DOI:10.16016/j.1000-5404.201412101

论著

慢病毒介导 LATS1 过表达对人肾癌细胞系 786-0 增殖、凋亡及下游癌基因 YAP 的影响

陈柯宏[1],何 江[2],王德林[3],刘武江[4] [400020 重庆,重庆市红十字会医院(江北区人民医院)肿瘤血液科[1];401331 重庆,重庆医科大学附属大学城医院消化神经中心[2];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科[3];100034 北京,北京大学第一医院泌尿外科,北京大学泌尿外科研究所[4]]

[**摘要**] **目的** 探讨慢病毒介导 LATS1 过表达对人肾癌细胞 786-0 增殖、凋亡及下游癌基因 YAP 的影响。**方法** 采用携带 LATS1 基因的慢病毒载体感染人透明细胞肾癌细胞系 786-0,利用 RT-PCR 检测感染后 786-0 细胞中 Hippo-YAP 信号通路大肿瘤抑制基因-1(large tumor suppressor gene 1, LATS1) mRNA 和下游癌基因 Yes-相关蛋白(Yes-associated protein, YAP) mRNA 的表达水平,Western blot 检测 LATS1 和 YAP 的蛋白表达水平,流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡和周期,细胞增殖/毒性试剂(cell counting kit-8, CCK-8)检测细胞增殖抑制情况。**结果** 慢病毒介导 LATS1 感染肾癌 786-0 细胞系后,LATS1 mRNA 及蛋白表达水平显著高于对照组及空病毒组($P<0.05$), YAP mRNA 及蛋白表达水平显著低于对照组及空病毒组($P<0.05$),细胞周期停滞在 G_1期($P<0.05$)、细胞增殖受到明显抑制($P<0.05$)、细胞凋亡显著增加($P<0.05$)。**结论** 慢病毒介导 LATS1 过表达下调 YAP 基因表达,抑制 786-0 细胞增殖、促进其凋亡并阻滞细胞周期于 G_1期。肾癌的发生、发展可能与 LATS1 和 YAP 表达失调有关。

[**关键词**] 肾细胞癌;慢病毒;Hippo-YAP;LATS1;YAP
[**中图法分类号**] R394.2; R730.23; R737.11 [**文献标志码**] A

Lentivirus-mediated LATS1 overexpression suppresses proliferation, improves apoptosis and down-regulates downstream oncogene YAP in human renal cell carcinoma 786-0 cells

Chen Kehong[1], He Jiang[2], Wang Delin[3], Liu Wujiang[4] [[1]Department of Oncology and Hematology, Chongqing Red Cross Hospital (People's Hospital of Jiangbei District), Chongqing, 400020; [2]Center of Gastroenterology and Neurology, University-Town Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401331; [3]Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [4]Department of Urology, the First Hospital of Peking University, Institute of Urology Surgery of Peking University, Beijing, 100034, China]

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of lentivirus-mediated large tumor suppressor gene 1 (LATS1) overexpression on the cell proliferation, apoptosis and downstream oncogene Yes-associated protein (YAP) in human clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) cell line 786-0. **Methods** LATS1 gene was introduced into 786-0 cells *via* lentiviral vector. The mRNA expression levels of LATS1 and YAP in Hippo-YAP signaling pathway were detected by RT-PCR, while the protein levels were detected by Western blotting. The cell apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry (FCM), and the cell proliferation inhibition was assayed by cell proliferation and toxicity detection reagent (cell counting kit-8). **Results** After 786-0 cells

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(30972999);重庆市卫生局基金(2013-2-082)
[**通信作者**] 何 江,E-mail: hj594967383@sina.cn
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1406.014.html(2015-03-27)

were transfected with LATS1 gene, the expression of LATS1 at mRNA and protein levels was significantly increased ($P<0.05$), while the expression of YAP at mRNA and protein levels was markedly decreased ($P<0.05$). After lentiviral-mediated LATS1 overexpression, the cell cycle was arrested at G_1 phase ($P<0.05$), the cell proliferation was obviously inhibited ($P<0.05$), and the cell apoptosis was increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Lentivirus-mediated LATS1 overexpression down-regulates the expression of YAP, inhibits the cell proliferation of 786-0 cells, induces the cell apoptosis and blocks the cell cycle at G_1 phase. The occurrence and development of RCC may be associated with expression disorder of LATS1 and YAP.

