胃癌细胞中 Hippo 通路负调控因子筛选-YAP 出入核检测

Screening of Negative Regulators of Hippo Pathway in Gastric Cancer Cells with Nuclear Translocation of YAP as Readout

汤扬¹, 焦石², 周兆才^{3,*}

¹医学院临床医学流动站, 同济大学/第十人民医院, 上海; ²中国科学院分子细胞科学卓越中心, 中国科学院大学, 上海; ³生命科学学院, 复旦大学, 上海

*通讯作者邮箱: zczhou@sibcb.ac.cn

引用格式: 汤扬, 焦石, 周兆才. (2021). 胃癌细胞中 Hippo 通路负调控因子筛选-YAP 出入核检测. // 高通量筛选实验手册. *Bio-101* e1010822. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010822.

How to cite: Tang, Y. Jiao, S. and Zhou, Z. C. (2021). Screening of Negative Regulators of Hippo Pathway in Gastric Cancer Cells with Nuclear Translocation of YAP as Readout. // High-throughput Screening Protocol eBook. *Bio-101* e1010822. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010822. (in Chinese)

摘要: Hippo 信号通路广泛参与器官大小调控、组织稳态、癌症发生发展等过程, 该通路失活时, 关键组分 YAP 去磷酸化, 进入细胞核并调节下游靶基因的转录, 促进细胞生长和癌症的发生。为了找到 Hippo 信号通路负调控因子, 我们选取 Human ON-TARGETplus (OTP) 全基因组 siRNA 文库进行筛选, 以 YAP 入核抑制率作为筛选指标。首先在胃癌细胞系 HGC-27 中转染不同的 siRNAs, 运用免疫荧光呈像技术检测 YAP 的亚细胞定位, 最后通过计算机程序对荧光图像进行统计分析, 定量 YAP 出入核的变化, 获得 Hippo 信号通路负调控因子。

关键词: Hippo 信号通路, YAP 入核抑制率, 负调控因子, siRNA 高通量筛选, 胃癌

材料与试剂

1. 15 ml 离心管 (Corning, catalog number: CLS430791)
2. 50 ml 离心管 (Corning, catalog number: CLS430828)
3. 10 ml 移液管 (Corning, catalog number: 4488)
4. 1.5 ml 离心管 (Axygen, catalog number: MCT-150-C)
5. 96 孔圆底板 (Corning, catalog number: CLS3879)
6. 384 孔 Viewplate 黑色透明底板 (Perkin Elmer, catalog number: 6007460)

7. RPMI 1640 (Thermo, catalog number: 11875093)
8. Opti-MEM (Thermo, catalog number: 31985088)
9. FBS (Biological Industries, catalog number: 04-001-1A)
10. Trypsin-EDTA (0.25%) (Thermo, catalog number: 25200072)
11. Penicillin/streptomycin (Thermo, catalog number: 15070063)
12. Lipofectamine RNAiMAX reagent (Thermo, catalog number: 13778075)
13. PFA (Sigma-Aldrich, catalog number: 158127)
14. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, catalog number: 93443)
15. BSA (生工生物工程(上海)股份有限公司, catalog number: 9048-46-8)
16. DharmaFECT1 (Horizon, catalog number: T-2001-03)
17. TOX (Thermo, catalog number: AM16708)

抗体

1. YAP (63.7) antibody (Santa Cruz, catalog number: sc-1001199)
2. Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse secondary antibody (Thermo, catalog number: A32723)
3. DAPI (Sigma-Aldrich, catalog number: 28718-90-3)

细胞系

HGC-27 细胞 (上海生命科学研究院细胞资源中心, TCHu 22)

仪器设备

1. 离心式自动洗板机 (BlueCatBio, model: BlueWasher)
2. Multidrop 自动分液器 (Thermo Fisher, model: Multidrop Combi)
3. Opera 激光共聚焦高内涵细胞成像分析系统 (Perkin Elmer, model: Opera LX4 88/561/640)
4. Operetta 高通量细胞成像分析系统 (Perkin Elmer, model: Operetta)
5. 隔水式恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司)
6. 水平冷冻离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
7. 细胞计数仪 (Invitrogen, model: Countess)
8. 二氧化碳恒温细胞培养箱 (Thermo Fisher, model: Thermo Series 8000)
9. 电动移液器 (Eppendorf)

