

# 蛋白质酪氨酸磷酸化在抗失巢凋亡的癌细胞中的失调变化\*

张利能<sup>1,2)</sup> 查锡良<sup>1)\*\*</sup> 俞强<sup>2,3)\*\*</sup>

<sup>(1)</sup>卫生部糖复合物重点实验室, 复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 上海 200032;

<sup>(2)</sup>The Pulmonary Center and Department of Biochemistry, Boston University Medical Center, Boston MA 02118, USA;

<sup>(3)</sup>中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

**摘要** 失巢凋亡是细胞与细胞外基质脱离发生的一种特定的凋亡方式. 癌细胞抗失巢凋亡或失巢生存能力可以使之在转移过程中生存. 业已发现癌细胞失巢生存与 PI3K-PKB/Akt、MAPK 这两条重要信号途径有关, 但是 PI3K-PKB/Akt、MAPK 通路的上游酪氨酸激酶途径还不甚清楚. 为此设计了一种基于 SH<sub>2</sub>-pTyr 特异性结合特性的功能性筛选方法, 以期发现癌细胞失巢生存相关的酪氨酸磷酸化蛋白质, 为最终明确酪氨酸激酶途径提供有力的实验依据. 实验发现, MDCK 细胞悬浮培养后失巢凋亡, 但癌细胞可以失巢生存. 与这一现象相一致的是, 悬浮培养后, MDCK 细胞中一系列 SH<sub>2</sub> 结合的酪氨酸磷酸化蛋白质水平急剧下降, 而癌细胞中蛋白质酪氨酸磷酸化水平并不呈锚着依赖性. 细胞悬浮培养后, 随着培养时间的延长, MDCK 细胞中 Abl SH<sub>2</sub> 结合的靶蛋白酪氨酸磷酸化水平逐渐降低, 在 H460 肺癌细胞中经过短暂下降后升高, H1792 肺癌细胞随着培养时间的延长, Abl SH<sub>2</sub> 结合的靶蛋白酪氨酸磷酸化水平逐渐增加. Fyn SH<sub>2</sub> 和 Crk SH<sub>2</sub> 结合的蛋白质分别为 FAK 和 p130Cas, 后者是重要的失巢生存信号. 这些结果提示, 酪氨酸磷酸化蛋白质可能赋予肺癌细胞失巢生存能力. 结果也表明, 功能性 SH<sub>2</sub> 筛查方法可以有效地发现肿瘤细胞中失巢生存相关的酪氨酸磷酸化蛋白质.

**关键词** 失巢凋亡, Src 同源结构域 2, 酪氨酸磷酸化, 癌细胞

**学科分类号** Q28, Q78

细胞失巢凋亡(anoikis)是一种特定的凋亡方式, 也有学者谓之脱落凋亡<sup>[1-3]</sup>. 正常上皮细胞的生存依赖于细胞外基质, 当细胞离开细胞外基质后, 由于缺乏来源于细胞外基质的生存信号(outside-in), 细胞随之发生失巢凋亡. 研究发现, 细胞外基质与细胞膜上受体结合所引发的信号途径对细胞的生存起着重要作用<sup>[1-3]</sup>. 其中, 研究得较为清楚的是整合蛋白介导的生存信号通路. 当整合蛋白与相应配体结合后, 胞内如 FAK, src, cdc42 等信号途径活化, 随之 PI3K-Akt/PKB 或 MAPK 通路激活<sup>[2,4,5]</sup>. 目前已知 PI3K-Akt/PKB、MAPK 信号途径的活化是维系细胞生存的关键因素.

正常细胞导入某些癌基因后, 癌基因表达产物通过激活包括 PI3K-Akt/PKB、MAPK 在内的信号级联反应, 补偿了由于失巢引起的源于细胞外基质的生存信号, 使转化细胞获得了失巢凋亡抵抗(失巢生存)的能力<sup>[1,6-9]</sup>. 与转化细胞的这一特性相似, 癌细胞也往往具有失巢生存的能力. 这种离巢并生存于其他组织的能力是癌细胞侵袭和转移的必要条件之一.

当前的研究表明, 癌细胞得以失巢生存可能与至少三种因素引起的生存信号途径的激活有关. 首先, 癌细胞由于遗传背景改变导致某些癌基因激活, 癌基因编码产物以其组成型活性持续刺激生存信号通路<sup>[10]</sup>. 其次, 癌细胞即使与细胞外基质分离, 但仍形成细胞团块, 癌细胞依赖细胞间的粘附而得以生存<sup>[11]</sup>. 再者, 当上述两种生存信号还不足以维持细胞生存, 则细胞可以在细胞因子的作用下得以失巢生存<sup>[12,13]</sup>.

失巢生存相关的信号通路的研究显示, PI3K-Akt/PKB 或 MAPK 通路受上游多种受体型或非受体型酪氨酸激酶激活<sup>[7,14,15]</sup>. 随着研究的深入, 还将发现更多的上游酪氨酸激酶参与失巢生存. 我们以前的实验还发现, 在 PI3K-Akt/PKB 和 MAPK

\*国家自然科学基金资助项目(CB518903).

\*\* 通讯联系人.