[**Key words**] renal cell carcinoma; lentivirus; Hippo-YAP; LATS1; YAP

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30972999) and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2013-2-082). Corresponding author: He Jiang, E-mail: hj594967383@sina.cn

肾癌(renal cell carcinoma,RCC)是泌尿系统中致死率最高的恶性肿瘤,肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)为其主要类型。每年全世界大约有102 000例患者因肾癌死亡,发病率和病死率占全部肿瘤的2%~3%,其分子特性复杂,发生机制迄今不甚清楚[1-3]。RCC诊断主要依靠形态学和影像学,大部分患者就诊时已经是肿瘤晚期,发展成转移性肾癌(matastatic RCC, mRCC),由于RCC对化疗抵抗,所以mRCC患者病死率高。有研究指出舒尼替尼、索拉菲尼等药物对mRCC疗效较好,能提高患者的生存率,但只对部分患者有效[4-5],RCC主要还是依靠外科手术治疗,晚期治疗非常局限[6]。RCC与大多数恶性肿瘤一样,其发生、发展大多与抑癌基因失活有关,因此通过慢病毒介导抑癌基因的表达是常用的肾癌治疗方法之一。

大肿瘤抑制基因-1(large tumor suppressor gene 1, LATS1)最早采用基因嵌合体筛选法(genetic mosaics)从黑腹菌属果蝇中发现,编码保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,是Dbf2相关核蛋白(nuclear Dbf-2-related,NDR)激酶家族成员[7]。LATS1位于染色体6q24-25,开放阅读框架约3 393 bp大小,编码1 130个氨基酸,相对分子质量大小约126.87×10^3,与LATS2在结构和功能上高度相似,是Hippo-YAP信号通路中关键因子之一[8]。研究发现抑癌基因LATS1在星形细胞瘤[9]、乳腺癌[10]、头颈部鳞状细胞癌[11]、结直肠癌[12]、宫颈癌[13]、胃癌[14-15]、皮肤癌[16]、转移性前列腺癌[17]等多种肿瘤中表达降低。Hao等[18]在人正常乳腺上皮细胞系MCF10A中过表达LATS1可降低下游癌基因Yes-相关蛋白(Yes-associated protein,YAP)诱导的上皮细胞间质化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)、软琼脂糖克隆形成、细胞迁移和锚地性生长等,证实LATS1能抑制肿瘤发生。本研究将通过慢病毒过表达方式在肾癌细胞系786-0细胞中上调LATS1表达,探讨其对肾癌细胞生物学功能及下游癌基因YAP的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人肾癌细胞系786-0购自ATCC,RPMI1640培养基、胎牛血清均购自Gibco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,胰蛋白酶购自Sigma公司,总RNA提取试剂RNAiso、逆转录试剂盒及*Taq*酶购自TaKaRa大连宝生物工程有限公司,兔抗人LATS1、YAP抗体购自Santa Cruz公司,兔抗人β-actin抗体、HRP标记羊抗兔IgG、RIPA蛋白裂解液等试剂均购自上海碧云天公司,细胞增殖/毒性试剂(cell counting kit-8,CCK-8)试剂购自广州奕源生物公司。

1.2 细胞培养

786-0细胞用含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基,在5% CO_2、37 ℃、饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 过表达LATS1慢病毒载体感染786-0细胞

培养786-0细胞,待处于对数生长期时,以每孔2×10^4细胞数接种6孔板,实验分为3组:对照组(control group);空病毒组(mock virus group);LATS1感染组(lentiviral-LATS1 group)。置于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养。24 h后,弃掉培养液,每孔加新鲜培养液1 mL,病毒稀释后以感染复数(multiplicity of infection, MOI)值60的病毒数量加入培养孔中,继续培养12 h后弃去培养液,换新鲜培养液继续培养,每天常规换液,培养96 h,正置荧光显微镜下观察荧光表达情况,感染效率大于80%认为感染成功,转至培养瓶继续培养。

1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

用RNAiso Plus按RNA提取试剂盒说明书提取对照组、空病毒组、LATS1感染组细胞总RNA,用UV分光光度计检测RNA浓度后,将各组RNA浓度调成一致,并取1 μg RNA模板,按逆转录试剂盒反转录RNA

