DOI:10.16016/j.1000-5404.201911189

YAP 蛋白在 HER2 阳性乳腺癌拉帕替尼耐药中的作用

陈 鹏[1],徐 婷[1],郭 丹[2],黄佳祎[1] 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室[1];400016 重庆,重庆医科大学附属第二医院三腺外科[2]

[摘要] **目的** 建立乳腺癌拉帕替尼耐药细胞株,探讨 Hippo 通路中 YAP 蛋白在 HER2 阳性乳腺癌细胞拉帕替尼耐药中的作用及机制。**方法** 采用逐步增加剂量与高浓度反复间歇诱导乳腺癌细胞株 Skbr3 对拉帕替尼耐药,耐药株命名为 Skbr3-LR。用拉帕替尼同时处理亲本细胞和耐药细胞株,CCK-8 法检测其耐药指数;结晶紫染色和平板克隆形成实验检测细胞的存活状况;定量 PCR 检测上皮-间质化改变。定量 PCR 及 Western blot 检测 YAP、TAZ 的表达。以维替泊芬阻断耐药细胞株 Skbr3-LR 中 YAP 下游通路的激活,CCK-8 法检测其细胞活性的改变并计算 IC_{50} 值的变化;结晶紫染色检测细胞存活数量的变化。定量 PCR 及 Western blot 检测 YAP 表达的改变。**结果** 与亲本细胞比较,结晶紫染色和平板克隆形成实验结果均显示,耐药株存活细胞数量明显增多。亲本细胞耐药指数为 3.61 μmol/L,耐药株耐药指数上升约 8 倍,为 29.26 μmol/L。PCR 结果显示,与亲本细胞比较,耐药细胞株的上皮标志物 E-cadherin 表达降低,而间质标志物 Twist、Vinemtin 和 N-cadherin 表达上升,YAP/TAZ 表达上升,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 结果显示,耐药细胞株中总 YAP 和磷酸化 YAP 表达均较亲本细胞显著上升($P<0.05$)。以维替泊芬阻断耐药细胞株 YAP 下游通路的激活后,其耐药指数为 2.98 μmol/L,较未处理的 Skbr3-LR 耐药指数下降约 4 倍;其存活细胞数量明显降低,YAP 表达也明显降低($P<0.05$)。**结论** 成功建立了拉帕替尼获得性耐药的乳腺癌细胞模型,其耐药机制可能与 Hippo 信号通路下游的关键效应因子 YAP 表达异常有关。

[关键词] 拉帕替尼;乳腺癌;Hippo;YAP

[中图法分类号] R737.9; R915; R979.1 [文献标志码] A

Role of yes-associated protein in resistance of HER2$^+$ breast cancer to lapatinib

CHEN Peng[1], XU Ting[1], GUO Dan[2], HUANG Jiayi[1] [1]Deptartment of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Thyroid, Pancreatic and Breast Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a lapatinib-resistant breast cancer cell line, and to study the role and underlying mechanism of yes-associated protein (YAP) in Hippo signaling pathway in the process. **Methods** The drug-resistant cell model of human breast cancer was established by gradually increasing the dose of drug and repeated intermittent high concentration inducing. After lapatinib treatment, the parent cell line Skbr3 and the drug-resistant cell line Skbr3- LR were detected by CCK-8 assay for drug resistance index, crystal violet staining and plate colony for cell survival, and quantitative PCR for the expression of epithelial mesenchymal transformation (EMT) markers. The expression of YAP/TAZ at mRNA and protein levels were measured by quantitative PCR and Western blotting, respectively. After verteporfin was used to block the downstream pathway of YAP in Skbr3-LR cells, CCK-8 assay was employed to measure the cell viability to

[通信作者] 黄佳祎,E-mail: 102561@cqmu.edu.cn

obtain IC_{50}, cell crystal violet staining was performed to count the number of survival cells, and the change of YAP expression was be detected by quantitative PCR and Western blotting. **Results** The results of crystal violet staining and plate colony showed that there were more survival cells in the Skbr3-LR cells when compared with the parent Skbr3 cells. The drug resistance index was 3.61 μmol/L in the parent Skbr3 cells, and was increased by 8 times in the drug-resistant Skbr3-LR cells (29.26 μmol/L). Compared with the parent cells , the expression level of the marker of epithelial cells, E-cadherin was decreased, while those of mesenchymal markers, Twist, Vinemtin, N-cadherin, and of YAP/TAZ were increased in the drug resistant cells (all $P<0.05$). And Western blot assay also indicated the enhanced expression of YAP and p-YAP proteins ($P<0.05$). After the Skbr3-LR cells were treated with verteporfin, the IC_{50} to Lapatinib was decreased from 11.25 to 2.98 μmol/L, by 4 times, and there were less survival cells and the expression of YAP was decreased ($P<0.05$). **Conclusion** The lapatinib-resistant model of breast cancer Skbr3-LR cells is successfully established. And the mechanism of cell resistant to lapatinib may be associated with the abnormal expression of YAP protein.

