

钙调蛋白结合蛋白及其磷酸化对癌细胞迁移能力的影响研究*

江奇峰^{1, 2)} 蔡绍哲^{1)**} 晏小清¹⁾

(¹⁾ “生物流变科学与技术”教育部重点实验室(重庆大学), 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044;

²⁾ Boston Biomedical Research Institute, Boston 02472, USA)

摘要 轻链钙调蛋白结合蛋白 (light-chain caldesmon, l-CaD) 是一种肌动蛋白结合蛋白, 它通过与肌动蛋白结合而稳定胞内微丝结构, 在磷酸化作用下则能从微丝上脱离。在众多非转移性癌细胞以及永生化的正常细胞系中, l-CaD 的表达量很低甚至没有, 但在高迁移活性的转移性癌细胞中, l-CaD 表达量显著上升, 因此 l-CaD 可能是维持转移性癌细胞高迁移能力的重要因素。为了探索 l-CaD 如何调节转移性癌细胞迁移活性及其所处地位, 以人源转移性乳腺癌细胞 MDA MB-231 为载体, 一方面, 在胞内高表达外源野生型 l-CaD 及其磷酸化突变株, 干扰胞内 l-CaD 的磷酸化进程, 从而考察 l-CaD 磷酸化对细胞迁移的调节, 另一方面, 利用 siRNA 技术, 抑制 l-CaD 在 MDA MB-231 细胞内的表达量, 检测 l-CaD 对转移性癌细胞迁移活性的总体影响。通过细胞骨架荧光染色、细胞迁移小室、单细胞层次上的牵张力测定以及细胞基底脱黏附能力测定, 结果显示: a. 阻断 MDA MB-231 胞内 l-CaD 的磷酸化进程将显著抑制细胞的迁移能力, 细胞骨架调整受阻, 基底牵张力增加, 细胞基底脱附能力下降; b. l-CaD 表达抑制的 MDA MB-231 细胞失去了完整的细胞骨架, 其迁移能力显著降低并与非转移性癌细胞 MCF-7 类似, 而细胞骨架解聚导致 MDA MB-231 细胞基底牵张力显著减少, 更容易从基底脱附。总的来说, l-CaD 磷酸化是调节转移性癌细胞高迁移活性的重要分子开关, l-CaD 的高表达与高效磷酸化循环是维持转移性癌细胞高迁移活性的关键因素。探索了 l-CaD 调节转移性癌细胞迁移活性的机制, 也为认识转移性癌细胞的本质提供了新的思路。

关键词 l-钙调蛋白结合蛋白 (l-CaD), 细胞骨架, 转移性癌细胞, 细胞迁移, 细胞基底牵张力, siRNA

学科分类号 Q245, Q319

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00545

无序生长和高迁移能力是转移性癌细胞的重要特征, 而这两个过程都涉及到细胞肌动蛋白骨架的解聚与重排。在细胞内外信号的调控下, 细胞骨架通过肌动蛋白有序的重排, 保持或改变细胞形状。很多研究已经证明肌动蛋白的聚合和解聚在许多细胞生理活动的控制中起关键作用, 包括: 细胞分裂、迁移、内吞和外排作用、凋亡和炎症、囊泡运输和基因表达^[1-2]。为数众多的肌动蛋白以及肌动蛋白结合蛋白 (actin binding protein, ABPs) 在细胞骨架的构建和重排起重要作用。钙调蛋白结合蛋白 (caldesmon, CaD) 是一种存在于几乎所有脊椎动物细胞中的肌动蛋白结合蛋白^[3-5]。CaD 由同一基因通过选择剪接产生两种亚型^[6]: 平滑肌型 (h-caldesmon, h-CaD) 和普遍存在的非肌型轻链 CaD (l-caldesmon, l-CaD)^[7]。一般认为 h-CaD 是平滑肌细胞中收缩结构的完整组件, l-CaD 是细胞骨架单

位^[3-5]。

l-CaD 以一个类似于订书针结构的方式与肌动蛋白结合, 一方面能够稳定胞内应力纤维^[8-10], 另一方面通过与肌动蛋白结合, l-CaD 能够抑制肌球蛋白与肌动蛋白的结合, 从而抑制细胞骨架的调整。通过与钙调蛋白 (calmodulin) 结合或者在磷酸化作用下, l-CaD 能够从肌动蛋白上解离下来并恢复肌球蛋白与肌动蛋白的结合。已有研究证明, 磷酸化的 l-CaD 能够定向富集到细胞骨架解聚与重排非常活跃的细胞前缘^[11], 因此, l-CaD 极有可能在其他一些细胞进程, 诸如细胞迁移、细胞膜边缘

* 国家自然科学基金资助项目 (10872224) 和 “111” 项目计划资助。

** 通讯联系人。

Tel: 023-65112097, E-mail: sxcai@cqu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-16, 接受日期: 2009-11-20

波动以及细胞黏附等中起作用。更有研究指出 l-CaD 能够抑制 Arp2/3 的装配^[12-13]并参与细胞周期进程的调控^[14]等。已有研究证明在增殖中细胞^[15-16]、迁移中细胞^[17]以及铺展中细胞^[18], l-CaD 的磷酸化水平在碳端肌动蛋白结合区域的 MAPK 位点明显提高。如果在全部 7 个可能的 cdc2 磷酸化位点通过定点突变, 从而完全阻止 l-CaD 在 MAPK 位点上的磷酸化则导致细胞周期进程的延迟^[19-20]。与之相对, 共转染 cdc2 与野生型的 CaD 则可以显著增强肿瘤细胞的迁移^[21-23]。在细胞周期的交替进程中, l-CaD 的磷酸化水平是呈动态变化的, 并且与应力纤维的变化相对^[18]。在应力纤维的解聚中, 绝大部分 l-CaD 以磷酸化的形式出现在细胞前缘; 应力纤维相对完整时, 绝大部分的 l-CaD 以非磷酸化的形式出现。这些结果都显示, l-CaD 的磷酸化水平与细胞分裂及分裂后伸展过程中细胞形状变化息息相关。除 MAPK 之外, l-CaD 的磷酸化还可以发生在碳端肌动蛋白结合区域的 PAK 位点上^[24]。如果 PAK 位点上的氨基被定点突变成 Ala 或者 Glu, l-CaD 则富集在应力纤维或细胞前缘上^[25], 这表明 PAK 介导的磷酸化在细胞收缩和细胞迁移中都起作用^[26]。Morita 等^[27]证明, ERK 和 PAK 位点介导的 l-CaD 磷酸化能够显著降低 l-CaD 对细胞伪足形成的抑制作用。作为 ERK 和 PAK 磷酸化位点的共有下游底物, Boerner 等亦证明多种细胞信号能够通过 l-CaD 调节细胞的各种生理行为^[21-22, 28]。进一步, 在众多非转移性细胞以及永生化的正常细胞系中, l-CaD 的表达量很低甚至没有, 但在高迁移活性的转移性癌细胞中, l-CaD 表达量显著上升, 因此可以认为 l-CaD 可能是维持转移性癌细胞高迁移能力的重要因素。

本研究中, 我们通过 siRNA 抑制细胞内 l-CaD 表达量和基因转染高表达外源 l-CaD 的方法, 结合细胞基底牵张力以及迁移能力的测定, 进一步显示, l-CaD 的高表达与高效的磷酸化循环是维持其转移性癌细胞高迁移活性表型的关键因素, 两者缺一不可。我们的研究不仅揭示了 l-CaD 调节癌细胞迁移的机理, 而且为进一步认识转移性癌细胞本质提供了新的思路。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人源性转移性乳腺癌细胞 MDA MB-231 (ATCC#HTB-26TM) 和非转移性癌细胞 MCF-7

