

黏着斑激酶抑制剂TAE226对人口腔鳞状细胞癌细胞上皮间质转化的影响

邹湘渝^{1,2} 曾琴^{1,2} 刘萍³ 聂敏海^{1,2}

1.西南医科大学附属口腔医院牙周黏膜科, 泸州 646000;

2.西南医科大学口颌面修复重建与再生实验室, 泸州 646000;

3.深圳市罗湖区人民医院口腔科, 深圳 518000

[摘要] 目的 探究黏着斑激酶抑制剂TAE226对人口腔鳞状细胞癌细胞上皮间质转化(EMT)过程的影响。方法 不同浓度(0、1、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的TAE226作用于人口腔鳞状细胞癌HSC-3和HSC-4细胞24、48、72 h后, 实时定量聚合酶链反应检测EMT标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)的mRNA表达; 蛋白质印迹法检测E-cadherin、Vimentin在TAE226作用48 h后的蛋白表达。结果 实时定量聚合酶链反应检测表明, 随着TAE226作用时间和浓度的增加, E-cadherin mRNA的表达增加, Vimentin mRNA的表达降低($P<0.05$)。蛋白质印迹法检测表明, 随着TAE226浓度的增加, E-cadherin蛋白的表达增加, Vimentin蛋白的表达降低($P<0.05$)。结论 TAE226能有效抑制人口腔鳞状细胞癌细胞株的EMT进程, 有望成为治疗口腔鳞状细胞癌的有效药物之一。

[关键词] 黏着斑激酶抑制剂TAE226; 上皮间质转化; 口腔鳞状细胞癌

[中图分类号] R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2020.01.004



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Effect of the focal adhesion kinase inhibitor TAE226 on the epithelial-mesenchymal transition in human oral squamous cell carcinoma cell line Zou Xiangyu^{1,2}, Zeng Qin^{1,2}, Liu Ping³, Nie Minhai^{1,2}. (1. Dept. of Periodontics and Oral Medicine, The Affiliated Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Laboratory for Reconstruction and Regeneration of Oral and Maxillofacial Region, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Dept. of Stomatology, Luohu People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518000, China)

Supported by: Sichuan Science and Technology Program (2018JY0401). Correspondence: Nie Minhai, E-mail: 517094363@qq.com.

[Abstract] **Objective** To study the effect of the focal adhesion kinase inhibitor TAE226 on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell line. **Methods** HSC-3 and HSC-4 cells were cultured with TAE226 under different concentrations (0, 1, 5, and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24, 48, and 72 h. Real-time quantitative polymerase chain reaction was performed to detect the mRNA expressions of E-cadherin and Vimentin. The protein expressions of E-cadherin and Vimentin were determined by Western blot assay after 48 h of TAE226 treatment. **Results** Real-time quantitative polymerase chain reaction showed that increasing the TAE226 dose and reaction time resulted in increased and decreased E-cadherin and Vimentin mRNA expressions, respectively ($P<0.05$). Western blot assays showed that increasing the TAE226 dose resulted in increased and decreased E-cadherin and Vimentin protein expressions, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** TAE226, which is expected to be an effective drug for OSCC treatment, can effectively inhibit the EMT of the OSCC cell line.

[Key words] focal adhesion kinase inhibitor TAE226; epithelial-mesenchymal transition; oral squamous cell carcinoma

[收稿日期] 2019-03-21; **[修回日期]** 2019-08-19

[基金项目] 四川省科技计划(2018JY0401)

[作者简介] 邹湘渝, 硕士, E-mail: 1456300692@qq.com

[通信作者] 聂敏海, 教授, 博士, E-mail: 517094363@qq.com

黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一种非受体酪氨酸激酶, 通过整合来自胞外的压力、细胞黏着等方面的信号, 参与肿瘤的增殖、迁移、侵袭和血管再生等有关的多条信号传导通路, 目前

