

文章编号: 1004-7220(2022)05-0874-07

上皮-间质转化过程中黑色素瘤细胞力学特性变化与迁移关系研究

陈 瑜, 姜晓敏, 李亭亭, 李 顺, 秦 翔, 刘贻尧

(电子科技大学 生命科学与技术学院, 成都 610054)

摘要:目的 探讨上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中黑色素瘤细胞力学特性的变化规律及其与细胞迁移的内在联系。方法 使用免疫荧光检测 TGF- β 1 对 EMT 相关蛋白表达的影响;使用细胞划痕和 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力;借助原子力显微镜检测细胞刚度;通过流式细胞术检测骨架蛋白的动态变化。结果 利用 TGF- β 1 成功诱导 A375 细胞发生 EMT。TGF- β 1 呈时间依赖性可增加波形蛋白 vimentin 表达,降低 E-钙黏蛋白 E-cadherin 表达,并增强细胞迁移和侵袭能力。在 EMT 进程中,细胞的生物力学特性(细胞刚度)发生改变,细胞骨架 G-actin/F-actin 比值明显上升,细胞刚度明显降低。结论 EMT 进程中,黑色素瘤细胞骨架发生解聚,细胞刚度降低,从而增强细胞的迁移和侵袭能力。研究结果为癌症转移的临床治疗提供力学生物学新思路。**关键词:** 上皮间质转化; 细胞骨架; 细胞刚度; 细胞迁移

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.05.017

The Melanoma Cell Mechanics and Migration During Epithelial-Mesenchymal Transition

CHEN Yu, JIANG Xiaomin, LI Tingting, LI Shun, QIN Xiang, LIU Yiyao

(School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China)

Abstract: Objective To investigate the inner relationship of mechanical properties and migration during epithelial-mesenchymal transition (EMT) of melanoma A375 cells. **Methods** EMT was induced by TGF- β 1 in epithelial-like melanoma A375 cells, and further morphological observation and analysis of A375 cells were performed. The effect of TGF- β 1 on EMT-related protein expression was detected by immunofluorescence. Cell scratch and transwell assay were used to detect cell migration and invasion. The cell stiffness was measured by atomic force microscopy (AFM). The cytoskeletal proteins of G-actin and F-actin were determined by flow cytometry. **Results**

Melanoma A375 cells were successfully induced by TGF- β 1 stimulation to establish the EMT phenotype. TGF- β 1 increased the expression of mesenchymal marker of vimentin and decreased the expression of epithelial marker of E-cadherin in a time-dependent manner, which further enhanced cell migration and invasion. TGF- β 1-induced EMT also altered the biomechanical properties of melanoma A375 cells, which showed a significant increase in cytoskeletal G-actin/F-actin ration and an obvious decrease in cell stiffness. **Conclusions** The cytoskeleton of melanoma A375 cells undergoes depolymerization and cell stiffness decreases in response to TGF- β 1-induced EMT, which enhances the ability of cell migration and invasion. These research findings provide new strategy in mechanobiology for clinical treatment of cancer metastasis.

Key words: epithelial-mesenchymal transition (EMT); cytoskeleton; cell stiffness; cell migration

收稿日期: 2021-12-31; 修回日期: 2022-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(U19A2006, 12132004)

通信作者: 刘贻尧, 教授, 博士生导师, E-mail: liuyiyao@uestc.edu.cn

黑色素瘤是死亡率较高的一种恶性肿瘤,具有高度的转移潜能^[1]。手术是早期黑色素瘤的主要治疗方式,但转移性的黑色素瘤预后较差,复发和转移是患者死亡的主要原因^[2]。因此,深入研究黑色素瘤转移和侵袭,对提高患者生存率、开发更有效的治疗方案具有重要临床意义。癌症转移是一个复杂且连续的过程,主要包括细胞从原发病灶脱离、局部侵袭、渗入血管并存活、外渗到远端组织以及形成转移灶等过程^[3-4]。肿瘤细胞发生上皮间充质表型转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)被认为是癌症转移的起始和关键步骤之一^[5]。EMT是上皮细胞在特定病理生理条件下转换为在形态学上具有间充质表型细胞的过程,它的发生会导致细胞黏附和机械性能的显著改变,包括细胞间连接破坏、细胞骨架重组和细胞运动性增加^[6-7]。之前研究主要聚焦于EMT中的生化信号对肿瘤细胞恶性行为的影响^[8]。近年来,越来越多的研究表明,生物力学因素在肿瘤转移中发挥重要作用^[9]。

