织中 Hippo-Yes 相关蛋白 1 (YAP1) 表达及临床意义。**方法** 选取 2013 年 1 月—2019 年 6 月杭州市妇产科医院和慈溪市妇幼保健院收治的 100 例宫颈癌患者的宫颈组织作为宫颈癌组, 100 例宫颈上皮内瘤变 (CIN) 患者的宫颈组织作为 CIN 组, 100 例子宫肌瘤患者的正常宫颈组织作为正常组。采用免疫组织化学染色测定组织中 YAP1 蛋白表达。**结果** CIN 组 YAP1 蛋白阳性表达率高于正常组 ($P < 0.05$), 宫颈癌组 YAP1 蛋白阳性表达率高于 CIN 组 ($P < 0.05$)。临床分期 II 期宫颈癌组织中 YAP1 蛋白阳性表达率高于 I 期 ($P < 0.05$), 有淋巴结转移宫颈癌组织中 YAP1 蛋白阳性表达率高于无淋巴结转移 ($P < 0.05$); 不同年龄、组织学类型、组织学分级、宫颈浸润深度、神经管是否浸润及宫旁是否浸润宫颈癌组织中 YAP1 蛋白阳性表达率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。YAP1 阳性表达组无病生存期 (DFS) 和总生存期 (OS) 低于 YAP1 阴性表达组 ($P < 0.05$)。Cox 比例风险模型分析显示, YAP1 表达 [$\hat{RR}=1.202$ (95% CI: 1.114, 1.415), $P=0.000$]、临床分期 [$\hat{RR}=1.412$ (95% CI: 1.325, 1.503), $P=0.000$] 及淋巴结转移 [$\hat{RR}=1.391$ (95% CI: 1.258, 1.471), $P=0.000$] 为宫颈癌 OS 的独立影响因素。**结论** 宫颈癌组织 YAP1 呈高表达, YAP1 表达与宫颈癌临床分期和淋巴结转移关系密切, 为宫颈癌预后的独立影响因素, 高表达 YAP1 的宫颈癌患者预后差。

关键词: 宫颈肿瘤; 淋巴转移; 预后

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Expression and clinical significance of Hippo-Yes-associated protein1 in cervical cancer

Wen-hui Wang¹, Zhi-ye Shao², Hao Chen¹

(1. Department of Pathology, Hangzhou Obstetrics and Gynecology Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310000, China; 2. Department of Pathology, Cixi Maternal and Child Health Hospital, Cixi, Zhejiang 315300, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of Hippo-Yes-associated protein1 (YAP1) in cervical cancer tissues. **Methods** The cervical cancer tissues of 100 cervical cancer patients were selected as the cervical cancer group, the cervical tissues of 100 patients with cervical CIN were selected as the CIN group and the normal cervical tissues of 100 patients with uterine fibroids were selected as the normal group in Hangzhou Obstetrics and Gynecology Hospital and Cixi Maternal and Child Health Hospital from January 2013 to June 2019. The expression of YAP1 protein was determined by immunohistochemical staining. **Results** The positive expression rate of YAP1 protein in CIN group was higher than that in normal group ($P < 0.05$). The positive expression rate of YAP1 protein in cervical cancer group was higher than that in CIN group ($P < 0.05$). The positive expression rate of

收稿日期: 2020-01-29

YAP1 protein in stage II cervical cancer tissues was higher than that in stage I ($P < 0.05$). The positive expression rate of YAP1 protein in cervical cancer tissues with lymph node metastasis was higher than that without lymph node metastasis ($P < 0.05$). The comparison of YAP1 protein positive expression rates in different ages, histological types, histological grades, cervical invasion depth, neural vascular invasion and cervical invasion of cervical tissues were not statistically significant ($P > 0.05$). The disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) of the YAP1 positive expression group were lower than those of the YAP1 negative expression group ($P < 0.05$). Analysis of the COX proportional hazard model showed: YAP1 expression [RR = 1.202 (95% CI: 1.114, 1.415)], TNM stage [RR = 1.412 (95% CI: 1.325, 1.503)] and lymph node metastasis [RR = 1.391 (95% CI: 1.258, 1.471)] were independent influencing factors for the overall survival of cervical cancer. **Conclusions** YAP1 is highly expressed in cervical cancer tissues. YAP1 expression is closely related to the clinical stage and lymph node metastasis of cervical cancer. It is an independent influencing factor for cervical cancer prognosis. Patients with high expression of YAP1 cervical cancer have poor prognosis.