[**Key words**] lapatinib; breast cancer; Hippo; yes-associated protein

Corresponding author: HUANG Jiayi, E-mail: 102561@cqmu.edu.cn

乳腺癌是全球高发的疾病,HER2 阳性是乳腺癌预后不良的独立指标。针对 HER2 的靶向治疗给 HER2 阳性的乳腺癌患者预后带来明显改善。目前针对 HER2 的靶向药物主要包括两大类:①针对胞外结构域的单克隆抗体类,如曲妥珠单抗、帕妥珠单抗及抗体-药物结合体 T-DM1;②针对胞内酪氨酸激酶结构域的酪氨酸激酶抑制剂,如拉帕替尼、诺拉替尼及阿法替尼等。其中曲妥珠单抗作为最早的抗 HER2 抗体,在 HER2 靶向治疗中应用最为广泛和成熟[1]。尽管针对 HER2 的靶向治疗给患者的预后带来了极大改善,但治疗后的继发性耐药或部分患者原发性的耐药仍然是患者获益的瓶颈。拉帕替尼是 2007 年 3 月美国 FDA 批准上市的小分子酪氨酸激酶抑制剂,作为 HER1/HER2 双靶点抑制剂,单药作为一线治疗,有效率可达到 28%。与卡培他滨联合治疗晚期或转移性乳腺癌,可明显延长疾病进展时间和无疾病进展时间。尤其是当其在曲妥珠单抗治疗失败后作为二线药物治疗时,仍具有 8% 的有效率。尽管治疗的效果是令人振奋的,但大部分患者依然会对拉帕替尼的治疗产生耐药[2]。耐药性的产生依然是拉帕替尼治疗失败的主要原因。因此,研究拉帕替尼耐药的机制,为临床治疗和预测提供新的靶向,成为当前急需解决的问题。

YAP 是 Hippo 信号通路中的关键因子。该信号通路通过调节细胞的生长、增殖和凋亡,主要参与调控器官大小和组织再生,在胚胎发育和组织器官形成等过程中具有重要作用。YAP 的表达异常与多种肿瘤的发生、发展及耐药相关。GUJRAL 等[3]研究发现,Hippo 信号通路与吉西他滨等细胞毒性药物的耐药有关;上调 YAP 可引起乳腺癌和卵巢癌细胞对化疗药物紫杉醇和顺铂的耐药性[4-5]。其机制可能与促进 EGFR 的过表达有关[6]。在非小细胞肺癌中,YAP 可促进酪氨酸激酶抑制剂厄洛替尼(erlotinib)耐药的产生,以干扰 RNA 抑制非小细胞肺癌中 YAP 的表达,有利于逆转厄洛替尼的耐药[7]。但在乳腺癌中,靶向 HER2 的酪氨酸激酶抑制剂拉帕替尼耐药中有无 YAP 的异常尚不清楚。因此,本研究采用逐步增加剂量法与高浓度反复间歇诱导的方法诱导乳腺癌细胞株 Skbr3 对拉帕替尼耐药,并利用该耐药细胞株探讨 Hippo 信号通路的关键因子 YAP 在耐药中的作用及机制,为临床对拉帕替尼耐药的治疗提供新的靶点和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

拉帕替尼(lapatinib)购自德诺和生物公司,维替泊芬(vertepovfin)购自美国 Selleck 公司,CCK-8 试剂(CK04)购自日本同仁公司,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO;C2H6SO)购自碧云天生物技术研究所,SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒、逆转录试剂盒均购自 TaKaRa 公司,BCA 蛋白定量试剂盒(00121506)购自康为世纪公司,SDS-PAGE 凝胶速配试剂盒(L00670-50T)购自金斯瑞生物科技公司,抗体均购自 Abways Technology 公司,超敏 ECL 化学发光检测试剂盒

(EL0511005)购自爱必信(上海)生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞株 Skbr3 购自美国 ATCC 公司。用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养,置于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。0.25%胰蛋白酶消化传代,每 3 天传代 1 次,倒置显微镜下观察细胞形态。

