

# 可溶性纤维连接蛋白对SGC-7901细胞中PKA活性的影响

王忠诚 李永金\* 陈永昌

(江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013)

**摘要** 本研究通过向SGC-7901细胞中加入可溶性纤维连接蛋白(fibronectin, FN)探讨可溶性纤维连接蛋白对PKA活性的影响。实验采用蛋白印迹技术检测可溶性FN在不同浓度及作用时间情况下对PKA C $\alpha$ 亚基表达水平以及PKA作用底物血管扩张刺激磷蛋白(vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)磷酸化水平的影响; 采用免疫荧光技术检测可溶性FN对PKA作用底物p-VASP分布的影响。结果显示, 在SGC-7901细胞中, 可溶性FN在0.5~8  $\mu$ g/ml浓度区间内, 对PKA活性存在剂量依赖性抑制效应; 选取1  $\mu$ g/ml可溶性FN作用12 h以后, 可溶性FN对PKA活性存在时间依赖性抑制效应; 同时, 我们建立了能够稳定表达人甲状腺A激酶锚定蛋白(human thyroid AKAP, Ht31)肽段的SGC细胞, Ht31破坏PKA锚定后, FN对PKA活性的抑制作用消失; 免疫荧光显示可溶性FN可以使VASP磷酸化位置聚集于细胞边缘。因此, 我们认为在SGC-7901细胞中可溶性FN对PKA活性存在抑制作用, 这种抑制效应与可溶性FN的浓度及作用时间呈正比且取决于PKA能否正常锚定; 可溶性FN可以影响PKA活化位置。

**关键词** 可溶性纤维连接蛋白; PKA; p-VASP; Ht31

在癌症以及肿瘤研究中, 整合素是重要的研究对象。在受整合素影响的众多信号通路中, 小G蛋白RhoA、蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)介导的信号通路在肿瘤迁移过程中作用十分显著<sup>[1]</sup>。但是整合素作为一类重要的细胞膜表面糖蛋白受体, 其发挥生物学作用需要与配体结合。之前的研究中我们发现, 整合素 $\alpha_5\beta_1$ 的配体纤维连接蛋白(fibronectin, FN)以溶解形式存在时可以与整合素 $\alpha_5\beta_1$ 结合并诱导RhoA介导的信号转导<sup>[2]</sup>。同时, RhoA介导的信号通路与PKA介导的信号通路间存在拮抗效应, 上述过程中FN对PKA介导的信号通路产生何种影响报道甚少。因此, 本实验通过蛋白质印迹法、免疫荧光检测PKA催化亚基和PKA底物血管扩张刺激磷蛋白(vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)的磷酸化水平初步研究可溶性纤维连接蛋白对PKA活性的影响; 同时, 我们向SGC-7901细胞中转染了含wild type pcDNA Ht31基因片段的质粒, 建立了能够稳定表达野生型Ht31<sup>418-735</sup>肽段的SGC细胞株。Ht31是人甲状腺细胞中的A激酶锚定蛋白(A kinase-anchoring proteins, AKAPs), 其中494~507这一肽段对结合PKA

II型R亚基非常重要。包含这一肽段的Ht31蛋白对RII有高度亲和力, 本文中用以阻断PKA的正常锚定, 探究破坏PKA锚定后FN对PKA活性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人胃癌细胞株SGC-7901由上海生物化学与细胞生物研究所提供。Fibronectin购自Sigma公司, 用PBS配制成实验所需的浓度。小牛血清和DMEM细胞培养基购自美国GIBCO公司, 胰蛋白酶购自Amresco公司。p-VASP Ser157位点特异性抗体和PKA C $\alpha$ 抗体以及鼠抗人 $\beta$ -actin抗体均购自Santa Cruz公司。羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司。梭华阳离子转染试剂购自厦门太阳马生物工程有限公司, G418购自Invitrogen。质粒DNA wild type pcDNA Ht31由加利福尼亚州圣地亚哥大学Renate Pilz教授友情提供。

收稿日期: 2010-12-13 接受日期: 2011-01-24

国家自然科学基金(No.30340036, No.30470891)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0511-88791201-409, E-mail: lyj3600@163.com