(ATCC#HTB-22TM) 用添加了 10% 胎牛血清和 1% 抗生素的 DMEM 培养基 (CellgroTM) 培养; 人源性上皮细胞 (HMEC) 用添加了 10 μ g/L 人源性上皮生长因子 (hEGF, CellgroTM)、10 mg/L 胰岛素、5% 胎牛血清和 1% 抗生素的 DMEM-F12 基础培养基 (CellgroTM) 培养。所有细胞均在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养。

1.2 质粒

人源性成纤维细胞 l-CaD (GenBank#M64110) 的 pCB6hx 质粒获赠于 Jim Lin 博士 (University of Iowa, Iowa City, IA)。通过 *Nco* I 酶切的方法将含有 l-CaD DNA 的片段从质粒上酶切下来, 经过 T4DNA 聚合酶平整末端后, 用 *Bam*H I 处理获得一平端一黏端的 *Bam*H I CaD 插入片段。将得到的片段插入到哺乳动物表达载体 pEGFP-C1 (Clontech) BspEI (预先用 T4DNA 聚合酶平整末端) 和 *Bam*H I 多克隆位点之间获得野生型 l-CaD (EGFP-wtCaD), 并通过测序确认 EGFP 开放阅读框和终止密码子的正确性。通过定点突变的方式^[28], 突变 ERK 与 PAK 位点的氨基, 获得了 PAK 和 ERK 磷酸化位点完全被封闭的不可磷酸化 l-CaD 突变株 (EGFP-A1234, PAK 和 ERK 位点都更换为 Ala) 和模拟 PAK 和 ERK 位点完全磷酸化的突变株 (EGFP-D1234, PAK 和 ERK 位点都更换为 Asp), 并以不含 l-CaD 序列的 EGFP 空质粒载体作为对照组。

1.3 Western blot 检测细胞中 l-CaD 的表达

通过 Western blot 检测细胞中内外源性总 l-CaD 以及磷酸化 l-CaD 表达量。将细胞以 10⁵ 个 / 孔的密度种在 6 孔板 (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ) 中, 孵育 24 h。移除培养基, 用冰冷的 PBS 冲洗细胞 2 次。向每孔加入 150 ml 裂解液制备总蛋白, 裂解液中含有 1 mmol/L 苯甲磺酰氟 (Sigma 公司), 10 g/L 亮氨酸 (Sigma 公司), 30 g/L 胰蛋白酶抑制剂 (Sigma 公司), 1 mmol/L NaVO₃ (Sigma 公司)。培养板在冰上孵育 30 min 后, 刮净。总细胞提取物都通过 SDS-PAGE 分离, 并用亲和纯化的多克隆抗体 anti-CaD、anti-pCaD-Ser789 和 anti- β -actin 单克隆抗体 (Sigma 公司) 进行免疫标记, 再用亲和纯化的分别连接有 IRDyeTM 700 和 800 抗兔和抗鼠的荧光二抗标记。用 Odyssey 红外图像系统 (Li-COR, Biosciences, Lincoln, NE) 检测, 可以直接定量表征红外荧光, 并计算各对 (anti-CaD/anti- β -actin, anti-pCaD/anti- β -actin) 比值。

1.4 细胞转染

MDA MB-231 细胞以 2 $\times$ 10⁵ 的密度种在 6 孔板

内。孵育 18 h 后, 用无血清 DMEM 培养基饥饿细胞 2 h。在 93 μ l 无血清 DMEM 培养基中先后加入 2 μ g 质粒 DNA 以及 5 μ l FUGENE 转染试剂(Roche 公司), 室温孵育 20 min 后加入含有 800 μ l 无血清 DMEM 培养基的细胞培养板中。孵育 5 h 用完全培养基换液。48 h 后通过 Western blot 检测蛋白质表达量。

1.5 siRNA 抑制 Caldesmon 表达

MDA MB-231 细胞以 5×10^4 / 孔的密度种在 6 孔板内, 孵育过夜。使用包装有 siRNA 的慢病毒(Sigma 公司)载体感染细胞, 孵育 24 h 后用完全培养基换液。siRNA 的序列为: Human-CaD CAGA-TAGGTATCAATATGTTT(Sigma 公司)。对照组为用包装了乱序 siRNA 的慢病毒所感染的 MDA MB-231 细胞。孵育 5 天后通过 Western blot 检测蛋白质抑制效率。

1.6 细胞骨架的激光共聚焦检测

细胞种植于预先表衬了人纤连蛋白的玻璃盖玻片上(Becton Dickinson), 孵育 24 h 直至细胞完全铺展。PBS 洗涤细胞 2 次, 4%多聚甲醛(PFA)固定 15 min, 0.3% Triton X-100 透膜 5 min。F-actin 用 rhodamine phalloidin(1:75) 染色并孵育 1 h, 所有溶液均为 PBS 制备。PBS 清洗 3 $\times$ 5 min 并 Mowiol(Sigma 公司)封片。所有图像均通过 Nikon Eclipse TE300 显微镜的 BioRad Radiance 2000 激光共聚焦系统获得并通过 Laser Sharp 2000 BioRad 软件处理。

1.7 细胞迁移测定

通过带有 8 μ m 孔径滤膜的 Transwell 24 孔板(Becton Dickinson)进行细胞迁移实验。滤膜的内壁和外壁都用 5 mg/L 的人纤连蛋白(R&D, Minneapolis)在 37 $^{\circ}$ C 表衬 2 h, PBS 清洗。200 μ l 的细胞悬液以 2×10^4 个 / 孔的密度种在 Transwell 的内腔。外腔加入 800 μ l 含有 10% FBS 的完全培养基。37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后, 选取 9 个随机视野, 计数迁移细胞数。转染后的细胞, 用 ZEISS-AXIO 荧光显微镜分别在相差视野和荧光视野下计数总的迁移细胞数和转染了绿色荧光的迁移细胞数。具有绿色荧光的迁移细胞数与总的具有绿色荧光的细胞数之间的比率则作为转染细胞的相对迁移能力。

1.8 细胞基底牵张力测定 (Fourier-Transform Traction Microscopy, FTTM)

细胞种植于胶原蛋白表衬并均匀包埋了 0.2 μ m 红色荧光微珠的聚丙烯酰胺凝胶基底表面, 凝胶硬

度设计为 1 kb。完全铺展的细胞由于细胞骨架产生的牵张力将使凝胶产生一定程度的形变, 该形变可以通过凝胶内部包埋的微珠在细胞胰酶消化前后的位置变化表征。凝胶形变的大小则可通过 Fourier-Transform 转化为细胞施加在凝胶表面的牵张力。

1.8.1 聚丙烯酰胺凝胶的制备。聚丙烯酰胺凝胶基底的制备主要根据前人的方法^[29-30]。除有特殊说明之外的所有化学试剂均购自 Sigma Aldrich(St. Louis)。具体步骤概括为: a. 滴几滴 0.1 mol/L NaOH 到 35 mm 玻璃底培养皿(MatTek)的中间, 过夜风干; b. 滴 2~3 滴 97% 3-aminopropyltrimethoxysilane 加在步骤 a 中 NaOH 沾染的区域。将培养皿洗好, 风干, 在沾染区加入 0.5%戊二醛, 然后将培养皿清洗并过夜风干。c. 20 μ l 超纯水, 含有 0.03%双丙烯酰胺、5%丙烯酰胺(Bio-Rad 公司)、0.6%直径 0.2 μ m 的红色荧光微珠 (Invitrogen 公司)、0.5%过硫酸铵以及 0.05% TEMED (Bio-Rad 公司)加在培养皿中央。随后用 25 mm 盖玻片盖住 (Fisher Scientific)直至聚合。移去盖玻片。加入 200 μ l 溶液(1 mmol/L sulfosuccinimidyl-6-[4-azido-2-nitrophenylamino] hexanoate (Sulfo-SANPAH; Pierce) 溶解在 200 mmol/L HEPE 溶剂中)进行表面活化。紫外线照射 5 min, 0.1 mol/L HEPES 溶液清洗 2 $\times$ 15 min, 用 PBS 清洗 1 $\times$ 15 min, 用 200 μ l I 型胶原溶液(0.1 g/L; Inamed Biomaterials)表衬, 4 $^{\circ}$ C 过夜。隔天, PBS 洗涤并用 2 ml 无血清培养基水合, 并于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的孵箱中储存至使用。

