

阳性表达表皮钙粘蛋白增加 G0/ G1 期人乳腺癌细胞比例及其分子机制*

吴 衡¹⁾ 沈敏雄^{1, 2)} 梁玉龙¹⁾ 段玲玲¹⁾ 王丽影¹⁾ 徐 贞¹⁾ 查锡良^{1)**}

(¹⁾复旦大学上海医学院生化与分子生物学教研室, 上海 200032; ²⁾浙江湖州师范学院医学院基础部, 浙江 313000)

摘要 表皮钙粘蛋白 (E-cadherin) 阴性的乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 转染野生型表皮钙粘蛋白基因, 通过流式细胞仪测量细胞周期发现表皮钙粘蛋白阳性细胞生长变慢, 更多细胞停滞在 G0/ G1 期, 蛋白质印迹证实由 G0/ G1 期进入 S 期的重要调控分子细胞周期蛋白-D1 (cyclin D1) 下降了, 并发现表皮钙粘蛋白还能降低直接激活细胞周期蛋白-D1 基因转录的 β -连环蛋白的蛋白质浓度. 蛋白激酶 B (PKB) 能通过抑制糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β) 的活性来抑制 β -连环蛋白降解, 并在乳腺癌高转移细胞株中普遍过表达, 其表达同样受到了表皮钙粘蛋白的抑制. 并且在表皮钙粘蛋白阳性细胞中, 作为 PKB 上游信号分子并能激活 PKB 的粘着斑激酶 (FAK) 和整联蛋白相关激酶 (ILK) 蛋白量也发生下降, 能抑制 PKB 激活的 PTEN 蛋白量却增加了. 结果显示, 表皮钙粘蛋白能通过降低乳腺癌细胞中的 PKB 蛋白浓度, 并通过上游信号分子抑制 PKB 的激活, 进而降低 PKB 对 β -连环蛋白降解的抑制作用, 导致 β -连环蛋白直接调控的靶基因细胞周期蛋白 D1 的表达量下降, 引起更多的细胞停止在 G0/ G1 期.

关键词 表皮钙粘蛋白, 乳腺癌细胞, 细胞周期蛋白 D1, 蛋白激酶 B, 粘着斑激酶, 整联蛋白相关激酶, PTEN

学科分类号 Q291

钙粘蛋白 (cadherin) 是细胞间连接的主要成分, 负责细胞间的信号相互传递, 根据来源不同可分为表皮钙粘蛋白 (E-cadherin)、神经钙粘蛋白和胎盘钙粘蛋白等. 其中, 表皮钙粘蛋白基因在乳腺癌细胞中普遍低表达、缺失或突变, 与肿瘤细胞丧失接触抑制高度相关, 被认为是抑癌基因^[1]. 表皮钙粘蛋白胞浆内部分通过 α 、 β 、 γ -连环蛋白与细胞骨架相连^[2]. 其中 β -连环蛋白在肿瘤细胞中表达常常失控, 被认为是癌基因, 它在游离状态下, 胞浆内达到一定浓度后就能进入细胞核, 与转录因子 TCF/LEF 家族中的一些成员结合, 直接激活或抑制下游基因的转录. 受到 β -连环蛋白直接转录水平调控的基因包括细胞周期蛋白-D1, 细胞周期蛋白-D1 是细胞在细胞周期中 G0/ G1 期进入 S 期蛋白的开关蛋白^[3].

粘着斑激酶 (FAK) 和整联蛋白相关激酶 (ILK) 是受整联蛋白直接调控的两种激酶^[4]. FAK 是一种 125 ku 位于细胞浆中的非受体酪氨酸激酶, 在细胞中直接参与了粘着斑的形成, 另外, 它还有弱的磷酸酪氨酸酶活性, 能下调包括 FAK 的信号途径. FAK 能激活其他信号蛋白, 例如 c -Src、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 和促细胞分裂剂激活性蛋白激酶 (MAPK), 并进一步激活抗凋亡蛋白蛋白激酶 B (PKB). ILK 是 1996 年才被发现的丝氨酸/苏氨酸激酶^[5], 受到 ILK 调控的下游重要信号分子包括 PKB/Akt、GSK-3、 β -连环蛋白、p44/42 MAPK 和

