

# YAP、Claudin与肺癌干细胞

周婵<sup>1,2</sup> 杨俊俊<sup>1</sup> 徐兴祥<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>江苏省苏北人民医院呼吸与危重症医学科, 扬州 225001; <sup>2</sup>大连医科大学, 大连 116044)

**摘要** 肺癌干细胞(lung cancer stem cell, LCSC)是指来源于肺癌的一部分细胞群, 具有自我更新能力, 并影响肺癌发生发展及预后。Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)作为活化Hippo途径的关键转录蛋白在调节器官大小、细胞自我更新、干细胞特性等方面发挥重要作用。闭合蛋白(claudin, Cldn)是一种紧密连接骨架蛋白, 作为YAP的调节剂, 在癌症中经常功能失调。该文将对Cldn、YAP及肺癌干细胞间的相互关系进行综述。

**关键词** YAP; claudin; 肺癌; 肺癌干细胞

## YAP and Claudin Related to Lung Cancer Stem Cell

ZHOU Chan<sup>1,2</sup>, YANG Junjun<sup>1</sup>, XU Xingxiang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Jiangsu Subei People's Hospital, Yangzhou 225001, China;

<sup>2</sup>Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

**Abstract** Lung cancer stem cell refers to a cell population derived from lung cancer with the ability to self-renew, and it will affect the development and prognosis of lung cancer. YAP is a key transcriptional regulatory protein that activates the Hippo pathway and plays an important role in regulating organ size, cell self-renewal and stem cell characteristics. Cldn (claudin) is an integral tight junction protein that acts as a modulator of YAP and is often dysfunctional in cancer. In this paper, the relationship between Cldn, YAP and LCSC will be reviewed.

**Keywords** YAP; claudin; lung cancer; lung cancer stem cell

肺癌干细胞(lung cancer stem cell, LCSC)学说的提出, 对传统的肺癌治疗手段发出了挑战, 也为肺癌的治疗提供了新思路。以往手术切除、放疗在内的肺癌的治疗方法都是通过减少机体肺癌细胞的数量, 达到治疗肺癌的目的, 但一段时间后肺癌又会复发转移。LCSC学说认为, 传统治疗肺癌的方法虽然能够消灭大部分的肺癌细胞, 却无法消灭占总细胞比例很小的LCSC, 尤其是已经转移的LCSC。这就可以解释为什么现有的肺癌治疗方法不够理想, 而只有杀灭LCSC才能真正地根治肺癌。近期研究表明, YAP蛋白(Yes-associated protein)由原癌基因编码<sup>[1]</sup>, 它可以与Hippo通路的下游信号分子结合, 进

而促进下游目的基因的表达, 从而起到促进细胞增殖, 抑制其凋亡的作用, 而闭合蛋白(claudin, Cldn)<sup>[2]</sup>是一种紧密连接骨架(tight junction, TJ)蛋白, 起屏障作用, 调节细胞间渗透率和细胞极性, 在癌症中经常功能失调<sup>[3]</sup>, 目前越来越多的研究表明, YAP、Claudin的表达与LCSC有着密切的联系。

### 1 YAP与Hippo信号通路

Hippo信号通路最初是在果蝇的遗传筛选中发现的一种信号通路, YAP则是活化Hippo途径的关键转录调节蛋白<sup>[4]</sup>。Hippo-YAP信号通路的核心蛋白激酶模块包括MST1/2(mammalian Ste20-like kinases 1/2)、LATS1/2(large tumor suppressor 1/2), 下游转录因子是TEAD1/2(TEA domain 1/2)。当Hippo信号通路被激活时, 核心激酶MST1/2磷酸化, 并激活LATS1/2, 进而使YAP磷酸化, 磷酸化的YAP滞留于

收稿日期: 2019-07-04 接受日期: 2019-11-07

通讯作者: Tel: 18051062315, E-mail: xuxx63@sina.com

Received: July 4, 2019 Accepted: November 7, 2019

\*Corresponding authors. Tel: +86-18051062315, E-mail: xuxx63@sina.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5235>

