

文章编号 1006-8147(2015)02-0093-04

论 著

SHP2 不同突变体对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响

张 洁, 张 飞, 冀 为, 赵元元, 牛瑞芳

(天津医科大学肿瘤医院公共实验室, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060)

摘要 目的: 采用慢病毒感染的方式将 SHP2 基因和 SHP2 突变体导入乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中, 研究 SHP2 及其各突变体对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响。方法: 构建 SHP2-WT 和 SHP2-T468M、SHP2-N308D 和 SHP2-2YF 3 个突变体的慢病毒载体, 完成慢病毒包装后, 感染乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 稳定表达。通过蛋白免疫印记检测高表达情况, 免疫荧光观察定位情况, 划痕、Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力。结果: SHP2-WT 增强了乳腺癌细胞迁移和侵袭能力, SHP2-T468M、SHP2-N308D 与对照相比无显著影响, SHP2-2YF 与对照相比降低了乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。结论: SHP2-WT 能显著增强乳腺癌细胞迁移和侵袭能力, 这可能与磷酸酶活性无关, 而与其 542 位和 580 位酪氨酸的磷酸化有关。

关键词 乳腺癌; SHP2; 磷酸酶活性; 迁移; 侵袭

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

Effect of different SHP2 mutants on migration and invasion of breast cancer cell

ZHANG Jie, ZHANG Fei, JI Wei, ZHAO Yuan-yuan, NIU Rui-fang

(Public Laboratory, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center of Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To explore the effects of SHP2 and its mutants on migration and invasion of breast cancer cells by transfecting SHP2 and SHP2 mutants into breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods:** First lentiviral vector SHP2-WT and three mutants of SHP2-T468M, SHP2-N308D and SHP2-2YF were constructed, and then the lentiviral packaging was completed to infect breast cancer cell line MDA-MB-231 for stable expression. The expression, location, cell migration and invasion were detected by western blotting, immunofluorescence, wound-healing and transwell assay respectively. **Results:** Migration and invasion abilities of breast cancer cell were enhanced by SHP2-WT. SHP2-T468M, SHP2-N308D had no significant effect compared with the control group. The SHP2-2YF lessened the migration and invasion in breast cancer cells. **Conclusion:** SHP2-WT can significantly increase the invasion and migration of breast cancer cells, which may not be related to the phosphatase activity, but associate with 542 and 580 tyrosine phosphorylation.

Key words breast cancer; SHP2; phosphatase activity; migration; invasion

乳腺癌是危害妇女健康的主要恶性肿瘤, 全世界每年约有 18 万妇女发生乳腺癌, 约有 45 万妇女死于乳腺癌^[1]。乳腺癌转移是乳腺癌病人死亡的重要原因, 很多分子参与乳腺癌转移, SHP2 与乳腺癌的转移有关^[2]。SHP2 是由 PTPN11 基因编码的一种蛋白酪氨酸磷酸酶, 是 Ras-erk 信号通路中的正向调节因子^[3-5]。研究发现, SHP2 与乳腺癌的发生发展具有密切关系, 降低乳腺癌细胞中 SHP2 的表达, 能够有效抑制肿瘤在小鼠体内的生长和转移^[2]。SHP2 的不同突变体与不同疾病相关, SHP2-Wild type (SHP2-WT) 的高表达能够增加乳腺癌的转移^[2,6],

SHP2 磷酸酶活性激活突变体 SHP2-Asn308Asp (SHP2-N308D) 在 Noonan 综合征中被发现, SHP2 磷酸酶活性失活突变体 SHP2-Thr468Met (SHP2-T468M) 在 LEOPARD 综合征中被发现^[7-8]。SHP2 的 542 位和 580 位酪氨酸在细胞因子的刺激下能够被激活, 这两个位点的磷酸化参与募集 Grb2/Sos 复合体, 从而进一步激活下游 erk 信号通路^[3,9-10], 将这两个位点的酪氨酸突变为丙氨酸, 即 SHP2-Tyr542Ala+Tyr580Ala (SHP2-2YF), 能够阻止 SHP2 被磷酸化。然而, 在乳腺癌的迁移和转移中, SHP2 的磷酸酶活性及其磷酸化形式是否发挥了重要作用尚未可知。本文通过向乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中转入 SHP2 的野生型及其 3 种突变体, 先观察其表达和定位情况, 然后检测其对细胞迁移和侵袭能力的影响, 从而探讨 SHP2 的磷酸酶活性和磷酸化水平与乳腺癌细胞迁移和侵袭的关系。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81372844); 教育部博士点基金资助项目(20131202110002); 天津医科大学科研基金资助项目(2009ky21)