肌球蛋白轻链^[6], ILK 的过表达能降低细胞表面的表皮钙粘蛋白. 抑癌基因 PTEN 主要功能是磷脂酶, 它的一个关键底物是 3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3), 并因此影响 PKB 的激活^[7]. 本文通过在表皮钙粘蛋白阴性的乳腺癌细胞中阳性表达表皮钙粘蛋白, 部分恢复细胞间通讯重要组成部分的表皮钙粘蛋白复合物, 观察对细胞周期以及一系列信号分子的影响, 探讨细胞间正常通讯联系对细胞维持正常功能中的作用, 以及丢失表皮钙粘蛋白的功能在肿瘤的发生和发展中可能起的作用.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳腺癌细胞株: 表皮钙粘蛋白阴性的细胞株 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 由上海肿瘤医院邵志敏教授赠送, 培养基使用 DMEM/F12 (1: 1), 细胞在 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养. 主要试剂: 多克隆山羊抗表皮钙粘蛋白抗体、单克隆鼠抗 β -连环蛋白抗体、多克隆兔抗 PTEN 抗体、多克隆鼠抗 PKB/Akt 抗体、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的驴抗羊二抗购自 Santa Cruz 公司, 多克隆鼠抗 ILK 抗体购自 Upstate biotechnology 公司. 野生型表皮

* 国家自然科学基金资助项目 (30000083), 上海市科委项目 (00JC 14042) 和教育部分子医学重点实验室资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-54237696, Fax: 021-64179832

E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

收稿日期: 2002-11-22, 接受日期: 2002-12-28

钙粘蛋白基因真核细胞表达质粒由美国 Memorial Sloan Kettering 癌症研究中心 Gottardi 博士赠送. LIPOFECTAMINE™ 2000 脂质体和 G418 购自美国 JIBCO 公司. 二抗 HRP 标记羊抗兔和鼠 IgG 购自华舜生物工程公司, 增强化学发光 (ECL) 试剂购自普飞生物工程公司. DMEM 和 F12 培养基均为 GibcoBRL 产品.

1.2 转染野生型表皮钙粘蛋白基因

人表皮钙粘蛋白全长 cDNA 的真核表达质粒 pcDNA3/E-cadherin 取 2 μ g, 和无血清培养基 F12/DMEM 100 μ l 混匀. LIPOFECTAMINE™ 2000 脂质体 6 μ l 和无血清培养基 F12/DMEM 100 μ l 混匀, 放置 5 min. 再将上述两者相互混匀, 静止放置 20 min, 再加入 800 μ l 无血清培养基混匀, 直接加到细胞表面, 37℃ 二氧化碳培养箱放置 5~8 h, 换成 10% 小牛血清的培养基继续培养 48 h. 更换成含有 600 mg/L G418 的培养液筛选高表达阳性克隆.

1.3 免疫组织化学法鉴定表皮钙粘蛋白的表达

采用亲和蛋白生物蛋白 (avidin-biotin) 酶标记复合物 (ABC) 法. 具体步骤为: 细胞接种于内置盖玻片的六孔板中, 待细胞接近长满盖玻片, PBS 洗涤, 冷丙酮固定. 用含有 0.3% H_2O_2 的甲醇去内源性酶活性, 置 37℃ 30 min. 加正常羊血清 37℃ 封闭 20 min. 加羊抗表皮钙粘蛋白抗体 (1:50) 先置 37℃ 90 min, 再于 4℃ 过夜. PBS 洗涤, 加生物蛋白标记的驴抗羊 IgG (1:100), 置 37℃ 1 h. 0.05% 二氨基联苯胺 (DAB), 0.03% H_2O_2 显色. 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封固. 用 PBS 取代一抗作阴性对照, 同时实验. 独立重复实验一次.

1.4 流式细胞仪测量细胞周期变化

细胞密度约 70% 时, 无血清培养 48 h, 更换有血清培养基, 于 4、8、16、24、48 h, 3 mmol/L EDTA 消化细胞, 离心收集细胞, 加入冷 75% 乙醇固定, -20℃ 保存. 上流式细胞仪前, 离心收集细胞, 加入 0.1% Triton X-100, 5 g/L RNA 酶溶液 37℃ 保温 30 min. 50 mg/L 碘化丙啶 (PI) 避光染 15 min, 流式细胞仪 (Becton Dickinson Co.) 分析. 独立重复 3 次, 计算平均值和 CV 值.

1.5 流式细胞仪测量细胞表面的表皮钙粘蛋白

消化液 (2 mmol/L EDTA, PBS pH 7.4) 消化细胞. PBS 洗, 封闭液 (1% BSA, pH 7.4) 封闭 1 h. 加一抗, 含 1% BSA 的 PBS 洗. 加 FITC

标记二抗, PBS 洗, 避光, 流式细胞仪 (Becton Dickinson Co.) 分析. 独立重复 3 次, 计算平均值和 CV 值.

