

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.09.008

· 基础研究 ·

布托啡诺通过 Hippo/YAP 信号通路影响骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、迁移和侵袭

杜建国, 张迅, 宗士兰, 张明阳, 贾旺华, 刘志东(滕州市中心人民医院 麻醉科, 山东 滕州 277500)

[摘要] **目的:** 探讨布托啡诺(BPH)对骨肉瘤(OS)细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其相关的作用机制。**方法:** 将MG-63细胞分为对照组、YAP抑制剂组(维替泊芬组)和BPH低、中、高浓度组, MTT法、克隆形成实验、FCM术、划痕愈合实验、Transwell实验、qPCR法、WB法和移植瘤实验分别检测处理后各组细胞的增殖活性、克隆形成数、细胞凋亡率、划痕愈合率, 以及上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)mRNA的表达和YAP、TAZ蛋白的表达, 同时观察BPH和维替泊芬对移植瘤生长的影响。**结果:** 与对照组相比, 维替泊芬组和BPH低、中、高浓度组细胞增殖活性、克隆数、划痕愈合率、侵袭细胞数, 以及N-cadherin和vimentin mRNA水平、YAP和TAZ蛋白表达及移植瘤体积均显著降低(均 $P<0.05$), 细胞凋亡率、E-cadherin mRNA水平及对移植瘤的抑瘤率均升高(均 $P<0.05$), 且BPH高浓度组与维替泊芬组之间各项指标均无明显差异(均 $P>0.05$)。**结论:** BPH可能通过抑制Hippo/YAP信号通路来抑制OS细胞MG-63增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 布托啡诺; Hippo/YAP信号通路; 骨肉瘤MG-63细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R738.1; R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)09-0797-07

Butorphanol affects the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma MG-63 cells via Hippo/YAP signaling pathway

DU Jianguo, ZHANG Xun, ZONG Shilan, ZHANG Mingyang, JIA Wanghua, LIU Zhidong (Department of Anesthesiology, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou 277500, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the impacts of butorphanol (BPH) on the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma (OS) cells and the relevant mechanism. **Methods:** MG-63 cells were grouped into a control group, a YAP inhibitor group (Verteporfin group), and low, medium and high concentration BPH groups. The cytotoxicity and proliferative activity of each group of cells were detected by MTT, the number of cell clones was detected by clonogenic assay, the apoptosis of cells was detected by flow cytometry, the migration ability of the cells was detected by wound-healing test, and the invasion ability of the cells was detected by Transwell assay. The mRNA expression of E-cadherin, N-cadherin and vimentin was detected by qPCR, and the protein expression of YAP and TAZ was detected by WB assay. Besides, the effects of BPH and verteporfin on growth of transplanted tumors were also observed. **Results:** Compared with the control group, the cell proliferation activity, the number of clones, the rate of wound healing, the number of invaded cells, the mRNA levels of N-cadherin and vimentin, the protein expression of YAP and TAZ, and the tumor volumes were obviously lower (all $P<0.05$), while the apoptosis rate, mRNA level of E-cadherin and the transplanted tumor inhibition rate were significantly higher (all $P<0.05$) in the Verteporfin group and the low, medium and high concentration BPH groups. There were no obvious differences in above observation indices between the high concentration BPH and the Verteporfin group ($P>0.05$). **Conclusion:** BPH may inhibit the proliferation, migration and invasion of OS cells by inhibiting Hippo/YAP signaling pathway.

[Key words] butorphanol; Hippo/YAP signal pathway; osteosarcoma MG-63 cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(9): 797-803. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.09.008]

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是常见的原发性骨恶性肿瘤之一, 主要发生在儿童和青少年中, 具有较高的病死率和转移性, 尤其是肺转移的风险高, 通常预后较差, 严重威胁年轻人的身心健康^[1-2]。OS的标准治疗方法包括手术、术后化疗和新辅助化疗, 但对于转移性和复发性OS患者, 常规治疗方法的疗效并不

显著^[3]。因此, 寻找具有临床潜力的新治疗药物是当前的主要目标之一。

[基金项目] 徐州医科大学附属医院基金项目(No. XYFM2020046)