细胞肌动蛋白骨架是一种在细胞质中高度动态的网状支架,在许多生命活动中发挥核心作用,如迁移、形态发生、胞质分裂、内吞作用等^[10-11]。细胞骨架能响应EMT信号发生动态重塑,帮助细胞穿透基底膜,进入循环系统继而扩散至继发病灶处^[12]。细胞骨架重组贯穿细胞运动的全过程,是恶性肿瘤转移和侵袭所必需的。细胞骨架网络由球状肌动蛋白单体G-actin聚合而成的肌动蛋白丝束F-actin构成,细胞通过动态调节F-actin组装和去组装以维持细胞骨架空间结构的稳定,在调控细胞力学特性中起着至关重要的作用^[13-14]。因此,深入探究细胞骨架重塑对调控肿瘤转移具有重要意义。

细胞力学特性的改变依赖于肌动蛋白及其相关蛋白的组装和调控,细胞力学特性与细胞功能,如分裂、分化、凋亡、迁移等生物学行为密切相关^[14-15]。肿瘤细胞形态、刚度和黏附力变化是细胞力学特性改变的重要指标^[16]。肿瘤细胞发生转移、侵袭和黏附等一系列过程时,都需要重塑细胞形态。因此,细胞力学特性在肿瘤进展中起着关键作用。研究发现,细胞刚度被认为是侵袭性潜力的重要参数。例如,转移潜能增加的膀胱癌细胞刚度显著降低^[9];恶性卵巢上皮细胞通常比非恶性卵巢上

皮细胞更软^[17];黑色素瘤的局部进展也受到细胞刚度调节^[18]。因此,细胞力学特性中细胞刚度变化在肿瘤恶性转化和迁移中显得尤为重要。

多种信号通路都直接或间接参与肿瘤细胞的EMT过程,这些反应主要由生长因子和细胞因子所介导^[19-20]。例如,Hidenori等^[16]报道转化生长因子(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)能促进人肺泡上皮细胞发生EMT。TGF- β 1诱导的EMT是一种常见EMT模型^[21],但TGF- β 1介导的EMT中细胞生物物理特性的变化还尚不清楚。本文采用TGF- β 1建立A375上皮样人黑色素瘤细胞EMT模型,揭示TGF- β 1介导的EMT进程中细胞力学特性变化规律及其与细胞迁移的关系,为癌症转移的临床治疗提供力学生物学新思路。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞培养

本实验中所用人黑色素瘤细胞系A375购自中科院细胞库。A375细胞使用含有10%新生牛血清(Gibco公司,美国)、100 U/mL青霉素(Gibco公司,美国)和100 μ g/mL链霉素(Gibco公司,美国)的RPMI-1640培养基(Thermo公司,美国),于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中传代及培养。

1.2 抗体与试剂

TGF- β 1购自美国CST公司;E-cadherin抗体、Vimentin抗体、罗丹明标记的鬼笔环肽和脱氧核糖核酸酶I(DNase I)购自美国ThermoFisher Scientific公司; β -actin抗体购自北京中彬金桥公司;Alexa Fluor 488购自美国Proteintech公司;DAPI染色液购自上海碧云天生物科技有限公司。

1.3 细胞形态观察

将A375细胞接种在玻片上,待细胞贴壁后,分别使用10 ng/mL的TGF- β 1去刺激细胞0、12、24、48 h^[22]。在倒置显微镜下观察至少10个细胞的形态变化,并使用Image J统计分析细胞长宽比。

1.4 免疫荧光检测

将A375细胞接种在共聚焦培养皿中,待细胞贴壁后,分别使用10 ng/mL TGF- β 1去刺激细胞0、12、24、48 h。用4%多聚甲醛室温固定细胞10~15 min, PBS清洗3次,用0.4% Triton X-100室温破膜处理10 min, PBS再清洗3次。使用1% BSA于