1.6 蛋白质印迹实验

细胞生长融合率达到 80%~90% 后, 冰浴, PBS 洗涤 2 次, 加入 100 μ l 1× 上样缓冲液 (2% SDS, 50 mmol/L Tris·HCl, pH 6.8, 10% 甘油, 5 mmol/L Na_3VO_4 , 0.5 mmol/L 苯甲基磺酰胺, 5 g/L 亮抑蛋白酶肽), 收集细胞总蛋白, 改良 Lowry 法测定蛋白质浓度. 10% 的不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移缓冲液 (25 mmol/L Tris·HCl, 192 mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇, 200 μ mol/L Na_3VO_4) 湿式电转移. 封闭液 (3% BSA, 0.05% Tween 20, PBS) 中, 室温封闭 4~6 h. 加一抗, 室温孵育过夜. 洗涤液 (PBS, 0.05% Tween 20) 洗涤 3 次, 加二抗, 室温孵育 3 h. 洗涤液洗 3 次, ECL 法显影. 图像分析仪分析结果. 重复 3 次收集细胞总蛋白 (每次样品再重复 2 次), 计算平均值和 CV 值.

2 结 果

2.1 乳腺癌细胞株转染表皮钙粘蛋白基因

MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 转染含有野生

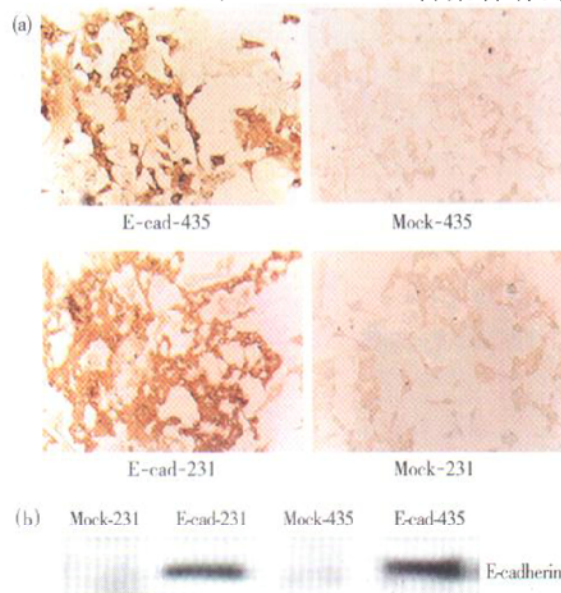


Fig. 1 Positive expression of E-cadherin in transfectants
Wild-typed E-cadherin plasmid was transfected into MDA-MB-231 and MDA-MB-435 cell lines and the transfectants were named E-cad-231 and E-cad-435, while pcDNA3 plasmids was also transfected as control and the transfectants were named Mock-231 and Mock-435. Positive expression of E-cadherin in E-cad-435 and E-cad-231 was confirmed by the methods of immunohistochemistry (a) and Western blot (b) described in "Materials and Methods". As the control, there was no expression of E-cadherin in Mock-435 and Mock-231.

型表皮钙粘蛋白 cDNA 的真核细胞表达质粒 pcDNA3, 经过 G418 挑选阳性高表达克隆, 阳性克隆被命名为 E-cad-231 和 E-cad-435. 并平行转染空质粒 pcDNA3 作为对照细胞, 对照细胞株被命名为 Mock-231 和 Mock-435. 免疫组化 (图 1a)、蛋白质印迹 (图 1b) 和流式细胞仪 (略) 证实表皮钙粘蛋白在 E-cad-231 和 E-cad-435 细胞株中得到

了阳性表达.

2.2 表皮钙粘蛋白的表达对细胞周期的影响

流式细胞仪测量 3 次结果统计显示, E-cad-231 比对照细胞 Mock-231 细胞生长速度明显变慢, 尤其停滞在 G0/G1 期增多 (图 2). 阳性表达表皮钙粘蛋白对 MDA-MB-435 细胞周期的影响与对 MDA-MB-231 的影响类似 (略).