为cDNA,反应体系10 μL,37 ℃孵育15 min,85 ℃加热30 s。PCR扩增基因,LATS1上游:5′-CCACCCTACCCAAAACATCTG-3′,下游:5′-CGCTGCTGATGAGATTTGAGTAC-3′,产物长度302 bp;YAP上游:5′-TGAACAAACGTCCAGCAAGATAC-3′,下游5′-CAGCCCCCAAAATGAACAGTAG-3′,产物长度165 bp;GAPDH上游:5′-ACCACCATGGAGAAGGCTGG-3′,下游5′-CTCAGTGTAGCCCAGGATGC-3′,产物长度528 bp,引物均由TaKaRa大连宝生物工程有限公司合成,扩增条件为95 ℃ 5 min,之后95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共30个循环,最后72 ℃ 5 min。RT-PCR产物经3%琼脂糖凝胶电泳,以LATS1或YAP与GAPDH条带密度比值表示LATS1或YAP mRNA的相对表达水平。

1.5 Western blot检测LATS1和YAP蛋白表达

用RIPA裂解液加1% PMSF分别提取对照组、空病毒组、LATS1感染组的细胞总蛋白,BCA测定上清液蛋白浓度。加上1/4体积的蛋白上样缓冲液loading buffer,100 ℃变性10 min。配制SDS-聚丙烯酰胺分离胶和积层胶,加Tris甘氨酸电泳缓冲液,每孔加等量变性蛋白约50 μg,SDS-PAGE电泳后转于PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h。加入一抗(抗LATS1 1∶150,抗YAP 1∶200,抗β-actin 1∶500)4 ℃过夜,TBST洗膜,3次/10 min,再加入辣根过氧化酶标记二抗(1∶5 000),37 ℃ 2 h,TBST洗膜,3次/10 min,ECL显影,暗室下凝胶成像仪曝光,以LATS1或YAP与β-actin条带密度比值表示LATS1或YAP蛋白相对表达水平。

1.6 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测凋亡及其周期

取对数生长期786-0细胞经0.25%胰酶消化后,重新接种于培养瓶(细胞密度4×10^4/mL),分为对照组、空病毒组、LATS1感染组,感染96 h后消化细胞并调整细胞密度为1×10^6/mL。PBS冲洗2次,离心后加入1 mL PBS吹打均匀,分别加入Annexin-V和PI,室温避光孵育15 min,测定各组细胞凋亡率。按前述方法将细胞离心后,加入1 mL 70%预冷无水乙醇,4 ℃固定过夜,PBS清洗后在浓度为1% RNase水浴10 min,加入碘化丙啶(PI)室温避光染色30 min,3 000 r/min 8 min,以生理盐水重悬后,检测各组细胞周期。

1.7 CCK-8检测增殖

将生长良好的786-0细胞接种于96孔平底培养板,每孔100 μL培养液种植2×10^3个细胞,分为对照组、空病毒组、LATS1感染组。每24、48、72、96、120小时,加入CCK-8溶液10 μL,继续孵育2 h。用酶标仪在450 nm波长处测定光密度值[$D(450)$],并计算细胞增殖抑制率(inhibitory rate, IR):IR=[1−实验组$D(450)$/对照组$D(450)$]×100%。

1.8 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件,实验数据为计量资料,用$\bar{x}\pm s$表示,两两组之间比较采用独立样本t检验,多组间单因素分析采用单因素方差分析。检验水准$\alpha=0.05$(双侧)。

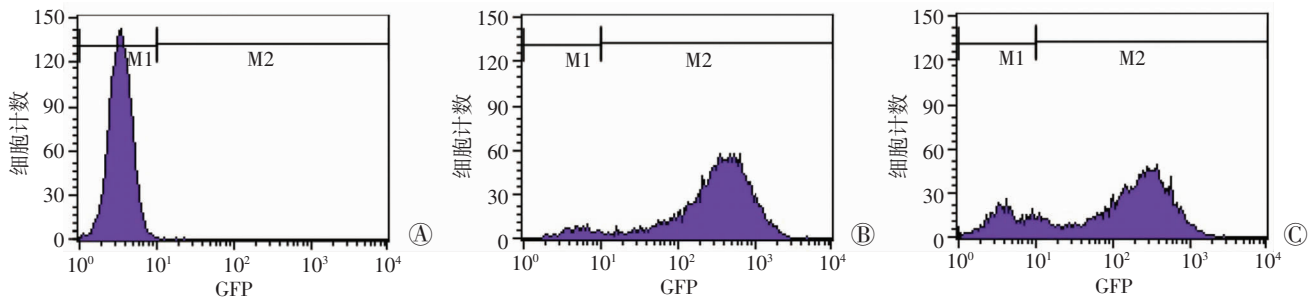
2 结果

2.1 慢病毒感染LATS1后检测786-0细胞感染率

慢病毒载体介导LATS1在MOI为60的病毒数量下感染肾癌786-0细胞96 h后,用FCM检测感染效率,结果显示:对照组为0.09%,空病毒组为96.36%,LATS1感染组为83.27%(图1),说明慢病毒感染成功。