作者简介 张洁(1989-), 女, 硕士在读, 研究方向: 生物化学与分子生物学; 通信作者: 牛瑞芳, E-mail: niurui-fang@tjmuch.com。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 1640 和 DMEM 高糖购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司,嘌呤霉素购自 BD Biosciences 公司。乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 T47D 用 10%胎牛血清的 1640 进行培养,293T 细胞用 10%胎牛血清的 DMEM 高糖进行培养。MDA-MB-231 用慢病毒感染 72 h 后,用含有 3 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素的培养液进行药筛。

1.2 载体质粒的构建 限制性内切酶购自 Fermentas 公司,T4 连接酶和 DNA 回收试剂盒购自 Takara 公司,质粒提取试剂盒购自 Biomiga 公司。构建质粒所用的质粒空载体为 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (pCDH),载体质粒 pCDH-SHP2 的构建中,SHP2 的基因是从乳腺癌细胞 T47D 的总 RNA 中逆转录后,通过 PCR 克隆构建到载体 pCDH 上,所用引物见表 1。而 SHP2-T468M (468 位苏氨酸突变为甲硫氨酸),SHP2-N308D (308 位天冬酰胺突变为天冬氨酸),SHP2-2YF (542 位与 580 位酪氨酸突变为苯丙氨酸)是以 pCDH-SHP2 为模版,选用 *Bcl* I 和 *Bam*H I 两个酶切位点同时采用 PCR 定点突变技术构建而成,所用引物见表 1。

表 1 质粒构建引物序列信息

Tab 1 Primer sequence information of plasmid construction

| 引物名称 | 引物序列 |
|-------|---|
| S-F | CGGAATTCATGACATCGCGGAGATGCTTTC |
| S-R | GAGGATCCTCATCTGAAACTTTTCTGCTGT |
| 1-F | AAAATAGATATAAAACATCCTGCCCTTTCATCATACCA GGGTTGCTCTACACGATGGTGATCCAATGAGCCTGTT |
| 1-F1 | GTGATCCAATGAGCCTGTTTCAGATTACATCAATGCA ATATCATCATGCCTGAATTT |
| 1-R | GAGCGATCGCAGATCCTTCGCGGCCGCGCATCTCATCT GAAA |
| 2-TBF | TGCTGGAATTGGCCGGACAGGGAAGTTTCATTGTGATTGA TATTCTTA |
| 2-TBR | TAAGAATATCAATCACAATGAACATCCCTGTCCGGCCAA TTCCAGCA |
| 3-TBF | GCAAGAGGAAAGGGCACGAATTTACAAATATTAAGTAT TCTCTA |
| 3-TBR | TAGAGAATACTTAATATTGTAAATTCGTGCCCTTTCCTC TTGC |
| 3-R | GAGCGATCGCAGATCCTTCGCGGCCGCGCATCTCATCT GAAACTTTTCTGCTGTTGCATCAGGCCACGTTTTCA GACTCTAGCACTGCTTCTT |

S-F 与 S-R 分别表示构建 pCDH-SHP2 的上下游引物,绿色表示酶切位点 *Bcl* I,蓝色代表酶切位点 *Bam*H I,红色代表各个突变位点,1-F1 是突变体 SHP2-N308D 的引物,2-TBF 是突变体 SHP2-T468M 的突变位点,3-TBF 是突变体 SHP2-2YF 在 542 位酪氨酸突变时的引物,3-TBF 是突变体 SHP2-2YF 在 580 位酪氨酸突变时的引物

1.3 包装慢病毒并感染细胞

1.3.1 包装慢病毒 在 6 cm 的 dish 中铺约 50%的 293T 细胞,第 2 天,用钙离子沉淀法,将几组载体质粒、包装质粒 1、包装质粒 2 共转染进 293T 中,转染后 48 h 收集培养液上清,即产生的病毒原液。

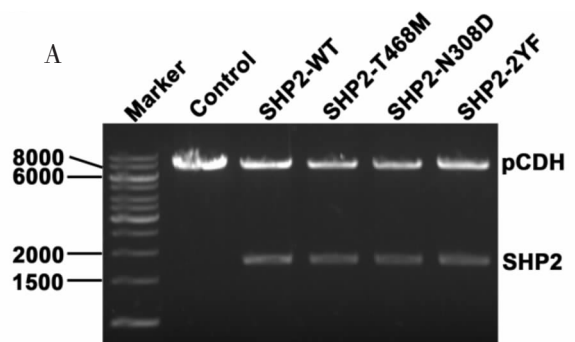
1.3.2 感染慢病毒 在 6 孔板中铺 MDA-MB-231 细胞约 60%,转天待细胞贴壁后,将收集好的病毒原液 (1 mL) 加入细胞培养液 (1 mL) 中,感染细胞约 24 h 后,更换新鲜培养液。感染慢病毒 72 h 后,用嘌呤霉素 (3 $\mu\text{g/mL}$) 进行药筛,3 d 后药筛结束,细胞即可进行下一步的实验。