1.8.2 细胞基底牵张力的测定。细胞以 10^4 个 / 孔的密度种在制备好的聚丙烯酰胺凝胶上。孵育 24 h 后, 无血清 DMEM 培养基饥饿细胞过夜。荧光显微镜下, 找到单个绿色荧光细胞, 然后分别在相差显微镜和荧光显微镜下对细胞和细胞下微珠拍照。胰酶消化细胞后, 获取另一张细胞在同一位置的微珠荧光照片。通过这 3 张照片, 利用 Matlab 来确定细胞基底下微珠的位移^[31]。细胞的区域通过软件描绘实验开始时获得的相差图片中细胞轮廓的方法来计算。应用 Butler 等^[32]的方法计算细胞牵张区域内凝胶基底的形变和位移。基于 Fourier-Transform, 由基底的位移量可计算由于细胞骨架铺展、收缩而施加在基底上的牵张力(PJ 表示)。

1.9 基于胰酶消化的细胞基底脱离测定

MDA MB-231 细胞以 2×10^5 个 / 孔密度种植于 6 孔板中, 孵育 48 h。用 PBS 洗涤培养皿 2 次后, 加入标准 0.25%胰酶 / EDTA 溶液(CellgroTM)。在

Nikon Eclipse TE300 荧光显微镜荧光光路下用 100×观测转染细胞；在相差显微镜下用 100×观测基因沉默的细胞，计数细胞脱离基底的速度和比率。

1.10 统计分析

实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示，作组间 *t* 检验

2 结 果

2.1 I-CaD 在 MDA MB-231、MCF-7 以及 HMEC 中的表达

为了确定 I-CaD 的表达量及其磷酸化水平与细胞表型的关系，通过 Western blot 检测了转移性癌细胞 MDA MB-231、非转移性癌细胞 MCF-7 以及正常上皮细胞 HMEC 中内源性总 I-CaD、磷酸化 I-CaD 的表达。结果显示，内源性 I-CaD 在 MDA MB-231 细胞中表达量较高，其表达水平与 HMEC 细胞相当，而 MCF-7 的 I-CaD 表达量显著低于 MDA MB-231 细胞(图 1a)。除此之外，MDA MB-231 细胞内源性 I-CaD 磷酸化水平显著高于 HMEC 细胞(图 1b)。结果显示，I-CaD 在转移性癌细胞中的高表达以及显著高于正常细胞的磷酸化水平，可能是转移性癌细胞高侵袭表象的一个重要因素。

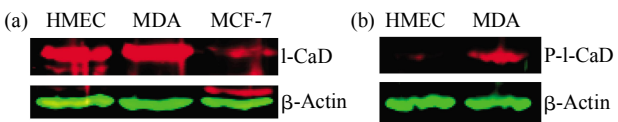


Fig. 1 Western blot analysis of endogenous I-CaD expression and phosphorylation level in MCF-7, MDA MB-231 and HMEC cells

Immunoblot of cell extracts against anti-CaD (red), anti-phospho-CaD (at ERK-site; red) and anti-β-actin (green) antibodies. (a) Both HMEC and MDAMB-231 cells exhibited high level of CaD expression, but there was very little CaD expression in MCF-7 cells. (b) The phosphorylated CaD level was much higher in MDAMB-231 cells than that in HMEC and MCF-7 cells which indicated that the I-CaD may have much higher regulation in MDAMB-231 cells.

2.2 I-CaD 的磷酸化是转移性癌细胞迁移活性的重要调节因素

为了阐明 I-CaD 磷酸化在 MDA MB-231 迁移活性中的调控作用，通过在 MDA MB-231 细胞中高表达外源 I-CaD 及其磷酸化突变株的方式来扰动 MDA MB-231 胞内 I-CaD 磷酸化水平，并检测 I-CaD 磷酸化对细胞迁移活性的潜在影响。使用的

外源 I-CaD 基因包括野生型 I-CaD (EGFP-wtCaD)、不可磷酸化 CaD 突变株(EGFP-A1234CaD)、磷酸化 CaD 突变株(EGFP-D1234CaD)以及空质粒载体 (EGFP)。Western blot 结果显示，外源 I-CaD 在 MDA MB-231 细胞中获得了显著高表达且明显高于内源蛋白表达量，经过荧光定量分析，外源蛋白的表达量均约为内源蛋白的 5 倍，因此可以认为外源高表达 I-CaD 在胞内占主导作用，内源 I-CaD 对其拮抗作用可基本忽略(图 2)。

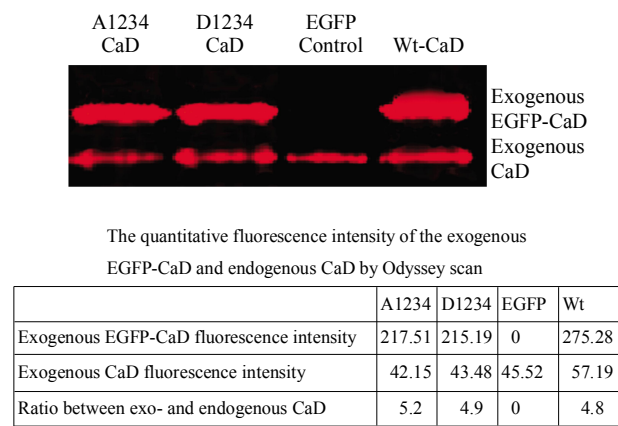


Fig. 2 Western blot analysis of EGFP-tagged I-CaD variants and endogenous I-CaD expressed in MDA MB-231 human breast cancer cells

The total extracts from cells transfected with various constructs were immunoblotted with polyclonal anti-CaD antibodies. The samples are, respectively, cells transfected with A1234, D1234, EGFP, and wtCaD. The corresponding ratios of the digitized intensity of the EGFP-A1234, -D1234, EGFP alone, and EGFP-wtCaD (the upper bands) to the endogenous CaD (the lower bands) are respectively, 5.2, 4.9, 0 and 4.8 for MDAMB-231 cells.