细胞质中被降解或与14-3-3蛋白结合,实现生长抑制作用,即Hippo-YAP信号通路的激活状态;反之,未被磷酸化的YAP转位到细胞核,与TEAD家族转录因子结合,促进细胞增殖,从而维持细胞干性,此为Hippo-YAP信号通路的失活状态<sup>[5]</sup>。所以,YAP的磷酸化水平和定位被认为起到衡量Hippo通路活性的作用。

## 2 YAP、Cldn与肺癌干细胞和肺癌发生

根据LCSC假说,肺癌的发生、进展及耐药等均是由LCSC造成的,已在LCSC上发现多个干细胞标记物包括CD44、CD133,并具有醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)活性<sup>[6]</sup>。研究表明,YAP与LCSC干性密切相关<sup>[7]</sup>。之前的研究已经证明,肺癌细胞如A549、H520和H1581细胞在被诱导为具有干细胞特性的细胞球的过程中,随着肿瘤干细胞标记物(如CD133、OCT4、Nanog)的表达水平升高,YAP的表达明显高于肿瘤细胞。同时发现,YAP基因的下调抑制了肿瘤细胞的自我更新能力,在体内体外都减缓了肿瘤的生长;相反,YAP的过表达导致了肿瘤的发生发展及转移<sup>[8]</sup>。

有研究表明,极性蛋白3(crumbs3, Crb3)、Ras/Raf/MEK/ERK和PI3K/AKT/MTOR信号通路和Cldn表达有关<sup>[9]</sup>。研究发现,在小鼠的肺中,顶端的Crb3能抑制YAP的核活动,而Crb3的下行调节促进了YAP的核定位和细胞增殖,导致癌变前的上皮细胞的形成。当G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptors, EGFR)和酪氨酸激酶受体(receptor-tyrosine kinase, RTK)被配体激活时,会诱导Ras/Raf/MEK/ERK和PI3K/AKT/MTOR途径,或通过依赖或独立于YAP-Hippo途径核心激酶的机制激活YAP<sup>[10]</sup>。这不仅说明Cldn、YAP的表达是经过精细调控的,也表明它们的调控通路是紧密联系的。

Cldn-3的表达在肺腺癌组织中显著增加,沉默Cldn-3降低了体内肿瘤的进展,且Cldn-3表达与肺腺癌患者的总生存(overall survival, OS)和无病生存期(disease-free survival, DFS)呈负相关<sup>[11]</sup>。在肺腺癌细胞中使Cldn-3表达,导致细胞增殖、迁移和耐药性显著增加。在许多实体肿瘤中,表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)信号通路调控Cldn的表达,用EGF及其抑制剂处理肺腺癌细胞系发现,

Cldn-3的表达依赖于EGFR酪氨酸激酶的活性,在肺腺癌细胞中下调Cldn-3表达可阻止EGF诱导的细胞增殖。这个效应可能是通过EGF激活的MEK/ERK和PI3K-AKT通路实现的,而这个通路同时也影响着YAP的活性。在人肺腺癌中还发现,肺腺癌组织和细胞中Cldn-3的表达与上皮黏钙素(E-cadherin)表达显著相关,这种上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标记物的变化已经在各种癌症中被观察到,并在细胞实验上证实与细胞活力增加和侵袭有关<sup>[9]</sup>。研究也发现,抑制YAP可以降低EMT,而这个效应是YAP通过上调血管E-cadherin形成的<sup>[12]</sup>。

在Cldn家族的众多成员中,Cldn-6几乎不表达于任何器官的已分化细胞中,仅表达于各种类型的胚胎上皮中,其对于人类多能干细胞的存活和自我更新是必不可少的<sup>[13]</sup>。而Cldn-6也可以诱导其他Cldn的表达<sup>[14]</sup>。研究表明,Cldn-6是一种致癌性人类多能干细胞的细胞表面特异性标记物<sup>[15]</sup>。在致癌性人类多能干细胞分化过程中,Cldn-6迅速下调,用一种针对Cldn-6的抗体选择性地去除Cldn-6阳性细胞,消除了人类多能干细胞的致癌潜能<sup>[15]</sup>。这项研究为靶向Cldn-6从而消除肿瘤干细胞提供了依据。

