

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.004

· 基础研究 ·

## SIRP $\alpha$ 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 黏附、侵袭和凋亡的影响

王晨<sup>1,2</sup>, 杜荣辉<sup>1</sup>, 白蕊<sup>2</sup>(1. 南京大学医学院病理生理学教研室, 江苏南京 210093; 2. 南京大学生命科学学院生物学系, 江苏南京 210093)

**[摘要]** 目的: 研究信号调节蛋白 $\alpha$  (signal regulatory protein  $\alpha$ , SIRP $\alpha$ )对乳腺癌细胞黏附、侵袭和凋亡的影响及其可能机制。方法: Western blotting 检测侵袭能力强的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞和侵袭能力弱的 MDA-MB-435 乳腺癌细胞中 SIRP $\alpha$  蛋白的表达。脂质体法将 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染 MDA-MB-231 细胞后, RT-PCR 检测 MDA-MB-231 细胞 SIRP $\alpha$  mRNA 的表达, TUNEL 法检测细胞的凋亡, 细胞侵袭实验观察细胞侵袭能力变化, 黏附实验观察细胞黏附能力变化, Western blotting 检测 JNK 和 p-JNK 蛋白的表达。EGF 刺激 MDA-MB-435 细胞, 免疫共沉淀检测 MDA-MB-435 细胞中 SIRP $\alpha$  与 SHP2 的结合。结果: 侵袭能力强的 MDA-MB-231 细胞不表达 SIRP $\alpha$ , 侵袭能力弱的 MDA-MB-435 细胞表达高水平 SIRP $\alpha$  蛋白。pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染可增强 MDA-MB-231 细胞的黏附, 降低 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力, 并促进 MDA-MB-231 细胞的凋亡。pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染抑制 MDA-MB-231 细胞 JNK 的磷酸化。EGF 刺激可进一步上调 MDA-MB-435 细胞中 SIRP $\alpha$  蛋白表达, 并促进 SIRP $\alpha$  与 SHP-2 蛋白的结合。结论: SIRP $\alpha$  与乳腺癌细胞的黏附、侵袭能力相关, 并可能通过抑制 JNK 磷酸化促进乳腺癌细胞凋亡。

**[关键词]** 信号调节蛋白 $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ); 凋亡; JNK; 侵袭; 黏附

**[中图分类号]** R737.9; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2010)06-0609-06

## Influence of signal regulatory protein $\alpha$ on adhesion, invasion and apoptosis of breast cancer cell line MDA-MB-231

WANG Chen<sup>1,2</sup>, DU Rong-hui<sup>1</sup>, BAI Rui<sup>2</sup>(1. Department of Pathophysiology, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China; 2. Department of Biology, Life Science School, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) on the adhesion, invasion and apoptosis of human breast cancer cells, and to explore the possible mechanism. **Methods:** SIRP $\alpha$  protein expression in high invasion breast cancer MDA-MB-231 cells and low invasion breast cancer MDA-MB-435 cells were detected by Western blotting analysis. pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  plasmid was transfected into MDA-MB-231 cells by lipofectant assay, and SIRP $\alpha$  mRNA expression was examined by RT-PCR. Apoptosis of cells was examined by TUNEL method; invasion and adhesion abilities of MDA-MB-231 cells were examined by invasion or adhesion assays; and JNK and p-JNK protein expressions were determined by Western blotting analysis. Interaction of SIRP $\alpha$  with SHP2 in MDA-MB-435 cells stimulated with EGF was determined by immunoprecipitation assay. **Results:** Highly invasive MDA-MB-231 cells did not express SIRP $\alpha$ , while lowly invasive MDA-MB-435 cells expressed high level of SIRP $\alpha$  protein. pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  transfection enhanced the adhesion of MDA-MB-231 cells, decreased their invasion ability, and promoted their apoptosis. Phosphorylation of JNK in pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  transfected MDA-MB-231 cells was also decreased. EGF stimulation further increased SIRP $\alpha$  protein expression in MDA-MB-435 cells and enhanced the interaction of SIRP $\alpha$  with SHP2. **Conclusion:** SIRP $\alpha$  is related to adhesion and invasion of breast cancer cells, and might promote their apoptosis by decreasing the phosphorylation of JNK.

