

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.05.009

黏着斑激酶抑制剂 TAE226 对人口腔鳞癌细胞增殖的影响

廖鹏程¹, 刘萍², 曾琴², 邹湘渝², 聂敏海^{2△}

(1. 西安交通大学医学院附属三二〇一医院口腔科门诊, 陕西汉中 723000; 2. 西南医科大学附属口腔医院/口颌面修复重建和再生实验室, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 研究黏着斑激酶抑制剂 TAE226 对口腔鳞癌 HSC-3 细胞增殖能力的影响, 为临床治疗提供参考。**方法** (1) 采用 CCK-8 法检测不同浓度的 TAE226 (1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 作用细胞 12、24、36、48、60、72 h 后的光密度(OD)值, 计算不同浓度的 TAE226 在不同时间对该细胞增殖的抑制率; (2) 采用流式细胞术检测不同浓度的 TAE226 对口腔鳞癌细胞周期和凋亡的影响; (3) 采用 SPSS17.0 软件对数据进行统计学分析。**结果** (1) CCK-8 法增殖实验结果: 与对照组相比, 不同浓度的 TAE226 作用于人口腔鳞癌 HSC-3 细胞株后, 均对细胞增殖有抑制作用 ($P < 0.05$)。当 TAE226 的浓度为 1、5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 在 12 h 时细胞增殖抑制率与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但是随着时间的延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着 TAE226 浓度的逐渐升高, 其对口腔鳞癌 HSC-3 细胞增殖的抑制作用逐渐增强 ($P < 0.05$)。 (2) 流式细胞术结果: TAE226 可以促进口腔鳞癌细胞的凋亡, 且与细胞的浓度呈正相关。TAE226 可以将 HSC-3 细胞周期阻滞于 G₂ 期。**结论** TAE226 可以有效地抑制 HSC-3 细胞增殖, 促进细胞的凋亡, 阻滞细胞周期于 G₂ 期。

[关键词] 人口腔鳞状细胞癌; 黏着斑激酶; TAE226; 增殖; 凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R739.85 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)05-0760-05

Effect of adhesion spot kinase inhibitor TAE226 on proliferation of human oral squamous cell carcinoma cells

LIAO Pengcheng¹, LIU Ping², ZENG Qin², ZOU Xiangyu², NIE Minhai^{2△}

(1. Department of Dentistry, Affiliated 3201 Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Hanzhong, Shaanxi 723000, China; 2. Laboratory of Oromaxillofacial Reconstruction and Regeneration, Affiliated Stomatology Hospital, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of adhesion spot kinase inhibitor TAE226 on the proliferation ability of oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells to provide reference for clinical treatment. **Methods** (1) The CCK-8 assay was used to detect the optical density(OD) of HSC-3 cells acted by different concentrations of TAE226 (1, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) for 12, 24, 36, 48, 60, 72 h respectively. The cell proliferation inhibition rates of different concentrations of TAE226 on the cellular proliferation were calculated; (2) the effect of different concentrations of TAE226 on the cell cycle and apoptosis of oral squamous cell carcinoma was examined by adopting the flow cytometry. (3) The data were analyzed by adopting the SPSS17.0 software. **Results** (1) The CCK-8 proliferation experiment results showed that compared with the control group, the different concentrations of TAE226 acting on human oral squamous cell carcinoma cell line HSC-3 had the inhibiting effect on cell proliferation ($P < 0.05$). When the concentration of TAE226 was 1 $\mu\text{mol/L}$ and 5 $\mu\text{mol/L}$, there was no statistically difference significance in the cellular proliferation inhibiting rate at 12 h compared with the control group. But with the time extension, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). With gradual increase of the TAE226 concentration, its inhibitory effect on oral squamous cell carcinoma HSC-3 cell proliferation was increased gradually ($P < 0.05$). (2) The flow cytometry results showed that TAE226 could promote the apoptosis of oral squamous carcinoma cells, moreover had a positive correlation with the cell concentration. Meanwhile, TAE226 could block the cell cycle at G₂ phase. **Conclusion** TAE226 can effectively inhibit the cell proliferation of HSC-3 cells, promote the cell apoptosis and block the cell cycle in G₂ phase.