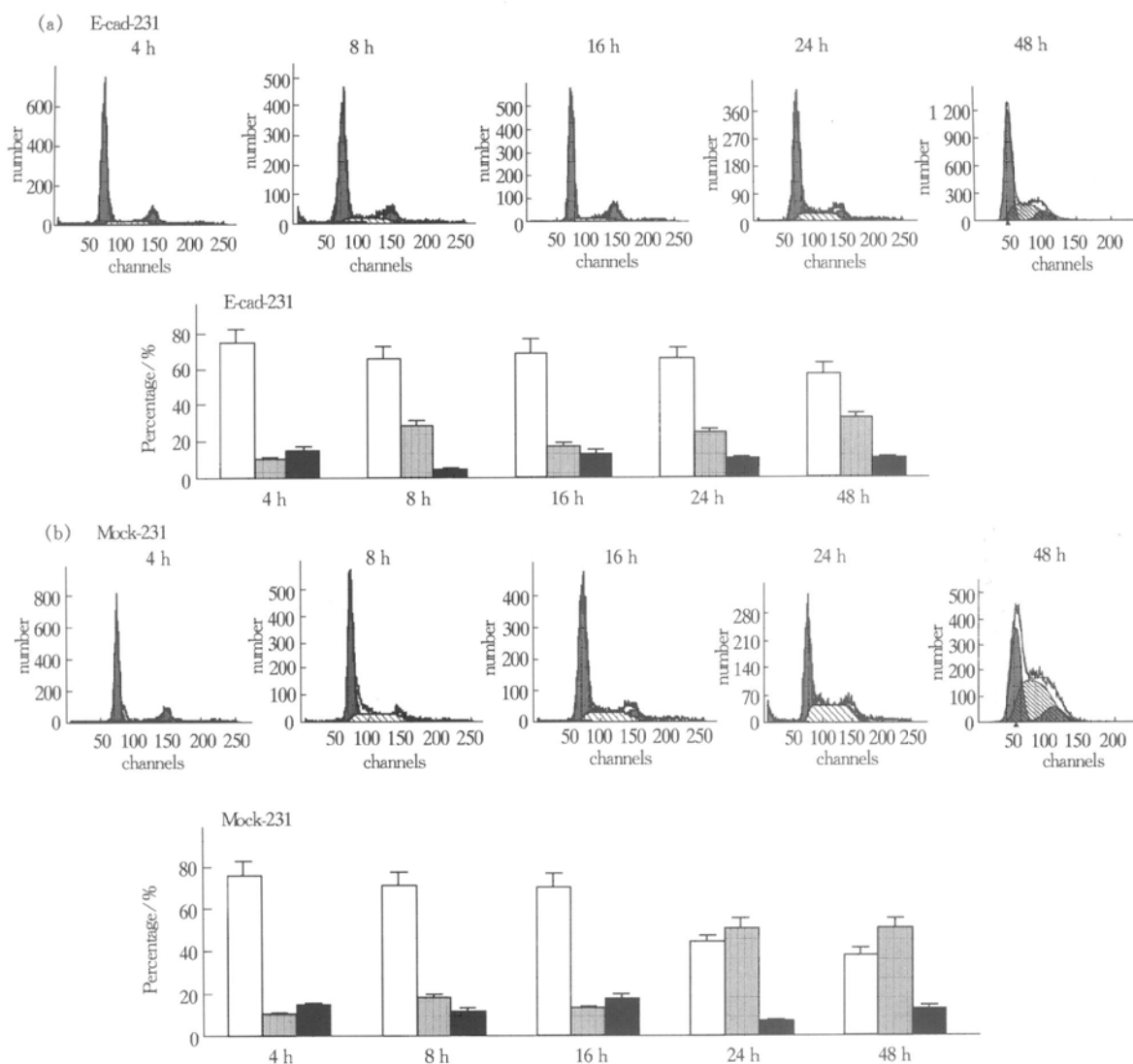


Fig.2 Effect of positive expression of E-cadherin on cell cycle

E-cad-231 was transfectants which could positively expressed E-cadherin. Mock-231 was transfected with empty vector, pcDNA3 as control. The cells were synchronized by starvation with culture medium without serum for 48 h. Then the culture medium was changed for fresh medium with serum. The cells was harvested after 4, 8, 16, 24, 48 h and the chromosome DNA was dyed by PI. The results of flow cytometry showed that more cells of E-cad-231 was delayed in G0/G1 phase than that of Mock-231. This experiment had been repeated for 3 independent experiments. The means were calculated and histograms were drawn. (a) E-cad-231, (b) Mock-231. □: G0~G1; ▒: S; ■: G2~M.