查锡良. Tel: 021-54237696, E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

俞强. Tel: 021-50801790, E-mail: qyu@sibs.ac.cn

收稿日期: 2005-05-08, 接受日期: 2005-06-30

生存信号途径外可能还存在一条独立的酪氨酸激酶通路介导肺癌细胞失巢生存<sup>[6]</sup>。这些结果说明, 相关的酪氨酸激酶途径的研究有助于我们更全面地了解癌细胞失巢生存的机制。

本研究以 GST-SH<sub>2</sub> 融合蛋白通过亲和沉淀分离失巢生存的肺癌细胞中酪氨酸磷酸化的信号蛋白, 试图为肺癌细胞失巢生存有关的酪氨酸激酶信号途径及其中可能的新信号分子的研究提供实验依据。基于失巢生存相关的信号途径的研究, 有助于揭示癌细胞侵袭和转移行为的分子机制, 并可能为肿瘤治疗药物的筛选提供新的靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞和细菌.** MDCK、H446、H460、H1792、A549、H522、U20S、SK-LU-1、H23 细胞株均购自 ATCC。DH5 $\alpha$ 、BL-21 感受态细菌均为 Stratagene 公司产品。

**1.1.2 试剂.** RT-PCR 试剂盒为 Promega 公司产品; 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; PolyHEMA 为 Aldrich 公司产品; 胰酶抑制剂(soybean), IPTG 购自 Sigma 公司; 4G10 抗体购自 Upstate Biotechnology 公司; anti-p130Cas, Crk 抗体为 Transduction Laboratories 公司产品; Anti-FGF1, FGF4, Cbl 抗体为 Santa Cruz 公司产品; ECL 显色试剂盒为 Amersham Pharmacia 公司产品。

**1.1.3 质粒.** Abl, Crk, Fyn, Gap, Lck, Plc, PI3K-C, PI3K-N 等 SH<sub>2</sub> 与 GST 的融合表达质粒由哈佛大学医学院 S Y Zhou 提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 软琼脂克隆形成实验.** 生理盐水配制的 6% 琼脂溶液置沸水浴中使琼脂完全溶化, 待冷至 50℃, 加入 37℃ 预温的新鲜培养液, 混匀后, 立即加至 24 孔培养板中, 每孔 0.5 ml, 置室温使琼脂凝固。2 ml 37℃ 预温的细胞悬液中加入 50℃ 的 6% 琼脂溶液 100  $\mu$ l, 混匀后, 立即加至铺有底层琼脂的 24 孔培养板中, 每孔加 0.5 ml, 置室温使琼脂凝固后, 以培养液覆盖。每 2 天更换培养液。培养 14 天后拍照<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 细胞悬浮培养.** polyHEMA 溶于无水乙醇 (10 g/L)。每个 60 mm 直径的 petri 培养皿加 2 ml polyHEMA 溶液, 待乙醇挥发后, 再加 2 遍 polyHEMA 溶液。临用前, petri 培养皿以 PBS 洗 3 遍。以胰酶-EDTA 溶液消化贴壁的肺癌细胞, 加入

soybean 溶液, 轻轻吹打混匀, 1 500 r/min 离心 3 min。弃上清, 细胞沉淀以含有或不含有 10% FBS 的 DMEM 培养液重悬。每个 polyHEMA 处理过的 petri 培养皿加入 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养一定时间<sup>[1,16]</sup>。

**1.2.3 细胞质梯度 DNA 测定.** 收集悬浮细胞, 胰酶-EDTA 消化细胞后计数, 各取 10<sup>6</sup> 个细胞, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。细胞沉淀加入 0.6 ml 裂解缓冲液 (0.5% Triton X-100, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl), 吹打混匀, 冰浴 1 h。14 000 r/min 离心 5 min。上清以等体积 Tris-HCl (pH 8.0) 饱和酚、酚+氯仿 (1:1)、氯仿去蛋白, 上清加 3 mol/L 醋酸钠至 0.3 mol/L, 两倍体积无水乙醇, 混匀, -20℃ 放置过夜。14 000 r/min 离心 10 min, DNA 溶于 30  $\mu$ l TE 溶液, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (60 V)。紫外灯下观察 DNA ladder<sup>[1,16]</sup>。

**1.2.4 GST-SH<sub>2</sub> 融合蛋白诱导表达和 GST-SH<sub>2</sub> 结合珠子的制备及鉴定.**

挑取细菌克隆于 2 ml LB 抗性培养液中, 37℃ 280 r/min 振摇过夜。次日将菌液接种到 18 ml LB 培养液中, 37℃ 280 r/min 振摇, 待细菌生长至 A<sub>590</sub>=0.6, 全部接种到 180 ml LB 培养液中。37℃ 280 r/min 振摇培养 2 h, 加入 IPTG 至 0.3 mmol/L 浓度, 30℃ 诱导表达 5 h。菌液离心, 细菌菌体以 10 ml PBS 重悬, 4℃ 超声破碎细菌。4℃ 12 000 r/min 离心 30 min。取细菌裂解上清, 加入适量经过 PBS 平衡的 GSH 珠子, 4℃ 摇 2 h。离心, 弃上清。珠子以 PBS 洗 3 遍, 加入 10 ml PBS, 4℃ 保存备用。

鉴定: 取 0.1 ml 珠子悬液, 离心弃上清, 珠子以 30  $\mu$ l 2 $\times$ SDS 样品缓冲液变性, 加样于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 电泳后用考马斯亮蓝染色。

**1.2.5 GST pull-down<sup>[8]</sup>.** 收集细胞, 加入裂解液, 于 rotator 上 4℃ 30 r/min 裂解 30 min。裂解液为 Lysis buffer (100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 20 mmol/L NaF, 10 mmol/L Benzamidine, 10 mg/L aprotinin, 10 mg/L leupeptin, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Sodium Vanadate)。测定裂解液中蛋白质浓度, 取 700  $\mu$ g 总蛋白质, 加裂解液至 800  $\mu$ l, 加入 100  $\mu$ l 的 GSH 珠子预处理, 置于 rotator 上 4℃ 30 r/min 反应 30 min。离心后取上清, 加入 100  $\mu$ l 的 GST-SH<sub>2</sub> 珠子, 置于 rotator 上 4℃ 30 r/min 反应 1 h。珠子加 30  $\mu$ l 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min。或立即上

样，或贮存于-80℃冰箱备用<sup>[18]</sup>.