2.2 慢病毒感染获得稳定过表达LATS1的786-0细胞系

慢病毒介导LATS1感染786-0细胞96 h后荧光显微镜下观察荧光表达情况,空病毒组可见大量的绿色荧光蛋白表达,细胞生长良好;LATS1感染组细胞绿色荧光蛋白相对较少(图2),转入培养瓶中持续培养,建立稳定细胞系。



M1:未感染病毒的786-0细胞;M2:感染病毒后的786-0细胞

A:对照组;B:空病毒组;C:LATS1感染组

图1 FCM检测786-0细胞感染效率

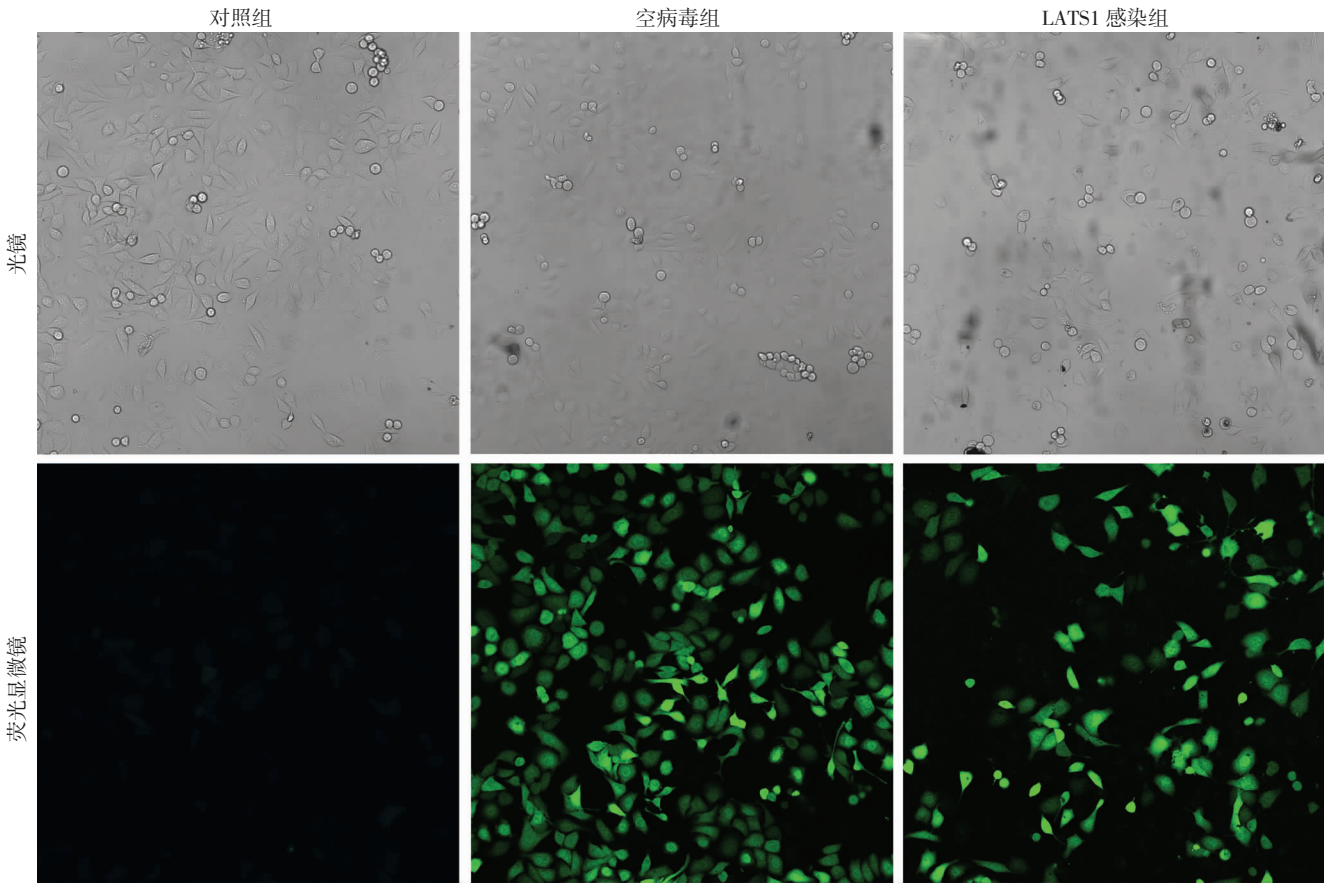


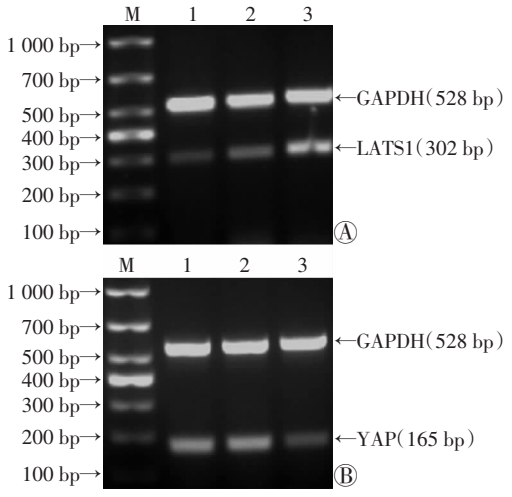
图2 光镜和荧光显微镜检测各组细胞绿色荧光蛋白的表达 （×200）

2.3 RT-PCR检测细胞感染前后LATS1和YAP mRNA表达情况

琼脂糖凝胶电泳结果显示，LATS1感染组中LATS1 mRNA表达灰度比（0.76±0.03）明显高于对照组灰度比（0.43±0.02）及空病毒组灰度比（0.44±0.01）（$P<0.05$），YAP mRNA的表达灰度比（0.41±0.02）明显低于对照组灰度比（0.69±0.01）及空病毒组灰度比（0.70±0.03）（$P<0.05$），而空病毒组与对照组LATS1和YAP mRNA表达水平无明显差异（$P>0.05$，图3），表明慢病毒介导LATS1感染786-0细胞后上调LATS1 mRNA表达，抑制YAP mRNA表达。

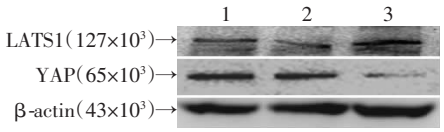