[作者简介] 杜建国(1981—), 本科, 主治医师, 主要从事麻醉医学研究, E-mail:svq1hzk@163.com

[通信作者] 刘志东, E-mail:diaodantk65@163.com

布托啡诺(butorphanol, BPH)是一种有效的 κ -阿片受体激动剂和 μ -阿片受体拮抗剂,具有良好的镇痛作用,也已成功用于治疗中度或重度瘙痒患者^[4]。目前已有研究^[5-6]显示,阿片类药物可以促进或预防肿瘤生长和转移,如BPH能够抑制卵巢癌和OS细胞的恶性增殖和转移,但对阻碍OS发展的作用机制研究甚少。近几年,Hippo通路在癌症中的作用被广泛研究,该通路及其下游效应蛋白Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)是一种关键的转录共激活因子,可以在发育和器官再生的背景下控制器官生长和细胞分化,且在癌细胞增殖、凋亡和迁移等过程中发挥关键作用^[7-8]。有研究^[9]显示,华蟾素注射液可以通过抑制肽基脯氨酰顺反异构酶NIMA相互作用蛋白1(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1, PIN1)-YAP信号途径在OS中发挥抗肿瘤作用。因此,本研究探讨BPH是否能够通过调控Hippo/YAP信号通路来抑制OS细胞增殖、迁移和侵袭,以期为止OS的转移和发展提供新的潜在治疗药物及策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂和仪器

6周龄、体质量22~25 g的SPF级BALB/c裸鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(许可证号:SCXK(湘)2019-0004,动物合格证号:HNASLKJ20221018)。人OS细胞MG-63及MEM培养基购自武汉普赛诺生命科技有限公司,BPH注射液购自国药集团国瑞药业有限公司(国药准字H20223866),维替泊芬购自美国MedChemExpress(verteporfin, YAP抑制剂,货号:HY-B0146),MTT细胞毒性及细胞增殖检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司(货号:M1020),结晶紫购自北京伊塔生物科技有限公司(货号:YT8810),Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自无锡善禾生物医药技术有限公司(货号:CTCC-M009),康宁Transwell 24孔板购自上海研卉生物科技有限公司,上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin) mRNA引物均购自上海生工生物工程股份有限公司,YAP、TAZ(一种带有PDZ结合基序的转录共激活蛋白)一抗购自英国Abcam公司(货号:ab52771、ab110239),山羊抗兔IgG(H&L)二抗购自艾美捷科技有限公司(货号:GARG80-0500)。SpectraMax iD5多功能酶标仪购自上海美谷分子仪器有限公司,奥林巴斯CX23光学显微镜购自上海普赫光电科技有限公司,美国BD FACSCanto II流式细胞仪购自上海远耀生物科技有限公司,伯乐CFX Connect荧光定量PCR仪、ChemiDoc MP全能型成像仪均购自上海

伯乐生命医学产品有限公司。

1.2 细胞培养、分组和处理

将MG-63细胞接种至含有10% FBS和1%双抗的MEM(含非必需氨基酸)培养基中培养,于37 °C、5% CO₂培养箱中常规培养。当细胞汇合度达到80%后按照1:3的比例进行传代,将传至第3代且生长状态良好的细胞用于后续实验。

将MG-63细胞分为对照组、维替泊芬组、BPH低浓度组、BPH中浓度组、BPH高浓度组。对照组细胞用正常MEM培养基培养,维替泊芬组用含有2 μmol/L维替泊芬的培养基培养^[10],BPH低、中、高浓度组分别用含有10、20、40 μg/mL BPH的培养基培养,所有处理后的细胞同样置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.3 MTT法检测BPH对MG-63细胞增殖活性的影响

将MG-63细胞接种到96孔板中(1×10⁴个/孔)正常培养,待细胞汇合度达到80%时,弃去培养基,用不同质量浓度的BPH(5、10、20、40、60 μg/mL)处理细胞48 h(0 μg/mL BPH处理的MG-63细胞作为对照组),加入10 μL的MTT溶液,继续培养4 h,再加入150 μL的DMSO,充分混匀。用酶标仪在490 nm处测定每孔细胞的光密度(D)值,并计算细胞增殖率及半数抑制增殖浓度(IC₅₀)。增殖率=(实验组D值/对照组D值)×100%。

1.4 克隆形成实验检测处理后各组MG-63细胞的克隆形成能力

将MG-63细胞接种于6孔板中(1×10⁴个/孔)培养24 h后,按照1.2方法处理48 h。将细胞以500个/孔接种至60 mm的平板中,在培养箱中培养2周。用3:1的甲醇:冰醋酸混合液固定30 min,再用0.1%结晶紫染色20 min,最后在显微镜下观察并对可见细胞克隆进行计数。

1.5 FCM检测处理各组MG-63细胞的凋亡水平

将MG-63细胞接种至6孔板中(1×10⁵个/孔),按1.2方法处理48 h后收集细胞。然后在细胞中加入100 μL结合缓冲液重悬细胞,再加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI,室温避光静置30 min,用FCM检测细胞凋亡情况并计算凋亡率。