1.3 耐药细胞模型的建立

通过药物浓度递增与高浓度反复间歇诱导的方法建立乳腺癌拉帕替尼耐药模型。将 Skbr3 细胞接种于 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,24 h 后待细胞贴壁生长状态良好时加入拉帕替尼药物,作用 48 h 后更换为不含拉帕替尼药物的培养基培养,待细胞生长融合度约为 80%时进行传代处理,再次重复以上加药培养过程。拉帕替尼作用浓度依次为:0.25、0.5、0.75、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0、22.5、25.0 μmol/L。期间间歇使用高浓度冲击(20 μmol/L)。历时 7 个月,Skbr3 细胞基本可以在含拉帕替尼药物浓度为 25.0 μmol/L 的培养基中稳定生长和传代。即耐药模型建立成功,将此耐药细胞命名为 Skbr3-LR。

1.4 CCK-8 分析细胞药物敏感性改变

分别将处于对数生长期的 Skbr3 亲本细胞(Skbr3)和耐药细胞(Skbr3-LR)按 8×10^3/孔接种于 96 孔板,100 μL 培养液,设置 3 个复孔。待细胞完全贴壁后,按倍比稀释依次加入不同浓度的拉帕替尼。加药期间观察细胞形态,48 h 后行 CCK-8 检测。每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL,37 ℃孵育 2~3 h,酶标仪测定波长 450 nm 处光密度值[D(450)]。3 次独立读取后取平均值,绘制细胞增殖曲线,GraphPad Prism 5.0 软件计算各组 IC_{50}。

将处于对数生长期的 Skbr3 耐药细胞接种于 96 孔板,待细胞完全贴壁后,将细胞分为 2 组,一组按倍比稀释依次加入不同浓度的拉帕替尼(Skbr3-LR 组)。另一组同时加入维替泊芬 10 μmol/L(Skbr3-LR+V 组),48 h 后行 CCK-8 检测。方法同上。

1.5 结晶紫染色实验

分别将处于对数生长期的 Skbr3 亲本细胞和耐药细胞接种于 6 孔板,密度约 30%。待细胞贴壁后,分别加入终浓度为 40、80 μmol/L 的拉帕替尼和空白 DMSO 组。培养 3~5 d 后,小心吸弃培养孔中的液体,PBS 洗 2 遍,加入结晶紫溶液常温染色。

将处于对数生长期的 Skbr3 耐药细胞接种于 6 孔板,密度约 30%。待细胞贴壁后,将细胞分为 2 组,一组加入终浓度为 40、80 μmol/L 的拉帕替尼和空白 DMSO 组。另一组同时加入维替泊芬 10 μmol/L,培养 3~5 d 后,结晶紫溶液常温染色。方法同上。

1.6 平板克隆形成实验

同上,将处于对数生长期的 Skbr3 亲本细胞和耐药细胞接种于 6 孔板,密度约 10%。待细胞贴壁后,加入相应药物,每隔 3 d 换液 1 次,并持续维持药物浓度。培养 2 周后,结晶紫染色并进行细胞克隆计数。

1.7 定量 PCR 分析

分别提取对数生长期的 Skbr3 亲本细胞和耐药细胞总 RNA,逆转录获 cDNA。检测两组细胞上皮-间质化指标的改变,YAP/TAZ 及 Cyr61 的表达。

1.8 Western blot 检测

分别提取 Skbr3 亲本细胞、耐药细胞及耐药细胞加维替泊芬处理组总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,按照 30 ng 上样量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后湿转至 PVDF 膜上,用 5%脱脂牛奶 TBST 进行封闭,封闭时间 2 h。封闭结束后加入一抗(YAP、p-YAP)孵育过夜。TBST 漂洗 3 遍后,加入二抗,常温孵育 2 h 后用凝胶成像仪曝光分析条带。