1.4 Western blotting 和免疫荧光的检测 SHP2 的抗体和二抗均购自 Santa Cruze Biotechnology 公司。Western blotting 中,抗体用 5%的 BSA 以 1:1 000 的比例进行稀释,免疫荧光中,抗体用 3%的 BSA 以 1:200 的比例进行稀释。

1.5 细胞迁移、侵袭能力的检测 Transwell 小室购自 Merck Millipore 公司,matrigel 基质胶购自 BD Biosciences 公司,Transwell 的 3 步染色固定液购自 Thermo Scientific 公司。用划痕实验检测细胞的迁移能力,分别在 4、8、12 h 测量细胞迁移的距离并拍照。用 Transwell 小室实验检测细胞的侵袭能力,在上室加入 40 μL matrigel 基质胶 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,加入细胞 24 h 后固定染色。

2 结果

2.1 载体构建的结果 取 pCDH 空载 (Control)、SHP2-WT 和 SHP2-T468M、SHP2-N308D、SHP2-2YF 慢病毒质粒进行 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切验证,结果如图 1A 所示,与预期结果一致,表明目的基因片段已经成功插入载体质粒 pCDH 中。测序结果显示,重组质粒中插入的 SHP2 突变体序列,除突变点外,其余均未发生突变 (图 1B)。



A: 双酶切验证

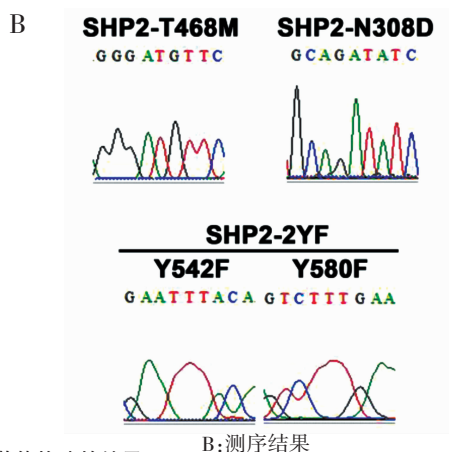
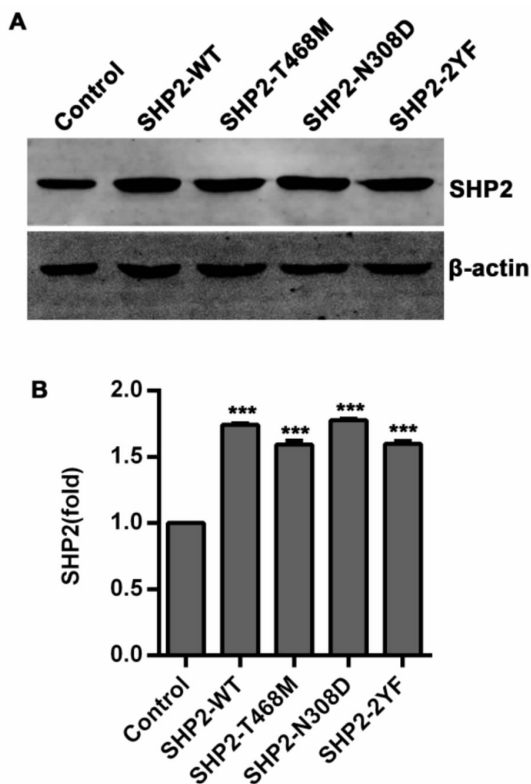


图 1 载体构建的结果

Fig 1 Vector construction results

2.2 目的蛋白的表达和定位情况 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 用慢病毒感染后,再用嘌呤霉素筛选获得稳定细胞株 Control、SHP2-WT、SHP2-T468M、SHP2-N308D 和 SHP2-2YF,Western blotting 结果显示,SHP2 在 SHP2-WT、SHP2-T468M、SHP2-N308D 和 SHP2-2YF 中明显高表达(图 2)。



A:Western blotting 实验检测感染慢病毒后 SHP2 的表达水平变化; B: Western blotting 灰度值分析结果 (***) $P < 0.001$)

图 2 目的蛋白的表达情况

Fig 2 The expression of target protein

免疫荧光的结果证明了在 MDA-MB-231 中转入 SHP2 的不同形式对其定位并没有可观察到的影响(图 3),不同形式的 SHP2 在细胞中呈散在分布,且在细胞核内表现出一定的富集现象。

