

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.002

黏着斑激酶在 HUVEC 的增殖、迁移、凋亡和毛细血管样结构形成中的作用

蒲盛蓝, 刘代顺, 龚玲, 吴杨, 朱红兰, 黄桂川, 张威(遵义市第一人民医院呼吸与危重症科, 贵州遵义 563002)

[摘要] **目的:** 探讨以黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)特异性抑制剂 TAE226 处理或 siRNA 沉默 FAK 基因对人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的增殖、迁移、细胞凋亡及毛细血管样结构形成的影响。**方法:** 应用 Real-time PCR 检测 HUVEC 和胸膜间皮瘤(malignant pleural mesothelioma, MPM)细胞株 Y-MESO-14、NCI-H290 中 FAK mRNA 的表达。以 FAK siRNA 转染 HUVEC 细胞致 FAK 基因沉默或以 TAE226 处理, 采用 Western blotting 法检测经/未经 VEGF 预处理的 HUVEC 中 FAK 蛋白的表达; 采用 MTT 法检测 TAE226 或 FAK siRNA 处理对 HUVEC 增殖能力的影响, Annexin-V FITC/PI 双染色流式细胞术检测两者对 HUVEC 细胞凋亡的作用, Transwell 法检测 TAE226 及 siRNA 处理对 HUVEC 细胞迁移的影响, 体外脉管生成实验检测 HUVEC 中毛细血管样结构形成的数量。**结果:** 在 HUVEC 中 FAK mRNA 的表达量显著高于 Y-MESO-14 和 NCI-H290 细胞[(0.032 ± 0.006) vs (0.014 ± 0.001) 、 (0.006 ± 0.002)], 均 $P < 0.05$ 。HUVEC 在 VEGF 刺激下, FAK 和 pFAK 的表达量均有增高($P < 0.05$), FAK siRNA 转染可以抑制 VEGF 预刺激下的 FAK 蛋白表达[(0.011 ± 0.002) vs (0.036 ± 0.004)], $P < 0.01$ 。分别给予不同浓度 TAE226 或 FAK siRNA 处理, 均可呈浓度依赖性地抑制 HUVEC 增殖、迁移和凋亡($P < 0.01$)。体外脉管生成实验发现, VEGF 可促进 HUVEC 中毛细血管样结构的生成, TAE226 [(14.32 ± 7.83) vs (46.31 ± 39.46) 条, $P < 0.01$]而 FAK siRNA [(11.83 ± 6.75) vs (42.86 ± 27.63) 、 (48.32 ± 18.19) 条, 均 $P < 0.01$]转染可明显抑制毛细血管样结构形成。**结论:** TAE 226 处理或 FAK siRNA 转染可以抑制 HUVEC 增殖、迁移和诱导细胞凋亡, 同时可显著抑制毛细血管样结构的形成, 提示 FAK 可能成为靶向治疗恶性肿瘤的潜在靶点。

[关键词] 黏着斑激酶; 血管内皮细胞; 血管新生

[中图分类号] R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)05-0558-08

Roles of focal adhesion kinase in vascular endothelial cell proliferation, migration, apoptosis, and capillary-like structures formation

Pu Shenglan, Liu Daishun, Gong Ling, Wu Yang, Zhu Honglan, Huang Guichuan, Zhang Wei(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First People's Hospital of Zunyi City, Zunyi 563002, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate roles for focal adhesion kinase (FAK) in the regulation of proliferation, migration, apoptosis, and angiogenesis of human vascular endothelial cells. **Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were transfected with FAK siRNA or treated with TAE226. FAK mRNA abundance in siRNA-transfected or TAE226-treated HUVECs and malignant pleural mesothelioma cell lines Y-MESO14 and NCI-H290 was determined by Real-time PCR. FAK protein was assessed by Western blotting, cell viability by MTT, apoptosis by flow cytometry, migration by Transwell assay, and capillary structure formation by matrigel-based tube formation assay in control, TAE-treated and FAK siRNA-transfected HUVECs. **Results:** FAK mRNA was significantly more abundant in HUVECs than in both Y-MESO-14 and NCI-H290 cell lines ($P < 0.05$). rhVEGF treatment significantly increased FAK and pFAK protein levels of HUVECs ($P < 0.05$). FAK siRNA effectively silenced FAK gene expression in the presence of rhVEGF in HUVECs ($P < 0.01$). TAE226 at all concentrations used and FAK mRNA significantly inhibited proliferation, migration, and apoptosis of HUVECs ($P < 0.01$). While rhVEGF significantly promoted angiogenesis, TAE226 and FAK siRNA significantly inhibited capillary structure formation in HUVECs ($P < 0.01$). **Conclusion:** FAK siRNA plays important regulatory roles in

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81360350)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81360350)

[作者简介] 蒲盛蓝(1987-),女,贵州省遵义市人,博士生,主要从事肺部恶性疾病的基础与临床研究, E-mail: 274201689@qq.com

[通信作者] 刘代顺(Liu Daishun, corresponding author), E-mail: ldsdoc@126.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20151017.1611.006.html>

vascular endothelial cell proliferation, migration, apoptosis, and capillary structure formation, and thus offer a novel target for angiogenesis-based cancer therapy.