[Key words] human oral squamous cell carcinoma; FAK; TAE226; proliferation; apoptosis; cell cycle

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)简称口腔鳞癌, 是头颈部最易好发的以影响口

腔黏膜衬里上皮为主的恶性肿瘤^[1]。在世界上常见的肿瘤致死排行榜中位居第 6^[2]。在发展中国家, 它

是第 3 常见的恶性肿瘤^[1]。随着对口腔鳞癌研究的不断深入,以及在临床上治疗方法的不断改进,患者的术后生存率有了一定的改善,但仍在 50%左右^[3]。黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)是一种位于细胞内的非受体酪氨酸激酶^[4]。它与细胞的黏附密切相关,同时介导多条信号通路,与肿瘤的预后有着重要关系。TAE226 是一种双苯胺嘧啶类化合物,已被开发成为一种小分子酪氨酸激酶抑制剂,具有三磷酸腺苷(ATP)竞争结合性,它的作用靶点为 FAK^[5]。本实验采用 CCK-8 法检测不同浓度的 TAE226 干预 HSC-3 细胞后,对细胞增殖能力的影响。采用流式细胞术检测其对细胞凋亡和细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人口腔鳞癌 HSC-3 细胞株由四川大学华西口腔医学院、口腔疾病研究国家重点实验室惠赠。DMEM 培养液(Hyclone,赛默飞世尔生物化学制品有限公司),优质胎牛血清(北京索莱宝生物科技有限公司),TAE226(Selleck,上海蓝木化工有限公司),DMSO(美国 AMRESCO 公司),CCK-8 试剂盒(DojinDo,日本同仁化学研究所),细胞周期检测试剂盒(南京凯基生物)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HSC-3 细胞株培养于含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养液中,置于 37 °C,5%CO₂ 培养箱中培养,定期换液。

1.2.2 TAE226 配置 TAE226 溶解于 DMSO 中,调整浓度为 1 mmol/L,再用培养液配置成 1、5、10、20 μmol/L 的不同浓度贮存液,将其置于 4 °C 冰箱备用,母液放于 -80 °C 冰箱中长期保存。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期细胞,调整细胞密度为 5×10⁴ 个/mL,将细胞悬液接种于 96 孔板上。设置对照组和实验组。实验组每孔加入 100 μL 细胞悬液,每组设 6 个复孔,培养 24 h,吸去原培养液,对照组每孔加入新鲜培养液,实验组加入不同浓度的 TAE226 共 100 μL,继续培养 12、24、36、48、60、72 h。待药物共培养结束后,弃去孔中液

