DOI:10.16016/j.1000-5404.201906041

ATP1A2 通过 Src/PI3K/Akt 信号通路抑制人乳腺癌细胞的侵袭和迁移

覃 绎[1,2],袁洪范[1,2],曾蓓蕾[1,2],张 芳[3],向廷秀[1],任国胜[1,2] 400016 重庆,重庆医科大学分子肿瘤与表观遗传学重庆市重点实验室[1];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:内分泌乳腺外科[2],消化内科[3]

[摘要] **目的** 探讨 ATP1A2 在人乳腺癌组织与细胞中的表达水平及其对乳腺癌细胞侵袭和迁移能力的影响。**方法** 分析 the Cancer Genome Atlas(TCGA)数据库中 ATP1A2 在正常乳腺组织和乳腺癌组织中的表达差异,以及在有无远处转移的患者组织中的表达情况;对过表达 ATP1A2 的 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞进行细胞划痕实验、Transwell 侵袭和迁移实验,以研究其对乳腺癌细胞侵袭和迁移能力的影响;通过 Western blot 检测 Src、PI3K、Akt 蛋白的激活情况。**结果** ATP1A2 在乳腺癌组织中的表达低于正常乳腺组织($P<0.05$);远处转移的患者组织中 ATP1A2 的表达低于无远处转移的患者组织($P<0.05$);划痕实验和 Transwell 侵袭、迁移实验中,ATP1A2 过表达组的划痕愈合能力及侵袭和迁移出小室的细胞数均少于对照组($P<0.05$);Western blot 实验发现:过表达组的 Src、PI3K、Akt 蛋白的磷酸化水平受到抑制($P<0.05$)。**结论** ATP1A2 在人乳腺癌组织中低表达,其表达可能与乳腺癌患者的远处转移相关;过表达 ATP1A2 后能显著抑制乳腺癌细胞的侵袭和迁移能力,此种作用可能是通过抑制 Src/PI3K/Akt 信号通路而产生的。

[关键词] 乳腺癌;细胞侵袭;细胞迁移;Na-K-ATP 酶 α2 亚基;Src/PI3K/Akt 信号通路
[中图法分类号] R345;R730.23;R737.9 [文献标志码] A

Overexpression of α2 subunit of Na-K-ATPase suppresses invasion and migration of human breast cancer cells *in vitro* by inhibiting the Src/PI3K/Akt signaling pathway

QIN Yi[1,2], YUAN Hongfan[1,2], ZENG Beilei[1,2], ZHANG Fang[3], XIANG Tingxiu[1], REN Guosheng[1,2] [1]Chongqing Key Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Endocrine and Breast Surgery, [3]Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of α2 subunit of Na-K-ATPase (ATP1A2) in human breast cancer and the effects of ATP1A2 overexpression on the invasion and migration of breast cancer cells *in vitro*. **Methods** Based on the data from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, the differences of ATP1A2 expression were analyzed between normal breast tissue and breast cancer tissue and between breast cancer patients with and without distal metastasis. The breast cancer MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells transfected with pEZ-M35-ATP1A2 plasmid for ATP1A2 overexpression were evaluated for invasion and migration abilities using wound healing test and Transwell invasion and migration tests; The activation of Src, PI3K and Akt proteins in the transfected cells was detected with Western blotting. **Results** The expression of ATP1A2 was significantly lower in breast cancer tissues than in normal breast tissues, and was also lower in patients with than in those without distal metastasis. In wound healing test and Transwell invasion and migration tests, the breast cancer cells with ATP1A2 overexpression showed significantly lowered invasion and migration abilities as compared with the control cells. Western blotting showed that ATP1A2 overexpression significantly reduced the phosphorylation levels of Src, PI3K and Akt proteins in the breast cancer cells.

[基金项目] 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(31420103915)
[通信作者] 任国胜,E-mail:rengs726@126.com

Conclusion ATP1A2 is lowly expressed in human breast cancer tissues and shows a likely correlation with distal metastasis. Overexpression of ATP1A2 can significantly inhibit the invasion and migration of breast cancer cells in vitro possibly by inhibiting the Src/PI3K/Akt signaling pathway.

[**Key words**] breast cancer; cell invasion; cell migration; α2 subunit of Na-K-ATPase; Src/PI3K/Akt signaling pathway

Supported by the International Cooperation and Exchange Program of National Natural Science Foundation of China (31420103915). Corresponding author: REN Guosheng, E-mail: rengs726@126.com

Na^+, K^+-ATP 酶作为已被熟知的膜蛋白,广泛参与了人体生理及病理各个过程[1]。有研究发现:在肿瘤细胞中,除了经典的对膜内外离子浓度的影响外,Na^+, K^+-ATP 酶被证实在与其配体强心苷类药物(cardiac glycosides,CGs)结合的情况下,能够引起多条信号通路相关蛋白含量和活性的改变,如 PLC/PKC 信号通路、MEK/ERK 信号通路、PI3K/Akt 信号通路等,而 Na^+, K^+-ATP 酶对这些通路的调节离不开它的催化亚基--α 亚基的介导[2-5]。

Na^+, K^+-ATP 酶由 α、β、FXYD 蛋白所构成,其中 α 亚基上包含 Mg^{2+}、Na^+、K^+离子、ATP 以及 CGs 等分子的结合位点,所以它被认为是 Na^+, K^+-ATP 酶的催化亚基;而 β 亚基是一种糖蛋白,是一种调节间隙连接蛋白的粘附分子。它参与全酶的结构和功能成熟,促进 α 亚单位向质膜的转运和上皮细胞外膜中酶的维持;FXYD 蛋白能调节酶的功能,从而使活性钠离子和钾离子转运的动力学特性适应不同细胞的特殊需要[1,6-7]。