## 1.2 细胞培养

人胃癌细胞株SGC-7901用含10%新生小牛血清NBS的DMEM培养,置于37℃恒温,饱和湿度,5%CO<sub>2</sub>的孵育箱中培养。待细胞铺满瓶底后,用0.25%胰蛋白酶(含1 mmol/L EDTA Na<sub>2</sub>)消化。

## 1.3 细胞转染

**1.3.1 细胞转染** SGC-7901用0.25%胰蛋白酶消化后,1 000 rpm离心5 min,充分吹打制成细胞悬液,计数,调整细胞密度为 $8 \times 10^5$ 个/ml,接种于6孔板上,每孔1 ml。转染时,按照说明准备两管相应体积的不含血清的培养液,一管加入质粒,另一管加入转染试剂,两管液体逐步混匀,室温下静置15~20 min后,直接加入细胞培养皿或板中。24 h后更换培养液。

**1.3.2 制备稳定表达wtHt31的SGC细胞** 将野生型Ht31质粒与GFP质粒共转染入人胃癌细胞SGC-7901后,以500 ng/ml浓度的G418筛选细胞14 d。在荧光倒置显微镜下观察荧光细胞并标记。用PBS冲洗,再用无菌的10  $\mu$ l枪头吸取3~4  $\mu$ l胰酶,轻轻吹刮标记处细胞,并将细胞转入新的6孔板中。3 d后更换培养液,以200 ng/ml浓度的G418继续筛选14 d左右。在荧光倒置显微镜下观察荧光细胞聚集处并标记。用PBS冲洗,再用无菌的10  $\mu$ l枪头刮除标记处非阳性细胞,然后用无菌的10  $\mu$ l枪头吸取3~4  $\mu$ l胰酶,轻轻吹刮标记处细胞,并将细胞转入培养瓶中生长。继续加200 ng/ml浓度的G418维持筛选。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳来鉴定扩增后的细胞是否表达wtHt31。经鉴定,筛选后的SGC-7901细胞与未经转染的细胞相比,分别在分子量27 kDa、37 kDa左右有两条特异的蛋白条带,分别符合绿色荧光蛋白GFP和Ht31肽段的大小;同时,对比荧光实验结果与对应GFP质粒转染图,呈绿色荧光的细胞占全部细胞总数80%以上,因此,我们认为稳定表达wtHt31的SGC细胞制备成功。

## 1.4 Western blot分析

**1.4.1 收集蛋白样品** 细胞按前述消化方法消化后接种于6孔板中,待细胞贴壁后更换无血清DMEM培养液培养24 h进行饥饿处理。饥饿处理之后更换为等量无血清DMEM培养液,用无菌枪头分别向各孔培养液中加入预先配置好的FN溶液等试剂。剂量效应组培养液加入不等量FN,使各孔中FN终浓度为0.5  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、2  $\mu$ g/ml、4  $\mu$ g/ml、8  $\mu$ g/ml,作用24 h。时间效应组各组作用时间取

0 h、6 h、12 h、18 h、24 h,在相应时间加入的FN终浓度均取1  $\mu$ g/ml。加药后将细胞置于37℃恒温培养箱培养,到达作用时间后将细胞取出,用PBS冲洗两次,刮下收集至EP管中,100℃加热10 min,超声30 s确保细胞充分裂解。

**1.4.2 免疫蛋白印迹** 配制8%聚丙烯酰胺凝胶,向各泳道中加入样品后,电压80 V电泳20 min,然后以100 V电泳80 min分离蛋白。电泳结束后取出凝胶与PVDF膜置4℃,90 mA恒流转膜15 h。取出PVDF膜,5% BSA封闭1 h。将PVDF膜与1:200配制的PKA C $\alpha$ 或p-VASP抗体常温孵育2 h。TBS-T漂洗30 min。加入HRP标记的羊抗兔IgG(1:5 000稀释),室温下孵育1 h。TBS-T漂洗30 min。用ECL发光剂显示阳性条带,ChampGel凝胶成像系统扫描并分析目的条带以及 $\beta$ -actin灰度值,取二者比值为相对值,做直方图并进行统计学分析。