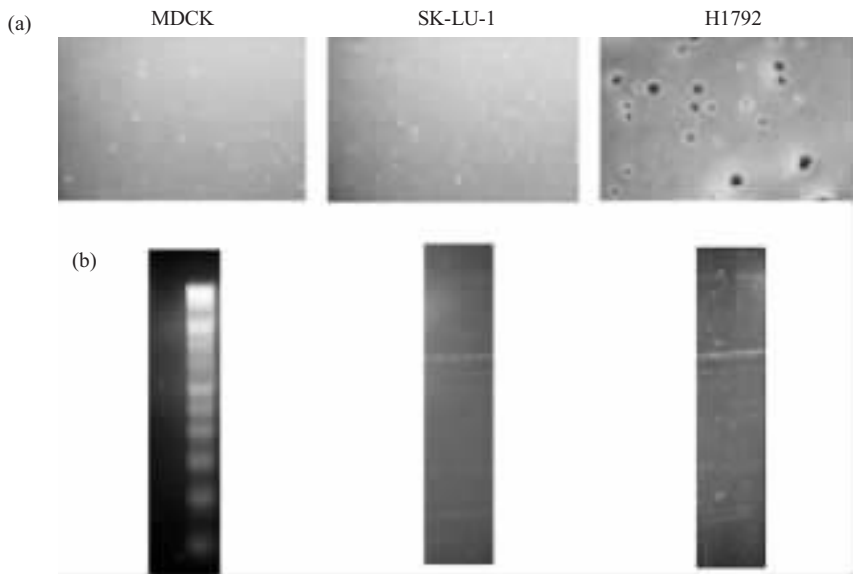
**1.2.6 蛋白质印迹.** SDS- 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 7.5%. 样品电泳结束后，取下凝胶，将凝胶中的蛋白质通过电转移印迹到硝酸纤维素膜上(100 V 转移 1 h). 硝酸纤维素膜用 5%脱脂奶粉 TBST 液室温封闭 1 h，加入 5%脱脂奶粉 TBST 稀释的相应的抗体溶液，4℃反应过夜，用 TBST 洗膜 10 min/ 次，共 3 次. 用 HRP 标记的二抗稀释液室温反应 1 h，TBST 洗膜 10 min/ 次，共 3 次. 等比例混合 ECL 试剂 A 液和 B 液，与膜反应 1 min，用胶片曝光.

2 结 果

2.1 肺癌细胞可以失巢生存和失巢增殖

将对数生长期的细胞传至 polyHEMA 处理的

petri 培养皿，以含 10% FBS 的 DMEM 培养液悬浮培养 3 天. 每天观察细胞状态并计数细胞. 培养 24 h 后，收集细胞进行细胞质梯度 DNA 分析. 我们选择正常狗肾细胞经原代培养后自发形成的可传代 MDCK 细胞株作为对照细胞<sup>[1, 16]</sup>. MDCK 永生化细胞悬浮培养后，虽然也形成了细胞团块，但还是发生凋亡，随着培养时间的延长，生存细胞数也随之急剧下降. 一组肺癌细胞在悬浮培养状态下，形成了或大或小的细胞团块，由梯度 DNA 分析表明，这一组肺癌细胞未发生失巢凋亡(图 1). 与悬浮培养结果相同，MDCK 细胞不能在软琼脂上形成克隆，H1792 肺癌细胞则能形成克隆，说明某些肺癌细胞具有失巢生存的能力(图 1).

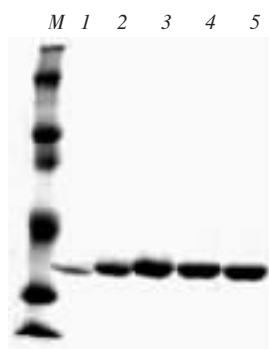


**Fig. 1 Lung tumor cells survived and proliferated upon detachment**  
Soft agar growth assay (a): cells seeded into soft-agar and photographed at ×50 magnification 2 weeks later.  
DNA ladder assay (b): cells were cultured in polyHEMA-coated dishes and collected 3 days later for DNA ladder analysis.

2.2 肺癌细胞中蛋白质酪氨酸磷酸化水平的研究

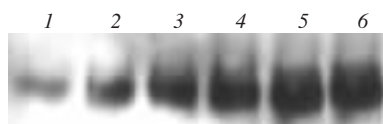
研究发现，PI3K-Akt/PKB 或 MAPK 通路受上游多种受体型或非受体型酪氨酸激酶激活. 我们以前的实验还发现，在 PI3K-Akt/PKB 和 MAPK 生存信号途径外可能还存在一条独立的酪氨酸激酶通路介导肺癌细胞失巢生存. 为了发现与肺癌细胞失巢生存相关的酪氨酸激酶途径，我们应用 GST pull-down 方法，采用一系列 Src homologue 2 (SH<sub>2</sub>) 结构域来钓取酪氨酸磷酸化蛋白质. 首先，我们对 GSH 偶联珠子结合的 GST- SH<sub>2</sub> 融合蛋白量进行标