Keywords: uterine cervical neoplasms; lymphatic metastasis; prognosis

人乳头瘤病毒感染为宫颈癌发病的根本原因，而宫颈癌发病是一个复杂的过程，其发病机制尚不十分清楚。随着研究的不断深入，人们逐渐认识到宫颈癌的发病是一个多因素、多步骤共同导致的过程，从正常宫颈发展到宫颈上皮内瘤变（cervical intraepithelial neoplasia, CIN），再发展为宫颈癌。在这个过程中，原癌基因激活和抑癌基因突变或缺失发挥重要作用。关于原癌基因和抑癌基因变化的研究是宫颈癌发病机制研究的热点。Hippo 信号通路为恶性肿瘤的抑制通路，在恶性肿瘤发病中发挥重要作用^[1]，Hippo-Yes 相关蛋白 1（Hippo-Yes-associated protein1, YAP1）位于该通路下游，为 Hippo 通路转录共激活因子^[2]，参与生长、发育及 DNA 修复等过程，在结直肠癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中表达升高，发挥抑癌基因的角色^[3]。本文对宫颈癌组织中 YAP1 表达进行研究，探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 1 月—2019 年 6 月杭州市妇产科医院和慈溪市妇幼保健院收治的 100 例宫颈癌患者的宫颈癌组织作为宫颈癌组，100 例宫颈 CIN 患者的宫颈组织作为 CIN 组，100 例子宫颈癌患者的正常宫颈组织作为正常组。宫颈癌组年龄（ 48.75 ± 6.16 ）岁；临床分期：I 期 58 例，II 期 42 例；鳞癌 69 例、腺癌 31 例；低分化 19 例，中分化 42 例，高分化 39 例；宫旁浸润深度： $\leq 1/3$ 者 31 例， $>1/3$ 者 69 例；神经管浸润 67 例；宫旁浸润 65 例；淋巴结转移 53 例。CIN 组年龄（ 47.59 ± 6.54 ）岁，正常组年龄（ 47.82 ± 6.73 ）岁。纳入标准：①正常组选自子宫肌瘤行全子宫切除术患

者，病理证实宫颈组织正常；② CIN 组选自宫颈锥切患者，病理证实为宫颈 CIN；③宫颈癌组为行广泛性子宫切除术 + 盆腔淋巴结切除术患者，病理证实为宫颈癌；④ 3 组均临床资料完整、依从性好、接受正规治疗和随访，以及足够样本量进行免疫组织化学染色。排除标准：①其他恶性肿瘤；②随访过程中失访；③宫颈癌复发；④既往接受放化疗等其他治疗。本研究通过医院伦理委员会批准，患者及其家属知情同意。3 组年龄比较，差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器 鼠抗人 YAP1 单克隆抗体购自美国 Epitomics 公司，二抗购自上海罗氏有限公司，DAB 显色剂购自上海罗氏有限公司。

1.2.2 免疫组织化学染色 将 3 组宫颈组织石蜡切片经烤箱烘烤 1 h，二甲苯脱蜡，梯度酒精脱水，柠檬酸缓冲液高温修复抗原，过氧化氢孵育 10 min，加入一抗。兔抗人 YAP1 单克隆抗体（1 : 400）过夜孵育，加入二抗（1 : 2 000）孵育 1 h，DAB 显色，HE 染色 1 min，盐酸乙醇分化 30 s，氨水返蓝 1 min，常规脱水、透明、封固。阴性对照以 PBS 代替一抗。结果判断：YAP1 阳性产物主要位于细胞浆和细胞核。①染色程度：无染色计 0 分；淡黄色计 1 分；棕黄色计 2 分；棕褐色计 3 分。②阳性细胞率： $\leq 5\%$ 计 0 分； $>5\% \sim 25\%$ 计 1 分； $>25\% \sim 50\%$ 计 2 分； $>50\% \sim 75\%$ 计 3 分； $>75\%$ 计 6 分。染色程度和阳性细胞染色率相乘得到总分：总分 0 ~ 2 分为阴性；总分 ≥ 3 分为阳性^[4]。