## 1.5 免疫荧光

将细胞接种于24孔板内的玻片上,密度30%左右,无血清DMEM培养液培养24 h后更换为等量无血清DMEM培养液。向处理组培养液中加入FN溶液使FN终浓度为1  $\mu$ g/ml,加药后置于37℃恒温培养箱培养。作用24 h后将细胞取出,用PBS冲洗两遍后加入4%多聚甲醛固定15 min;之后加入0.3%浓度的Triton X-100作用8 min以增加细胞膜通透性;加3%BSA室温孵育1 h封闭非特异结合位点;加入p-VASP抗体(1:200稀释)4℃孵育过夜;加入CY3标记的二抗避光孵育1 h,以上各步骤操作后均用PBS冲洗3次。50%甘油封片后用荧光显微镜拍摄结果。

## 1.6 统计学方法

所得数据用SPSS 10.0统计软件进行分析。所有数据用均数 $\pm$ 标准差表示, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 PKA、PKG对VASP磷酸化的影响

VASP是PKA的一个重要的作用底物,它与PKA的结合位点有三个,两个丝氨酸位点(Ser157, Ser239),一个为苏氨酸位点(Thr278);这些磷酸化位点的动力学分析显示,作为PKA的底物,VASP的Ser157位点比Ser239位点优先发生磷酸化。因此, Ser157位点的磷酸化可以用来评估cAMP-PKA信号通路的活性。但是因为VASP同时也可作为PKG的

磷酸化底物,为比较二者影响VASP Ser157位点磷酸化的程度,我们向SGC细胞培养环境中加入了等浓度的cAMP以及cGMP,以分别增强细胞PKA或PKG活性。PKA活性增强时VASP Ser157位点磷酸化水平大幅度提高,而PKG活性增强时VASP Ser157位点磷酸化水平仅略有提升(图1)。因此,我们认为可以使用SGC细胞内VASP Ser 157位点磷酸化水平作为PKA活性的间接标志。

## 2.2 可溶性FN对PKA活性的影响存在剂量依赖性

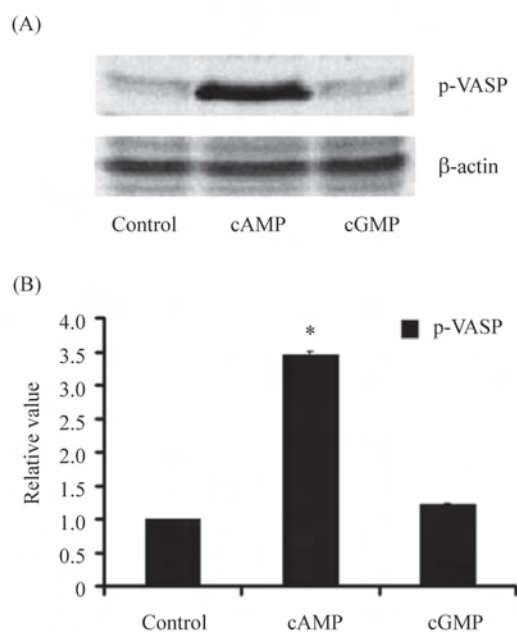
为检测可溶性纤维连接蛋白对PKA活性的影响,我们使用PKA的作用底物VASP的磷酸化水平标志PKA的活性,同时检测了PKA催化亚基C $\alpha$ 的表达量。实验中,我们向6孔板中加入了终浓度为0.5  $\mu$ g/ml、

1  $\mu$ g/ml、2  $\mu$ g/ml、4  $\mu$ g/ml、8  $\mu$ g/ml的FN溶液,作用24 h后p-VASP量以及PKA C $\alpha$ 的表达量随着浓度的增加明显降低(图2)。

从上述实验中可以看出,PKA活性在FN浓度为1  $\mu$ g/ml以上时明显被抑制。因此,我们以1  $\mu$ g/ml FN为作用条件,检测可溶性FN对PKA活性的影响是否存在时间效应。SGC-7901细胞中加入1  $\mu$ g/ml可溶性FN分别作用6 h、12 h、18 h、24 h, p-VASP量以及PKA C $\alpha$ 的表达量在可溶性FN作用12 h后显著降低(图3)。

