

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.02.009

· 基础研究 ·

骨唾液酸蛋白对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 PI3K-AKT 信号通路的影响

杨德猛^{1,2}, 王捷¹, 彭远远^{1,2}, 王丽^{1,2}, 夏冰², 张宏斌², 杨传红², 张海燕² (1. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510006; 2. 广州军区广州总医院 医学实验科, 广东 广州 510010)

[摘要] 目的: 探讨骨唾液酸蛋白(bone sialoprotein, BSP)对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 PI3K-AKT 信号通路的影响。方法: BSP 基因沉默的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞(简称 231BO-BSP27)经重组人 BSP(recombinant human BSP, rhBSP)和 PI3K-AKT 抑制剂 LY294002 处理后, Western blotting 检测磷酸化 AKT 水平的变化, 实时定量 PCR 检测 caspase-3、cyclin D1 mRNA 表达水平, MTT 法检测细胞增殖能力。结果: 与 BSP 基因未沉默的对照组 231BO-Scrambled 细胞相比, BSP 基因沉默的 231BO-BSP27 细胞 BSP 蛋白表达明显下调(74.32 ± 2.18)% ($P < 0.01$); AKT 磷酸化水平明显下降(33.30 ± 2.61)% ($P < 0.01$), 而 caspase-3 和 cyclin D1 mRNA 表达分别上升和下降(1.000 ± 0.000 vs 1.733 ± 0.039, 1.000 ± 0.000 vs 0.370 ± 0.012; 均 $P < 0.01$); 231BO-BSP27 细胞增殖能力显著下降($P < 0.05$)。外源添加 rhBSP 蛋白分别上调 231BO-Scrambled 和 231BO-BSP27 细胞 AKT 磷酸化水平(17.86 ± 2.27)% 和(33.78 ± 1.51)% (均 $P < 0.01$), 231BO-BSP27 细胞 caspase-3 mRNA 表达降低(1.000 ± 0.039 vs 0.541 ± 0.091, $P < 0.01$), cyclin D1 mRNA 表达升高(1.000 ± 0.000 vs 2.921 ± 0.032, $P < 0.01$), 促进 231BO-Scrambled 和 231BO-BSP27 细胞的增殖(均 $P < 0.01$)。LY294002 则能逆转 rhBSP 对 231BO-Scrambled 和 231BO-BSP27 细胞 AKT 磷酸化激活作用($P < 0.05$), 使 231BO-BSP27 细胞 caspase-3 mRNA 表达升高($P < 0.01$), cyclin D1 mRNA 表达降低($P < 0.01$), 使该两种细胞增殖能力下降(均 $P < 0.01$)。结论: BSP 通过 PI3K-AKT 信号通路调控乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 caspase-3 和 cyclin D1 的表达, 并影响细胞的增殖。

[关键词] 骨唾液酸蛋白; 乳腺癌细胞; LY294002; PI3K-AKT 信号通路

[中图分类号] R737.9; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)02-0165-05

Effect of bone sialoprotein on PI3K-AKT signaling pathway of breast cancer MDA-MB-231 cells

YANG De-meng^{1,2}, WANG Jie¹, PENG Yuan-yuan^{1,2}, WANG Li^{1,2}, XIA Bing², ZHANG Hong-bin², YANG Chuang-hong², ZHANG Hai-yan² (1. School of Bioscience and Engineering South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China; 2. Center of Medical Research, Guangzhou General Hospital, PLA Guangzhou Military Area Command, Guangzhou 510010, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of bone sialoprotein (BSP) on the PI3K-AKT signaling pathway in breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods:** BSP-silenced MDA-MB-231 cells were treated with recombinant human BSP (rhBSP) and the PI3K-AKT specific inhibitor LY294002. Western blotting analysis was used to detect the phosphorylation of AKT, qPCR was conducted to evaluate caspase-3, cyclin D1 mRNA expressions, and the proliferation of cells was analyzed by MTT assay. **Results:** Compared with the 231BO-Scrambled cells in control group, BSP protein expression in BSP-silenced 231BO-BSP27 cells was significantly lower (74.32 ± 2.18)% ($P < 0.01$), and expression level of AKT phosphorylation was also significantly lower (33.30 ± 2.61)% ($P < 0.01$), resulting in up-regulation of caspase-3 mRNA level (1.000 ± 0.000 vs 1.733 ± 0.039, $P < 0.01$), down-regulation of cyclin D1 mRNA (1.000 ± 0.000 vs 0.370 ± 0.012, $P < 0.01$), and the inhibition of 231BO-BSP27 cells growth ($P < 0.05$). After treatment with exogenous rhBSP, the phosphorylation of AKT was increased in both 231BO-Scrambled and 231BO-BSP27 cells [(17.86 ± 2.27)% , (33.78 ± 1.51)% , $P < 0.01$]. rhBSP treatment decreased caspase-3 mRNA (1.000 ± 0.039 vs 0.541 ±