1.3 随访

定期进行门诊或电话随访了解患者预后，随访开

始时间为宫颈癌手术日期, 随访截止时间为 2019 年 12 月 31 日或死亡时间。无病生存期 (disease-free survival, DFS) 为手术日期至出现远处转移、复发、死亡或随访截止时间; 总生存期 (total survival, OS) 为手术日期至死亡或随访截止时间。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计数资料以率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验; Kaplan-Meie 法绘制生存曲线, 比较用 Log-rank χ^2 检验; 预后影响因素用多

因素 Cox 比例风险模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组宫颈组织中 YAP1 蛋白阳性表达率比较

正常组、CIN 组、宫颈癌组宫颈组织中 YAP1 蛋白阳性表达率分别为 13%、42% 和 78%, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2=85.930$, $P=0.000$), CIN 组、宫颈癌组高于正常组 ($P < 0.05$), 且宫颈癌组高于 CIN 组 ($P < 0.05$)。见图 1。

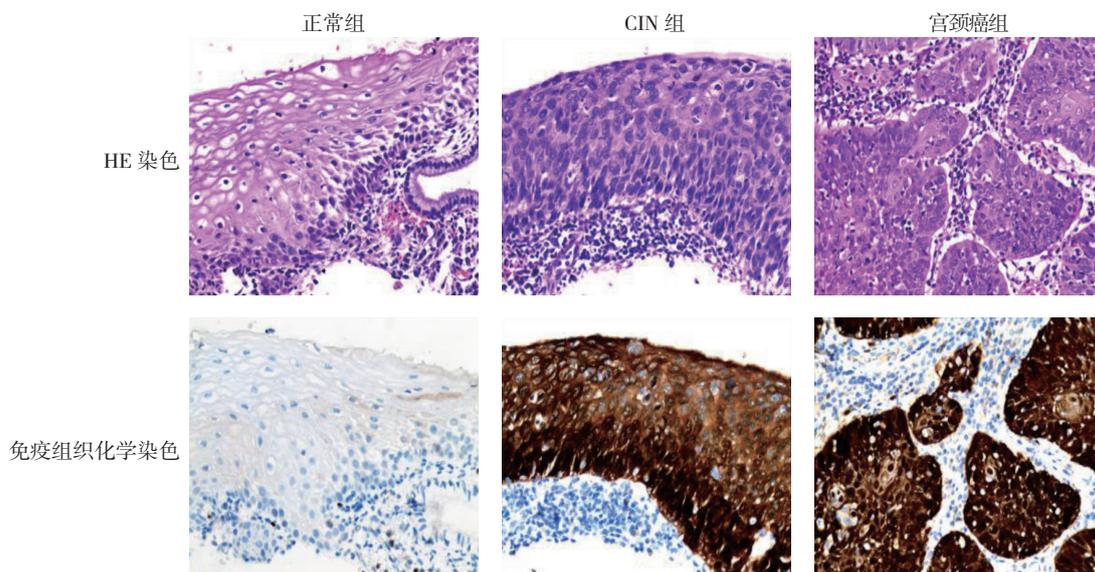


图 1 各组宫颈组织染色 ($\times 400$)

2.2 不同因素的宫颈癌组织中 YAP1 蛋白阳性表达率比较

不同临床分期和有无淋巴结转移患者宫颈癌组织中 YAP1 蛋白阳性表达率比较, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 临床分期 II 期宫颈癌组织中 YAP1 蛋白阳性表达率高于 I 期; 有淋巴结转移宫颈癌组织中 YAP1 蛋白阳性表达率高于无淋巴结转移。而不同年龄、组织学类型、组织学分级、宫颈浸润深度、神经脉管是否浸润及宫旁是否浸润的宫颈癌组织中 YAP1 蛋白阳性表达率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 宫颈癌 YAP1 阳性表达组和阴性表达组生存时间比较

100 例宫颈癌患者 DFS 中位数为 61.15 个月 (95% CI: 58.76, 63.32)。其中, 宫颈癌 YAP1 阳性表达组 78 例, DFS 中位数为 54.27 个月 (95% CI:

52.16, 67.36), 5 年 DFS 率为 3.85% (3/78); YAP1 阴性表达组 22 例, DFS 中位数为 87.76 个月 (95% CI: 85.54, 90.73), 5 年 DFS 率为 0.00% (0/22)。两组 DFS 比较, 经 Log-rank χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.241$, $P=0.023$), YAP1 阳性表达组低于 YAP1 阴性表达组。见图 2。

100 例宫颈癌患者 OS 中位数为 63.57 个月 (95% CI: 61.25, 65.02)。其中, 宫颈癌 YAP1 阳性表达组 OS 中位数为 61.27 个月 (95% CI: 58.76, 53.64); YAP1 阴性表达组 OS 中位数为 93.61 个月 (95% CI: 90.25, 96.02)。两组 OS 比较, 经 Log-rank χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2=6.201$, $P=0.014$), YAP1 阳性表达组低于 YAP1 阴性表达组。见图 3。

2.4 YAP1 对宫颈癌预后的影响

以 OS 为因变量 (赋值为总生存期实际值), 以

表 1 不同因素的宫颈癌组织中 YAP1 蛋白阳性表达率比较 (n=100)

因素	n	阳性例 (%)	χ^2 值	P 值	因素	n	阳性例 (%)	χ^2 值	P 值
年龄					宫颈浸润深度				
≥ 50 岁	43	32 (74.42)	0.564	0.453	≤ 1/3	31	22 (70.97)	1.295	0.255
<50 岁	57	46 (80.70)			>1/3	69	56 (81.16)		
临床分期					神经管浸润				
I 期	58	38 (65.52)	12.540	0.000	有	67	55 (82.09)	1.979	0.160
II 期	42	40 (95.24)			无	33	23 (69.70)		
组织学类型					宫旁浸润				
鳞癌	69	54 (78.26)	0.009	0.925	有	65	54 (83.08)	2.790	0.095
腺癌	31	24 (77.42)			无	35	24 (68.57)		
组织学分级					淋巴结转移				
低分化	19	18 (94.74)	4.057	0.132	有	53	48 (90.57)	10.377	0.001
中分化	42	32 (76.19)			无	47	30 (63.83)		
高分化	39	28 (71.79)							

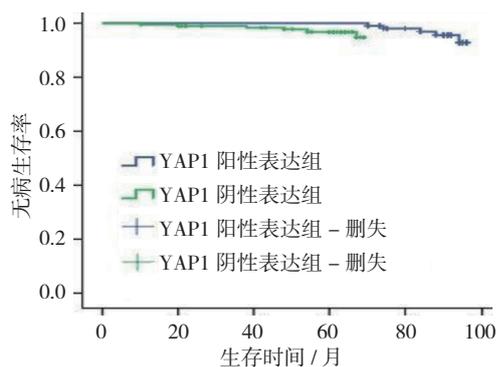


图 2 YAP1 不同表达宫颈癌患者的 DFS

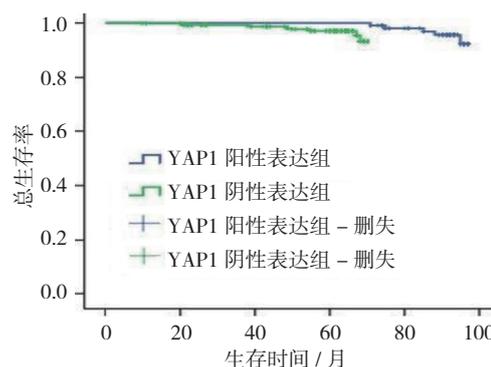


图 3 YAP1 不同表达宫颈癌患者的 OS

YAP1 (阳性 =1, 阴性 =0)、肿瘤大小 (赋值为实测值)、临床分期 (I 期 =0, II 期 =1)、淋巴结转移 (无 =0, 有 =1) 为自变量, 进行逐步多因素 Cox 比例风险分析,

引入水准为 0.05, 剔除水准为 0.10。Cox 比例风险模型分析结果显示, YAP1 表达、临床分期及淋巴结转移为宫颈癌 OS 的独立影响因素 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 宫颈癌总生存期影响因素的 Cox 比例风险分析参数

变量	b	S _b	χ^2 值	P 值	\hat{RR}	95% CI	
						下限	上限
YAP1	0.202	0.218	22.613	0.000	1.202	1.114	1.415
临床分期	0.364	0.152	15.846	0.000	1.412	1.325	1.503
淋巴结转移	0.411	0.178	18.520	0.000	1.391	1.258	1.471

