

FAK抑制剂对肝癌HCC-LM3细胞骨架重排和侵袭的作用机制

姚红兵¹, 肖芳², 郭威¹, 吴嘉兴¹, 文雪霖¹, 蒋建晖¹, 华贇鹏³

(1. 桂林医学院第二附属医院肝胆外科, 广西 桂林 541199; 2. 解放军联勤保障部队第924医院肿瘤科, 广西 桂林 541002; 3. 中山大学附属第一医院肝外科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】基于FAK/PI3K/Akt通路,探讨FAK抑制剂CT-707对人肝癌HCC-LM3细胞骨架重排、侵袭、迁移及裸鼠皮下移植瘤生长的影响和机制。【方法】HCC-LM3细胞分为Control组、CT-707低剂量(1.5 μmol/L)组、CT-707中剂量(3 μmol/L)组、CT-707高剂量(6 μmol/L)组,采用Transwell小室实验、细胞划痕、MTT实验分别测定细胞侵袭、迁移能力及细胞活力;采用RT-qPCR和Western blot分别检测Palladin、Vimentin、MMP2和MMP9 mRNA及蛋白的表达;Western blot检测p-FAK、FAK、p-PI3K、PI3K、p-Akt及Akt蛋白的表达。使用HCC-LM3细胞系建立裸鼠皮下移植瘤模型,分为模型组、CT-707组(20 mg/kg, 腹腔注射),每组6只,记录肿瘤体积及质量,采用HE染色法观察移植瘤组织结构变化,免疫组化检测移植瘤FAK、PI3K、p-Akt、MMP-2、MMP-9的表达。【结果】与Control组比较,CT-707高、中、低剂量组可显著抑制HCC-LM3细胞侵袭迁移能力,降低细胞活力,下调Palladin、Vimentin、MMP2、MMP9、p-FAK/FAK、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt的表达水平($P < 0.05$),中、高剂量组的效应明显优于低剂量组($P < 0.05$),中、高剂量组间结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,CT-707治疗后可显著降低移植瘤体积和质量以及FAK、PI3K、p-Akt、MMP-2、MMP-9蛋白表达($P < 0.05$),抑瘤率为51.92%。【结论】CT-707可能通过抑制FAK/PI3K/Akt信号通路活性,降低细胞骨架重排及基质金属蛋白酶分泌,从而抑制肝癌细胞侵袭、迁移以及肿瘤生长。

关键词:CT-707;FAK;肝癌;侵袭;迁移

中图分类号:R575 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2021)03-0364-09

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2021.0106

Effect and Mechanism of FAK Inhibitors on Cytoskeleton Rearrangement, Invasion and Migration of HCC-LM3 Cells

YAO Hong-bing¹, XIAO Fang², GUO Wei¹, WU Jia-xing¹, WEN Xue-lin¹,
JIANG Jian-hui¹, HUA Yun-peng³

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. Department of Oncology, The 924th Hospital of PLA Joint Service Support Force Liuzhou Worker's Hospital, Guilin 541002, China; 3. Department of Liver surgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: HUA Yun-peng; E-mail: 13737712516@139.com

Abstract: 【Objective】 To explore the effect of FAK inhibitor CT-707 on the cytoskeleton rearrangement, invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells HCC-LM3 and its mechanism, and the growth of subcutaneous

收稿日期:2021-01-29

基金项目:广西自然科学基金(2018JJA140512)

作者简介:姚红兵,主任医师,研究方向:肝癌基础及临床研究;E-mail: luckstar0503@163.com;华贇鹏,通信作者,教授,主任医师,研究方向:肝癌基础及临床研究;E-mail: hyp0427@163.com

xenografted tumors in nude mice based on the FAK/PI3K/Akt pathway.【Methods】HCC-LM3 cells were divided into Control group, CT-707 low dose (1.5 $\mu\text{mol/L}$) group, CT-707 medium dose (3 $\mu\text{mol/L}$) group, CT-707 high dose (6 $\mu\text{mol/L}$) group. Transwell chamber test, cell scratch, and MTT test were used to determine cell invasion, migration and cell viability. RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of Palladin, Vimentin, MMP2 and MMP9. Western blot was used to detect the expression of p-FAK, FAK, p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt protein. HCC-LM3 cell line was used to establish subcutaneous xenograft tumor models in nude mice, which were divided into model group and CT-707 group (20 mg/kg, ip), with 6 mice in each group. The tumor volume and mass were recorded, the tissue structure changes of the transplanted tumor were observed by HE staining method, and the expression of FAK, PI3K, p-Akt, MMP-2, MMP-9 of the transplanted tumor was detected by immunohistochemistry.【Results】Compared with the control group, the CT-707 high, medium and low dose groups could significantly inhibit the invasion and migration ability, decrease cell viability, significantly down-regulate the expression levels of Palladin, Vimentin, MMP2, MMP9, p-FAK/FAK, p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt, ($P<0.05$), and the effect of the middle and high-dose groups was significantly better than that of the low-dose group ($P<0.05$), and there was no significant difference in the results between the middle and high-dose groups ($P>0.05$). Compared with those in the control group, CT-707 could significantly reduce the volume and quality of transplanted tumors and the protein expression of FAK, PI3K, p-Akt, MMP-2, and MMP-9 in the treatment groups ($P<0.05$), and the tumor inhibition rate was 51.92%.【Conclusion】CT-707 may inhibit the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the activity of FAK/PI3K/Akt signaling pathway, thereby inhibiting cytoskeletal rearrangement and matrix metalloproteinase secretion.