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(No.06104396)。Project supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.06104396)

[作者简介] 杨德猛(1985 -),男,湖北省孝感市人,硕士生,主要从事乳腺癌骨转移机制方面的研究。E-mail: yangdemeng@163.com

[通信作者] 王捷(WANG Jie, corresponding author), E-mail: jjew@tom.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110412.1824.009.html>

0.091, $P < 0.01$), and increased cyclin D1 mRNA (1.000 ± 0.000 vs 2.921 ± 0.032 , $P < 0.01$) expression in 231BO-BSP27 cells, and stimulated the proliferation of 231BO-Scrambled and 231BO-BSP27 cells ($P < 0.01$). Furthermore, rhBSP-induced activation of AKT was reversed by LY294002 in 231BO-Scrambled and 231BO-BSP27 cells ($P < 0.05$), with an increase in caspase-3 mRNA and decrease in cyclin D1 mRNA expression in 231BO-BSP27 cells (all $P < 0.01$), causing proliferation inhibition in 231BO-Scrambled and 231BO-BSP27 cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** BSP can regulate the mRNA expressions of caspase-3 and cyclin D1, and affect the proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells through the PI3K-AKT signaling pathway.

[**Key words**] bone sialoprotein; breast cancer cell; LY294002; PI3K-AKT signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(2): 165-169]

骨唾液酸蛋白(bone sialoprotein, BSP)是一种高度硫酸化、磷酸化和糖基化的矿化组织特异性非胶原蛋白,属于SIBLING(small integrin binding ligand and N-linked glycoprotein)蛋白质家族。已有研究^[1]报道,乳腺癌细胞通过FAK(focal adhesion kinase)-ERK(extracellular signal-regulated kinase)信号转导途径促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移,但BSP对胞内其他信号转导通路的影响并不清楚。本研究旨在探讨BSP基因沉默以及外源rhBSP对乳腺癌MDA-MB-231细胞PI3K-AKT信号通路及其下游caspase-3、cyclin D1 mRNA水平的影响,为揭示BSP促进肿瘤转移的机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

BSP基因沉默乳腺癌细胞株MDA-MB-231BO-BSP27、导入无关质粒pSilencer-scrambled的对照乳腺癌细胞株MDA-MB-231BO-Scrambled,分别简称为231BO-BSP27、231BO-Scrambled,由广州军区广州总医院医学实验科保存^[2]。DMEM培养基购自杭州吉诺生物医药技术有限公司,胎牛血清购自Hyclone公司。兔抗人BSP抗体购自Santa Cruz公司,兔抗人p-AKT1/2/3抗体、兔抗人AKT抗体、HRP-山羊抗鼠IgG二抗和HRP-山羊抗兔IgG二抗均购自Cell Signal Technology公司,兔抗GAPDH多克隆IgG抗体购自北京康维世纪公司。RIPA裂解液购自上海申能博彩生物科技有限公司,ECL发光液、PVDF膜购自Millipore公司,rhBSP蛋白购自R&D公司,PI3K-AKT特异性抑制剂LY294002购自Enzo Lifescience公司,TRIzol试剂购自Invitrogen公司,MTT购自Sigma公司。逆转录试剂盒购自Promega公司,SYBR Green I荧光定量PCR试剂盒购自Roche公司,引物由上海英俊公司合成。

1.2 细胞培养

乳腺癌细胞株231BO-Scrambled和231BO-

BSP27用含10%胎牛血清的DMEM培养液在37℃、5%CO₂饱和湿度细胞培养箱内培养,常规更换培养液、消化传代。将处于对数生长期的细胞用胰酶消化后,制备单细胞悬液,以 3×10^5 /孔接种于6孔培养板。培养24h后,倒掉培养上清,每孔分别加入1.5ml含rhBSP(400nmol/L)、rhBSP(400nmol/L)+LY294002(20μmol/L)的无血清培养基,均设3个复孔,并以无血清培养基作为对照。37℃、5%CO₂饱和湿度细胞培养箱内继续培养24h后,进行后续实验。

