

# 骨桥蛋白通过 NF- $\kappa$ B 上调钙蛋白酶小亚基 1 促进肝癌细胞迁移\*

张 焯 叶丽虹\*\* 张晓东\*\*

(南开大学生命科学学院教育部生物活性材料重点实验室, 天津 300071)

**摘要** 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)参与调控多种信号途径激活转移相关基因, 进而促进细胞迁移. 钙蛋白酶小亚基 1 (calpain small subunit 1, Capn4)与肿瘤转移密切相关, 在许多肿瘤及其转移组织中高表达. 为了探讨 OPN 促进肝癌细胞迁移的分子机制, 应用报告基因检测、RT-PCR、免疫印迹及“伤口愈合”等方法检测了肝癌细胞中 OPN 对 Capn4 的调控作用及其对肝癌细胞迁移的影响. 结果显示, 在 HepG2 细胞中过表达 OPN 后, Capn4 的启动子转录活性显著增强, 同时 mRNA 及蛋白质表达水平也明显上调. 在 HepG2 细胞中应用 siRNA 干扰 OPN 的表达可导致 Capn4 启动子转录活性受到明显抑制, 同时 mRNA 及蛋白质表达水平也显著下调. 应用核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的抑制剂 PDTC 可抑制由过表达 OPN 导致的 HepG2 细胞中 Capn4 的上调. “伤口愈合”实验显示, OPN 可以通过上调 Capn4 促进肝癌细胞迁移. 因此, 研究发现, OPN 通过 NF- $\kappa$ B 上调 Capn4 的表达, 进而促进肝癌细胞的迁移, 这一发现对进一步阐明肝癌细胞迁移的分子机制具有重要意义.

**关键词** 骨桥蛋白, 钙蛋白酶小亚基 1, 核转录因子  $\kappa$ B, 肝癌, 迁移

**学科分类号** Q257

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00665

肿瘤转移复发是导致病人死亡的主要原因, 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)及钙蛋白酶小亚基 1 (calpain small subunit 1, Capn4)在转移的肿瘤组织中表达很高<sup>[1-2]</sup>, 体外研究发现 OPN 和 Capn4 均具有促进肿瘤细胞迁移的能力. OPN 最早被作为一种与恶性转化有关的磷酸化蛋白, Senger 等<sup>[3]</sup>于 1979 年报道, 曾被称为早期 T 淋巴细胞活性蛋白 1 (early T lymphocyte activation 1, Eta-1)和分泌磷蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP-1)等. 近年来, 越来越多的研究发现, OPN 通过与细胞膜上受体 CD44 及整合素结合而发挥作用<sup>[4-5]</sup>, 与肿瘤细胞生长、增殖、浸润及转移密切相关<sup>[6]</sup>, 在乳腺癌、胃癌、肝癌等大部分肿瘤及其转移复发组织中高表达<sup>[7-9]</sup>. Capn4 属于钙蛋白酶(calpain)系统, 该系统中  $\mu$ -calpains 在哺乳动物各组织中广泛表达,  $\mu$ -calpains 是由一个 80 ku 的大催化亚基和一个 28 ku 的小调节亚基组成的异源二聚体, 其中这个小亚基被命名为 Capn4. Capn4 作为钙蛋白酶的一个调节亚基, 在 Calpain 促进细胞的迁移、增殖、凋亡和分化过程中起着重要的作用<sup>[10-11]</sup>. 此

外, 骨桥蛋白 OPN 可以参与调控多种信号通路如激活核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)途径<sup>[12]</sup>, 并进一步激活转移相关基因, 促进细胞迁移. 但是 OPN 和 Capn4 之间是否有相互调节目前尚不清楚. 为了进一步探讨 OPN 促进肝癌细胞迁移作用的分子机制, 本研究检测了肝癌细胞中 OPN 对 Capn4 的影响, 发现 OPN 可以通过 NF- $\kappa$ B 上调肝癌细胞 HepG2 中 Capn4 的表达, 进而促进肝癌细胞迁移.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系.** 人肝癌细胞系 HepG2 为本实验室保存.

\* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2009CB521702)和国家自然科学基金资助项目(30670959).

\*\* 通讯联系人.

张晓东. Tel: 022-23506830, E-mail: zhangxd@nankai.edu.cn

叶丽虹. Tel: 022-23501385, E-mail: yelihong@nankai.edu.cn

收稿日期: 2009-11-08, 接受日期: 2010-01-19

**1.1.2 试剂.** 进口胎牛血清, MEM 和 DMEM 细胞培养基均购于 Gibco 公司; 鼠抗人  $\beta$  肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 单克隆抗体 (1:20 000) 购于 Sigma-Aldrich 公司; 鼠抗人 Capn4 单克隆抗体 (1:1 000) 购于 Chemicon 公司; 辣根过氧化物酶标记的广谱二抗购于天津津脉基因测绘技术有限公司. Lipofectamine 2000 和 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; M-MuLV 反转录酶购于 TaKaRa 公司; PDTC 购于 Sigma-Aldrich 公司; 其余为国产分析纯或优级纯试剂.

**1.1.3 质粒.** pGL3-Capn4 为本实验室构建的克隆有 Capn4 启动子序列的荧光素酶报告基因载体; pRL-TK 为海肾荧光素酶载体; pCDNA3-OPN 为克隆有 OPN 全长的真核表达载体.

**1.1.4 siRNA 序列.** 靶向骨桥蛋白 OPN 和钙蛋白酶小亚基 1 Capn4 mRNA 的小 RNA 干扰片段由广州锐博生物科技有限公司合成, Si-OPN: 5' GCC-ACAAGCAGUCCAGAUUdTdT 3' (正义链), 3' dT-dTCGUGUUCGUCAGGUCUAA 5' (反义链); Si-Capn4: 5' GCTTTTGTCTCTCUGTUCdTdT 3' (正义链), 3' dTdTTCGUUUUCUUGUGUGTUCUTG 5' (反义链).

## 1.2 细胞培养

HepG2 细胞采用 GIBICO 公司生产的 DMEM (含 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 U/ml 硫酸链霉素) 培养液, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养.

## 1.3 Capn4 启动子的克隆

根据文献报道<sup>[13]</sup>, 设计靶向 Capn4 启动子序列的 PCR 引物 (上游: 5' CGGGGTACCTCCCTTAG-TGAGCGGACCGAAAAC 3', 下游: 5' CCGCTC-GAGGGGTATCTCTGAAACCTATGGGC 3'), 以 HepG2 细胞基因组为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增后测序正确的 PCR 产物经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切, 连入报告基因载体 pGL3-Basic, 得到含有 Capn4 启动子序列的重组质粒 pGL3-Capn4.

## 1.4 报告基因检测

将报告基因载体 (pGL3-Capn4 和 pRL-TK) 和 OPN siRNA 或真核表达质粒 pCDNA3-OPN 共转染至细胞中, 其中海肾荧光素酶载体为内参. 转染 48 h 后按照荧光素酶试剂盒说明, 加入裂解缓冲液室温反应 15 min 后刮下细胞裂解产物并转移到 1.5 ml 离心管中. 12 000 r/min 离心 10 min, 把上清液小心地转移到一个新的 1.5 ml 离心管中. 在每

个含有 100  $\mu$ l 荧光素酶测定缓冲液 (LAR II) 的离心管中加入等量细胞裂解液, 混匀. 将离心管放入荧光光度计, 2 s 平衡后, 测定 10 s 后的光输出; 接着加入 100  $\mu$ l 荧光淬灭剂 (Stop & Glo reagent), 淬灭萤火虫荧光素酶, 同时启动海肾荧光素酶反应, 测定 10 s 后的光输出. 每组实验重复 3 次.