体。实验组、对照组及空白组加入含有 10% CCK-8 液的新鲜培养液 100 μL。于波长 450 nm 的酶标仪上测光密度(OD)值。实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期分布 取对数生长期细胞,调整细胞密度为 3×10⁵ 个/mL,将细胞悬液接种于 6 孔板中,培养 24 h。弃原培养液,对照组每孔加入新鲜培养液 2 mL,实验组每孔加入不同浓度的 TAE226 2 mL,将 6 孔板放入培养箱中继续培养 24 h。取出 6 孔板,吸除废液,漂洗 2~3 次,0.25% 胰蛋白酶消化细胞 3~4 min,低速离心收集细胞,加入预冷 70% 乙醇,4 °C 固定过夜。低速离心,吸除上清液。每孔加入染色缓冲液 500 μL,重悬细胞。加入碘化丙啶染色液各孔 25 μL,RNase A 各孔 10 μL,混匀,分散细胞。避光 37 °C 温浴 30 min。流式细胞仪在激发波长 488 nm 处检测细胞周期分布。实验重复 3 次。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况 细胞种板和细胞收集同前细胞周期实验。收集细胞后,PBS 液漂洗 2~3 次,镜下调整细胞密度为 (1~5)×10⁵ 个/mL。加入 500 μL 的 Binding Buffer,混匀。加入 5 μL 的 Annexin-FITC 混匀后,加入 5 μL Propidium Iodide,混匀。室温,避光反应 5~15 min。于 1 h 内用流式细胞仪检测发射波长 530 nm、激发波长 488 nm 下的细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TAE226 对口腔鳞癌 HSC-3 细胞增殖的抑制作用 当 TAE226 的浓度为 1 μmol/L,在 12 h 时与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但是随着时间的延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着 TAE226 的浓度增至 5、10、20 μmol/L 时,在同一浓度下,随着作用时间的延长,其对 HSC-3 细胞增殖的抑制作用逐渐增强;同一时间下,随着 TAE226 浓度的增加,TAE226 对细胞增殖的抑制作用逐渐增强($P < 0.05$),见表 1 和图 1。

表 1 不同浓度的 TAE226 于不同时间下 HSC-3 细胞的 OD 值($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	对照组	TAE226				F	P
		1 μmol/L	5 μmol/L	10 μmol/L	20 μmol/L		
12	0.67±0.07	0.65±0.04	0.61±0.02	0.55±0.03	0.45±0.03	70.370	0.00
24	1.04±0.13	0.93±0.05	0.78±0.02	0.69±0.02	0.59±0.05	54.897	0.00
36	1.48±0.11	0.96±0.05	0.83±0.04	0.72±0.02	0.56±0.09	214.646	0.00
48	1.66±0.18	1.21±0.08	0.96±0.09	0.79±0.01	0.63±0.18	60.399	0.00
60	2.21±0.19	1.23±0.07	1.03±0.09	0.87±0.07	0.65±0.02	302.619	0.00
72	2.58±0.31	1.51±0.17	1.23±0.07	0.91±0.07	0.69±0.05	139.265	0.00