## 2.3 破坏PKA锚定后可溶性FN对PKA活性的影响

在SGC-7901细胞中转染能够表达Ht31肽段的质粒后,我们按前述实验方法检测了可溶性FN浓

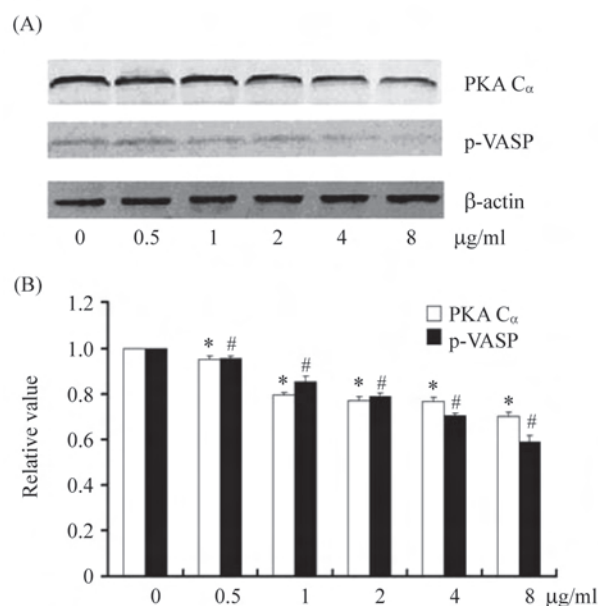


**图1 cAMP和cGMP对SGC-7901细胞中磷酸化VASP水平的比较**

细胞裂解液用p-VASP Ser157位点特异性抗体进行Western blot分析。A: Western blot; control: 空白组; cAMP: 2  $\mu$ g/ml cAMP; cGMP: 2  $\mu$ g/ml cGMP; B: 运用ChampGel软件对Western blot结果进行分析,所有数据均来自三次独立实验。\* $P$ <0.01,与空白组相比。

**Fig.1 Comparison of VASP phosphorylation in SGC-7901 cells treated with cAMP and cGMP**

Cell lysate were analyzed by Western blot with an antibody against p-VASP(ser-157). A: Western blot; lane control: untreated cells; lane cAMP: cells treated with 2  $\mu$ g/ml cAMP; lane cGMP: cells treated with 2  $\mu$ g/ml cGMP; B: Western blot results were analyzed by ChampGel software, each data obtained from three independent experiments. \* $P$ <0.01 compared with control.

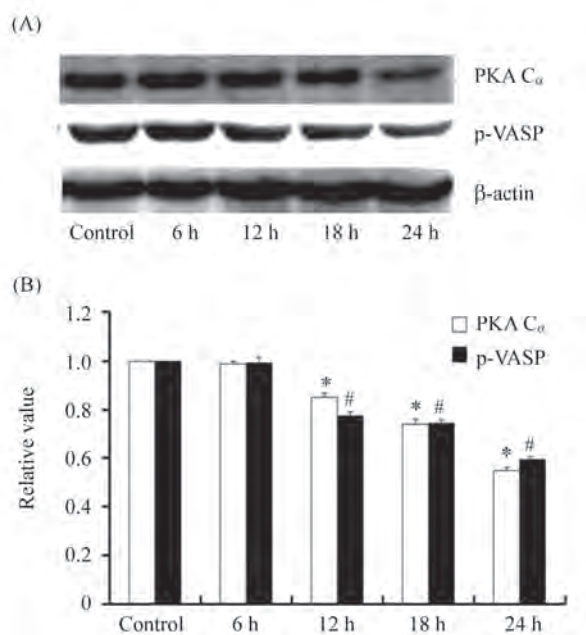


**图2 不同浓度可溶性纤维连接蛋白对SGC-7901细胞中PKA C $\alpha$ 和磷酸化p-VASP含量的影响**

A: Western blot; 0: 空白组; 0.5: 0.5  $\mu$ g/ml FN作用细胞24 h; 1: 1  $\mu$ g/ml FN作用细胞24 h; 2: 2  $\mu$ g/ml FN作用细胞24 h; 4: 4  $\mu$ g/ml FN作用细胞24 h; 8: 8  $\mu$ g/ml FN作用细胞24 h; B: 运用ChampGel软件对Western blot结果进行分析,所有数据均来自三次独立实验。\* $P$ <0.05与PKA C $\alpha$ 空白组相比, # $P$ <0.05与p-VASP空白组相比。