已成为肿瘤诊断的分子标志物和恶性肿瘤治疗的重要靶点^[1-2]。TAE226是一种针对FAK的强效抑制剂，可以有效阻断FAK信号通路^[3]。随着研究的深入，人们发现TAE226对口腔鳞状细胞癌（oral squamous cell carcinoma, OSCC）具有明显的抗增殖、迁移和侵袭作用，但对发生在OSCC细胞转移阶段的上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）进程的作用尚不清楚。本研究采用实时定量聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）和蛋白质印迹法（Western blot），探究TAE226在OSCC细胞EMT过程中的作用及其意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人OSCC HSC-3、HSC-4细胞株（由四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供）。TAE226（上海蓝木化工有限公司），优质胎牛血清、PBS缓冲液（北京索莱宝生物科技有限公司），DMEM高糖培养基（赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司），DMSO（AMRESCO公司，美国），RNA提取试剂盒（天根生化科技北京有限公司），逆转录试剂盒（TOYOBO公司，日本），QuantiFast SRBR Green PCR Kit（QIAGEN公司，德国），Anti-E-cadherin抗体、Anti-Vimentin抗体（Abcam公司，英国），二抗（北京博奥森生物技术有限公司），电化学发光（electrochemiluminescence, ECL）检测试剂盒（Millipore公司，美国）。

1.2 实验方法

1.2.1 TAE226的配置及实验分组 用10.67 mL DMSO溶解5 mg TAE226，配成浓度为1 mmol·L⁻¹的TAE226母液，分装后于-20 °C冰箱中保存。临用前按比例用培养液将其稀释，并使其中DMSO液含量低于0.1%。本实验将1、5、10 μmol·L⁻¹浓度的TAE226培养液作为实验组，将不含TAE226（0 μmol·L⁻¹）的培养液作为对照组。

1.2.2 细胞培养和铺板 HSC-3、HSC-4细胞株由含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM高糖培养液常规培养，每2天换液1次，待细胞融合度80%~90%时，消化传代。将对数生长期的HSC-3细胞制备成细胞浓度为3×10⁵个·mL⁻¹的细胞悬液，按每孔2 mL接种于六孔板内。培养24 h至贴壁后，弃原培养液，PBS液洗2遍后分别加入含TAE226 0、1、5、10 μmol·L⁻¹的培养液每孔3 mL，摇匀置于37 °C、5%CO₂孵箱中培养，培养24、48、72 h时用于EMT标志物E-钙黏蛋白（E-cadherin）和波形蛋白（Vimentin）mRNA的检测，

并对培养48 h的细胞进行E-cadherin和Vimentin蛋白检测。

1.2.3 实时定量PCR检测 按RNA提取试剂盒的操作说明进行操作。分别在HSC-3和HSC-4细胞培养24、48、72 h时将其取出，置于显微镜下观察其生长情况并拍照，用PBS液洗2遍，按每孔1 mL向六孔板中加入Trizol液以裂解细胞，提取总RNA，并于微量分光光度计上检测RNA的纯度及浓度，逆转录合成cDNA，进而扩增E-cadherin和Vimentin的mRNA。反应体系：总RNA模板2 μL（1 μg），蒸馏水6.4 μL，SRBR Green Real time PCR Master Mix 10 μL，上游引物0.8 μL，下游引物0.8 μL。设置2个复孔，扩增条件为：95 °C预变性30 s，95 °C变性30 s，57 °C退火10 s，72 °C延伸15 s，共40个循环。实时定量PCR引物由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成（表1）。以目的基因的相对表达量（2^{-ΔΔCT}）计算出各基因相对表达水平，其中ΔCT=CT_{目的基因}-CT_{内参基因}，ΔΔCT=ΔCT_{实验组}-ΔCT_{对照组}。

表 1 引物序列和产物

Tab 1 Sequences of primers and products

引物名称	引物序列（5'-3'）	片段大小/bp
GAPDH	F- GACAGTCAGCCGCATCTTCT	395
	R- AAATGAGCCCCAGCCTTCTC	
E-cadherin	F- GAGTGCCAACTGGACCATTTCAGTA	106
	R- AGTCACCCACCTCTAAGGCCATC	
Vimentin	F- CTCTCAAAGATGCCAGGAG	176
	R- GCACGATCCAACCTTTCCTC	