化，以确保每 100 μl 珠子悬液结合的 GST- SH<sub>2</sub> 融合蛋白量的一致性(图 2). 其次，因为 GST- SH<sub>2</sub> 融合蛋白可与蛋白质信号分子中 p-Tyr 残基结合，两者结合的特异性将直接影响结果的可靠性. 故而，我们分别取 20 μl，50 μl，100 μl，200 μl，300 μl GST- SH<sub>2</sub> 结合珠子悬液，与 700 μg 肿瘤细胞裂解液蛋白亲和作用 1 h，以验证 GST- SH<sub>2</sub> 珠子与酪氨酸磷酸化蛋白结合的特异性. 蛋白质印迹用 4G10 抗体检测 SH<sub>2</sub> 结合的酪氨酸磷酸化的蛋白质分子. 以 Abl SH<sub>2</sub> 珠子为例，如图 3 显示，GST-Abl



**Fig. 2 Standardization of glutathione beads-binding GST-SH<sub>2</sub> fusion proteins**

Purified GST-SH<sub>2</sub> proteins in aliquots (100  $\mu$ l) were lysed from glutathione-agarose beads and resolved by SDS-PAGE, followed by Coomassie blue staining. 1: Abl; 2: Crk; 3: Gap; 4: LCK; 5: PLC.

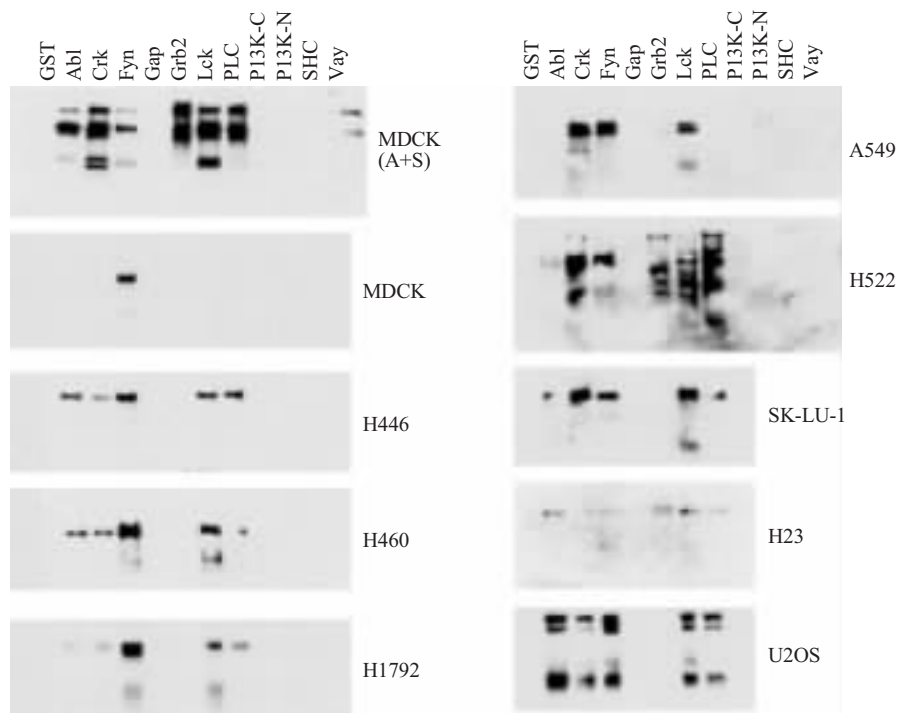


**Fig. 3 Specific interaction between GST-SH<sub>2</sub> fusion protein and phosphotyrosine containing protein**

After pretreated with GSH coupled beads, each 700  $\mu$ g total protein of tumor cells reacted with 20  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 300  $\mu$ l of GST-SH<sub>2</sub> beads for 1 h, the SH<sub>2</sub>-associated proteins were resolved by SDS-PAGE, followed by 4G10 antibody immunoblotting. This is a representative of GST-Abl-SH<sub>2</sub> specific binding protein. 1: 20  $\mu$ l; 2: 50  $\mu$ l; 3: 100  $\mu$ l; 4: 200  $\mu$ l; 5: 300  $\mu$ l; 6: 400  $\mu$ l.

SH<sub>2</sub> 珠子特异结合靶蛋白, 未发现随着珠子悬液增加而可能出现的非特异结合条带, 特异结合条带的灰度随着珠子悬液量的增加而升高. 因此似乎可以认为, GST-SH<sub>2</sub> 珠子与酪氨酸磷酸化蛋白的结合是特异性的.

在常规培养状态(以下简称 A+S)和 polyHEMA 培养皿中无血清悬浮(P-S)培养状态下, 比较 MDCK 细胞和肺癌细胞中与一系列 SH<sub>2</sub> 结构域结合的蛋白质酪氨酸磷酸化水平. 细胞培养 3 h 后, 收获并裂解细胞. 细胞裂解液与 GST-SH<sub>2</sub> 融合蛋白珠子反应后, GST-SH<sub>2</sub> 结合的蛋白质经上样缓冲液变性后, 以 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶分离, 以抗 pTyr 抗体(4G10)检测蛋白质酪氨酸磷酸化水平. 结果显示, Abl、Crk 等 7 种 GST-SH<sub>2</sub> 融合蛋白能够结合相应的蛋白质信号分子. MDCK 细胞经 P-S 条件培养 3 h, 细胞中 SH<sub>2</sub>s 结合的酪氨酸磷酸化蛋白质下降. 与 MDCK 细胞不同, 肺癌细胞在 P-S 条件下培养 3 h, 仍有酪氨酸磷酸化蛋白质被 SH<sub>2</sub> 结构域所识别. 不同肺癌细胞中酪氨酸磷酸化蛋白质不同(图 4). 在 SK-LU-1、H446 肺癌细胞中, 与 Abl、Crk、Fyn SH<sub>2</sub> 结合的蛋白质只有 130 ku 一种, 而 U2OS 细胞和 H522 肺癌细胞中还有 60 ku、