37 °C 条件下封闭 1 h 后,分别加入 E-cadherin 和 vimentin 一抗,4 °C 孵育过夜。PBS 清洗 3 次,加入 Alexa Fluor 488 标记的二抗,然后在 37 °C 条件下再孵育 2 h,最后用 DAPI 染细胞核 10 min。激光共聚焦显微镜采集图像,用 Image J 软件分析平均荧光强度。

1.5 划痕和侵袭实验

将 A375 细胞接种在 24 孔细胞培养板中,待细胞贴壁后,分别使用 10 ng/mL TGF- β 1 刺激 0、12、24、48 h。再用已经灭菌的白色枪头垂直于孔板方向划一直线,PBS 清洗被划下的细胞。在 TGF- β 1 刺激的 0、12 h 时间点用倒置荧光显微镜进行拍照观察,并用 Image J 软件计算分析划痕愈合率。

将 Transwell 小室 (Corning 公司,美国)放入 24 孔细胞培养板内,在上层滴加基质胶待其凝固。使用胰酶消化 TGF- β 1 诱导完成的细胞并用无血清培养基重悬,在上室加入 300 μ L 密度为 1×10^5 个/mL 细胞悬液,并在下室加入完全培养基。在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h 后取出,擦拭掉上层细胞后,用 4% 多聚甲醛固定并结晶紫染色下层细胞。倒置荧光显微镜采集图像,并用 Image J 软件统计细胞数。

1.6 流式细胞仪检测

消化诱导好的细胞,离心取细胞沉淀,并用 4% 多聚甲醛重悬固定 15 min。用 0.4% Triton X-100 破膜打孔 10 min,然后用 1% BSA 封闭 1 h。PBS 清洗后,加入配制成工作浓度的 DNase I (1 : 1 000),避光室温染色 20 min,离心后再加入鬼笔环肽,避光室温下孵育 20 min,最后用 PBS 清洗并重悬,采用流式细胞仪进行分析并采集数据。

1.7 细胞刚度测定

将 A375 细胞接种在玻片上,待细胞贴壁后,分别使用 10 ng/mL TGF- β 1 刺激肿瘤细胞 0、12、24、48 h。设置参数,使用原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM) 获取每个细胞核周的电压-位移曲线^[23]。将电压-位移曲线转变成力-位移曲线,通过赫兹模型计算出细胞弹性模量。

1.8 统计方法

所有实验至少重复 3 次,数据采用均值 \pm 标准差表示,采用 *t* 检验或 One-Way ANOVA 检验方法进行统计学分析。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β 1 诱导 A375 细胞发生 EMT

肿瘤细胞发生 EMT 在癌症恶性演进过程中起着关键作用,细胞的形态变化被认为是 EMT 的主要特征之一^[24]。首先,探究 TGF- β 1 能否诱导人黑色素瘤细胞发生 EMT。结果显示,随着 TGF- β 1 刺激时间增长,细胞形态更为细长,呈现明显的间质样。Image J 软件统计结果同样表明,TGF- β 1 诱导黑色素瘤细胞 A375 的长宽比显著增加,表现出明显的间质样表型 (见图 1)。

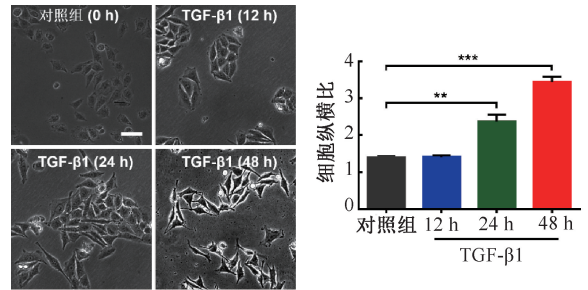


图 1 TGF- β 1 促进 A375 细胞形态伸长和 EMT 发生
(****P* < 0.001, ***P* < 0.01)

Fig. 1 TGF- β 1 promoted morphological elongation and EMT in A375 cells (a) Cell morphology, (b) Cell aspect ratio