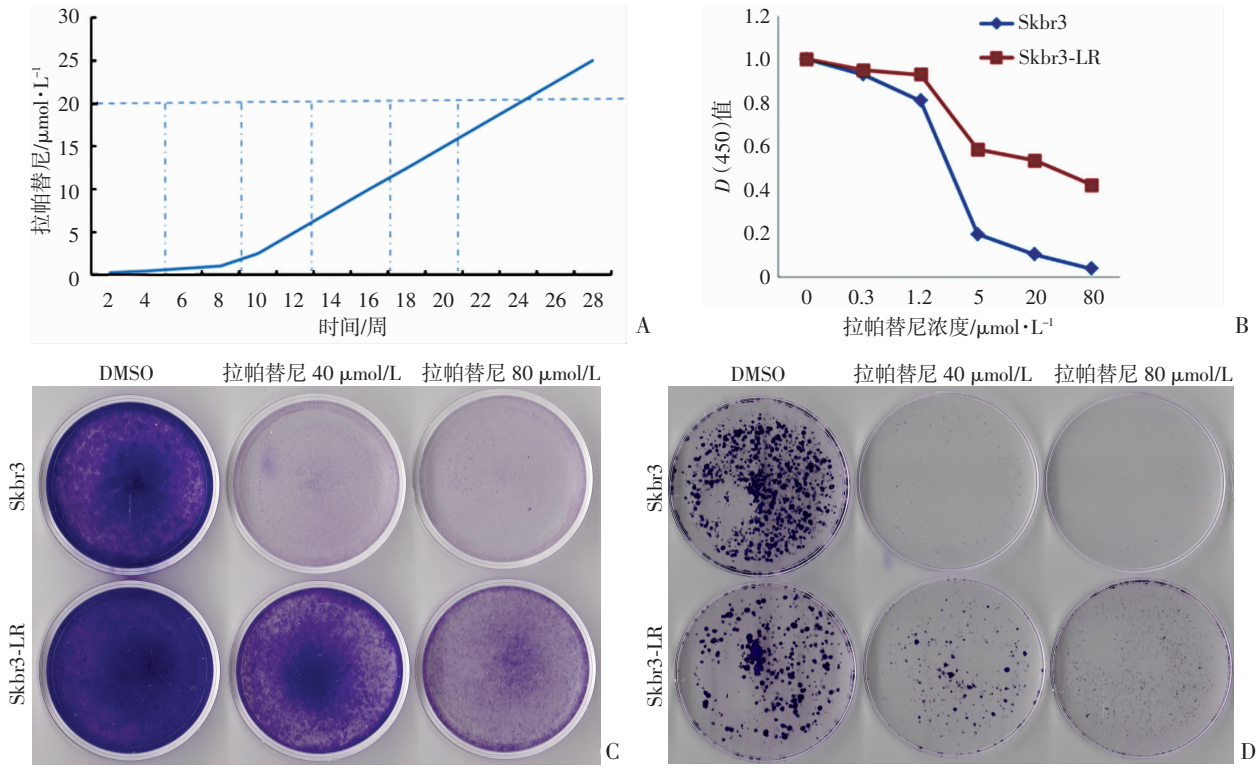
1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 和 SPSS 20.0 进行统计分析。试验均重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组均数比较采取单因素方差分析,两组均数比较采取 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 对拉帕替尼耐药的乳腺癌细胞株模型鉴定

通过药物浓度递增与高浓度反复间歇诱导的方法,建立了较稳定的乳腺癌拉帕替尼耐药模型(图 1A),命名为 Skbr3-LR,结晶紫染色及克隆形成实验结果显示,与亲本细胞比较,在致死浓度拉帕替尼的处理下,耐药模型中存活的细胞数明显增加(图 1C、D)。CCK-8 检测结果显示,随着拉帕替尼浓度的升高,细胞存活的比例逐渐降低;与亲本细胞比较,耐药模型下降的速度较慢,对拉帕替尼的敏感性降低(图 1B)。经 GraphPad Prim 5.0 计算,Skbr3 的拉帕替尼 IC_{50} 为 3.61 μmol/L,Skbr3-LR 的 IC_{50} 为 29.26 μmol/L,耐药倍数约为 8 倍。

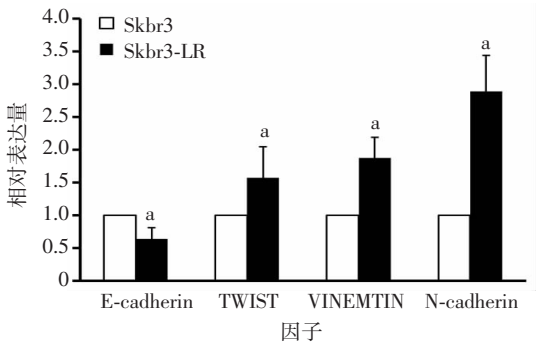


A:以药物浓度递增与高浓度反复间歇诱导的方法建立乳腺癌拉帕替尼耐药模型;B:不同浓度拉帕替尼处理48 h后Skbr3和Skbr3-LR细胞活性;C、D:结晶紫染色及克隆形成实验检测致死浓度拉帕替尼处理Skbr3和Skbr3-LR细胞后存活情况

