

# WZB117 下调 YAP 影响胃癌细胞干性和糖酵解的机制

张晨嵩 潘成武 王庆康 李靖 汪虎 马家驰

**摘要** 目的 探究糖酵解抑制剂 WZB117 通过下调 Yes 相关蛋白(YAP)影响病人来源的胃癌细胞干性和糖酵解的机制。方法 胰蛋白酶消化临床获取的胃癌组织,培养制备胃癌细胞;细胞分为正常组、低糖对照组和 WZB117 处理组,qRT-PCR 检测细胞干性相关基因(Nanog、oct-4、sox-2)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和凋亡相关基因(Bcl-2、bax 和 Cyt-C)的表达;Western blot 测定细胞中 YAP 和代谢相关蛋白己糖激酶 2(HK2)、丙酮酸激酶 M2 亚型(PKM2)和活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Cleaved Caspase-3)的表达;MTT 测定细胞增殖活性;平板克隆实验测定细胞克隆形成能力;划痕试验观察细胞迁移能力;Transwell 实验观察细胞的侵袭能力;试剂盒测定细胞中三磷酸腺苷(ATP)及培养液上清液中的乳酸含量。结果

WZB117 培养细胞后,YAP 表达水平较正常组及低糖对照组显著降低( $P < 0.05$ );Nanog、Bmi-1、c-Myc 的表达以及细胞增殖活性、克隆形成率、侵袭能力、迁移能力降低( $P < 0.05$ );Cleaved Caspase-3 水平及细胞凋亡率升高( $P < 0.05$ );Bcl-2 表达随 WZB117 浓度增高而降低( $P < 0.05$ );Bax 和 Cyt-C 表达随 WZB117 浓度增高而升高( $P < 0.05$ );ATP、上清液中乳酸含量以及 HK2、PKM2 蛋白水平降低( $P < 0.05$ )。结论 抑制剂 WZB117 可通过下调胃癌细胞中 YAP 表达,干扰糖酵解关键酶 HK2、PKM2 的表达,抑制胃癌细胞糖酵解,降低细胞 ATP 水平。

**关键词** WZB117;胃癌;Yes 相关蛋白;癌细胞干性;糖酵解  
中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1241-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.014

胃癌是全世界第四大最常见的癌症,是每年死亡人数第二多的癌症<sup>[1-2]</sup>。Hippo 途径在组织稳态

和早期胚胎细胞规格方面起着至关重要的作用,与细胞能量代谢密切相关<sup>[3]</sup>。Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)是该途径的核心组成部分<sup>[4-6]</sup>。抑制 YAP 的表达可抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭和转移<sup>[7-8]</sup>。WZB117 [2-氟-6-(间羟基苯甲酰氧基)苯基-羟基-羟基苯甲酸酯]是一种合成的小分子糖酵解抑制剂<sup>[9]</sup>,可通过限制糖酵解来抑制小鼠体内的肿瘤增长。WZB117 可下调 GLUT1 蛋白、细胞内三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)和糖酵解酶的水平,并上调 AMP 依赖的蛋白激酶[Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]的磷酸化,导致癌细胞的细胞周期停滞、衰老和凋亡<sup>[10-13]</sup>。该研究探讨 WZB117 通过下调 YAP 的表达进而影响病人来源的胃癌细胞能量代谢的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 新鲜的胃癌组织用 PBS 洗涤以除去血液后,将组织切成 1~3 mm<sup>3</sup> 大小的碎片,漂浮在含 15% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的杜氏磷酸缓冲盐溶液改良的 Eagle 培养基中。将胃癌组织碎片在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的潮湿空气中培养。当细胞汇合至约 80% 时,用胰蛋白酶消化,然后以 1:3 的分离比重新铺入较大的培养瓶中。第 4 代的胃癌细胞用于后续实验。临床样品的使用经医院伦理委员会批准,并获得患者的书面知情同意。