3 讨论

Hippo 信号通路参与多种疾病的发生、发展过程, 与恶性肿瘤的发病关系密切, 尤其与其抑癌基因失活

关系密切^[5-6]。YAP1 被证实为原癌基因, 保护多个特异氨基酸结构域, 通过这些氨基酸结构域与一些蛋白质发生作用, 参与多种信号转导通路^[7]。在 Hippo 信

号通路中, YAP1 发挥中心效应作用^[8]。在生理条件下 Hippo 信号通路为一条激酶链, 由多种抑癌因子共同构成, 通过使 YAP1 磷酸化, 进而抑制 YAP1 转录共激活活性, 维持细胞增殖和凋亡的平衡^[9-10]。当 YAP1 过度表达或活性增加时, 可激活下游靶基因表达, 从而改变细胞增殖和凋亡的平衡^[11-12]。在恶性肿瘤组织中, Hippo 信号通路遭到破坏, 导致 YAP1 去磷酸化, 活性增加, 活化的 YAP1 可诱导细胞增生相关的基因高度表达、抑制凋亡基因过度表达, 从而打破细胞增殖和凋亡的平衡, 促进细胞过度增殖^[13], 导致乳腺癌^[14]、胰腺癌^[15]等恶性肿瘤的发生、发展。故推测 YAP1 在恶性肿瘤的发生、发展中发挥致癌基因角色^[16-17]。

HE 等^[18]发现, Hippo/YAP 途径和 HPV 致癌蛋白相互作用调节宫颈癌的进展。ZHANG 等^[19]发现, miR-136/TFCP2/YAP 途径在宫颈癌中发挥致癌作用。惠慧等^[20]发现, 沉默 YAP1 可影响宫颈癌细胞的增殖和侵袭。上述研究表明, YAP1 可通过多种途径参与宫颈癌的发生、发展过程, 但上述研究主要对宫颈癌细胞进行研究。本文对宫颈癌组织中 YAP1 的表达及临床意义进行研究, 发现宫颈癌组织中 YAP1 高表达率高于宫颈 CIN 组织, 宫颈 CIN 组织中 YAP1 高表达率高于正常宫颈组织, 宫颈癌组织中 YAP1 高表达与宫颈癌的临床分期和淋巴结转移关系密切。李灵芝等^[21]对宫颈癌组织中 YAP1 表达进行研究, 发现 YAP1 蛋白在宫颈癌前病变中呈高表达, 在宫颈癌筛查中具有一定价值。本研究结果与该研究结果一致, 表明 YAP1 在宫颈癌前病变中已表达异常, 检测 YAP1 表达在宫颈癌筛查和防治中具有一定价值。李娜等^[4]研究发现, YAP 在宫颈癌组织中高表达, 其高表达与宫颈癌淋巴结转移关系密切, 与宫颈癌临床分期无关。而本研究结果显示, 宫颈癌组织中 YAP1 与宫颈癌临床分期和淋巴结转移均有关。本研究与李娜等^[4]研究结果不完全一致, 分析可能与病例数少、病例来自不同医院等因素有关。结合上述基础研究结果得知, 沉默 YAP1 可影响宫颈癌细胞增殖和侵袭, 分析 YAP1 在宫颈癌增殖和侵袭中发挥重要作用, YAP1 高表达可促进宫颈癌增殖和侵袭。

本文对 YAP1 高表达与宫颈癌预后的关系进行研究, 发现 YAP1 高表达组患者 DFS 和 OS 较短, YAP1 表达为宫颈癌 OS 的独立影响因素。分析在宫颈癌组织中, Hippo 信号通路受到破坏, 导致 YAP1 去磷酸化, YAP1 活性增加, 活化的 YAP1 可诱导宫颈癌细胞增

殖, 促进其侵袭能力, 从而促进宫颈癌的发生、发展, 宫颈癌临床分期较高, 并出现淋巴结转移, 导致宫颈癌严重程度增加, 预后较差。

综上所述, 宫颈癌组织中 YAP1 呈高表达, YAP1 表达水平一定程度上可反映宫颈癌的严重程度, 在预测预后上也具有一定的辅助价值。

参 考 文 献:

- [1] MOYA I M, HALDER G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(4): 211-226.
- [2] TANG D E, DAI Y, LIN L W, et al. STUB1 suppresses tumorigenesis and chemoresistance through antagonizing YAP1 signaling[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(10): 3145-3156.
- [3] SUN Z Q, OU C L, LIU J B, et al. YAP1-induced MALAT1 promotes epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis by sponging miR-126-5p in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2019, 38(14): 2627-2644.
- [4] 李娜, 李洪林, 尹利荣. HPV E6/E7 mRNA 与 YAP 在宫颈癌中的表达与相关性研究 [J]. *天津医科大学学报*, 2018, 24(4): 307-311.
- [5] ZHENG Y, PAN D. The hippo signaling pathway in development and disease[J]. *Dev Cell*, 2019, 50(3): 264-282.
- [6] WHITE S M, MURAKAMI S, YI C. The complex entanglement of Hippo-Yap/Taz signaling in tumor immunity[J]. *Oncogene*, 2019, 38(16): 2899-2909.
- [7] GUO L, CHEN Y, LUO J, et al. YAP1 overexpression is associated with poor prognosis of breast cancer patients and induces breast cancer cell growth by inhibiting PTEN[J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(3): 437-445.
- [8] KAOWINN S, YAWUT N, KOH S S, et al. Cancer upregulated gene (CUG)2 elevates YAP1 expression, leading to enhancement of epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(1): 122-128.
- [9] 董高宏, 丘福良, 刘长安, 等. DNMT3B 通过 Hippo 信号通路促进肝癌细胞的增殖与侵袭 [J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(12): 1443-1452.
- [10] 布力布·吉力斯汉, 尹哲, 王薇, 等. Hippo 通路靶向 Ascl2 调节结直肠癌转移分子机制 [J]. *河北医科大学学报*, 2019, 40(11): 1255-1260.
- [11] 顾思佳, 孙国壮, 乔大伟, 等. Hippo 信号通路与结直肠癌 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2019, 46(5): 299-302.
- [12] MIN Q, MOLINA L, LI J, et al. β -Catenin and yes-associated protein 1 cooperate in hepatoblastoma pathogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(5): 1091-1104.
- [13] LI F, XU Y, LIU B, et al. YAP1-Mediated CDK6 activation confers radiation resistance in esophageal cancer - rationale for the combination of YAP1 and CDK4/6 inhibitors in esophageal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(7): 2264-2277.

- [14] YU S, ZHANG M, HUANG L, et al. ERK1 indicates good prognosis and inhibits breast cancer progression by suppressing YAP1 signaling[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(24): 12295-12314.
- [15] DHIR T, SCHULTZ C W, JAIN A, et al. Abemaciclib is effective against pancreatic cancer cells and synergizes with hur and YAP1 inhibition[J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(10): 2029-2041.
- [16] 崔娇, 韩治国, 艾力根·阿布都热依木, 等. YAP1-JUN 促进人喉鳞状细胞癌细胞增殖及 EMT 的机制研究 [J]. *中国医师杂志*, 2019, 21(9): 1316-1320.
- [17] 周宁, 郭纪伟, 代娟娟, 等. YAP 对非小细胞肺癌细胞增殖和迁移能力的影响 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2019, 45(6): 1320-1326.
- [18] HE C, MAO D, HUA G, et al. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression[J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(11): 1426-1449.
- [19] ZHANG J H, ZHAO X Y, ZHANG J, et al. Circular RNA hsa_circ_0023404 exerts an oncogenic role in cervical cancer through regulating miR-136/TFCP2/YAP pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(2): 428-433.
- [20] 惠慧, 吴磊, 胡艳, 等. siRNA 沉默 YAP1 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖和侵袭的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(2): 177-180.
- [21] 李灵芝, 胡晓飞, 程月平, 等. Yes 相关蛋白、AEG-1 蛋白在宫颈癌癌前病变患者中表达及联合液基细胞学检查的临床意义 [J]. *中国计划生育和妇产科*, 2019, 11(7): 82-85.

(唐勇 编辑)

本文引用格式: 王文慧, 邵志叶, 陈豪. 宫颈癌组织中 Hippo-Yes 相关蛋白 1 的表达及临床意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(12): 27-32.