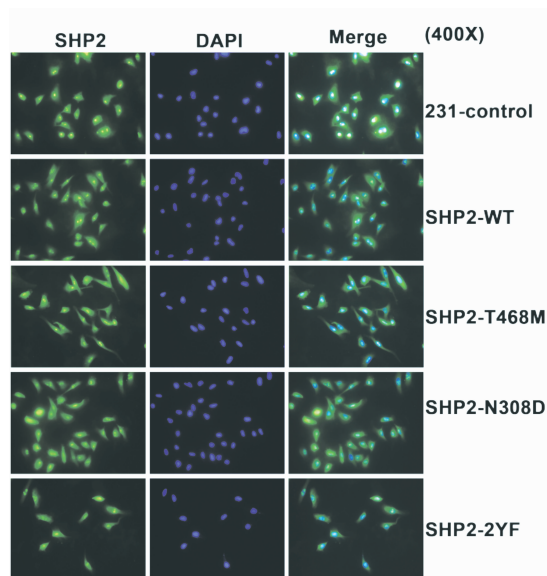
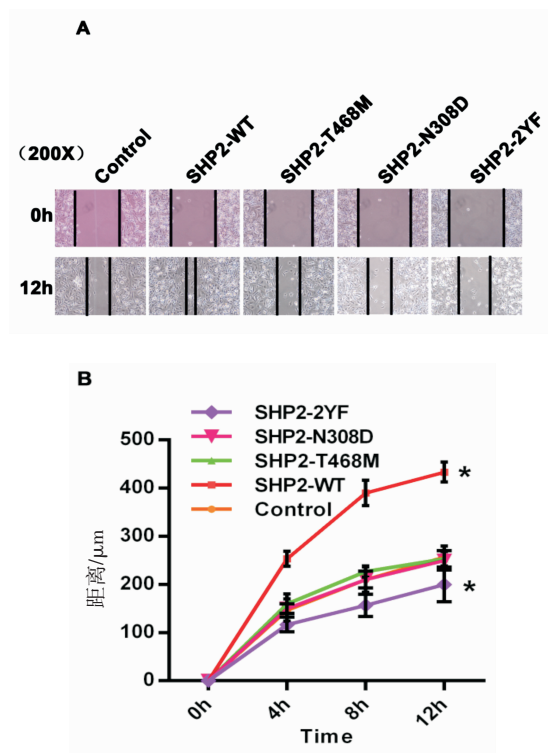


图 3 慢病毒感染后 SHP2 在细胞中的定位情况

Fig 3 Localization of SHP2 after transfection

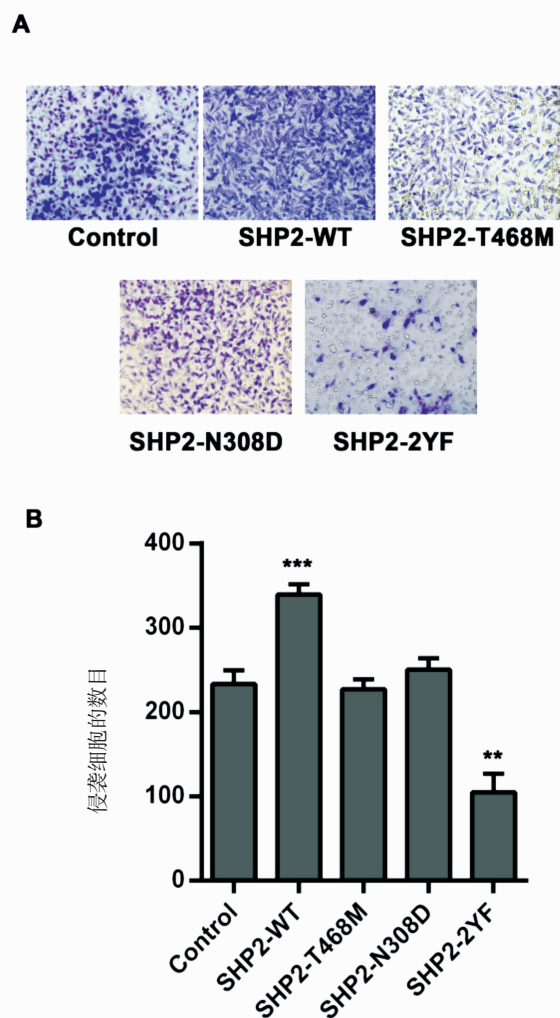
2.3 SHP2 的不同突变体对细胞的迁移、侵袭能力的影响 划痕实验和 Transwell 小室实验分别检测了不同细胞系的迁移和侵袭能力(图 4、5),结果显示,SHP2-WT 的高表达使细胞的迁移和侵袭能力增强,SHP2-T468M 和 SHP2-N308D 对细胞的迁移和侵袭能力无显著影响,而 SHP2-2YF 的高表达使细胞的迁移和侵袭能力减弱。