Key words: CT-707; focal adhesion kinase; hepatic carcinoma; invasion, migration

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(3): 364-372]

肝癌是临床常见的恶性肿瘤之一,其病情进展迅速,待临床确诊时大部分已为肝癌晚期。侵袭转移是促进其病情进展的主要原因之一,也是肝癌治疗预后差的主要因素^[1],因此干预转移相关的靶分子已成为肝癌研究领域的重点。黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一种非受体酪氨酸激酶,既往研究表明,FAK可通过PI3K/Akt通路调节肿瘤细胞黏附、侵袭、迁移等过程,是肿瘤发生发展的重要调控因子之一^[2]。CT-707是一种新型的FAK激酶抑制剂,具有良好的抗肝癌细胞增殖作用^[3]。本课题组前期研究表明,CT-707在肝癌动物模型中可抑制肝癌细胞的增殖以及肿瘤形成,促进癌细胞的凋亡^[4],但相应机制尚需深入研究。故本研究拟选取人高转移性肝癌细胞HCC-LM3和裸鼠为研究对象,基于FAK/PI3K/Akt通路,进一步探讨CT-707对肝癌细胞侵袭、迁移能力以及肿瘤生长的影响和机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞及动物 人肝癌细胞系HCC-LM3由上

海生命科学院细胞所提供。12只BALB/c裸鼠购自上海林畅生物有限公司,均为6周龄雌性,于SPF级条件下饲养。实验均通过我院伦理委员会审核、批准。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM (Hyclone SH30023.01),胎牛血清(Hyclone SH30070.03),青链霉素混合液(Solarbio, P1400),逆转录试剂盒(Takara, RR047a), SYBR Green qPCR Mix (Monad, MQ10301), TRIzol Reagent (Invitrogen, 15596026), BCA蛋白定量试剂盒(Solarbio PC0020), ECL化学发光底物(超敏)(Biosharp BL523A), Transwell小室(Corning, 3422), CT-707 (MCE HY-109084), Anti-Palladin antibody (abcam, ab169051), Anti-Vimentin antibody (abcam, ab92547), Anti-MMP2 antibody (abcam, ab97779), Anti-MMP9 antibody (abcam, ab38898), Anti-p-FAK antibody (abcam, ab81298), Anti-FAK antibody (abcam, ab40794), Anti-p-PI3K antibody (CST17366), Anti-PI3K antibody (abcam, ab70912), Anti-p-Akt antibody (CST4060), Anti-Akt antibody (abcam, ab179463), β -actin (abcam, ab8227), MTT (Solarbio, M1020), HE染色试剂盒(Solarbio G1121)。主要仪器:电泳转膜仪

(Bio-Rad PowerPac Basic)、多功能酶标仪(美国 MD FilterMax F3)、凝胶成像系统(上海天能 Tanon 5200)、实时荧光定量 PCR 仪(Agilent Technologies, G8830-64001)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 肝癌细胞系 HCC-LM3 采用含 10 g/L 胎牛血清和 1% 双抗(青霉素 100 U/mL, 链霉素 0.1 mg/mL)的 DMEM, 于 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 隔日传代, 选取生长状态量好的细胞接种于 6 孔板中, 待细胞融合至 60%~70% 时, 进行实验。

1.2.2 分组及给药 HCC-LM3 分为 Control 组、CT-707 低剂量(1.5 μmol/L)组、CT-707 中剂量(3 μmol/L)组、CT-707 高剂量(6 μmol/L)组。细胞给药前换入无血清 DMEM 去血清同步化 24 h, 根据实验分组, 加入相应剂量的含药 DMEM, 于 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。

1.2.3 Transwell 将 Matrigel 胶于 4 °C 过夜融化, 与无血清培养基以 2:1 体积比混匀, 吸取 200 μL 混合液铺于 Transwell 小室上室, 培养箱放置至基质胶凝固。将给药处理后的 HCC-LM3 从培养箱取出, 消化离心后收集, 采用 DMEM 重悬, 调整细胞浓度为 5×10⁵ 个/mL, 取 200 μL 细胞悬液加入上室。在下室加入 500 μL DMEM 全培养基, 放置培养箱中孵育 48 h。采用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 结晶紫染色 15 min, 棉签擦掉上室细胞, 显微镜下拍照并进行计数, 侵袭细胞数取均值。

1.2.4 细胞划痕实验 对数生长期的 HCC-LM3 按每孔 5×10⁵ 个接种于 6 孔板中, 培养至细胞单层铺满板底, 用 200 μL 无菌枪头, 垂直于板底进行划痕, 采用 PBS 清洗去除划下的细胞。细胞经 CT-707 干预后, 倒置显微镜下拍照, 并计算迁移距离。

1.2.5 MTT 实验 各组对数期细胞种植于 96 孔板, 每孔 180 μL, 3 000~10 000 个细胞/孔。置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 温箱培养使细胞贴壁, 培养 24 h 细胞贴壁后加入含不同剂量的 CT-707 培养液, 对照组加入空白培养液。培养箱内孵育 48 h 后, 弃去培养液, 加入 90 μL 培养液, 再加入 10 μL MTT 溶液, 继续培养 4 h。然后吸掉上清, 每孔加入 110 μL Formazan 溶解液, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光值(OD 值)。按下列公式计算细胞活力: 细胞活力(%)=(加药孔平均 OD

值-空白孔平均 OD 值)/(对照孔平均 OD 值-空白孔平均 OD 值)×100%。

1.2.6 RT-qPCR HCC-LM3 细胞经 CT-707 干预后, 弃去培养基, PBS 清洗 2 次, TRIzol 法提取细胞总 RNA, 根据逆转录试剂盒操作说明进行逆转录, 合成 cDNA 后进行 PCR 反应。逆转录条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 min。反应体系为 20 μL, 扩增条件为 95 °C 变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 45 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。PCR 引物见表 1, 以 β-actin 为内参, 通过 2^{-ΔΔCt} 相对定量法计算各基因相对表达水平。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of the primers