## 1.5 RT-PCR

分别设计 Capn4 PCR 引物 (上游: 5' CCCCC-ACGCACACATTACTCCA 3', 下游: 5' CGCTAT-CCATCACGGCCACCAT 3') 和 GAPDH PCR 引物 (上游: 5' GGTCATCCCTGAGCTGAACG 3', 下游: 5' TCCGTTGTCATACCAGGAAAT 3'), 应用 TRIzol 一步法, 从 HepG2 和 HepG2 过表达 OPN 及干扰 OPN 的细胞中分别提取总 RNA. 取 1  $\mu$ g 总 RNA, 应用 M-MuLV 反转录酶进行反转录合成 cDNA 第 1 链, 然后加热至 70 $^{\circ}$ C, 10 min 灭活反转录酶, 取 2  $\mu$ l cDNA 作为模板, 进行 PCR 反应. PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环. 取 5  $\mu$ l PCR 产物做琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果.

## 1.6 免疫印迹分析

用预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 然后加细胞裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L PMSF, 1% SDS, 蛋白酶抑制剂) 冰上放置 20 min, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清定量分析. 取 30~40  $\mu$ g 已定量的总蛋白进行 SDS-PAGE, 电转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入一抗, 分别为鼠抗人 Capn4 抗体 (1:1 000 稀释), 鼠抗人  $\beta$ -actin (1:20 000 稀释). 室温培育 3 h, TBS-T 洗膜, 再分别加入辣根过氧化物酶标记的广谱二抗, 室温培育 1 h, TBS-T 洗膜, 应用增强型 ECL 显色试剂盒于暗室曝光显影, 免疫印迹实验均重复 3 次.

## 1.7 “伤口愈合”实验

在 HepG2 细胞转染 48 h 后, 用移液器枪头沿培养板底部呈 “一” 字形划痕单层培养细胞, 用 PBS 洗细胞 2 次, 加入新鲜培养基继续培养. 于此后的 0、6、24 和 48 h 时在倒置显微镜下测量细胞向致伤区迁移的相对距离并拍照.

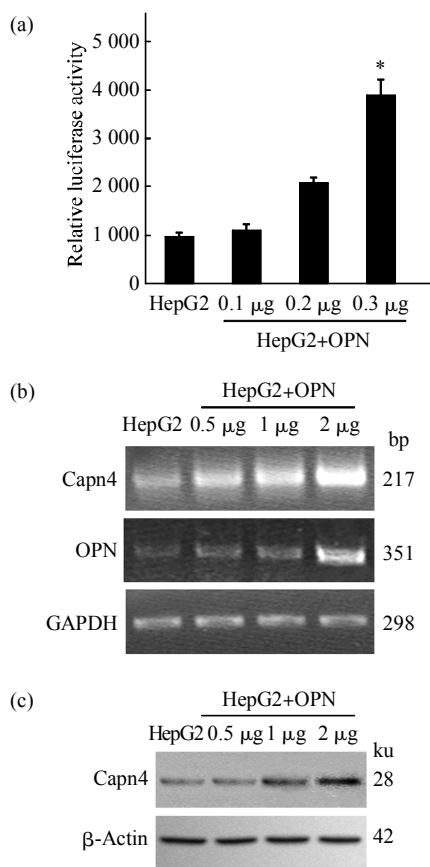
## 1.8 统计学分析

实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 输入 spss13.0 统计软件, 采用 Student's *t* 检验进行统计分析.