通过 rhodamine-phalloidin 荧光染色，检测了高表达外源性 EGFP、wtCaD、A1234 以及 D1234 的 MDA MB-231 细胞的细胞骨架。激光共聚焦结果显示，绝大部分 A1234 质粒转染的细胞显示了最为明显的应力纤维结构，并且外源性 I-CaD 与细胞骨架有着明显重叠(图 3a)，转染了 wtCaD 的细胞也显示出强于对照组细胞的应力纤维，外源性 I-CaD 与细胞骨架的重叠也非常明显(图 3d)，与之相对的是，转染了 D1234 的细胞(图 3b)表现出显著弱于 A1234 以及 wtCaD 转染细胞的细胞骨架，其应力纤维结构与对照组细胞(图 3c)类似，但外源性 D1234 与细胞骨架也有一定程度上的重叠。

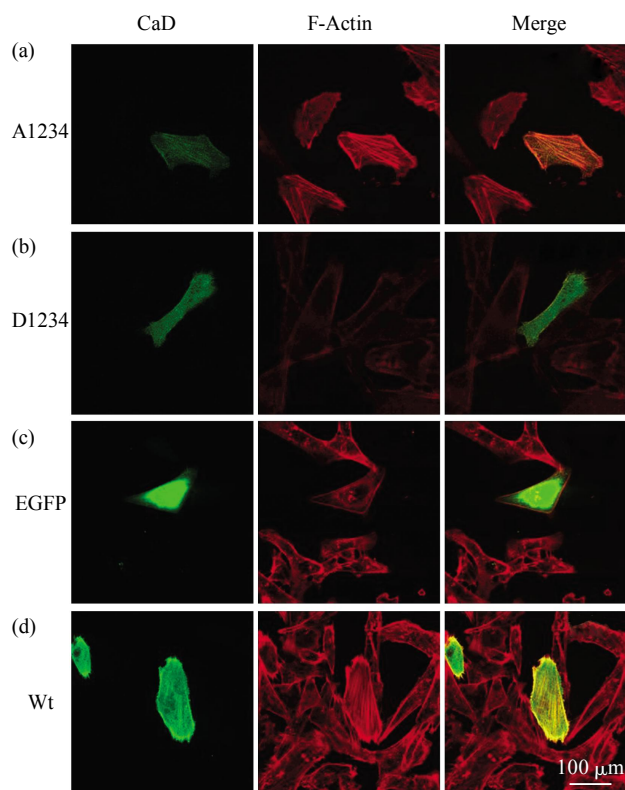


Fig. 3 Fluorescence images of cytoskeleton in 1-CaD and its mutant transfected MDA MB-231 cells by confocal

All CaD constructs were EGFP-tagged (left panels); actin was stained with red (middle panels); Merged images are shown on the right panels. Cells were transfected with EGFP control (EGFP (c)), EGFP-wtCaD (wild-type CaD(d)) and CaD mutant, including EGFP-A1234 (A1234(a)) and EGFP-D1234 (D1234(b)). A1234 transfected cells had most robust cytoskeleton structure, the wtCaD transfected cells also had more robust structure than D1234 and control cells (EGFP). The D1234 transfected cells exhibited similar cytoskeleton structure to the control cells.

更进一步，基于趋化实验的原理，使用了 $8\ \mu\text{m}$ 孔径的 transwell 进行细胞迁移实验，通过迁移过膜的绿色荧光细胞数(图 4a)与总的绿色荧光细胞数之间的比率表征转染细胞的相对迁移能力。实验结果显示，在所有的转染细胞中，A1234 转染细胞的迁移能力受到了最大程度的抑制，其相对迁移率(0.074 ± 0.018)只有对照组 EGFP 转染细胞的 25% (图 4b)。转染 wtCaD 同样抑制了细胞的迁移能力，其相对迁移率(0.19 ± 0.01)约为对照组细胞的 60%。D1234 对细胞迁移的抑制作用与 wtCaD 相近，相对迁移率(0.18 ± 0.06)约为对照组细胞的 60%。很明显，1-CaD 磷酸化是细胞迁移行为的重要调节

手段，完全阻断 1-CaD 磷酸化进程将显著抑制细胞迁移。

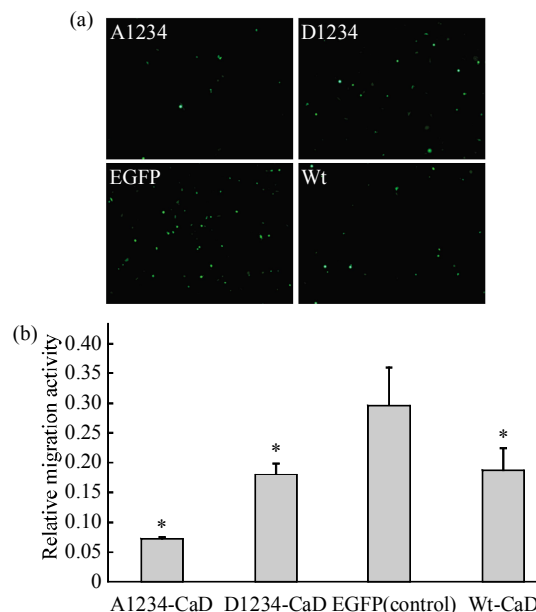


Fig. 4 Results of transwell migration assays on 1-CaD and its mutant transfected MDA MB-231 cells

(a) The images of migrated cells under fluorescence microscope. The green spots represent the transfected cells that migrated through the membrane. (b) The migration ratio for the A1234 transfected cells was about 25% of the control cells (EGFP), and the ratio of wt-CaD was about 60% of the control cells. D1234 mutant have similar inhibitory effect on the mobility of MDAMB-231 cells to wt-CaD which about 60% of the control cells. * $P < 0.05$.

细胞对基底的牵张力是影响细胞迁移的关键因素之一。为了分解 1-CaD 磷酸化水平对整个细胞迁移行为的影响，我们使用 Fourier-Transform Traction Microscopy 在单细胞水平上，对 1-CaD 及其突变株对细胞基底牵张力的影响进行了检测。转染了 EGFP、wtCaD、A1234、D1234 的细胞种植于均匀包埋了红色荧光微珠的聚丙烯酰胺凝胶基底表面(图 5)。

通过相差显微镜及荧光显微镜，获取胰酶消化前后的细胞以及细胞下荧光微珠的照片(图 5a-A)，经计算机分析，获得细胞下荧光微珠的位移大小和方向(图 5a-B, C)，通过 Fourier-Transform 将荧光微珠的位移转换为细胞对基底的平均牵张力。结果显示：迁移受到最大抑制(参照图 3)的 A1234 转染细胞表现出了最大的牵张力(3.37 ± 0.90)(图 4b)，约为对照组细胞牵张力(0.28 ± 0.09)的 10 倍；与对照

组细胞相比, wtCaD 转染细胞的牵张力(1.56 ± 0.30)也显著升高, 约为对照组细胞的 5 倍; 相对而言, D1234 转染细胞的牵张力(0.65 ± 0.27)也有部分增加, 仅约为对照组细胞的 2 倍. 数据显示, 1-CaD 磷酸化突变株对细胞基底牵张力有显著影响且与其对细胞迁移的影响相对.

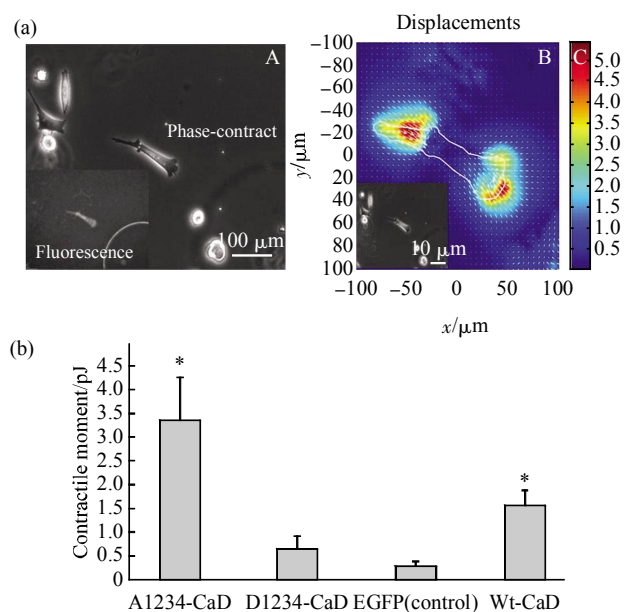


Fig. 5 Fourier transform traction microscopy measurements and the images of a representative MDA MB-231 cell gathered in the measurement process

(a) Fourier transform traction microscopy measurements and the images of a representative MDAMB-231 cell gathered in the measurement process. A: The single green cell was first identified under fluorescence channel (lower left) and then recorded the both fluorescence and phase-contrast images. B, C: The computed traction field based on the micropatterned beads. The magnitude and the direction of the vectors indicate the beads movement which was used to compute the contractile moment. (b) Results of traction force measurements of MDAMB-231 cells transfected with wt-CaD and phosphomimetic mutants of 1-CaD ($n = 20$). $*P < 0.05$.