**[Key words]** signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ); apoptosis; JNK; invasion; adhesion

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(6): 609-614]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30901805/H3102)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30901805/H3102)

**[作者简介]** 王晨(1975-),女,江苏省南京市人,博士,主要从事肿瘤发病机制研究。E-mail: wangchen922@sina.com

**[网络出版]** 2010-12-06; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20101206.1535.010.html>

近年来乳腺癌的发病率明显增加,而发生机制不明确,乳腺癌治疗后的复发和病死率仍很高<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3-4]</sup>证实,乳腺癌细胞高表达 EGFR,并具有很强的转移和侵袭能力,而 EGFR 下游信号转导通路较为复杂。信号调节蛋白  $\alpha$  (signal regulatory protein  $\alpha$ , SIRP $\alpha$ ) 属于免疫球蛋白超家族的跨膜糖蛋白, SIRP $\alpha$  胞内段含免疫受体酪氨酸抑制基序 (immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif, ITIM), 当细胞受到生长因子刺激时, SIRP $\alpha$  胞内段 ITIM 发生磷酸化,可抑制相应生长因子的活性<sup>[5-6]</sup>。在单核细胞或中性粒细胞中,阻断 SIRP $\alpha$  可以抑制单核细胞或中性粒细胞的侵袭和迁移,增强细胞黏附。SIRP $\alpha$  突变后的小鼠成纤维细胞失去在纤维连接蛋白上伸展和迁移的能力<sup>[7-8]</sup>。研究<sup>[9-10]</sup>发现, SIRP $\alpha$  可抑制 EGFR 信号转导通路,抑制侵袭和转移,促进细胞凋亡,但关于 SIRP $\alpha$  和乳腺癌细胞侵袭、转移和凋亡的关系很少有报道。本研究观察 SIRP $\alpha$  蛋白的表达与乳腺癌细胞侵袭和凋亡的关系,发现 SIRP $\alpha$  可能通过活化 JNK, 促进细胞凋亡。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和 EGF 刺激

人乳腺癌侵袭能力弱的 MDA-MB-435 细胞株和侵袭能力强的 MDA-MB-231 细胞株由南京医科大学韩晓教授惠赠。上述细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素的 Leibobitz's L-15 培养基 (Gibco) 培养。EGF 刺激前,细胞无血清饥饿 16 h, EGF 终质量浓度为 50 ng/ml (Invitrogen 公司), 每个时间点重复检测 3 次。

### 1.2 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$ 质粒转染 MDA-MB-231 细胞

pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  质粒<sup>[11-12]</sup>由南京大学生命科学院曾科教授惠赠。2  $\times$  10<sup>5</sup> 个 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板,培养过夜,第 2 天 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 介导 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  质粒转染入 MDA-MB-231 细胞。方法如下:分别稀释 5  $\mu$ g pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  和 12  $\mu$ l Lipofectamine 于 200  $\mu$ l 无血清培养基,两者混合后,室温静置 20 min。将 400  $\mu$ l 混合物加入 MDA-MB-231 细胞中,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱 48 h,免疫荧光染色检测 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染效率。同时设 pcDNA3.0 空质粒 (Invitrogen 公司) 转染对照组。

### 1.3 免疫荧光染色检测转染后 MDA-MB-231 细胞中 SIRP $\alpha$ 的表达

转染后 MDA-MB-231 细胞爬片用 PBS 洗 3 遍, 3.7% 多聚甲醛固定 10 min, 0.1% Triton X-100 通

透 10 min, PBS 洗涤后, 1% BSA 室温孵育 1 h。加入兔抗人 SIRP $\alpha$  一抗 (1% BSA 封闭液以 1:300 稀释), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗 3 遍后, 滴加罗丹明标记的羊抗兔的荧光二抗 (KPL 公司), 室温孵育 30 min。PBS 洗去游离抗体, 置荧光显微镜下观察 SIRP $\alpha$  的表达。

### 1.4 RT-PCR 检测转染后 MDA-MB-231 细胞中 SIRP $\alpha$ mRNA 的表达

用 TRIzol、氯仿和异丙醇提取转染后 MDA-MB-231 细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA。SIRP $\alpha$  正向引物为 5'-CCCTCTACCTCGTCCGAATC-3', 反向引物为 5'-CTGCGGGCTGGTCTGAAT-3'。PCR 反应条件如下: 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 1 min, 64  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 50 s, 共 29 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 然后用捷达 JD801 凝胶电泳图像分析系统采集和分析电泳图像。