Na^+, K^+-ATP 酶的各亚基均有不同的亚型,α 亚基有 4 种不同的亚型,但是这 4 种亚型的功能并不完全相同。其中,α1 也就是 ATP1A1,在恶性胶质瘤、小细胞肺癌、黑色素瘤等肿瘤中被认为发挥了促进肿瘤的作用[8-12],在肾细胞癌中又被认为具有抑制肿瘤的作用[13-14];α3(ATP1A3)被认为有促结肠癌增殖和转移的能力[15];α4(ATP1A4)只存在于睾丸组织中[6-7];而 α2(ATP1A2)与肿瘤的关系鲜有研究报道。因此,本研究观测 ATP1A2 在乳腺癌中的表达情况,并探讨其对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 侵袭和迁移的影响,以期拓展 Na^+-ATP 酶对肿瘤作用的认识,为临床实践中治疗乳腺癌提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 ATP1A2 相关数据 ATP1A2 的 mRNA 及相关临床数据来自 the Cancer Genome Atlas (TCGA)(http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/)数据库。

1.1.2 乳腺癌组织及癌旁组织 12 对乳腺癌及癌旁组织来自 2014-2016 年重庆医科大学附属第一医院。患者均签署知情同意书。组织的使用经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会审批同意[2017 年科研伦理(2017-012)号]。

1.1.3 细胞及质粒 乳腺癌细胞(BT549、MAD-MB-231、MCF-7、T47D、SK-BR-3、ZR-75-1)及正常乳腺细胞 MCF-10A 购自美国 ATCC。pEZ-M35-ATP1A2 和空载 vector-pEZ-M35 质粒购自美国 Genecopoeia 公司。

1.1.4 主要试剂 TRIzol 试剂、SYBR Green kit、脂质体 Lipofectamine™ 2000、质粒提取试剂盒、胎牛血清、链霉素+青霉素试剂购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒、PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司,Cocktail、PMSF、RIPA 试剂、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,多聚甲醛购自川东化工有限公司,Matrigel 购自美国 Bio-Rad 公司,结晶紫染料购自新加坡 ICM Pharma 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo Pierce 公司,PVDF 膜购自美国 Millipore 公司,RPMI1640 培养基(1640 培养基)购自德国 Gibco-BRL 公司。抗体:Anti-ATP1A2 (orb312157)购自英国 Biorbyt 公司,Anti-c-Src (sc-130124)、Anti-p-c-Sr (sc-166860)、Anti-PI3K (sc-12930)、Anti-p-PI3K (sc-12929)、Anti-β-actin (sc-47778)购自美国 Santa Cruz 公司,Anti-Akt (WL0003b)购自万类生物有限公司,Anti-p-Akt (66444-1-ig)、Anti-goat IgG (SA00001-4)购自美国 Proteintech Group 公司,Anti-mouse (7076)、IgG Anti-rabbit IgG (7074)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。ATP1A2 正向引物:5′-CACCACCGAAG-ATCAGTCTGG-3′, 反向引物:5′-CGCTTAGACACG-GAGATGTTC-3′, 产物长度:132 bp。;β-actin 正向引物:5′-CCTGTGGCATCCACGAAACT-3′,反向引物:5′-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3′, 产物长度:314 bp。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 组织:在液氮的研钵中,将组织研磨成粉,移至无酶 EP 管中。细胞及组织:向 EP 管(培养板)中加入 1 mL TRIzol,在室温下静置 10 min;将上层液体移至新的无酶 EP 管中,加入异丙醇 500 μL,室温下静置 10 min;4 ℃、12 000×g 离心 10 min;弃上清,加入 75%乙醇 1 mL,4 ℃、7 500×g 离心 5 min;弃上清;

加入适量 DEPC 水混匀,测浓度;-80 ℃冰箱保存。

1.2.2 RT-PCR Oligo (dT) Primer 0.5 μL,RNA 1 μg,DEPC,定容至 5 μL;混匀,70 ℃加热 10 min,冰上 3 min;5×M-MLV Buffer 4 μL,$MgCl_2$ 2 μL,RNase inhibitor 0.5 μL, Reverse Transcriptase 1 μL, dNTP (10 mmol/L)1 μL,DEPC 水 6.5 μL;将两种液体混匀,放入 PCR 仪,程序设为:42 ℃ 1 h,70 ℃ 15 min,4 ℃ 10 min;5×Flexi Buffer 1.6 μL,$MgCl_2$ (25 mmol/L) 0.4 μL,DEPC 水 4.75 μL,F-primer 0.6 μL,R-primer 0.6 μL,Go-*Taq* DNA Polymerase 0.05 μL,cDNA 2 μL;将液体混匀,放入 PCR 仪,程序为:95 ℃ 2 min,95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s;目的基因进行 32 次循环,内参基因 β-actin 进行 23 次循环;72 ℃ 3 min。加热使液体沸腾且琼脂颗粒完全溶解,每 20 毫升加入液体 1 μL 的核酸染料,混匀,放置室温至凝固;将凝固的 2%琼脂糖凝胶放入电泳槽中,依次加入 DNA Marker 和 PCR 产物;电泳:120 V,25 min;紫外灯下曝光,进行结果分析。