为了验证这一结果,进一步检测 TGF- β 1 对 EMT 相关标志蛋白表达的影响。细胞免疫荧光结果显示,随着 TGF- β 1 刺激时间的延长,上皮标志蛋白 E-cadherin 在细胞中的表达显著低于对照组,而间充质标志物 vimentin 表达却高于对照组。Image J 定量分析同样显示 TGF- β 1 呈时间依赖性增强了 vimentin 表达,E-cadherin 表达降低。上述结果说明,TGF- β 1 能诱导 A375 细胞发生 EMT (见图 2)。

2.2 TGF- β 1 促进细胞迁移和侵袭

肿瘤细胞发生 EMT 被认为是癌症转移的起始和关键步骤之一^[25],故探究 TGF- β 1 是否诱导肿瘤细胞迁移和侵袭。划痕愈合实验和 ImageJ 统计结果一致显示,TGF- β 1 处理组的细胞迁移速率明显高于对照组,表明 TGF- β 1 能显著加快 A375 细胞的愈合速率。同时,Transwell 实验结果也显示,TGF- β 1 刺激后,穿过 Transwell 小室的细胞数目与对照相比明显增多。上述结果说明 TGF- β 1 诱导细胞发生 EMT 后能促进细胞迁移和侵袭 (见图 3)。

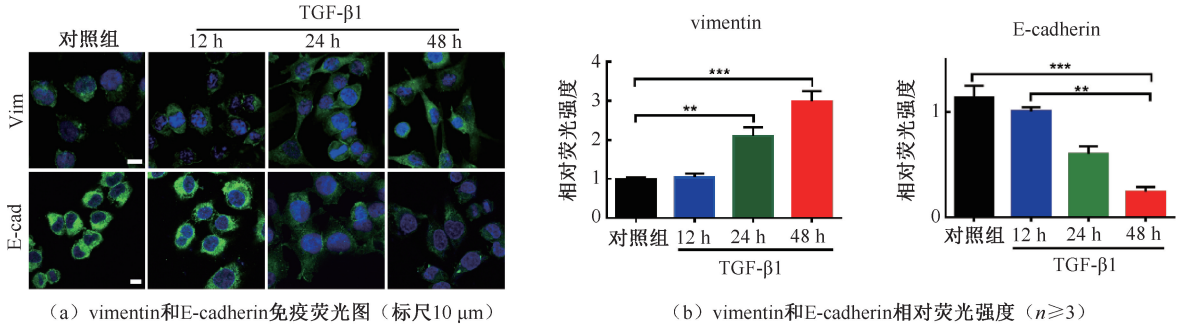


图 2 TGF-β1 诱导 A375 细胞发生 EMT 的分子标记物表达分析 (** $P < 0.001$, * $P < 0.01$)

Fig. 2 Molecular markers analysis of TGF-β1-induced EMT in A375 cells (a) Expressions of E-cadherin or vimentin, (b) Relative fluorescence intensities of E-cadherin or vimentin