在既往关于非小细胞肺癌的研究中,Cldn-7的表达极其微弱,甚至消失。继续研究Cldn-7的表达与非小细胞肺癌关系发现,与正常肺组织相比,非小细胞肺癌组织中Cldn-7表达强度明显降低,且强度与肺癌细胞分化呈显著正相关,所以Cldn-7被认为是肺癌的一个分化因子<sup>[16]</sup>。虽然在肺腺癌的研究中,尚未发现Cldn-7与YAP的直接联系,但在一项研究中发现,化生乳腺癌细胞中,基质YAP的表达与Cldn-7阳性有关,并且YAP在化生癌中的表达高于三阴乳腺癌<sup>[17]</sup>。这同样表明了YAP与Cldn的表达之间是相互联系的。

小鼠II型肺泡上皮细胞(alveolar type II cell, AT2 cell)为肺上皮具有干细胞特性的细胞,也被认为是人类肺腺癌的来源细胞<sup>[18]</sup>。在小鼠中沉默肺泡上皮高度表达的Cldn-18,能引起AT2细胞的增殖和肺实质扩展。通过激活YAP的核移位来处理缺失Cldn-18的小鼠,小鼠的肺体积也增大,且加速了老龄鼠肺腺癌的进展。反之,Cldn-18的过度表达降低了细胞增殖和YAP的转录活性。研究者认为,Cldn-18可以直接在AT2细胞中启动YAP活性,从而揭示细胞接触器调节

肺泡祖细胞周期和功能。进一步通过一系列小鼠基因模型和体外实验来评估Cldn-18表达对YAP的影响,得出结论: Cldn-18在AT2细胞中,直接与磷酸化YAP和Hippo途径激酶(phospho-large tumor suppressor 1/2, p-LATS1/2)相关联<sup>[19]</sup>,这些结果说明了Cldn-18参与调控YAP活性,从而影响干细胞增殖、肺脏发育和肿瘤发生。

Cldn是与细胞极性和上皮屏障维持有关的紧密连接蛋白。Cldn的失调对细胞分化和增殖有负面影响<sup>[20]</sup>。研究表明, Cldn-1、Cldn-2、Cldn-4、Cldn-5、Cldn-9、Cldn-15与肺癌的发生、发展及预后有着不可忽视的联系<sup>[21]</sup>。

### 3 Cldn、YAP与肺腺癌耐药

EGFR突变在肺腺癌中普遍存在, EGFR酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)作为治疗肺腺癌的靶向药物,仍不可避免地出现耐药。据报道, YAP参与了非小细胞肺癌患者的耐药,在TKI敏感的肺腺癌细胞H1975中,提高YAP的表达导致肺腺癌细胞的耐药<sup>[22]</sup>,同时在TKI诱导的耐药细胞中也检测到YAP的表达增高。用YAP抑制剂后,肺腺癌细胞H1975TKI耐药变成TKI敏感型<sup>[23]</sup>,这些研究揭示了YAP在促进TKI耐药中的重要性,联合YAP抑制剂可能是一种潜在的治疗或延迟TKI耐药发生的新方法。

顺铂是化疗药物中最基础的药物之一,有研究者用肺腺癌细胞A549及A549细胞球(含LCSC)对顺铂耐药的差异进行研究。用顺铂处理A549细胞及A549细胞球,得出A549干细胞球对顺铂的敏感性较低,抑制YAP的表达会升高肺腺癌细胞及肺腺癌细胞球对顺铂的敏感性,同时细胞出现了大量凋亡,而YAP的表达在肺癌干细胞球中也高于肺癌细胞,提示YAP在维持肺腺癌细胞干性的作用,也验证了LCSC高耐药的理论。此外, LCSC中高表达的多耐药蛋白ATP结合转运蛋白G超家族成员2(ATP-binding cassette sub-family G member 2, ABCG2)也为耐药的产生提供了证据<sup>[24]</sup>。