2.3 细胞周期蛋白 D1 的表达受到抑制

已知细胞周期蛋白 D1 直接负责调控细胞 G0/G1 期进入 S 期的转变^[8], 为了研究表皮钙粘蛋白

使细胞周期停滞于 G0/G1 期是否与细胞周期蛋白 D1 有关, 应用蛋白质印迹实验测量细胞周期蛋白 D1 的蛋白量, 3 次独立重复实验统计结果证实,

E-cad-231 和 E-cad-435 中细胞周期蛋白 D1 的蛋白质浓度明显比对照细胞低 (图 2)。这说明表皮钙粘蛋白通过降低细胞周期蛋白 D1 的蛋白量, 从而将更多的细胞停滞在 G0/G1 期, 抑制细胞的生长 (图 3a)。

2.4 β -连环蛋白的蛋白量被降低

细胞周期蛋白 D1 基因是 β -连环蛋白和 TCF/

LEF 直接作用的靶基因, 且 β -连环蛋白是表皮钙粘蛋白的重要信号分子, 能与表皮钙粘蛋白直接结合。为了证实表皮钙粘蛋白是否通过 β -连环蛋白来调控细胞周期蛋白 D1 基因的转录, 应用蛋白质印迹实验测量 β -连环蛋白的蛋白质浓度变化。3 次独立重复实验结果统计证实表皮钙粘蛋白能降低 β -连环蛋白的蛋白量 (图 3b)。

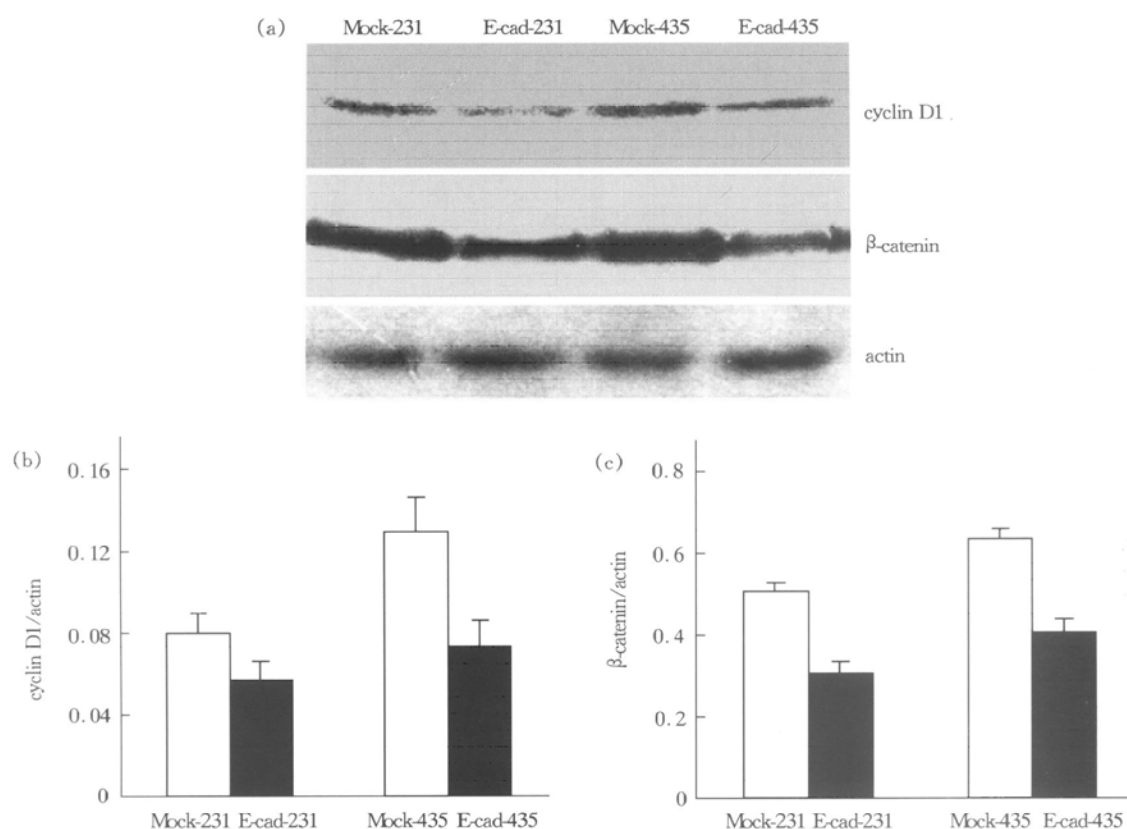


Fig. 3 Cyclin D1 and β -catenin protein levels were decreased by positive expression of E cadherin

E-cad-231 and E-cad-435 were transfectants which could positively express E-cadherin. Mock-231 and Mock-435 were transfected with empty vector, pcDNA3 as control. The cells were synchronized by starvation with culture medium without serum for 24 h. Then the culture medium was changed for fresh medium with serum. The cells was harvested after 48 h. The results of Western blot showed that protein levels of cyclin D1 and β -catenin were decreased by positive expression of E-cadherin. These experiments had been repeated for 3 independent experiments (each had been repeated for 2 times). The results were normalized by actin. The means were calculated and histograms were drawn. (a) Protein levels of cyclin D1 and β -catenin were detected by Western blot. (b) The calculated means of cyclin D1/actin were drawn into a histogram. (c) The calculated means of β -catenin/actin were drawn into a histogram.