## 2 结 果

### 2.1 在肝癌细胞 HepG2 中 OPN 具有上调 Capn4 的作用

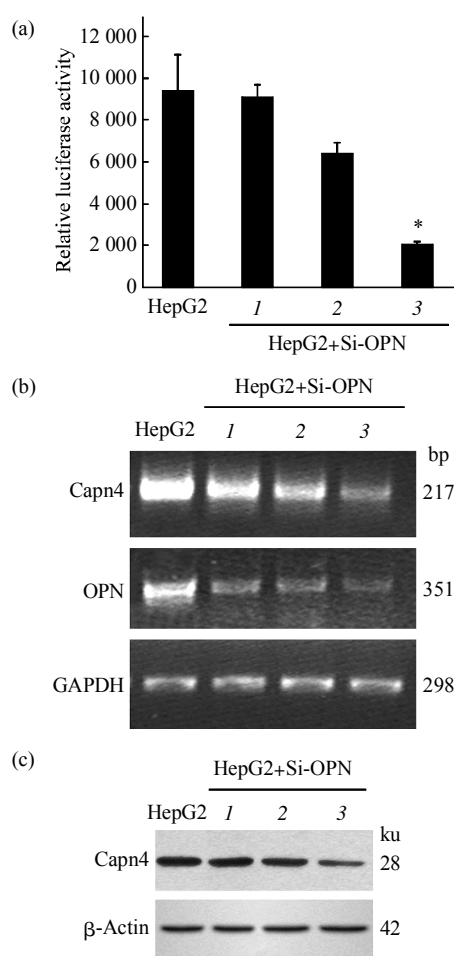
在 HepG2 细胞中分别瞬时转染 0.1、0.2、0.3  $\mu\text{g}$  (或 0.5、1、2  $\mu\text{g}$ ) OPN 的真核表达质粒 pCDNA3-OPN 过表达 OPN, 转染后 48 h 通过启动子报告基因, RT-PCR 和免疫印迹方法检测 Capn4 的启动子转录活性、mRNA 表达及其蛋白质表达情况. 结果显示, 在 HepG2 细胞中过表达 OPN 后与对照组相比, Capn4 在启动子的转录活性、mRNA 表达及其蛋白质水平均显著上调(图 1), 并



**Fig. 1 OPN was able to upregulation of Capn4 in HepG2 cells**

(a) Reporter gene assay showed that the promoter activity of Capn4 was enhanced by overexpression of OPN in a dose-dependent manner in HepG2 cells. Values represent  $\bar{x} \pm s$  ( $n = 3$ ).  $*P < 0.05$ , vs. HepG2 cells, by Student's  $t$  test. (b) RT-PCR showed that expression of Capn4 at mRNA level was upregulated by overexpression of OPN in a dose-dependent manner in HepG2 cells. GAPDH were used as internal controls. Results shown are representative of three independent experiments. (c) Western blot analysis revealed that expression of Capn4 at levels of protein was upregulated by overexpression of OPN in a dose-dependent manner in HepG2 cells.  $\beta$ -Actin were used as internal controls.

呈现剂量依赖性. 为了进一步验证上述结果, 在肝癌细胞 HepG2 中分别转染 20、50 和 100 nmol/L 靶向 OPN 的小干扰 RNA 抑制 OPN 的表达, 转染 48 h 后通过启动子报告基因、RT-PCR 和免疫印迹方法检测 Capn4 的启动子转录活性、mRNA 水平及其蛋白质表达情况. 结果显示, 在 HepG2 细胞中干扰 OPN 后与对照组相比, Capn4 的启动子的转录活性和 mRNA 及蛋白质表达水平发生显著下调(图 2), 并呈现剂量依赖性. 因此, 在肝癌细胞 HepG2 中 OPN 具有上调 Capn4 的作用.