1.3 Western blotting 检测细胞中BSP、AKT的表达

乳腺癌细胞经rhBSP和LY294002处理后,用细胞裂解液提取细胞总蛋白,BCA法进行蛋白定量。取120μg等量总蛋白样品变性后进行SDS-PAGE,然后转移至PVDF膜;含5%脱脂奶粉的TBST室温摇动封闭1h;加入TBST稀释的大鼠抗人BSP单克隆抗体(1:200稀释)、兔抗人p-AKT单克隆抗体(1:1000稀释)、兔抗人AKT(1:1000稀释)或兔抗人GAPDH多克隆抗体(1:3000稀释),4℃摇床过夜;加TBST稀释的HRP标记的二抗(1:2000稀释),37℃孵育60min;加入ECL超敏发光液,X线胶片曝光成像。Quantity One软件进行分析,计算条带灰度值,以GAPDH作为内参,计算BSP、p-AKT蛋白的相对表达量。

1.4 Real-time PCR 检测细胞中caspase-3、cyclin D1 mRNA的表达

乳腺癌细胞经rhBSP和LY294002处理后,以TRIzol一步法从细胞中提取总RNA,紫外分光光度计测定总RNA的浓度及纯度。以4μg总RNA为模板按照逆转录试剂盒说明合成第一链cDNA,然后以cDNA为模板进行荧光实时定量PCR检测。引物如下:caspase-3上游引物为5'-TCAGGCCTGC-CGTGGTACAGA-3',下游引物为5'-AGCATGGCAAAGCGACTGGA-3',扩增产物为189bp;cyclin D1上游引物为5'-TGCCGTCCATGCGGAAGAT-3',

下游引物为 5'-CACAGAGGGCAACGAAGGT-3', 扩增产物为 411 bp。内参照 β -actin 引物 (QT01680476) 购自 QIAGEN 公司, 扩增产物为 104 bp。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 15 s, 59 °C 60 s 共 50 个循环。目标基因的相对表达量由 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算得到, 其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}} = (Ct_{\text{目标基因}}/Ct_{\text{实验组}} - Ct_{\text{内参基因}}/Ct_{\text{实验组}}) - (Ct_{\text{目标基因}}/Ct_{\text{对照组}} - Ct_{\text{内参基因}}/Ct_{\text{对照组}})$ 。

1.5 MTT 法检测细胞增殖

选取对数生长期细胞 (3.5×10^4 /ml), 每孔 200 μ l 接种入 96 孔细胞培养板, 置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。培养 12 h 后, 弃上清, 每孔分别加入 200 μ l 含 rhBSP (400 nmol/L) 和 rhBSP (400 nmol/L) + LY294002 (20 μ mol/L) 的无血清培养基, 均设 3 个复孔, 并以加无血清培养基作为对照 (200 μ l)。37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养 24 h 后, 每孔加 5 mg/ml MTT 20 μ l, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱继续孵育 4 h, 吸除原有培养液, 每孔加 DMSO 150 μ l, 振荡溶解紫色甲臞, 选择检测波长 570 nm, 在酶标仪上测定光密度值 (*D*)。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *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 231BO-BSP27 细胞中 BSP 蛋白表达下调

Western blotting 检测结果显示, 与 231BO-Scrambled 细胞相比, 231BO-BSP27 细胞中 BSP 蛋白水平明显降低, 其抑制率达到 (74.32 ± 2.18)% (图 1, $P < 0.01$)。



图 1 231BO-BSP27 细胞中 BSP 蛋白表达下调
Fig. 1 Decreased expression of BSP protein in 231BO-BSP27 cells

1: 231BO-Scrambled cells; 2: 231BO-BSP27 cells

2.2 BSP 对 MDA-MB-231 细胞 AKT 磷酸化的调控

与 231BO-Scrambled 细胞相比, 231BO-BSP27 中 p-AKT 相对表达水平减少 (33.30 ± 2.61)%

($P < 0.01$)。rhBSP 作用后, 231BO-Scrambled 和 231BO-BSP27 细胞中 p-AKT 相对表达水平分别提高 (17.86 ± 2.27)% 和 (33.78 ± 1.51)% ($P < 0.01$); LY294002 则能明显抑制 rhBSP 对 AKT 的激活作用, p-AKT 相对表达水平分别下降 (31.49 ± 3.81)% 和 (26.98 ± 1.05)% ($P < 0.01$) (图 2)。由此可见, BSP 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 AKT 的活性具有明显的调控作用, 而这种作用是以 PI3K 激酶依赖方式发挥的。