Name	Primer sequence	Product/ bp
Palladin	F: ATAGGCAAGGCCACAACCTC	136
	R: CCAGAGGCACTGGAAACTGT	
Vimentin	F: AAACCTTAGGGGCGCTCTTGT	162
	R: GAGGGCTCCTAGCGGTTAG	
MMP2	F: CTGGACTIONAGACCGCTTGGC	217
	R: CAAACAGGTTGCAGCTCTCC	
MMP9	F: TCTATGGTCTCGCCCTGAA	219
	R: CATCGTCCACCGACTCAAA	
β-actin	F: ACAGAGCCTCGCCTTTGCC	250
	R: GAGGATGCCTCTCTTGCTCTG	

MMP: matrix metalloproteinase

1.2.7 Western blot HCC-LM3 细胞经 CT-707 干预后, 加入 300 μL RIPA 细胞裂解液后用刮刀刮取细胞, 置冰上 30 min 后, 低温离心 20 min, 取上清。BCA 法进行蛋白定量, 以每泳道 20 μg 进行样品配置, 100 °C 变性 10 min。SDS 电泳, 湿法转膜, 用 5% 脱脂奶粉进行封闭, 分别加入相应一抗, 4 °C 过夜孵育, TBST 洗膜 3 次, 加入相应属源辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 荧光显色, 采用凝胶成像系统进行拍照, Image J 软件对条带进行灰度值分析。

1.2.8 裸鼠皮下移植瘤模型建立及药物治疗 将对数生长期的 HCC-LM3 消化、离心、重悬, 制成 2.0×10⁷ /mL 悬液, 在常规消毒的裸鼠腋部皮肤行皮

下注射细胞悬液0.2 mL。根据实验动物3R原则,将接种HCC-LM3细胞悬液的裸鼠随机分为模型组及CT-707组,每组6只。CT-707组按照20 mg/kg剂量腹腔注射给药,间隔1 d注射1次,模型组则不做任何处理。分别于给药后9、18、27、36和45 d测定瘤体最长直径(a)和最短直径(b),计算移植瘤的体积(V/mm^3)= $(1/2) \times a \times b^2$ 。给药45 d后处死动物,取出移植瘤组织进行称重,计算抑瘤率($\%$)= $[(\text{模型组平均瘤体质量} - \text{CT-707组平均瘤体质量}) / \text{模型组平均瘤体质量}] \times 100\%$ 。将取出的肿瘤组织于40 g/L多聚甲醛中固定,行石蜡切片。

1.2.9 HE染色 取各组移植瘤组织石蜡切片行HE染色。根据试剂盒说明书操作:二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,蒸馏水浸洗5 min;苏木精染色5 min,冲洗残留染液;滴加体积分数1%盐酸酒精进行分化,冲洗;滴加体积分数1%氨水反蓝,冲洗;浸入伊红染液中染色5 min,冲洗;依次进行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。切片晾干后镜检、拍照。

1.2.10 免疫组化 取各组移植瘤石蜡切片,脱蜡,微波抗原修复后,滴加体积分数3% H_2O_2 ,蒸馏水冲洗干净。滴加封闭液室温孵育,加入一抗4℃过夜孵育。弃去一抗,PBS冲洗,滴加生物素标记的二抗,室温孵育20 min,PBS冲洗。滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液,室温孵育20 min,PBS清洗,DAB显色,终止,自来水反复冲洗,苏木素复染。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察并拍照,Image J软件分析FAK、PI3K、p-Akt、MMP-2、MMP-9的阳性表达。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据统计分析,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,二组计量资料的均数比较,如果每一组资料都呈正态分布并且方差齐性,组间比较采用 t 检验,多组均数比较,各组定量资料都呈正态分布并且方差齐性采用单因素方差分析,差异有统计学意义时采用LSD- t 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CT-707对肝癌细胞活性、侵袭、迁移的作用