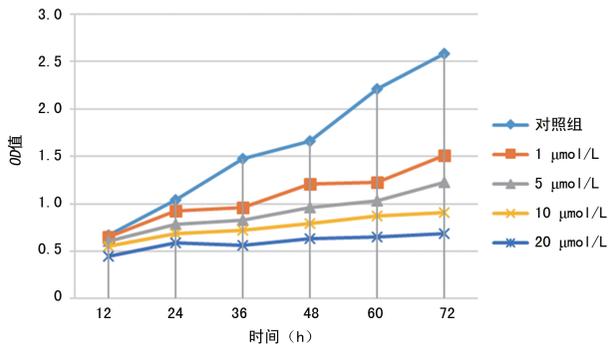
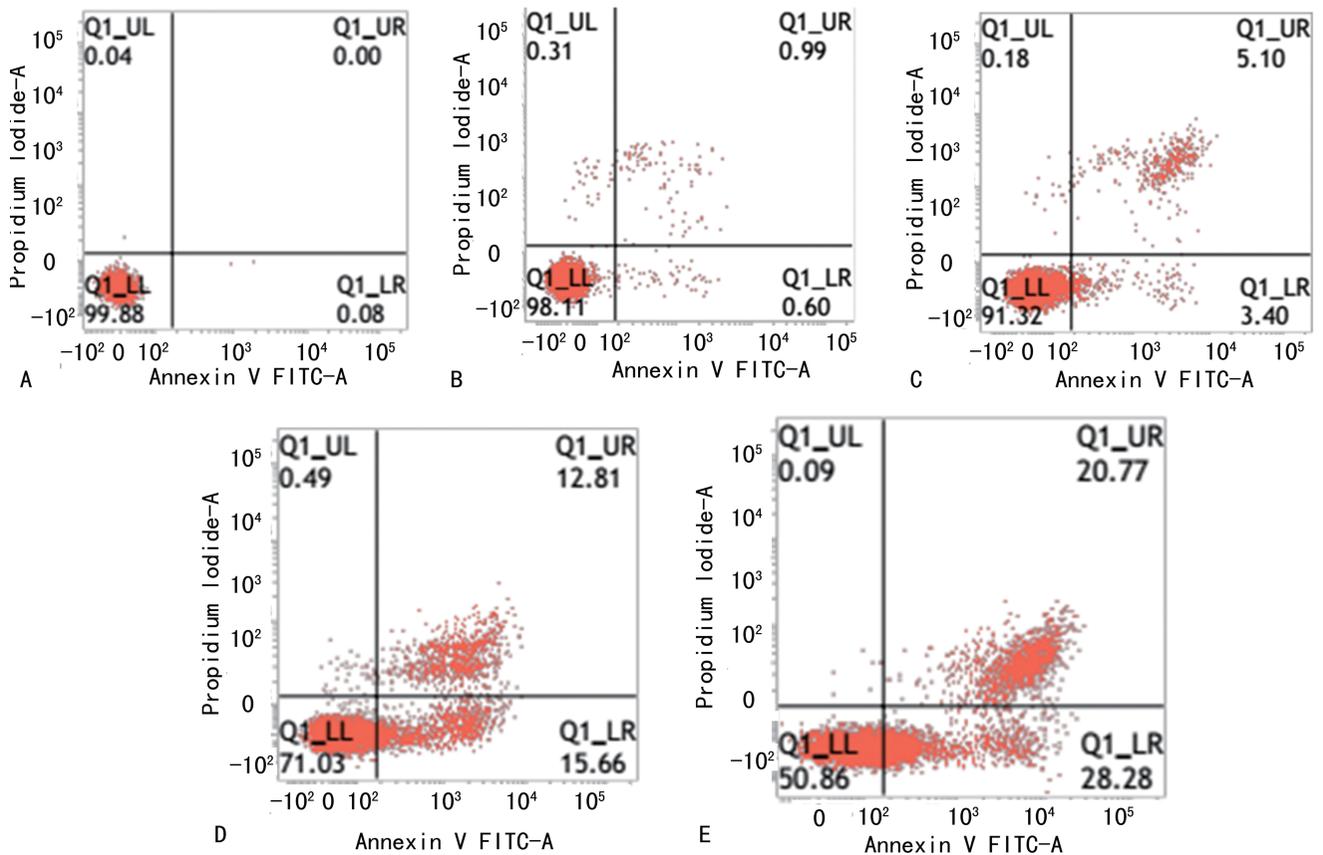


图 1 不同浓度的 TAE226 于不同时间下 HSC-3 细胞的 OD 值

2.2 TAE226 对口腔鳞癌 HSC-3 细胞凋亡的影响
在 TAE226 作用于 HSC-3 细胞 24 h 后, TAE226 浓度为 1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的实验组凋亡率分别为

1.59%、8.50%、28.47%、49.05%。与对照组的 0.08% 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 随着 TAE226 浓度的不断增高, 其对 HSC-3 的促凋亡作用越明显, 见图 2。

2.3 TAE226 对口腔鳞癌 HSC-3 细胞周期的影响
在细胞周期各阶段, 对照组与 1 $\mu\text{mol/L}$ TAE226 实验组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而对照组与其余各实验组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。在 G_1 期和 S 期比较时发现 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。当 TAE226 的浓度达到 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞周期 G_1 期和 S 期所占比例逐渐降低, 而 G_2 期所占比例逐渐升高。组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2、图 3。