10. Ensight 多功能微孔板检测仪 (Perkin Elmer, model: Ensight)

11. Bravo 自动化液体处理平台 (Agilent, model: Bravo)

实验步骤

一、预实验:

在本实验中,我们选择胃癌细胞系 HGC-27 作为实验对象,进行最佳细胞密度、转染试剂类型及转染试剂浓度的测试 (图 1)。由于 Hippo 信号通路受细胞密度的影响,细胞密度低的情况下, Hippo 信号通路被抑制, YAP 入核;细胞密度高的情况下, YAP 在细胞质中 (Zhao *et al.*, 2007; Ota and Sasaki, 2008)。因此,我们选择在低细胞密度的情况下进行筛选 Hippo 通路的负调控因子。

1. 测试条件:

细胞密度梯度: 每孔 250、500、750、1,000 个细胞。

转染试剂: RNAiMAX 和 DharmaFECT1。

转染试剂浓度: 每孔 0.05、0.1 和 0.15 μ l。

NC: negative control siRNA。

TOX: 用于检测转染效率。

转染时间: 48 小时。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B			250	500	750	1000	250	500	750	1000	
C			NC-RNAiMax, 0.05ul/well				NC-DharmaFECT 1, 0.05ul/well				
D											
E											
F			NC-RNAiMax, 0.1ul/well				NC-DharmaFECT 1, 0.1ul/well				
G											
H			NC-RNAiMax, 0.15ul/well				NC-DharmaFECT 1, 0.15ul/well				
I											
J			TOX-RNAiMax, 0.05ul/well				TOX-DharmaFECT 1, 0.05ul/well				
K											
L											
M			TOX-RNAiMax, 0.1ul/well				TOX-DharmaFECT 1, 0.1ul/well				
N											
O			TOX-RNAiMax, 0.15ul/well				TOX-DharmaFECT 1, 0.15ul/well				
P											

图 1. 384 孔板测试条件分布

2. 实验步骤

- 2.1 首先在 Viewplate 384 孔板中加入 siRNA，用 opti-MEM 稀释 siRNA 至终浓度为 20 nM，每孔加入 10 μ l siRNA；384 孔板每孔按照图 1 所示加入对应的转染试剂及剂量，用 Opti-MEM 补齐至 10 μ l。
- 2.2 加入 10 μ l siRNA 和 10 μ l 转染试剂后，800 rpm 水平离心 1 分钟，室温静置混匀 30 分钟。
- 2.3 在 siRNA 和转染试剂静置过程中，准备细胞。HGC-27 细胞经胰酶消化后用 1640 完全培养基重悬，随后进行细胞计数，每孔加入 30 μ l 对应密度的细胞量。（由于血清的终浓度为 10%，用 Opti-MEM 配制 siRNA 和转染试剂中未加入血清，因此在 1640 完全培养基中的血清浓度为 16.7%）。
- 2.4 每孔加入对应密度的细胞后，800 rpm 水平离心 1 分钟，使细胞沉降在板底。随后将 384 孔板放置在含有 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养 48 小时。
- 2.5 用 Ensign 多功能微孔板检测仪进行明场和绿色荧光拍照，明场中看细胞死亡情况确定转染试剂使用浓度。
- 2.6 随后运用免疫荧光检测不同细胞密度下 YAP 在核内的定位情况：
首先在 384 孔板中每孔加入 16 μ l 16% PFA（PFA 终浓度为 4%），800 rpm 水平离心 1 分钟，37 °C 培养箱中固定 15 分钟。其次用离心式自动洗板机洗板，PBS 洗 3 次，每次每孔加入 50 μ l PBS 溶液，洗板完成后加入 50 μ l 含有 0.05% Triton X-100 的 PBS 溶液室温静置 10 分钟，使细胞膜穿透。然后再用 PBS 洗 3 次，最后每孔加入 15 μ l 5% BSA 配制的 YAP（1:250）一抗进行 4 °C 过夜孵育。第二天用 PBS 洗去一抗，加入 DAPI（1:1,000，1 mg/ml）和荧光二抗（1:1,000）室温共孵育 1 小时，PBS 洗 3 次，最后每孔加入 50 μ l PBS 后进行拍照。
- 2.7 确定合适的筛选条件：
选择视野中细胞分散且 YAP 定位于核内的筛选条件，如图 2 所示。
确定合适的筛选条件：
细胞密度：每孔 250 个细胞；转染试剂：RNAiMAX；转染试剂浓度：384 孔板每孔 0.05 μ l。