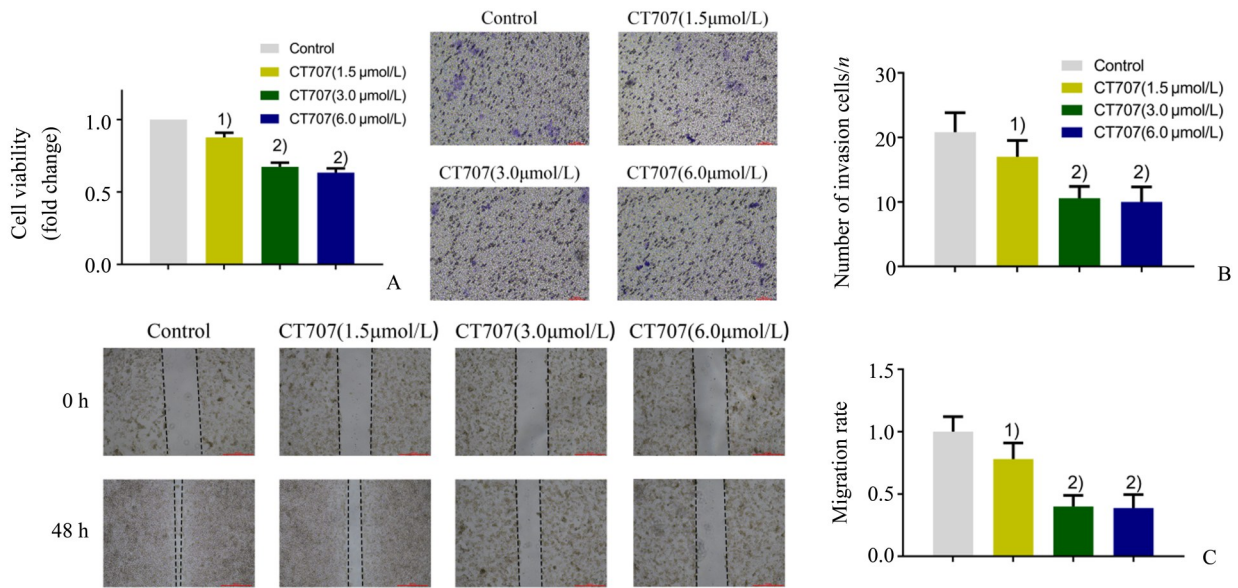
采用MTT、Transwell小室及细胞划痕实验检测

肝癌细胞活力、侵袭及迁移能力。结果显示,与控制组比较,CT-707高、中、低剂量干预HCC-LM3细胞可显著抑制HCC-LM3细胞侵袭($F=22.139, P=0.000$)、迁移能力($F=35.987, P=0.000$),降低细胞活力($F=43.481, P=0.000; P < 0.05$),中、高剂量组的效应明显优于低剂量组($P < 0.05$),中、高剂量组间结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。相较于Control组,CT-707低剂量组的细胞活力($P=0.005$)、侵袭能力($P=0.027$)和迁移能力($P=0.007$)均显著降低,CT707中剂量组的细胞活力($P=0.000$)、侵袭能力($P=0.000$)和迁移能力($P=0.000$)均显著降低,CT707高剂量组的细胞活力($P=0.000$)、侵袭能力($P=0.000$)和迁移能力($P=0.000$)均显著降低。相较于CT-707低剂量组,CT707中剂量组的细胞活力($P=0.000$)、侵袭能力($P=0.001$)和迁移能力($P=0.000$)均显著降低,CT707高剂量组的细胞活力($P=0.000$)、侵袭能力($P=0.000$)和迁移能力($P=0.000$)均显著降低。相较于CT-707中剂量组,CT707高剂量组的细胞活力($P=0.283$)、侵袭能力($P=0.707$)和迁移能力($P=0.869$)差异均无统计学意义(图1)。

2.2 CT-707对肝癌细胞骨架蛋白及基质金属蛋白的作用

采用qPCR及Western blot检测细胞骨架蛋白(Palladin、Vimentin)和基质金属蛋白酶(MMP2和MMP9)的表达水平。结果显示,HCC-LM3经高、中、低剂量处理后,与控制组比较,Palladin(mRNA: $F=14.454, P=0.000$, protein: $F=14.311, P=0.000$)、Vimentin(mRNA: $F=31.711, P=0.000$, protein: $F=21.025, P=0.000$)、MMP2(mRNA: $F=45.341, P=0.000$, protein: $F=18.685, P=0.000$)和MMP9(mRNA: $F=21.953, P=0.000$, protein: $F=15.031, P=0.000$)的表达均显著降低($P < 0.05$),中、高剂量组的效应明显优于低剂量组($P < 0.05$),中、高剂量组间结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。

相较于Control组,CT-707低剂量组的Palladin(mRNA: $P=0.032$, protein: $P=0.011$)、Vimentin(mRNA: $P=0.043$, protein: $P=0.001$)、MMP2(mRNA: $P=0.000$, protein: $P=0.002$)和MMP9(mRNA: $P=0.001$, protein: $P=0.006$)的表达均显著降低,CT707中剂量组的Palladin(mRNA: $P=0.000$, protein: $P=0.000$)、Vimentin(mRNA: $P=$



A: Cell viability test results by MTT method, $F=43.481$, $P=0.000$; B: Results of Transwell assay for cell invasion ability, $F=22.139$, $P=0.000$; C: The results of the scratch test on cell migration ability, $F=35.987$, $P=0.000$, 1) $P<0.05$ compared with Control, 2) $P<0.05$ compared with the CT-707 (1.5 $\mu\text{mol/L}$) group. $\bar{x} \pm s$, $n=5$.

图1 CT-707对HCC-LM3细胞活性、侵袭及迁移的影响

Fig. 1 The effect of CT-707 on the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells

0.003, protein: $P=0.000$)、MMP2 (mRNA: , $P=0.000$, protein: $P=0.000$) 和 MMP9 (mRNA: $P=0.000$, protein: $P=0.000$) 的表达均显著降低, CT707 高剂量组的 Palladin (mRNA: $P=0.000$, protein: $P=0.000$)、Vimentin (mRNA: $P=0.002$, protein: $P=0.000$)、MMP2 (mRNA: , $P=0.000$, protein: $P=0.000$) 和 MMP9 (mRNA: $P=0.000$, protein: $P=0.000$) 的表达均显著降低。