**Fig. 4 The tyrosine phosphorylation levels of GST-SH<sub>2</sub>-binding proteins in detached lung tumor cells**

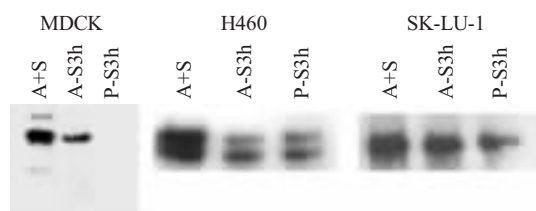
MDCK cells were cultured for 3 h in regular dishes or in polyHEMA-coated dishes without serum. Lung tumor cells and U2OS cells were cultured for 3 h in polyHEMA-coated dishes without serum. The cells were then harvested and lysed in lysis buffer. After pretreated with GSH coupled beads, 700  $\mu$ g total protein reacted with GST-SH<sub>2</sub> beads. The precipitated target proteins were resolved by SDS-PAGE, followed by immunoblotting using anti-phosphotyrosine antibody 4G10.

180 ku 左右的酪氨酸磷酸化蛋白质. 以上结果提示, 这几株肺癌细胞在悬浮培养状态, 仍可能依赖于相应的酪氨酸磷酸化蛋白质而得以生存, 而且可能有多种酪氨酸磷酸化蛋白质与肺癌细胞失巢生存相关.

### 2.3 不同的悬浮培养条件对肺癌细胞中 Abl SH<sub>2</sub> 结合的蛋白质酪氨酸磷酸化水平的影响

此部分实验选择 MDCK 细胞和 H460、H1792、SK-LU-1 肺癌细胞作为细胞模型, 是基于以下考虑: a. 预实验已证实 H460、H1792 肺癌细胞对酪氨酸蛋白激酶抑制剂 genistein 敏感, 这一特性有利于研究肺癌细胞失巢生存相关的酪氨酸激酶信号途径. b. SK-LU-1 细胞中与 Abl SH<sub>2</sub> 结合的靶蛋白酪氨酸磷酸化信号条带只有一条, 有利于分离纯化及氨基酸序列分析.

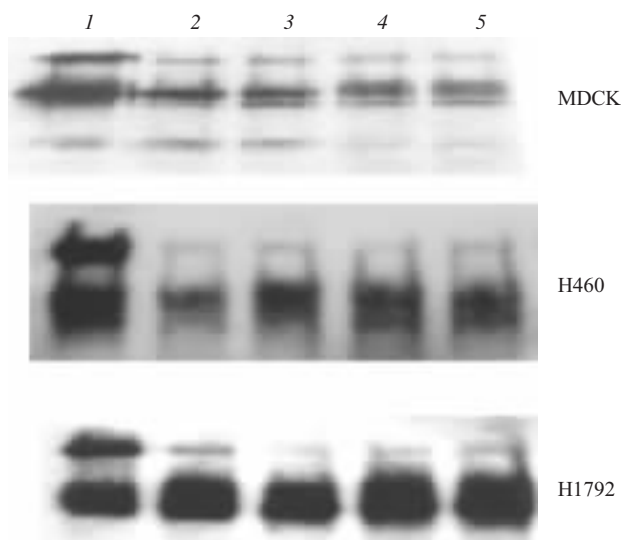
MDCK 细胞和 H460、SK-LU-1 肺癌细胞分别在常规 (A+S)、贴壁无血清 (A-S)、悬浮无血清 (P-S) 培养条件下培养 3 h. 如图 5 所示, MDCK 细胞中 Abl SH<sub>2</sub> 结合的靶蛋白酪氨酸磷酸化水平由高到低的顺序为 A+S > A-S > P-S. MDCK 细胞在 P-S 条件下培养 3 h, Abl SH<sub>2</sub> 结合的酪氨酸磷酸化靶蛋白消失. 这说明 MDCK 细胞的生存依赖于贴壁和血清中生长因子的刺激. H460 和 SK-LU-1 肺癌细胞在 A-S 和 P-S 培养条件下, Abl SH<sub>2</sub> 结合的靶蛋白酪氨酸磷酸化水平相同, 但低于 A+S 条件, 结果提示 H460 和 SK-LU-1 肺癌细胞的生长为非贴壁依赖性, 但生长因子对其生存具有促进作用.



**Fig. 5 Western blotting analysis of the tyrosine phosphorylation levels of Abl SH<sub>2</sub>-binding proteins in lung tumor cells upon cell detachment**

Cells were cultured for 3 h in regular dishes with or without serum, or in polyHEMA-coated dishes without serum. The cells were then harvested and lysed in lysis buffer. After pretreated with GSH coupled beads, 700  $\mu$ g total protein reacted with GST-Abl-SH<sub>2</sub> beads. The affinity precipitated target proteins were resolved by SDS-PAGE, followed by immunoblotting using anti-phosphotyrosine antibody 4G10.

为了观察肺癌细胞悬浮培养更长时间后酪氨酸磷酸化水平的变化, MDCK 细胞和 H460、H1792 肺癌细胞分别经 A+S 和 P+S 条件培养 1 h, 3 h, 5 h, 7 h. 如图 6 显示, 随着培养时间的延长, MDCK 细胞中 Abl SH<sub>2</sub> 结合的靶蛋白酪氨酸磷酸化水平逐渐降低, 在 H460 肺癌细胞中经过短暂下降后升高, 而 H1792 肺癌细胞随着培养时间的延长, Abl SH<sub>2</sub> 结合的靶蛋白酪氨酸磷酸化水平逐渐增加.