1.6 划痕愈合实验检测处理后各组MG-63细胞的迁移能力

将MG-63细胞接种于6孔板中(1×10⁵个/孔)培养24 h,按1.2方法处理48 h。用10 μL的移液器尖端在培养孔壁上划痕,并更换至无血清培养基,去除已经分离的细胞,分别于划痕0和24 h在倒置显微镜下(×100)观察划痕区域细胞的愈合情况,计算细胞的划痕愈合率。划痕愈合率=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%。

1.7 Transwell 实验检测处理后各组 MG-63 细胞的侵袭能力

将 MG-63 细胞接种至预铺有基质胶的 Transwell 板上室中(1×10³个/孔),加入无血清培养基,下室按 1.2 方法处理 48 h,将侵入下室的细胞用多聚甲醛固定,并用结晶紫染色。用 PBS 缓冲液将表面的结晶紫洗除干净,再用棉签将上室中接种侧的未侵袭细胞擦除干净,在显微镜下观察,每孔随机选取 5 个区域对侵袭细胞进行计数。

1.8 qPCR 检测处理后各组 MG-63 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、vimentin mRNA 的表达

将 MG-63 细胞按 1.2 方法处理 48 h 后,收集细胞并提取总 RNA,然后利用一步法荧光定量试剂盒进行 qPCR 反应,反应体系: 2×SYBR Green Mix 10 μL, DNA 聚合酶 1 μL,上下游引物各 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL,补水至总体系 20 μL。反应程序: 50 °C 逆转录 3 min; 95 °C 预变性 30 s; 2 步法: 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目标基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物

引物名称	方向	序列(5'-3')
E-cadherin	F	CGAGAGCTACACGTTTCACGG
	R	GGGTCGAGGGAAAAATAGG
N-cadherin	F	TTTGATGGAGGTCTCCTAACACC
	R	ACGTTTAACACGTTGGAAATGTG
vimentin	F	TGGTCTAACGGTTTCCCCTA
	R	GACCTCGGAGCGAGAGTG
GAPDH	F	CTTTGGTATCGTGAAAGACTC
	R	GTAGAGGCAGGGATGATGATGTTCT

1.9 WB 法检测处理后各组 MG-63 细胞中 YAP、TAZ 蛋白的表达

收集处理各组细胞加入 RIPA 裂解液提取总蛋白。然后用 10% SDS-PAGE 分离蛋白并转至 PVDF 膜。转膜结束,将膜浸泡在 5% 的脱脂牛奶中,4 °C 封闭过夜,将膜冲洗后放入一抗稀释液(YAP 一抗稀释

比例 1:5 000,TAZ 一抗稀释比例 1:1 000),室温下处理 2 h,再放入羊抗兔 IgG 二抗稀释液(1:500),室温下处理 2 h,最后加入显影剂避光显色,以 GAPDH 为内参,用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.10 裸鼠移植瘤模型的抗癌实验

收集按照对照组、维替泊芬组、BPH 低浓度组、BPH 中浓度组、BPH 高浓度组处理 48 h 后的 MG-63 细胞,并用 PBS 缓冲液重悬细胞并调整浓度至 1×10⁷ 个/mL。按随机表法随机将裸鼠分为对照组、维替泊芬组和 BPH 低、中、高浓度组,每组 5 只。将细胞悬液注射至裸鼠右侧背部皮下,每只小鼠注射 0.2 mL,每 d 观察裸鼠的状态,每 3 d 测量一次肿瘤的大小,并记录长径(a)和短径(b),计算肿瘤体积[V=(ab²)/2]。15 d 后,用 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠并断颈处死,分离各组小鼠的肿瘤块进行称重,计算抑瘤率。抑瘤率=(对照组瘤质量-实验组瘤质量)/对照组瘤质量×100%。