[**Key words**] focal adhesion kinase (FAK); human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); angiogenesis

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(5): 558-565]

恶性肿瘤已经成为全人类的第一大杀手和全球公共卫生的巨大负担,积极探索新的分子生物学靶点和寻找有效的抗肿瘤药物成为治疗恶性肿瘤的难点和热点。

恶性肿瘤的生长分为血管前期和血管期。在血管期,肿瘤内部出现新生血管,促进肿瘤的发展及转移^[1],其是造成抗肿瘤治疗失败的主要原因^[2]。血管新生过程实际上就是沿着血管排列的血管内皮细胞增殖过程^[3]。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在血管的发生、淋巴管的形成和脉管的生成过程中具有重要的作用^[4]。肿瘤血管对 VEGF 的反应高于正常血管,表明 VEGF 与肿瘤血管生成关系密切^[5]。黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一种非受体酪氨酸激酶^[6],与细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭、转移及血管生成等密切相关^[7]。FAK 与多种生长因子结合可以激活 FAK-GTPase 通路,诱导血管内膜形成^[8]。FAK 在许多恶性肿瘤中有高表达,如神经胶质瘤、前列腺癌、结肠癌和乳腺癌^[9-12]等。TAE226 是一种强效竞争 ATP 的小分子抑制剂,能特异地抑制 FAK Tyr(397)位点活性及其生物学效应^[13],能有效地抑制多种恶性肿瘤细胞,如脑肿瘤、结肠癌^[9,14]等。

本研究应用不同浓度的 FAK 特异性抑制剂 TAE226 及 siRNA 沉默 FAK 基因,探讨 FAK 在人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)中增殖、迁移和细胞凋亡,以及对恶性胸膜间皮瘤(malignant pleural mesothelioma, MPM)血管新生中的作用等,为恶性肿瘤的靶向治疗提供新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

恶性胸膜间皮瘤(malignant pleural mesothelioma, MPM) Y-MESO-14 和 NCI-H290 细胞株由日本德岛大学提供; HUVEC 购自美国标准菌库(ATCC),实验中所用细胞株为第 2 ~ 3 代。1640 培养基、胰蛋白酶和胎牛血清购于 Invitrogen 公司,鼠抗 FAK 抗体、兔抗、羊抗鼠抗体均购自 BD 公司, rh-VEGF 购于 Invitrogen 公司,新生血管试剂盒购于 Chemicon Int 公司, Real-time PCR Kit 购于 QIAGEN

公司, FAK mRNA (PTK2-VHS50354)购于 Invitrogen 公司, MagicMark XP Western Standard 购于 Invitrogen 公司, TAE226 购于 ApexBio Technology LLC。

1.2 细胞培养

将 1×10^6 个/ml Y-MESO-14、NCI-H290 和 HUVEC 接种到 10 cm 塑料培养皿,放入 37°C 、5% CO_2 孵箱培养。待细胞生长覆盖培养瓶底壁大于 80% 以上进行传代。加入 0.125%、pH7.4 胰蛋白酶 1 ml,轻轻摇匀使消化液流遍所有细胞表面进行消化。待消化充分后立即加入 10% FBS-P/S RPMI1640 9 ml 终止消化,制成 2×10^4 个/ml ~ 1×10^6 个/ml 混悬液后进行后续实验。

1.3 FAK siRNA 转染 HUVEC

常规无抗生素培养基培养 HUVEC,选用第 2 ~ 3 代,以每孔 2 ml 接种于 6 孔板,待细胞生长达到 50% 后按照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行转染。用 50 μl Opti-MEM® I 低血清培养基在形成复合物前稀释 1 μl Lipofectamine™ 2000 和 20 pmol/L Stealth™ siRNA,轻轻混匀后在室温下孵育 5 min,然后将混合稀释的寡聚物和稀释的 Lipofectamine™ 2000 轻轻混合,在室温下孵育 20 min。将 Lipofectamine™ 2000 复合物加入到每一个细胞培养孔中。轻轻前后摇动培养板,待混合液出现混浊,后弃培养皿/孔板中的培养液, FAK siRNA 加入细胞,最后置于 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养。

1.4 Real-time PCR 检测 HUVEC、Y-MESO-14 及 NCI-H290 细胞中 FAK mRNA 的表达

引物及探针由美国 Applied Biosystem 公司设计合成(表 1),应用 TaqMan® 基因表达分析方法扩增。首先在冰上融化试剂和引物及探针,计算反应总数和试剂总量、cDNA 模板量,每个反应设 4 个复孔。然后配置 20 μl 反应体系于 1.5 ml 无菌 EP 管中,再转移 20 μl PCR 反应混合物到 96 孔板中,最后在实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, Foster City, CA)执行 cDNA 扩增,根据动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值的扩增循环数(Ct 值),以样品拷贝数的对数为横坐标, Ct 值为纵坐标,拟合标准曲线, $Y = 10^{-\Delta\text{Ct}}$ (ΔCt 为 DNA 每稀释 10 倍时,平均增加的 Ct 数值; Y 为根据标准曲线获得的 Ct 值减少 1 个循环对应的模板 DNA 的增加的倍数)。

收集数据,绘制动力学曲线,测定各样品的 Ct 值与标准曲线进行比较,用比较阈值法得出待测样品的相对拷贝数。在 PCR 反应过程中,设定无 cDNA 模板的空白管作为阴性对照。实验重复 3 次。