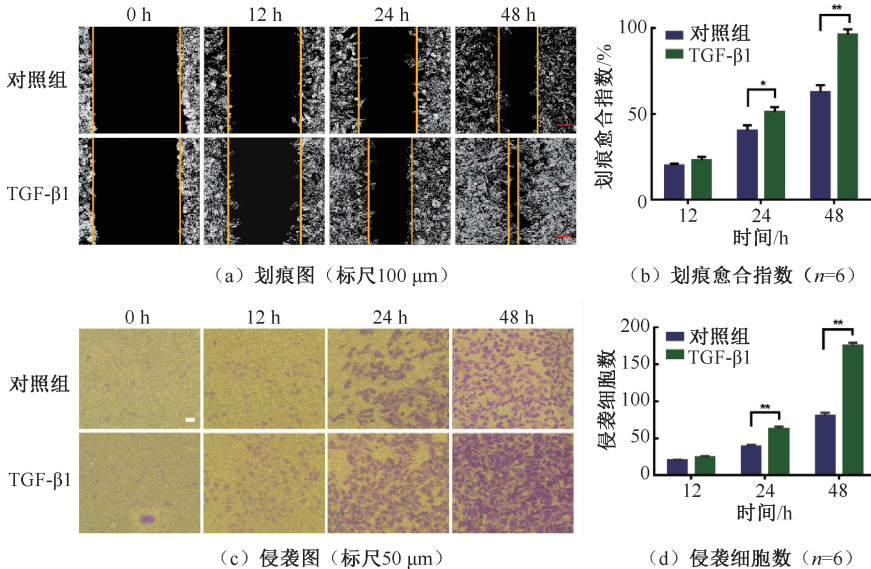


图 3 TGF-β1 促进 A375 细胞的迁移和侵袭 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig. 3 TGF-β1 induced migration and invasion of A375 cells (a) Wound-healing assay, (b) Wound-healing rates, (c) Transwell assay, (d) Invasion ability

2.3 TGF-β1 促进细胞骨架解聚

大量证据表明,细胞肌动蛋白骨架参与调节细胞运动,包括迁移和黏附^[11]。因此,进一步研究 EMT 过程中细胞骨架的变化。使用鬼笔环肽标记 F-actin, Dnase I 标记 G-actin,并用流式细胞仪检测两种肌动蛋白的荧光强度。结果发现,TGF-β1 刺激后,细胞内 G-actin/F-actin 荧光强度比值与对照相比显著增加,即细胞内组装的 F-actin 向单体形式的 G-actin 转化增多。以上结果说明,EMT 进程中细胞骨架发生解聚,促进细胞的迁移和侵袭(见图 4)。

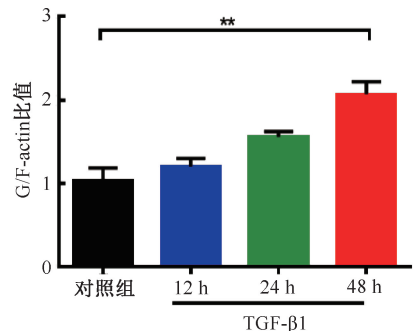


图 4 TGF-β1 促进细胞骨架解聚 (** $P < 0.01$, n=3)

Fig. 4 TGF-β1 depolymerized the actin cytoskeleton in A375 cells

2.4 TGF- β 1 降低细胞刚度

细胞骨架空间结构的稳定在维持细胞力学特性中起着重要作用。转移性较高的细胞通常表现出较低的细胞刚度,以便能穿过基底膜,进入血管发生转移^[9]。因此,本文探究肿瘤细胞发生 EMT 进程中细胞力学特性的变化。AFM 具有较高的精确度,是目前测量单细胞力学性能最常用的方法之一。通过 AFM 测量单个细胞核周的弹性模量,统计结果表明,TGF- β 1 刺激后,黑色素瘤 A375 细胞弹性模量与对照组相比显著降低,即细胞刚度减小。以上结果表明,在诱导肿瘤细胞发生 EMT 进程中,细胞刚度逐渐降低,细胞变得更加柔软(见图 5)。

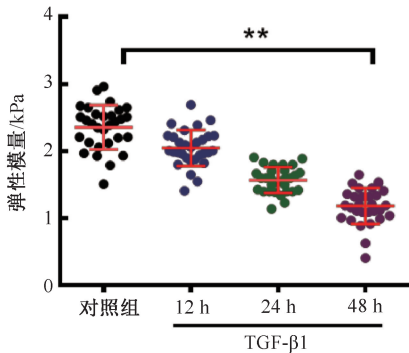


图 5 TGF- β 1 诱导的 EMT 过程中肿瘤细胞刚度变化 (** $P < 0.01, n = 30$)

Fig. 5 Cell stiffness changes during TGF- β 1-induced EMT in A375 cells

3 讨论

肿瘤的复发和转移是黑色素瘤预后差以及患者死亡的主要因素,故研究转移相关机制已成为黑色素瘤研究领域的热点之一。以往研究多从生化信号转导上着手,而关于细胞力学性质改变影响肿瘤细胞迁移的研究还不够深入。已有证据表明,TGF- β 1 等生长因子能通过诱导转录因子的表达促进细胞发生 EMT^[21]。因此,本文通过 TGF- β 1 构建人黑色素瘤细胞 EMT 模型,探讨 EMT 过程对细胞力学特性的调控作用,以及对肿瘤迁移和侵袭的影响与内在联系。研究结果表明,细胞力学特性的改变可能是潜在的肿瘤转移关键调控因素之一。