### 1.5 TUNEL 法和免疫荧光显微镜检测细胞凋亡

pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染 24 h 后, MDA-MB-231 细胞用 PBS 洗 3 遍, 然后用 3.7% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤后用 0.1% Triton X-100 通透 10 min, 再室温下用 PBS 洗 3 遍, 滴加 TUNEL 反应混合物 100  $\mu$ l (Roche 公司), 避光 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 然后用 Prolong Antifade 试剂盒 (Invitrogen 公司, Lot: 28519) 封片。奥林巴斯公司的共聚焦显微镜下观察凋亡细胞核、凋亡小体。每张片计数 5 个视野, 每个视野用凋亡细胞数除以视野中所有细胞数得到凋亡指数, 取平均值做比较。

### 1.6 黏附实验检测 MDA-MB-231 细胞的黏附能力

将人纤维连接蛋白 (FN) 均匀涂在 24 孔板的底部, 铺板 5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, 室温放置 60 min。胰酶/EDTA 消化以后, 将转染了 pcDNA3.0 或 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  质粒的 MDA-MB-231 细胞调整为 2  $\times$  10<sup>6</sup>/ml 的细胞悬液, 每孔 500  $\mu$ l 细胞悬液接种于铺好 FN 的 24 孔板, 每种细胞设 6 个复孔。1 h 后弃细胞悬液, PBS 洗涤后用 0.1% 结晶紫室温摇晃染色 5 min<sup>[13]</sup>。PBS 洗涤后再用 10% 乙酸室温孵育 10 min, 酶标仪下检测 570 nm 处的光密度值 ( $D$ ) 来反映细胞黏附能力。

### 1.7 侵袭实验检测 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力

将 50  $\mu$ l 基质胶 (5  $\mu$ g/ml, BD Biosciences 公司) 加入 24 孔 Transwell 小室 (8.0  $\mu$ m 膜孔径, Costar 公司) 上室中, 37  $^{\circ}$ C 包被 30 min, 备用。在 Transwell 小室的上室中加入 1  $\times$  10<sup>5</sup> 个 MDA-MB-231 细胞 (总体积 200  $\mu$ l, 无血清培养), 下室中加入 500  $\mu$ l 含 20% 胎牛血清的培养基作为趋化剂, 6 h 后终止

实验。用棉签轻轻擦去上室的细胞和基质胶,3.7%多聚甲醛液体固定 10 min, PBS 洗后苏木精染色 0.5 h。水洗多次后置显微镜下观察聚碳酸酯膜上的紫色细胞数。每张膜随机数 5 个视野。每种处理设 3 复孔。

### 1.8 Western blotting 检测肿瘤细胞中 SIRP $\alpha$ 、p-JNK、JNK 蛋白表达

消化收集 MDA-MB-231 细胞或 MDA-MB-435 细胞,冷 PBS 洗 2 次,裂解细胞,离心取上清。BCA 法测蛋白浓度,调整蛋白浓度后,行 SDS-PAGE,然后用半干转膜仪转至硝酸纤维素膜,5% BSA-PBST 封闭 2 h。加入相应一抗(用封闭液稀释),其中抗 SIRP $\alpha$ (Chemicon 公司)1:1 000 稀释,抗 p-JNK(Thr183/Tyr185, Thr221/Tyr223; Millipore 公司)1:500 稀释,抗 JNK(Cell Signaling 公司)1:1 000 稀释,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 洗涤后加入羊抗兔二抗,室温孵育 1.5 h, PBST 洗 4 次后,加入 ECL 化学发光混合物(Pierce 公司)反应 1 min,暗室里用 X 线胶片曝光。

### 1.9 免疫共沉淀检测 SIRP $\alpha$ 与 SHP2 的结合

$3 \times 10^6$  个无血清培养的 MDA-MB-435 细胞加入 35 mm 培养皿中,EGF 刺激不同时间后收集细胞,加入裂解液,冰上裂解 1 h。调整所有样品蛋白质量浓度至 1 mg/ml,加入 2  $\mu$ l SIRP $\alpha$  一抗,4  $^{\circ}$ C 轻轻转动孵育过夜。再加入 100  $\mu$ l 蛋白 A 琼脂糖珠,室温继续孵育 1 h。离心收集琼脂糖珠,洗涤后将琼脂糖珠重悬于 60  $\mu$ l 2 $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液中,煮沸 5 min,解离免疫复合物,取上清行 SDS-PAGE, Western blotting 检测免疫复合物中 SHP2 的表达。同样上述方法,用 SHP2 反方向免疫沉淀检测免疫复合物中 SIRP $\alpha$  的表达。