1.2.4 Western blot检测 培养HSC-3和HSC-4细胞48 h后取出六孔板于显微镜下观察细胞生长情况，拍照，将其用PBS液洗2遍，按每孔250 μL向六孔板中加入蛋白裂解液裂解细胞，提取细胞总蛋白，在蛋白液内加入适量的5×蛋白上样缓冲液（蛋白液：5×蛋白上样缓冲液为4：1），95~100 °C干锅浴5 min进行变性。聚丙烯酰胺凝胶电泳，切胶、转至PVDF膜。脱脂牛奶室温封闭2 h，4 °C孵育一抗过夜，TBST漂洗PVDF膜5次，每次5 min。室温孵育二抗1 h，TBST洗膜。ECL混合溶液避光孵育1 min，置于凝胶成像系统成像拍照。将拍摄的图片保存，用AlphaEase FC软件测量灰度值，并计算蛋白相对表达量。将目的蛋白的光密度值/内参的光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达丰度。

1.3 统计分析

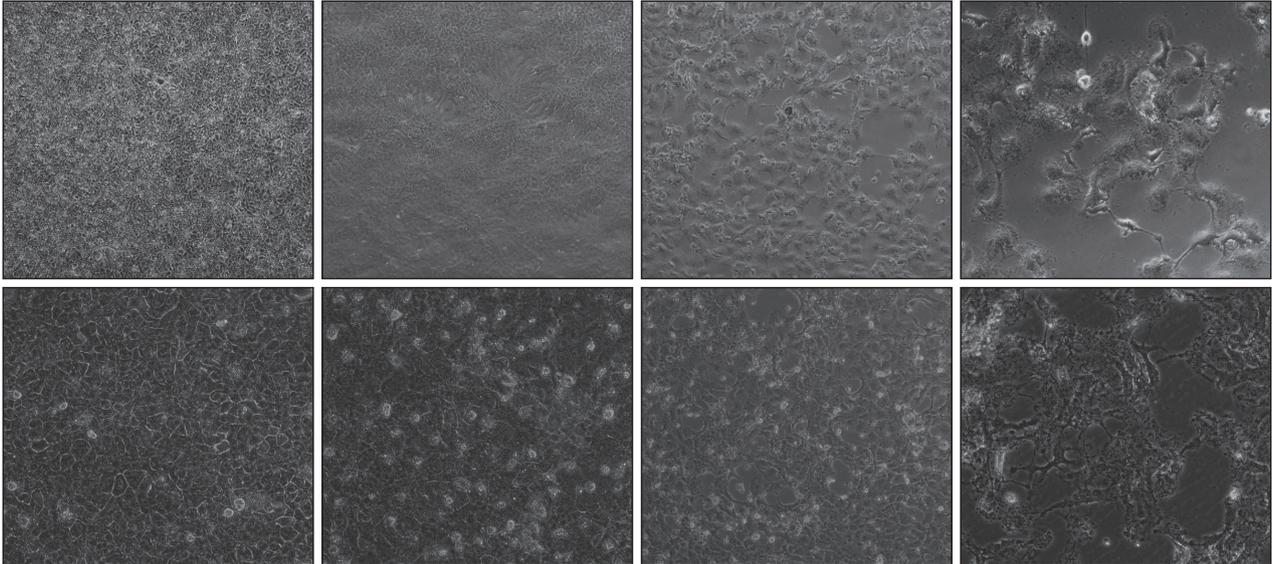
采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。多因素多组间的比较采用重复变量的方差分析，单因素多组间的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 HSC-3和HSC-4细胞在TAE226作用下细胞形态的变化

对照组细胞生长快速,彼此紧密贴壁生长,细胞

呈短梭形或菱形,细胞膜和细胞核清晰可见,胞质饱满且透亮。加入了TAE226的HSC-3/HSC-4细胞培养后,随着TAE226浓度不断增加,细胞体积逐渐皱缩变小,细胞膜边界不清,细胞固缩成圆形、长梭形、椭圆形或镂空状,最后呈蜂窝样空洞性连接并出现大量脱落漂浮细胞,基本上无贴壁细胞(图1)。