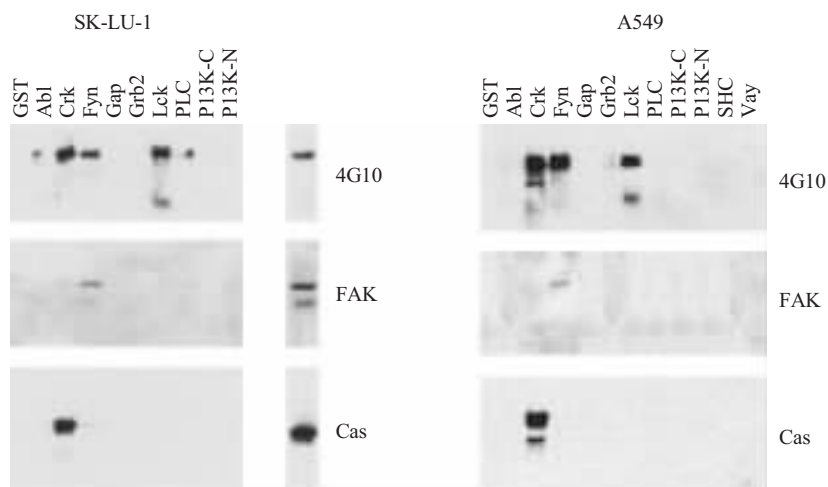
**Fig. 6 Changes in the tyrosine phosphorylation levels of GST-Abl SH<sub>2</sub>-binding proteins in MDCK epithelial cell and H460, H1792 lung tumor cells upon detachment**

Cells were cultured in polyHEMA-coated dishes with serum for 1, 3, 5, 7 h as indicated. Control cells were cultured in regular dishes. The cells were then harvested and lysed in lysis buffer. After pretreated with GSH coupled beads, 700  $\mu$ g total protein reacted with GST-Abl-SH<sub>2</sub> beads. The affinity precipitated target proteins were resolved by SDS-PAGE, followed by immunoblotting using anti-phosphotyrosine antibody 4G10.

1: A+S; 2: P+S 1h; 3: P+S 3h; 4: P+S 5h; 5: P+S 7h.

### 2.4 GST-SH<sub>2</sub> 融合蛋白结合的酪氨酸磷酸化靶蛋白的鉴定

将抗体反应过的膜洗去抗体, 再以相近分子质量蛋白质的抗体来检测酪氨酸磷酸化条带为何种蛋白质. 由图 7 可见, 肺癌细胞中与 Crk SH<sub>2</sub> 结合的 130 ku 条带被 p130Cas 抗体识别, 与 Fyn SH<sub>2</sub> 结合的 130 ku 蛋白为 FAK 分子. 实验表明, U20S 细胞和 H522 肺癌细胞中 180 ku 酪氨酸磷酸化条带不为 EGF 抗体识别. 其他酪氨酸磷酸化条带如分子质量为 120 ku 的条带不为 p125FAK、p130Cas、Cbl、FGFR1、FDFR4 等抗体所识别.



**Fig. 7 The identification of Crk and Fyn SH<sub>2</sub> domain-binding proteins with antibodies**

SK-LU-1 or A549 lung tumor cells were cultured in polyhema-coated dishes without serum for 3 h. Then the cells were harvested and lyzed in lysis buffer. After pretreated with GSH coupled beads, 700  $\mu$ g total protein reacted with GST-Abl-SH<sub>2</sub> beads. The precipitated target proteins were resolved by SDS-PAGE, followed by immunoblotting using anti-phosphotyrosine antibody 4G10, FAK, Cas antibodies sequentially.

### 3 讨 论

人们早在 20 世纪 60 年代就发现肿瘤细胞失巢生存的现象, 对这种现象的分子机制的研究, 目前主要还是通过把某种癌基因转入永生化细胞这一手段<sup>[1, 6-9]</sup>. 这些研究发现, 细胞外基质介导的 PI3K-Akt/PKB、MAPK 信号途径的活化是维系细胞生存的关键因素. 但是, PI3K-Akt/PKB、MAPK 途径上游酪氨酸激酶通路的调节机制还不太清楚, 更缺少对 PI3K-Akt/PKB 和 MAPK 生存信号途径外可能存在的酪氨酸激酶生存通路的清晰了解<sup>[10]</sup>. 我们采用 GST-SH<sub>2</sub> pull-down 方法, 试图发现与肺癌细胞失巢生存可能相关的酪氨酸磷酸化蛋白质, 为最终明确酪氨酸激酶途径提供实验依据.

细胞膜受体与配体结合后, 受体型酪氨酸激酶或非受体型酪氨酸激酶的酪氨酸残基可能发生磷酸化, 凭借其 p-Tyr 可与含有 SH<sub>2</sub> 结构域的信号分子特异性结合<sup>[19, 20]</sup>, 并启动细胞酪氨酸激酶信号级联反应. SH<sub>2</sub> 结构域由 100 个左右氨基酸残基组成, 进化保守, 可与肽链中磷酸化酪氨酸残基特异结合<sup>[21, 22]</sup>. 含有 SH<sub>2</sub> 结构域的信号蛋白一般具有 SH<sub>2</sub> 和 PH(pleckstrin homology) 结构域, 分别与 PXXP 序列、细胞骨架蛋白结合<sup>[21, 22]</sup>. 含有 SH<sub>2</sub> 结构域的蛋白质可分为两类, 一类具有酶活性, 如 PLC- $\gamma$ 1,

另一类为衔接子, 无酶活性, 如 Shc<sup>[23]</sup>. 我们设想, 既然特定信号分子的 SH<sub>2</sub> 结构域可以结合相应蛋白质的 p-Tyr 残基, 那么如果某种 SH<sub>2</sub> 结构域结合的酪氨酸磷酸化蛋白质与癌细胞失巢生存相关的话, 我们就可以初步认为这种含有 SH<sub>2</sub> 结构域分子所参与的酪氨酸激酶途径对癌细胞失巢生存有很大的贡献.