图1 耐药细胞株Skbr3-LR的鉴定

2.2 定量PCR检测耐药细胞株中上皮-间质转化相关指标的改变

挑取上皮-间质转化常用指标E-cadherin、Twist、Vinemtin和N-cadherin用定量PCR做初步检测。结果可见,与亲本细胞Skbr3比较,耐药细胞株的上皮标志物E-cadherin表达显著降低,而间质标志物Twist、Vinemtin和N-cadherin表达显著上升($P<0.05$,图2)。提示耐药株有上皮间质转化。



a:$P<0.05$,与Skbr3比较

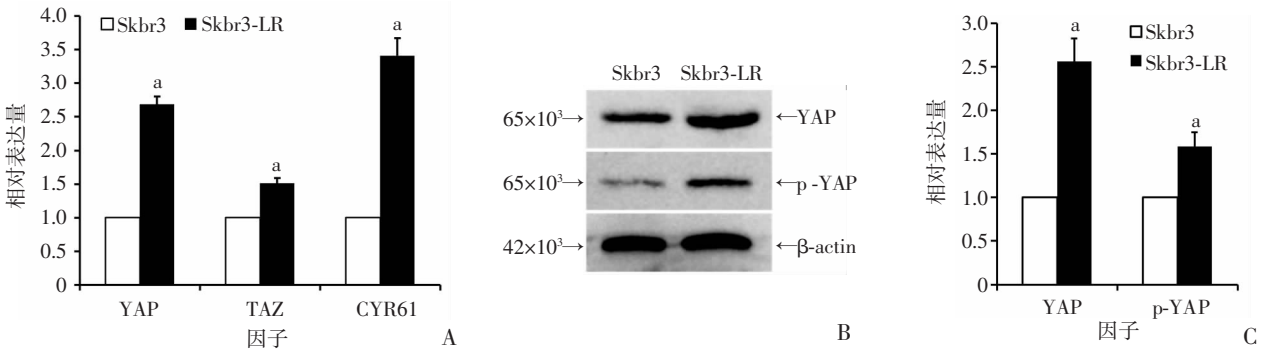
图2 定量PCR检测EMT标志物的表达

2.3 耐药模型Hippo信号通路中关键效应因子的检测

PCR结果显示,与亲本细胞比较,耐药细胞中YAP和TAZ的表达显著上升,YAP的下游基因CYR61表达也显著升高($P<0.05$,图3A)。Western blot结果可见,耐药细胞株中总YAP及磷酸化YAP蛋白的表达均显著上升($P<0.05$,图3B、C)。

