

YAP1激活Wnt/ β -catenin通路调控细胞间质样干性参与乳腺癌曲妥珠单抗耐药

叶星明¹ 许扬梅¹ 吴秀凤² 刘青¹ 苏莉莉¹ 林晓为¹ 陈莉¹ 黄丽洁¹ 刘沁颖^{1*}

(¹福建医科大学肿瘤临床医学院, 福建省肿瘤医院, 国家卫生健康委员会肿瘤与代谢重点实验室, 福建省肿瘤生物治疗重点实验室, 福州 350014; ²福建医科大学肿瘤临床医学院, 福建省肿瘤医院, 乳腺肿瘤外科, 福州 350014)

摘要 Yes相关蛋白1(Yes associated-protein 1, YAP1)被报道可以与HER4相互作用调控上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 在胃癌曲妥珠单抗耐药的发生中发挥重要作用, 但其是否通过调控细胞发生间质样干性(mesenchymal-like stemness)参与曲妥珠单抗的耐药尚不清楚, 该文探讨YAP1通过参与细胞间质样干性转化在乳腺癌细胞曲妥珠单抗耐药中发挥的作用及其分子机制。建立乳腺癌曲妥珠单抗的耐药细胞株, 通过分别对野生株(wild-type, WT)和耐药株(trastuzumab resistance, TR)转染YAP1的过表达载体(pcDNA3.1-YAP1)和小干扰序列(si-YAP1), 逆转其在野生株和耐药株中的表达情况。采用qRT-PCR检测其上皮-间质性标志物[E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)]和干细胞标志物(CD44和Nanog) mRNA水平的表达情况; 采用Western blot检测E-cadherin、Vimentin、CD44以及Nanog的表达水平; 采用Transwell实验检测细胞侵袭能力; 采用肿瘤细胞成球实验检测细胞自我更新能力和干细胞特征; 采用MTT和平板克隆形成实验检测细胞耐药性和增殖能力。在干扰YAP1的表达后, 使用Western blot以及qRT-PCR检测耐药细胞株中 β -catenin、Cyclin D1以及CD44的表达水平, 进而鉴定Wnt/ β -catenin通路的激活情况。在耐药株中, 下调YAP1可以升高E-cadherin, 降低Vimentin、CD44以及Nanog的表达水平, 抑制细胞间质转化, 降低细胞侵袭、成球能力, 减弱干细胞特征, 增强细胞对曲妥珠单抗的敏感性。反之, 在野生株中, 过表达YAP1蛋白可以降低E-cadherin, 升高Vimentin、CD44以及Nanog的表达水平, 促进细胞间质转化, 提高细胞侵袭和成球能力, 增强干细胞特征, 同时增强细胞对曲妥珠单抗的耐药性。在耐药株中沉默YAP1的表达后, 可降低Wnt/ β -catenin通路的激活水平。我们的研究表明, YAP1可调控乳腺癌细胞间质性和干性特征的表达, 进而参与曲妥珠单抗的耐药, 并且其作用与激活Wnt/ β -catenin通路相关。进一步地, YAP1与HER2阳性乳腺癌患者较差的预后显著相关。

关键词 Yes相关蛋白1; 乳腺癌; 曲妥珠单抗耐药; 间质样干性; Wnt/ β -catenin通路

YAP1 Regulates Breast Cancer Cell Mesenchymal-Like Stemness and Contributes to Trastuzumab Resistance Through Wnt/ β -catenin Signaling Pathway

YE Xingming¹, XU Yangmei¹, WU Xiufeng², LIU Qing¹, SU Lili¹, LIN Xiaowei¹, CHEN Li¹, HUANG Lijie¹, LIU Qinying^{1*}

(¹Fujian Provincial Key Laboratory of Tumor Biotherapy, NHC Key Laboratory of Cancer Metabolism, Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, China; ²Department of Breast Surgical Oncology, Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, China)

收稿日期: 2025-10-27

接受日期: 2026-06-05

福建省卫健委计划(批准号: 2024CXA034、2022CXA028)、福建省自然科学基金(批准号: 2024J011096)、福建省科技创新联合资金项目(批准号: 2024Y9639)和院内资金资助项目(批准号: F2125Y-GSP02-01)资助的课题

*通信作者。Tel: 15806030321, E-mail: liuqinyingbio@163.com

Received: October 27, 2025

Accepted: June 5, 2026

This work was supported by the Fujian Provincial Health Technology Project (Grant No.2024CXA034, 2022CXA028), the Fujian Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.2024J011096), the Joint Funds for the Innovation of Science and Technology, Fujian Province (Grant No.2024Y9639), and the Scientific Research Foundation of Fujian Cancer Hospital (Grant No.F2125Y-GSP02-01)

*Corresponding author. Tel: +86-15806030321, E-mail: liuqinyingbio@163.com

Abstract YAP1 has been reported to be involved in trastuzumab resistance through regulating EMT in gastric carcinoma. However, the role of mesenchymal-like stemness in the TR (trastuzumab-resistant) breast cancer is still elusive. Here, the function and mechanism of YAP1 related mesenchymal-like stemness in trastuzumab-resistant breast cancer were explored. TR breast cancer cell line was established. YAP1 plasmid (pcDNA3.1-YAP1) or YAP1 siRNAs were transfected into SKBr-3 (WT and TR) cells to overexpress or silence YAP1, respectively. The sensitivities of breast cancer cells to trastuzumab were detected by MTT assay. Proliferation was detected by clone formation. Invasiveness capability of cells was detected by Matrigel invasion assays. Stemness of cells was detected by tumor sphere formation. qRT-PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction) and Western blot were applied to detect mRNA and protein expression of YAP1, E-cadherin, Vimentin, CD44, Nanog, β -catenin and Cyclin D1. Compared with NC group, knockdown of YAP1 decreased the resistance of TR cells to trastuzumab ($P<0.01$), capacity of clone formation ($P<0.01$), invasiveness and sphere formation ($P<0.01$ and $P<0.001$). The expression of mesenchymal marker Vimentin and stem cell markers CD44 and Nanog was significantly down-regulated, whereas E-cadherin was significantly up-regulated (all $P<0.05$). Conversely, compared with NC group, overexpression of YAP1 increased the resistance of WT cells to trastuzumab ($P<0.01$), capacity of clone formation ($P<0.001$), invasiveness and sphere formation (all $P<0.001$). The expression of mesenchymal marker vimentin and stem cell marker CD44 and Nanog was significantly up-regulated, whereas E-cadherin was significantly down-regulated (all $P<0.05$). Furthermore, silencing of YAP1 reduced the expression of β -catenin, cyclin D1 and CD44 in TR cells (all $P<0.01$). These data indicated that YAP1 contributes to the mesenchymal-like stemness of breast cancer cell through Wnt/ β -catenin signaling pathway; targeting YAP1 may inhibit trastuzumab resistance of BC. Furthermore, YAP1 leads to poor prognosis in HER2⁺ breast cancer patients.