细胞迁移过程中另一个关键步骤就是细胞从基底脱附. 在胰酶作用下, 细胞内部肌动蛋白束从黏附斑位置迅速脱离、解聚, 从而导致细胞变圆并从基底上脱附. 根据这样的原理, 我们通过胰酶刺激, 对 EGFP、wtCaD、A1234 以及 D1234 转染后的细胞在从基底上脱附下来的动力学过程进行了比较. 结果显示, 与对照组细胞相比, wtCaD 转染细胞表现出对胰酶处理的延迟型应答, A1234 转染的细胞其变圆速率更加缓慢, D1234 对细胞在胰酶刺激下的应答影响不大, D1234 转染细胞表现出与对照组细胞相近的变圆速率(图 6).

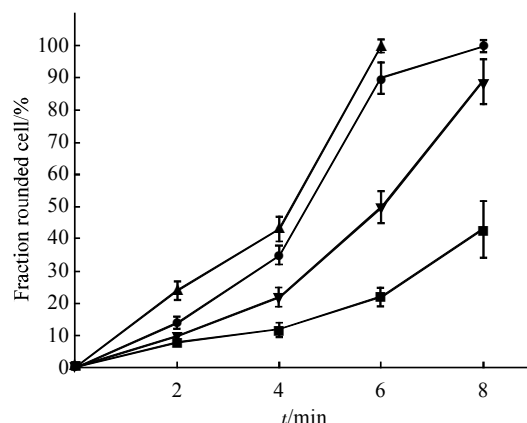


Fig. 6 Detachment of 1-CaD and its mutant transfected MDA MB-231 cells upon trypsinization

MDA-MB231 cells were infected by lentivirus which were packed with 1-CaD siRNA and scribbled siRNA (control). Total cell extracts were Immunoblotted against anti-CaD(red) and anti- β -actin(green) antibodies. ■: A1234; ●: D1234; ▲: EGFP; ▼: Wt.

2.3 1-CaD 是维持转移性癌细胞高迁移活性表型的关键因素

为了进一步检验 1-CaD 对转移性癌细胞高迁移能力的整体影响, 我们通过 siRNA 方式干扰 MDA MB-231 中 1-CaD 的表达量, Western-blot 的结果显示, 与包装了乱序 siRNA 的慢病毒感染的对照组细胞相比, 1-CaD 基因沉默的 MDA MB-231 细胞内源性 1-CaD 表达量显著下降(图 7).

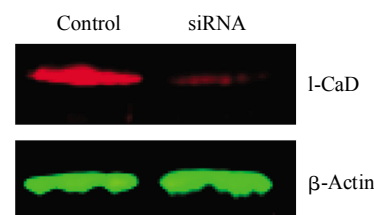


Fig. 7 Western blot analysis of endogenous 1-CaD expression in CaD knock-down MDA MB-231 cells

MDAMB-231 cells were infected by lentivirus which were packed with 1-CaD siRNA and scribbled siRNA (control). Total cell extracts were Immunoblotted against anti-CaD (red) and anti- β -actin (green) antibodies.

我们首先考察了 1-CaD 的表达量能否会影响 MDA MB-231 细胞骨架结构. 通过细胞骨架荧光染色, 发现与对照组的 MDA MB-231 细胞相比,

在 l-CaD 表达抑制的 MDA MB-231 细胞中, 应力纤维明显减少, 细胞失去了完整的细胞骨架结构 (图 8).

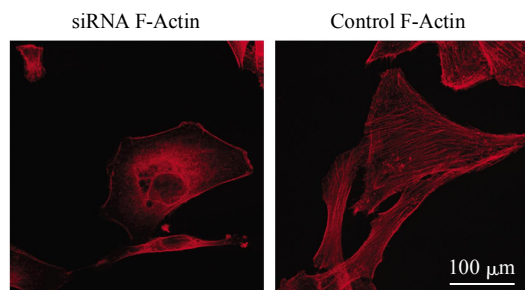


Fig. 8 Fluorescence images of cytoskeleton in 1-CaD knock-down MDA MB-231 cells by confocal

MDA-MB231 cells were infected by lentivirus which were packed with l-CaD siRNA and scribbled siRNA (control). The cytoskeleton was stained with rhodamine-phalloidin. The l-CaD knock-down cells lost the intact cytoskeleton structure compared with control cells.

继而, 考察了 l-CaD 基因沉默对 MDA MB-231 细胞迁移能力的影响, 通过 transwell 迁移实验证明, l-CaD 基因沉默的 MDA MB-231 细胞迁移能力显著降低, 其跨膜迁移效率仅为对照组细胞的 50%, 有趣的是, l-CaD 表达受到显著抑制的 MDA MB-231 细胞其迁移能力下降到与非转移性

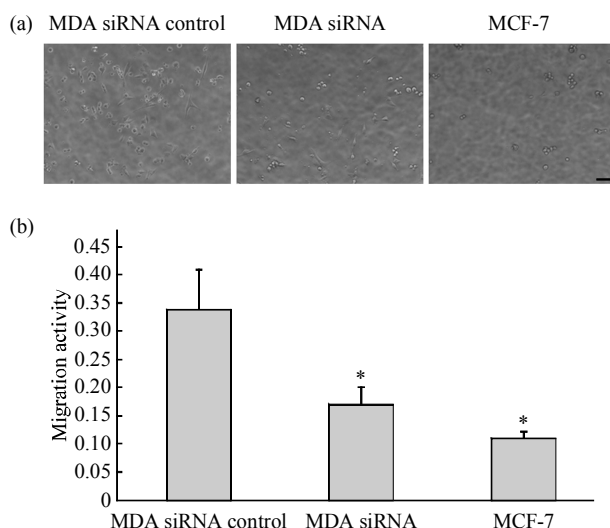


Fig. 9 Results of transwell migration assays on 1-CaD knock-down MDA MB-231 cells

(a) The images of migrated cells under microscope, The light spots represent the cells that migrated through the membrane. (b) The migration ratio for the l-CaD knock-down cells was about 50% of the control cell and the migration activity of knock-down cells was similar with MCF-7 cells ($n = 9$). * $P < 0.05$.

癌细胞 MCF-7 类似 (图 9b), 降低 l-CaD 表达将限制转移性癌细胞的恶性迁移能力.

通过细胞对基底的牵张力以及细胞基底脱附能力的检测, 发现 l-CaD 表达受到显著抑制后, 细胞基底牵张力明显变小 (图 10), 细胞更容易在胰酶的刺激下从基底脱黏附 (图 11). 总的来说, 数据显示 l-CaD 是维持转移性癌细胞正常骨架结构的重要因素, 抑制转移性癌细胞 l-CaD 的表达将显著抑制细胞的迁移活性, 失去了 l-CaD 的高表达, 转移性癌细胞将失去其标志性高迁移能力, 细胞表型更加接近于非转移性癌细胞.