也有小鼠实验显示,耐顺铂人肺腺癌细胞A549中Cldn-1和Cldn-3转录和翻译水平上调,而Cldn-1表达的下降促进耐顺铂的A549细胞凋亡,也降低了耐顺铂的A549细胞的耐药、增殖、迁移和侵袭能力。同时发现,耐顺铂的A549细胞中AKT的磷酸化

水平高于A549细胞。考虑到Cldn-1的调节是通过激活PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B通路导致的耐药产生<sup>[25]</sup>,同样这个通路会影响YAP的活性。

Cldn-2在人肺腺癌细胞A549中高度表达。抗癌药物如顺铂、吉非替尼和阿霉素的细胞毒性在A549细胞中通过Cldn-2敲除而增加。也发现在高表达Cldn-2肺腺癌细胞中, ABCG2也高表达。并且研究发现, Cldn-2敲除是通过降低了ABCG2的启动子活性来影响ABCG2表达<sup>[26]</sup>。所以Cldn-2可能是肺腺癌一个新的治疗靶点。

### 4 结语

YAP对肺癌的发展及干细胞特性的维持非常重要,显而易见Cldn家族影响着YAP的信号通路上的不同环节,但Cldn在YAP哪个环节上起主要作用,每一个Cldn亚型贡献的力量比例,甚至相互间是否存在协同或者拮抗的作用,目前并不清楚。但现有的研究表明, Cldn家族影响着YAP的核定位, YAP的活性与LCSC密切相关,而LCSC的存在也是肺癌无法根治及耐药产生及不良预后的根本原因。现如今已有从不同水平干扰YAP表达的实验研究,但Cldn的表达并不局限于肺部,而在不同病理类型的癌组织中也并不一致,这就为靶向药物来治疗癌症带来了更多的难题。要解决存在的这些问题,就需要更好地了解不同Cldn成员的具体功能,我们希望未来有关Cldn-YAP的深入研究能为肺癌的靶向治疗提供新的理论依据,为肺癌患者带来新的希望。

### 参考文献 (References)

- [1] HUANG H, ZHANG W, PAN Y, et al. YAP Suppresses lung squamous cell carcinoma progression via deregulation of the DNp63-GPX2 axis and ROS accumulation [J]. Cancer Res, 2017, 77(21): 5769-81.
- [2] VAN ITALLIE C M, ANDERSON J M. Claudin interactions in and out of the tight junction [J]. Tissue Barriers, 2013, 1(3): e25247.
- [3] TABARIES S, SIEGEL P M. The role of claudins in cancer metastasis [J]. Oncogene, 2017, 36(9): 1176-90.
- [4] MAUGERI N, FRANCHINI S, CAMPANA L, et al. Circulating platelets as a source of the damage-associated molecular pattern HMGB1 in patients with systemic sclerosis [J]. Autoimmunity, 2012, 45(8): 584-7.
- [5] CHERRETT C, FURUTANI-SEIKI M, BAGBY S. The Hippo pathway: key interaction and catalytic domains in organ growth control, stem cell self-renewal and tissue regeneration [J]. Essays Biochem, 2012, 53: 111-27.
- [6] TAHA Z, JANSE VAN RENSBURG H J, YANG X. The Hippo