1.11 统计学处理

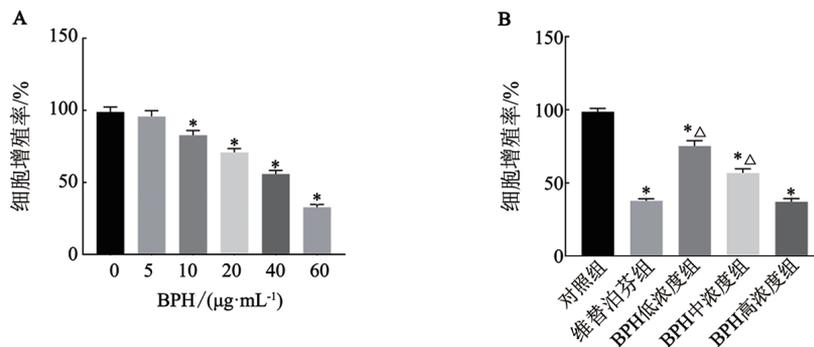
所有实验均独立重复 3 次。利用软件 Graphpad prism 9.0 分析数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两多重比较采用 SNK-q 检验。以 P<0.05 或 P<0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BPH 对 MG-63 细胞增殖能力的影响

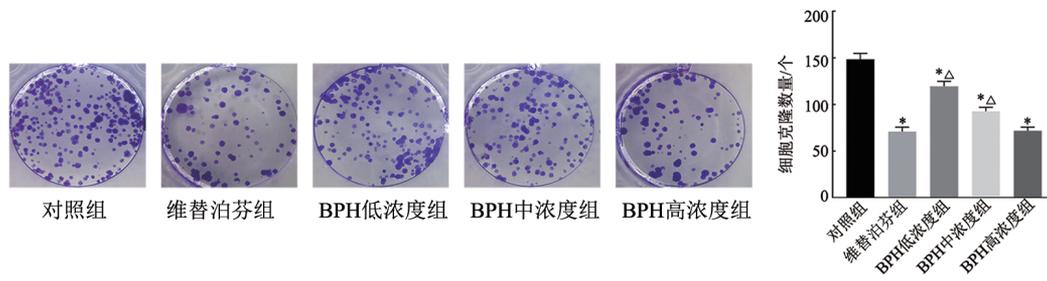
MTT 法检测结果(图 1A)显示,与对照组相比,10、20、40、60 μg/mL BPH 处理组的细胞增殖率明显降低(均 P<0.05),BPH 处理 MG-63 细胞 48 h 后的 IC₅₀ 为 40.09 μg/mL。因此,10、20、40 μg/mL 作为后续实验中 BPH 的低、中、高质量浓度组。

MTT 法检测图(1B)结果及克隆形成实验结果(图 2)均显示,与对照组相比,维替泊芬组和 BPH 低、中、高浓度处理组 MG-63 细胞和克隆数均明显降低(均 P<0.05);且维替泊芬组与 BPH 高浓度组无显著差异(P>0.05)。



A: 不同质量浓度 BPH 作用下细胞的增殖率; B: 各处理组细胞的增殖率。与 0 μmol/L BPH 组或对照组比较, *P<0.05; 与维替泊芬组比较, ΔP<0.05。

图 1 BPH 和维替泊芬对 MG-63 细胞增殖率和克隆形成数量的影响



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与维替泊芬组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图2 维替泊芬和BPH对MG-63细胞克隆形成能力的影响($\times 40$)

2.2 高浓度BPH促进MG-63细胞的凋亡

FCM检测结果(图3)显示,与对照组相比,维替泊芬组和BPH低、中、高浓度处理组MG-63细胞凋亡率升高(均 $P < 0.05$);且维替泊芬组与BPH高浓度组无显著差异($P > 0.05$)。结果说明,作为YAP抑制剂的维替泊芬诱导细胞凋亡能力与高浓度BPH相当。