A:划痕实验拍照结果;B:划痕实验各个时间点细胞迁移距离(SHP2-WT: $P=0.023$ 1, SHP2-2YF: $P=0.038$)

图 4 SHP2 的不同突变体对细胞迁移能力的影响

Fig 4 Effect of different SHP2 mutants on cell migration ability



A: 用 Thermo 3 步法染色试剂盒染色后, 在 200 倍显微镜下拍照结果; B: 通过在 200 倍显微镜下的照片而计数的穿过小室细胞数目 (SHP2-WT:*** $P=0.0008$, SHP2-2YF:** $P=0.0012$)

图 5 SHP2 的不同突变体对细胞侵袭能力的影响

Fig 5 Effect of different SHP2 mutants on cell invasive ability

3 讨论

本实验中, SHP2 这种非受体型酪氨酸磷酸酶, 作为一种癌基因在乳腺癌中发挥了重要的作用, 证明了 SHP2-WT、SHP2-2YF、SHP2-N308D、SHP2-T468M 这 4 种 SHP2 的表达形式对乳腺癌细胞的迁移、侵袭能力的影响。SHP2-WT 增强了细胞的迁移和侵袭能力, 而 SHP2-2YF 降低了细胞的迁移和侵袭能力。在进一步的研究中, 笔者将在乳腺癌细胞中转入 SHP2 磷酸化持续激活突变体, 观察其对细胞迁移和侵袭能力的影响, 从而分析 SHP2 酪氨酸磷酸化位点对于肿瘤细胞迁移和侵袭能力的作用。

目前, 在乳腺癌中, 研究 SHP2 功能很多, 但是研究其磷酸酶活性和其磷酸化形式的功能很少。

SHP2 是一种非受体型酪氨酸磷酸酶, 具有磷酸酶活性, 然而其磷酸酶活性是否在各信号通路中发挥重要作用尚有争议, 其 542 位和 580 位酪氨酸磷酸化与其磷酸酶活性是否相关也不明确^[11]。本研究通过探索 SHP2 及其不同突变体对乳腺癌细胞迁移、侵袭能力的影响, 分析 SHP2 的磷酸酶活性和磷酸化水平与肿瘤的关系, 为进一步研究 SHP2 奠定了基础方向。

目前的研究表明, SHP2 在临床上可能成为一种新的乳腺癌治疗的靶点。因此, 需要弄清楚其促进乳腺癌发生发展的机制, 从而为临床研究提供有力的理论支持。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011,61(2):69
- [2] Aceto N, Sausgruber N, Brinkhaus H, et al. Tyrosine phosphatase SHP2 promotes breast cancer progression and maintains tumor-initiating cells via activation of key transcription factors and a positive feedback signaling loop[J]. Nat Med, 2012,18(4):529
- [3] Chan G, Kalaitzidis D, Neel B G. The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2008,27(2):179
- [4] Dance M, Montagner A, Salles J P, et al. The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway[J]. Cell Signal, 2008,20(3):453
- [5] Grossmann K S, Rosário M, Birchmeier C, et al. The tyrosine phosphatase Shp2 in development and cancer[J]. Adv Cancer Res, 2010, 106:53
- [6] Hartman Z R, Schaller M D, Agazie Y M. The tyrosine phosphatase SHP2 regulates focal adhesion kinase to promote EGF-induced lamellipodia persistence and cell migration[J]. Mol Cancer Res, 2013,11(6):651
- [7] Tidyman W E, Rauen K A. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation[J]. Curr Opin Genet Dev, 2009,19(3):230
- [8] Tartaglia M, Gelb B D. Disorders of dysregulated signal traffic through the RAS-MAPK pathway: phenotypic spectrum and molecular mechanisms[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010,1214:99
- [9] Araki T, Nawa H, Neel B G. Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors[J]. J Biol Chem, 2003,278(43):41677
- [10] Cleghon V, Feldmann P, Ghiglione C, et al. Opposing actions of CSW and RasGAP modulate the strength of Torso RTK signaling in the Drosophila terminal pathway[J]. Mol Cell, 1998,2(6):719
- [11] Miura K, Wakayama Y, Tanino M, et al. Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase[J]. Oncogene, 2013,32 (45):5292

(2014-10-20 收稿)