1.2.3 qRT-PCR 将 cDNA 浓度稀释 10 倍;SYBR 5 μL,F-primer 0.25 μL,R-primer 0.25 μL,DEPC 水 2.5 μL,cDNA 2 μL;混匀;设立 3 个复孔,每孔 2 μL 混合液;放入定量 PCR 仪,将程序设置为:50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s,目的及内参均进行 40 次循环,95 ℃ 15 s;绘制溶解曲线;以内参 β-actin 为标准,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析。

1.2.4 ATP1A2 稳定株建立 将 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞种于 6 孔板内,待细胞生长覆盖孔底 70%~80%;将 4 μg 质粒加至 500 μL 的无血清 1640 培养液中,混匀;将 5 μL Lipofectamine™ 2000 加至 500 μL 无血清 1640 培养基中,混匀;两液均在室温下静置 5 min;将两液混合均匀,室温下静置 20 min;弃 6 孔板中旧液,PBS 清洗 3 次,每孔加入 1 mL 转染用混合液,置于 37 ℃ CO_2 细胞培养箱中培养 4~6 h 后,更换混合液为 2 mL 不含双抗、含 10%胎牛血清的 1640 培养液。在细胞转染 48 h 后,向细胞培养液中按比例加入适量 G418 进行筛选,2~3 d 换液 1 次;筛选 14 d 后,进行 RT-PCR 和 Western blot 验证目的基因的表达;验证筛选成功后,细胞继续使用减半量的 G418 维持筛选效果。

1.2.5 细胞划痕实验 将细胞种至背面画了均匀 3 条横线的 6 孔板中,待细胞覆盖满后,用小枪头垂直于所画横线画线;用 1 mL PBS 洗 2 遍,加入 2 mL 无血清 1640;分别于 0、12、24 h 于倒置显微镜下观察。

1.2.6 Transwell 细胞迁移实验 将细胞消化离心,800 r/min,5 min;计数,调整细胞数为 2×10^5/mL,在下室加入 800 μL 含 10%血清的培养液,上室加入 100 μL 细胞悬液,MDA-MB-231 细胞在 37 ℃孵箱中培养 18 h,SK-BR-3 细胞培养 24 h;取出小室,吸干上室液体,移到 800 μL 的 4%多聚甲醛中,室温固定 30 min;取出小室,吸干液体,移至 800 μL 结晶紫中,室温染色 30 min;清水轻柔冲洗浸泡数次,取出小室,吸干液体,用湿棉棒擦去小室底部膜表面上的细胞;显微镜下拍照,统计。

1.2.7 Transwell 细胞侵袭实验 将 Matrigel 放在 4 ℃过夜融化;用 4 ℃预冷的无血清培养液稀释 Matrigel,Matrigel 胶∶无血清1640= 1∶7;向上室中加入 70 μL 稀释后的 Matrigel,37 ℃温育 4~5 h;消化细胞,800 r/min 离心 5 min,重悬细胞,计数,调整细胞数为 2×10^5/mL;在下室加入 800 μL 含 10%血清的培养液,上室加入 100 μL 细胞悬液,MDA-MB-231 细胞继续在 37 ℃孵箱中培养 24 h,SK-BR-3 细胞培养 36 h;取出小室,同迁移实验,使用 4%多聚甲醛固定、结晶紫中染色。清洗擦拭后显微镜下拍照,统计。

1.2.8 Western blot 检测 用细胞裂解液裂解各组细胞,提取细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度;将蛋白与含 β-巯基乙醇的 2×loading buffer 以 2∶1的比例混合混匀,100 ℃加热 10 min;加入蛋白 Marker 5 μL 和待测蛋白样本 40 μg 进行 10%SDS-PAGE 凝胶电泳(开始 60 V,当蛋白跑至浓缩胶和分离胶交界处时,调至 80 V,跑至整块胶正中时调电压至 100 V,直到最后);将 PVDF 膜放入无水乙醇中 5 min 后进行转膜,100 V,100 min;取出 PVDF 膜,放入 5%脱脂牛奶中,放置于摇床上,室温封闭 1 h;将膜用 PBST 洗净牛奶,放入适宜浓度的一抗中,放在 4 ℃摇床中,过夜孵育;PBST 摇床清洗膜,10 min,3 次;将膜放入适宜浓度的二抗中,摇床上室温孵育 1 h;PBST 摇床洗膜,10 min,3 次;向膜上滴加适量配制好的发光液,Las-4000 成像系统进行显影,分析结果。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad 5.0 及 SSPS 19.0 统计软件。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;两组比较用非配对独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。每项实验均独立重复至少 3 次。

2 结果

2.1 TCGA 数据库中乳腺癌组织 ATP1A2 的表达情况

通过从 TCGA 数据库中下载 ATP1A2 的 mRNA 表达情况及患者的临床特征分析发现:对比 112 例正常乳腺组织和 801 例乳腺癌组织,ATP1A2 的 mRNA 表达在乳腺癌中显著下调(图 1A);进一步分析有无远处

转移的患者乳腺癌组织中 ATP1A2 mRNA 表达后发现:13 例远处转移患者组织中 ATP1A2 的表达显著低于 691 例未发生远处转移的患者(图 1B)。提示 ATP1A2 可能作为一个抑制转移和侵袭的相关因素在乳腺癌中发挥作用。