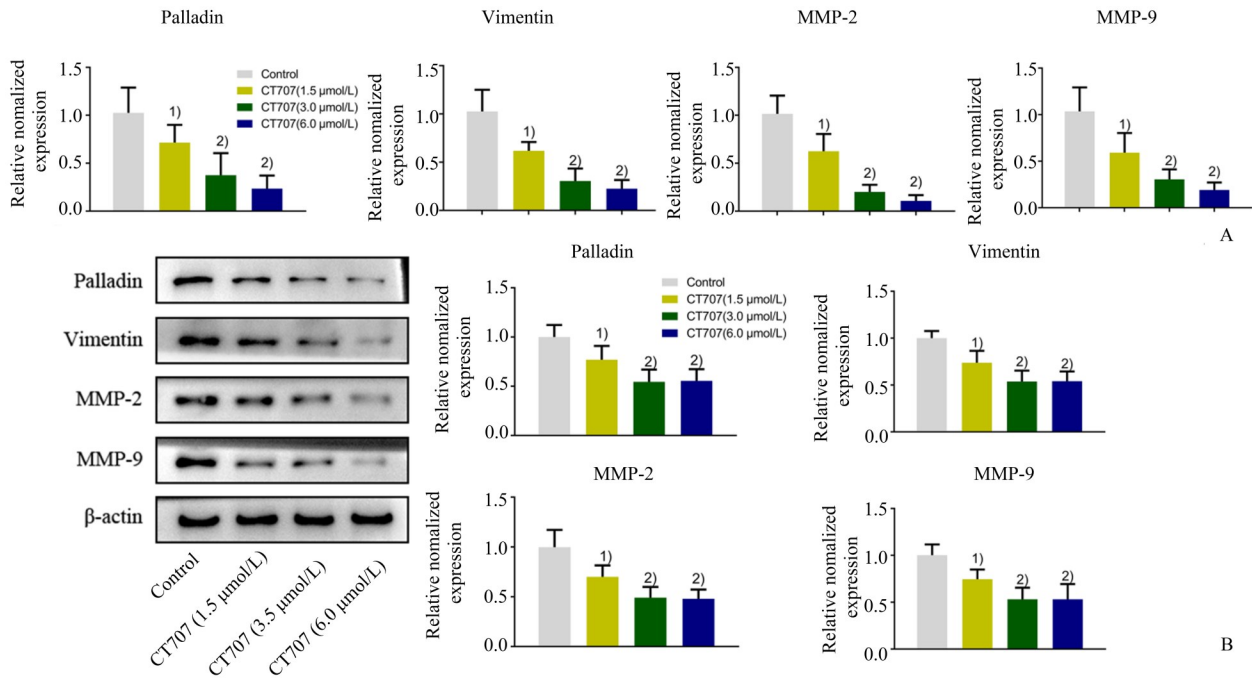
相较于 CT-707 低剂量组, CT707 中剂量组的 Palladin (mRNA: $P=0.020$, protein: $P=0.013$)、Vimentin (mRNA: $P=0.012$, protein: $P=0.009$)、MMP2 (mRNA: , $P=0.000$, protein: $P=0.018$) 和 MMP9 (mRNA: $P=0.023$, protein: $P=0.018$) 的表达均显著降低, CT707 高剂量组的 Palladin (mRNA: $P=0.002$, protein: $P=0.018$)、Vimentin (mRNA: $P=0.001$, protein: $P=0.010$)、MMP2 (mRNA: , $P=0.000$, protein: $P=0.014$) 和 MMP9 (mRNA: $P=0.003$, protein: $P=0.019$) 的表达均显著降低。

相较于 CT-707 中剂量组, CT707 高剂量组的 Palladin (mRNA: $P=0.304$, protein: $P=0.089$)、Vimentin (mRNA: $P=0.675$, protein: $P=0.965$)、MMP2 (mRNA: , $P=0.300$, protein: $P=0.895$) 和 MMP9 (mRNA: $P=0.330$, protein: $P=0.986$) 的表达差异均

无统计学意义(图2)。

2.3 CT-707对FAK/PI3K/Akt信号通路的影响

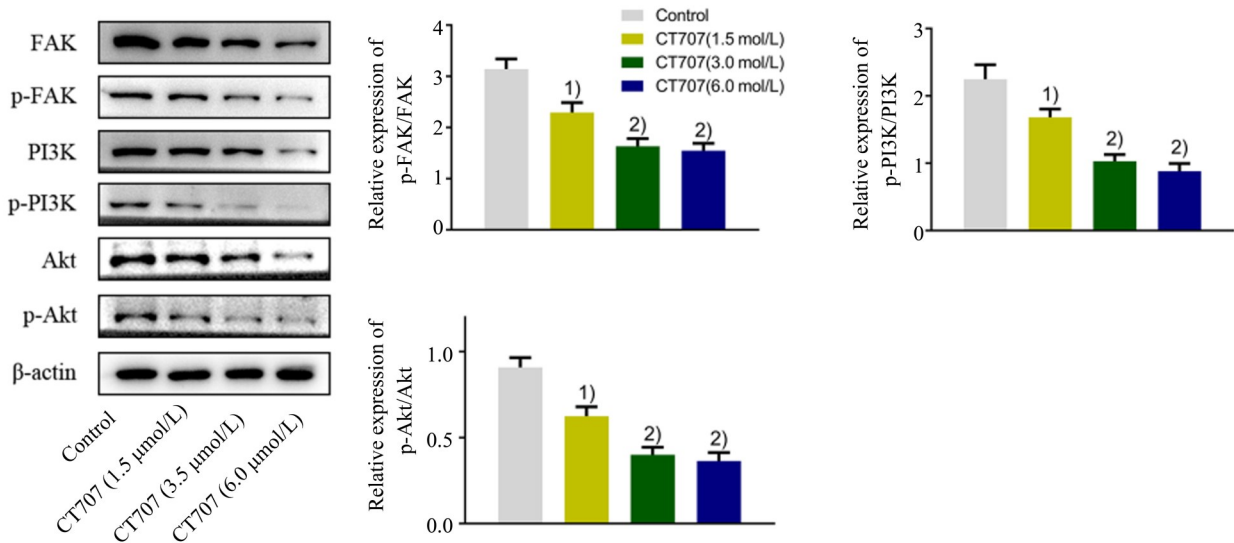
采用 Western blot 检测 FAK、PI3K 和 Akt 蛋白及其磷酸化表达水平。结果表明, HCC-LM3 经高、中、低剂量处理后, 与 Control 组比较, p-FAK/FAK ($F=90.258$, $P=0.000$)、p-PI3K/PI3K ($F=90.909$, $P=0.000$)、p-Akt/Akt 均显著下调 ($F=115.559$, $P=0.000$; $P<0.05$), 中、高剂量组的效应明显优于低剂量组 ($P<0.05$), 中、高剂量组间结果无统计学差异 ($P>0.05$)。相较于 Control 组, CT-707 低剂量组的 p-FAK/FAK ($P=0.000$)、p-PI3K/PI3K ($P=0.000$)、p-Akt/Akt ($P=0.000$) 均显著降低, CT707 中剂量组的 p-FAK/FAK ($P=0.000$)、p-PI3K/PI3K ($P=0.000$)、p-Akt/Akt ($P=0.000$) 均显著降低, CT707 高剂量组的 p-FAK/FAK ($P=0.000$)、p-PI3K/PI3K ($P=0.000$)、p-Akt/Akt ($P=0.000$) 均显著降低。相较于 CT-707 低剂量组, CT707 中剂量组的 p-FAK/FAK ($P=0.000$)、p-PI3K/PI3K ($P=0.000$)、p-Akt/Akt ($P=0.000$) 均显著降低, CT707 高剂量组的 p-FAK/FAK ($P=0.000$)、p-PI3K/PI3K ($P=0.000$)、p-Akt/Akt ($P=0.000$) 均显著降低。相较于 CT-707 中剂量组, CT707 高剂量组的 p-FAK/FAK ($P=0.416$)、p-PI3K/PI3K ($P=0.132$)、p-Akt/Akt ($P=0.270$) 差异均无统计学意义(图3)。