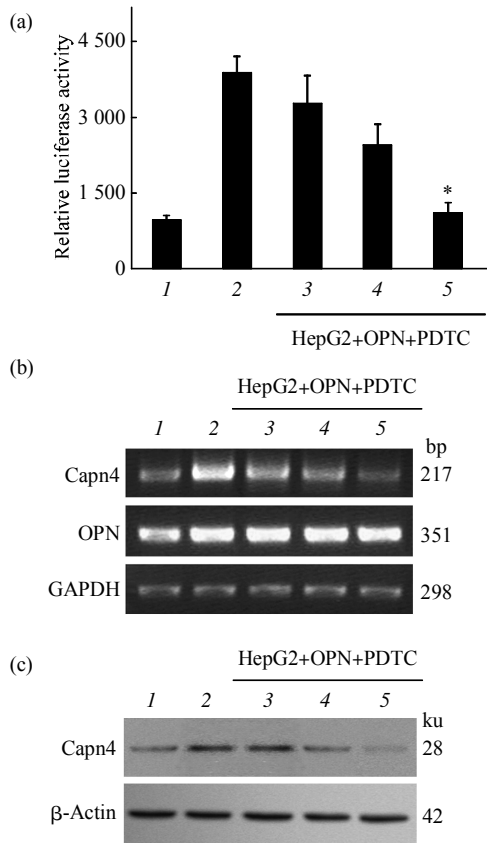


**Fig. 2 OPN RNAi resulted in downregulation of Capn4 in HepG2 cells**

(a) Reporter gene assay showed that the promoter activity of Capn4 was reduced after knockdown of OPN with indicated doses of siRNAs targeting OPN mRNA in HepG2 cells. Values represent  $\bar{x} \pm s$  ( $n = 3$ ).  $*P < 0.05$ , vs. HepG2 cells, by Student's  $t$  test. (b) RT-PCR showed that knockdown of OPN with indicated doses of siRNAs targeting OPN mRNA resulted in reduction of Capn4 mRNA expression in HepG2 cells. GAPDH were used as internal controls. Results shown are representative of three independent experiments. (c) Western blot analysis revealed that knockdown of OPN with indicated doses of siRNAs targeting OPN mRNA resulted in reduction of Capn4 protein expression in HepG2 cells.  $\beta$ -Actin were used as internal controls. 1: 20 nmol/L; 2: 50 nmol/L; 3: 100 nmol/L.

### 2.2 OPN 通过 NF-κB 上调 Capn4 的表达

在 HepG2 细胞中瞬时转染 0.3 μg OPN 的真核表达质粒 pCDNA3-OPN 过表达 OPN 后, 在转染的细胞中分别添加 20 μmol/L、50 μmol/L 和 100 μmol/L NF-κB 的抑制剂 PDTC. 24 h 后, 通过启动子报告基因、RT-PCR 和免疫印迹方法检测 Capn4 启动子活性、mRNA 水平及蛋白质表达情况. 结果显示, 在 HepG2 细胞中应用 NF-κB 的抑制剂 PDTC 作用后, 与对照组相比, 由过表达 OPN 导致的 Capn4 启动子转录活性、mRNA 水平及蛋白质水平表达的上调均受到明显抑制(图 3), 并呈现剂量依赖性. 此结果表明, 在肝癌细胞中 OPN 通过 NF-κB 上调 Capn4 的表达.

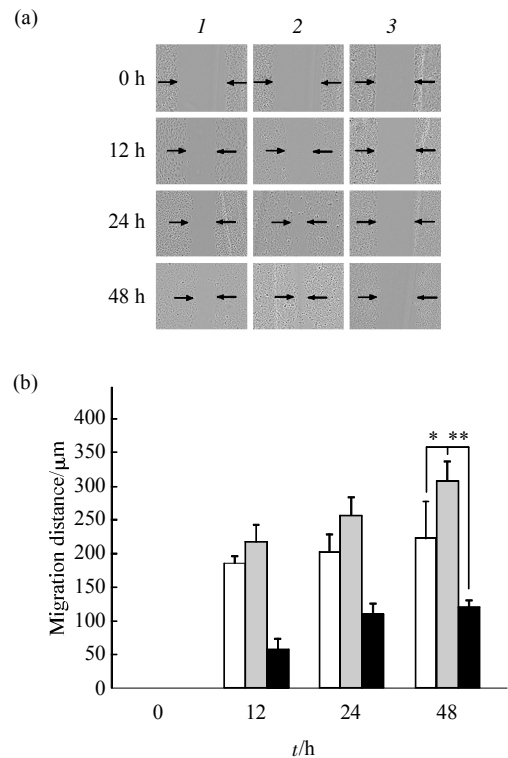


**Fig. 3 NF-κB was responsible for the upregulation of Capn4 mediated by OPN in HepG2 cells**

(a) Reporter gene assay showed that the promoter activity of Capn4 was suppressed by treatment with PDTC in a dose-dependent manner in HepG2 cells with overexpression of OPN. Values represent  $\bar{x} \pm s$  ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , vs. mock HepG2 cells, by Student's  $t$  test. (b) RT-PCR showed that the upregulation of Capn4 mRNA mediated by OPN was attenuated by treatment with PDTC as indicated doses in HepG2 cells. GAPDH were used as internal controls. Results shown are representative of three independent experiments. (c) Western blot analysis showed that the upregulation of Capn4 mediated by OPN was attenuated by treatment with PDTC in a dose-dependent manner in HepG2 cells. 1: HepG2; 2: HepG2+OPN; 3: 20 μmol/L; 4: 50 μmol/L; 5: 100 μmol/L.