Keywords Yes associated-protein 1; breast cancer; trastuzumab resistance; mesenchymal-like stemness; Wnt/ β -catenin signaling pathway

人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)是表皮生长因子受体家族(ErbB family)的成员之一, 25%~30%的乳腺癌出现HER2过表达, 这导致了更加恶性的肿瘤表型以及较差的预后^[1]。曲妥珠单抗是针对HER2基因的重组人源化单克隆抗体, 作为HER2阳性乳腺癌治疗的一线药物, 可使患者的无进展生存期显著延长^[2]。然而, 大部分病人在治疗效果初显后会发展为药物耐受并且肿瘤细胞发生远端转移^[3]。

肿瘤细胞干性化已经被证实存在曲妥珠单抗耐药的发生中发挥重要作用^[4,5], 这导致了肿瘤的复发与转移。有报道显示, 大部分的恶性表型发生于具有正常干细胞特征的肿瘤细胞中, 被称为“肿瘤初始细胞”, 这些细胞具有自我更新(self-renew)能力, 推动疾病进展, 并且具有致癌属性, 提示这些肿瘤初始细胞在肿瘤复发过程中的潜在能力^[6-7]。Ai等^[8]首次报道了乳腺癌中肿瘤初始细胞的存在, 这些细胞具有明显的干细胞特征。间充质干细胞(mesenchymal

stem cells, MSCs)是组成肿瘤微环境中的一个重要部分, 作为乳腺肿瘤干细胞(breast cancer stem cell, BCSC)的重要组成部分之一, 其具有促进上皮肿瘤形成和增强药物耐受的能力^[9]。

转录共激活因子YAP1蛋白作为Hippo通路的一个重要调控分子, 可以通过转录调控一系列的基因表达参与信号通路的活化, 这使其不仅在各种癌症的进展中作为致癌基因发挥作用, 而且参与了肿瘤细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和干细胞化的调控^[10-11]。然而, 在乳腺癌曲妥珠单抗耐药的过程中, 其通过调控细胞发生间质样干性转化所发挥的功能还有待探讨。我们在前期的研究中发现, YAP1可以通过miR-18a被LncRNA UCA1所调控, 进而参与乳腺癌曲妥珠单抗的耐药^[12], 这与他人的研究结果一致^[13]。在本研究中, 我们进一步阐述了YAP1在曲妥珠单抗耐药的过程中对细胞间质化以及干性转化的影响, 并对其分子机制进行了初步探讨, 旨在为临床上治疗曲妥珠

单抗耐药提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 细胞系及主要试剂

HER2阳性人乳腺癌细胞系 SKBr-3(wild type, WT)购自美国ATCC, 培养条件为: 将细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640细胞培养液在37 °C、5% CO₂的环境中进行培养。曲妥珠单抗耐药细胞系(trastuzumab resistant, TR)为药物压力筛选细胞系, 诱导方法为: 用含5 µg/mL曲妥珠单抗的细胞培养液RPMI 1640培养SKBr-3, 药物压力筛选耐药细胞克隆6个月, 所得细胞株即被认定为耐药细胞株。

曲妥珠单抗(赫赛汀)(货号: N3742)购自美国Roche公司。胎牛血清及RPMI 1640细胞培养液(货号: 26010074)购自美国Gibco公司。反转录试剂盒(货号: 9109-036-820)购自日本TaKaRa公司。YAP1干扰小片段、干扰对照片段均由上海吉玛基因医学科技股份有限公司合成。YAP1过表达载体pcDNA3.1-YAP1以及对照组pcDNA3.1-control由厦门安捷海拉生物技术公司构建合成。蛋白一抗YAP1(货号: 14074)、E-cadherin(货号: 3195)、Vimentin(货号: 5741)、β-catenin(货号: 8482)、Cyclin D1(货号: 55506)、GAPDH(货号: 2118)、Anti-YAP1(货号: 14074)、阴性对照IgG(货号: 2729)均购自美国Cell Signaling Technology公司。CD4(货号: EPR18668)、Nanog(货号: EPR2027)自英国Abcam公司。羊抗兔二抗(货号: BA1039)均购自武汉博士德生物工程有限公司。Lipofectamine™ 2000(货号: 11668019)购自Invitrogen公司。EZ Magna ChIP™试剂盒(货号: 17-371)购自美国Millipore公司。

1.2 细胞转染与分组

取对数生长期的WT和TR两组乳腺癌细胞并将其分别接种[调整密度为 $(1.8\sim 2.5)\times 10^5$ /孔]至6孔板中, 待细胞长至70%, 更换无血清培养基, 分别加入5 µL的Lipofectamine™ 2000脂质体以及2 µg的表达质粒或RNAi干扰片段, 4 h后更换为含10%的血清细胞培养基。48 h后, 收集细胞用于后续实验。将WT细胞分为过表达对照组(oe-control)和过表达YAP1组(oe-YAP1); 将TR细胞分为干扰对照组(si-control)和干扰YAP1组(si-YAP1)。

1.3 MTT检测细胞增殖能力

在转染48 h后, 将细胞(3 000/孔)接种至96孔板,

加入不同浓度(1~5 µg/mL)的含有曲妥珠单抗的细胞培养液, 血清饥饿过夜在37 °C、5% CO₂的环境中培养, 替换转染培养基为含5 µg/mL MTT的无血清培养基, 37 °C培养4 h后, 吸走MTT培养基并且加入50 µL DMSO, 37 °C孵育10 min, 用酶标仪检测490 nm处每孔的吸光度(D)值, 绘制生长曲线。

1.4 平板克隆形成实验

将细胞以2 000/孔的密度种于6孔细胞培养板中, 分别用含有或不含有5 µg/mL曲妥珠单抗的RPMI 1640细胞培养液在37 °C、5% CO₂的环境中进行培养, 7~14 d至肉眼可见克隆形成时终止培养。甲醇室温固定15 min, 用结晶紫染色液染色20 min后, 移至相机下拍照。

1.5 侵袭实验

将基质胶按1:5的比例用无血清RPMI 1640细胞培养液进行稀释, 后按200 µL/孔加入小室内, 37 °C放置1 h使其聚合。无菌吸走培养瓶中旧培养液, 加入无菌PBS, 轻轻晃动瓶底覆盖细胞层, 吸弃; 重复1~2次。加1 mL胰酶室温消化细胞1~3 min, 加入含血清完全培养基终止消化, 收集细胞悬液室温离心(800 r/min、5 min)后, 用无血清细胞培养液将细胞密度调整为3 000/mL, 加入已经凝固的基质胶上方, 每孔80 µL。取24孔板, 将含20%血清的细胞培养液加入孔中, 每孔400 µL。将小室提起放入24孔板液面上方。将24孔板放入37 °C、5% CO₂的环境中培养48 h。取出小室用甲醇室温固定30 min, 用结晶紫染色液室温染色20 min后, 自来水冲洗, 于显微镜下进行拍照。每个小室选3个视野, 计算平均细胞数。

1.6 肿瘤细胞成球实验

将200 µL基质胶按1:5的比例稀释后加入24孔细胞培养板内, 37 °C放置1 h使其聚合。无菌吸走培养瓶中旧培养液, 加入无菌PBS, 轻轻晃动瓶底覆盖细胞层, 吸弃; 重复1~2次。加1 mL胰酶室温消化细胞1~3 min, 加入含血清完全培养基终止消化, 收集细胞悬液室温离心(800 r/min、5 min)后制成单细胞悬液, 用无血清细胞培养液将细胞密度调整为3 000/mL, 加入已经凝固的基质胶上方, 每孔500 µL, 将24孔板放入37 °C、5% CO₂的环境中进行培养。待细胞定植于基质胶内, 用含5%的基质胶以及适量生长因子的细胞培养基替换之前的上层培养基, 继续培养7~10 d。待观察到单细胞成球时, 消化成球的细胞, 制成单细胞悬液, 再次进行成球培养。7~10 d后, 置

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Sequences of primers for qRT-PCR

基因 Gene	正义引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	反义引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>YAP1</i>	GTA GCC AGT TAC CAA CAC TG	CTG TTC AGG AAG TCA TCT GG
<i>E-cadherin</i>	AGT CAC TGA CAC CAA CGA TAA T	ATC GTT GTT CAC TGG ATT TGT G
<i>Vimentin</i>	AGT CCA CTG AGT ACC GGA GAC	CAT TTC ACG CAT CTG GCG TTC
β -catenin	TCT TGC CCT TTG TCC CGC AAA TCA	TCC ACA AAT TGC TGT GTC CCA C
<i>Cyclin D1</i>	GCT GCG AAG TGG AAA CCA TC	CCT CCT TCT GCA CAC ATT TGA A
<i>CD44</i>	GGT GAA CAA GGA GTC GTC	TTC CAA GAT AAT GGT GTA GGT G
<i>Nanog</i>	GAT TTG TGG GCC TGA AGA AA	TTG GGA CTG GTG GAA GAA TC
<i>GAPDH</i>	CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT	AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC

于显微镜下观察, 计算成球数量并拍照, 每个孔选3个视野, 计算平均成球数。

1.7 qRT-PCR检测相关基因

将各组细胞提取RNA, 用反转录试剂盒合成的cDNA作为模板, qRT-PCR反应体系为25 μ L, 其中包括2 μ L模板, 上下游引物各1 μ L, 9 μ L双蒸水, 2 μ L SYBR Green qPCR预混液。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性10 min; 95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共38个循环。各组基因上下游引物详见表1。

1.8 蛋白质印迹法(Western blot)

将各组细胞提取总蛋白, 定量后每孔上样100 μ g, 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 结束后, 将分离的条带电转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 用5%的脱脂奶粉进行封闭, 分别温育一抗YAP1(1:1 000)、E-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)、CD44(1:1 000)、Nanog(1:1 000)、 β -catenin(1:1 000)、Cyclin D1(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C过夜。洗膜后, 加入羊抗鼠二抗或兔二抗(1:5 000)室温孵育1 h。洗膜后, 电化学发光(electrochemical luminescence, ECL)显影。用凝胶成像仪拍照并分析各条带灰度值, 以GAPDH为内参计算相对表达量。

1.9 染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)

根据EZ Magna ChIP™试剂盒说明书进行染色质免疫共沉淀ChIP检测: 先是细胞被交联, 然后被超声裂解成DNA片段, 使用Anti-YAP1(1:50)和阴性对照IgG抗体(1:50)进行免疫沉淀。最后, 对免疫沉淀的DNA进行qRT-PCR分析。

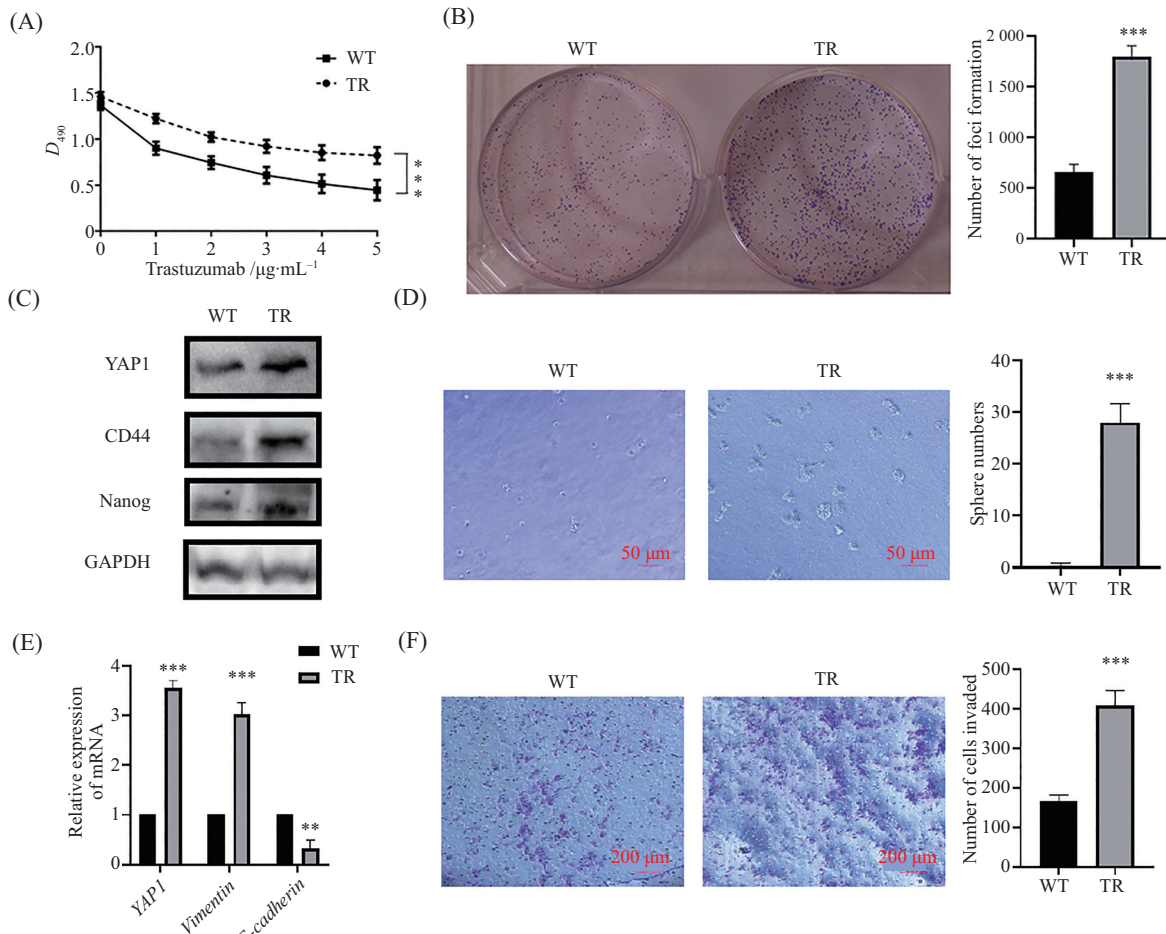
1.10 统计学处理

采用SPSS 23.0进行数据分析和处理, 用Graph-Pad Prism 5.0软件进行图表绘制。每组实验重复3次, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD-*t*检验。两组间比较采用独立样本*t*检验, *P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TR细胞株具有更强的干细胞特征、EMT特征以及更高的YAP1表达水平

MTT实验结果显示, 与乳腺癌细胞野生株SK-Br-3(WT)相比较, 随着细胞培养液中曲妥珠单抗药物浓度的增加, 耐药株(TR)仍然保持了显著的高增殖能力(*P*<0.001)(图1A)。而平板克隆形成实验显示, 与WT比较, TR细胞株显示出明显更强的克隆形成能力(*P*<0.001)(图1B), 表明TR细胞株具有对曲妥珠单抗药物的抵抗能力以及更强的增殖能力。蛋白质印迹实验结果发现, 与WT相比, TR细胞株中干细胞标志物CD44以及Nanog的表达量明显上调(图1C); 肿瘤干细胞成球实验也显示, 与WT相比, TR细胞具有非常显著的成球能力(*P*<0.001)(图1D)。这些结果均提示, TR细胞具有明显的肿瘤干细胞特征。qRT-PCR检测结果表明, 与WT相比, TR细胞的EMT特性标志物*E-cadherin* mRNA水平发生明显下调, 同时波形蛋白(*Vimentin*) mRNA水平发生明显上调(*P*<0.01)(图1E)。侵袭实验结果则发现, 与WT相比, TR细胞株的侵袭力明显增强(*P*<0.001)(图1F)。此外, 蛋白质印迹和qRT-PCR显示, TR细胞株中YAP1的蛋白表达水平以及mRNA表达水平均明显高于WT细胞株(*P*<0.001)(图1C)。综上所述, 与WT株相比, TR细胞



A: MTT实验检测细胞增殖; B: 平板克隆形成实验检测细胞增殖; C: Western blot检测干细胞相关标志物的表达情况; D: 肿瘤球形成实验; E: qRT-PCR检测细胞中EMT标志物mRNA; F: Transwell迁移实验检测细胞侵袭情况。 ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: MTT assays was performed for cell proliferation detection; B: colony formation was used to observe cell proliferation; C: Western blot was used to observe stem cell markers expression; D: tumor sphere formation assay for cells; E: qRT-PCR assay was used to observe EMT markers mRNA expression; F: Transwell assays was used to performed for cell invasion detection. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图1 曲妥珠单抗耐药细胞株的EMT特性、干细胞特性以及YAP1表达水平的检测