A: qPCR for determining the mRNA of Palladin ($F=14.454, P=0.000$), Vimentin ($F=31.711, P=0.000$), MMP2 ($F=45.341, P=0.000$) and MMP9 ($F=21.953, P=0.000$) in LM3 cells; B: Western blot for determining the protein levels of Palladin ($F=14.311, P=0.000$), Vimentin ($F=21.025, P=0.000$), MMP2 ($F=18.685, P=0.000$) and MMP9 ($F=15.031, P=0.000$) in LM3 cells. 1) $P<0.05$ compared with Control, 2) $P<0.05$ compared with the CT-707 (1.5 μmol/L) group. $\bar{x} \pm s, n=5$.

图2 CT-707对HCC-LM3细胞Palladin、Vimentin、MMP2和MMP9蛋白的作用

Fig. 2 The effect of CT-707 on the Palladin, Vimentin, MMP2 and MMP9 protein of LM3 cells



Western blot for determining the protein levels of p-FAK/FAK ($F=90.258, P=0.000$), p-PI3K/PI3K ($F=90.909, P=0.000$), and p-Akt/Akt ($F=115.559, P=0.000$) in the LM3 cells. 1) $P<0.05$ compared with Control, 2) $P<0.05$ compared with the CT-707 (1.5 μmol/L) group. $\bar{x} \pm s, n=5$.

图3 CT-707对HCC-LM3细胞中FAK/PI3K/Akt信号通路的影响

Fig. 3 The effect of CT-707 on the FAK/PI3K/Akt pathway

2.4 CT-707对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

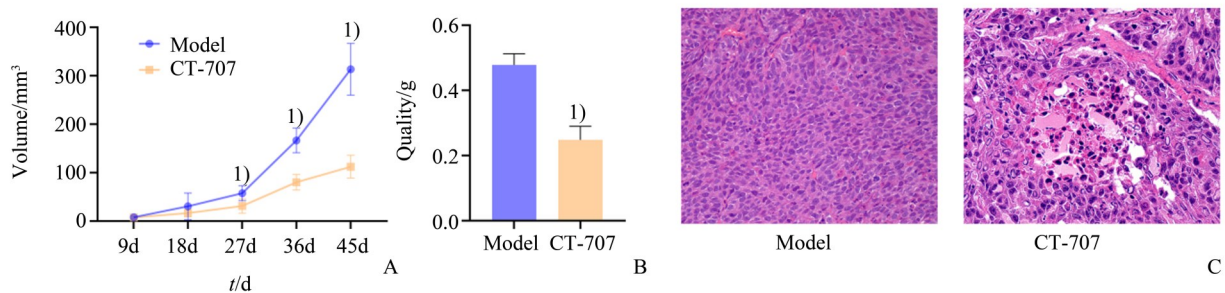
通过计算裸鼠移植瘤体积及质量,结果显示,与模型组相比,CT-707组移植瘤体积[27 d ($t=3.030$, $P=0.013$), 36 d ($t=7.056$, $P=0.000$), 45 d ($t=8.461$, $P=0.000$)]和质量($t=10.510$, $P=0.000$)显著降低($P<0.05$;图4),抑瘤率为51.92%;HE染色结果显示,模型组肿瘤细胞排列紧密、整齐,细胞核清晰可见,CT-707组肿瘤组织坏死增多,肿瘤细胞核消失,细胞排列松散。

2.5 CT-707对裸鼠皮下移植瘤FAK/PI3K/Akt通路关键因子表达的影响

采用免疫组化检测裸鼠皮下移植瘤中FAK、PI3K、p-Akt、MMP-2、MMP-9蛋白的阳性表达,结果显示,相较于模型组,CT-707组FAK($t=5.426$, $P=0.000$)、PI3K($t=7.731$, $P=0.000$)、p-Akt($t=5.930$, $P=0.000$)、MMP-2($t=7.965$, $P=0.000$)、MMP-9($t=7.525$, $P=0.000$)蛋白表达均显著降低($P<0.05$;图5)。