2.2　ATP1A2 在临床组织样本中和乳腺癌细胞系中的表达

提取 12 对乳腺癌组织和癌旁组织总 mRNA,qRT-PCR 检测结果显示:乳腺癌组织中 ATP1A2 的表达较癌旁组织显著降低(图 2A)。

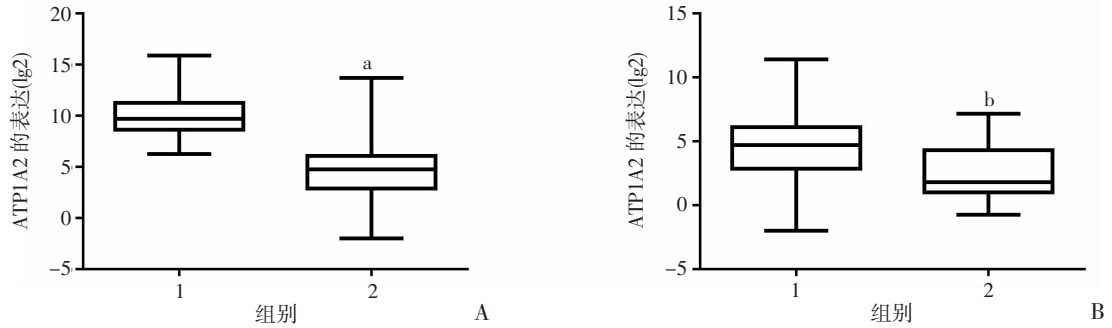
RT-PCR 检测乳腺癌细胞(BT549、MAD-MB-231、MCF-7、T47D、SK-BR-3、ZR-75-1)和正常乳腺细胞 MCF-10A 中 ATP1A2 的表达,发现在这些乳腺癌细胞中,ATP1A2 的 mRNA 表达都很低,有的甚至没有明显的条带(图 2B)。

2.3　ATP1A2 在 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞中过表达

因 ATP1A2 在各乳腺癌细胞中的表达都很低,选取了在实验室条件下较为容易获取和培养的 MDA-MB-231 及 SK-BR-3 进行 ATP1A2 的过表达。在 14 d 的 G418 筛选后,采用 RT-PCR 和 Western blot 验证过表达结果,以转染空载质粒的细胞作为对照,发现不论是 mRNA 水平,还是蛋白质水平(图 3),ATP1A2 均有效地发生了过表达。

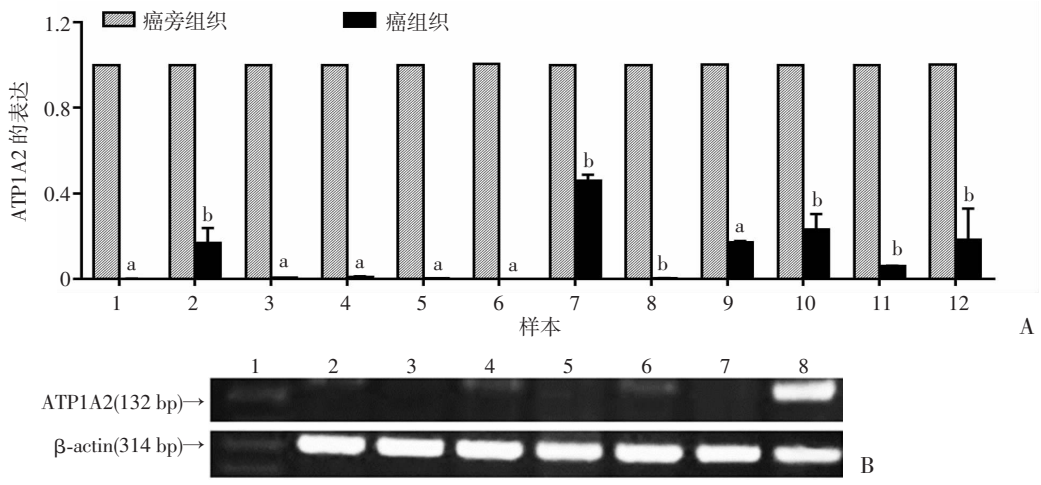
2.4　ATP1A2 对 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞迁移和侵袭的影响

将过表达组及对照组的细胞同时进行细胞划痕实验(图 4)、Transwell 迁移(图 5A)和侵袭实验(图 5B),发现过表达 ATP1A2 能够显著抑制 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞的迁移和侵袭能力。



A:ATP1A2 在乳腺癌组织和正常乳腺组织中的表达　1:正常组;2:乳腺癌组;a:$P<0.001$,与正常组比较;B:ATP1A2 在有无远处转移患者乳腺组织中的表达　1:无远处转移组;2:远处转移组;b:$P=0.004$,与无远处转移组比较

图 1　TCGA 数据库中 ATP1A2 的表达情况



A:ATP1A2 在 12 对乳腺癌和癌旁组织中的表达　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$ 与癌旁组织组比较;B:ATP1A2 在乳腺癌细胞及正常乳腺细胞中的表达　1:标准;2:BT-549;3:MDA-MB-231;4:MCF-7;5:T47D;6:SK-BR-3;7:ZR-75-1;8:MCF-10A