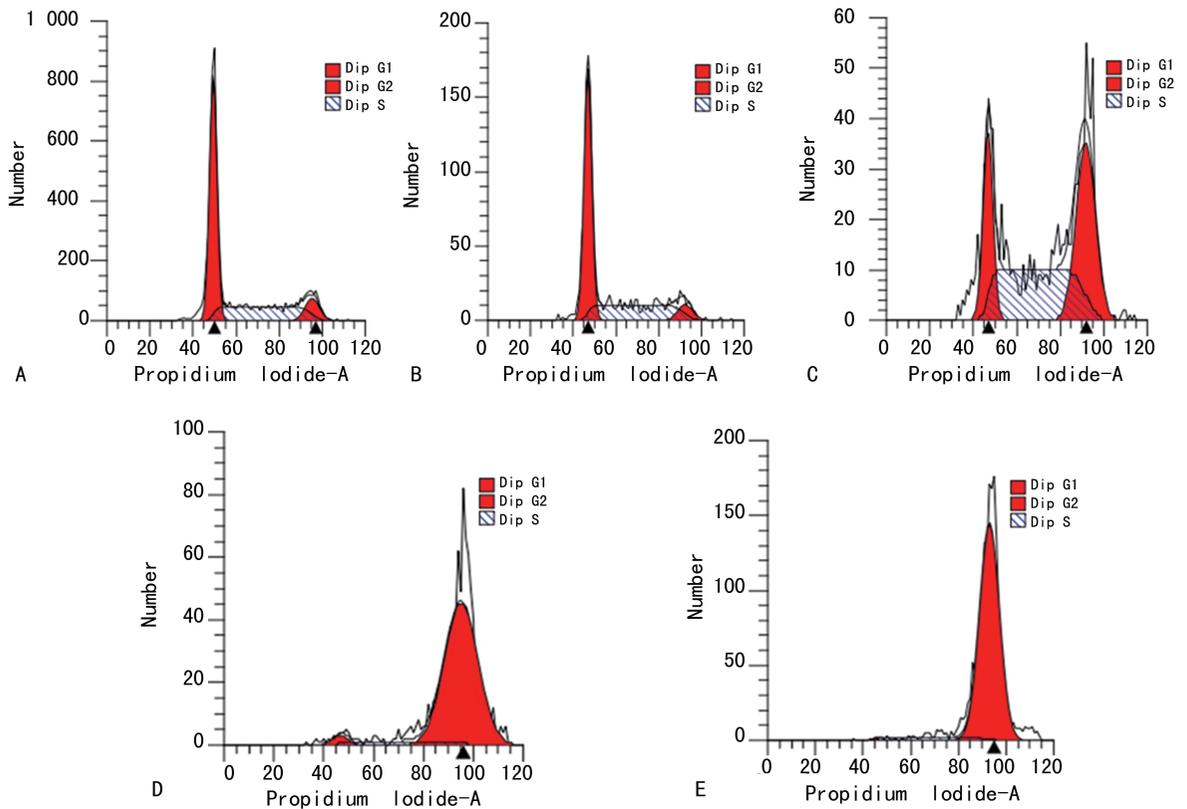


A: 对照组; B: TAE226 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 实验组; C: TAE226 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 实验组; D: TAE226 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 实验组; E: TAE226 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组

图 2 不同浓度的 TAE226 对 HSC-3 细胞凋亡的影响

表 2 TAE226 对 HSC-3 细胞周期的影响

细胞周期	对照组	TAE226 的浓度				F	P
		1 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$		
G1	59.71 ± 5.85	57.48 ± 0.98	20.39 ± 0.89	2.85 ± 0.14	0.25 ± 0.08	343.371	0.00
S	32.26 ± 2.51	34.45 ± 1.78	42.92 ± 1.58	8.17 ± 2.49	5.55 ± 1.86	194.829	0.00
G2	8.03 ± 3.34	8.07 ± 1.09	36.69 ± 0.72	88.98 ± 2.63	94.19 ± 1.78	1 162.955	0.00



A:对照组;B:TAE226 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 实验组;C:TAE226 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 实验组;D:TAE226 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 实验组;E:20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组