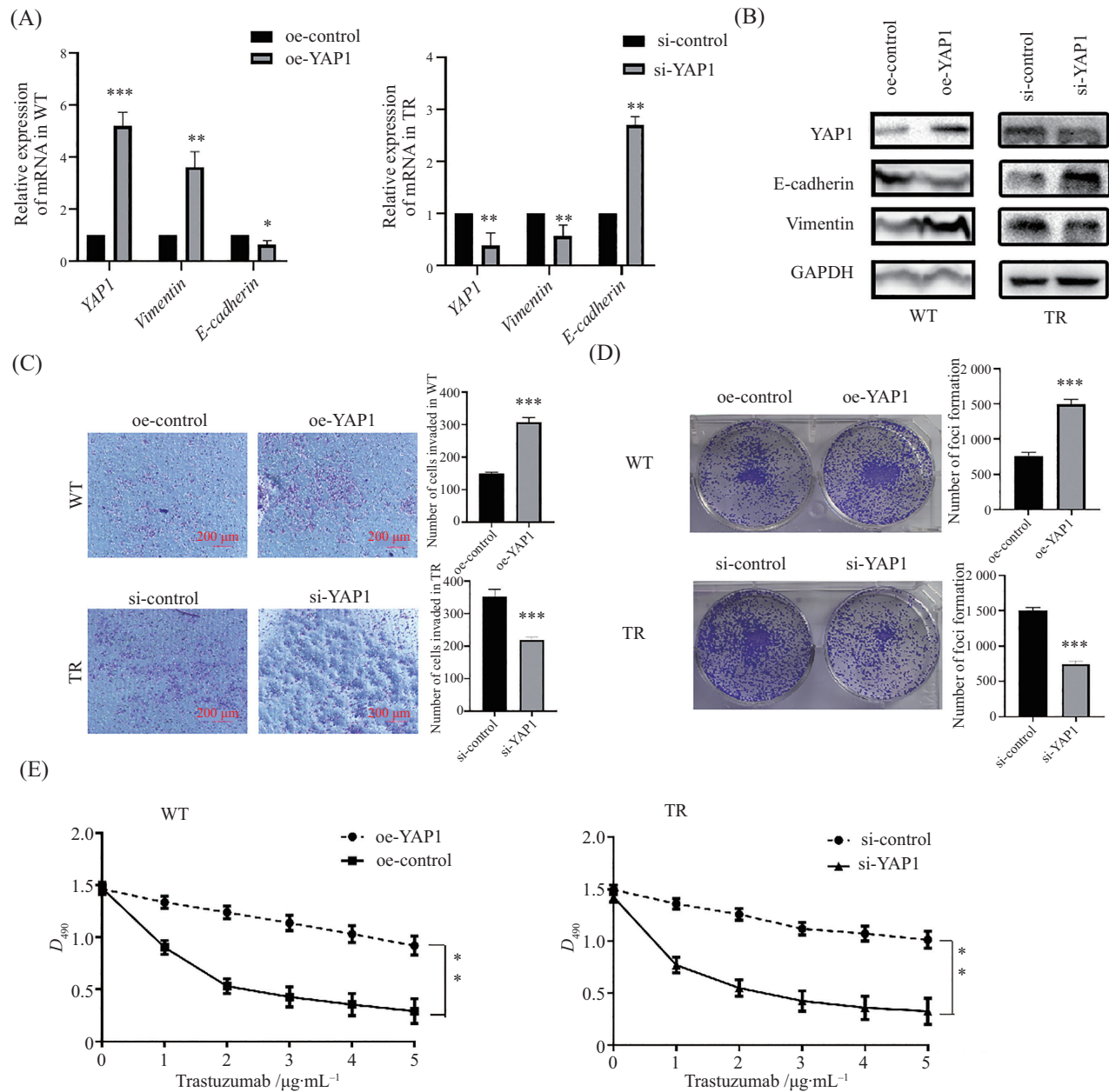
Fig.1 Detection of EMT characteristics, stemness and YAP1 expression levels in TR cell line

株具有更加明显的肿瘤干细胞特征、EMT特征、耐药性以及更高的YAP1表达水平。

2.2 YAP1可以促进乳腺癌细胞的上皮-间质转化、提高侵袭力以及耐药性

对 WT 以及 TR 细胞株分别转染 pcDNA3.1-YAP1 质粒和 YAP1 干涉片段 (si-YAP1)。qRT-PCR 和蛋白质印迹实验结果显示, 与阴性对照组相比, 在 WT 中, 过表达 YAP1 之后, 上皮-间质转化标志物 Vimentin 表达量明显上调而 E-cadherin 表达量明显下调 ($P<0.05$); 而在 TR 中, 抑制 YAP1 的表达之后, 上皮-间质转化标志物 Vimentin 表达量明显下调而 E-cadherin 表达量明显上调 ($P<0.01$) (图 2A 和图 2B)。这些结果提示, YAP1 可以促进细胞发生上皮-间质转化。侵袭实验结果表明, 与阴性对照组相比, 在

WT 中, 促进 YAP1 的表达后, 细胞侵袭数量显著增加 ($P<0.001$); 而在 TR 中, 抑制 YAP1 的表达后, 细胞侵袭数量显著下降 ($P<0.001$) (图 2C), 这说明 YAP1 可以增强细胞的侵袭能力。平板克隆实验显示, 与阴性对照组相比, 在 WT 中, 促进 YAP1 的表达后, 细胞克隆形成数量显著增加 ($P<0.001$); 而在 TR 中, 抑制 YAP1 的表达后, 细胞克隆形成数量显著下降 ($P<0.001$) (图 2D), 提示 YAP1 可以增强细胞的增殖能力。与此同时, MTT 实验结果也证明了, 在 WT 中, 促进 YAP1 的表达后, 细胞对曲妥珠单抗药物的耐受能力显著增强 ($P<0.01$); 在 TR 中, 抑制 YAP1 的表达后, 细胞对曲妥珠单抗药物的耐受能力显著下降 ($P<0.01$) (图 2E)。总结以上研究结果, YAP1 可以促进细胞的上皮-间质转化特性、增强细胞侵袭能力



A: qRT-PCR检测细胞中EMT标志物mRNA; B: Western blot检测细胞中EMT标志物蛋白表达情况; C: Transwell迁移实验检测细胞侵袭情况; D: 平板克隆实验检测细胞增殖情况; E: MTT实验检测细胞增殖情况。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与control组比较。

A: qRT-PCR assay was used to observe EMT markers mRNA expression; B: Western blot was used to observe stem cell markers expression; C: Transwell assays was used to performed for cell invasion detection; D: colony formation was used to observe cell proliferation; E: MTT assays was performed for cell proliferation detection. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group.