上: HSC-3细胞;下: HSC-4细胞。从左到右TAE226的浓度依次为0、1、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

图1 不同浓度的TAE226干预72 h后的HSC-3、HSC-4细胞 显微镜 $\times 200$

Fig 1 HSC-3 and HSC-4 cells were observed after 72 h intervention with TAE226 at different concentrations microscope $\times 200$

2.2 TAE226作用下HSC-3和HSC-4细胞E-cadherin和Vimentin mRNA的表达

TAE226作用下HSC-3细胞E-cadherin和Vimentin mRNA的表达见表2、3。从表2、3可见,1)除对照组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TAE226)在TAE226作用24 h和48 h时,E-cadherin mRNA的表达无统计学差异外,其他不同浓度和不同时间的比较均有统计学差异($P < 0.05$),E-cadherin mRNA的表达随TAE226作用时间和浓度的增加而表达增加。2)对照组Vimentin mRNA的表达随时间增加而升高($P < 0.05$),实验组Vimentin mRNA的表达低于对照组($P < 0.05$),且随时间和浓度的增加而表达降低($P < 0.05$)。

TAE226作用下HSC-4细胞E-cadherin和Vimentin mRNA的表达见表4、5。从表4、5可见,1)对照组E-cadherin mRNA的表达随着时间增加而降低($P < 0.05$),实验组E-cadherin mRNA的表达高于对照组($P < 0.05$),且随TAE226作用时间和浓度的增加而表达增加($P < 0.05$)。2)对照组Vimentin mRNA的表达随着时间增加而增加($P < 0.05$),除实验组 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TAE226作用24 h时Vimentin mRNA的表达与对照组无统计学差异外,其他不同浓度和不同时间的比较均具有统计学差异($P < 0.05$),实验组Vimentin mRNA的表达低于对照组,且随时间和浓

度的增加表达降低($P < 0.05$)。

表2 TAE226作用下HSC-3细胞的E-cadherin mRNA表达

Tab 2 The relative expression of E-cadherin mRNA in HSC-3 cells with TAE226

TAE226浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
0	1.00±0.25 ^{aA}	1.01±0.10 ^{aA}	0.80±0.13 ^{bA}
1	1.98±0.66 ^{aB}	3.77±0.34 ^{bB}	6.41±0.16 ^{bB}
5	4.15±0.02 ^{aC}	8.08±0.12 ^{bC}	14.52±0.97 ^{cC}
10	10.10±0.84 ^{aD}	11.18±0.09 ^{bD}	20.58±0.32 ^{cD}

注:组内变量和组间变量交互作用 $F=13.649$, $P < 0.05$,二者存在交互作用。同一浓度不同时间比较, $F=201.930$, $P=0.000$;进一步两两比较,a、b、c、d字母相同为无统计学差异,字母不同为有统计学差异($P < 0.05$)。同一时间不同浓度比较, $F=145.796$, $P=0.000$;进一步两两比较,A、B、C、D字母相同为无统计学差异,字母不同为有统计学差异($P < 0.05$)。

2.3 TAE226作用下HSC-3、HSC-4细胞E-cadherin、Vimentin蛋白的表达

TAE226作用下HSC-3、HSC-4细胞的E-cadherin、Vimentin蛋白表达见图2、3和表6、7。HSC-3、HSC-4细胞的E-cadherin蛋白的表达随TAE226浓度的增加

而增加 ($P<0.05$), Vimentin蛋白的表达随TAE226浓度的增加而降低 ($P<0.05$)。表明, TAE226对HSC-3细胞和HSC-4细胞的E-cadherin的蛋白表达有促进作用, 对Vimentin的蛋白表达有抑制作用, 且该效应具有剂量依赖性。