**1.2 细胞分组及培养** 将胃癌细胞接种至 6 孔板中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,观察细胞在培养 24、48 h 的生长情况并计数。将胃癌细胞随机分为 3 组:正常组、低糖对照组和 WZB117 处理组。正常组细胞培养于 DMEM 高糖(4.5 g/L)中,添加含 100 ml/L 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的完全培养基;低糖对照组细胞培养于 DMEM 低糖(1.0 g/L)完全培养基;WZB117 处理组细胞培养于 DMEM 高糖(4.5 g/L)完全培养基,添加 10 mmol/L 抑制剂 WZB117。细胞常规培养 2~3 d 传代 1 次。

**1.3 MTT 检测细胞增殖活性** 在 96 孔板中将正

2021-04-13 接收

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(编号:KJ2019A0396);蚌埠医学院自然科学重点项目(编号:BYKY2019099ZD);蚌埠医学院胃癌多学科诊疗创新团队项目(编号:BYKC201907);蚌埠医学院自然科学基金重点项目(编号:2020byzd083)

作者单位:蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科综合病区,蚌埠 233010

作者简介:张晨嵩,男,主治医师;

马家驰,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: tsmjc@hotmail.com

常组、低糖对照组和 WZB117 处理组细胞于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后, 在每孔迅速加入 10 μl 浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液, 继续 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h。取出培养板, 用移液枪把孔中的上清液吸除, 再加入 100 μl 的二甲基亚砷溶液, 摇床反应 10 min。观察结晶物溶解后, 酶标仪检测 OD570。

**1.4 RNA 提取和 qRT-PCR** 根据制造商的说明, 细胞培养 48 h 后使用 TRIzol 试剂从细胞中分离总 RNA, 溶于 20 μl DEPC 水中, 检测其浓度和纯度。StepOne Real-Time 系统用于定量 mRNA 检测, 内参基因为 β-actin。逆转录反应程序为: 42 ℃、60 min, 70 ℃、50 min。qRT-PCR 反应程序为: 94 ℃、45 s, 60 ℃、60 s, 72 ℃、80 s, 合计 40 个循环。通过式 2<sup>-ΔΔCt</sup> 测量每个基因的表达。本研究中使用的引物由 Invitrogen( 中国上海) 生产, 其序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列	引物长度( bp)
β-actin	F: GACCTGTACGCCAACACAGT	20
	R: CTCAGGAGGAGCAATGATCT	20
Nanog	F: CCTGATTCTTCCACAGTCC	20
	R: TGCTATCTTCGGCCAGTTG	20
Oct-4	F: TTGAGGCTCTGCAGCTTAG	20
	R: GCCGGTTACAGAACACAC	20
Bax	F: CACCAGCAGATCAT	14
	R: GATCAGTTCGGCACCTTG	19
Sox-2	F: ACACCAATCCCATCCACACT	20
	R: GCAAACCTCCTGCAAAGCTC	20
MMP-2	F: CTCAGGGCGAGATGACTTGTA	21
	R: CCACACCATCGTCCTCTAAT	20
MMP-9	F: CCTTGCTGCTTACCTCCAC	20
	R: ATCTGCATGGTGATGTTGGA	20
Cyt-C	F: CCTGGTTGCTTCAAGGACAC	20
	R: TCCATGCTCTTGCAGCTCTC	20
Bcl-2	F: CTGGGAGAACAGGGTACGATAA	22
	R: CCCACCGAACTCAAAGAAGG	20
HK2	F: CGCATTTGCCACATACACTCT	20
	R: TTGGCTGAGGATGGTGTAAAG	20
PKM2	F: AGTCAACTGCAACGTCT	17
	R: AGCGTTCTGTTCACCTCAT	20
Caspase-3	F: GCTCTGTGTGAAGGTGCAGTTT	22
	R: TTCTGTGTTGGCCAGTGT	19

**1.5 Western blot 检测蛋白表达** 正常组、低糖对照组和 WZB117 处理组细胞培养 48 h 后, 移液器吸除培养液, PBS 洗涤细胞 2 次。均质化后在添加了蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中裂解, 收集细胞裂解液, 在 4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取培养液上清液, BAC 法对蛋白定量。在 12% SDS-