表 1 FAK PCR 引物序列
Tab. 1 Sequences of primers used in PCR analysis of FAK mRNA

Gene	Primer sequence	Product (bp)
PTK2	F: 5'-CAATAGTGAGCCAACCCACCTG-3'	390
	R: 5'-TCTAGACAACCCAACTTCAAAGC-3'	
β -Actin	F: 5'-TGGAGAAAATCTGGCACCAC-3'	190
	R: 5'-GAGGCGTACAGGGATAGCAC-3'	

1.5 Western blotting 法检测经 FAK siRNA、rhVEGF 及 TAE226 处理后 HUVEC 中 FAK 及 pFAK 表达量变化

待细胞汇合至 70% 以上提取总蛋白,考马斯亮蓝法定量蛋白质。取 50 μ g 总蛋白上样于 12% 的 SDS-PAGE,将蛋白转印至 PVDF 膜,置入 5% 脱脂牛奶 TBST 封闭 2 h。1% BSA + TBST 稀释(稀释度分别为 1:200、1:400、1:400)一抗兔抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,弃一抗后加封闭液稀释的 HRP 偶联羊抗兔 IgG-HRP 二抗(稀释度 1:2 000),室温摇床上孵育 2 h 后用 TBST 清洗,使用 ECL 发光法检测目的蛋白条带,用 Quantity One 4.6 软件分析图像。以 β -Actin 为内参,以 VEGF/ β -Actin、CtlsiRNA + VEGF/ β -Actin、FAK siRNA + VEGF/ β -Actin 代表其蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.6 MTT 法检测抑制剂 TAE226 及 siRNA 沉默处理对 HUVEC 增殖的影响

96 孔板中收集对数生长期细胞,每孔加入 100 μ l,调整细胞密度为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个/孔,加入不同浓度梯度的 TAE226 及 FAK siRNA,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 48 h,每个浓度设 4 个复孔。每孔加入 10 μ l MTT 溶液(5 mg/ml,即 0.5% MTT),继续培养 4 h。终止培养后吸去孔内培养液,每孔加入 100 μ l 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,置酶标仪于波长 490 nm 处测光密度(D)值。实验重复 4 次。细胞增殖抑制率(%) = (1 - 实验组 D 值/对照组 D 值) \times 100%。

1.7 Transwell 法检测 TAE226 及 siRNA 处理后对 HUVEC 细胞迁移的影响

培养已加入 TAE226 及 FAK mRNA 的 HUVEC,在对数生长期消化细胞,在下室加 600 ~ 800 μ l 至 10% 培养基,上室加 100 ~ 150 μ l 细胞悬液,培养 24 h 后取出小室,吸干上室液体,孔中移入 800 μ l 甲醇,室温固定 30 min,移 800 μ l 吉姆萨染液于孔中,室温染色 15 ~ 30 min,清洗后小镊子揭下膜,移至载玻片上用中性树胶封片,显微镜下随机取 5 个视野进行计数。实验重复 3 次。

1.8 倒置显微镜下观察 FAK 对毛细血管样结构形成的影响

为探讨 FAK 在血管内皮细胞形成管样结构中的作用,接种 HUVEC 于 96 孔板(预先加入 Matrigel),分别给予 TAE226、FAK siRNA 及生长因子 VEGF,并设置相应对照组,12 ~ 24 h 后观察到脉管形成,倒置显微镜下拍照。此外,为探讨基因 FAK 沉默及抑制其磷酸化后对血管内皮细胞活力的影响,HUVEC 分为 VEGF 刺激组和无刺激组,接种于 96 孔板,分别给予不同浓度 TAE226 及 FAK siRNA 处理 48 h。倒置显微镜下观察毛细血管管样结构交错的网状结构,其管壁薄、腔内有红细胞通过,倒置显微镜下进行观察拍照。每孔取 5 个视野计数毛细血管样结构形成数。实验重复 3 次。

1.9 Annexin-V FITC/PI 双染色流式细胞术检测 TAE226 及 FAK siRNA 转染对 HUVEC 凋亡的影响

HUVEC 经 FAK siRNA 转染及不同浓度 TAE226 处理 48 ~ 72 h,对照组加入 PBS,离心收集细胞,弃上清,加入 80 μ l 缓冲液,5 μ l Annexin V-FITC 和 15 μ l PI,混匀细胞后室温避光反应 15 min,重悬细胞于至 1 ml 预冷,1 h 内用流式细胞仪检测(Ex = 488 nm)细胞凋亡情况。

1.10 统计学处理

采用 GraphPad Prism Ver. 5.01 统计学软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUVEC 中 FAK mRNA 表达显著高于两种恶性胸膜间皮瘤细胞

为探讨 HUVEC 血管内皮细胞中 FAK 的表达,以 Y-MESO-14 和 NCI-H290 细胞株作对照,Real-time PCR 法检测结果(图 1A)显示,HUVEC 中 FAK mRNA 表达量显著高于 Y-MESO-14 和 NCI-H290 细胞[(0.032 \pm 0.006) vs (0.014 \pm 0.001)、(0.006 \pm 0.002),均 $P < 0.01$]。