表 3 TAE226作用下HSC-3细胞Vimentin mRNA的表达

Tab 3 The relative expression of Vimentin mRNA in HSC-3 cells with TAE226

TAE226浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
0	1.01±0.18 ^{aA}	1.61±0.12 ^{bA}	3.16±0.97 ^{cA}
1	0.90±0.13 ^{aB}	0.75±0.06 ^{bB}	0.55±0.21 ^{cB}
5	0.76±0.44 ^{aC}	0.51±0.03 ^{bC}	0.15±0.29 ^{cC}
10	0.25±0.18 ^{aD}	0.11±0.05 ^{bD}	0.08±0.00 ^{cD}

注: 组内变量和组间变量交互作用 $F=55.420$, $P<0.05$, 二者存在交互作用。同一浓度不同时间比较, $F=9.630$, $P=0.000$; 进一步两两比较, a、b、c、d字母相同为无统计学差异, 字母不同为有统计学差异 ($P<0.05$)。同一时间不同浓度比较, $F=220.215$, $P=0.000$; 进一步两两比较, A、B、C、D字母相同为无统计学差异, 字母不同为有统计学差异 ($P<0.05$)。

表 4 TAE226作用下HSC-4细胞E-cadherin mRNA的表达

Tab 4 The relative expression of E-cadherin mRNA in HSC-4 cells with TAE226

TAE226浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
0	1.01±0.18 ^{aA}	0.71±0.09 ^{bA}	0.68±0.08 ^{cA}
1	1.40±0.10 ^{aB}	3.20±0.36 ^{bB}	10.01±0.29 ^{cB}
5	2.15±0.50 ^{aC}	11.42±1.22 ^{bC}	23.65±1.07 ^{cC}
10	3.70±0.34 ^{aD}	16.68±0.53 ^{bD}	27.08±1.02 ^{cD}

注: 组内变量和组间变量交互作用 $F=51.639$, $P<0.05$, 二者存在交互作用。同一浓度不同时间比较, $F=17.833$, $P=0.000$, 进一步两两比较, a、b、c、d字母相同为无统计学差异, 字母不同为有统计学差异 ($P<0.05$)。同一时间不同浓度比较, $F=616.630$, $P=0.000$, 进一步两两比较, A、B、C、D字母相同为无统计学差异, 字母不同为有统计学差异 ($P<0.05$)。

3 讨论

OSCC作为口腔颌面部最常见的恶性肿瘤, 癌细胞易从原发部位经淋巴道、血管或体腔等途径, 到其他部位生长、定植并最终形成新的肿瘤病灶, 即OSCC早期即可发生转移, 严重影响预后^[4-5]。研究^[6]表明, EMT在肿瘤转移, 尤其是单个肿瘤细胞从肿瘤组织上脱离的过程中起着重要作用。EMT作

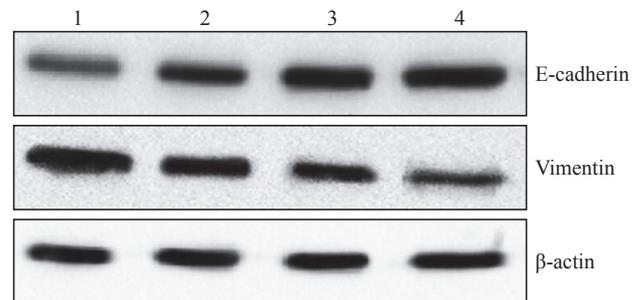
为生物胚胎发生过程中最基本的过程, 在许多慢性病及恶性肿瘤的发生、进展中亦发挥重要作用。当细胞发生EMT时, 上皮细胞失去极性, 细胞之间黏附连接能力下降, 演变为具有间质细胞形态和特性的细胞, 并获得了浸润性和游走迁移能力, 进而增强了侵袭和转移的能力^[7]。

表 5 TAE226作用下HSC-4细胞Vimentin mRNA的表达

Tab 5 The relative expression of Vimentin mRNA in HSC-4 cells with TAE226

TAE226浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
0	0.98±0.10 ^{aA}	1.87±0.38 ^{bA}	3.22±0.65 ^{cA}
1	0.97±0.32 ^{aA}	0.73±0.68 ^{bB}	0.45±0.17 ^{cB}
5	0.75±0.27 ^{aB}	0.41±0.07 ^{bC}	0.20±0.09 ^{cC}
10	0.45±0.21 ^{aC}	0.07±0.20 ^{bD}	0.04±0.01 ^{cD}