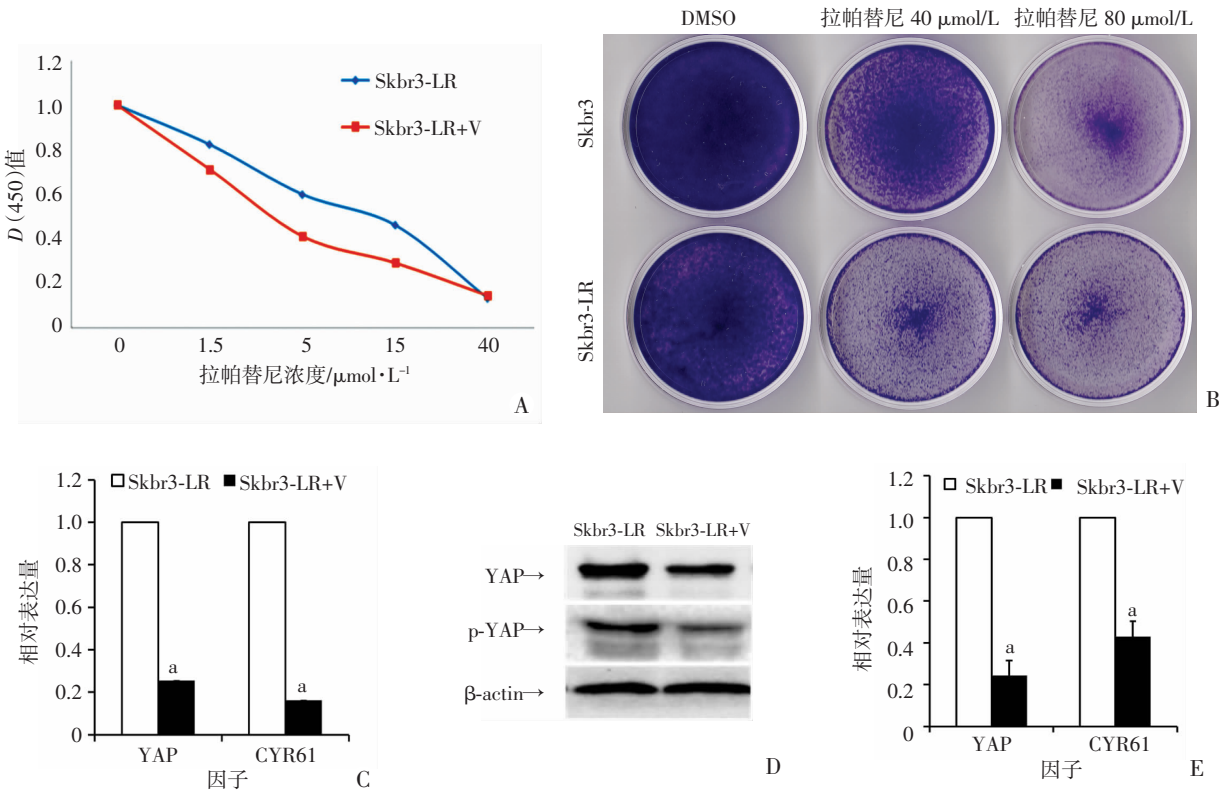
2.4 维替泊芬处理后,耐药细胞株对拉帕替尼敏感性的改变

将耐药细胞株分为2组:拉帕替尼处理(Skbr3-LR)组和维替泊芬+拉帕替尼处理(Skbr3-LR+V)组。CCK-8结果显示,以维替泊芬处理后,耐药株对拉帕替尼的敏感性重新升高,其IC_{50}值从11.25 μmol/L逆转到2.98 μmol/L(图4A)。结晶紫染色结果可见,以维替泊芬处理后,在高浓度拉帕替尼培养基中存活的细胞数量明显降低(图4B)。定量PCR和Western blot结果显示,YAP表达显著降低($P<0.05$,图4C、D)。



A:定量 PCR 检测亲本和耐药细胞株中 YAP/TAZ/CYR61 的表达;B、C:Western blot 检测亲本和耐药细胞株中 YAP 和磷酸化 YAP 的表达及半定量分析　a:$P<0.05$,与 Skbr3 比较

图 3　定量 PCR 和 Western blot 检测 YAP 的表达



A:CCK-8 测定 48 h 后两组细胞活性;B:结晶紫染色检测两组存活细胞;C:定量 PCR 检测细胞中 YAP/CYR61 的表达;D、E:Western blot 检测细胞中 YAP 和磷酸化 YAP 的表达及半定量分析　a:$P<0.05$,与 Skbr3-LR 比较

图 4　维替泊芬对耐药细胞 Skbr3-LR 耐药性的影响

3　讨论

YAP 作为高度保守的 Hippo 信号通路关键效应因子,因其与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关,近年来引起了人们广泛的关注,成为研究的热点。哺乳动物 Hippo 信号通路主要由 4 部分组成:①多重上游信号输入因子,包括 Fat4、Dchs1/2、FRMD6、NF2 和 KIBRA;② 核心激酶级联反应链,包括 MST1/2、hSAV1、LATS1/2 和 MOB1[8];③下游转录共激活因子,包括 YAP/TAZ 和 TEAD[9];④下游调节因子,包括 RASSFs、ASPP1/2 和 Ajuba。在上游信号输入因子的作用下,MST1/2 被活化,然后依次磷酸化 hSAV1、LATS1/2 与 MOB1,并相互结合形成聚合物,促进 YAP/TAZ 磷酸化并停留在细胞质中。一方面,磷酸化

的 YAP/TAZ 与细胞质中的 14-3-3 蛋白结合,抑制 YAP/TAZ 的促增殖和抗凋亡活性,从而促进细胞凋亡;另一方面,磷酸化的 YAP/TAZ 可能被泛素化降解[10]。如果 MST1/2-YAP/TAZ 信号通路被阻断或失活,YAP/TAZ 不能被磷酸化,未被磷酸化的 YAP/TAZ 迁移进入细胞核,并与 TEAD 等转录因子结合,促进下游 Cyclin E、AXL、CTGF 和 Cyr61 等靶基因的表达,从而启动 YAP/TAZ 的促增殖和抗凋亡活性,促进细胞增殖。