3 讨论

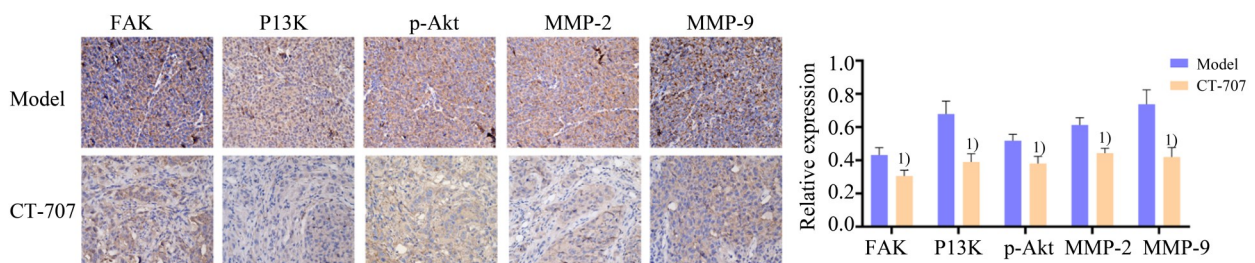
肝癌是我国位列第四的常见恶性肿瘤,且在癌症相关死亡原因中位列第三,该病发病率和死亡率较高,严重影响患者的生活质量及总体生存期^[5]。肿瘤的复发和转移是导致肝癌治疗失败和死亡的主要原因^[6]。肿瘤的转移是肿瘤细胞脱离原发部位,降解周围基底膜从而穿过血管壁或淋巴管壁,随血液或淋巴液运行并聚集于相应器官,在转移器官内生长增殖,最终形成继发性肿瘤的多步骤过程^[7]。肝癌恶性程度高,病情进展迅速,临床确诊大多已处于进展期或晚期,多伴有远端转移及癌栓,术后五年生存率仅为12%~14%。随着肿瘤靶向药物的开发使用,寻求靶向肿瘤侵袭迁移相关蛋白的药物已成为肿瘤研究热点。



A: Growth curve of tumor volume of 9 d ($t=0.343$, $P=0.739$), 18 d ($t=0.474$, $P=0.646$), 27 d ($t=3.030$, $P=0.013$), 36 d ($t=7.056$, $P=0.000$), 45 d ($t=8.461$, $P=0.000$); B: Tumor quality ($t=10.510$, $P=0.000$); C: HE staining. 1) $P<0.05$ compared with Model. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.

图4 CT-707对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

Fig. 4 The effect of CT-707 on the growth of subcutaneously transplanted tumors in nude mice



Immunohistochemical results of FAK ($t=5.426$, $P=0.000$), PI3K ($t=7.731$, $P=0.000$), p-Akt ($t=5.930$, $P=0.000$), MMP-2 ($t=7.965$, $P=0.000$), MMP-9 ($t=7.525$, $P=0.000$) proteins. 1) $P<0.05$ compared with Model. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.

图5 FAK、PI3K、p-Akt、MMP-2、MMP-9蛋白的免疫组化检测结果

Fig. 5 Immunohistochemical results of FAK, PI3K, p-Akt, MMP-2, MMP-9 proteins

据报道,FAK在包括肝癌在内的多种肿瘤组织内高表达,且与肝癌细胞的黏附、播散、迁移和侵袭能力呈正相关^[8]。FAK参与整合素依赖性信号通路,作为胞内信号传导分子,介导细胞内多条信号通路及信号通路的交联反应,进而调节肿瘤细胞的恶性表型和侵袭转移行为^[9]。故抑制FAK的表达及其下游与肿瘤相关的传导通路,是降低肝癌细胞的侵袭迁移能力的重要策略。目前,开发靶向FAK的抑制剂是新型抗肿瘤药物研发的重要领域^[10]。其中CT-707是一种结构新颖的靶向FAK、ALK和Pyk2的多重激酶抑制剂,在促进癌细胞分离实验中呈现良好效果,且与卡博替尼联合使用治疗肝癌,具有协同抗肿瘤作用,其机制为显著抑制由卡博替尼诱导的FAK磷酸化激活^[11]。本研究选取高转移潜能的细胞系HCC-LM3进行CT-707干预,发现CT-707可显著抑制HCC-LM3侵袭、迁移能力,降低癌细胞活力,表明CT-707对肝癌细胞的侵袭、迁移具有明显的抑制作用。另外,在裸鼠皮下移植瘤模型中,我们发现CT-707治疗后可显著降低肿瘤体积及质量,抑瘤率为51.92%,且移植瘤细胞坏死增多,排列松散,进一步证实CT-707可有效抑制肿瘤生长。

肿瘤细胞的侵袭和迁移涉及细胞骨架聚集、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)异常分泌等细胞活动。支架蛋白Palladin和波形蛋白Vimentin是细胞骨架的重要组成部分,与细胞骨架和细胞形态的改变密切相关。研究表明,Palladin在多种癌细胞中高表达,通过调控伪足的形成,影响癌细胞的迁移侵袭,从而促进肿瘤的转移^[12]。而Vimentin的表达水平与肝癌细胞的转移能力呈正相关,在肿瘤细胞增殖、迁移和黏附中具有关键作用,并与癌症的复发密切相关^[13]。MMPs是一类能降解细胞外基质的高度保守蛋白水解酶,在肿瘤的侵袭转移中具有重要意义,可通过降解破坏靠近肿瘤表面的细胞外基质,使肿瘤细胞向周围组织浸润,最终导致肿瘤局部侵袭和远端转移^[14]。其中,

MMP2和MMP9在肝癌组织中高表达,通过调节肝癌细胞和基质的黏附等方式加速肝癌的侵袭转移^[15-16]。因此,本研究选取Palladin、Vimentin、MMP2及MMP9作为肝癌细胞发生侵袭转移的标志蛋白。HCC-LM3细胞经CT-707干预后,Palladin、Vimentin、MMP2及MMP9蛋白表达均显著下调,且动物实验也显示裸鼠移植瘤模型经CT-707治疗后,显著降低了肿瘤组织中MMP2及MMP9阳性表达,表明CT-707可通过降低骨架蛋白及MMPs的表达,进而降低细胞的侵袭及迁移能力,从而发挥抑癌作用。