图 2　ATP1A2 在临床组织样本和乳腺癌细胞系中的表达

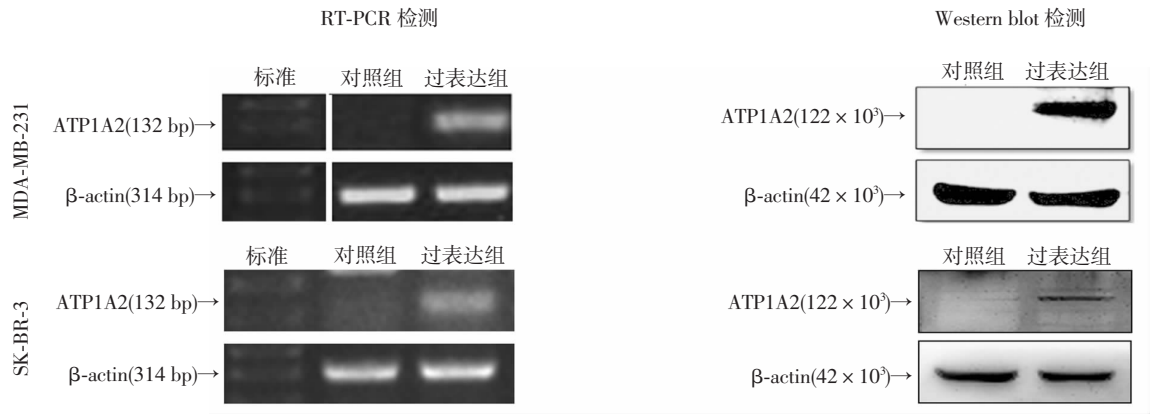