### 1.10 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS10.0 统计软件,两两间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 MDA-MB-435 与 MDA-MB-231 细胞中 SIRP $\alpha$ 蛋白的表达情况

Western blotting 检测乳腺癌 MDA-MB-435 和 MDA-MB-231 细胞中 SIRP $\alpha$  的表达,结果(图 1)发现,MDA-MB-435 细胞表达 SIRP $\alpha$ ,而 MDA-MB-231 细胞不表达 SIRP $\alpha$ 。因此,后续实验采用 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染 MDA-MB-231 细胞,研究 SIRP $\alpha$  表达对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生物学行为的影响。

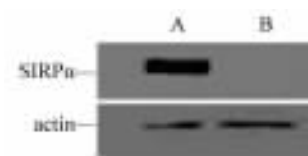


图 1 MDA-MB-435 细胞(A)与 MDA-MB-231 细胞(B)中 SIRP $\alpha$  蛋白的表达情况

Fig. 1 SIRP $\alpha$  protein expression in MDA-MB-435 (A) and MDA-MB-231 (B) cells

### 2.2 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$ 有效转染 MDA-MB-231 细胞

pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  质粒转染 MDA-MB-231 细胞,免疫荧光检测结果(图 2)证实,转染 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  后的 MDA-MB-231 细胞表达高水平的 SIRP $\alpha$  蛋白,而对照 pcDNA3.0 质粒转染 MDA-MB-231 细胞不表达 SIRP $\alpha$  蛋白。

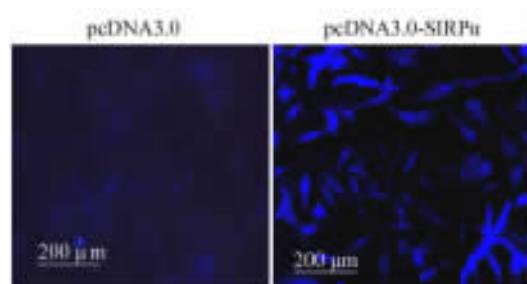


图 2 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染的 MDA-MB-231 细胞表达 SIRP $\alpha$  蛋白

Fig. 2 Expression of SIRP $\alpha$  protein in MDA-MB-231 cells transfected with pcDNA3.0-SIRP $\alpha$

### 2.3 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$ 转染减弱 MDA-MB-231 细胞对 EGF 的反应

细胞黏附实验结果(图 3)发现,转染 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  质粒可增强 MDA-MB-231 细胞的黏附能力。进一步用 50 ng/ml EGF 刺激 MDA-MB-231 细胞后发现,EGF 刺激可增强 MDA-MB-231 细胞的黏附能力;但 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染后,EGF 的刺激效应消失,EGF 不能进一步增强 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染后 MDA-MB-231 细胞的黏附能力(图 3)。结果提示,SIRP $\alpha$  能增强乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的黏附能力,但抑制 MDA-MB-231 细胞对 EGF 的反应。

### 2.4 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$ 转染抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力

侵袭实验检测 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响,结果(图 4)显示,pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染组 MDA-MB-231 细胞穿透基

质胶到达聚碳酸膜的细胞数显著少于 pcDNA3.0 对照组,提示 SIRP $\alpha$  可抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力。

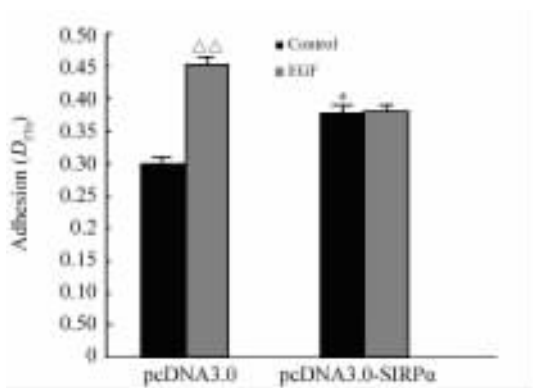


图3 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染增强 MDA-MB-231 细胞的黏附能力

Fig. 3 pcDNA3.0-SIRP transfection enhanced adhesion of MDA-MB-231 cells

\*  $P < 0.05$  vs pcDNA3.0,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs control