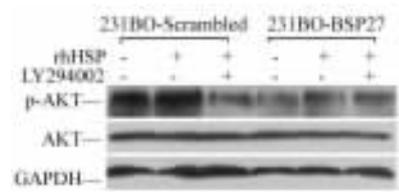


图 2 BSP 基因沉默和 rhBSP 对 MDA-MB-231 细胞 p-AKT 和 AKT 表达的影响

Fig. 2 Effects of BSP gene silencing and rhBSP on p-AKT and AKT protein expressions in MDA-MB-231 cells

2.3 BSP 对 MDA-MB-231 细胞中 caspase-3 和 cyclin D1 mRNA 水平的影响

与对照组 231BO-Scrambled 细胞相比, 231BO-BSP27 细胞中 caspase-3 mRNA 相对表达水平明显升高 ($P < 0.01$), cyclin D1 mRNA 相对表达水平明显降低 ($P < 0.01$) (表 1)。而 rhBSP 作用后, 使 231BO-BSP27 细胞 caspase-3 mRNA 相对表达水平明显下降 ($P < 0.01$), cyclin D1 mRNA 相对表达水平明显升高 ($P < 0.01$); LY294002 可部分阻断 rhBSP 对 caspase-3 和 cyclin D1 mRNA 表达水平的影响 (表 2)。可见 BSP 通过 PI3K-AKT 信号通路调控 caspase-3 和 cyclin D1 mRNA 的表达。

表 1 BSP 基因沉默对 MDA-MB-231 细胞 caspase-3、cyclin D1 mRNA 表达的影响

Tab. 1 Effect of BSP gene silencing on caspase-3 and cyclin D1 mRNA expressions in MDA-MB-231 cells

Group	mRNA relative quantity	
	Caspase-3	Cyclin D1
231BO-Scrambled	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
231BO-BSP27	1.733 ± 0.039**	0.370 ± 0.012**

** $P < 0.01$ vs 231BO-Scrambled cells

表 2 rhBSP 和 LY294002 对 231BO-BSP27 细胞中 caspase-3、cyclin D1 mRNA 表达的影响
Tab.2 Caspase-3 and cyclin D1 mRNA expressions in 231BO-BSP27 cells treated with rhBSP and LY294002

Group	mRNA relative quantity	
	Caspase-3	Cyclin D1
231BO-BSP27	1.000 ± 0.039	1.000 ± 0.000
231BO-BSP27 + rhBSP	0.541 ± 0.091 **	2.921 ± 0.032 **
231BO-BSP27 + rhBSP + LY294002	0.971 ± 0.023 $\Delta\Delta$	0.722 ± 0.018 $\Delta\Delta$

** $P < 0.01$ vs 231BO-BSP27 cells; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 231BO-BSP27 + rhBSP cells

2.4 BSP 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

MTT 检测 231BO-Scrambled 和 231BO-BSP27 细胞在 rhBSP 和 LY294002 作用后的增殖能力, 结果(图 3)显示, 与 231BO-Scrambled 相比, 231BO-BSP27 细胞增殖能力降低 ($P < 0.05$); 而两株细胞经 rhBSP 作用 24 h 后, 增殖能力均分别有明显提高 ($P < 0.01$), LY294002 能部分抑制 rhBSP 促细胞增殖作用, 使两种细胞的增殖能力均有明显下降 ($P < 0.01$)。由此提示, BSP 可通过 PI3K-AKT 通路促进细胞增殖。

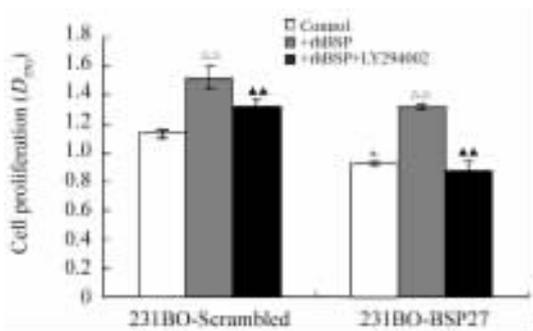


图 3 MTT 检测 BSP 对 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响

Fig.3 Effect of BSP on proliferation of MDA-MB-231 cells as detected by MTT assay