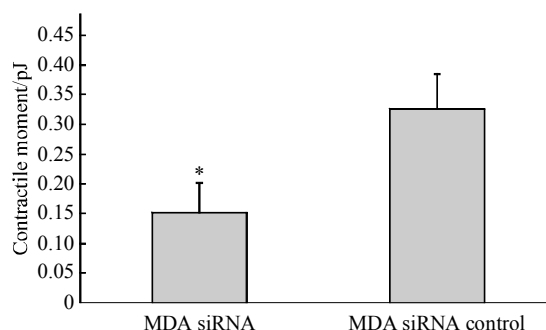


Fig. 10 Fourier transform traction microscopy measurements on 1-CaD knock-down MDA MB-231 cells

Results of traction force measurements of l-CaD knock-down MDA-MB231 cells. The measurement process is referred to 1.8 (Figure 5), the traction force of l-CaD knock-down cells was significantly decreased compared with control cells ($n = 20$). * $P < 0.05$.

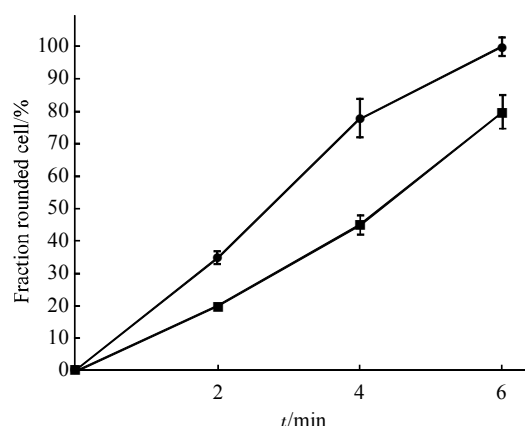


Fig. 11 Detachment of 1-CaD knock-down MDA MB-231 cells upon trypsinization

Detachment of l-CaD knock-down MDA-MB231 cells upon trypsinization. Cells from each plate were trypsinized and monitored under the phase-contrast microscope for time-dependent retraction, rounding and detachment. Percentage of round cells within the designated period was plotted for each type of cells. $n = 6$. ■—■: Control; ●—●: siRNA.

3 讨 论

细胞骨架通过肌动蛋白有序地解聚、重排在许多细胞生理活动的控制中起关键作用, 包括: 细胞分裂、迁移、内吞和外排作用、凋亡和炎症、囊泡运输和基因表达^[1-2]. l-CaD 作为一种重要的肌动蛋白结合蛋白, 通过与肌动蛋白的相互作用参与到细胞正常的生理活动中. 在众多关于表达外源 l-CaD 的研究中, 虽然使用的是不同细胞系或者表达不同的 l-CaD 外源片段, 但总的来说, 这些研究均指出 l-CaD 能够通过稳定细胞骨架, 影响细胞骨架重排, 从而调节细胞迁移^[14, 18, 20, 33-37]. 例如, 反义核苷酸标记的 CaD 能显著影响荷尔蒙介导的应力纤维形成^[38], 转染慢病毒包装的 l-CaD 将会抑制血管平滑肌细胞的增殖和存活率^[39]. 我们的研究则进一步指出, l-CaD 的表达量及其磷酸化程度是调控转移性癌细胞迁移能力的重要因素.

蛋白质磷酸化是胞内信号通路传递的重要方式, 与正常人源性上皮细胞 HMEC 相比, 转移性乳腺癌癌细胞 MDA MB-231 胞内 l-CaD 的磷酸化程度维持在一个较高水平(图 1b), 这可能是因为 MDA MB-231 细胞中天然存在的 K-ras 位点突变^[40-43]可以为 MDA MB-231 细胞提供很强的 l-CaD 磷酸化活性, 从而维持 MDA MB-231 相对很高的迁移能力. 通过使用外源 l-CaD 及其磷酸化突变株作为“分子探针”来干扰细胞内 l-CaD 的磷酸化水平, 我们验证了 l-CaD 磷酸化在 MDA MB-231 迁移活性中的作用. 数据显示, l-CaD 磷酸化对细胞骨架的影响是细胞基底牵张力、基底脱附以及迁移能力的一个重要调控机制. 与对照组 EGFP 空质粒转染的细胞相比, 高表达外源野生型 l-CaD (wtCaD) 的细胞拥有更为牢固的细胞骨架结构, 而这一发现则与 Yamashiro 等^[19]的研究结果一致. 不可磷酸化 l-CaD(A1234)转染的细胞则显示了甚至强于 wtCaD 细胞的骨架系统. 细胞迁移实验证明, 高表达外源不可磷酸化 l-CaD 显著抑制了癌细胞 MDA MB-231 的迁移能力, A1234 细胞的相对迁移率仅为对照组细胞的 25%. 当 l-CaD 的磷酸化被 Ser 位点突变阻断时, 不可磷酸化 l-CaD 突变株将无法通过磷酸化从细胞骨架上脱离, 细胞骨架重排受阻, 从而导致细胞迁移受到显著抑制而细胞的基底牵张力显著增加, 更难从基底脱附, 高表达外源野生型 l-CaD 明显抑制了癌细胞 MDA MB-231 的迁移能力, 这可能是因为 wtCaD 转染细胞的 l-CaD 表达量显著增

高, 超出了细胞内部 l-CaD 磷酸化激酶的承受范围, 因此富余的过量 l-CaD 得不到高效的磷酸化, 从而大量富集并结合在细胞骨架上, 导致细胞骨架解聚受阻, 细胞迁移受到明显抑制. 与之相对的是, 非磷酸化 l-CaD 在细胞骨架上的富集在抑制癌细胞整体迁移能力的同时, 通过增强细胞骨架的应力纤维, 赋予了细胞更强的基底牵张力. D1234 同样抑制了癌细胞 MDA MB-231 的整体迁移能力且与 wtCaD 细胞相近, 都约为对照组细胞的 60%. D1234 虽然是模拟在 ERK 和 PAK 位点完全磷酸化的 l-CaD, 但 D1234 的这种磷酸化是不可逆的. 当 D1234 在细胞内高效表达时, 却不能与野生型 l-CaD 一样通过去磷酸化变成非磷酸化 l-CaD, 因此, D1234 在胞内的过表达将可能扰乱内源性 l-CaD 在磷酸化与去磷酸化中的高效循环, 细胞的整体迁移能力受到明显抑制. 除此之外, 与对照组细胞相比, A1234 细胞基底牵张力显著增强而细胞迁移与胰酶刺激下的基底脱附能力受到明显抑制. 这些数据似乎说明细胞的基底牵张力与细胞迁移能力相对, 尽管细胞基底牵张力是细胞迁移的一个重要因素. 然而, 细胞迁移由多个步骤组成^[44], 包括肌动蛋白骨架重构、黏附、基底脱附、细胞牵张, 其中, 肌动蛋白骨架的解聚跟重排是细胞迁移的首要步骤. 在 A1234 细胞中, 因为 A1234-CaD 不能通过磷酸化从细胞骨架上脱离, 导致解聚受阻. 虽然牢固的骨架能够提供很强的基底牵张力, 但由于细胞骨架重排受到抑制, 以至细胞迁移从第一步上被抑制, 从而表现出整个迁移能力的抑制. 因此, 我们认为, 转移性癌细胞的高迁移能力要求在磷酸化激酶配合下的一个高效有序的 l-CaD 磷酸化 - 去磷酸化循环, 阻断 l-CaD 的磷酸化循环将显著影响转移性癌细胞的迁移活性.