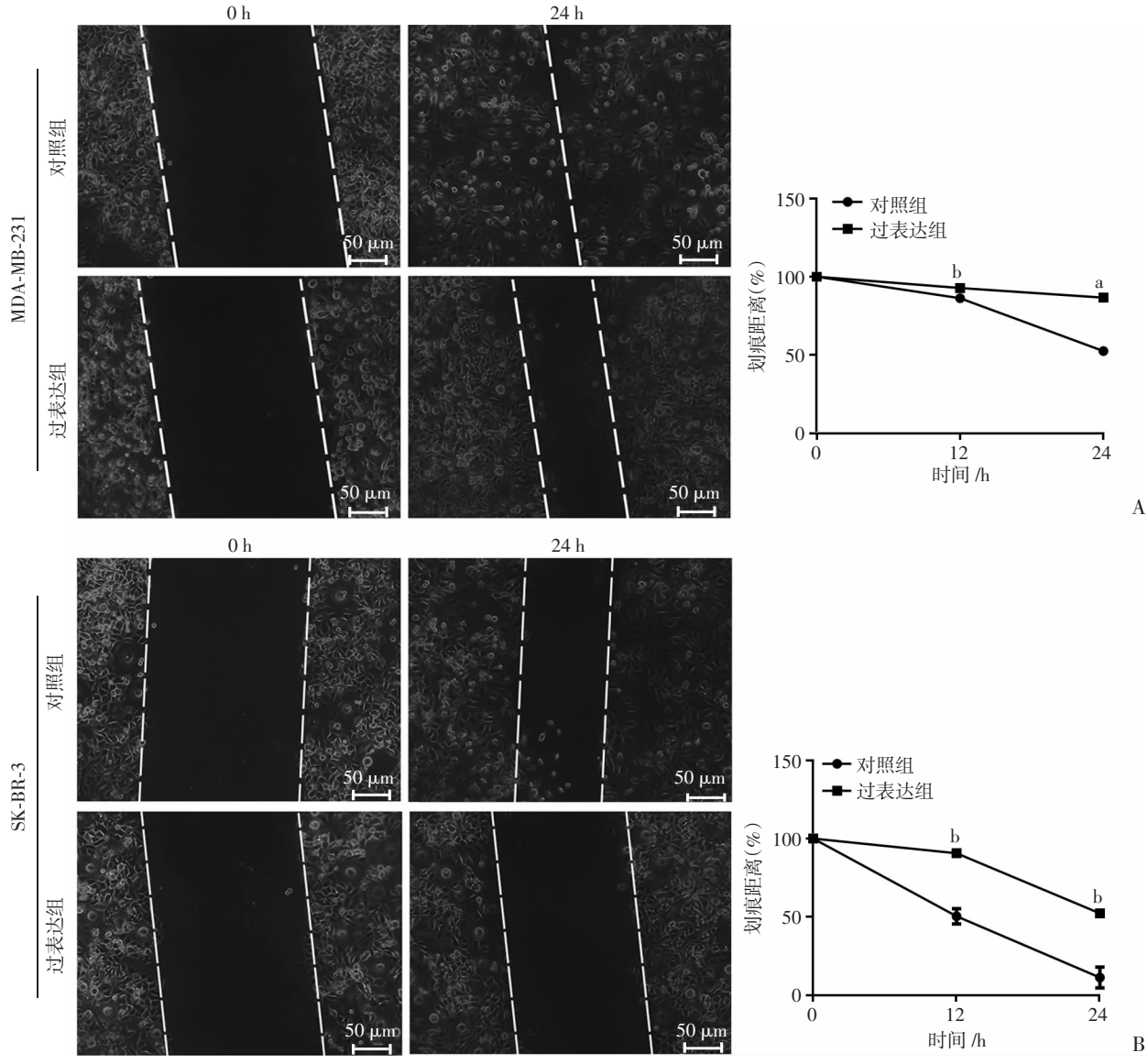
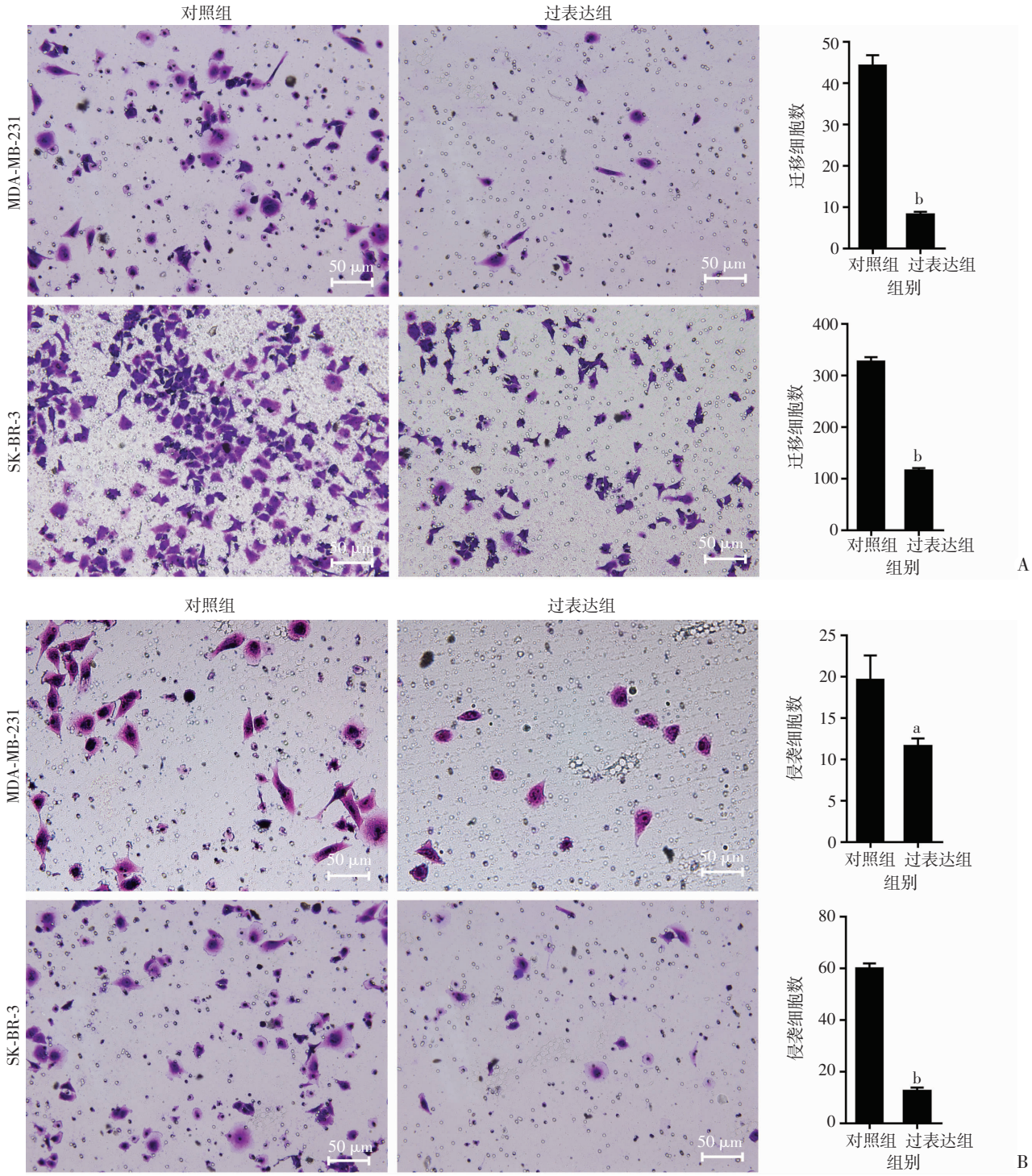