* $P < 0.05$ vs 231BO-Scrambled cells; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs control; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs + rhBSP + LY294002 group

3 讨论

乳腺癌是易发生骨转移的恶性肿瘤之一。BSP 是一种在骨基质中限制性表达的分泌性糖蛋白, 自 1994 年 Bellahcene^[3]首次阐述了 BSP 在易发生骨转移的人乳腺癌中表达以来, 多项研究证实 BSP 在

肿瘤的黏附、增殖、侵袭^[4]、骨代谢^[5]、免疫反应(炎症和补体逃逸)^[6]、血管生成^[7]等多个病理过程中发挥重要作用, 但其具体作用机制还十分不明确。既往研究已证实, BSP 是由 317 个氨基酸组成的分泌蛋白, 包含一个 16 个氨基酸的疏水信号序列, 引导蛋白进入内质网并分泌到胞外发挥生物学作用^[8], 其含有 3 个功能性结构域: N 末端、中间结构域及 C 末端。C 末端含有一段可被整合素(主要是 $\alpha v \beta 3$ ^[9])受体识别的精-甘-天(门)冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列^[10], 该 RGD 多肽不但可介导细胞外基质与细胞间的黏附^[11], 还可通过该序列与整合素结合促进人乳腺癌细胞增殖和转移^[12]。

整合素是一类由 α 和 β 亚基以非共价键结合而形成的跨膜异二聚体糖蛋白, 作为一类重要的细胞表面受体在多种肿瘤细胞(例如乳腺癌细胞^[13])表达, 介导细胞与胞外基质或细胞间的黏附, 另外还可作为介导信号传递的膜分子激活多种信号转导分子如 FAK^[14]、整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)^[15]、PI3K^[16]等, 参与细胞多种生理功能和病理变化。

PI3K-AKT 信号通路作为整合素下游一个重要信号转导途径, 在人乳腺癌发生和发展中发挥重要作用。AKT 作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶是 PI3K 调控的主要靶蛋白之一。一方面 AKT 通过 PH 结构域与活化的 PI3K 激活产物相结合, 自身发生磷酸化而被激活; 另一方面活化后的 AKT 进一步引起下游因子如 caspase-3 表达下降。Caspase-3 是细胞凋亡的最终执行者, 在正常情况下, 以无活性的酶原形式存在胞质中, 当被诱导表达后其酶促活性增强, 则意味着细胞步入凋亡^[17]。CyclinD1 为细胞从 G₁ 进入 S 期的关键激酶复合物, 通过磷酸化其底物蛋白使 DNA 合成得以进行, 当 cyclin D1 过度表达时能缩短 G₁ 期, 促进细胞提前进入 S 期, 增强细胞增殖能力^[18]; 同时激活核转录因子(nuclear factor kappa B, NF- κ B)^[19]等参与调节乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭等。AKT 的磷酸化水平可以作为衡量 PI3K 活性的指标反映 PI3K 信号通路的活性, 而该通路中 PI3K 的抑制剂 LY294002 可以阻断 AKT 的激活^[20]。

Gordon 等^[1]报道了肿瘤细胞中 BSP 能激活胞内 FAK-ERK 信号转导途径, 促进肿瘤细胞增殖与转移, 因此 BSP 不仅可以介导细胞与细胞外基质间的黏附作用, 还可能通过整合素激活胞内多种信号转导途径, 促进肿瘤发展。本实验室利用 RNAi 技术建立 BSP 稳定沉默的细胞株, 实验证实 BSP 基因

的沉默对乳腺癌细胞的生长,克隆形成能力均有明显抑制作用。流式细胞仪检测发现,实验组细胞均停滞在 G₀/G₁ 期,S 期的水平明显下降^[21],而且实验组细胞培养上清中 BSP 蛋白水平有明显降低(数据未显示)。本研究通过检测 BSP 基因沉默乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 PI3K-AKT 信号通路中的 AKT 位点,发现 BSP 基因沉默下调 AKT 磷酸化水平,上调促凋亡蛋白 caspase-3 mRNA,并抑制细胞周期蛋白 cyclin D1 mRNA 表达,抑制细胞生长。另外通过外源添加 rhBSP 方式,提高细胞培养上清中 BSP 蛋白水平,可激活乳腺癌细胞内 AKT 磷酸化水平,抑制 caspase-3 mRNA 表达,同时上调 cyclin D1 mRNA 水平,促进细胞生长,回复由于 BSP 沉默下调 MDA-MB-231 细胞的生物学特性。而 PI3K/AKT 信号通路特异性阻断剂 LY294002 能部分抑制 rhBSP 对 PI3K-AKT 信号通路及其下游 caspase-3 和 cyclin D1 的调控作用。