PAGE 凝胶上分离蛋白质。电泳后, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 在 5% ( W/V) 的脱脂牛奶中封闭, 并与一抗在 4 ℃ 下孵育过夜。将膜用 Tris 缓冲盐水/吐温洗涤 3 次, 并在 37 ℃ 下用二抗孵育 1 h。一抗和二抗的稀释倍数均为 1 : 1 000。

**1.6 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力** 在 6 孔板( 2 × 10<sup>3</sup> 个细胞/孔) 中将正常组、低糖对照组和 WZB117 处理组细胞于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 湿润的培养箱中培养 8 d。用 2 ml 完全培养基处理细胞。每 3 d 更换 1 次培养基。孵育结束时, 将培养物用 4% 多聚甲醛固定并用结晶紫染色。

**1.7 细胞中 ATP 含量及培养液中乳酸含量测定** 使用 ATP 含量试剂盒检测正常组、低糖对照组和 WZB117 处理组细胞中 ATP 的含量, 3 组细胞培养 48 h 后, 吸取培养液上清液, 使用乳酸含量检测试剂盒检测乳酸水平。ATP 含量和乳酸含量分别以低糖对照组及正常组为对照, 分析 ATP 相对含量和乳酸相对含量。

**1.8 细胞迁移和侵袭测定** 正常组、低糖对照组和 WZB117 处理组细胞( 5 × 10<sup>4</sup> 个细胞/孔) 铺在顶室, 将无血清 L-DMEM 和含有 10% FBS 的培养基放入 Transwell( 孔径 8.0 μm) 中, 并放入底部腔室。在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 湿润的培养箱中孵育 12 h 后, 用棉签除去残留在膜上表面的细胞。将滤膜在 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 用结晶紫染色 15 min 后照相。在显微镜下观察细胞, 每组至少分析 5 个视野。为了进行细胞侵袭测定, 在 Transwell 室中用 200 μl 在无血清培养基中以 1 : 5 稀释的 Matrigel 包被, 并将孵育时间延长至 24 h。其余步骤与细胞迁移测定相同。在显微镜下计数迁移和侵袭的细胞数。

**1.9 统计学处理** 本研究采用 SPSS20.0 统计分析软件( 美国 IBM 公司) 处理; 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计数资料采用百分率( %) 表示, 组间比较使用 *F* 检验和 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 WZB117 对病人来源胃癌细胞中 YAP 蛋白质表达的影响** 正常组和低糖对照组细胞中 YAP 表达水平的比较, 差异无统计学意义。WZB117 处理组细胞中 YAP 的表达水平均低于正常组及低糖对照组, 差异有统计学意义( P < 0.05), 见表 2。

**2.2 WZB117 对病人来源胃癌细胞增殖活性、克隆形成率、侵袭能力、迁移能力的影响** 利用 MTT 检测 WZB117 对胃癌细胞增殖活性的影响, 平板克隆

实验检测细胞克隆形成能力。结果显示 WZB117 处理组胃癌细胞增殖活性和克隆形成能力均低于正常组及低糖对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 正常组与低糖对照组比较, 差异无统计学意义, 见表 3。

表 2 各组细胞中 YAP 蛋白质表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 16$ )

组别	YAP 蛋白
WZB117 处理	0.36 ± 0.12* #
正常	1.23 ± 0.08
低糖对照	1.20 ± 0.06
P 值	< 0.001

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与低糖对照组比较: #  $P < 0.05$

表 3 各组细胞增殖活性和细胞克隆率 ( $\bar{x} \pm s, n = 16$ )

组别	细胞活性(OD570)	克隆率(%)
WZB117 处理	0.41 ± 0.06* #	18.62 ± 4.72* #
正常	0.77 ± 0.02	34.79 ± 7.17
低糖对照	0.75 ± 0.02	34.26 ± 6.97
F 值	48.511	63.193
P 值	0.001	0.001