在多种肿瘤的发生中,可以观察到 YAP 表达的异常。YAP 在非小细胞肺癌标本中高表达,并且与肿瘤分期和淋巴结转移显著相关[11-12],YAP 对肺癌细胞的调控可能与线粒体应激有关[13]。胃癌中,升高的 SOX9 可促进 YAP 的表达,并增加胃癌细胞的上皮-间质转化[14]。基因敲除 YAP/TAZ 的表达可降低癌细胞的迁移及裸鼠体内肿瘤的形成[15]。乳腺癌的发生与 Hippo 信号通路密切相关。Hippo 通路中 Lats 表达下调可导致乳腺癌侵袭性因素增多,如:肿瘤体积增大,淋巴结转移增多,雌、孕激素受体阴性表达[16]。Lats1/2 的低表达甚至缺失会强化乳腺癌细胞的增殖能力,提高管腔型乳腺癌侵袭性,可能是乳腺恶性肿瘤发生、发展的关键要素之一,有望成为乳腺癌治疗的新靶点[17]。但 Hippo 信号通路关键效应因子 YAP 和 TAZ 在乳腺癌中的表达却充满争议。WANG 等[18]通过免疫组化检测乳腺癌标本,显示乳腺癌中 YAP 表达升高,认为 YAP 是原癌基因。但更多的研究显示,乳腺癌中 YAP 表达较癌旁组织降低,YAP 在乳腺癌中作为抑癌基因存在。我们总结了近年来关于乳腺癌标本中 YAP 或 TAZ 表达的文献,发现多检测总的 YAP 表达,并没有检测 YAP 在胞质和胞核的分布比率。而 YAP 蛋白在胞质和胞核中具有不同的功能,这也是我们下一步要研究的方向。

YAP 蛋白不仅与肿瘤发生相关,也与肿瘤耐药有关。研究发现,不仅在吉西他滨、紫杉醇和顺铂等化疗药物的耐药中 YAP 表达异常,在非小细胞肺癌酪氨酸激酶抑制剂厄洛替尼的耐药中,也可观察到 YAP 上调,以干扰 RNA 抑制非小细胞肺癌中 YAP 的表达,有利于逆转厄洛替尼的耐药[7]。在 ALK 基因重排的肺癌细胞中,靶向 YAP 可逆转 ALK 抑制剂的获得性耐药[19]。同时,YAP 可促进 PD1/PD-L1 的表达,导致肿瘤细胞在免疫治疗中逃逸,也是导致靶向治疗耐药的重要原因[20];在 BRAFi 耐药的黑色素瘤中也观察到类似的结果[21]。但乳腺癌拉帕替尼耐药的机制中有无 YAP 的参与尚不清楚。本研究采用逐步增加剂量与高浓度反复间歇诱导的方法构建了拉帕尼替耐药细胞株,结晶紫染色和克隆形成实验均可见在高浓度的拉帕替尼作用下,耐药株对拉帕替尼的敏感性明显降低;细胞增殖实验显示,随着拉帕替尼浓度的增加,细胞增殖速度明显降低,但与亲本细胞相比,拉帕替尼对耐药株的抑制率降低。证明 Skbr3 耐药株构建成功。本研究结果显示,代表间质化的指标 Twist、Vinemtin 和 N-cadherin 在耐药株中表达上升,而上皮标志物 E-cadherin 在耐药株中表达下降,提示耐药细胞发生了上皮-间质化转变;与亲本细胞相比,耐药株中 YAP 的表达上升明显;进一步 Western blot 检测 YAP 结果与 PCR 结果一致,但和我们预期不同的是不仅总的 YAP 蛋白表达上升,磷酸化 YAP 表达也上升。既往研究显示,磷酸化 YAP 不稳定,不能进入细胞核诱导细胞的增殖,相反,磷酸化的 YAP 很容易在胞质中被泛素化降解。也有研究提示,磷酸化的 YAP 在胞质中有抗凋亡的作用。下一步我们将探讨其原因。维替泊芬可阻断 YAP 蛋白与下游 TEAD 的结合,从而阻止下游通路的激活。研究发现,Cyr61 是 YAP 的下游基因,沉默 YAP 的表达可抑制 Cyr61 的表达水平,从而导致肝细胞的增殖障碍[22]。以维替泊芬处理耐药细胞株后,可以观察到 YAP 表达的下调及下游靶基因 Cyr61 表达的下调,说明维替泊芬可以有效阻断该通路的激活。CCK-8 结果显示,维替泊芬处理后耐药细胞株对拉帕替尼的敏感性重新增加,进一步证实在乳腺癌拉帕替尼耐药的过程中有 YAP 的参与。本研究为临床拉帕替尼耐药的治疗提供了新的靶点和思路。

参考文献:

[1] CAMERON D, PICCART-GEBHART M J, GELBER R D, *et al*. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial[J]. Lancet, 2017, 389(10075): 1195-1205. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32616-2.

[2] PARONI G, FRATELLI M, GARDINI G, *et al*. Synergistic antitumor activity of lapatinib and retinoids on a novel subtype of breast cancer with coamplification of ERBB2 and RARA[J]. Oncogene, 2012, 31(29): 3431-3443. DOI: 10.1038/onc.2011.506.

[3] GUJRAL T S, KIRSCHNER M W. Hippo pathway mediates resistance to cytotoxic drugs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(18): E3729-E3738. DOI: 10.1073/pnas.1703096114.