**Fig.2 Effect of different concentrations soluble FN to PKA C $\alpha$  and p-VASP in SGC-7901 cells**

A: Western blot; lane 0: untreated cells; lane 0.5: cells treated with 0.5  $\mu$ g/ml FN for 24 h; lane 1: cells treated with 1  $\mu$ g/ml FN for 24 h; lane 2: cells treated with 2  $\mu$ g/ml FN for 24 h; lane 4: cells treated with 4  $\mu$ g/ml FN for 24 h; lane 8: cells treated with 8  $\mu$ g/ml FN for 24 h; B: Western blot results were analyzed by ChampGel software, each data obtained from three independent experiments. \* $P$ <0.05 compared with bar 0; # $P$ <0.05 compared with bar 0.



**图3** 可溶性纤维连接蛋白作用不同时间对SGC-7901细胞中PKA C $\alpha$ 和磷酸化VASP含量的影响

A: Western blot; control: 空白对照组; 6 h、12 h、18 h及24 h分别表示1  $\mu$ g/ml FN作用6 h、12 h、18 h及24 h; B: 运用ChampGel软件对Western blot结果进行分析, 所有数据均来自3次独立实验。\* $P$ <0.05, 与空白组相比; # $P$ <0.05, 与空白组相比。

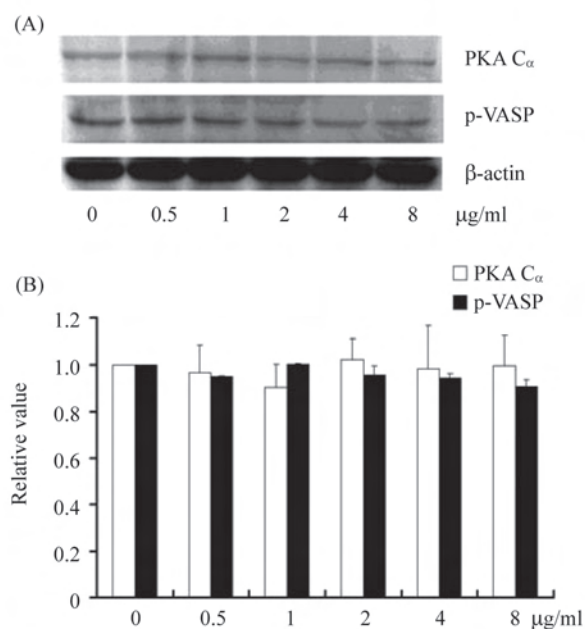
**Fig.3** Effect of soluble FN for different times to PKA C $\alpha$  and p-VASP in SGC-7901 cells

A: Western blot; lane control: untreated cells; lane 6 h, 12 h, 18 h and 24 h were treated with 1  $\mu$ g/ml soluble FN for 6 h, 12 h, 18 h and 24 h; B: Western blot results were analyzed by ChampGel software, each data obtained from three independent experiments; \* $P$ <0.05 compared to control; # $P$ <0.05 compared to control.

度以及作用时间等因素在破坏PKA锚定后对PKA活性的影响。实验表明, 破坏PKA锚定后, PKA磷酸化底物VASP的磷酸化水平不受可溶性FN浓度影响, 1  $\mu$ g/ml浓度条件下也未观察到可溶性FN的影响存在时间效应; 同样, PKA催化亚基C $\alpha$ 的表达量不受可溶性FN浓度影响(图4和图5)。

## 2.4 可溶性FN对P-VASP分布的影响

我们通过免疫荧光实验检测了可溶性FN对VASP磷酸化位置的影响。实验结果显示, SGC-7901细胞中, p-VASP Ser157主要分布于胞浆中, 同时在细胞边缘突起处也有颗粒状分布(图6A), 可溶性FN可以使p-VASP Ser157在细胞边缘处特别是细胞突起部位的颗粒状分布数量明显增加(图6D); 破坏PKA锚定后, FN组和对照组细胞边缘处呈颗粒状分布的