2.5 抗凋亡蛋白 PKB 的蛋白量被减少

已有文献报道, PKB 在恶性乳腺癌细胞中普遍过表达, 并且 PKB 能抑制 GSK-3 β 的激活^[9,10]. GSK-3 β 能磷酸化 β -连环蛋白并起始 β -连环蛋白的降解^[2]. 高转移乳腺癌细胞中 PKB 普遍过表达, 表皮钙粘蛋白是否对 PKB 的过表达有抑制作用, 并因此影响 β -连环蛋白的降解, 为此, 采用蛋白质

印迹测量 PKB 量的变化。3 次独立重复统计证实, 与对照细胞 Mock-231 和 Mock-435 相比, PKB 蛋白浓度在 E-cad-231 和 E-cad-435 显著降低。这说明表皮钙粘蛋白能强烈抑制 PKB 在乳腺癌细胞中的过表达, 并因此能增加 β -连环蛋白的降解 (图 4a)。

2.6 FAK 和 ILK 蛋白量被降低进而抑制 PKB

FAK 和 ILK 是与整联蛋白直接结合的重要激酶, 他们能通过 PI3K 激活 PKB. 由于粘着斑激酶和整联蛋白相关激酶与 PKB 的激活有关, 表皮钙粘蛋白是否能通过他们来调节 PKB 的活性, 应用蛋白质印迹测量了 FAK 和 ILK 的蛋白量. 3 次独立重复实验结果经统计证实, 表皮钙粘蛋白的阳性表达能引起 FAK (图 4b) 和 ILK (图 4c) 的蛋白量下降. ILK 为 59 ku, 但是蛋白质印迹结果出现靠得很近的双带, 分子质量在 75~80 ku 之间, 与 Upstate 生物技术公司的抗体说明书上完全一致,

通过两条带的总浓度来统计 ILK 蛋白量的变化.

2.7 PKB 的上游抑制因子 PTEN 的表达增加

PTEN 即是磷酸脂酶, 又是磷酸蛋白酶, 它的一个重要底物是 PIP₃, 通过 PIP₃ 进而抑制 PI3K 的激活, 并因此抑制 PKB 的活性. 作为 PI3K 的重要抑制因子, 表皮钙粘蛋白对它是否有影响显得尤为重要, 因此通过蛋白质印迹测量了 PTEN 蛋白量的变化. 3 次独立重复统计说明, E-cad-231 和 E-cad-435 的 PTEN 蛋白量与 Mock-231 和 Mock-435 细胞相比是增加了 (图 4d). 说明表皮钙粘蛋白能通过 PTEN 来抑制 PKB 的活性.