图2 YAP1敲低或过表达对乳腺癌细胞株EMT特性、侵袭力以及耐药性的影响

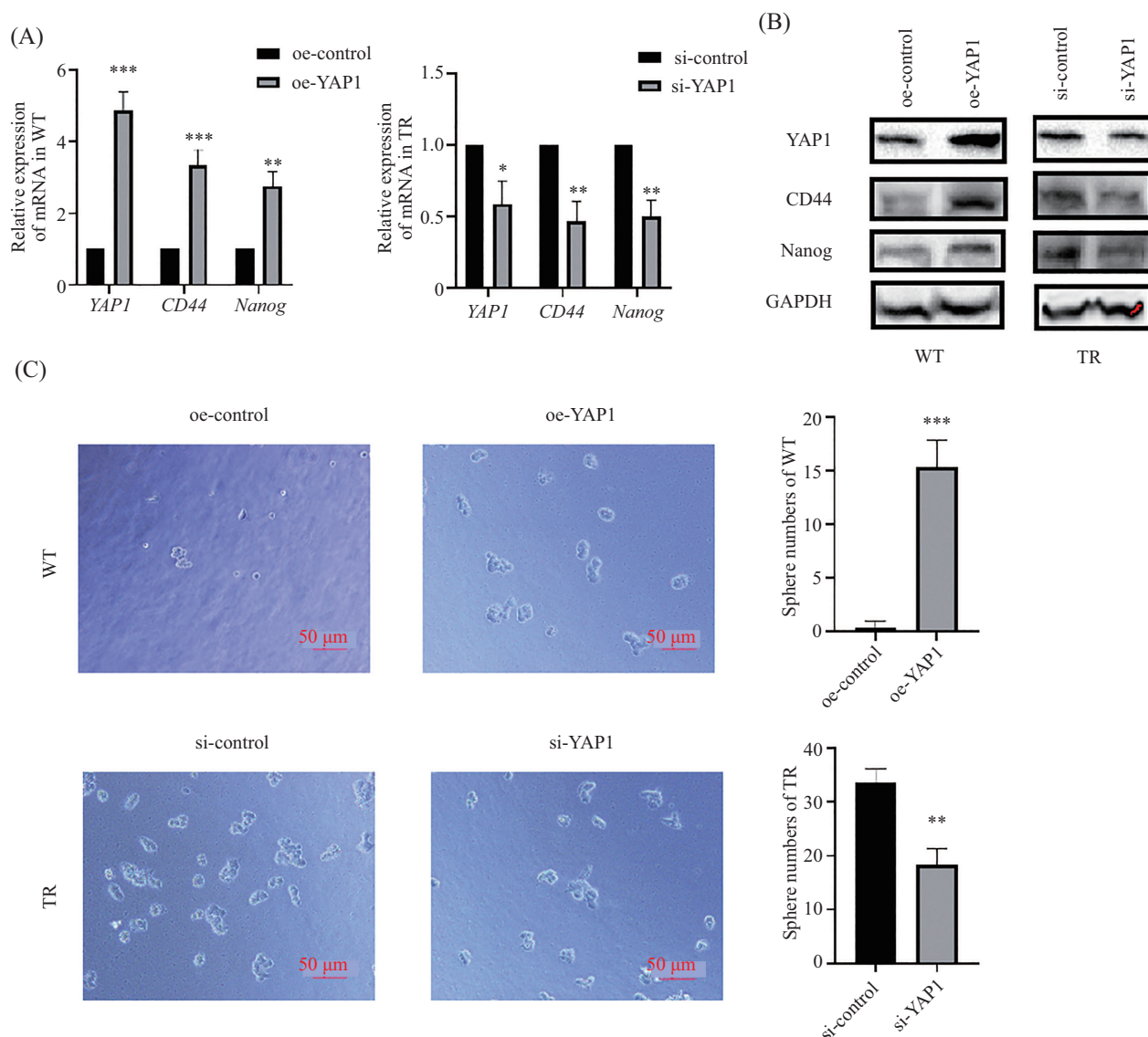
Fig.2 The effect of knockdown or overexpression of YAP1 on the EMT, invasiveness and drug resistance in breast cancer cell lines

以及耐药特征。

2.3 YAP1可以促进乳腺癌细胞的干性特征

对WT以及TR细胞株分别转染pcDNA3.1-YAP1质粒和YAP1干涉片段(si-YAP1)。qRT-PCR和蛋白质印迹实验结果同时表明,与阴性对照组相比,在WT中,过表达YAP1之后,干细胞标志物CD44以及Nanog的表达明显上调($P<0.01$);而在TR中,抑制

YAP1的表达之后,CD44以及Nanog的表达明显下调($P<0.05$)(图3A和图3B)。肿瘤细胞成球实验显示,与阴性对照组相比,在WT中,过表达YAP1之后,细胞成球能力显著增强($P<0.001$),而在TR中,抑制YAP1的表达之后,细胞成球能力显著降低($P<0.01$)(图3C)。总的来说,实验结果揭示,YAP1可以促进乳腺癌细胞发生干细胞转化。



A: qRT-PCR检测细胞中的干细胞标志物mRNA表达情况; B: Western blot检测细胞中的干细胞标志物蛋白表达情况; C: 肿瘤球形成实验。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与control组比较。

A: qRT-PCR assay was used to observe EMT markers mRNA expression; B: Western blot was used to observe stem cell markers expression; C: tumor sphere formation assay for cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

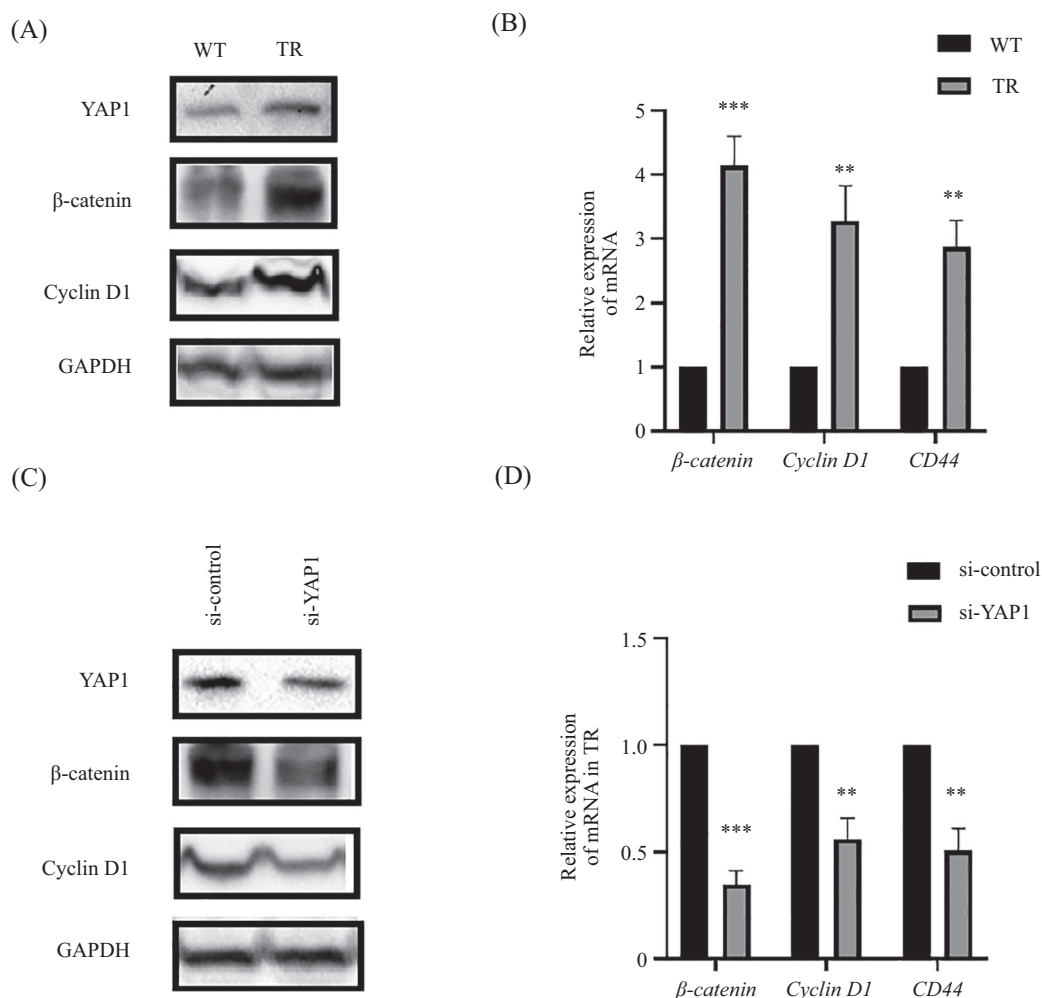
图3 YAP1敲低或过表达对乳腺癌细胞株干细胞特性的影响

Fig.3 The effect of knockdown or overexpression of YAP1 on stemness in breast cancer cell lines