上皮间充质转换是肿瘤恶化的一个重要标志,与恶性肿瘤的形成和浸润,组织重塑和纤维化密切

相关。肿瘤细胞发生 EMT 后,促使细胞极性和细胞间连接的丧失,并会获得较高的转移和侵袭能力,从而随着血液循环和淋巴循环扩散至其他部位。研究发现,TGF- β 1 对人肺泡上皮细胞系 A549 的上皮间充质转换具有促进作用,TGF- β 1 通过 Smad2 的磷酸化诱导 EMT 发生,并被 Smad2 基因沉默所抑制^[16,26]。TGF- β 1 也能通过诱导转录因子 Snail1/2、ZEB1/2、HMGA2 等的表达促进上皮间充质转化^[27]。肿瘤细胞失去部分上皮细胞样的特性,获得间充质样的细胞特性是 EMT 发生的重要标志^[28]。因此,本文选取上皮表型标志物 E-cadherin 和间充质表型标志物 vimentin 作为肿瘤细胞发生 EMT 的标志蛋白^[29]。与上述研究结果一致,本文同样发现,TGF- β 1 刺激黑色素瘤 A375 细胞 48 h 后,细胞逐渐变得纤长,显著降低上皮样标志性蛋白 E-cadherin 的表达,增加间充质样蛋白 vimentin 表达,且细胞划痕愈合率和侵袭细胞数目都表明 TGF- β 1 刺激能成功构建 A375 细胞 EMT 模型,进而促进肿瘤转移和侵袭。

肿瘤细胞转移过程包含迁移、侵袭等运动行为。肿瘤细胞的转移和侵袭能力都与细胞本身的形变能力有关^[30],同时细胞的形变能力又与细胞自身的软硬(细胞刚度)关系紧密。随着癌细胞恶化或逐渐变得更具侵袭性,细胞显示出更柔软的力学特性,形成适合转移的细胞变形^[31]。因此,细胞变形程度和细胞刚度可能是评估癌细胞转移能力的重要指标之一。本文利用 AFM 测量细胞刚度,结果发现,在 TGF- β 1 介导的 EMT 中,细胞变得更加柔软,细胞刚度显著降低,细胞与细胞外基质的黏附破坏,增强了细胞脱离原位肿瘤的能力,进一步促进肿瘤转移。与本文结果相一致,Sun 等^[32]研究发现,盐霉素通过增强细胞刚度来减弱肝癌干细胞的运动性。尽管多数研究都认为,具有较高运动性的细胞通常比其他细胞更柔软,但 Rathje 等^[33]却发现,致癌基因通过增加细胞刚度促进细胞侵袭。因此,细胞刚度与运动能力之间矛盾的关系可能与具体的肿瘤类型有关。

细胞形态变化与细胞骨架动力学密切相关,F-actin 组装与去组装的动态平衡对于维持细胞刚度具有重要作用。当细胞发生恶性转化时,细胞骨架动力学发生改变,从而促进肿瘤转移和侵袭。近

年来研究表明, TGF- β 1 通过一系列复杂信号通路调控多种细胞骨架相关蛋白表达水平的变化以及细胞骨架重塑^[34-35]。本文发现, 在 TGF- β 1 介导的 EMT 过程中, 细胞骨架蛋白 G/F-actin 比值显著增加, 细胞骨架发生解聚, 细胞刚度降低, 最终促进黑色素瘤细胞的迁移和侵袭。但 EMT 过程中细胞骨架解聚以及细胞刚度降低的具体机制还尚不完全清楚。有研究报道, Rho GTPase 家族成员是肌动蛋白应力纤维组装的主要调节因子, 而 Arhgap28 通过抑制 RhoA 的活化来调控肌动蛋白骨架解聚^[36-37]。Zhang 等^[38]研究发现, 离子通道包括钙稳态介导了细胞骨架网络的重塑和细胞硬度。因此, TGF- β 1 是否通过 Arhgap28/RhoA 或钙稳态来调控细胞的力学特性, 需要更加深入的研究。