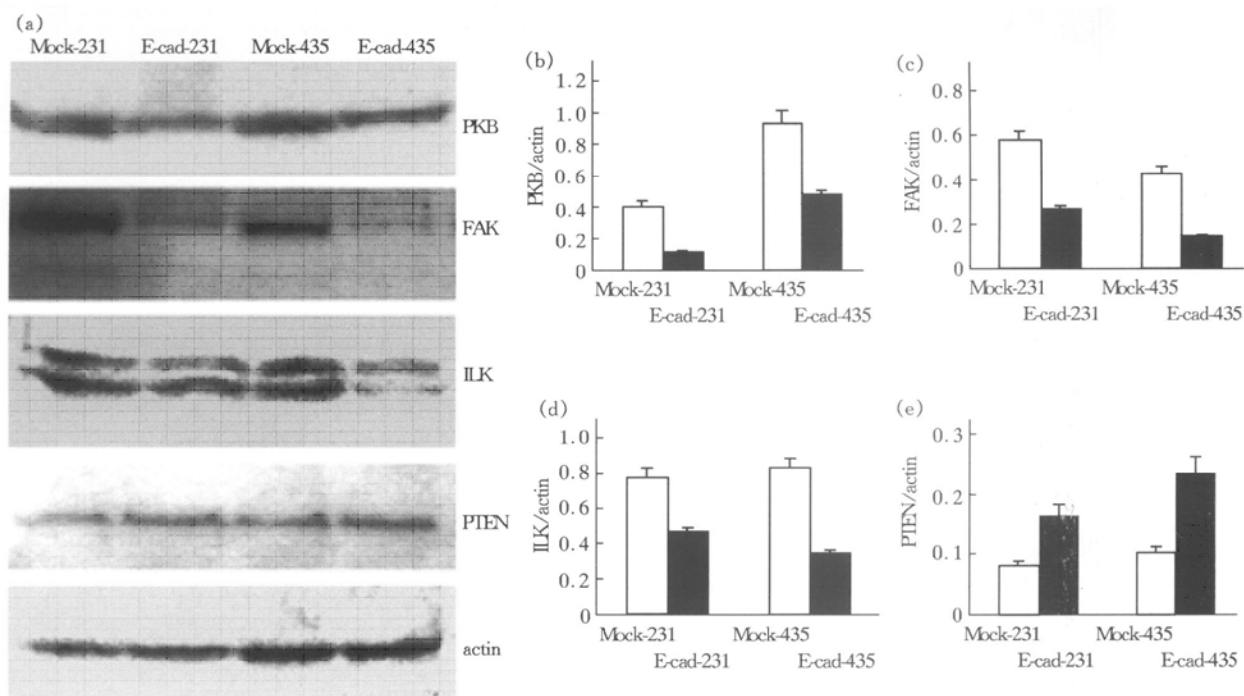


Fig 4 FAK, ILK and PKB protein levels were decreased while PTEN protein level was increased by positive expression of E cadherin E-cad-231 and E-cad-435 were transfectants which could positively express E-cadherin. Mock-231 and Mock-435 were transfected with empty vector, pcDNA3 as control. The cells were synchronized by starvation with culture medium without serum for 24 h. Then the culture medium was changed for fresh medium with serum. The cells was harvested after 48 h. (a) The protein levels of FAK, ILK and PKB were detected by Western blot and the results of Western blot were normamlized by actin. (b) ~ (e) Every experiment had been repeated for 3 independent experiments (each had been repeated for 2 times). The means of PKB/actin (b), FAK/actin (c), ILK/actin (d) and PTEN/actin (e) were calculated and the corresponding histograms were drawn.

3 讨 论

E-cad-231 和 E-cad-435 生长明显比对照细胞慢, 流式细胞仪测量细胞周期发现, 表皮钙粘蛋白能将更多的细胞停滞在 G0/G1 期. 视网膜母细胞瘤易感基因 (Rb) 在 G1/S 期转变中起决定作用, Rb 通过与转录因子 E2F 结合抑制 E2F 的转录活

性, 还通过恢复去乙酰化酶到启动子位点, 抑制进入 S 期所必需的启动子活性^[11, 12]. Rb 的磷酸化失活依赖于 D 型细胞周期蛋白, 尤其是细胞周期蛋白 D1^[8]. 另外, 细胞周期蛋白 D1 是 Wnt 信号通路中 β -连环蛋白的靶基因^[3]. β -连环蛋白的降解需要一系列信号分子的参与, 其中主要的信号分子 GSK-3 β 能直接磷酸化 β -连环蛋白, 被磷酸化的

β -连环蛋白被泛素化随即被降解^[2]。又有文献报道, PKB 能抑制 GSK-3 β 的活性, 并进而抑制 β -连环蛋白的降解^[9]。本文证实, 表皮钙粘蛋白能降低乳腺癌细胞株中 PKB 的蛋白质浓度, 并因此降低了 PKB 对 β -连环蛋白的保护作用, 进而降低细胞周期蛋白 D1 的蛋白质浓度, 最后引起更多细胞停滞在 G0/G1 期, 生长速度变慢。

正常细胞中, 磷酸酶和激酶存在一个动态平衡, 共同完成对外界信号的应激和传递过程。在细胞发生癌变后, 各种激酶尤其是酪氨酸激酶经常发生过表达或处于持续激活状态, 导致肿瘤细胞恶性增殖和对外界信号的不依赖性。整联蛋白 (integrin) 是细胞表面主要负责细胞和基质粘附的分子, 它能与细胞表面的生长因子受体产生协同效应, 感受外界信号, 激活细胞内部的信号分子, 尤其是与之直接相关的 FAK 和 ILK, 将外界的信号转变为细胞内的各种反应。但在很多肿瘤细胞中, FAK 和 ILK 通常发生过表达现象并处于持续激活状态, 大大降低了细胞对外界生长因子的依赖程度。FAK 和 ILK 都能通过 PI3K 激活抗凋亡蛋白 PKB, 促进细胞的生长^[13, 14]。磷酸酶 PTEN 的一个重要底物是 PIP3, 通过 PIP3 抑制 PI3K 的激活, 从而抑制 PKB 的激活^[15, 16]。本实验证实, 表皮钙粘蛋白可通过降低 FAK 和 ILK, 增加磷酸酶 PTEN 的表达, 从而抑制 PKB 的激活, 进一步抑制肿瘤细胞的增殖。