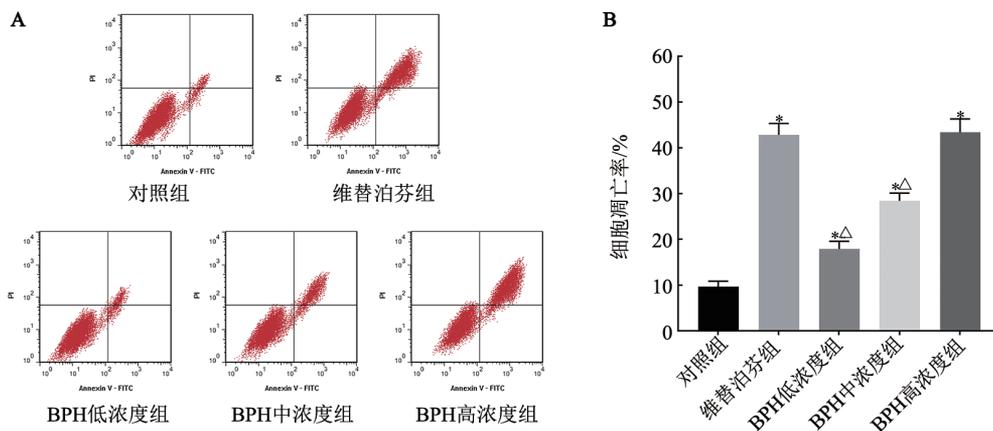
2.3 高浓度BPH强效抑制MG-63细胞的迁移

划痕愈合实验结果(图4)显示,与对照组相比,维替泊芬组和BPH低、中、高浓度处理组MG-63细胞划痕愈合率降低,迁移能力均受到明显抑制

(均 $P < 0.05$);且维替泊芬组与BPH高浓度组无显著差异($P > 0.05$)。结果说明,维替泊芬抑制细胞迁移的能力与高浓度BPH的相似。

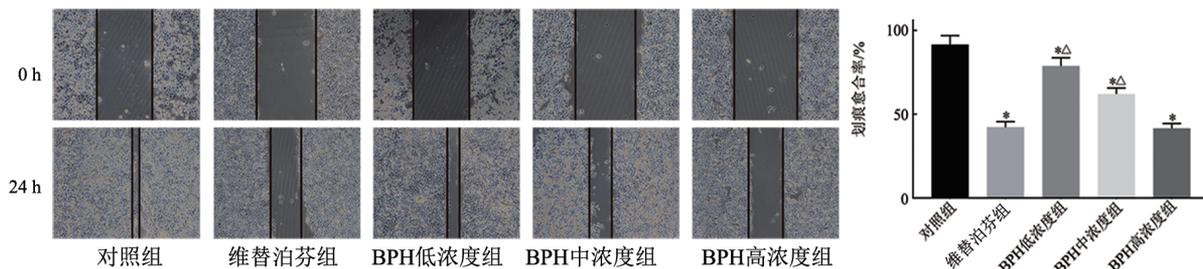
2.4 高浓度BPH抑制MG-63细胞的侵袭

Transwell侵袭实验结果(图5)显示,与对照组相比,维替泊芬组和BPH低、中、高浓度处理组MG-63细胞侵袭数量降低(均 $P < 0.05$);且维替泊芬组与BPH高浓度组无显著差异($P > 0.05$)。结果说明,BPH与维替泊芬均能明显抑制MG-63细胞的侵袭能力。



A: FCM检测各组细胞凋亡图; B: 各处理组细胞的凋亡率。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与维替泊芬组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图3 维替泊芬和BPH对MG-63细胞凋亡的影响



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与维替泊芬组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

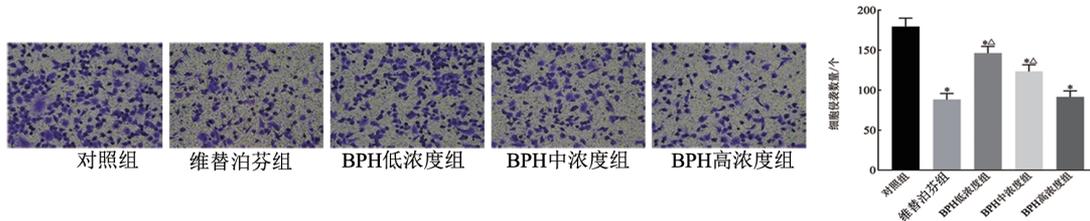
图4 划痕愈合实验检测维替泊芬和BPH对MG-63细胞迁移的影响($\times 100$)

2.5 高浓度BPH促进MG-63细胞中EMT相关分子的表达

qPCR检测结果(图6)显示,与对照组相比,维替泊芬组和BPH低、中、高浓度处理组MG-63细胞中

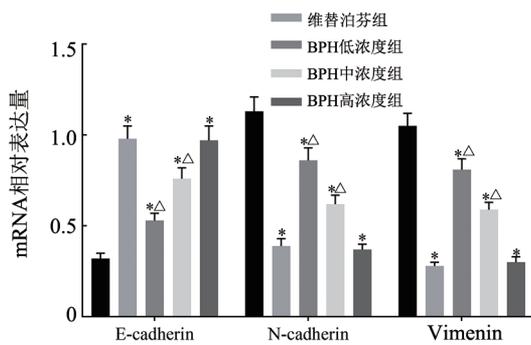
E-cadherin mRNA 水平升高, N-cadherin、vimentin mRNA 水平降低(均 $P < 0.05$); 且维替泊芬组与 BPH 高浓度组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果说明,

BPH 和维替泊芬均能明显抑制 MG-63 细胞的 EMT 进程。



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与维替泊芬组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