图 3 ATP1A2 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 中的过表达



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较

图 4 划痕实验观察 MDA-MB-231 细胞(A)和 SK-BR-3 细胞(B)的迁移



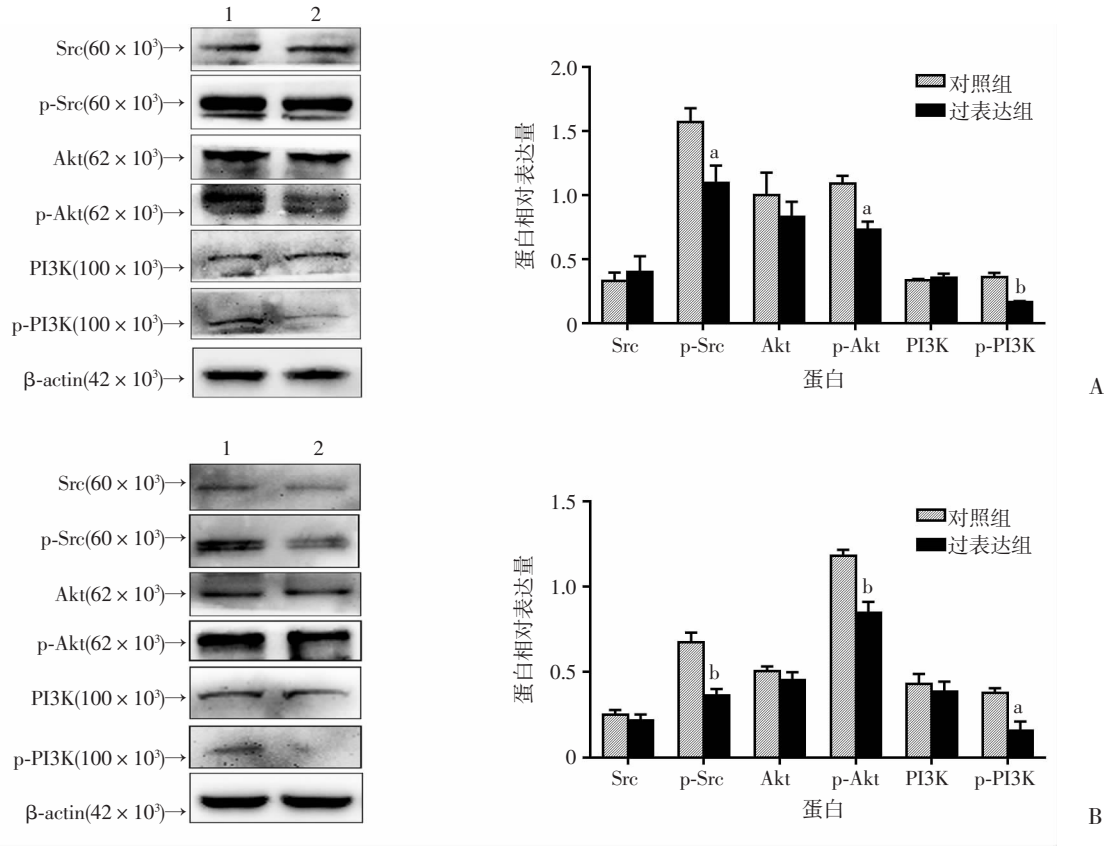
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

A:Transwell 迁移实验观察 MDA-MB-231 细胞和 SK-BR-3 细胞迁移;B:Transwell 侵袭实验观察 MDA-MB-231 细胞和 SK-BR-3 细胞侵袭

图 5 ATP1A2 对 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞迁移和侵袭的影响

2.5 ATP1A2 过表达对 Src/PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的影响

Western blot 检测 Src、PI3K、Akt 蛋白及其磷酸化水平。与对照组比较,过表达组的 Src、PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平明显降低(图 6),提示 ATP1A2 能够抑制它们的激活,表明 ATP1A2 可能通过 Src/PI3K/Akt 信号通路来调节乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。



1:对照组;2:过表达组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图6 Western blot 检测 ATP1A2 过表达在 MDA-MB-231 细胞(A)和 SK-BR-3 细胞(B)中对 Src、PI3K、Akt 及其磷酸化蛋白的影响

3 讨论

Na-K-ATP 酶作为 CGs 类药物的目标蛋白,在心力衰竭、心律失常等疾病中被广泛研究和应用,而它的信号传导功能被研究者们逐渐发现和认识,其中,它在肿瘤中发挥的作用是关注的重点之一[1,3]。

ATP1A2 作为 Na-K-ATP 酶 α 亚单的 2 亚型并没有如 ATP1A1 或者 ATP1A3 那样在肿瘤中受到关注,究其原因可能是其本身的组织特异性所致[6-7]。α1 亚型的分布是普遍存在的,它也是肾脏中表达的主要亚型;α2 亚型主要在成人心脏、血管平滑肌、骨骼肌、大脑、脂肪细胞、软骨和骨骼中表达;α3 亚型主要在可兴奋组织和心脏传导系统中表达,在中枢和周围神经组织中最丰富;而 α4 亚型具有睾丸组织特异性[6-7]。可能正因为这种组织特异性,才使得大多数的目光聚集到了 ATP1A1 上,而忽略了在某些组织中,即使 ATP1A2 含量不高,可能仍然对肿瘤细胞的活动具有明显的调节功能。

本研究表明:ATP1A2 即使在乳腺组织中相较于 ATP1A2 和 ATP1A3 的含量不高,但其在乳腺癌和乳腺正常组织或者细胞中的含量变化却仍然显著:乳腺癌患者的癌组织中 ATP1A2 含量明显低于正常乳腺组织。并且乳腺癌远处转移患者癌组织中 ATP1A2 的含量也低于无远处转移患者的癌组织,这提示 ATP1A2 在乳腺癌的发生和发展中可能起到了一定的抑癌作用。

基于有/无远处转移的患者乳腺癌组织中的 ATP1A2 含量的明显差异,本研究观察 ATP1A2 对 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞迁移和侵袭功能的影响,结果显示:在两种乳腺癌细胞中过表达 ATP1A2 后,细胞的迁移和侵袭能力受到了明显的抑制。这说明 ATP1A2 可能有调控乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的作用。

Src 基因作为原癌基因在正常人体中发挥了调控细胞增殖和分化等生理功能,但当它的表达或者功能出现异常时就可能会促进人体肿瘤的发生、发展,如促进它们的增殖和转移等。它的异常在乳腺癌的发病中也发挥了十分重要的作用。而 Src 蛋白作为已被广泛研究的促癌因子,它可以影响许多下游信号分子产生相应的促癌作用,于是也产生了许多针对于它的相关治疗方法[16-17]。现有研究表明:ATP1A1 能够与 Src