2.4 Western blot检测细胞感染前后LATS1和YAP蛋白表达情况

Western blot检测结果显示，LATS1感染组中LATS1蛋白表达灰度比（0.62±0.01）明显高于对照组灰度比（0.27±0.01）及空病毒组灰度比（0.26±0.01）（$P<0.05$），YAP蛋白表达灰度比（0.29±0.02）显著低于对照组灰度比（0.74±0.03）及空病毒组灰度比（0.73±0.02）（$P<0.05$），而空病毒组与对照组LATS1和YAP蛋白表达水平无明显差异（$P>0.05$，图4），表明慢病毒介导LATS1感染786-0细胞后恢复了LATS1蛋白表达水平并下调YAP蛋白表达。



M：标准；1：对照组；2：空病毒组；3：LATS1感染组

图3 RT-PCR检测各组细胞LATS1（A）和YAP（B）mRNA表达



1:对照组;2:空病毒组;3:LATS1 感染组

图 4 Western blot 检测各组细胞 LATS1 和 YAP 蛋白表达

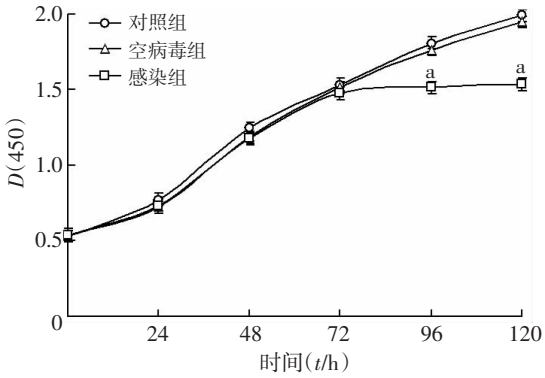
2.5 慢病毒介导 LATS1 过表达对 786-0 细胞凋亡及周期的影响

LATS1 感染组细胞凋亡率(25.69 ± 1.13)% 显著高于其对照组(7.49 ± 1.21)% 和空病毒组(7.58 ± 1.62)(P <0.05),而空病毒组与其对照组凋亡率相比无明显差异(P >0.05,图 5)。FCM 检测结果显示,慢病毒介导 LATS1 感染 786-0 细胞后能诱导细胞凋亡。