FAK可通过多条信号通路参与细胞骨架重排及MMPs的分泌过程,其中PI3K/Akt是FAK经典下游通路,参与调控肿瘤的增殖、黏附及迁移,在肝癌的发生发展过程中发挥重要作用^[17]。Palladin、Vimentin是Akt下游蛋白,激活Akt可直接促进Palladin、Vimentin的表达^[18-19]。研究表明,抑制PI3K/Akt信号通路还可进一步抑制MMP2、MMP9的表达,抑制肝癌细胞侵袭迁移^[20]。由此,我们推测CT-707可能通过调控FAK/PI3K/Akt信号通路活性从而抑制肝癌细胞侵袭迁移。通过进一步实验,本研究发现HCC-LM3细胞经CT-707干预后,p-FAK/FAK、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt均显著下降,表明抑制FAK/PI3K/Akt信号通路活性是CT-707发挥抑癌作用的关键机制。为了进一步验证CT-707抑制肝癌细胞侵袭、转移的机制,我们进行了裸鼠皮下成瘤实验,发现模型鼠经CT-707治疗后,FAK、PI3K、p-Akt蛋白表达均显著降低,表明CT-707可通过抑制FAK/PI3K/Akt信号通路活性进而抑制肿瘤的形成。

综上所述,本研究证实FAK新型抑制剂CT-707可抑制肝癌细胞的侵袭、迁移以及肿瘤生长,其机制为抑制FAK/PI3K/Akt信号通路活性,从而抑制细胞骨架重排及MMPs分泌,表明CT-707作为一种FAK靶向抑制剂具有良好的癌细抑制作用,可能是潜在的肿瘤靶向药物,值得深入研究。

参考文献

[1] Casadei GA, Foschi FG, Conti F, et al. Immune inflammation indicators and ALBI score to predict liver cancer in HCV-patients treated with direct-acting anti-

virals[J]. Dig Liver Dis, 2019, 51(5): 681-688.

[2] 刘伟,杭春玖,薛同敏,等.黏着斑激酶与肝癌侵袭、转移的研究进展[J].中华普通外科学文献(电子

- 版), 2015, 9(2): 79-82.
- Liu W, Hang CJ, Xue TM, et al. Progress on relationship between focal adhesion kinase and invasion metastasis of hepatoma [J]. *Chin Arch Gen Surg (Electronic Edition)*, 2015, 9(2): 79-82.
- [3] Zhu H, Wang DD, Yuan T, et al. Multikinase inhibitor CT-707 targets liver cancer by interrupting the hypoxia-activated IGF-1R-YAP axis [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(14): 3995-4006.
- [4] 姚红兵, 郭威, 吴嘉兴, 等. 新型黏着斑激酶抑制剂 CT-707 对肝癌细胞的影响及机制研究 [J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(17): 2360-2364.
- Yao HB, Guo W, Wu JX, et al. The research of the influence and molecular mechanism of the adhesion kinase (FAK) inhibitor Ct-707 on liver cancer cells [J]. *J Pract Med*, 2020, 36(17): 2360-2364.
- [5] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [6] Huang KGNBD. Correlation between FAK and EGF-Induced EMT in colorectal cancer cells [J]. *Oncol*, 2020; 2020-5428920.
- [7] Cao H, Xu E, Liu H, et al. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review [J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(8): 557-569.
- [8] 李匡凡, 杨真真, 李勇. 黏着斑激酶和磷酸酶基因蛋白在肝细胞癌中的表达及意义 [J]. *广东医学*, 2014, 35(14): 2216-2219.
- Li KF, Yang ZZ, Li Y. Expression and significance of focal adhesion kinase and phosphatase gene protein in hepatocellular carcinoma [J]. *Guangdong Med J*, 2014, 35(14): 2216-2219.
- [9] Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, et al. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration [J]. *Nature Cell Biol*, 2000, 2(5): 249-256.
- [10] Berdan CA, Ho R, Lehtola HS, et al. Parthenolide covalently targets and inhibits focal adhesion kinase in breast cancer cells [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26(7): 1027-1035.
- [11] Wang DD, Chen Y, Chen ZB, et al. CT-707, a novel FAK inhibitor, synergizes with cabozantinib to suppress hepatocellular carcinoma by blocking cabozantinib-induced FAK activation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(12): 2916-2925.
- [12] Mansour MA, Asano E, Hyodo T, et al. Special AT-rich sequence-binding protein 2 suppresses invadopodia formation in HCT116 cells via palladin inhibition [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 332(1): 78-88.
- [13] 曹文玺, 金慧涵, 季沉. 缺氧对肝癌上皮细胞 E-Cadherin、间质细胞 Vimentin 表达的影响 [J]. *中国当代医药*, 2015, 22(35): 4-6.
- Cao WX, Jin HH, Ji Y. Influence of hypoxia on expressions of E-Cadherin of epithelial cell and Vimentin of interstitial cell from liver cancer [J]. *Chin Modern Med*, 2015, 22(35): 4-6.
- [14] Conlon GA, Murray GI. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis [J]. *J Pathol*, 2019, 247(5): 629-640.
- [15] Scheau C, Badarau IA, Costache R, et al. The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma [J]. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)*, 2019, 2019: 9423907.
- [16] Peltonen R, Hagström J, Tervahartiala T, et al. High expression of MMP-9 in primary tumors and high preoperative mpo in serum predict improved prognosis in colorectal cancer with operable liver metastases [J]. *Oncology*, 2021, 99(3): 144-160.
- [17] Yang Q, Ji G, Li J. STEAP2 is down-regulated in breast cancer tissue and suppresses PI3K/AKT signaling and breast cancer cell invasion in vitro and in vivo [J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2020, 21(3): 278-291.
- [18] Ryu D, Lee C. Expression quantitative trait loci for PI3K/AKT pathway [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(1): e5817.
- [19] Liu S, Huang J, Zhang Y, et al. MAP2K4 interacts with Vimentin to activate the PI3K/AKT pathway and promotes breast cancer pathogenesis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(22): 10697-10710.
- [20] Liu Q, Yang P, Tu K, et al. TPX2 knockdown suppressed hepatocellular carcinoma cell invasion via inactivating AKT signaling and inhibiting MMP2 and MMP9 expression [J]. *Chin J Cancer Res*, 2014, 26(4): 410-417.