基于这种设想, 我们成功地建立了 GST-SH<sub>2</sub> 融合蛋白检测肺癌细胞中酪氨酸磷酸化蛋白质信号分子的方法. 这为研究肿瘤细胞失巢生长特性的分子基础提供了有利条件. 藉此可以比较肿瘤细胞与正常上皮细胞、肿瘤细胞之间、肿瘤细胞在不同培养条件下酪氨酸磷酸化水平, 也可能发现与癌细胞失巢生存相关的酪氨酸激酶途径.

我们的实验证明, 肺癌细胞可以悬浮生存而不发生凋亡. 肺癌细胞在无血清悬浮(P-S)培养条件下的生长有赖于细胞酪氨酸蛋白激酶的活性. 肺癌细胞在 P-S 状态, Crk SH<sub>2</sub> 结合的 p130Cas 酪氨酸磷酸化维持在高水平. 文献报道, p130Cas 可以藉 p-Tyr 与衔接子 Crk 的 SH<sub>2</sub> 结构域结合<sup>[24]</sup>. 整合蛋白介导的细胞粘附引起 p130Cas 酪氨酸磷酸化. p130Cas 受 Src 家族激酶、Abl 酪氨酸激酶和 Fyn 酪氨酸激酶催化磷酸化<sup>[25]</sup>. 由于激酶与底物的结合位点和 SH<sub>2</sub> 与 p-Tyr 结合位点的不同, 这个特性可

以解释 Abl SH<sub>2</sub>、Fyn SH<sub>2</sub> 结合的蛋白质不为 p130Cas 抗体识别。

我们的实验也证明, Fyn SH<sub>2</sub> 结合的酪氨酸磷酸化 FAK 及其参与介导的信号转导在肺癌细胞失巢生存事件中起着作用, 这在蛋白质分子相互作用的层面上, 证实了有关文献报道的 FAK 抑制凋亡的理论<sup>[4, 26]</sup>。

Crk SH<sub>2</sub> 和 Fyn SH<sub>2</sub> 结合的 p130Cas、FAK 在肺癌细胞失巢生存过程中的作用, 证明我们以 GST-SH<sub>2</sub> 融合蛋白筛选酪氨酸激酶途径中信号分子的设想是可行的。因此本实验发现的 Abl、Grb2、LCK、PLC SH<sub>2</sub> 结合的酪氨酸磷酸化蛋白质值得进一步研究。我们首先选择了 Abl SH<sub>2</sub> 结合蛋白的鉴定, 因为在 H446、H1792、SK-LU-1 和 H23 肺癌细胞, Abl SH<sub>2</sub> 结合的蛋白质磷酸化条带只有一条, 便于对其纯化分析。我们观察到 SK-LU-1 肺癌细胞在悬浮培养时形成了众多大片粘附团块。提示, 细胞-细胞粘附作用可能介导 Abl SH<sub>2</sub> 结合蛋白磷酸化, 我们实验发现的 Abl SH<sub>2</sub> 结合的 p130 蛋白, 不为分子质量相近的 p130Cas、p125FAK、FGFR1、FGFR4 和 p120Cbl 抗体所识别。我们接下来的实验将首先对 Abl 及其他 SH<sub>2</sub> 结合蛋白进行测序分析, 这有助于揭示 SH<sub>2</sub> 结合的酪氨酸磷酸化蛋白质分子及可能的信号途径与肺癌细胞失巢生存之间的关系。本研究也表明, 可能有多种酪氨酸磷酸化蛋白质与肺癌细胞失巢生存密切相关。要进一步确定到底是哪些酪氨酸磷酸化蛋白质分子、酪氨酸激酶途径, 很显然, 我们还需要进一步研究。