**图4** 不同浓度可溶性纤维连接蛋白对转染wtHt31的SGC-7901细胞中PKA C $\alpha$ 和磷酸化VASP含量的影响

A: Western blot; 0: 空白组; 0.5: 0.5  $\mu$ g/ml FN作用细胞24 h; 1: 1  $\mu$ g/ml FN作用细胞24 h; 2: 2  $\mu$ g/ml FN作用细胞24 h; 4: 4  $\mu$ g/ml FN作用细胞24 h; 8: 8  $\mu$ g/ml FN作用细胞24 h; B: 运用ChampGel软件对Western blot结果进行分析, 所有数据均来自3次独立实验。

**Fig.4** Effect of different concentrations soluble FN to PKA C $\alpha$  and p-VASP in SGC-7901 cells transfected with wtHt31

A: Western blot; lane 0: untreated cells; lane 0.5: cells treated with 0.5  $\mu$ g/ml FN for 24 h; lane 1: cells treated with 1  $\mu$ g/ml FN for 24 h; lane 2: cells treated with 2  $\mu$ g/ml FN for 24 h; lane 4: cells treated with 4  $\mu$ g/ml FN for 24 h; lane 8: cells treated with 8  $\mu$ g/ml FN for 24 h; B: Western blot results were analyzed by ChampGel software, each data obtained from three independent experiments.

p-VASP Ser157均显著减少(图6B和图6E), 二者无明显差异。

## 3 讨论

本实验室之前的研究已经证实, 可溶性FN可以活化小G蛋白RhoA介导的信号通路<sup>[2]</sup>。同时, PKA活化可以抑制RhoA的活化, 那么, FN对RhoA介导的信号通路的活化就有可能是通过抑制PKA的活化而实现的。本实验使用可溶性FN对SGC-7901细胞进行处理, 通过PKA C $\alpha$ 催化亚基以及PKA磷酸化底物VASP的磷酸化水平进行检测, 初步验证了这一推论。并且我们的实验证实了可溶性FN对PKA活性的抑制效果随FN的作用浓度和作用时间的增加而增加, 呈现良好的剂量效应和时间效应关系。此外,

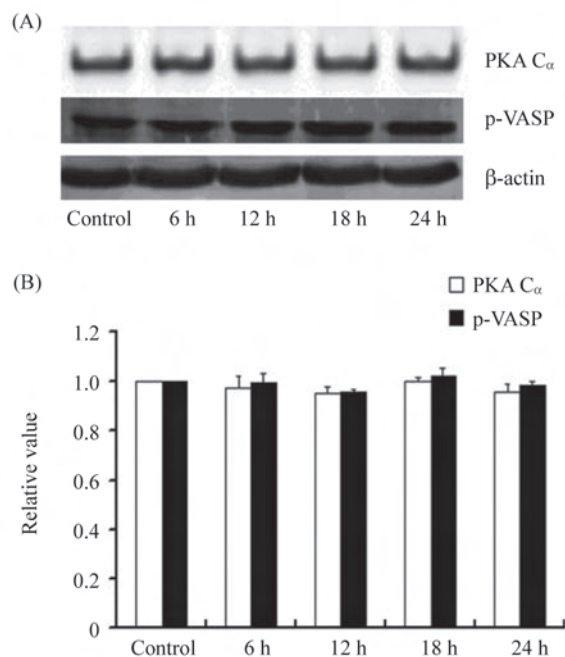


图5 可溶性纤维连接蛋白作用不同时间对转染wtHt31的SGC-7901细胞中PKA C $\alpha$ 和磷酸化VASP含量的影响

A: Western blot; control: 空白对照组; 6 h、12 h、18 h及24 h分别表示1  $\mu$ g/ml FN作用6 h、12 h、18 h及24 h; B: 运用ChampGel软件对Western blot结果进行分析, 所有数据均来自三次独立实验。

Fig.5 Effect of soluble FN for different time to PKA C $\alpha$  and p-VASP in SGC-7901 cells transfected with wtHt31

A: Western blot; lane control: untreated cells; lane 6 h, 12 h, 18 h and 24 h were treated with 1  $\mu$ g/ml soluble FN for 6 h, 12 h, 18 h and 24 h; B: Western blot results were analyzed by ChampGel software, each data obtained from three independent experiments.