图 3 TAE226 对 HSC-3 细胞周期的影响

3 讨论

口腔鳞癌是头颈部最易好发的恶性肿瘤,全世界每年有 65 万以上的人被诊断为口腔鳞癌,同时每年约有 35 万的人死于口腔鳞癌^[6],近年来随着人们生活环境和生活方式的改变,口腔鳞癌的发生趋于年轻化。在过去的十年里,口腔鳞癌的发病率有所下降,但近 20 年来患者的 5 年生存率仅有约 5% 的提升,生存率的上升基本处于停滞状态^[7]。越来越多的学者将目光集中于高效药物和早期诊断的灵敏指标的寻找。

FAK 在不同来源的肿瘤细胞中随着肿瘤的分化程度及转移状态的不同,它的核酸和蛋白的表达量也不尽相同,但目前多认为在恶性程度高的肿瘤或者已经发生了转移的肿瘤组织中,FAK 的表达有显著的提高。在恶性肿瘤的早期事件中可以发现 FAK 的过表达,并且这种现象会持续存在^[8]。WANG 等^[2]通过对 108 例口腔鳞状细胞癌患者的病变组织和正常组织的比较研究中发现,miR-433 可通过 ERK/MAPK 信号通路来下调 FAK,从而抑制 SCC-9 细胞增殖、迁移、侵袭。CHANG 等^[9]通过提高生长缓慢时期的 SCC-25 细胞的 FAK 表达量,可以促进导致雌激素受体 α (estrogen receptor alpha, ERA) 的磷酸化、转录活性和细胞生长速率的增加。实验中通过降低

生长快速时期的 SCC-25 中 FAK 表达量,可以降低 ERA 的磷酸化和细胞的活性,抑制细胞的生长。由此说明口腔鳞癌的活性可被 FAK/AKT 信号增强,这也是其促进细胞生长的关键^[9]。CHIU 等^[10]研究发现相比于侵袭性低的 SCC-4 细胞,侵袭性强的 OECM-1 细胞的 FAK 和 pY397 高表达,同时与 GDP 相关联的 Rac-1 也高表达。当沉默 OECM-1 细胞中的 FAK, Rac-1 表达量明显降低,而这一变化也使得细胞的侵袭性降低,由此说明了抑制 FAK 在 Py397 位点的磷酸化或降低 Rac-1 的活性,可作为治疗转移性口腔鳞状细胞癌的一种治疗策略。本项研究旨在探索 FAK 的抑制剂 TAE226 对口腔鳞癌细胞的相关作用,以期寻找出合适的高效治疗药物。

TAE226 可通过阻断 FAK 与 ATP 的连接位点及 FAK 的 Y397 位点和 Y861 位点的自磷酸化,从而抑制 FAK 的活性^[11]。BEIERLE 等^[12]研究得出用 TAE226 处理了人神经母细胞瘤细胞后,FAK 磷酸化水平呈浓度依赖性下降,细胞活力下降,细胞周期阻滞,细胞的凋亡增加。

本实验中的研究发现 TAE226 可以有效地抑制细胞增殖,在浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时效果并不明显,但是随着浓度的不断增加,抑制效果越来越强。这与文献^[2,9]结果相一致。同时 TAE226 可以促进细胞凋亡

事件的发生,而这与其影响了细胞周期的关系密不可分,在细胞周期实验中发现,TAE226 将 HSC-3 细胞阻滞于 G₂ 期,这与 BEIERLE 等^[12]的研究相吻合。处于 G₂ 期的细胞已经完成了 DNA 的复制,处于相关蛋白的形成阶段及细胞的有丝分裂阶段,由此可以看出 TAE226 的作用位点主要与蛋白及 RNA 相关,同时也再次验证了上述增殖实验的结果,这也为后续的研究提供了一定的依据。