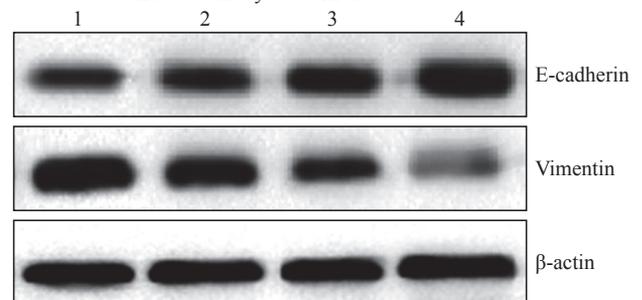
注: 组内变量和组间变量交互作用 $F=41.108$, $P<0.05$, 二者存在交互作用。同一浓度不同时间比较, $F=17.576$, $P=0.000$, 进一步两两比较, a、b、c、d字母相同为无统计学差异, 字母不同为有统计学差异 ($P<0.05$)。同一时间不同浓度比较, $F=106.251$, $P=0.000$, 进一步两两比较, A、B、C、D字母相同为无统计学差异, 字母不同为有统计学差异 ($P<0.05$)。



1~4分别为0、1、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TAE226。

图 2 Western blot检测HSC-3细胞E-cadherin及Vimentin蛋白的表达

Fig 2 Level of E-cadherin and Vimentin protein expression in HSC-3 cells by Western blot



1~4分别为0、1、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TAE226。

图 3 Western blot检测HSC-4细胞E-cadherin及Vimentin蛋白的表达量

Fig 3 Level of E-cadherin and Vimentin protein expression in HSC-4 cells by Western blot

表 6 HSC-3细胞E-cadherin及Vimentin蛋白的表达(灰度比值)

Tab 6 Grayscale ratio of E-cadherin and Vimentin protein in HSC-3 cells

TAE226浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	E-cadherin	Vimentin
0	0.63±0.15	1.54±0.02
1	0.95±0.04	1.12±0.12
5	1.13±0.02	0.79±0.19
10	1.28±0.10	0.57±0.15

注:不同浓度E-cadherin蛋白比较, $F=15.683$, $P=0.001$, 进一步两两比较, 各组间均有统计学差异 ($P<0.05$)。不同浓度Vimentin蛋白比较, $F=18.745$, $P=0.001$, 进一步两两比较, 各组间均有统计学差异 ($P<0.05$)。

表 7 HSC-4细胞E-cadherin及Vimentin蛋白的表达(灰度比值)

Tab 7 Grayscale ratio of E-cadherin and Vimentin protein in HSC-4 cells

TAE226浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	E-cadherin	Vimentin
0	0.57±0.12	1.39±0.12
1	0.95±0.04	1.13±0.03
5	1.17±0.47	0.96±0.04
10	1.34±0.06	0.51±0.27

注:不同浓度E-cadherin蛋白比较, $F=65.291$, $P=0.001$, 进一步两两比较, 各组间均有统计学差异 ($P<0.05$)。不同浓度Vimentin蛋白比较, $F=152.342$, $P=0.001$, 进一步两两比较, 各组间均有统计学差异 ($P<0.05$)。

FAK是一种非受体酪氨酸蛋白激酶,是细胞内重要的骨架蛋白与多种信号通路的关键分子。FAK在整合生长和细胞基质黏附信号方面具有关键作用,是癌症侵袭和转移的主要驱动力,目前已成为研究抗肿瘤药物的重要靶点之一^[8]。TAE226是针对FAK的一种ATP竞争性酪氨酸激酶抑制剂。Lietha等^[9]在体外细胞实验以及体内动物模型诱癌实验中证实,TAE226可有效抑制肿瘤的生长及侵袭,延长胶质瘤或卵巢肿瘤植入小鼠的寿命。Hehlgans等^[10]研究也发现,TAE226作用于三维细胞培养模型中的头颈部鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck, HNSCC)细胞后,细胞的放射敏感性增强,这也说明TAE226在临床上可能会提高HNSCC放射治疗的有效性。Kurio等^[11]研究发现,TAE226可抑制破骨前细胞RAW264.7转变为破骨细胞,抑制成熟破骨细胞的微核和肌动蛋白环的形成,提示TAE226在破骨前细胞、成熟破骨细胞、骨基质细胞中均参与了溶骨性转移和活化,可有效治疗肿瘤性骨转移。本课题组的前期研究发现,TAE226对OSCC细胞有明显的