2.4 TR中Wnt/ β -catenin信号通路被YAP1激活

蛋白质印迹实验结果显示,与WT相比,TR细胞中Wnt/ β -catenin通路相关蛋白 β -catenin、Cyclin D1表达量明显升高(图4A)。同时qRT-PCR实验检测显示,除了上述蛋白外,其下游相关蛋白CD44的mRNA水平也发生明显升高($P < 0.01$)(图4B),提示在TR细胞中,Wnt/ β -catenin通路为激活状态。对TR细胞分别转染YAP1干涉片段(si-YAP1)以及阴性对照后,蛋白质印迹实验结果表明,与阴性对照相比,干涉YAP1组Wnt/ β -catenin通路相关蛋白 β -catenin、Cy-

clin D1表达量明显下调(图4C)。同时qRT-PCR实验检测显示,除了上述蛋白外,其下游相关蛋白CD44的mRNA水平也发生明显下调($P < 0.01$)(图4D)。染色质免疫共沉淀(ChIP)实验结果表明,YAP1可与 β -catenin相互作用,同时能直接结合Wnt/ β -catenin通路协同激活关键基因SLC2A1(*Glut1*)^[13]的启动子区域,并上调该基因的转录水平(图5A和图5B)。此外,GEPIA2网站的生物信息学预测显示,在乳腺癌患者中,YAP1与 β -catenin(CTNNB1)的表达呈显著正相关(图5C)。qRT-PCR也显示,在TR细胞中,过表达



A: Western blot检测在WT和TR细胞中Wnt/ β -catenin通路相关蛋白表达情况; B: qRT-PCR检测WT和TR细胞中Wnt/ β -catenin通路相关mRNA表达; ** P <0.01, *** P <0.001, 与WT组比较; C: Western blot检测在TR细胞中下调YAP1的表达后Wnt/ β -catenin通路相关蛋白表达情况; D: qRT-PCR检测在TR细胞中下调YAP1的表达后Wnt/ β -catenin通路相关mRNA表达情况; ** P <0.01, *** P <0.001, 与si-control组比较。

A: Western blot for Wnt/ β -catenin signaling pathway relative protein in WT and TR cells; B: qRT-PCR assay for Wnt/ β -catenin signaling pathway relative mRNA in cells; ** P <0.01, *** P <0.001 compared with WT group; C: Western blot for Wnt/ β -catenin signaling pathway relative protein in TR cells following silencing YAP1 compared with control group; D: qRT-PCR assay for Wnt/ β -catenin signaling pathway relative mRNA in TR cells following silencing YAP1. ** P <0.01, *** P <0.001 compared with si-control group.

图4 YAP1激活了乳腺癌耐药细胞株中的Wnt/ β -catenin信号通路

Fig.4 YAP1 activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway in TR cells

β -catenin, 可以部分逆转由YAP1敲低导致的CD44和Nanog的mRNA表达水平下降的情况(图5D)。综上所述, YAP1激活TR细胞中的Wnt/ β -catenin通路, 并与 β -catenin协同作用促进其下游相关基因的表达。

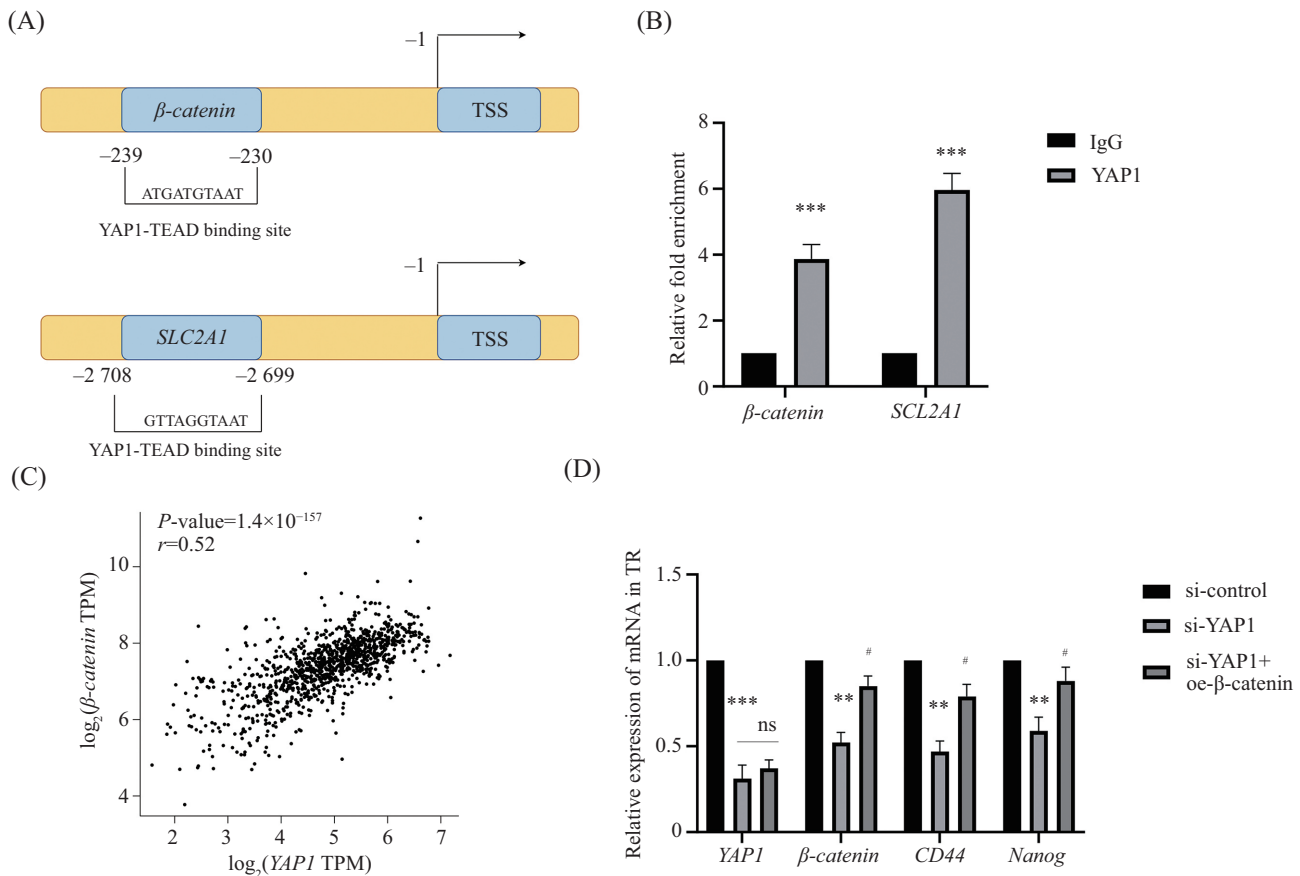
2.5 YAP1在HER2阳性乳腺癌患者中与较差的预后相关

在乳腺癌生存/预后预测网站Kaplan-Meier Plotter对HER2阳性乳腺癌患者的预后进行分析显示, YAP1高表达亚组患者的无复发(relapse-free survival, RFS)以及无远端转移生存期(distance metastasis-free survival, DMFS)较短, 但总生存期(overall survival, OS)和进展后生存期(post-progression survival, PPS)无显著差异(图6A~图6D)。此外, 在HER2阳性乳腺癌患者中, 对曲妥珠单抗治疗有效以及复发患者的临床组织样本进行YAP1免疫组织化学染色, 结果显示, 与有效治疗组织样本相比, 复发组织样本中YAP1表达量更高(图6E)。

sis-free survival, DMFS)较短, 但总生存期(overall survival, OS)和进展后生存期(post-progression survival, PPS)无显著差异(图6A~图6D)。此外, 在HER2阳性乳腺癌患者中, 对曲妥珠单抗治疗有效以及复发患者的临床组织样本进行YAP1免疫组织化学染色, 结果显示, 与有效治疗组织样本相比, 复发组织样本中YAP1表达量更高(图6E)。