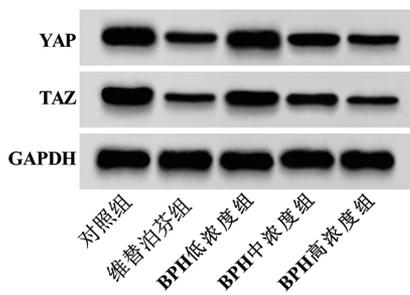
图5 Transwell 实验检测各组 MG-63 细胞的侵袭能力($\times 200$)



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与维替泊芬组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图6 各组 MG-63 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、vimentin mRNA 的表达水平

2.6 高浓度 BPH 抑制 MG-63 细胞中 YAP、TAZ 蛋白的表达



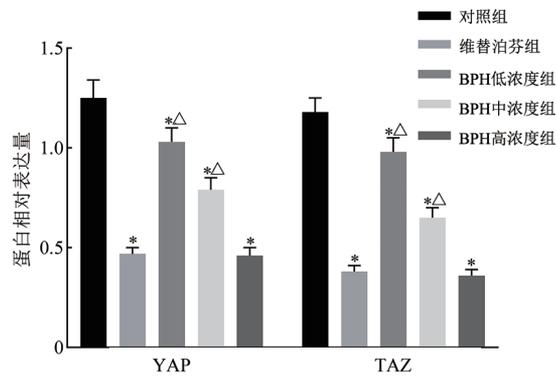
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与维替泊芬组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图7 BPH 和维替泊芬对 MG-63 细胞中 YAP、TAZ 蛋白表达水平的影响

WB 法检测结果(图7)显示,与对照组相比,维替泊芬组和 BPH 低、中、高浓度处理组 MG-63 细胞中 YAP 和 TAZ 蛋白表达均明显降低(均 $P < 0.05$); 且维替泊芬组与 BPH 高浓度组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果说明, BPH 和维替泊芬均能抑制 MG-63 细胞中 YAP、TAZ 蛋白的表达。

2.7 高浓度 BPH 抑制 OS 移植瘤的生长

裸鼠移植瘤模型实验结果(图8)显示,与对照组相比,维替泊芬组和 BPH 低、中、高浓度处理组小鼠的肿瘤体积减小,抑瘤率明显升高(均 $P < 0.05$); 且维替泊芬组与 BPH 高浓度组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果说明, BPH 和维替泊芬均能明显抑制移植瘤的生长。



3 讨论

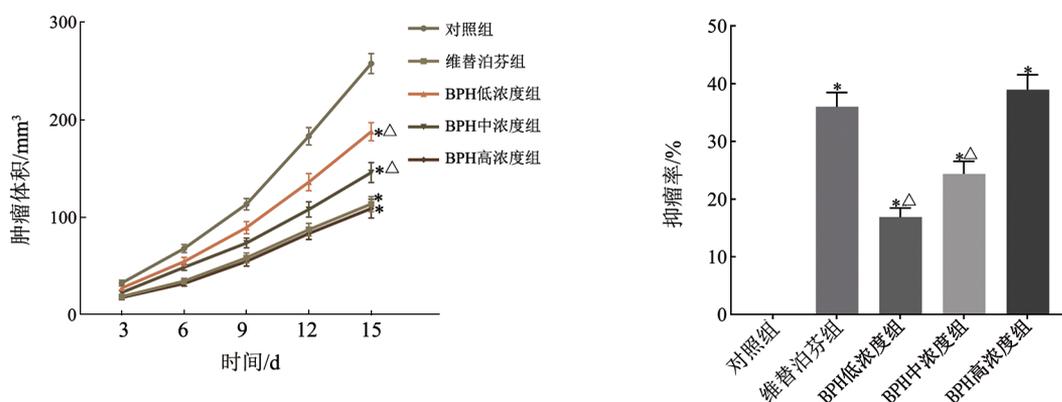
目前随着新辅助化疗药物的出现和手术的进步, OS 的治疗效果有所提高, 但对于部分转移癌患者的治疗效果仍然不佳, 预后较差。因此, 探索有效阻断 OS 进展和转移的新治疗药物可能为 OS 的治疗提供新的策略^[11-12]。目前, 已经有研究^[13-14]显示, 作为镇

痛剂的阿片类药物能够调节癌症的进展, 例如 μ -阿片受体激动剂(如吗啡)可能诱发癌症进展, 而 κ -阿片受体激动剂/ μ -阿片受体拮抗剂(如 BPH)对肝细胞癌的血管生成及 OS 的增殖和迁移有抑制作用。