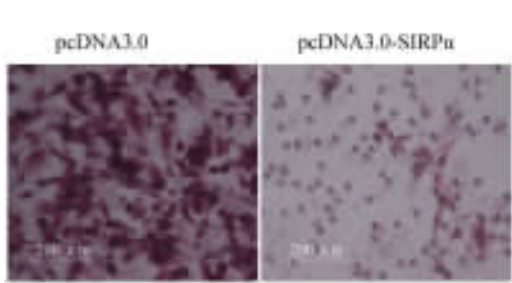


图4 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭  
Fig. 4 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  transfection inhibited invasion of MDA-MB-231 cells

### 2.5 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$ 转染促进 MDA-MB-231 细胞凋亡

TUNEL 检测转染 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  质粒对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响。结果(图5)显示,凋亡细胞和凋亡小体在 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染组各视野中到处可见,平均凋亡指数达(57.0 ± 2.1)%,显著高于 pcDNA3.0 转染组的(1.7 ± 0.09)%( $P < 0.05$ )。

### 2.6 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$ 转染抑制 MDA-MB-231 细胞 JNK 的磷酸化

本研究继续探讨 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染对 MDA-MB-231 细胞 JNK 磷酸化的影响。Western blotting 实验结果显示,未转染 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  的 MDA-MB-231 细胞有较强的 JNK 磷酸化,

pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染抑制 MDA-MB-231 细胞 JNK 的磷酸化,且 EGF 刺激不能进一步上调 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染后 MDA-MB-231 细胞中 JNK 的磷酸化(图6)。因此,pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染抑制 MDA-MB-231 细胞 JNK 的磷酸化。

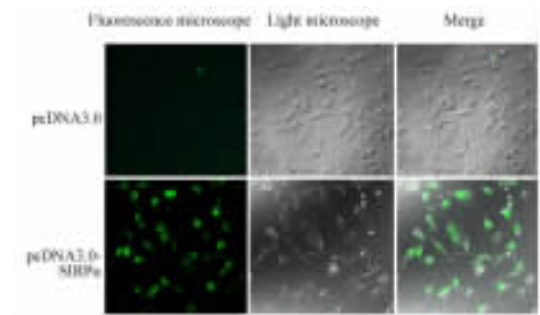


图5 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染促进 MDA-MB-231 细胞凋亡(×100)

Fig. 5 pcDNA3.0-SIRP transfection promoted apoptosis of MDA-MB-231 cells (×100)

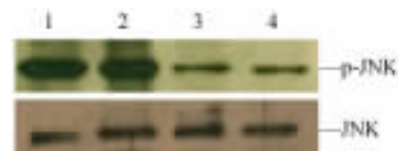


图6 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染抑制 MDA-MB-231 细胞 JNK 的磷酸化

Fig. 6 pcDNA3.0-SIRP transfection inhibited phosphorylation of JNK in MDA-MB-231 cells

1: pcDNA3.0; 2: pcDNA3.0 + EGF; 3: pcDNA3.0-SIRP $\alpha$ ; 4: pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  + EGF

### 2.7 EGF 促进 MDA-MB-435 细胞中 SIRP $\alpha$ -SHP2 复合物的形成

MDA-MB-435 细胞表达 SIRP $\alpha$  蛋白,EGF 刺激 MDA-MB-435 细胞后发现,EGF 可进一步上调 MDA-MB-435 细胞中 SIRP $\alpha$  蛋白的表达,在 15 min 表达显著增加(图7A)。但 RT-PCR 结果发现,EGF 刺激 MDA-MB-435 细胞,不同时间点的 SIRP $\alpha$  mRNA 表达水平没有显著差异(图7B),提示 EGF 可能从转录后水平上调 MDA-MB-435 细胞 SIRP $\alpha$  蛋白的表达。

已有的研究<sup>[14-15]</sup>证实,SHP-2 蛋白是 SIRP $\alpha$  的直接靶蛋白。本研究用免疫沉淀分析 EGF 是否可促进乳腺癌细胞中 SIRP $\alpha$  与 SHP-2 蛋白的结合。结果显示,EGF 刺激 15 ~ 60 min,SIRP $\alpha$ -SHP2 复合物的量明显增加(图8)。