本实验证实了 TAE226 可以抑制口腔鳞癌细胞 HSC-3 细胞株的增殖,促进细胞的凋亡,同时将细胞阻滞于 G₂ 期,导致细胞的活力下降。以上结论可为口腔鳞癌的机制研究提供一定的理论依据。但是其对蛋白分子水平和 RNA 等基因水平的具体影响和机理还未可知,需要进一步的研究。

参考文献

- [1] ABU-GHANEM S, HOROWITZ G, ABERGEL A, et al. Elective neck irradiation versus observation in squamous cell carcinoma of the maxillary sinus with N0 neck: A meta-analysis and review of the literature[J]. *Head Neck*, 2015, 37(12):1823-1828.
- [2] WANG Y J, ZHANG Z F, FAN S H, et al. MicroRNA-433 inhibits oral squamous cell carcinoma cells by targeting FAK[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59):100227-100241.
- [3] ZHANG D, WU H, ZHANG X, et al. Phosphoglycerate Mutase 1 predicts the poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and is associated with cell migration[J]. *J Cancer*, 2017, 8(11):1943-1951.
- [4] CHI A C, DAY T A, NEVILLE B W. Oral cavity and oropharynx -geal squamous cell carcinoma-an update[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65 (5):401-421.
- [5] 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.

- [6] RAYESS H M, XI Y, GARSHOTT D M, Brownell A L, et al. Benzethonium chloride activates ER stress and reduces proliferation in HNSCC[J]. *Oral Oncol*, 2018, 76 (1):27-33.
- [7] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):E359-386.
- [8] XIA J, LV N, HONG Y, et al. Increased expression of focal adhesion kinase correlates with cellular proliferation and apoptosis during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis[J]. *J Oral Pathol Med*, 2009, 38 (6):524-529.
- [9] CHANG Y L, HSU Y K, WU T F, et al. Regulation of estrogen receptor alpha function in oral squamous cell carcinoma cells by FAK signaling[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(4):555-565.
- [10] CHIU Y W, LIOU L Y, CHEN P T, et al. Tyrosine 397 phosphorylation is critical for FAK-promoted Rac1 activation and invasive properties in oral squamous cell carcinoma cells[J]. *Lab Invest*, 2016, 96(3):296-306.
- [11] 陈瑛, 王丹丹, 朱虹. 抗肿瘤新靶点黏着斑激酶 FAK 及其抑制剂研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(2):255-260.
- [12] BEIERLE E A, TRUJILLO A, NAGARAM A. TAE226 inhibits human neuroblastoma cell survival[J]. *Cancer Invest*, 2008, 26(2):145-151.

(收稿日期:2018-09-18 修回日期:2018-11-06)

(上接第 759 页)

- [6] 彭麒麟, 耿建国, 邹大威, 等. 糖肾宁对高糖培养的小鼠系膜细胞 TGF- β 1 和 P38MAPK 表达的影响[J]. *环球中医药*, 2017, 10(3):265-269.
- [7] 陈纪言, 傅国胜, 傅向华, 等. 血管紧张素转换酶抑制剂在冠心病患者中应用中国专家共识[J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(5):420-425.
- [8] 朱清, 萨仁高娃, 岳欣, 等. RAS 拮抗剂调节血管平滑肌细胞增殖、凋亡因子表达[J]. *中国公共卫生*, 2012, 28(5):633-636.
- [9] LEE S, LIM H J, PARK H Y, et al. Berberine inhibits rat

vascular smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and improves neointima formation after balloon injury in vivo[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 186(1):29-37.

- [10] 李承德, 王煜, 曲敬蓉, 等. 黄芪多糖对糖尿病大鼠肾脏 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(4):512-516.
- [11] 徐云, 陈雪辉, 尹清风, 等. TGF- β 1/SGK1 信号通路在糖尿病肾病中的作用[J]. *中国医师杂志*, 2017, 19(10):1483-1487.

(收稿日期:2018-09-22 修回日期:2018-11-10)