图 2. YAP 定位情况

二、高通量筛选：

1. 选择 Human ON-TARGETplus (OTP) siRNA 亚文库：GPCR、Phosphatase 和 Protease 等亚文库。利用 Bravo 自动化液体处理平台进行亚文库整版分装，每块整版 3 个重复，每孔加入 10 μ l siRNA。
2. 用 Multidrop 自动分液器加样，每孔 10 μ l RNAiMAX 液体 (0.05 μ l RNAiMAX + 9.5 μ l Opti-MEM)，800 rpm 水平离心 1 分钟，室温静置混合 15 分钟后，加入 30 μ l HGC-27 细胞 (250 个/孔)，800 rpm 水平离心 1 分钟使细胞沉降至板底，放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 48 小时。
3. 免疫染色方法见上面实验步骤第(6)步。
4. 使用 Opera 或者 Operetta 进行拍照，用 Columbus 软件进行荧光强度计算和统计。
4.1 将数据导入至 Columbus 中 (图 3)。

图 3. 数据导入

- 4.2 上传数据后，点击数据处理和分析按钮进行荧光数据定量分析(图 4)。

图 4. 数据处理和分析

4.3 进入数据分析界面 (图 5)，界面左侧为数据处理流程，可按照需求自定义；界面中间为所拍摄的荧光图片预览界面；界面右侧为荧光强度、颜色等调整界面。

4.4 分析流程：

定义细胞核区域 (图 6)→定义细胞质区域 (图 7)→计算细胞核 roundness，排除细胞核形态异常的细胞 (图 8)→选择计算细胞核荧光强度的区域进行细胞核荧光强度计算 (图 8)→选择计算细胞质荧光强度的区域进行细胞质荧光强度计算 (图 8)→定义细胞质荧光强度/细胞核荧光强度 >1.25 的为 YAP 定位在细胞质，定义细胞质荧光强度/细胞核荧光强度 ≤ 1 的为 YAP 定位在细胞核 (图 9)→批量处理数据并输出分析结果。

图 5. 数据分析预览界面

图 6. 利用 DAPI 定义细胞核

图 7. 定义细胞质区域

图 8. 计算细胞核和细胞质的荧光强度

图 9. 计算 YAP 在细胞核和在细胞质中的具体数目

图 10. 根据需求导出数据

结果与分析

本实验根据 YAP 在细胞质和细胞核内的荧光强度比值进行分类，定义细胞质荧光强度/细胞核荧光强度 > 1.25 的为 YAP 定位在细胞质，定义细胞质荧光强度/细胞核荧光强度 ≤ 1 的为 YAP 定位在细胞核 (比例数值大小根据实验具体荧光强度可稍做调整)。随后计算加入 siNC 和不同 siRNA 后 YAP 在细胞质中的细胞数目/总细胞数 (cyto ratio)，用 siRNA (cyto ratio) – siNC (cyto ratio) 即为加入不同 siRNA 后的 YAP 入核抑制率。