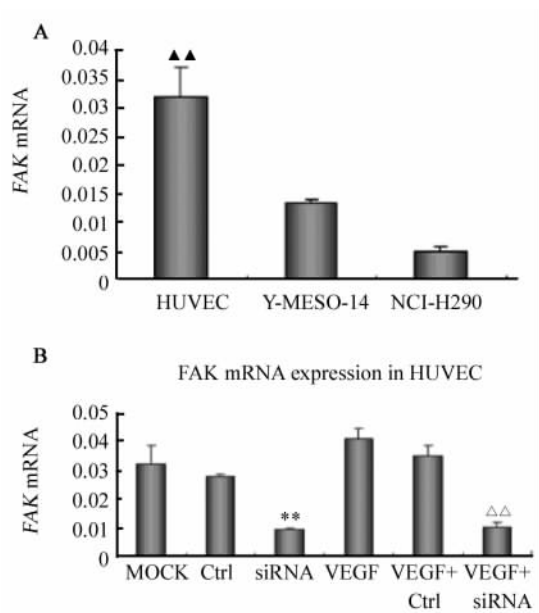


图1 在多种干预条件下 FAK mRNA 在 HUVEC 和 MPM 细胞中的表达

Fig. 1 FAK mRNA expression in HUVEC and MPM cells after treatment with VEGF and FAK siRNA

A: Expression of FAK mRNA in HUVEC, Y-MESO-14 and NCI-H290 cells;

B: Expression of FAK in HUVEC stimulated by FAK siRNA and VEGF

▲▲ $P < 0.01$ vs Y-MESO-14 or NCI-H290;

** $P < 0.01$ vs MOCK or Ctrl;

△△ $P < 0.05$ vs VEGF + Ctrl or VEGF + siRNA

2.2 转染 FAK siRNA 和 VEGF 处理对 HUVEC FAK mRNA 表达的影响

为了深入研究 FAK 在恶性肿瘤血管新生中的作用,培养 HUVEC,观察在 FAK mRNA 和 rhVEGF 作用下 FAK 表达情况。Real-time PCR 法检测结果(图 1B)显示,经 siRNA 转染后 FAK mRNA 明显下降[(0.008 ± 0.0006) vs (0.029 ± 0.0011), $P < 0.01$];经过 20 ng/ml VEGF 处理后 FAK mRNA 稍上调,但与非 VEGF 处理对照组比较无差异[(0.011 ± 0.002) vs (0.008 ± 0.0006), $P > 0.05$];在 VEGF + FAK mRNA 组,FAK mRNA 表达则明显下调[(0.011 ± 0.002) vs (0.036 ± 0.004), $P < 0.01$]

2.3 FAK siRNA 转染及 VEGF 和 TAE226 处理对 HUVEC 中 FAK、pFAK 蛋白表达的影响

Western blotting 法检测结果(图 2A)显示,与 Mock + VEGF 对照组相比,FAK mRNA 转染组可以显著抑制 VEGF 刺激下 FAK 蛋白的表达,

[(59.25 ± 8.35)% vs (102.82 ± 8.92)% , $P < 0.05$]; HUVEC 在 rhVEGF 刺激下,FAK 和 pFAK 的表达量均有增高,TAE226 处理后磷酸化的 FAK 蛋白下调,与对照组差异有统计学意义[(0.851 ± 0.073) vs (0.433 ± 0.055), $P < 0.05$](图 2B),总 FAK 蛋白无明显变化。结果提示,TAE226 抑制 HUVEC 中 FAK 蛋白磷酸化。

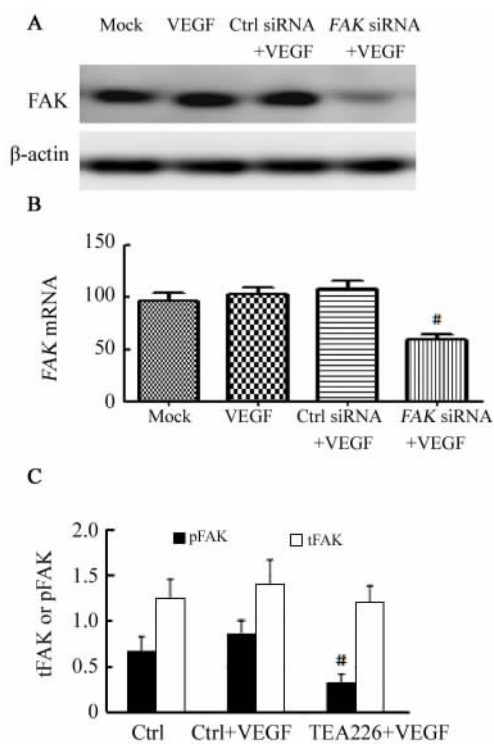


图2 FAK siRNA, VEGF 和 TAE226 处理对 HUVEC 中 FAK 和 pFAK 表达的影响

Fig. 2 Effects of FAK siRNA, VEGF and TAE226 on FAK and pFAK expression

A: FAK expression after the treatment with VEGF and FAK siRNA detected by Western blotting; B: Expression value of FAK after the treatment VEGF and FAK siRNA;

C: Expression values of FAK and pFAK after the treatment with TAE226 and VEGF

2.4 TAE226 及 FAK siRNA 处理剂量依赖性抑制 HUVEC 的增殖

MTT 法检测结果(图 3)显示,TAE226 及 FAK mRNA 均可呈浓度依赖性方式加强 VEGF 对 HUVEC 增殖的抑制,当两者剂量分别超过 1 及 10 μmol/L 时, HUVEC 增殖抑制率显著上升 ($P < 0.05$)。