[4] SONG Q H, MAO B B, CHENG J B, *et al*. YAP enhances autophagic flux to promote breast cancer cell survival in response to nutrient deprivation[J]. PLoS ONE, 2015, 10(3): e0120790. DOI:10.1371/journal.pone.0120790.

[5] JEONG W, KIM S B, SOHN B H, *et al*. Activation of YAP1 is associated with poor prognosis and response to taxanes in ovarian cancer[J]. Anticancer Res, 2014, 34(2): 811-817.

[6] SONG S M, HONJO S, JIN J K, *et al*. The hippo coactivator YAP1 mediates EGFR overexpression and confers chemoresistance in esophageal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(11): 2580-2590. DOI: 10.1158/1078-0432. CCR-14-2191.

[7] HSU P C, YOU B, YANG Y L, *et al*. YAP promotes erlotinib resistance in human non-small cell lung cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(32): 51922-51933. DOI:10.18632/oncotarget.10458.

[8] LIU H R, DU S Y, LEI T T, *et al*. Multifaceted regulation and functions of YAP/TAZ in tumors (Review)[J]. Oncol Rep, 2018, 40(1): 16-28. DOI:10.3892/or.2018.6423.

[9] HONG W J, GUAN K L. 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. DOI:10.1016/j.semcdb.2012.05.004.

[10] HANSEN C G, NG Y L, LAM W L, *et al*. The Hippo pathway effectors YAP and TAZ promote cell growth by modulating amino acid signaling to mTORC1[J]. Cell Res, 2015, 25(12): 1299-1313. DOI:10.1038/cr.2015.140.

[11] XIE M, ZHANG L, HE C S, *et al*. Prognostic significance of TAZ expression in resected non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(5): 799-807. DOI:10.1097/JTO.0b013e318248240b.

[12] WANG Y, DONG Q Z, ZHANG Q F, *et al*. Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Sci, 2010, 101(5): 1279-1285. DOI:10.1111/j.1349-7006.2010.01511.x.

[13] ZHOU J Y, ZHANG S Z, LI Z J, *et al*. Yap-Hippo promotes A549 lung cancer cell death via modulating MIEF1-related mitochondrial stress and activating JNK pathway[J]. Biomedecine Pharmacother, 2019, 113: 108754. DOI:10.1016/j.biopha.2019.108754.

[14] ZHOU H L, LI G Q, HUANG S, *et al*. SOX9 promotes epithelial-mesenchymal transition *via* the Hippo-YAP signaling pathway in gastric carcinoma cells[J]. Oncol Lett, 2019, 18(1): 599-608. DOI:10.3892/ol.2019.10387.

[15] KARPOWICZ P, PEREZ J, PERRIMON N. The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration[J]. Development, 2010, 137(24): 4135-4145. DOI:10.1242/dev.060483.

[16] VISSER S, YANG X L. LATS tumor suppressor: A new governor of cellular homeostasis[J]. Cell Cycle, 2010, 9(19): 3892-3903. DOI:10.4161/cc.9.19.13386.

[17] COOPER J, GIANCOTTI F G. Cancer: a new role for non-canonical Hippo signaling[J]. Cell Res, 2017, 27(4): 459-460. DOI:10.1038/cr.2017.27.

[18] WANG X D, SU L L, OU Q S. Yes-associated protein promotes tumour development in luminal epithelial derived breast cancer[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(8): 1227-1234. DOI:10.1016/j.ejca.2011.10.001.

[19] YUN M R, CHOI H M, LEE Y W, *et al*. Targeting YAP to overcome acquired resistance to ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer[J]. EMBO Mol Med, 2019, 11(12): e10581. DOI:10.15252/emmm.201910581.

[20] LEE B S, PARK D I, LEE D H, *et al*. Hippo effector YAP directly regulates the expression of PD-L1 transcripts in EGFR-TKI-resistant lung adenocarcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(2): 493-499. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.07.007.

[21] KIM M H, KIM C G, KIM S K, *et al*. YAP-induced PD-L1 expression drives immune evasion in BRAFi-resistant melanoma[J]. Cancer Immunol Res, 2018, 6(3): 255-266. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-17-0320.

[22] MOORING M, FOWL B H, LUM S Z C, *et al*. Hepatocyte stress increases expression of YAP and TAZ in hepatocytes to promote parenchymal inflammation and fibrosis[J]. Hepatology, 2019. [Epub ahead of print]. DOI:10.1002/hep.30928.

(收稿:2019-11-22;修回:2019-12-17)

(编辑 汪勤俭)