另外, G0/G1 进入 S 期的另一重要调控蛋白细胞周期蛋白 E (cyclin E) 也有可能受到表皮钙粘蛋白的调控。已有文献报道, 表皮钙粘蛋白能抑制 Kip/Cip 家族成员 p27 的表达^[2], 所有 Kip/Cip 家族成员又能抑制细胞周期蛋白 E 的表达^[17], 同样能起到将更多细胞停滞在 G0/G1 期的作用。表皮钙粘蛋白对细胞周期蛋白 E 的具体作用及其调控机理, 我们将在以后的工作中进一步证实。这一现象说明表皮钙粘蛋白对细胞周期的调控可能是多角度的, 不仅依赖于单一的信号调控通路。

参 考 文 献

- 1 Chothia C, Jones E Y. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem*, 1997, **66** (1): 823~ 862
- 2 Wijnhoven B P, Dinjens W N, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*, 2000, **87** (8): 992~ 1005
- 3 Tetsu O, McCormick F. β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 1999, **398** (6726): 422~ 426
- 4 Giancotti F G, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*, 1999, **285** (5430): 1028~ 1032
- 5 Hannigan G E, Leung-Hagsteejn C, Fitz-Gibbon L, *et al.* Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new β 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*, 1996, **379** (6560): 91~ 96
- 6 Wu C. ILK interactions. *J Cell Sci*, 2001, **114** (14): 2549~ 2550
- 7 Tamura M, Gu J, Matsumoto K, *et al.* Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*, 1998, **280** (5369): 1614~ 1617
- 8 Shapiro G I, Harper J W. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest*, 1999, **104** (12): 1645~ 1653
- 9 Nicholson K M, Anderson N G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, 2002, **14** (5): 381~ 395
- 10 Cheng J Q, Godwin A K, Bellacosa A, *et al.* AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (19): 9267~ 9271
- 11 Harbour J W, Luo R X, DeSanti A, *et al.* Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 1999, **98** (8): 859~ 869
- 12 Sherr C J, Roberts J M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 1999, **13** (12): 1501~ 1512
- 13 Abu-Ghazaleh R, Kabir J, Jia H, *et al.* Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. *Biochem J*, 2001, **360** (1): 255~ 264
- 14 Persad S, Attwell S, Gray V, *et al.* Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (7): 3207~ 3212
- 15 Yu Z, Fotouhi-Ardakani N, Wu L, *et al.* PTEN associates with the vault particles in HeLa cells. *J Biol Chem*, 2002, **277** (43): 40247~ 40252
- 16 Dupont J, Renou J P, Shani M, *et al.* PTEN overexpression suppresses proliferation and differentiation and enhances apoptosis of the mouse mammary epithelium. *J Clin Invest*, 2002, **110** (6): 815~ 825
- 17 Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. *FASEB J*, 1999, **13** (8): 773~ 780

Positive Expression of E-cadherin Retards More Human Breast Carcinoma Cells in G0/ G1 Phase and its Molecular Mechanism*

WU Heng¹⁾, SHEN Min-Xiong^{1,2)}, LIANG Yu-Long¹⁾,

DUAN Ling-Ling¹⁾, WANG Li-Ying¹⁾, XU Zhen¹⁾, ZHA Xi-Liang^{1)**}

¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 210032, China;

²⁾Medical School, Huzhou Teacher College, Zhejiang 313000, China)

Abstract E-cadherin-negative human breast carcinoma cell lines, MDA-MB-231 and MDA-MB-435 were transfected with wild-type E-cadherin cDNA. Flow cytometry showed that E-cadherin-positive transfectants grew slower than the control cells and more cells were relayed in G0/ G1 phase. Western blot showed that it was due to down-regulation of protein concentration of cyclin D1 and β -catenin, the cyclin D1 gene transcriptional regulator. At the meantime, PKB protein level, which can inhibit β -catenin destruction through GSK-3 β , was also down-regulated. As the PKB activators, FAK and ILK protein levels were decreased and PKB inhibitor, PTEN was increased by positive expression of E-cadherin. Therefore, E-cadherin can inhibit PKB activity by down-regulation of FAK, ILK and up-regulation of PTEN. As a result, β -catenin and cyclin D1 protein level increased and more cells were retarded in G0/ G1 phase.

Key words E-cadherin, breast carcinoma cell lines, cyclin D1, protein kinase B, focal adhesion kinase (FAK), integrin-linked kinase (ILK), PTEN

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30000083), Science and Technology Bureau of Shanghai Municipal Government (00JC 14042) and The Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, China.

** Corresponding author. Tel: 86-21-54237696, Fax: 86-21-64179832, E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

Received: November 22, 2002 Accepted: December 28, 2002