3 讨论

曲妥珠单抗耐药以及远端转移是导致HER2阳性乳腺癌病人死亡的主要原因, 其相关的分子机制



A: *β-catenin/SCL2A1*启动子中YAP1结合位点示意图, TSS: 转录起始位点; B: 采用ChIP法检测YAP1在*β-catenin/SCL2A1*启动子区域的结合, IgG作为阴性对照, *** $P<0.001$, 与IgG组比较; C: 使用GEPIA2数据库对BRCA中YAP1与*β-catenin*的相对表达量进行Pearson相关分析; D: 细胞中Wnt/*β-catenin*信号通路相关mRNA的qRT-PCR检测。^{ns} $P>0.05$; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, si-YAP1组vs si-control组; # $P<0.05$, si-YAP1+oe-*β-catenin*组vs si-YAP1组。

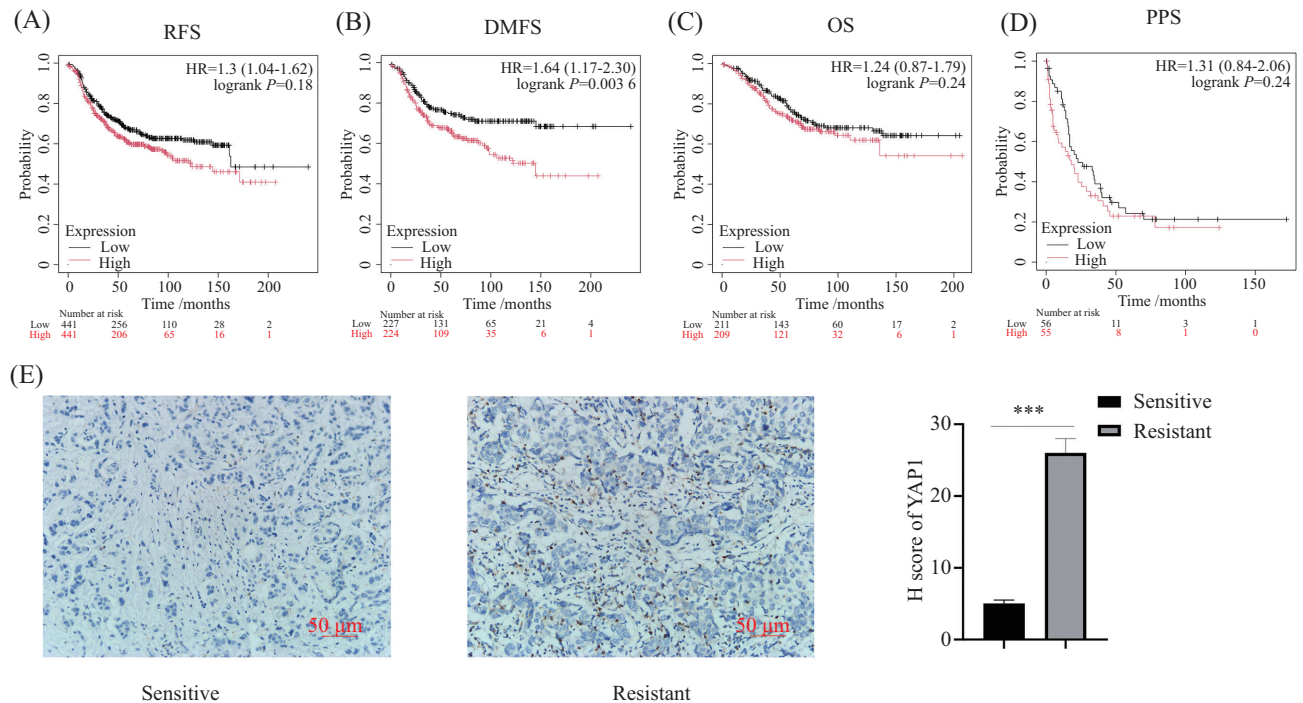
A: the schematic diagram of the YAP1-binding sites in *β-catenin/SCL2A1* promoter, TSS: transcription start site; B: the ChIP assay was used to detect the binding of YAP1 on *β-catenin/SCL2A1* promoter region. IgG was taken as a negative control. *** $P<0.001$ compared with IgG group; C: Pearson's correlation analysis of relative expression levels of YAP1 and those of *β-catenin* determined using GEPIA database in BRCA; D: qRT-PCR assay for Wnt/*β-catenin* signaling pathway related mRNA in cells. ^{ns} $P>0.05$; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, si-YAP1 group vs si-control group; # $P<0.05$, si-YAP1+oe-*β-catenin* group vs si-YAP1 group.

图5 YAP1激活了乳腺癌耐药细胞株中的Wnt/*β-catenin*信号通路
Fig.5 YAP1 activates the Wnt/*β-catenin* signaling pathway in TR cells

已经被部分阐明^[14]。比如:肿瘤细胞HER2表达水平下降,会降低细胞表面受体与曲妥珠单抗的结合亲和力;受体激酶发生变异可持续激活促生长信号级联反应;此外,*PTEN*基因缺失等改变也会重塑胞内信号转导网络,诱发耐药与转移表型^[15]。然而,HER2阳性乳腺癌细胞发生曲妥珠单抗耐药的机制是复杂而多变的,从多个角度和方向去探讨也是阐明和逆转曲妥珠单抗耐药的必然选择。本研究从乳腺肿瘤细胞发生间质化干性的角度出发,探讨了YAP1分子通过调控上皮-间质转化以及干细胞特征来参与曲妥珠单抗的耐药和细胞的侵袭作用,及其潜在的分子机制。

肿瘤干细胞具有复杂的表型以及很强的可塑

性,被证实在肿瘤的发生、复发以及药物耐受方面起着重要的推进作用^[16]。乳腺肿瘤干细胞(breast cancer stem cell, BCSC)分别存在上皮-间质转化(EMT)以及间质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)两种状态。间质样干性BCSC以CD44⁺C24⁺为特征,定植于肿瘤侵袭前端位置,而上皮样乳腺肿瘤干细胞以ALDH⁺为特征,定植于肿瘤中心位置^[17]。参考在正常乳腺组织中对干细胞基底型和管腔型的划分^[18],对两种类型的乳腺癌干细胞的基因表达进行分析,分成上述两种特征亚型。在我们的研究中发现,曲妥珠单抗耐药的乳腺癌细胞除具有间质样干性特征外,还具有较明显的侵袭能力,这与前期研究^[17]对间质样干性BCSC的研究结果相一致。



A~D: 基于YAP1表达的HER2阳性乳腺癌患者Kaplan-Meier生存曲线分析; E: 不同组曲妥珠单抗敏感和复发乳腺癌组织中YAP1免疫组化染色的代表性图像及统计箱形图。*** $P < 0.001$ 。

A~D: Kaplan-Meier survival curve analysis of HER2 positive breast cancer patients based on YAP1 expression; E: representative images of IHC staining for YAP1 in breast cancer tissues with trastuzumab sensitive and recurrence and statistical box plot of different groups. *** $P < 0.001$ 。