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与低糖对照组比较: #  $P < 0.05$

通过定量 RT-PCR 检测 MMP-2 和 MMP-9 的表达, 结果显示 WZB117 降低了胃癌细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的表达(图 1)。同样在 Transwell 迁移分析中, WZB117 处理组向室下表面迁移的细胞数量比正常组及低糖对照组要少(图 2A), 在侵袭试验中观察到了类似的变化(图 2B)。这表明 WZB117 抑制剂可降低胃癌细胞的迁移和侵袭能力。

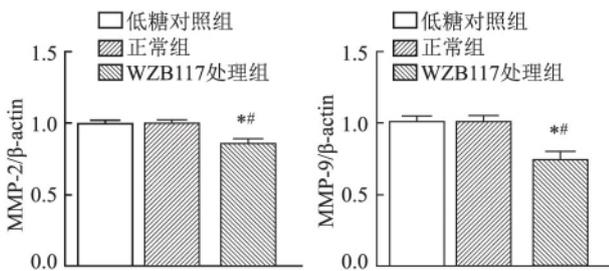


图 1 胃癌细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的表达

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与低糖对照组比较: #  $P < 0.05$

### 2.3 WZB117 对患者来源胃癌细胞干性的影响

为了探讨糖酵解抑制剂 WZB117 对胃癌细胞干性的影响, 检测包括 Sox-2、Oct-4 和 Nanog 在内的干性相关基因的表达。Sox-2、Oct-4 和 Nanog 的表达降低, 表明 WZB117 可能调节 GC-MSC 的干细胞特性, 结果见图 3、表 4。

### 2.4 WZB117 对患者来源胃癌细胞 ATP 和培养液

中乳酸含量的影响 使用不同浓度 WZB117 处理胃癌细胞, 分别在 4、8 h 时使用 ATP 含量试剂盒检测胃癌细胞中 ATP 含量, 分别在 24、48 h 使用乳酸含量试剂盒检测培养液中乳酸含量。ATP 和乳酸含量均随 WZB117 浓度增高和药物作用时间延长而降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明 WZB117 降低 ATP 和乳酸含量水平呈现时间和浓度依赖性, 结果见表 5。

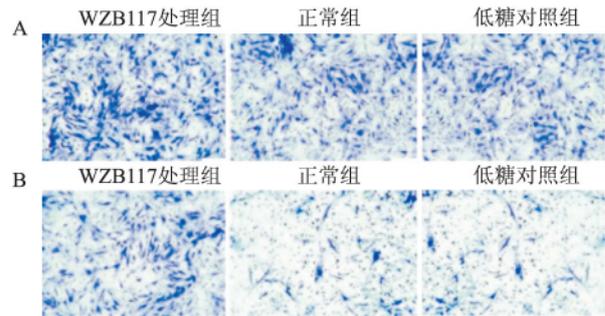


图 2 WZB117 可降低胃癌细胞的迁移和侵袭能力 SP × 400

A: Transwell 迁移试验分析; B: Transwell 侵袭试验分析

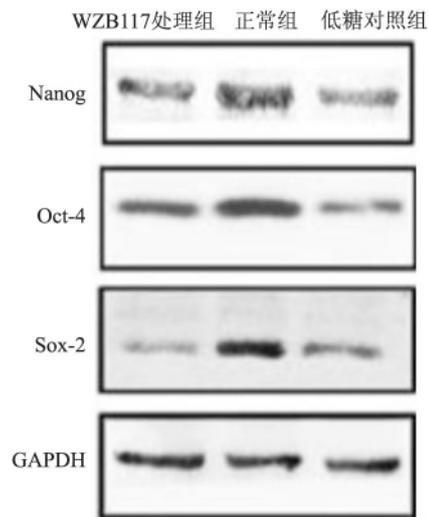


图 3 WZB117 可以调节胃癌细胞的干性

表 4 胃癌细胞干性相关基因的蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 16$ )