LATS1 感染组细胞周期停滞于 G_1 期比例(80.69 ± 2.53)% 显著高于其对照组(59.90 ± 1.13)% 和空病毒组(60.21 ± 0.97)%(P <0.05),而空病毒组细胞周期停滞于 G_1 期比例与其对照组相比无明显差异(P > 0.05,图 6)。FCM 检测结果显示,慢病毒介导 LATS1 感染 786-0 细胞后能阻滞细胞周期于 G_1 期。

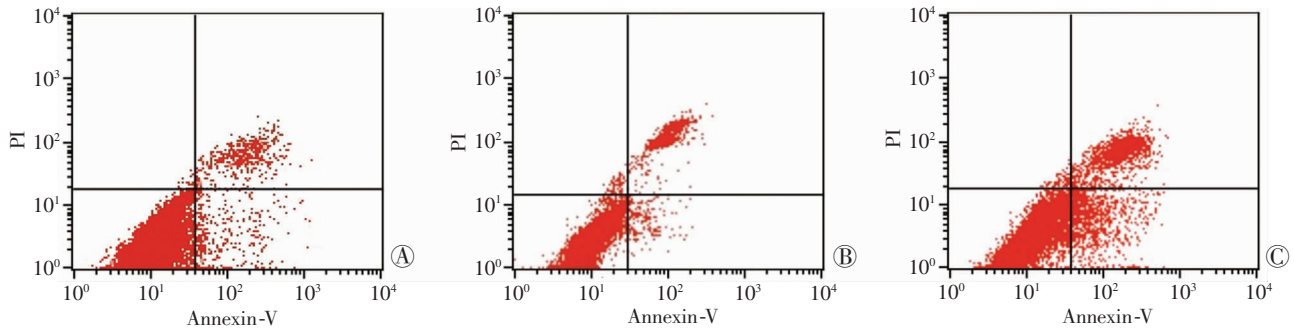
2.6 慢病毒介导 LATS1 过表达对 786-0 细胞增殖的影响

CCK-8 检测结果显示,在慢病毒感染前 3 d,对照组、空病毒组、LATS1 感染组的 D(450)无明显差异(P <0.05),但从第 4 天开始,LATS1 感染组的 D(450)明显低于对照组和空病毒组(P <0.05)。慢病毒介导 LATS1 感染 786-0 细胞 24、48、72、96 h 后,LATS1 感染组细胞增殖抑制率分别为 4.71%、5.43%、3.70%、16.37%、22.85%,差异有统计学意义(P <0.05),表明慢病毒介导 LATS1 感染 786-0 细胞后对其增殖有明显抑制作用(图 7)。