本研究结果提示,BSP 通过调控胞内 PI3K-AKT 信号转导通路及其下游因子影响乳腺癌细胞增殖,但该信号转导途径中所涉及的其他调控分子还需进一步明确。BSP 对 PI3K-AKT 信号通路的作用是否完全依赖于整合素受体,特别是 $\alpha v\beta 3$ ($\alpha v\beta 3$ 是 BSP 最适配基)的作用?而作为调控 PI3K-AKT 通路的转导分子 FAK、ILK 是否也参与 BSP 对 PI3K-AKT 的激活?这些都需要进一步证实。深入研究 BSP 与乳腺癌关系,对揭示乳腺癌转移演进的分子机制,以及探索以 BSP 为药物治疗靶点的肿瘤预防和治疗具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] Gordon J, Sodek J, Hunter GK, et al. Bone sialoprotein stimulates focal adhesion-related signaling pathways: Role in migration and survival of breast and prostate cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(6): 1118-1128.
- [2] 杨自飞,王捷,张宏斌,等. 逆转录病毒载体介导的 RNAi 抑制乳腺癌细胞 BSP 基因表达 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2009, 6(5): 415-419.
- [3] Bellahcene A, Merville MP, Castronovo V. Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein, in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(11): 2823-2326.
- [4] Karadag A, Ogbureke KU, Fedarko NS, et al. Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and alpha(v)beta3 integrin in osteotropic cancer cell invasion [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(12): 956-965.
- [5] Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, et al. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization *in vitro* [J]. *Bone*, 2007, 41(3): 462-473.
- [6] Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, et al. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(22): 16666-16672.
- [7] Bellahcene A, Bonjean K, Fohr B, et al. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis [J]. *Circ Res*, 2000, 86(8): 885-891.
- [8] Fisher WL, McBride OW, Termine JD, et al. Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(4): 2347-2351.
- [9] Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. Identification of a bone sialoprotein receptor in osteosarcoma cell [J]. *J Bio Chem*, 1988, 263(36): 19433-19436.
- [10] Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein(osteopontin)cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(23): 8819-8823.
- [11] Byzova TV, Kim W, Midura RJ, et al. Activation of integrin alpha(v)beta3 regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 254(2): 299-308.
- [12] Sung V, Stubbs JT 3rd, Fisher L, et al. Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the alpha(v)beta3 and alpha(v)integrins [J]. *J Cell Physiol*, 1998, 176(3): 482-494.
- [13] Meyer T, Marshall JF, Hart IR. Expression of alpha(v) integrins and vitronectin receptor identity in breast cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(4): 530-536.
- [14] Sawhney RS, Liu W, Brattain MG. A novel role of ERK5 in integrin-mediated cell adhesion and motility in cancer cells via Fak signaling [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219(1): 152-161.
- [15] Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S. Integrin-linked kinase: A cancer therapeutic target unique among its ILK [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(1): 51-63.
- [16] Taddei I, Faraldo MM, Teuliere J, et al. Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2003, 8(4): 383-394.
- [17] Jin CY, Kim GY, Choi YH. Induction of apoptosis by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(12): 1997-2003.
- [18] Khau T, Langenbach SY, Schuliga M, et al. Annexin-1 signals mitogen-stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2 [J]. *FASEB J*, 2011, 25(2): 483-496.
- [19] Yoon SO, Shin S, Lee HJ, et al. Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent matrix metalloproteinase-9 expression [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(11): 2666-2675.
- [20] Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, et al. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one(LY294002) [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(7): 5241-5248.
- [21] 燕慧,王捷,杨自飞,等. BSP 基因 RNA 干扰对乳腺癌 MDA-MB-231BO 细胞生物学特性的影响 [J]. *生物技术通报*, 2010, 17(6): 142-145.

[收稿日期] 2010-12-22

[修回日期] 2011-03-01

[本文编辑] 王莹