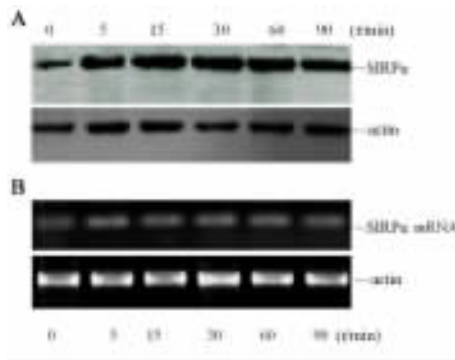


图7 EGF上调MDA-MB-435细胞中SIRP $\alpha$ 蛋白(A)的表达而不影响SIRP $\alpha$  mRNA(B)的表达

Fig.7 EGF increased SIRP $\alpha$  protein (A) but not SIRP $\alpha$  mRNA (B) expressions in MDA-MB-231 cells

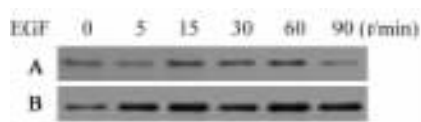


图8 免疫共沉淀检测EGF促进MDA-MB-435细胞中SIRP $\alpha$ -SHP2复合物的形成

Fig.8 EGF promoted interaction of SIRP $\alpha$  with SHP-2 in MDA-MB-231 cells as detected by immunoprecipitation

A: Cell lysis was immunoprecipitated with SIRP $\alpha$  and bound SHP-2 protein was detected by Western blotting analysis; B: Cell lysis was immunoprecipitated with SHP-2 and bound SIRP $\alpha$  protein was detected by Western blotting analysis

### 3 讨论

SIRP $\alpha$  是 Ig 超家族膜蛋白成员,有报道<sup>[16]</sup>肿瘤细胞转染 SIRP $\alpha$  后,使细胞对生长因子的刺激效应减弱。SIRP $\alpha$  的胞内段十分保守,在大鼠、小鼠和人类 SIRP $\alpha$  胞内段均含有 ITIM 基序<sup>[17]</sup>,该基序介导了 SIRP $\alpha$  与磷酸酶 SHP2 的结合<sup>[18]</sup>。SHP2 包含一个催化结构域(PTP)和一个酪氨酸磷酸化基序<sup>[19-20]</sup>。SIRP $\alpha$  与 SHP2 的结合激活了酶的催化结构域,然后抑制 SIRP $\alpha$  的信号转导通路<sup>[21-22]</sup>。研究<sup>[14]</sup>显示,SIRP $\alpha$  能调节多种分子的信号转导,包括受体酪氨酸激酶(RTK)、整合素、G 蛋白偶联受体。这些研究提示,调节 SIRP $\alpha$  水平可影响细胞的生物学功能,从而有可能作为新的治疗靶点。近年来 SIRP $\alpha$  的研究集中于白细胞、神经胶质瘤细胞和神经元细胞,而 SIRP $\alpha$  在肿瘤细胞信号转导中的作用仍研究很少<sup>[15]</sup>,目前还鲜有关于 SIRP $\alpha$  表达与乳腺癌细胞侵袭和凋亡关系的报道。

细胞黏附过程中的重要步骤是细胞外纤维连接

蛋白与细胞膜上整合素的结合,这种结合可以使 SIRP $\alpha$  蛋白胞内段 ITIM 基序磷酸化,从而抑制细胞对生长因子的反应<sup>[23]</sup>。本研究用纤维连接蛋白参与的细胞黏附实验证明,MDA-MB-231 细胞转染了 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  质粒后,对 EGF 刺激的反应下降,EGF 不再能增强该乳腺癌细胞的黏附能力。癌症的转移是癌细胞从原发灶脱落,并移动到另一个部位,在局部生长因子的刺激下黏附能力增强,形成新的癌灶。因此 SIRP $\alpha$  可以作为一种抑癌蛋白抑制肿瘤细胞的侵袭和转移灶的形成。

酪氨酸磷酸化的 SIRP $\alpha$  与 SHP-2 结合,激活 SHP-2 的磷酸酶活性,SHP-2 与 JNK 信号分子关系密切。JNK 又称为 MAPK8/9,是一种抗凋亡信号分子<sup>[24]</sup>。Bost 等<sup>[25]</sup>发现,寡核苷酸通过抑制 JNK 转录,可抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡。由于 JNK 参与乳腺癌细胞的增殖和凋亡过程<sup>[13,26]</sup>,本研究进一步探讨 pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染对 MDA-MB-231 细胞 JNK 磷酸化的影响,结果发现,pcDNA3.0-SIRP $\alpha$  转染后 MDA-MB-231 细胞 SIRP $\alpha$  蛋白表达增加,但 MDA-MB-231 细胞的 JNK 磷酸化水平显著下降,同时伴有明显的细胞凋亡指数增加、侵袭能力下降。因此,本研究提出 SIRP $\alpha$  可能通过抑制 JNK 磷酸化而诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡、抑制细胞侵袭。