本研究结果发现, 与对照组相比, 维替泊芬和 BPH 处理后的 MG-63 细胞的增殖率和克隆数量显著降低, 细胞凋亡率均升高。揭示了 BPH 可以抑制 OS 细胞的

增殖,促进细胞凋亡,进而阻止OS发展。同时进一步在移植瘤小鼠中进行验证显示,维替泊芬和BPH组小

鼠的肿瘤体积低于对照组,抑瘤率高于对照组,提示了BPH也可以抑制OS细胞在体内的增殖。



A:处理各组裸鼠移植瘤体积的变化;B:处理各组的抑瘤率。与对照组比较,* $P<0.05$;与维替泊芬组比较, $\Delta P<0.05$ 。

图8 BPH和维替泊芬对OS移植瘤体积和抑瘤率的影响

已知EMT是肿瘤细胞获得迁移能力的途径之一,其具体过程是具有上皮样形态的细胞经历形态和分子的变化从而获得间充质样形态,使细胞黏附性降低,迁移性增加^[15]。研究^[16]表明,EMT在骨肉瘤的侵袭和转移中起着关键作用。在骨肉瘤的EMT过程中,参与EMT的主要蛋白质E-cadherin表达受到抑制,而N-cadherin、vimentin的表达明显上调。本结果显示,与对照组相比,维替泊芬组和BPH不同浓度处理组MG-63细胞的划痕愈合率和侵袭数量降低。为了进一步探讨BPH对OS细胞转移的影响,本研究通过qPCR检测了EMT相关因子的mRNA水平,结果发现维替泊芬组和BPH组细胞中E-cadherin mRNA水平升高,N-cadherin和vimentin mRNA水平降低,进一步揭示了BPH可能是通过阻止EMT的进展过程来降低OS细胞的迁移和侵袭能力,从而抑制OS的转移。这与先前的研究结果保持一致,但对其中产生作用的具体机制还未知。

据了解,Hippo信号通路不仅在器官发育、组织再生中具有重要作用,其异常表达也与肿瘤转移、侵袭及EMT等肿瘤发展过程有关,包括OS^[17]。YAP及其旁系同源转录因子TAZ均是该通路下游的关键因子,它们通常作为转录共激活因子,与核内其他转录因子结合后启动靶基因的转录^[18]。转录增强相关结构域(TEAD)家族成员(如TEAD1/2/3/4)是介导YAP/TAZ致癌功能的主要转录因子,两者相互结合形成的YAP-TEAD或TAZ-TEAD复合物,在肿瘤发展、转移和耐药中发挥重要作用。因此,阻止YAP/TAZ与TEAD相互作用是一种有效的治疗策略^[19-20]。研究^[8]显示,在OS中,维替泊芬作为YAP的直接抑制剂,可以影响YAP-TEAD的相互作用,并减少OS

原发性肿瘤的生长。本研究结果显示,对照组细胞中YAP和TAZ的表达较高,与先前研究^[9]结果一致,表明YAP和TAZ可能参与OS的发展。与对照组相比,维替泊芬组和BPH不同浓度处理组细胞中YAP和TAZ蛋白表达显著降低,且高浓度BPH对OS细胞的作用与维替泊芬无显著差异。因此,本研究推测BPH抑制OS细胞增殖、迁移和侵袭的作用机制可能是由于Hippo/YAP信号通路被抑制,阻断了YAP/TAZ-TEAD相互作用。

综上所述,BPH可能通过抑制Hippo/YAP信号通路来抑制OS细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究为阻止OS的转移和发展提供了新的潜在治疗药物及策略。但由于本研究实验条件有限,关于BPH对OS细胞转移的作用及在临床中的应用效果和作用机制还需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] LI D K, WANG G H. Asiaticoside reverses M2 phenotype macrophage polarization-evoked osteosarcoma cell malignant behaviour by TRAF6/NF- κ B inhibition[J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1635-1645. DOI: 10.1080/13880209.2022.2109688.
- [2] ZHANG K, DONG C, CHEN M, *et al.* Extracellular vesicle-mediated delivery of miR-101 inhibits lung metastasis in osteosarcoma[J]. *Theranostics*, 2020, 10(1):411-425. DOI: 10.7150/thno.33482.
- [3] YANG Q, LIU J, WU B, *et al.* Role of extracellular vesicles in osteosarcoma[J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(8): 1216-1226. DOI: 10.7150/ijms.74137.
- [4] TANG W, LUO L, HU B, *et al.* Butorphanol alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis of cardiomyocytes *via* activation of the κ -opioid receptor[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(5): 1248-1255. DOI: 10.3892/etm.2021.10683.