4 结论

本文通过 TGF- β 1 刺激构建黑色素瘤细胞 EMT 模型, 分析 TGF- β 1 介导的 EMT 进程中细胞力学特性的变化规律及其与细胞迁移的关系。结果发现, 在 TGF- β 1 介导的 EMT 进程中, 细胞肌动蛋白骨架发生解聚, 细胞刚度降低, 细胞变性能力增强, 从而进一步提高细胞的转移和侵袭能力。本研究结果表明, 细胞力学特性改变可能是促进肿瘤转移的关键因素之一。

参考文献:

[1] HANNIFORD D, ULLOA-MORALES A, KARZ A, *et al.* Epigenetic silencing of CDR1as drives IGF2BP3-mediated melanoma invasion and metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(1): 55-70.

[2] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.

[3] VALASTYAN S, WEINBERG RA. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 275-292.

[4] 赵凤龙, 李莉, 杨红, 等. 整合素介导血源性转移中肿瘤细胞与宿主细胞相互作用规律研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2014, 29(2): 180-187.

ZHAO FL, LI L, YANG H, *et al.* Integrin-mediated tumor cell-host cell interaction during hematogenous metastasis and their regulatory mechanisms [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(2): 180-187.

[5] SHAO S, ZHAO X, ZHANG X, *et al.* Notch1 signaling

regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 28.

[6] GAO J, ZHU Y, NILSSON M, *et al.* TGF-beta isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2014, 14(1): 72.

[7] THIERY JP, ACLOQUE H, HUANG RY, *et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.

[8] 江莹, 李顺, 杨红, 等. RalA 通过小窝蛋白-1 调节肿瘤细胞活性氧自由基和三磷酸腺苷的生成 [J]. *医用生物力学*, 2017, 32(5): 458-463.

JIANG Y, LI S, YANG H, *et al.* RalA regulates ROS and ATP production in cancer cells by association with cavelolin-1 [J]. *J Med Biomech*, 2017, 32(05): 458-463.

[9] RAMOS JR, PABIJAN J, GARCIA R, *et al.* The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process [J]. *Beilstein J Nanotechnol*, 2014, 5: 447-457.

[10] PERES-POLON VL, CORREA FM. Central mechanisms of the isoprenaline-induced hypotension in anesthetized and conscious rats [J]. *Gen Pharmacol*, 1984, 15(6): 505-509.

[11] SCHAEDEL L, LORENZ C, SCHEPERS AV, *et al.* Vimentin intermediate filaments stabilize dynamic microtubules by direct interactions [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3799.

[12] KOTILA T, WIOLAND H, ENKAVI G, *et al.* Mechanism of synergistic actin filament pointed end depolymerization by cyclase-associated protein and cofilin [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5320.

[13] SALZER E, ZOGHI S, KISS MG, *et al.* The cytoskeletal regulator HEM1 governs B cell development and prevents autoimmunity [J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(49): eabc3979.

[14] FLASCHNER G, ROMAN CI, STROHMEYER N, *et al.* Rheology of rounded mammalian cells over continuous high-frequencies [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2922.

[15] ESSMANN CL, MARTINEZ-MARTINEZ D, PRYOR R, *et al.* Mechanical properties measured by atomic force microscopy define health biomarkers in ageing *C. elegans* [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1043.

[16] WATANABE T, TAKAHASHI A, SUZUKI K, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in human gastric cancer cell lines induced by TNF- α -inducing protein of *Helicobacter pylori* [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(10): 2373-2382.