2.5 TAE226 及 FAK siRNA 处理可抑制 HUVEC 的迁移

血管内皮细胞迁移是肿瘤新生血管形成的必要

条件。Transwell 法检测结果(图 4)显示,经 TAE226 抑制 FAK 磷酸化以及 siRNA 封闭 FAK 基因后, HUVEC 迁移能力明显受抑制。TAE226 处理后的迁移细胞数明显减少[(22.16 ± 16.73) vs (71.46 ± 15.93) 个, $P < 0.01$]; FAK siRNA 处理后的迁移细胞数同样减少[(21.13 ± 20.61) vs (76.51 ± 22.13), (73.16 ± 15.17) 个, 均 $P < 0.01$]。同时,

两者处理也能显著降低 VEGF 刺激条件下的 HUVEC 迁移能力。TAE226 处理经 VEGF 预刺激的 HUVEC, 其迁移细胞数显著降低[(42.73 ± 17.63) vs (96.42 ± 19.42) 个, $P < 0.01$]; FAK siRNA 处理经 VEGF 预刺激 HUVEC, 其迁移细胞数也明显降低[(48.17 ± 24.82) vs (97.58 ± 48.67), (101.27 ± 16.36) 个, 均 $P < 0.01$]。

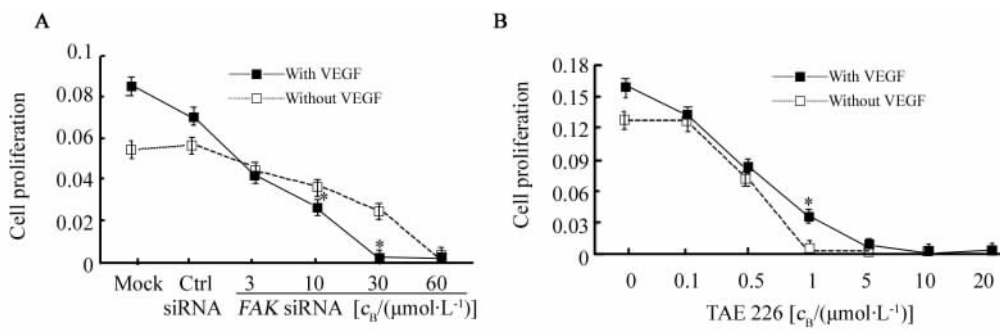


图 3 FAK siRNA 和 TAE226 对 HUVEC 增殖的影响(×100)

Fig. 3 Effect of FAK siRNA and TAE226 on HUVEC proliferation(×100)

A: The effect of FAK siRNA on HUVEC proliferation; B: The effect of TAE226 on HUVEC proliferation

* $P < 0.05$ vs without VEGF group

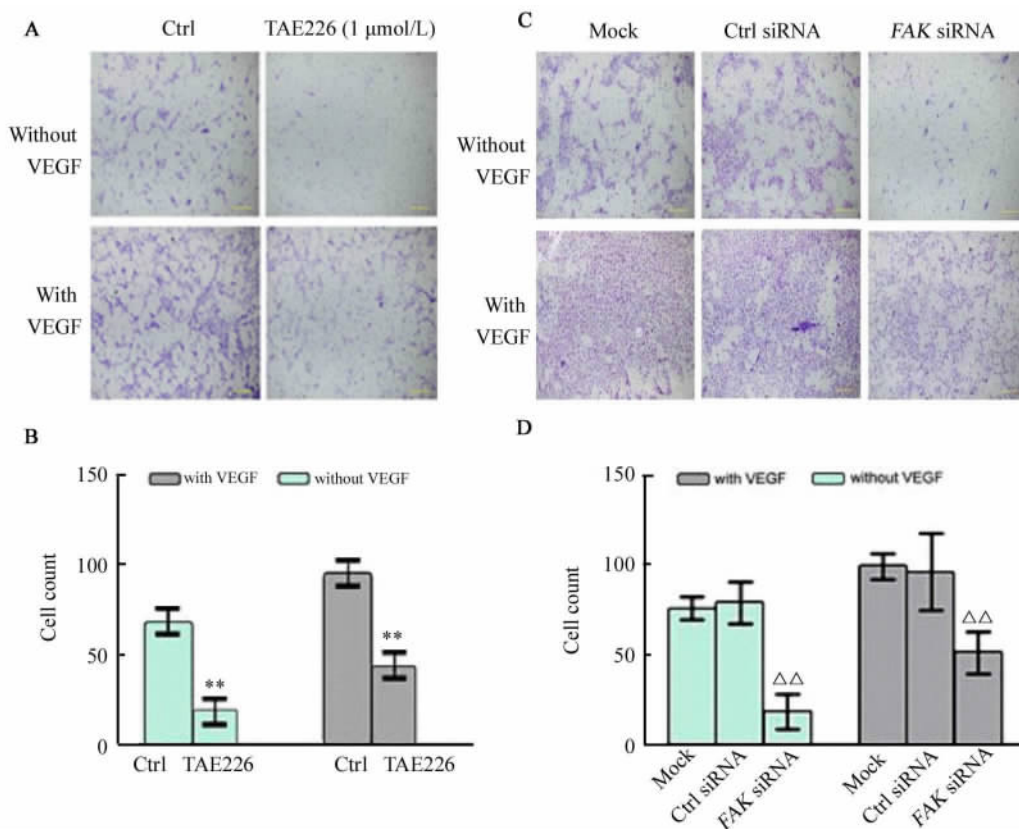


图 4 TAE226 或 FAK siRNA 作用后 HUVEC 的迁移能力受到明显抑制(×100)