### 2.3 OPN 通过上调 Capn4 促进 HepG2 细胞迁移

通过“伤口愈合”实验检测了 HepG2 细胞、HepG2 过表达 OPN 的细胞及 HepG2 过表达 OPN 后干扰 Capn4 的细胞迁移能力的变化. 结果显示, 在 HepG2 细胞中过表达 OPN 后细胞迁移能力显著增强, 而干扰 Capn4 后的 HepG2 细胞的迁移能力受到明显抑制(图 4). 此结果表明, 骨桥蛋白 OPN 通过上调肝癌细胞中 Capn4 的表达进而促进肝癌细胞的迁移.



**Fig. 4 OPN promoted the migration ability of HepG2 cells through upregulating Capn4**

(a) Wound healing assay showed that OPN was able to promote the migration of HepG2 cells. After 48 h transfection of HepG2 cells with pCDNA3-OPN or pCDNA3-OPN and siRNA targeting Capn4 mRNA, the migration ability was examined by wound healing assays. Images were taken from wound healing assays at 0, 12, 24 and 48 h in a phase-contrast microscope (100 ×). Black arrows indicate the wound edge closure of monolayer cells. Results shown are representative of three independent experiments. 1: HepG2; 2: HepG2+OPN; 3: HepG2+OPN+Si-Capn4. (b) The average migration distances of the wound edge in three independent experiments. Compared with HepG2 cells, HepG2 cells transfected with pCDNA3-OPN (HepG2+OPN) exhibited a much greater ability to repair the wound (\* $P < 0.05$  vs HepG2 cells, Student's  $t$  test). However, the greater migration ability could be suppressed by knockdown of Capn4 in a time dependent manner (\*\* $P < 0.01$  vs OPN-transfected HepG2 cells, Student's  $t$  test). □: HepG2; ▤: HepG2+OPN; ■: HepG2+OPN+Si-Capn4.

### 3 讨 论

骨桥蛋白 OPN 是一类分泌型、黏附型的酸性钙结合糖磷酸化蛋白, 属于小整合素结合配体 N 端联结糖蛋白家族 (small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins, SIBLING)<sup>[14]</sup>, 相对分子质量约为 44 ku, 其分子中含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 三肽序列, 通过与细胞膜表面受体  $\alpha V\beta 3$  整合素相互作用, 参与介导细胞的趋化、黏附和迁移. OPN 参与多种组织器官的生理病理过程, 研究发现, OPN 与肿瘤细胞生长、增殖、转移和浸润密切相关, 在多种肿瘤细胞及其转移组织中高表达<sup>[15]</sup>. OPN 通过调节与肿瘤发生、发展相关基因的表达, 促进细胞外基质的降解, 抑制机体对肿瘤的免疫作用, 促进肿瘤转移<sup>[16-17]</sup>. OPN 可以被凝血酶水解为两段, N 端片段磷酸化后可与整合素结合参与肿瘤扩散, C 端片段可以与黏附分子 CD44 结合, 参与免疫逃逸<sup>[18]</sup>. 文献报道, 骨桥蛋白参与调控多种信号途径, 如诱导活化 c-Src/EGFR/ERK 和 PI3-K/Akt/IKK 通路, 通过与  $\alpha V\beta 3$  整合素受体结合诱导 NF- $\kappa$ B 活化<sup>[19-20]</sup>, 进一步促进肿瘤转移相关基因如 MMP-2 的转录和表达, 并促进基质降解<sup>[21]</sup>, 导致细胞迁移, 阻止细胞凋亡. 钙蛋白酶 Calpain 可以将 p53、Bcl-2、Bcl-xl、Bid、Bax、caspase-3、caspase-7 和 caspase-12 等作为底物<sup>[22]</sup>, 促进细胞的迁移、增殖、凋亡和分化. 其小亚基 Capn4 与肿瘤转移密切相关, 通过与 RasGAP 及 SerinB2 相互作用促进细胞迁移<sup>[23-24]</sup>. 然而, 在促进肝癌细胞迁移中 OPN 与 Capn4 的关系尚不清楚.