### 参 考 文 献

- Frisch S M, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 1994, **124** (4): 619~626
- Frisch S M, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, **9** (5): 701~706
- Frisch S M, Screaton R A. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13** (5): 555~562
- Harnois C, Demers M J, Bouchard V, *et al.* Human intestinal epithelial crypt cell survival and death: complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways. *J Cell Physiol*, 2004, **198** (2): 209~222
- Schlaepfer D D, Broome M A, Hunter T. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (3): 1702~1713
- Shalom-Feuerstein R, Lindenboim L, Stein R, *et al.* Restoration of sensitivity to anoikis in Ras-transformed rat intestinal epithelial cells by a Ras inhibitor. *Cell Death Differ*, 2004, **11** (2): 244~247
- Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, *et al.* Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature*, 2004, **430** (7003): 1034~1039
- Jost M, Huggett T M, Kari C, *et al.* Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Mol Biol Cell*, 2001, **12** (5): 1519~1527
- Coniglio S J, Jou T S, Symons M. Rac1 protects epithelial cells against anoikis. *J Biol Chem*, 2001, **276** (30): 28113~28120
- Eckert L B, Repasky G A, Ulku A S, *et al.* Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis. *Cancer Res*, 2004, **64** (13): 4585~4592
- Zhang Y, Lu H, Dazin P, *et al.* Squamous cell carcinoma cell aggregates escape suspension-induced, p53-mediated anoikis: fibronectin and integrin  $\alpha$ 5 mediate survival signals through focal adhesion kinase. *J Biol Chem*, 2004, **279** (46): 48342~48349
- Shen X, Kramer R H. Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol*, 2004, **165** (4): 1315~1329
- Fujii K, Furukawa F, Matsuyoshi N. Ligand activation of overexpressed epidermal growth factor receptor results in colony dissociation and disturbed E-cadherin function in HSC-1 human cutaneous squamous carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 1996, **223** (1): 50~62
- Wei L, Yang Y, Zhang X, *et al.* Altered regulation of Src upon cell detachment protects human lung adenocarcinoma cells from anoikis. *Oncogene*, 2004, **23** (56): 9052~9061
- Wei L, Yang Y, Zhang X, *et al.* Anchorage-independent phosphorylation of p130(Cas) protects lung adenocarcinoma cells from anoikis. *J Cell Biochem*, 2002, **87** (4): 439~449
- Wei L, Yang Y, Yu Q. Tyrosine kinase-dependent, phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase-independent signaling pathways prevent lung adenocarcinoma cells from anoikis. *Cancer Res*, 2001, **61** (6): 2439~2444
- Orford K, Orford C C, Byers S W. Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. *J Cell Biol*, 1999, **146** (4): 855~868
- Okamura H, Resh M D. p80/85 cortactin associates with the Src SH2 domain and colocalizes with v-Src in transformed cells. *J Biol Chem*, 1995, **270** (44): 26613~26618
- Kinsey W H, Wu W, Macgregor E. Activation of Src-family PTK activity at fertilization: role of the SH2 domain. *Dev Biol*, 2003, **264** (1): 255~262
- Hunter S, Burton E A, Wu S C, *et al.* Fyn associates with Cbl and phosphorylates tyrosine 731 in Cbl, a binding site for phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 1999, **274** (4): 2097~2106
- Pawson T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*, 2004, **116** (2): 191~203
- Pawson T, Gish G D. SH2 and SH3 domains: from structure to

- function. *Cell*, 1992, **71** (3): 359~362
- 23 Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*, 1992, **9** (3): 383~391
- 24 Hamasaki K, Mimura T, Morino N, *et al.* Src kinase plays an essential role in integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate p130Cas. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **222** (2): 338~343
- 25 Sakai R, Nakamoto T, Ozawa K, *et al.* Characterization of the kinase activity essential for tyrosine phosphorylation of p130Cas in fibroblasts. *Oncogene*, 1997, **14** (12): 1419~1426
- 26 Xia H, Nho R S, Kahm J, *et al.* Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem*, 2004, **279** (31): 33024~33034

## Altered Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Anikis-resistant Tumor Cells\*

ZHANG Li-Neng<sup>1,2)</sup>, ZHA Xi-Liang<sup>1)\*\*</sup>, YU Qiang<sup>2,3)\*\*</sup>

<sup>(1)</sup>Key Laboratory of Glycoconjugate Research, Department of Biochemistry and Molecular Biology,  
Fudan University Shanghai Medical College, Shanghai 200032, China;

<sup>2)</sup>The Pulmonary Center and Department of Biochemistry, Boston University Medical Center, Boston MA 02118, USA;

<sup>3)</sup>Shanghai Institute of Materia Medica, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract** Anoikis is a type of apoptosis that results from cell detachment from the extracellular matrix. Resistance to anoikis may allow survival of cancer cells during metastasis. It has been found that PI3K-PKB/Akt and MAPK pathways confer anoikis resistance to cancer cells. However, the tyrosine kinase pathways upstream of PI3K-PKB/Akt and MAPK have not been adequately explored. In an attempt to identify specific phosphotyrosine-containing proteins and potential tyrosine kinase pathways involved in anoikis resistance, a functional screening method based on the specific interaction between src homologue 2 (SH<sub>2</sub>) domains and phosphotyrosine (p-Tyr) containing proteins was designed. Cell detachment rendered normal MDCK cells to undergo anoikis. However, the survival and proliferation of tumor cells was anchorage-independent. Consistent with this phenomenon, cell detachment induced rapid decrease in SH<sub>2</sub>s-binding tyrosine phosphorylated proteins in MDCK cells, while tyrosine phosphorylation of SH<sub>2</sub>-binding proteins in tumor cells was anchorage-independent. It was also found that tyrosine phosphorylation levels of Abl SH<sub>2</sub>-associated proteins decreased in detached MDCK cells. However, the tyrosine phosphorylation levels of Abl SH<sub>2</sub>-associated proteins in H460 lung tumor cells increased after a transient decrease, and the levels increased in H1792 lung tumor cells upon detachment. Using this functional screening method, some of the Fyn SH<sub>2</sub> and Crk SH<sub>2</sub>-binding proteins were identified as FAK and p130Cas respectively, which are critical in mediating cell-matrix interactions. The present data suggest that multiple phosphotyrosine-containing proteins and potential tyrosine kinase pathways may act to support the anoikis resistance of tumor cells. The SH<sub>2</sub>-domain screening method may be an efficient way to explore anoikis-resistance-related phosphotyrosine-containing proteins and potential tyrosine kinase pathways in tumor cells.

**Key words** anoikis, src homologue 2, tyrosine phosphorylation, tumor cell

\*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (CB518903).

\*\*Corresponding author .

ZHA Xi-Liang. Tel: 86-21-54237696, E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

YU Qiang. Tel: 86-21-50801790, E-mail: qyu@sibs.ac.cn

Received: May 8, 2005 Accepted: June 30, 2005