[17] CANOVIC EP, SEIDL DT, POLIO SR, *et al.*

- Biomechanical imaging of cell stiffness and prestress with subcellular resolution [J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2014, 13(3): 665-678.
- [18] WEDER G, HENDRIKS-BALK MC, SMAJDA R, *et al*. Increased plasticity of the stiffness of melanoma cells correlates with their acquisition of metastatic properties [J]. *Nanomedicine*, 2014, 10(1): 141-148.
- [19] OSBORNE LD, LI GZ, HOW T, *et al*. TGF-beta regulates LARG and GEF-H1 during EMT to affect stiffening response to force and cell invasion [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(22): 3528-3540.
- [20] RICE AJ, CORTES E, LACHOWSKI D, *et al*. Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells [J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(7): e352.
- [21] HAO Y, BAKER D, TDIJKE PT. TGF-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2767.
- [22] PANG MF, GEORGOUDAKI AM, LAMBUT L, *et al*. TGF-beta1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis [J]. *Oncogene*, 2016, 35(6): 748-760.
- [23] QIAO Y, CHEN J, LIM YB, *et al*. YAP Regulates actin dynamics through ARHGAP29 and promotes metastasis [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(8): 1495-1502.
- [24] CHEN YW, PAN HB, TSENG HH, *et al*. Differentiated epithelial- and mesenchymal-like phenotypes in subcutaneous mouse xenografts using diffusion weighted-magnetic resonance imaging [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 21943-21959.
- [25] AUGUST A, GIBSON S, KAWAKAMI Y, *et al*. CD28 is associated with and induces the immediate tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase ITK/EMT in the human Jurkat leukemic T-cell line [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(20): 9347-9351.
- [26] SLOGERYTE K, BOTTO L, LEE DA, *et al*. Chondrocyte dedifferentiation increases cell stiffness by strengthening membrane-actin adhesion [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(5): 912-920.
- [27] WANG J, WU M, ZHENG D, *et al*. Garcinol inhibits esophageal cancer metastasis by suppressing the p300 and TGF-beta1 signaling pathways [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(1): 82-92.
- [28] CASAS E, KIM J, BENDESKY A, *et al*. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(1): 245-254.
- [29] 李莉, 熊妮娅, 张婧, 等. 肿瘤细胞间相互作用: Notch-1 信号转导与调控机制 [J]. *医用生物力学*, 2016, 31(3): 284-90.
- LI L, XIONG NY, ZHANG J, *et al*. Cancer cell-cell interaction: Notch-1 signaling pathway and its regulation mechanisms [J]. *J Med Biomech*, 2016, 31(3): 284-290.
- [30] LEKKA M, LAIDLER P, IGNACAK J, *et al*. The effect of chitosan on stiffness and glycolytic activity of human bladder cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1540(2): 127-136.
- [31] SWAMINATHAN V, MYTHREYE K, O'BRIEN ET, *et al*. Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(15): 5075-5080.
- [32] SUN J, LUO Q, LIU L, *et al*. Salinomycin attenuates liver cancer stem cell motility by enhancing cell stiffness and increasing F-actin formation via the FAK-ERK1/2 signalling pathway [J]. *Toxicology*, 2017, 384: 1-10.
- [33] RATHJE LS, NORDGREN N, PETERSSON T, *et al*. Oncogenes induce a vimentin filament collapse mediated by HDAC6 that is linked to cell stiffness [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(4): 1515-20.
- [34] LOPEZ-ORTEGA O, OVALLE-GARCIA E, ORTEGA-BLAKE I, *et al*. Myo1g is an active player in maintaining cell stiffness in B-lymphocytes [J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2016, 73(5): 258-68.
- [35] LIU CY, LIN HH, TANG MJ, *et al*. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18): 15966-15983.
- [36] MANJON E, EDREIRA T, MUNOZ S, *et al*. Rgf1p (Rho1p GEF) is required for double-strand break repair in fission yeast [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(9): 5269-84.
- [37] YEUNG CY, TAYLOR SH, GARVA R, *et al*. Arhgap28 is a RhoGAP that inactivates RhoA and downregulates stress fibers [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107036.
- [38] ZHANG C, CHEN B, GUO A, *et al*. Microtubule-mediated defects in junctophilin-2 trafficking contribute to myocyte transverse-tubule remodeling and Ca²⁺ handling dysfunction in heart failure [J]. *Circulation*, 2014, 129(17): 1742-1750.