在众多非转移性癌细胞中, l-CaD 的表达量很低甚至没有, 但在高迁移活性的转移性癌细胞中, l-CaD 表达量显著上升, 诸如 HS578T^[45]、SNB-19^[46]等很多高转移性癌细胞均高表达 l-CaD, 我们的研究也显示, l-CaD 在转移性癌细胞 MDA MB-231 中的表达量显著高于非转移性癌细胞 MCF-7(图 1a), 这些数据都暗示 l-CaD 可能是维持转移性癌细胞高迁移活性表型的关键因素. 为了验证 l-CaD 在转移性癌细胞迁移活性中的总体作用, 我们通过 siRNA 技术显著抑制了 MDA MB-231 细胞中 l-CaD 的表达量, 并将其与非转移性癌细胞 MCF-7 进行了迁移活性比较. 发现, l-CaD 表达受到显著抑制的

MDA MB-231 细胞, 其迁移能力受到明显抑制, 迁移活性下降到 MCF-7 水平. 细胞骨架荧光染色显示, l-CaD 表达抑制的 MDA MB-231 细胞失去了完整的细胞骨架结构, 应力纤维明显消失, l-CaD 表达抑制导致细胞的基底牵张力显著降低, 细胞更容易从基底脱离下来. 这些数据证实, l-CaD 是维持转移性癌细胞恶性表型的关键因素, 抑制 l-CaD 的表达, 转移性癌细胞将失去调整活跃的细胞骨架系统, 迁移能力显著下降, 其恶性程度明显降低.

总的来说, 我们的研究证明, l-CaD 是维持转移性癌细胞正常骨架系统和高迁移活性的关键因素, 基于磷酸化, l-CaD 起到了一个“分子开关”的作用, 通过控制细胞骨架的解聚、重排来调节细胞的迁移活性. 我们实验室的其他研究也发现^[18], 磷酸化的 l-CaD 主要位于细胞骨架调整活跃的细胞运动前沿, 并参与平滑肌细胞黏附斑的形成, 而非磷酸化的 l-CaD 主要位于细胞骨架较为稳定的应力纤维上. CaD 与 cortactin, Arp2/3 complex, WASP 这样的肌动蛋白结合蛋白一起存在于细胞骨架结构伪足小体(podosome)中, podosome 被认为是细胞黏附、迁移和浸润细胞外基质的主要方式, 因为 podosome 的中心部分是金属基质蛋白酶 MMP-9 的重要分泌场所^[47-48]. 近来的研究证明, 通过激活 Cdc2 对 l-CaD 的磷酸化作用将显著影响内皮细胞和血管平滑肌细胞 podosome 的形成^[49-50]. 转移性癌细胞转移活性极为旺盛, 要求相对于正常细胞内皮细胞或平滑肌细胞更为活跃的骨架调整以及 podosome 的形成, 所以 l-CaD 可能是通过细胞黏附斑以及 podosome 的形成来进一步调节转移性癌细胞迁移、浸润活性. 总之, 我们将来的研究需要进一步考察 l-CaD 对转移性癌细胞 podosome 形成、基底浸润能力的调节作用, 并结合动物模型考察在体情况下 l-CaD 对恶性肿瘤形成的影响, 探索使用 l-CaD 突变株作为攻克特定转移性癌细胞一个治疗手段的潜在可能性.

参 考 文 献

- [1] Pollard T D, Borisy G G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 2003, **112**(4): 453-465
- [2] Winder S J. Structural insights into actin-binding, branching and bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, **15**(1): 14-22
- [3] Matsumura F, Yamashiro S. Caldesmon. *Curr Opin Cell Biol*, 1993, **5**(1): 70-76
- [4] Marston S B, Huber P A J. Caldesmon. *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*. San Diego, CA: Academic Press, Inc, 1996
- [5] Wang C L. Caldesmon and smooth-muscle regulation. *Cell Biochem Biophys*, 2001, **35**(3): 275-288
- [6] Humphrey M B, Herrerasosa H, Gonzalez G, *et al.* Cloning of cDNAs encoding human caldesmons. *Gene*, 1992, **112**(2): 197-204
- [7] Bretscher A, Lynch W. Identification and localization of immunoreactive forms of caldesmon in smooth and nonmuscle cells: a comparison with the distributions of tropomyosin and alpha-actinin. *J Cell Biol*, 1985, **100**(5): 1656-1663
- [8] Bretscher A. Thin filament regulatory proteins of smooth- and non-muscle cells. *Nature*, 1986, **321**(6072): 726-727
- [9] Warren K S, Lin J L C, Wamboldt D D, *et al.* Overexpression of human fibroblast caldesmon fragment containing actin-, Ca^{++} /calmodulin-, and tropomyosin-binding domains stabilizes endogenous tropomyosin and microfilaments. *J Cell Biol*, 1994, **125**(2): 359-368
- [10] Pittenger M F, Kistler A, Helfman D M. Alternatively spliced exons of the beta tropomyosin gene exhibit different affinities for F-actin and effects with nonmuscle caldesmon. *J Cell Sci*, 1995, **108**(Pt 10): 3253-3265
- [11] Owada M K, Hakura A, Iida K, *et al.* Occurrence of caldesmon (a calmodulin-binding protein) in cultured cells: comparison of normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**(10): 3133-3137
- [12] Yamakita Y, Matsumura F. Caldesmon inhibits cortactin-stabilized, Arp2/3-mediated actin branching. *Mol Biol Cell*, 2002, **13**(1): 316a
- [13] Yamakita Y, Shigeko Y, Matsumura F. Inhibition of Arp2/3-dependent actin nucleation by caldesmon. *Mol Biol Cell*, 2001, **12**(1): 32a
- [14] Numaguchi Y, Huang S, Polte Thomas R, *et al.* Caldesmon-dependent switching between capillary endothelial cell growth and apoptosis through modulation of cell shape and contractility. *Angiogenesis*, 2003, **6**(1): 55-64
- [15] Yamashiro S, Yamakita Y, Ishikawa R, *et al.* Mitosis-specific phosphorylation causes 83K non-muscle caldesmon to dissociate from microfilaments. *Nature*, 1990, **344**(6267): 675-678
- [16] D' Angelo G, Graceffa P, Wang C L A, *et al.* Mammal-specific, ERK-dependent, caldesmon phosphorylation in smooth muscle. Quantitation using novel anti-phosphopeptide antibodies. *J Biol Chem*, 1999, **274**(42): 30115-30121
- [17] Yamboliev I A, Gerthoffer W T. Modulatory role of ERK MAPK-caldesmon pathway in PDGF-stimulated migration of cultured pulmonary artery SMCs. *American J Physiology-Cell Physiology*, 2001, **280**(6): C1680-C1688
- [18] Kordowska J, Hetrick T, Adam L P, *et al.* Phosphorylated l-caldesmon is involved in disassembly of actin stress fibers and postmitotic spreading. *Exp Cell Res*, 2006, **312**(2): 95-110
- [19] Yamashiro S, Chern H, Yamakita Y, *et al.* Mutant caldesmon lacking cdc2 phosphorylation sites delays M-phase entry and inhibits cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 2001, **12**(1): 239-250
- [20] Li Y, Wessels D, Wang T, *et al.* Regulation of caldesmon activity by Cdc2 kinase plays an important role in maintaining membrane