组别	Nanog	Oct-4	Sox-2
WZB117 处理	460.63 ± 35.83* #	235.88 ± 38.19* #	348.25 ± 67.17* #
正常	940.25 ± 51.12	570.00 ± 64.75	755.13 ± 48.77
低糖对照	780.44 ± 72.07	492.94 ± 88.61	671.69 ± 75.45
F 值	47.735	51.839	63.770

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与低糖对照组比较: #  $P < 0.05$

### 2.5 WZB117 对患者来源胃癌细胞 HK2、PKM2

和 Caspase-3 表达的影响 使用不同浓度 WZB117 处理胃癌细胞, 分别使用 qRT-PCR 和 Western blot

表5 WZB117对胃癌细胞ATP和培养液中乳酸含量的影响( $\bar{x} \pm s$   $n=16$ )

项目	检测节点	WZB117 浓度( mmol/L)			低糖对照组	正常组
		5	10	20		
ATP 含量 ( ng/ml)	4 h	29.32 ± 1.63	22.39 ± 1.55* #	12.73 ± 1.28* #	32.48 ± 2.24	32.68 ± 2.01
	8 h	25.26 ± 1.923* #	15.19 ± 1.37* #	8.22 ± 3.94* #	30.56 ± 2.52	30.41 ± 2.59
乳酸含量 ( mmol/L)	24 h	89.79 ± 7.51	62.48 ± 1.23* #	47.90 ± 4.58* #	96.35 ± 9.52	96.12 ± 9.08
	48 h	69.08 ± 5.26* #	31.64 ± 0.93* #	20.28 ± 3.05* #	85.02 ± 7.44	85.39 ± 6.82

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与低糖对照组比较: #  $P < 0.05$

检测胃癌细胞中 HK2、PKM2 和 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白质表达。WZB117 处理组 HK2 和 PKM2 表达均较正常组和低糖对照组降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Caspase-3 表达较正常组和低糖对照组升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 正常组和低糖对照组间比较, 差异无统计学意义, 见表 6、7 和图 4。

表6 各组细胞中 HK2、PKM2 和 Caspase-3 的 mRNA 表达( $\bar{x} \pm s$   $n=16$ )

组别	HK2	PKM2	Caspase-3
WZB117 处理	0.29 ± 0.04* #	0.14 ± 0.02* #	1.34 ± 0.14* #
正常	0.63 ± 0.06	0.73 ± 0.12	0.34 ± 0.06
低糖对照	0.62 ± 0.04	0.70 ± 0.11	0.33 ± 0.05
F 值	66.124	63.138	55.673
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与低糖对照组比较: #  $P < 0.05$

表7 胃癌细胞中 Caspase-3、HK2 和 PKM2 的蛋白表达( $\bar{x} \pm s$   $n=16$ )

组别	Caspase-3	HK2	PKM2
WZB117 处理	169.53 ± 12.05* #	58.67 ± 13.99* #	63.42 ± 12.47* #
正常	49.31 ± 5.71	152.87 ± 8.73	152.18 ± 7.79
低糖对照	59.42 ± 16.16	165.77 ± 18.57	57.80 ± 15.02
F 值	53.120	53.689	34.543

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与低糖对照组比较: #  $P < 0.05$

**2.6 WZB117 对患者来源胃癌细胞中 Bcl-2、Bax 和 Cyt-C 表达的影响** 使用不同浓度 WZB117 处理胃癌细胞, 在 24 h 使用 qRT-PCR 检测胃癌细胞中 Bcl-2、Bax 和 Cyt-C 表达。Bcl-2 表达随 WZB117 浓度增高而降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Bax 和 Cyt-C 表达随 WZB117 浓度增高升高, 差异有统

表8 WZB117对胃癌细胞中 Bcl-2、Bax 和 Cyt-C 表达的影响( $\bar{x} \pm s$   $n=16$ )