以亚文库 Phosphatase 筛选为例，利用 GraphPad Prism 8.0 软件进行图像处理，将处理后所得数据导入软件 XY Table 中作图，横坐标为基因数目，纵坐标为 YAP 入核抑制率，得到 YAP 入核抑制率 $\geq 30\%$ 以上的基因数 6 个，即这 6 个基因敲低后能够促进 YAP 的出核（图 11）。

图 11. 亚文库 Phosphatase 中各个基因敲低导致 YAP 入核的抑制率大小

失败经验

1. 细胞生长密度影响实验结果：

- 1.1 在实验过程中，由于细胞成簇生长，在未加入任何处理时，就已经导致 YAP 出核（图 12）。解决方案一：消化细胞时，将 EDTA 的浓度由原来的 0.25% 提高至 0.5%，减少细胞之间的连接；解决方案二：转染时间缩短为 48 小时，减小细胞成簇的现象。
- 1.2 前期细胞培养时，如果一直是高密度培养，即使在筛选时每孔只加入 250 个细胞（细胞密度低），但由于之前培养时高密度导致 YAP 在细胞质，短时间内降低密度是不会引起 YAP 在细胞核。因此，在筛选前的细胞培养过程中，一直需要保持细胞密度低的情况，使得 YAP 在细胞核内，筛选过程中铺细胞后不会影 响实验结果。

图 12. 细胞成簇生长导致 YAP 出核

2. 处理结果无法得到正确的 YAP 在细胞质和细胞核的数目

解决方案一：调整 YAP 在细胞质和细胞核的荧光强度的定义，修改计算荧光强度的范围；解决方案二：对比荧光图片预览区域，调整细胞质荧光强度/细胞核荧光强度的比值大小范围，得到正确的分群信息。

3. 实验过程中关键步骤的影响实验结果

3.1 FBS 浓度改变会影响 YAP 的出入核状态，由于细胞生长过程中血清的终浓度为 10%，用 Opti-MEM 配制 siRNA 和转染试剂时未加入血清，因此在 1640 完全培养基中的血清浓度提高至为 16.7%，去除 FBS 对于 YAP 出入核的影响。

3.2 YAP 抗体的选择，需要选择适合做免疫荧光的抗体，即可以检测 YAP 出入核的变化情况。

溶液配方

1. 1640 完全细胞培养液

16.7% FBS, penicillin/streptomycin (v/v: 1:100)加入到 1640 基础培养基中
4 °C 保存，使用前 37 °C 水浴加热。

2. PBS 缓冲液

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 14.2 g Na₂HPO₄, 0.27 g KH₂PO₄, 加入 800 ml 双蒸水溶解，用 HCl 调 pH 值至 7.4，加水定容至 1 L
0.22 μm 滤膜过滤后，高压蒸汽灭菌，室温或 4 °C 保存。

3. 5% BSA

5 g BSA 用 PBS 缓冲液溶解并定容至 100 ml，0.22 μm 滤膜过滤，4 °C 保存。

4. 0.05% Triton X-100
50 μ l Triton X-100 用 PBS 缓冲液溶解并定容至 100 ml
0.22 μ m 滤膜过滤, 4 °C 保存。
5. YAP (63.7) 抗体稀释
按 1:250 的稀释倍数, 溶解至 5% BSA 中, 4 °C 保存。
6. Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse 二抗稀释
按 1:1,000 的稀释倍数, 溶解至 5% BSA 中, 4 °C 保存。
7. DAPI 稀释
按 1:1,000 的稀释倍数, 溶解至 5% BSA 中, 4 °C 保存。
8. PBA 溶液
PBS 缓冲液中加入 0.5% BSA 配制, 4 °C 保存。

致谢

感谢中国科学院分子细胞科学卓越中心化学生物学技术平台对本实验方法的帮助和改进。本实验得到国家自然科学基金项目 (81822035, 82002493) 和中国博士后科学基金项目 (2020T130477) 的资助。

参考文献

1. Ota, M. and Sasaki, H. (2008). [Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling.](#) *Development* 135(24): 4059-4069.
2. Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C. and Guan, K. L. (2007). [Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control.](#) *Genes Dev* 21(21): 2747-2761.