- [5] WANG B, LI Y, SHEN Y, *et al.* Butorphanol inhibits the malignant biological behaviors of ovarian cancer cells *via* down-regulating the expression of TMEFF1[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13(1): 10973-10981. DOI: 10.2147/OTT.S244928.
- [6] CUI P, XIN D, LI F, *et al.* Butorphanol suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma by promoting the expression of piRNA hsa_piR_006613[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 775132[2023-05-30]. <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.775132/full>. DOI: 10.3389/fonc.2022.775132.
- [7] ZHAN F, HE T, CHEN Z, *et al.* RhoA enhances osteosarcoma resistance to MPPa-PDT *via* the Hippo/YAP signaling pathway[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1):179-198. DOI: 10.1186/s13578-021-00690-6.
- [8] MORICE S, MULLARD M, BRION R, *et al.* The YAP/TEAD axis as a new therapeutic target in osteosarcoma: effect of verteporfin and CA3 on primary tumor growth[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(12):3847-3863. DOI: 10.3390/cancers12123847.
- [9] CHEN Y, WANG Y, ZHAI Y, *et al.* Cinobufacini injection suppresses the proliferation of human osteosarcoma cells by inhibiting PIN1-YAP/TAZ signaling pathway[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1081363 [2023-05-30]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2023.1081363/full>. DOI: 10.3389/fphar.2023.1081363.
- [10] LI Y, YANG S, YANG S. Verteporfin inhibits the progression of spontaneous osteosarcoma caused by Trp53 and Rb1 deficiency in ctsk-expressing cells *via* impeding hippo pathway[J]. *Cells*, 2022, 11(8):1361-1373. DOI: 10.3390/cells11081361.
- [11] JIANG L, LIAO J, LIU J, *et al.* Geranylgeranyl acetone promotes human osteosarcoma cell apoptosis by inducing the degradation of PRMT1 through the E3 ubiquitin ligase CHIP[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(16): 7961-7972. DOI: 10.1111/jcmm.16725.
- [12] LI Z, LI X, XU D, *et al.* An update on the roles of circular RNAs in osteosarcoma[J/OL]. *Cell Prolif*, 2021, 54(1):e12936[2023-05-30]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cpr.12936>. DOI: 10.1111/cpr.12936.
- [13] MAROUDA C, ANAGNOSTOU T, SAVVAS I, *et al.* The effect of opioid administration on cytologic and histopathologic diagnosis of canine cutaneous mast cell tumors treated by surgical excision[J]. *Vet Sci*, 2022, 9(5): 202-215. DOI: 10.3390/vetsci9050202.
- [14] GUO P, HU Q, WANG J, *et al.* Butorphanol inhibits angiogenesis and migration of hepatocellular carcinoma and regulates MAPK pathway[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2022, 75(11): 626-634. DOI: 10.1038/s41429-022-00565-z.
- [15] HUANG H, NIE C, QIN X, *et al.* Diosgenin inhibits the epithelial-mesenchymal transition initiation in osteosarcoma cells *via* the p38MAPK signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(4): 4278-4287. DOI: 10.3892/ol.2019.10780.
- [16] CHEN Y, LI J, XIAO J K, *et al.* The lncRNA NEAT1 promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis of osteosarcoma cells by sponging miR-483 to upregulate STAT3 expression[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 90-110. DOI: 10.1186/s12935-021-01780-8.
- [17] BARRETTE A M, RONK H, JOSHI T, *et al.* Anti-invasive efficacy and survival benefit of the YAP-TEAD inhibitor verteporfin in preclinical glioblastoma models[J]. *Neuro Oncol*, 2022, 24(5):694-707. DOI: 10.1093/neuonc/noab244.
- [18] DENG F, WU Z, ZOU F, *et al.* The Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in intestinal self-renewal and regeneration after injury[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 894737[2023-06-30]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.894737/full>. DOI: 10.3389/fcell.2022.894737.
- [19] GUO Y, ZHU Z, HUANG Z, *et al.* CK2-induced cooperation of HHEX with the YAP-TEAD4 complex promotes colorectal tumorigenesis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4995-5012. DOI: 10.1038/s41467-022-32674-6.
- [20] POBBATI A V, RUBIN B P. Protein-protein interaction disruptors of the YAP/TAZ-TEAD transcriptional complex[J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 6001-6018. DOI: 10.3390/molecules252460010.

[收稿日期] 2023-06-29

[修回日期] 2023-08-07

[本文编辑] 郁晓路, 向正华