项目	WZB117 浓度( mmol/L)			低糖对照组	正常组
	5	10	20		
Bcl-2	0.68 ± 0.14* #	0.45 ± 0.08* #	0.23 ± 0.05* #	1.02 ± 0.04	1.00 ± 0.00
Bax	1.74 ± 0.72* #	2.06 ± 0.83* #	4.53 ± 1.55* #	0.95 ± 0.02	1.00 ± 0.00
Cyt-C	1.06 ± 0.21	1.83 ± 0.75* #	2.55 ± 1.08* #	1.02 ± 0.04	1.00 ± 0.00

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与低糖对照组比较: #  $P < 0.05$

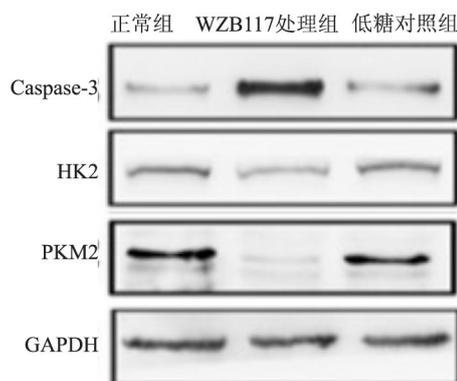


图4 WZB117 可以调节胃癌细胞中 Caspase-3、HK2 和 PKM2 的表达

学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 8。

### 3 讨论

Hippo/YAP 途径在人类癌症中起重要作用。YAP 在胃癌组织中的表达与患者总生存率密切相关, 其致癌作用最近已成为研究热点。据报道<sup>[14]</sup>, YAP 可通过与 TEAD 转录因子相互作用来促进胆管癌的生长。且 YAP 可以在体外和体内增强胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。通过减少 MMP-2 和 MMP-9 的表达, 降低 YAP 的信号传导, 从而抑制肿瘤的生长和转移<sup>[15]</sup>。在本研究中, WZB117 可以抑制 YAP 的表达, 进而降低了胃癌细胞的干性(包括增殖活性、克隆形成率、侵袭能力、迁移能力), 促进细胞凋亡; WZB117 也降低了细胞干性相关基因 Nanog、BMil、c-Myc 的表达。

肿瘤细胞较正常细胞相比需要更多的能量以维

持其侵袭、增值和细胞干性。大多数癌细胞利用厌氧代谢(糖酵解)来产生细胞生长和增值所需的ATP,这与正常分化的细胞不同,后者通常使用线粒体氧化磷酸化来维持细胞功能。从有氧代谢到无氧代谢的过渡被称为“Warburg效应”。肿瘤细胞在供氧充足条件下,“Warburg效应”强于普通细胞。肿瘤细胞的糖酵解水平与肿瘤细胞的分化程度和肿瘤恶性程度呈正相关效应,高度分化的肿瘤细胞能量代谢水平是正常细胞的40倍左右,糖酵解途径是维持高水平能量代谢的重要途径。因此,阻断肿瘤细胞糖酵解代谢途径中的任何一个环节,就能够降低肿瘤细胞的增殖能力,促进细胞凋亡。YAP可以调控肿瘤细胞生长,而肿瘤细胞的生长需ATP的参与,因此,YAP可能参与肿瘤细胞能量代谢过程。本研究结果显示,WZB117可通过下调YAP表达,使胃癌细胞中HK2、PKM2表达、乳酸和ATP水平皆下降,表明YAP下调可抑制胃癌细胞糖酵解。

综上所述,WZB117可以下调YAP的表达,从而影响了胃癌细胞的迁移、侵袭能力和增殖活性,促使胃癌细胞凋亡。这说明YAP在胃癌细胞中的表达在促进胃癌细胞的进展中起着重要作用,这可能为胃癌的进一步研究和治疗提供新的思路。