- cortex integrity during cell division. *Cell Mol Life Sci*, 2003, **60**(1): 198–211
- [21] Juliano R. Movin' on through with Cdc2. *Nat Cell Biol*, 2003, **5**(7): 589–590
- [22] Manes T, Zheng D Q, Tognin S, *et al.* Alpha (v)beta3 integrin expression up-regulates cdc2, which modulates cell migration. *J Cell Biol*, 2003, **161**(4): 817–826
- [23] Liu X, Yan S, Zhou T, *et al.* The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival. *Oncogene*, 2004, **23**(3): 763–776
- [24] Van Eyk J E, Arrell D K, Foster D B, *et al.* Different molecular mechanisms for Rho family GTPase-dependent, Ca^{2+} - independent contraction of smooth muscle. *J Biol Chem*, 1998, **273**(36): 23433–23439
- [25] Eppinga R D, Li Y, Lin J L, *et al.* Requirement of reversible caldesmon phosphorylation at P21-activated kinase-responsive sites for lamellipodia extensions during cell migration. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006, **63**(9): 543–562
- [26] Vidal C, Geny B, Melle J, *et al.* Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood*, 2002, **100**(13): 4462–4469
- [27] Morita T, Mayanagi T, Yoshio T, *et al.* Changes in the balance between caldesmon regulated by p21-activated kinases and the Arp2/3 complex govern podosome formation. *J Biol Chem*, 2007, **282**(11): 8454–8463
- [28] Boerner J L, Danielsen A J, Lovejoy C A, *et al.* Grb2 regulation of the actin-based cytoskeleton is required for ligand-independent EGF receptor-mediated oncogenesis. *Oncogene*, 2003, **22** (43): 6679–6689
- [29] Dembo M, Wang Y L. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J*, 1999, **76**(4): 2307–2316
- [30] Wang N, Tolic-Norrelykke I M, Chen J, *et al.* Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, **282**(3): C606–616
- [31] Tolic-Norrelykke I M, Butler J P, Chen J X, *et al.* Spatial and temporal traction response in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, **283**(4): C1254–1266
- [32] Butler J P, Tolic-Norrelykke I M, Fabry B, *et al.* Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, **282**(3): C595–605
- [33] Surgucheva I, Bryan J. Over-expression of smooth muscle caldesmon in mouse fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1995, **32**(3): 233–243
- [34] Warren K S, Shutt D C, McDermott J P, *et al.* Overexpression of microfilament-stabilizing human caldesmon fragment, CaD39, affects cell attachment, spreading, and cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1996, **34**(3): 215–229
- [35] Helfman D M, Levy E T, Berthier C, *et al.* Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. *Mol Biol Cell*, 1999, **10**(10): 3097–3112
- [36] Eves R, Webb B A, Zhou S, *et al.* Caldesmon is an integral component of podosomes in smooth muscle cells. *J Cell Sci*, 2006, **119**(Pt 9): 1691–1702
- [37] Grosheva I, Vittitow J L, Goichberg P, *et al.* Caldesmon effects on the actin cytoskeleton and cell adhesion in cultured HTM cells. *Exp Eye Res*, 2006, **82**(6): 945–958
- [38] Castellino F, Ono S, Matsumura F, *et al.* Essential role of caldesmon in the actin filament reorganization induced by glucocorticoids. *J Cell Biol*, 1995, **131**(5): 1223–1230
- [39] Yokouchi K, Numaguchi Y, Kubota R, *et al.* l-Caldesmon regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and inhibits neointimal formation after angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**(10): 2231–2237
- [40] Davidson N E, Gelmann E P, Lippman M E, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene expression in estrogen receptor-positive and negative human breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol*, 1987, **1**(3): 216–223
- [41] Ennis B W, Lippman M E, Dickson R B. The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. *Cancer Invest*, 1991, **9**(5): 553–562
- [42] Kato K, Ueoka Y, Kato K, *et al.* Oncogenic Ras modulates epidermal growth factor responsiveness in endometrial carcinomas. *Eur J Cancer*, 1998, **34**(5): 737–744
- [43] Toulany M, Dittmann K, Baumann M, *et al.* Radiosensitization of Ras-mutated human tumor cells in vitro by the specific EGF receptor antagonist BIBX1382BS. *Radiother Oncol*, 2005, **74**(2): 117–129
- [44] Condeelis J. The biochemistry of animal cell crawling. *Motion Analysis of Living Cell*. New York: Wiley-Liss, 1998: 85–100
- [45] Lakka S S, Jasti S L, Kyritsis A P, *et al.* Regulation of MMP-9 (type IV collagenase) production and invasiveness in gliomas by the extracellular signal-regulated kinase and jun amino-terminal kinase signaling cascades. *Clin Exp Metastasis*, 2000, **18**(3): 245–252
- [46] Kraus M H, Yuasa Y, Aaronson S A. A position 12-activated H-ras oncogene in all HS578T mammary carcinosarcoma cells but not normal mammary cells of the same patient. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**(17): 5384–5388
- [47] Chen W T. Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J Exp Zool*, 1998, **251**(2): 167–185
- [48] Ochoa G C, Slepnev V I, Neff L, *et al.* A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J Cell Biol*, 2000, **150**(2): 377–389
- [49] Moreau V, Tatin F, Varon C, *et al.* Cdc42-driven podosome formation in endothelial cells. *Eur J Cell Biol*, 2006, **85**(3–4): 319–325
- [50] Osiak A E, Zenner G, Linder S. Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res*, 2005, **307**(2): 342–353

The Effect of Caldesmon Phosphorylation on Metastatic Tumor Cell Mobility*

JIANG Qi-Feng^{1,2)}, CAI Shao-Xi^{1)**}, YAN Xiao-Qing¹⁾

⁽¹⁾ Key Laboratory of Biorheological Science and Technology of Ministry of Education, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China; ²⁾ Boston Biomedical Research Institute, Boston 02472, USA)

Abstract The light-chain actin-binding protein caldesmon (l-CaD) stabilizes microfilaments and stress fibers in cells, it also can dissociate from the actin filament by phosphorylation. Curiously, in many tumor and transformed cells CaD is down-regulated, but in metastatic cancer lines, the expression of l-CaD is very high, in order to explore the role of l-CaD in metastatic cancer cell mobility, transwell migration assays and contractility measurements at cellular levels by traction microscopy were performed using metastatic human breast cancer cell lines the MDA MB-231. By over-expression of wild-type or mutated CaD, including A1234 (unphosphorylatable, both PAK- and ERK-sites converted to Ala) and D1234 (phosphorylation mimics, both PAK- and ERK-sites converted to Asp) in MDA MB-231 cells, l-CaD phosphorylation in cells was disturbed to detect how the l-CaD phosphorylation mediate cancer cell migration. Afterwards, by siRNA, the l-CaD expression in MDA MB-231 cells was knocked down and the migration activities was compared with the non-metastatic human breast cancer cell line MCF-7. The result showed that the A1234 mutant cells exhibited most robust traction force and the wild-type CaD transfected cells also showed much stronger traction force than control cells, whereas the same transfection resulted in most severely hampered migration in both types of cells. These A1234 and wild-type expressing cells also exhibited enhanced stress fibers and delayed trypsin-induced detachment from substratum. Upon the inhibition of the CaD expression, the l-CaD knock-down cells lost the stress fiber structures and exhibited significant decrease in migration activities which was similar to the non-metastatic cancer cell line MCF-7. Moreover, because of the disruption of the cytoskeleton by l-CaD knock-down, the contractility of the l-CaD knock-down cells was decreased and much easier to detach from the substratum. Taken together, l-CaD phosphorylation is an important pathway that mediate the migration activity of the metastatic cancer cells, the high l-CaD expression level with the efficient phosphorylation cycling is a critical factor that maintains the high migration activities of the metastatic cancer cells. The findings thus not only shed lights on the mechanism by which CaD regulates cell motility, but also provide new insights into the nature of metastasis of cancer cells.

Key words l-caldesmon, cytoskeleton, tumor metastasis, cell migration, traction force, siRNA

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00545

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (10872224) and "111" Project.

**Corresponding author.

Tel: 86-23-65112097, E-mail: sxcai@cqu.edu.cn

Received: September 16, 2009 Accepted: November 20, 2009