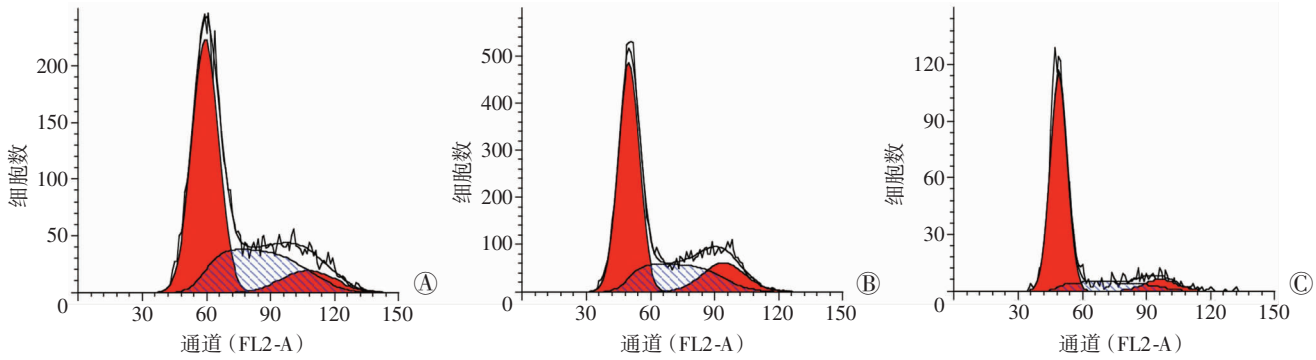
a:P <0.05,与对照组和空病毒组比较

图 7 CCK-8 检测各组细胞的增殖能力



A:对照组;B:空病毒组;C:LATS1 感染组

图 5 FCM 检测各组细胞凋亡结果



A:对照组;B:空病毒组;C:LATS1 感染组

图 6 FCM 检测各组细胞周期结果

3 讨论

Hippo-YAP 信号通路被证明与肿瘤的发生有关，核心因子包括 Mast1/2、WW45、Lats1/2、Mob1 和 YAP，彼此之间相互影响[19]，任何一个核心因子发生改变，将会导致组织和器官失控性生长，进而引发肿瘤。研究表明缺失 LATS1 会导致胶质瘤[8]、宫颈癌[13]、胃癌[14]、皮肤癌[16]、转移性前列腺癌[17]、肾癌[20]等肿瘤的发生，目前 LATS1 在肾癌中的抑癌机制尚不清楚。

本研究通过慢病毒介导 LATS1 过表达，以 MOI 值为 60 病毒量感染人肾透明细胞癌细胞系 786-0 96 h，FCM 检测感染效率为 83.27%，在荧光显微镜下可见大量的绿色荧光蛋白表达，表明感染成功。采用 RT-PCR 和 Western blot 检测慢病毒介导 LATS1 感染 786-0 细胞后 mRNA 和蛋白水平，发现上调 LATS1 能降低 YAP mRNA 和蛋白水平，其机制可能是 LATS1 通过 PPXY 模体与 YAP 的 WW 域相互作用使 YAP 的 HXRXXS 模体磷酸化，从而在 S127 位点直接磷酸化 YAP，磷酸化 YAP 通过与 14-3-3 蛋白和泛素化依赖的相互作用导致其被抑制在细胞质中，从而抑制 YAP 进入细胞核，导致其转录功能受到抑制[21]。此外，LATS1 也能在 S381 位点磷酸化 YAP，引起沉默的酪蛋白激酶 1（casein Kinase 1，CK1）连续磷酸化，聚集泛素因子 E3，继而降解 YAP[22]。

细胞增殖与凋亡的动态平衡维持着机体的稳态，然而肿瘤的发生往往与细胞凋亡受到抑制有关[23]，因此，我们采用 FCM、CCK-8 检测各组细胞凋亡和增殖抑制情况，结果显示 LATS1 感染组凋亡率明显高于空病毒组和对照组，细胞增殖受到明显抑制并呈时间依赖性。Xia 等[24]研究发现上调 LATS1 基因能促进乳腺癌 MCF7 细胞及肺癌 H460 细胞凋亡、抑制增殖，其机制可能是通过上调 Bax 蛋白水平来实现。Matallanas 等[25]提出上调 LATS1 能诱导细胞凋亡，可能是 LATS1 结合并抑制 Mdm2，增强 p53 表达的稳定性，诱导凋亡并抑制其增殖的缘故。

LATS1 是一个与细胞周期调控家族（dbf2、orb6、cot-1、ndr 和 kpm）有关的因子，参与周期调控[26]，因此我们利用 FCM 检测细胞周期发现 LATS1 感染组停滞于 G_1 期比例显著高于对照组和空病毒组，表明慢病毒介导 LATS1 感染 786-0 细胞后诱导其停滞于 G_1 期。Li 等[27]在研究中发现 3,3′-二吲哚甲烷（3,3′-diindolylmethane，DIM）能够上调 LATS1 的表达并诱导人胃癌细胞系 SNU-1 和 SNU-484 停滞于 G_1 期，机制可能是 DIM 通过 Mst1/2-LATS1-Mob1 复合体激活 Hippo 信号通路导致 YAP 磷酸化。

综上所述，本研究通过慢病毒介导 LATS1 过表达能够下调 YAP 基因表达，抑制 786-0 细胞增殖、促进其凋亡并诱导 G_1 期阻滞。LATS1 的抑癌机制可能是通过抑制 YAP 来引起肾癌细胞生物学功能改变，抑制肾癌的进展，因此，深入探讨 LATS1 的抑癌机制有望为肾癌的诊断和治疗提供新的方向。

参考文献：

[1] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma[J]. Nature, 2013, 499(7456): 43-49.