本研究中 EGF 上调 MDA-MB-435 细胞中 SIRP $\alpha$  蛋白的表达,表明 SIRP $\alpha$  的蛋白表达受 EGF 信号通路调控,但 SIRP $\alpha$  mRNA 表达水平没有显著差异,因此 EGF 可能不是在转录水平而是转录后水平发挥调控作用。最近 Gurpreet 等<sup>[27]</sup>发现,EGFR 在转录后水平上对 SIRP $\alpha$  进行调控,与本研究的结果吻合。SHP-2 是调节 EGFR 与下游 RTK-Grb2-SOS 复合物的关键蛋白<sup>[28]</sup>,而 SIRP $\alpha$  直接与 SHP-2 结合,显著激活 SHP-2 的磷酸酶活性,抑制下游 MAPK 分子的活化,从而抑制 EGFR 等通路活化。考虑到 EGF 刺激后,MDA-MB-435 细胞中 SIRP $\alpha$ -SHP-2 复合物增加,本研究认为 SIRP $\alpha$  可通过结合并激活 SHP2,抑制肿瘤细胞增殖和迁移。

本研究结果发现,SIRP $\alpha$  抑制 MDA-MB-231 细胞 JNK 的活化,促进肿瘤细胞凋亡,因此 SIRP $\alpha$  可能是一种抑癌蛋白。后续的研究将致力于弄清可以调节 SIRP $\alpha$  表达的转录因子,以及 SIRP $\alpha$  表达对乳腺癌细胞生物学功能的影响。MDA-MB-435 细胞恶性程度低、黏附牢固而转移能力差,表达 SIRP $\alpha$ ;相反,MDA-MB-231 细胞不表达 SIRP $\alpha$ ,是一种侵袭和转移能力极强的乳腺癌细胞。因此本研究希望通过阐