破坏PKA锚定后, 可溶性FN对PKA活性的抑制作用消失。本次试验还发现, PKA锚定被破坏后p-VASP的分布不再受可溶性FN影响。

目前可溶性FN对cAMP/PKA信号通路的影响尚未十分明确。有研究表明FN作为整合素 $\alpha_5\beta_1$ 的配体, 二者的结合程度可以影响PKA的活化程度<sup>[3]</sup>, Rho家族也参与调节细胞迁移过程中的细胞整合素和FN表达水平<sup>[4]</sup>。之前我们也发现可溶性FN可以通过RhoA介导的信号通路诱导F-actin的形成而调节细胞迁移<sup>[1]</sup>。本实验证明可溶性FN可以抑制PKA活性, 其调节细胞迁移的机制可能是通过PKA影响RhoA介导的信号通路实现的。之前, 我们研究组发现短时间内可溶性FN对PKA活性的影响没有统计学意义, 本实验证明可溶性FN作用12 h后对PKA活性抑制作用趋于明显, 这可能提示PKA不是这一信号通路中可溶性FN最初的作用位置, 可溶性FN可能通过影响信号通路中更为上游的位点进而影响PKA活性。这与先前我们的结论: 可溶性纤维连接蛋白能够对cAMP/PKA介导的信号通路有抑制作用, 可能的作用靶点是腺苷酸环化酶是一致的。此外, 有学者在研究细胞迁移过程中发现整合素与配体结合可以介导PKA在迁移前沿活化<sup>[5]</sup>, PKA的作用底物也同时优先在细胞的伪足等处活化或磷酸化。Ht31等可以阻断PKA底物在伪足处的优先磷酸化<sup>[6]</sup>。整合

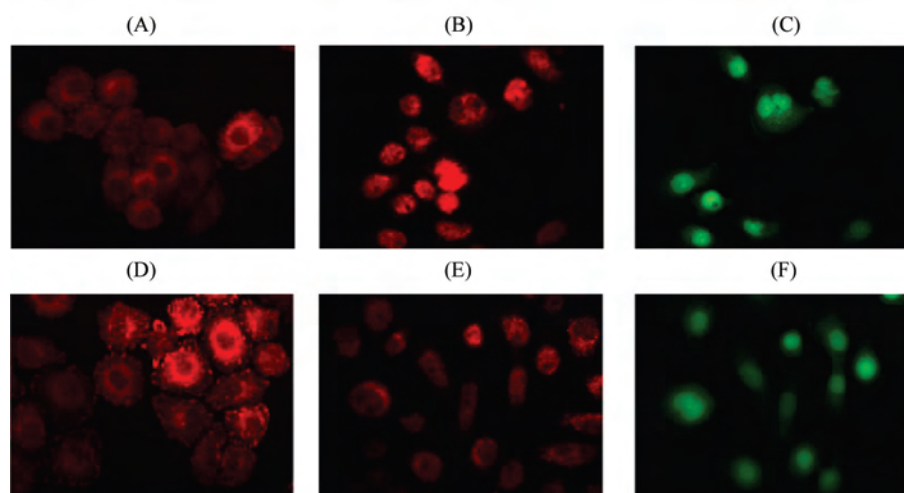


图6 可溶性纤维连接蛋白对SGC-7901细胞中p-VASP Ser157分布的影响

A: 空白对照组; B: 转染wtHt31和GFP的SGC-7901细胞; C: 相对图片B的转染GFP成功的细胞; D: 1  $\mu$ g/ml FN作用24小时的SGC-7901细胞; E: 1  $\mu$ g/ml FN作用24小时的转染wtHt31和GFP的SGC-7901细胞; F: 相对图片E的转染GFP成功的细胞; 荧光显微图像放大倍数:  $\times 400$ 。

Fig.6 Effect of soluble FN to localization of p-VASP ser157 in SGC-7901 cells

A: untreated cells; B: SGC-7901 cells cotransfection with wtHt31 and GFP; C: immunofluorescent of GFP relative to picture B; D: SGC-7901 cells treated with 1  $\mu$ g/ml FN for 24 h; E: SGC-7901 cells cotransfection with wtHt31 and GFP treated with 1  $\mu$ g/ml FN for 24 h; F: immunofluorescent of GFP relative to picture E; Original magnification;  $\times 400$  for fluorescence microscopic images.