[2] Junker K, Ficarra V, Kwon E D, *et al*. Potential role of genetic markers in the management of kidney cancer[J]. Eur Urol, 2013, 63(2): 333-340.

[3] Siegel R, Ward E, Brawley O, *et al*. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4): 212-236.

[4] Motzer R J, Hutson T E, Tomczak P, *et al*. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(22): 3584-3590.

[5] Chouhan J D, Zamarripa D E, Lai P H, *et al*. Sunitinib (Sutent): a novel agent for the treatment of metastatic renal cell carcinoma[J]. J Oncol Pharm Pract, 2007, 13(1): 5-15.

[6] Linehan W M, Rathmell W K. Kidney cancer[J]. Urol Oncol, 2012, 30(6): 948-951.

[7] Justice R W, Zilian O, Woods D F, *et al*. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation[J]. Genes Dev, 1995, 9(5): 534-546.

[8] Ji T, Liu D, Shao W, *et al*. Decreased expression of LATS1 is correlated with the progression and prognosis of glioma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 31: 67.

[9] Jiang Z, Li X, Hu J, *et al*. Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of LATS1 and LATS2 in human astrocytoma[J]. Neurosci Res, 2006, 56(4): 450-458.

[10] Takahashi Y, Miyoshi Y, Takahata C, *et al*. Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive

phenotype in human breast cancers[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(4): 1380 – 1385.

[11] Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, *et al*. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2009, 22(6): 1519 – 1526.

[12] Wierzbicki P M, Adrych K, Kartanowicz D, *et al*. Underexpression of LATS1 TSG in colorectal cancer is associated with promoter hypermethylation[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(27): 4363 – 4373.

[13] Visser S, Yang X. Identification of LATS transcriptional targets in HeLa cells using whole human genome oligonucleotide microarray[J]. Gene, 2010, 449(1/2): 22 – 29.

[14] Zhou G X, Li X Y, 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.

[15] Xu Z P, Zhu J S, Zhang Q, *et al*. A breakdown of the Hippo pathway in gastric cancer[J]. Hepatogastroenterology, 2011, 58(110/111): 1611 – 1617.

[16] Nishio M, Hamada K, Kawahara K, *et al*. Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1a/1b double-mutant mice[J]. J Clin Invest, 2012, 122(12): 4505 – 4518.

[17] Zhao B, Li L, Wang L, *et al*. Cell detachment activates the Hippo pathway *via* cytoskeleton reorganization to induce anoikis[J]. Genes Dev, 2012, 26(1): 54 – 68.

[18] Hao Y, Chun A, Cheung K, *et al*. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP[J]. J Biol Chem, 2008, 283(9): 5496 – 5509.

[19] Nishio M, Otsubo K, Maehama T, *et al*. Capturing the mammalian Hippo: elucidating its role in cancer[J]. Cancer Sci, 2013, 104(10): 1271 – 1277.

[20] 陈柯宏, 李兴森, 何江, 等. LATS1基因去甲基化对人肾癌细胞生物学功能及其Hippo-YAP信号通路的影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(12): 1249 – 1254.

[21] Zhao B, Wei X, Li W, *et al*. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control[J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2747 – 2761.

[22] Grusche F A, Richardson H E, Harvey K F. Upstream regulation of the hippo size control pathway[J]. Curr Biol, 2010, 20(13): R574 – R582.

[23] Salah Z, Cohen S, Itzhaki E, *et al*. NEDD4 E3 ligase inhibits the activity of the Hippo pathway by targeting LATS1 for degradation[J]. Cell Cycle, 2013, 12(24): 3817 – 3823.

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

[25] Matallanas D, Romano D, Al-Mulla F, *et al*. Mutant K-Ras activation of the proapoptotic MST2 pathway is antagonized by wild-type K-Ras[J]. Mol Cell, 2011, 44(6): 893 – 906.

[26] Hori T, Takaori-Kondo A, Kamikubo Y, *et al*. Molecular cloning of a novel human protein kinase, kpm, that is homologous to warts/lats, a Drosophila tumor suppressor[J]. Oncogene, 2000, 19(27): 3101 – 3109.

[27] Li X J, Park E S, Park M H, *et al*. 3, 3′-Diindolylmethane suppresses the growth of gastric cancer cells via activation of the Hippo signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2013, 30(5): 2419 – 2426.

（**收稿**:2014-12-09;**修回**:2015-01-27）

（编辑　邓强庭）