- pathway: immunity and cancer [J]. *Cancers*, 2018, doi: 10.3390/cancers10040094.
- [7] LO SARDO F, STRANO S, BLANDINO G. YAP and TAZ in lung cancer: oncogenic role and clinical targeting [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, doi: 10.3390/cancers10050137.
- [8] PRABAVATHY D, SWARNALATHA Y, RAMADOSS N. Lung cancer stem cells-origin, characteristics and therapy [J]. *Stem Cell Investig*, 2018, 5: 6.
- [9] NOTO A, DE VITIS C, PISANU M E, et al. Stearoyl-CoA-desaturase 1 regulates lung cancer stemness via stabilization and nuclear localization of YAP/TAZ [J]. *Oncogene*, 2017, 36(32): 4671-2.
- [10] SONG J, XIE L X, ZHANG X Y, et al. Role of YAP in lung cancer resistance to cisplatin [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3949-54.
- [11] LU T, LI Z, YANG Y, ET al. The Hippo/YAP1 pathway interacts with FGFR1 signaling to maintain stemness in lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2018, 423: 36-46.
- [12] YE X Q, LI Q, WANG G H, et al. Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(4): 820-31.
- [13] ZHANG L, WANG Y, ZHANG B, et al. Claudin-3 expression increases the malignant potential of lung adenocarcinoma cells: role of epidermal growth factor receptor activation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 23033-47.
- [14] NETO F, KLAUS-BERGMANN A, ONG Y T, et al. YAP and TAZ regulate adherens junction dynamics and endothelial cell distribution during vascular development [J]. *Elife*, 2018, doi: 10.7554/eLife.31037.
- [15] GUO J, WU Y, YANG L, et al. Repression of YAP by NCTD disrupts NSCLC progression [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(2): 2307-19.
- [16] SUGIMOTO K, ICHIKAWA-TOMIKAWA N, SATOHISA S, et al. The tight-junction protein claudin-6 induces epithelial differentiation from mouse F9 and embryonic stem cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75106.
- [17] BEN-DAVID U, NUDEL N, BENVENISTY N. Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1992.
- [18] AKIZUKI R, SHIMOBABA S, MATSUNAGA T, et al. Claudin-5, -7, and -18 suppress proliferation mediated by inhibition of phosphorylation of Akt in human lung squamous cell carcinoma [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, 1864(2): 293-302.
- [19] MIN KIM H, KIM S K, JUNG W H, et al. Metaplastic carcinoma show different expression pattern of YAP compared to triple-negative breast cancer [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(2): 1207-12.
- [20] DESAI T J, BROWNFIELD D G, KRASNOW M A. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer [J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 190-4.
- [21] KOTTON D N. Claudin-18: unexpected regulator of lung alveolar epithelial cell proliferation [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(3): 903-5.
- [22] ZHOU B, FLODBY P, LUO J, et al. Claudin-18-mediated YAP activity regulates lung stem and progenitor cell homeostasis and tumorigenesis [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(3): 970-84.
- [23] MAHONEY J E, MORI M, SZYMANIAK A D, et al. The hippo pathway effector Yap controls patterning and differentiation of airway epithelial progenitors [J]. *Dev Cell*, 2014, 30(2): 137-50.
- [24] HEINEMANN U, SCHUETZ A. Structural features of tight-junction proteins [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, doi: 10.3390/ijms20236020.
- [25] LEWIS J B, JIMENEZ F R, MERRELL B J, et al. The expression profile of Claudin family members in the developing mouse lung and expression alterations resulting from exposure to second-hand smoke (SHS) [J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(1): 13-24.
- [26] GHISO E, MIGLIORE C, CICIRIELLO V, et al. YAP-dependent AXL overexpression mediates resistance to EGFR inhibitors in NSCLC [J]. *Neoplasia*, 2017, 19(12): 1012-21.
- [27] LEE T F, TSENG Y C, NGUYEN P A, et al. Enhanced YAP expression leads to EGFR TKI resistance in lung adenocarcinomas [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 271.
- [28] AKIZUKI R, MARUHASHI R, EGUCHI H, et al. Decrease in paracellular permeability and chemosensitivity to doxorubicin by claudin-1 in spheroid culture models of human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5): 769-80.
- [29] MARUHASHI R, AKIZUKI R, SATO T, et al. Elevation of sensitivity to anticancer agents of human lung adenocarcinoma A549 cells by knockdown of claudin-2 expression in monolayer and spheroid culture models [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(3): 470-9.