蛋白直接结合,并在存在 Na-K-ATP 酶配体强行苷类药物的情况下,能够激活 Src 蛋白,调节下游一系列相关分子,达到促进或者抑制肿瘤的作用[1,3-4,10,18]。但是,ATP1A2 能否影响与 Src 蛋白结合尚有争议[19-20]。本研究验证了过表达 ATP1A2 能够调节 Src 蛋白的活性,引起 Src 蛋白磷酸化水平的抑制,同时引起下游蛋白 PI3K、Akt 蛋白的磷酸化水平抑制,抑制了它们的活性。也就是说 ATP1A2 能抑制 Src/PI3K/Akt 信号通路的激活,是 ATP1A2 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 迁移和侵袭发挥抑制作用的途径。但是,ATP1A2 是否如 ATP1A1 一样能与 Src 蛋白直接结合、它是如何对 Src 蛋白的进行调节的等问题还需要深入研究。

综上所述,本研究表明:ATP1A2 可能通过抑制 Src/PI3K/Akt 信号通路而抑制了乳腺癌细胞的侵袭和迁移,这拓展了对乳腺癌发病的理论认知,也为诊断和治疗乳腺癌提供了新的思路。

参考文献:

[1] LINGREL J B. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na, K-ATPase[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72(1): 395-412. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135725.

[2] XIE Z. Na^+-K^+-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function[J]. Mol Interv, 2003, 3(3): 157-168. DOI: 10.1124/mi.3.3.157.

[3] NEWMAN R A, YANG P, PAWLUS A D, *et al*. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents[J]. Mol Interv, 2008, 8(1): 36-49. DOI: 10.1124/mi.8.1.8.

[4] MENGER L, VACCHELLI E, ADJEMIAN S, *et al*. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(143): 143ra99. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003807.

[5] BAGROV A Y, SHAPIRO J I, FEDOROVA O V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets[J]. Pharmacol Rev, 2009, 61(1): 9-38. DOI: 10.1124/pr.108.000711.

[6] SWEADNER K J. Isozymes of the Na^+/K^+-ATPase[J]. Biochim Et Biophys Acta, 1989, 988(2): 185-220. DOI: 10.1016/0304-4157(89)90019-1.

[7] LINGREL J B, KUNTZWEILER T. Na^+,K^+-ATPase[J]. J Biol Chem, 1994,269(31): 19659-19662.

[8] MIJATOVIC T, ROLAND I, VAN QUAQUEBEKE E, *et al*. The α1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers[J]. J Pathol, 2007, 212(2): 170-179. DOI: 10.1002/path.2172.

[9] BENARROCH E E. Na^+, K^+-ATPase: Functions in the nervous system and involvement in neurologic disease[J]. Neurology, 2011, 76(3): 287-293. DOI: 10.1212/wnl.0b013e3182074c2f.

[10] MIJATOVIC T, DUFRASNE F, KISS R. Na^+/K^+-ATPase and cancer[J]. Pharm Pat Anal, 2012, 1(1): 91-106. DOI: 10.4155/ppa.12.3.

[11] MATHIEU V, PIRKER C, MARTIN DE LASSALLE E, *et al*. The sodium pump alpha1 sub-unit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(9B): 3960-3972. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00708.x.

[12] XU Z W, WANG F M, GAO M J, *et al*. Targeting the Na^+/K^+-ATPase α1 subunit of hepatoma HepG2 cell line to induce apoptosis and cell cycle arresting[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(5): 743-751. DOI: 10.1248/bpb.33.743.

[13] HE Y, ZHANG P, ZHANG D, *et al*. Combined assessment of low PGRMC1/positive ATP1A1 levels has enhanced prognostic value for renal cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2018, 40(3): 1467-1476. DOI: 10.3892/or.2018.6541.

[14] ZHANG D, ZHANG P, YANG P B, *et al*. Downregulation of ATP1A1 promotes cancer development in renal cell carcinoma[J]. Clin Proteom, 2017, 14: 15. DOI: 10.1186/s12014-017-9150-4.

[15] BAKER BECHMANN M, ROTOLI D, MORALES M, *et al*. Na, K-ATPase isozymes in colorectal cancer and liver metastases[J]. Front Physiol, 2016, 7: 9. DOI: 10.3389/fphys.2016.00009.

[16] GOJIS O, RUDRARAJU B, GUDI M, *et al*. The role of SRC-3 in human breast cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2010, 7(2): 83-89. DOI: 10.1038/nrclinonc.2009.219.

[17] KIM L C, SONG L X, HAURA E B. Src kinases as therapeutic targets for cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(10): 587-595. DOI: 10.1038/nrclinonc.2009.129.

[18] MIJATOVIC T, INGRASSIA L, FACCHINI V, *et al*. Na^+/K^+-ATPase α subunits as new targets in anticancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2008, 12(11): 1403-1417. DOI: 10.1517/14728222.12.11.1403.

[19] XIE J, YE Q, CUI X, *et al*. Expression of rat Na-K-ATPase α2 enables ion pumping but not ouabain-induced signaling in α1-deficient Porcine renal epithelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2015, 309(6): C373-C382. DOI: 10.1152/ajpcell.00103.2015.

[20] STAEHR C, HANGAARD L, BOUZINOVA E V, *et al*. Smooth muscle Ca^{2+} sensitization causes hypercontractility of middle cerebral arteries in mice bearing the familial hemiplegic migraine type 2 associated mutation[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2019, 39(8): 1570-1587. DOI: 10.1177/0271678x18761712.

(**收稿**:2019-06-19;**修回**:2019-08-20)

(编辑 汪勤俭)