素与胞外基质侧建立联系后, VASP、vinculin等会聚集起来, 形成VASP-vinculin复合体后VASP磷酸化水平下降, VASP的这种反复磷酸化行为造成了细胞的逐步变形。同时, 本实验室细胞周期方面的研究也表明, p-VASP Ser157的分布随着细胞周期的进程发生着动态变化。在间期, p-VASP Ser157分布在细胞胞浆中。在有丝分裂细胞中, 从前期到后期, p-VASP Ser157分布在分裂期纺锤体上。在分裂期细胞中, p-VASP Ser157 完全与 $\alpha$ -微管蛋白共定位。这也表明VASP可能通过与其他蛋白共同作用影响肿瘤的细胞骨架结构及细胞形态。本实验免疫荧光部分显示可溶性FN可以增加VASP在细胞边缘磷酸化水平, 但PKA锚定破坏后这种作用消失, 证实可溶性FN可能通过PKA调节p-VASP的分布进而调节细胞迁移。

整合素家族和cAMP/PKA信号通路都是肿瘤与癌症研究中的热点方向, 阐明二者间的联系以及作用机制可以为细胞迁移研究和癌症治疗提供新的思路。本研究显示整合素 $\alpha_5\beta_1$ 的配体FN可以抑制PKA活性, 并可以调节PKA作用底物VASP的磷酸化位

置。这种作用的产生机制以及是否可以对细胞迁移发生影响尚有待于进一步研究。

### 参考文献(References)

- 1 Cardone RA, Bagorda A, Bellizzi A, Busco G, Guerra L, Paradiso A, *et al.* Protein kinase A gating of a pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines. *Mol Biol Cell* 2005; 16(7): 3117-27.
- 2 李永金, 陈永昌, 王 瑛, 陶 燕, 许文荣. 可溶性纤维连接蛋白可活化RhoA并引起癌细胞骨架相关改变(英文). *细胞生物学杂志* 2007; 29(2): 262-6.
- 3 Kim S, Harris M, Varner JA. Regulation of integrin  $\alpha_v\beta_3$ -mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin  $\alpha_5\beta_1$  and protein kinase A. *J Biol Chem* 2000; 275(43): 33920-8.
- 4 Fernandez-Sauze S, Grall D, Cseh B, Van Obberghen-Schilling E. Regulation of fibronectin matrix assembly and capillary morphogenesis in endothelial cells by Rho family GTPases. *Exp Cell Res* 2009; 315(12): 2092-104.
- 5 Lim CJ, Kain KH, Tkachenko E, Goldfinger LE, Gutierrez E, Allen MD, *et al.* Integrin-mediated protein kinase A activation at the leading edge of migrating cells. *Mol Biol Cell* 2008; 19(11): 4930-41.
- 6 Howe AK. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1692(2-3): 159-74.

## Effect of Soluble Fibronectin on Protein Kinase A Activation in SGC-7901

Zhong-Cheng Wang, Yong-Jin Li\*, Yong-Chang Chen

(School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract** To investigate the effect of soluble fibronectin on protein kinase A activation in gastric cancer cell line SGC-7901, we treated Gastric cancer cell line SGC-7901 with soluble fibronectin of different concentrations or different time, expression of PKA catalytic subunit and the phosphorylation level of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), one of PKA substrates were determined by Western blot, the distribute of p-VASP was determined by immunofluorescence method. The results revealed that, FN can inhibit the PKA activation in SGC-7901 among concentrations of 0.5~8  $\mu\text{g/ml}$ . As the dose and time increased, the inhibitory of FN on PKA activation of SGC-7901 was significantly increased after 12 h. FN mediate p-VASP accumulate on the edge of cell. However, these effect disappear in stably transfected SGC cells expressing the AKAP inhibitory peptide Ht31. These data suggest that PKA activation in SGC-7901 could be inhibited by FN, the inhibition determined by FN concentration, functionary time and PKA anchor. FN mediate localized activation of PKA.

**Key words** fibronectin; PKA; P-VASP; Ht31

Received: December 13, 2010 Accepted: January 24, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30340036, No.30470891)

\*Corresponding author. Tel: 86-511-88791201-409, E-mail: lyj3600@163.com