Fig. 4 HUVEC migration ability was significantly inhibited by TAE226 or FAK siRNA(×100)

A, B: Migration ability of HUVEC after TAE226 treatment; C, D: Migration ability of HUVEC after FAK siRNA treatment

** $P < 0.01$ vs ctrl; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Mock or Ctrl siRNA

2.6 FAK mRNA 或 TAE226 抑制 HUVEC 毛细血管样结构的形成

体外脉管生成实验结果(图 5)显示,VEGF 可促进脉管生成增加,TAE226 处理及 FAK mRNA 转染均可抑制 HUVEC 毛细血管样结构形成。在 TAE226 作用组,在 VEGF 预刺激条件下 HUVEC 毛细血管样结构显著减少[(36.41 ± 18.43) vs (73.42 ± 19.73)条, P < 0.01];无 VEGF 预刺激条件下也明显减少[(14.32 ± 7.83) vs (46.31 ± 39.46)条, P < 0.01]。在 FAK mRNA 作用组,无 VEGF 预刺激条件下 HUVEC 毛细血管样结构显著减少,[(11.83 ± 6.75) vs (42.86 ± 27.63)、

(48.32 ± 18.19)条,均 P < 0.01];在 VEGF 预刺激条件下, HUVEC 毛细血管样结构也显著减少 [(28.78 ± 27.63) vs (78.76 ± 22.43)、(77.53 ± 19.12)条,均 P < 0.01]。

2.7 FAK mRNA 及 TAE226 均可诱导 HUVEC 凋亡

流式细胞术检测结果(图 6)显示,TAE226 或 FAK mRNA 处理后 HUVEC 早期凋亡细胞明显增多,呈浓度依赖性,当两者浓度分别达到 5 及 30 nmol/L 时,细胞凋亡率分别达(24.79 ± 24.09)% 及 (27.71 ± 0.57)%,与相应对照组比较,差异均有统计学意义(P < 0.05)。结果提示,TAE226 及 FAK mRNA 处理均可促进 HUVEC 细胞凋亡。

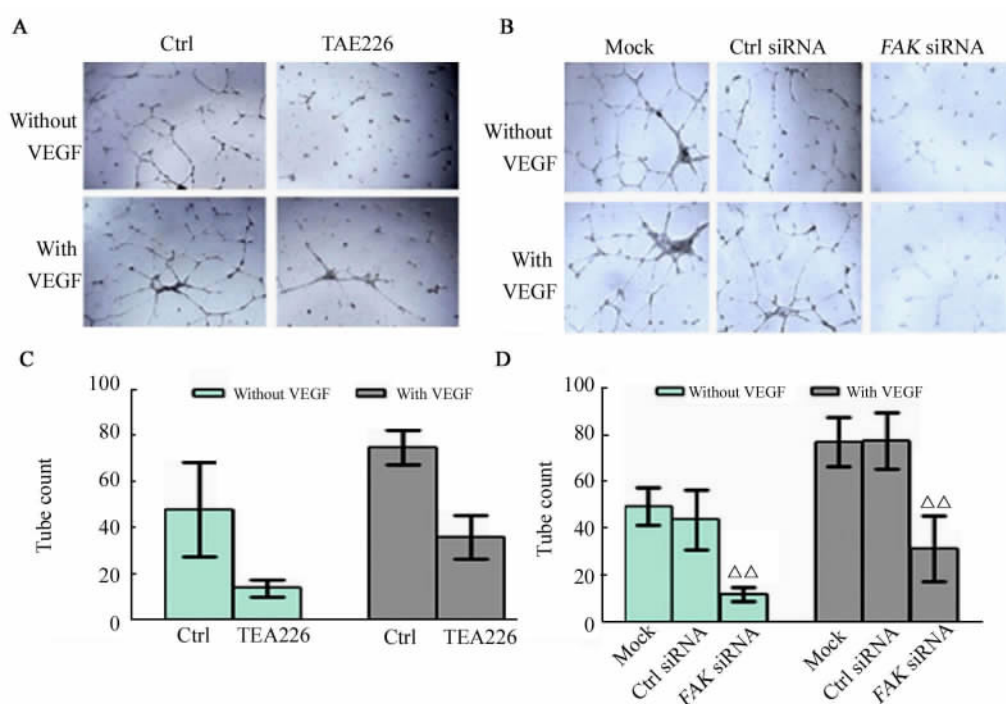


图 5 TAE226 或 FAK mRNA 处理后 HUVEC 脉管样结构的生成情况(×100)

Fig. 5 Condition of HUEVC capillary-like structures formation after treatment of TAE226 or FAK siRNA

A: The condition of HUEVC capillary-like structures formation after transaction of TAE226(×100); B: The condition of HUEVC capillary-like structures formation after transaction of FAK siRNA(×100); C: Frequency analysis for HUEVC capillary-like structures formation after treatment of TAE226; D: Frequency analysis for HUEVC capillary-like structures formation after treatment of FAK siRNA
** P < 0.01 vs Ctrl; △△ P < 0.01 vs Mock or Ctrl siRNA

3 讨论

肿瘤生长及转移依赖于肿瘤内血管生成,针对肿瘤血管内皮细胞与针对肿瘤细胞的抗肿瘤治疗间存在协同作用^[15-16]。因此,对于肿瘤血管形成能力的基因水平调节和寻找新的血管形成抑制因子,将成为抗肿瘤血管新生治疗领域的热点问题^[17]。