本研究在肝癌细胞 HepG2 中过表达 OPN 后发现, Capn4 的启动子转录活性、mRNA 表达及蛋白质表达水平发生显著上调, 提示肝癌细胞中 OPN 对 Capn4 具有调节作用. 进而, 在肝癌细胞 HepG2 中转染 OPN siRNA, 干扰 OPN 的表达, 发现 Capn4 的启动子转录活性、mRNA 表达及蛋白质表达水平均发生显著下调. 因此, 肝癌细胞 HepG2 中 OPN 具有上调 Capn4 的作用. 如前所述, OPN 可以通过激活 NF- $\kappa$ B 途径促进转移相关基因的表达, 导致细胞迁移. 因此, 我们推测在肝癌细胞中 OPN 可能通过 NF- $\kappa$ B 途径调节 Capn4 的表达. 为了证实这个假设, 我们在过表达 OPN 的 HepG2 细胞中应用 NF- $\kappa$ B 的抑制剂 PDTC 阻断 NF- $\kappa$ B 途径后, 发现 Capn4 的表达受到明显抑制,

提示肝癌细胞中 OPN 可通过 NF- $\kappa$ B 途径上调 Capn4 的表达. 随后, 应用“伤口愈合”实验进一步研究显示, 肝癌细胞 HepG2 中过表达 OPN 后与对照组 HepG2 细胞相比, 其细胞迁移能力明显增强, 而在过表达 OPN 的 HepG2 细胞中应用 siRNA 干扰 Capn4 后细胞的迁移能力受到明显抑制. 因此, 本结果表明 OPN 可通过上调 Capn4 促进肝癌细胞迁移. 原发性肝癌的发生发展涉及多基因、多分子水平的改变, 这一发现进一步丰富了肝癌细胞迁移的分子机制, 对研究肝癌转移及转移的治疗具有重要的意义.

### 参 考 文 献

- [1] Beckebaum S, Chen X, Sotiropoulos G C, *et al.* Role of osteopontin and CD44s expression for patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation or resection. *Transplant Proc*, 2008, **40**(9): 3182-3184
- [2] Bai D S, Dai Z, Zhou J, *et al.* Capn4 overexpression underlies tumor invasion and metastasis after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, **49**(2): 460-470
- [3] Senger D R, Wirth D F, Hynes R O. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*, 1979, **16**(4): 885-893
- [4] Wai P Y, Kuo P C. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, **27**(1): 103-118
- [5] Wang K X, Denhardt D T. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, **19**(5-6): 333-345
- [6] Rittling S R, Chambers A F. Role of osteopontin in tumor progression. *Br J Cancer*, 2004, **90**(10): 1877-1881
- [7] Rudland P S, Platt-Higgins A, El-Tanani M, *et al.* Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res*, 2002, **62**(12): 34172-3427
- [8] 杨力, 张东涛, 郭新宁. 骨桥蛋白和核因子- $\kappa$ B 在侵袭转移性胃癌中的表达. *中国肿瘤临床*, 2004, **31**(16): 901-904  
Yang L, Zhang D T, Guo X N. *Chin J Clin Oncol*, 2004, **31**(16): 901-904
- [9] Pan H W, Ou Y H, Peng S Y, *et al.* Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2003, **98**(1): 119-127
- [10] Dourdin N, Bhatt A K, Dutt P, *et al.* Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 2001, **276**(51): 48382-48388
- [11] Mellgren R L, Zhang W, Miyake K, *et al.* Calpain is required for the rapid, calcium-dependent repair of wounded plasma membrane. *J Biol Chem*, 2007, **282**(4): 2567-2575
- [12] Philip S, Bulbule A, Kundu G C. Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B mediated induction of membrane type 1

- matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem*, 2001, **276**(48): 449262-44935
- [13] Asangani I A, Rasheed S A, Leupold J H, *et al.* NRF-1, and AP-1 regulate the promoter of the human calpain small subunit 1 (CAPNS1) gene. *Gene*, 2008, **410**(1): 197-206
- [14] Bellahcene A, Castronovo V, Ogbureke K U, *et al.* Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, **8**(3): 212-226
- [15] El-Tanani M K, Campbell F C, Kurisetty V, *et al.* The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, **17**(6): 463-474
- [16] Rittling S R, Chambers A F. Role of osteopontin in tumor progression. *Br J Cancer*, 2004, **90**(10): 1877-1881
- [17] Wise G E, King G J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res*, 2008, **87**(5): 414-434
- [18] Ramaiah S K, Rittling S. Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity and cancer. *Toxicol Sci*, 2008, **103**(1): 4-13
- [19] Wai P Y, Kuo P C. The role of osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res*, 2004, **121**(2): 228-241
- [20] Wang D, You Y, Lin P C, *et al.* Bcl10 plays a critical role in NF-kappaB activation induced by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(1): 145-150
- [21] Mi Z, Guo H, WAI P Y, *et al.* Integrin linked kinase regulates osteopontin-dependent MMP-2 and uPA expression to convey metastatic function in murine mammary epithelial cancer cells. *Carcinogenesis*, 2006, **27**(6): 1134-1145
- [22] Goll D E, Thompson V F, Li H, *et al.* The Calpain system. *Physiol Rev*, 2003, **83**(3): 731-801
- [23] Pamonsinlapatham P, Gril B, Dufour S, *et al.* Capns1, a new binding partner of RasGAP-SH3 domain in K-RasV12 oncogenic cells: Modulation of cell survival and migration. *Cellular Signalling*, 2008, **20**(11): 2119-2126
- [24] Tonnetti L, Netzel-Arnett S, Darnell G A, *et al.* SerpinB2 protection of retinoblastoma protein from calpain enhances tumor cell survival. *Cancer Res*, 2008, **68**(14): 5648-5657

## Osteopontin(OPN) Upregulates Calpain Small Subunit 1(Capn4) via Nuclear Factor- $\kappa$ B in Promotion of Hepatoma Cell Migration\*

ZHANG Xuan, YE Li-Hong\*\*, ZHANG Xiao-Dong\*\*

(College of Life Sciences, Key Laboratory of Ministry of Education for Bioactive Materials, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract** Osteopontin (OPN) is able to enhance migration of tumor cells through activation of metastasis-related genes involving many signal pathways. Calpain small subunit 1 (Capn4) plays important roles in tumor metastasis. The mechanism of migration of hepatoma cells mediated by OPN was investigated by reporter gene assay, RT-PCR, Western blot analysis and wound healing assay. It was found that OPN was able to upregulate the expression of Capn4 at the levels of promoter activity, mRNA and protein in human hepatoma HepG2 cells. The treatment with PDTC (an inhibitor of NF- $\kappa$ B) could abolish the upregulation of Capn4 mediated by OPN. Moreover, wound healing assay showed that OPN was able to promote the migration ability of hepatoma cells through upregulating Capn4. Thus, It was concluded that OPN is able to upregulate Capn4 through NF- $\kappa$ B in promotion of migration of hepatoma cells.

**Key words** osteopontin (OPN), calpain small subunit 1 (Capn4), NF- $\kappa$ B, hepatocellular carcinoma, migration

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00665

\*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China(2009CB521702) and The National Natural Science Foundation of China (30670959).

\*\*Corresponding author.

ZHANG Xiao-Dong. Tel: 86-22-23506830, E-mail: zhangxd@nankai.edu.cn

YE Li-Hong. Tel: 86-22-23501385, E-mail: yelihong@nankai.edu.cn

Received: November 8, 2009 Accepted: January 19, 2010