### 参考文献

- [1] 陈冲,周波,常家聪. TIMP-4和MMP-2在胃癌中的表达[J]. 安徽医科大学学报,2020,55(10): 1575-8.
- [2] 孔晋,吴文涌,吴正升. TIMP-4和MMP-2在胃癌中的表达[J]. 安徽医科大学学报,2020,55(6): 965-9.
- [3] Yang W, Han W, Qin A, et al. The emerging role of Hippo signaling pathway in regulating osteoclast formation[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4606-17.
- [4] Zhao D L, Wu Q L. Effect of inhibition to Yes-related proteins-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway through miR-195-5p on apoptosis of gastric cancer cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(15): 6486-96.
- [5] Berndt S, Gurevich V V, Iverson T M. Crystal structure of the SH3 domain of human Lyn non-receptor tyrosine kinase[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215140.
- [6] Rigracciolo D C, Nohata N, Lappano R, et al. IGF-1/IGF-1R/FAK/YAP transduction signaling prompts growth effects in Triple-Negative breast cancer (TNBC) cells[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 1010.
- [7] Yuan L, Zhou M, Wasan H S, et al. Jiedu sangen decoction inhibits the invasion and metastasis of colorectal cancer cells by regulating EMT through the hippo signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 1431726.
- [8] Xiao Z, Chen L J, You Z, et al. A novel protein encoded by a circular RNA circPPP1R12A promotes tumor pathogenesis and metastasis of colon cancer *via* Hippo-YAP signaling[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 47.
- [9] Ojelabi O A, Lloyd K P, Simon A H, et al. WZB117 [2-Fluoro-6-(*m*-hydroxybenzoyloxy) phenyl *m*-Hydroxybenzoate] inhibits GLUT1-mediated sugar transport by binding reversibly at the exofacial sugar binding site[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(52): 26762-72.
- [10] Li Y L, Weng H C, Hsu J L, et al. The combination of MK-2206 and WZB117 exerts a synergistic cytotoxic effect against breast cancer cells[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1311.
- [11] Wei M, Lu L, Sui W J, et al. Inhibition of GLUTs by WZB117 mediates apoptosis in blood-stage Plasmodium parasites by breaking redox balance[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2): 1154-9.
- [12] Chen Q, Meng Y Q, Xu X F, et al. Blockade of GLUT1 by WZB117 resensitizes breast cancer cells to adriamycin[J]. *Anti-cancer Drugs*, 2017, 28(8): 880-7.
- [13] Kanakkanthara A, Kurmi K, Ekstrom T L, et al. BRCA1 deficiency upregulates NNMT, which reprograms metabolism and sensitizes ovarian cancer cells to mitochondrial metabolic targeting agents[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(23): 5920-9.
- [14] Marti P, Stein C, Blumer T, et al. YAP promotes proliferation, chemoresistance, and angiogenesis in human cholangiocarcinoma through TEAD transcription factors[J]. *Hepatology*, 2015, 62(5): 1497-510.
- [15] Majumder A, Ray S, Banerji A. Epidermal growth factor receptor-mediated regulation of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 452(1-2): 111-21.

## Mechanism of the effect of WZB117 on stemness and glycolysis *via* downregulation of YAP in gastric cancer cells

Zhang Chensong, Pan Chengwu, Wang Qingkang, et al

(Dept of Surgical Oncology Surgery, General Ward, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233010)

**Abstract Objective** To explore the mechanism by which the inhibitor WZB117 affects the stemness and glycolysis

# 抑制 PCSK9 对人主动脉内皮细胞钙化的保护作用

靳天慧<sup>1</sup> 陈亮<sup>1,2</sup> 刘叶红<sup>1</sup> 盛瑛<sup>1,2</sup> 宗刚军<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨抑制前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 对地塞米松联合 L-抗坏血酸和 β 甘油磷酸诱导的人主动脉内皮细胞 (HAEC) 钙化的影响。方法 使用不同浓度 (0、10、30、50 mmol/L) β 甘油磷酸 + 50 μg/ml L-抗坏血酸 + 100 nmol/L 地塞米松刺激 HAEC, 筛选出诱导细胞钙化的最佳浓度, 并验证 HAEC 钙化时, PCSK9 的 mRNA 和蛋白表达。采用小干扰 RNA (siRNA) 敲低 HAEC 中 PCSK9 的表达, 采用相同条件诱导细胞钙化, 检测敲低 PCSK9 后 HAEC 中 PCSK9 及主要钙化指标的表达变化。茜素红 S 染色观察细胞内的钙化沉积。结果 ① 当 β 甘油磷酸浓度为