本研究发现,在 HUVEC 中分别应用 FAK 特异

性抑制剂 TAE226 及沉默 FAK 基因后,肿瘤细胞的增殖和迁移受到抑制,血管生成明显减少,推测 FAK 通路激活可参与调控 VEGF 诱导的血管内皮细胞生长、迁移和脉管形成^[18-20]。Real-time PCR 和 Western blotting 检测发现,HUVEC 中 FAK mRNA 呈高表达,其表达量显著高于胸膜间皮瘤细胞株 Y-MESO-14 和 NCI-H290,证明 FAK 既在肿瘤细胞中表达,又在血管内皮细胞中表达^[19,21-22]。通过

siRNA介导 *FAK* 基因沉默, *FAK* mRNA 和蛋白表达均明显下降, 显著抑制 VEGF 刺激后的 *FAK* 转录及转录后信号表达。在 VEGF 刺激下, *FAK* 和 p*FAK* 的表达量均有增高。应用 *FAK* 特异性抑制剂 TAE226 处理后 *FAK* 磷酸化蛋白下调, 但总 *FAK* 蛋白无明显变化, 提示 *FAK* mRNA 可高效特异性转染 HUVEC 及定向沉默 *FAK* 基因, TAE226 可以抑制

HUVEC 中 *FAK* 的磷酸化^[23-27]。此外, 当给予不同浓度 TAE226 及 *FAK* siRNA 处理时可浓度依赖性地提高对 HUVEC 增殖的抑制率。细胞迁移实验中也发现经 TAE226 及 *FAK* siRNA 处理 HUVEC 后, 处理组细胞迁移能力明显受抑制, 并显著降低 VEGF 刺激后 HUVEC 的迁移能力。

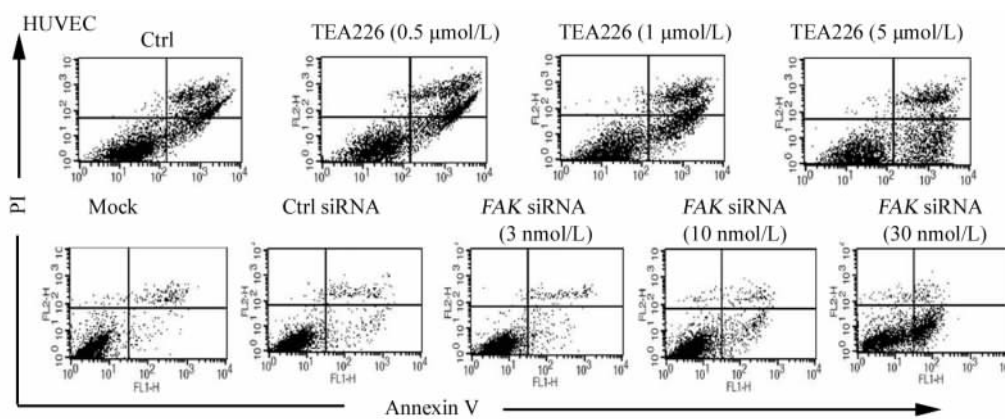


图 6 *FAK* siRNA 或 TAE226 诱导 HUVEC 凋亡

Fig. 6 *FAK* siRNA or TAE226 induced HUVEC apoptosis

体外血管新生实验发现, VEGF 可促进毛细血管样结构的形成, TAE226 处理或 *FAK* siRNA 转染均可抑制 HUVEC 毛细血管样结构形成, 同时也能显著降低 VEGF 预刺激下 HUVEC 的迁移, 提示 TAE226 及 *FAK* siRNA 均可抑制血管新生^[26-30]。此外, HUVEC 经 *FAK* siRNA 转染及 TAE226 处理 72 h 后, 利用 Annexin-V 与 PI 双染检测发现, HUVEC 早期凋亡细胞增多, 呈浓度依赖性, 提示 TAE226 及 *FAK* siRNA 处理均可促进 HUVEC 细胞凋亡^[31-34]。

本实验证实了 *FAK* 基因活化是 HUVEC 发挥生物学功能的重要环节, 其通路抑制可明显下调 VEGF 诱导的血管内皮细胞生长、迁移和脉管形成, 减少毛细血管新生和诱导肿瘤凋亡, 故可推测 *FAK* 是肿瘤发生发展中的重要分子。

[参 考 文 献]

[1] Cao Y. Tumor angiogenesis and therapy [J]. Biomed Pharmacother, 2005, 2(59): 340-343.
 [2] López E, Cho WC. Phosphoproteomics and lung cancer research [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13 (10): 12287-12314.
 [3] Silvestre JS, Lévy BI, Tedgui A, et al. Mechanisms of angiogenesis and remodelling of the microvasculature [J]. Cardiovasc Res, 2008, 78(2): 201-202.
 [4] Zhao M, Gao FH, Wang JY, et al. JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of

VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2011, 73(3): 366-374.
 [5] Zhang Y, Yu LK, Lu GJ, et al. Prognostic values of VEGF and endostatin with malignant pleural effusions in patients with lung cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(19): 8435-8440.
 [6] Cai G, Zheng A, Tang Q, et al. Downregulation of FAK-related nonkinase mediates the migratory phenotype of human fibrotic lung fibroblasts [J]. Exp Cell Res, 2010, 316(9): 1600-1609.
 [7] Steven NH, Golubovskaya VM. FAK as a target for cancer therapy [J]. Gene Therapist Mol Biological, 2009, 6(13): 26-35.
 [8] Macagno JP, Diaz Vera J, Yu Y, et al. FAK acts as a suppressor of RTK-MAP kinase signalling in Drosophila melanogaster epithelia and human cancer cells [J]. PLoS Genet, 2014, 10 (3): e1004262.
 [9] Zhong D, Ran JH, Tang WY, et al. Mda-9/syntenin promotes human brain glioma migration through focal adhesion kinase (FAK)-JNK and FAK-AKT signaling [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(6): 2897-2901.
 [10] Senapati S, Rachagani S, Chaudhary K, et al. Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK-RhoA signaling pathway [J]. Oncogene, 2010, 29(9): 1293-1302.
 [11] Fernanda L, Rabello SV, Tanaka MN, et al. Lysophosphatidic acid induces a migratory phenotype through a crosstalk between RhoA-Rock and Src-FAK signalling in colon cancer cells [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 671(1): 7-17.
 [12] Luo M, Guan JL. Focal adhesion kinase: a prominent determinant

- in breast cancer initiation, progression and metastasis [J]. *Cancer Lett*, 2010, 289(2): 127-139.
- [13] 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 .
- [14] Hao H, Takaoka M, Bao X, et al. Oral administration of FAK inhibitor TAE226 inhibits the progression of peritoneal dissemination of colorectal cancer [J]. *Biochem Bioph Res*, 2012, 423 (4): 744-749.
- [15] Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, et al. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy [J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2003, 3(2):95-117.
- [16] Ma L, Francia G, Vilorio-Petit A, In vitro procoagulant activity induced in endothelial cells by chemotherapy and antiangiogenic drug combinations: modulation by lower-dose chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2005,65(12):5365-5373.
- [17] Head M, Jameson MB. The development of the tumor vascular-disrupting agent ASA404 (vadimezan, DMXAA): current status and future opportunities [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19 (2):295-304.
- [18] Tong B, Lu D, Wei Z, et al. Gleditsioside B, a triterpene saponin isolated from the anomalous fruits of *Gleditsia sinensis* Lam, abrogates bFGF-induced endothelial cell migration through preventing the activation of MMP-2 and FAK via inhibiting ERK and PI3K/AKT signaling pathways [J]. *Vasc Pharmacol*, 2013, 58(1): 118-126.
- [19] Tavora B, Batista S, Reynolds LE, et al. Endothelial FAK is required for tumour angiogenesis [J]. *EMBO Mol Med*, 2010, 2 (12): 516-528.
- [20] Chen XL, Nam JO, Jean C, et al. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK [J]. *Dev Cell*,2012, 22(1): 146-157.
- [21] Siejka A, Barabutis N, Schally AV, et al. GHRH antagonist inhibits focal adhesion kinase (FAK) and decreases expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human lung cancer cells in vitro [J]. *Peptides*, 2012, 37(1): 63-68.
- [22] Wu Y, He L, Zhang L, et al. Anacardic acid (6-pentadecylsali-cyclic acid) inhibits tumor an Giogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases signaling pathway [J]. *J Pharmacol Exp Therapis*, 2011, 339(2): 403-411.
- [23] Otani H, Jida M, Takaoka M, et al. The effect of TAE226 on the non-small cell lung cancer Including Japanese origin lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(15): 22103-22112.
- [24] 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.
- [25] Kurio N, Shimo T, Fukazawa T, et al. Anti-tumor effect in human breast cancer by TAE226, a dual inhibitor forFAK and IGF-IR in vitro and in vivo [J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(8): 1134-1146.
- [26] Hao HF, Takaoka M, Bao XH, et al. Oral administration of FAK inhibitor TAE226 inhibits the progression of peritoneal dissemination of colorectal cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012 ,423(4):744-749.
- [28] Storch K, Sagerer A, Cordes N. Cytotoxic and radiosensitizing effects of FAK targeting in human glioblastoma cells in vitro [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 2009-2016.
- [29] 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.
- [30] Storch K, Sagerer A, Cordes N. Cytotoxic and radiosensitizing effects of FAK targeting in human glioblastoma cells in vitro [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 2009-2016.
- [31] Iacobazzi D, Garaeva I, Albertario A, et al. Protein phosphatase 1 beta is modulated by chronic hypoxia and involved in the angiogenic endothelial cell migration [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36 (1): 384-394.
- [32] Lee TS, Lin JJ, Huo YN, et al. Progesterone inhibits endothelial cell migration through suppression of the Rho activity mediated by cSrc activation [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(7): 1411-1418.
- [33] Dao P, Jarray R, Le Coq J, et al. Synthesis of novel diarylamino-1,3,5-triazine derivatives as FAK inhibitors with anti-angiogenic activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*,2013, 23(16): 4552-4556.
- [34] Chang CC, Tsai SY, Lin H, et al. Aryl-hydrocarbon receptor-dependent alteration of FAK/RhoA in the inhibition of HUVEC motility by 3-methylcholanthrene [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66 (19): 3193-3205.
- [收稿日期] 2015 -05 -30 [修回日期] 2015 -09 -25
[本文编辑] 阮芳铭

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 -93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)