抗增殖、迁移、侵袭作用,本实验旨在研究TAE226对OSCC细胞转移阶段的EMT进程是否有抑制作用,探索TAE226的抗癌机制,以期TAE226的临床应用提供依据,为口腔黏膜癌变的防治提供新的策略。

肿瘤细胞发生EMT时伴有多种上皮标志物的下调,如E-cadherin、 β -连环蛋白(β -catenin)等,同时间质标记物上调,包括N-cadherin、Vimentin、纤连蛋白等^[12-14]。E-cadherin是广泛分布于上皮组织的跨膜糖蛋白,是一种维持上皮细胞形态、结构的完整性和极性的细胞黏附分子,Hermiton等^[15]发现E-cadherin表达水平的降低可显著增强小鼠卵巢癌细胞株体外迁移能力。Perl等^[16]在Rip-Tag小鼠实验中证实了E-cadherin表达下调是腺瘤进展为浸润性癌的先决条件。E-cadherin的表达与肿瘤的分化程度、发展转移密切相关,E-cadherin表达缺失或降低可使肿瘤细胞黏附能力下降,促进上皮性肿瘤细胞顺利实现浸润及转移,是肿瘤转移的抑制因素,也是EMT发生的关键性蛋白,E-cadherin转录的抑制是EMT的主要机制^[17]。Vimentin是一种进化上保守的中间纤维蛋白,作为一种重要的骨架蛋白以维持细胞的完整性,与细胞骨架构成和细胞黏附密切相关^[18]。Vimentin主要表达于间充质,在正常上皮组织中不表达或低表达,是间质型细胞的标志蛋白之一。研究^[19]表明,当Vimentin表达于上皮源性的肿瘤细胞时,赋予了上皮源性细胞成纤维细胞样的特征,使细胞更易迁移和运动,细胞间黏附能力下降,迁移、侵袭和转移能力增强,发生上皮-间质转变,因此E-cadherin、Vimentin的表达水平反映了肿瘤细胞EMT的发生程度。在已有的相关研究中,不同细胞所用的TAE226浓度不尽相同,从500 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 至10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不等^[20]。本课题组的前期研究发现,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TAE226对HSC-3细胞的增殖、迁移、侵袭已有明显的抑制效果,本实验为寻找适宜的浓度,设置1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 到10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为检测浓度。在本实验中,TAE226作用下的人OSCC HSC-3细胞的上皮标志物E-cadherin表达增加及间质标志物Vimentin表达下降,且该药物效应具有剂量和时间的依赖性,这说明HSC-3细胞的EMT水平随TAE226的增加而下降。Kurio等^[21]研究发现,TAE226可抑制FAK pTYr(397)和AKT pSer(473)的表达,TYr(397)是FAK最主要的自磷酸化位点。Jones等^[22]发现,磷酸化后的Tyr397通过与Src的SH2结构域结合,进而激活下游PI3K/Akt通路,而后者激活后可以参与诱导细胞EMT的发生,且经TAE226处理后的OSCC细胞,其黏附丧失速度下降,本实验结果与之相符,TAE226可能通过下调FAK pTYr(397)的表达而抑制HSC-3细胞EMT进程的。