明 SIRP $\alpha$  的促进凋亡和抑制侵袭的功能, 为乳腺癌患者探索新的分子治疗方向。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development [ J ]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4( 4 ): 221-233.
- [ 2 ] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines [ J ]. *Cell*, 2002, 110( 6 ): 673-687.
- [ 3 ] Cáceres M, Guerrero J, Martínez J. Overexpression of RhoA-GTP induces activation of the epidermal growth factor receptor, dephosphorylation of focal adhesion kinase and increased motility in breast cancer cells [ J ]. *Exp Cell Res*, 2005, 309( 1 ): 229-238.
- [ 4 ] Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, Hunter T. Epidermal growth factor induced tumor cell invasion initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase [ J ]. *Mol Cell Biol*, 2001, ( 12 ): 4016-4031.
- [ 5 ] Stofega MR, Argetsinger LS, Wang H, Mllrich A, Carter-Su C. Negative regulation of growth hormone receptor/JAK2 signaling by signal regulatory protein alpha [ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 275( 36 ): 28222-28229.
- [ 6 ] Maile LA, Clemmons DR. Regulation of insulin-like growth factor I receptor dephosphorylation by SHPS-1 and the tyrosine phosphatase SHP-2 [ J ]. *J Biol Chem*, 2002, 277( 11 ): 8955-8960.
- [ 7 ] de Vries HE, Hendriks JJ, Honing H, De Lavalette CR, van der Pol SM, Hooijberg E, et al. Signal-regulatory protein-CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium [ J ]. *J Immunol*, 2002, 168( 11 ): 5832-5839.
- [ 8 ] Inagaki K, Yamao T, Noguchi T, Matozaki T, Fukunaga K, Takada T, et al. SHPS-1 regulates integrin-mediated cytoskeletal reorganization and cell motility [ J ]. *EMBO J*, 2000, 19( 24 ): 6721-6731.
- [ 9 ] Ramírez BS, Alpízar YA, Fernández DR, Hidalgo GG, Capote AR, Rodríguez RP, et al. Anti-EGFR activation, anti-proliferative and pro-apoptotic effects of polyclonal antibodies induced by EGFR-based cancer vaccine [ J ]. *Vaccine*, 2008, 26( 38 ): 4918-4926.
- [ 10 ] Bischoff J, Ignatov A. The role of targeted agents in the treatment of metastatic breast cancer [ J ]. *Breast Care ( Basel )*, 2010, 5( 3 ): 134-141.
- [ 11 ] Liu Y, Bühring HJ, Zen K, Burst SL, Schnell FJ, Williams IR, et al. Signal regulatory protein alpha, a cellular ligand for CD47, regulates neutrophil transmigration [ J ]. *J Biol Chem*, 2002, 277( 12 ): 10028-10036.
- [ 12 ] Liu Y, Tong Q, Zhou Y, Lee HW, Yang JJ, Bühring HJ, et al. Functional elements on SIRPalpha IgV domain mediate cell surface binding to CD47 [ J ]. *J Mol Biol*, 2007, 365( 3 ): 680-693.
- [ 13 ] Chen TT, Brown EJ, Huang EJ, Seaman WE. Expression and activation of signal regulatory protein alpha on astrocytomas [ J ]. *Cancer Res*, 2004, 64( 1 ): 117-127.
- [ 14 ] Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6( 6 ): 457-464.
- [ 15 ] Oshima K, Ruhul Amin AR, Suzuki A, Hamaguchi M, Matsuda S. SHPS-1, a multifunctional transmembrane glycoprotein [ J ]. *FEBS Lett*, 2002, 519( 1/2/3 ): 1-7.
- [ 16 ] Zhou X, Agazie YM. Molecular mechanism for SHP2 in promoting HER2-induced signaling and transformation [ J ]. *J Biol Chem*, 2009, 284( 18 ): 12226-12234.
- [ 17 ] Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling [ J ]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28( 6 ): 2842-2893.
- [ 18 ] Wu CJ, Chen Z, Mllrich A, Greene MI, ORourke DM. Inhibition of EGFR-mediated phosphoinositide-3-OH kinase ( PI3-K ) signaling and glioblastoma phenotype by signal-regulatory proteins ( SIRPs ) [ J ]. *Oncogene*, 2000, 19( 35 ): 3999-4010.
- [ 19 ] Veillette A, Thibaudau E, Latour S. High expression of inhibitory receptor SHPS-1 and its association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages [ J ]. *J Biol Chem*, 1998, 273( 35 ): 22719-22728.
- [ 20 ] Stofega MR, Wang H, Mllrich A, Carter-Su C. Growth hormone regulation of SIRP and SHP-2 tyrosyl phosphorylation and association [ J ]. *J Biol Chem*, 1998, 273( 12 ): 7112-7117.
- [ 21 ] Brooke G, Holbrook JD, Brown MH, Barclay AN. Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein ( SIRP ) family [ J ]. *J Immunol*, 2004, 173( 4 ): 2562-2570.
- [ 22 ] Sechler JL, Cumiskey AM, Gazzola DM, Schwarzbauer JE. A novel RGD-independent fibronectin assembly pathway initiated by alpha4beta1 integrin binding to the alternatively spliced V region [ J ]. *J Cell Sci*, 2000, 113( Pt 8 ): 1491-1498.
- [ 23 ] Standen CL, Kennedy NJ, Flavell RA, Davis RJ. Signal transduction cross talk mediated by Jun N-terminal kinase-interacting protein and insulin receptor substrate scaffold protein complexes [ J ]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29( 17 ): 4831-4840.
- [ 24 ] Bost F, McKay R, Bost M, Potapova O, Dean NM, Mercola D. The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor 2 induced transformation of human A549 lung carcinoma cells [ J ]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19( 3 ): 1938-1949.
- [ 25 ] Byun HJ, Hong IK, Kim E, Jin YJ, Jeoung DI, Hahn JH, et al. A Splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways [ J ]. *J Biol Chem*, 2006, 281( 46 ): 34833-34847.
- [ 26 ] Fu P, Jiang X, Arcasoy MO. Constitutively active erythropoietin receptor expression in breast cancer cells promotes cellular proliferation and migration through a MAP-kinase dependent pathway [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379( 3 ): 696-701.
- [ 27 ] Kapoor GS, Kapitonov D, O' Rourke DM. Transcriptional regulation of signal regulatory protein alpha1 inhibitory receptors by epidermal growth factor receptor signaling [ J ]. *Cancer Res*, 2004, 64( 18 ): 6444-6452.
- [ 28 ] Kang B, Liang Y, Shan Y, Guo M, Liu S, Fu X, et al. SIRPalpha negatively regulates differentiation of PC12 cell [ J ]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 138( 2 ): 205-214.

[ 收稿日期 ] 2010-08-02

[ 修回日期 ] 2010-09-17

[ 本文编辑 ] 王莹