图6 YAP1导致HER2阳性乳腺癌患者较差的预后

Fig.6 YAP1 leads to poor prognosis in HER2-positive breast cancer patients

YAP1蛋白已经被证实在人类肿瘤进展中扮演重要的角色^[19]。作为Hippo通路重要的组成部分, YAP1与TAZ协同发挥转录共激活因子功能, 进而激活多种致癌基因^[19], 并且在乳腺肿瘤组织中, 其过表达与病人较低的生存率和较差的预后密切相关^[20]。YAP1被报道可以与HER4相互作用调控上皮-间质转化在胃癌的曲妥珠单抗耐药中发挥作用^[21], 也可以通过YAP1/TEAD的形式激活Hippo通路参与乳腺癌曲妥珠单抗的耐药^[22]。我们在前期的研究中发现, YAP1通过被LncRNA UCA1以及miR-375调控参与了乳腺癌曲妥珠单抗的耐药^[12,23], 但具体机制尚不清楚。我们发现YAP1不仅能够介导乳腺癌细胞对曲妥珠单抗产生耐药, 还可促进肿瘤细胞侵袭、上皮-间质转化, 并诱导细胞获得干细胞样特性。

Wnt/ β -catenin信号通路在肿瘤细胞发生侵袭、转移、上皮-间质转化以及获得干细胞特征过程中发挥重要作用^[24], 并且 β -catenin信号主要调控因子的突变是肿瘤细胞在转移过程中发生上皮-间质转化以及自我更新的关键之一^[25]。Deng等^[26]发现, YAP1通过激活Wnt/ β -catenin信号通路来参与胃癌细胞间

质样干性的发生。而在我们的研究中发现, β -catenin的表达量在TR细胞中显著上升, 并且干扰YAP1表达后, 其表达量也随之下调。此外, 其下游基因CD44以及Cyclin D1的表达量也随之下调。这些结果提示, YAP1可能是通过激活Wnt/ β -catenin信号通路来参与乳腺癌细胞间质样干性的调控的。

本文研究的局限性在于: (1) 临床相关的样本验证相对较少; (2) 缺少动物水平的实验验证; (3) 需要开展更多的生物学实验, 进一步探索YAP1在介导乳腺癌细胞HER2靶向耐药中的分子生物学机制。

综上所述, YAP1作为一个重要的致癌基因以及转录共激活因子, 可以通过对Wnt/ β -catenin信号通路的调控参与乳腺癌细胞的上皮-间质转化、干细胞特征、侵袭以及曲妥珠单抗的耐药。本研究从YAP1调控肿瘤细胞间质样干细胞特性的角度阐释乳腺癌曲妥珠单抗耐药的形成机制, 为曲妥珠单抗耐药的解决提供新的思路和治疗途径。

参考文献 (References)

- [1] Slamon D J, Clark G M, Wong S G, et al. Human breast cancer:

- correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene [J]. *Science*, 1987, 235(4785): 177-182.
- [2] Cobleigh M A, Vogel C L, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 1999, 17(9): 2639-2648.
 - [3] Swain S M, Shastry M, Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future direction [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2023, 22(2): 101-126.
 - [4] Er I, Boe E R. Hedgehog pathway is a regulator of stemness in HER2-positive trastuzumab-resistant breast cancer [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(22): 12102.
 - [5] Qiu Y, Yang L, Liu H, et al. Cancer stem cell-targeted therapeutic approaches for overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer [J]. *Stem Cells*, 2021, 39(9): 1125-1136.
 - [6] Loh J J, Ma S. Hallmarks of cancer stemness [J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(5): 617-639.
 - [7] Li Z, Zhao H, Hu H, et al. Mechanisms of resistance to trastuzumab in HER2-positive gastric cancer [J]. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2024 30, 36(3): 306-321.
 - [8] Ai H M, Wicha M S, Benito H A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(7): 3983-3988.
 - [9] Botzone F R, Giorrello M B, Sanmartin M C, et al. Mesenchymal stem cells and cancer-associated fibroblasts as a therapeutic strategy for breast cancer [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2024, 181(2): 238-256.
 - [10] Jiang Z, Li X, Liu F, et al. Downregulation of HTRA1 promotes EMT and anoikis resistance in colorectal cancer via activation of Hippo/YAP1 pathway by facilitating LATS2 degradation [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2025, 64(8): 1330-1346.
 - [11] Zhang C, Gao L, Zhang Y, et al. Corosolic acid inhibits EMT in lung cancer cells by promoting YAP-mediated ferroptosis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 35: 156110.
 - [12] Zhu H Y, Bai W D, Ye X M, et al. Long non-coding RNA UCA1 desensitizes breast cancer cells to trastuzumab by impeding miR-18a repression of Yes-associated protein 1 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 496(4): 1308-1313.
 - [13] Chen B, Zou J, Xie L, et al. WNT-inhibitory factor 1-mediated glycolysis protects photoreceptor cells in diabetic retinopathy [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2024, 6, 22(1): 245.
 - [14] Derakhshani A, Rezaei Z, Safarpour H, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(4): 3142-3156.
 - [15] Zhao X, Li Y, Zhang H, et al. PAK5 promotes the trastuzumab resistance by increasing HER2 nuclear accumulation in HER2-positive breast cancer [J]. *Cell Death & Disease*, 2025, 16(1): 323.
 - [16] Yang L, Shi P, Zhao G, et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5(1): 8.
 - [17] Varisli L, Zoumpourlis P, Spandidos D A, et al. ALDH1A1 in breast cancer: a prospective target to overcome therapy resistance (Review) [J]. *Oncology Letters*, 2025, 29(5): 213.
 - [18] Huang T, Fan L, Tang J, et al. Advances in research on the carcinogenic mechanisms and therapeutic potential of YAP1 in bladder cancer (Review) [J]. *Oncology Reports*, 2025, 53(1): 10.
 - [19] Mukherjee S, Warden E A, Zhang J. YAP/TAZ: an epitome of tumorigenesis [J]. *Cancer Letters*, 2025, 625(10): 217806.
 - [20] Liu D, Wang X, Qian F, et al. DLAT promotes triple-negative breast cancer progression via YAP1 activation [J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2024, 25(1): 2421578.
 - [21] Qi X, Wang F, Thomas L, et al. Protein tyrosine phosphatase PTPH1 potentiates receptor tyrosine kinase HER2 oncogenesis via a PDZ-coupled and phosphorylation-driven scaffold [J]. *American Journal of Cancer Research*, 2024, 14(12): 5734-5751.
 - [22] Gongzalez A P, Zazo S, Martin A E, et al. The Hippo pathway transducers YAP1/TEAD induce acquired resistance to trastuzumab in HER2-positive breast cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12(5): 1108.
 - [23] 叶星明, 王淋, 贾静, 等. miR-375靶向YAP1调控上皮-间充质转化参与乳腺癌细胞曲妥珠单抗的耐药[J]. *中国癌症杂志*, 2021, 31(1): 20-28.
Ye X M, Wang L, Jia J, et al. miR-375 targeting YAP1 modulates trastuzumab-resistance through EMT in breast cancer cells [J]. *China Oncology*, 2021, 31(1): 20-28.
 - [24] Maurice M M, Angers S. Mechanistic insights into Wnt- β -catenin pathway activation and signal transduction [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2025, 26(5): 371-388.
 - [25] Xue C, Chu Q, Shi Q, et al. Wnt signaling pathways in biology and disease: mechanisms and therapeutic advances [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2025, 10(1): 106.
 - [26] Deng F, Peng L, Li Z, et al. YAP triggers the Wnt/ β -catenin signaling pathway and promotes enterocyte self-renewal, regeneration and tumorigenesis after DSS-induced injury [J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2): 153