30 mmol/L 时, HAEC 中主要钙化指标骨形态发生蛋白 (BMP) 2、BMP4 和 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2) 的 mRNA 和蛋白表达水平达到峰值, 诱导钙化效果最佳; ② 诱导 HAEC 钙化后细胞内 PCSK9 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高; ③ 敲低细胞内 PCSK9 的表达能够抑制体外诱导的 HAEC 钙化, 钙化相关基因和蛋白的表达降低, 细胞内钙盐沉积明显减少。结论 PCSK9 的表达与 HAEC 钙化水平相关, 敲低 PCSK9 可抑制地塞米松联合抗坏血酸和 β 甘油磷酸诱导的 HAEC 钙化。

**关键词** 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 血管钙化; 血管内皮细胞

中图分类号 R 543

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2021) 08 - 1246 - 05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2021.08.015

2020 - 09 - 09 接收

基金项目: 江苏省青年医学重点人才基金项目 (编号: QNRC2016883); 无锡市医疗与公众健康技术创新应用项目 (编号: N20192007)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学无锡临床学院心血管内科, 无锡 214044  
<sup>2</sup> 中国人民解放军联勤保障部队第 904 医院心血管内科, 无锡 214044

作者简介: 靳天慧, 女, 硕士研究生;  
宗刚军, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zonggj@163.com

血管钙化在动脉粥样硬化性心脑血管疾病以及肾功能衰竭的患者中非常普遍。内皮细胞和血管平滑肌细胞的衰老, 细胞外基质沉积以及血管周围脂肪组织的炎症反应等机制都参与了血管钙化的发生和发展<sup>[1]</sup>。前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein

via the downregulation of Yes-related proteins in patient-derived gastric cancer cells. **Methods** Patient-derived gastric cancer cells were obtained via the trypsin digestion of clinical gastric cancer tissues and incubation. The cells were divided into normal group, low glucose control group and WZB117 treatment group. Afterwards, qRT-PCR was used to detect the expression levels of stemness-related genes (Nanog, oct-4 and sox-2), invasion-related genes matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and apoptosis-related genes (Bcl-2, bax and Cyt-C). Western blot was applied to determine the expression levels of YAP, metabolism-related proteins hexokinase 2 (HK2) and pyruvate kinase M2 subtype (PKM2) and activated cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme 3 (Cleaved Caspase-3). Thiazolyl blue (MTT), plate clone, scratch test, Transwell and kit were performed to measure the cell proliferation, clone formation, migration, invasion, and content of adenosine triphosphate (ATP) and lactic acid, respectively. **Results** After WZB117 cultured cells, the YAP expression level was significantly lower than that of the normal group and the low glucose control group ( $P < 0.05$ ), and that of stemness-related genes (Nanog, oct-4 and sox-2) and cell proliferation, clone formation, invasion, and migration were also lower ( $P < 0.05$ ). The levels of Cleaved Caspase-3 and apoptosis in group treated by WZB117 were higher than those in control groups ( $P < 0.05$ ), and the expression level of Bcl-2 decreased with the increase of WZB117 concentration ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of Bax and CYT-C increased with the increase of WZB117 concentration ( $P < 0.05$ ). The content of ATP and lactic acid in supernatant and the protein expression levels of HK2 and PKM2 were lower than those in control groups. **Conclusion** WZB117 can down regulate the expression of Yap, HK2 and PKM2 in gastric cancer cells, inhibit glycolysis and reduce ATP level.

**Key words** WZB117; gastric cancer; Yes-related protein; cancer cell stemness; glycolysis