综上, TAE226作为FAK的强效抑制剂之一, 能有效抑制OSCC细胞EMT过程, 从而发挥抑制肿瘤细胞侵袭转移能力, 但具体分子机制还需进一步研究。单独使用TAE226或与其他药物联合使用有望成为治疗OSCC的一种有效方法, 为进一步探索口腔肿瘤的防治策略提供参考。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Rustad KC, Wong VW, Gurtner GC. The role of focal adhesion complexes in fibroblast mechanotransduction during scar formation[J]. *Differentiation*, 2013, 86(3): 87-91.
- [2] Wang YJ, Zhang ZF, Fan SH, et al. MicroRNA-433 inhibits oral squamous cell carcinoma cells by targeting FAK[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59): 100227-100241.
- [3] Otani H, Yamamoto H, Takaoka M, et al. TAE226, a bis-anilino pyrimidine compound, inhibits the EGFR-mutant kinase including T790M mutant to show anti-tumor effect on EGFR-mutant non-small cell lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129838.
- [4] Sathiyasekar AC, Chandrasekar P, Pakash A, et al. Overview of immunology of oral squamous cell carcinoma[J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2016, 8(Suppl 1): S8-S12.
- [5] Çankaya H, Güneri P, Epstein JB. Adjunctive methods and devices for clinical detection of oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Health Prev Dent*, 2015, 13(1): 29-39.
- [6] Zhang MX, Zheng SS, Jing CY, et al. S100A11 promotes TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through SMAD2/3 signaling pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Future Oncol*, 2018, 14(9): 837-847.
- [7] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [8] Goñi GM, Epifano C, Boskovic J, et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate triggers activation of focal adhesion kinase by inducing clustering and conformational changes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(31): E3177-E3186.
- [9] Lietha D, Eck MJ. Crystal structures of the FAK kinase in complex with TAE226 and related bis-anilino pyrimidine inhibitors reveal a helical DFG conformation[J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3800.
- [10] Hehlhans S, Lange I, Eke I, et al. 3D cell cultures of human head and neck squamous cell carcinoma cells are radiosensitized by the focal adhesion kinase inhibitor TAE226[J]. *Radiother Oncol*, 2009, 92(3): 371-378.
- [11] Kurio N, Shimo T, Fukazawa T, et al. Anti-tumor effect in human breast cancer by TAE226, a dual inhibitor for FAK and IGF-IR *in vitro* and *in vivo*[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(8): 1134-1146.
- [12] Attramadal CG, Kumar S, Boysen ME, et al. Tumor budding, EMT and cancer stem cells in T1-2/N0 oral squamous cell carcinomas[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(11): 6111-6120.
- [13] Natsuzaka M, Whelan KA, Kagawa S, et al. Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1758.
- [14] Palen K, Weber J, Dwinell MB, et al. E-cadherin re-expression shows *in vivo* evidence for mesenchymal to epithelial transition in clonal metastatic breast tumor cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 43363-43375.
- [15] Hermiston ML, Wong MH, Gordon JI. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system.[J]. *Genes Dev*, 1996, 10(8): 985-996.
- [16] Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma[J]. *Nature*, 1998, 392(6672): 190-193.
- [17] Zhou WH, Gong L, Wu QC, et al. Correction to: PHF8 upregulation contributes to autophagic degradation of E-cadherin, epithelial-mesenchymal transition and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018. doi.org/10.1186/s13046-018-0944-7.
- [18] Murakami M, Imabayashi K, Watanabe A, et al. Identification of novel function of vimentin for quality standard for regenerated pulp tissue[J]. *J Endod*, 2012, 38(7): 920-926.
- [19] Li LF, Wei ZJ, Sun H, et al. Abnormal β -catenin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: a meta-analysis[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(34): 12313-12321.
- [20] Schultze A, Decker S, Otten J, et al. TAE226-mediated inhibition of focal adhesion kinase interferes with tumor angiogenesis and vasculogenesis[J]. *Invest New Drugs*, 2010, 28(6): 825-833.
- [21] Kurio N, Shimo T, Fukazawa T, et al. Anti-tumor effect of a novel FAK inhibitor TAE226 against human oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(11): 1159-1170.
- [22] Jones RJ, Brunton VG, Frame MC. Adhesion-linked kinases in cancer, emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(13): 1595-1606.

(本文编辑 李彩)