

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.050

SPARC 基因 DNA 甲基化与胰腺癌的研究进展 *

吴冬梅¹ 贺修胜^{1Δ} 郭杏丹² 文 容²

(1 南华大学肿瘤研究所 湖南 衡阳 421001; 2 南华大学肿瘤研究所 湖南 衡阳 421001)

摘要: SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) 蛋白是一种富含半胱氨酸(Cys)的酸性分泌蛋白,参与细胞增殖、迁移、凋亡及肿瘤血管生成等生物学过程。前期研究表明,DNA 甲基化在胰腺癌中广泛地存在,其可能是胰腺癌等消化道恶性肿瘤中富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC)表达下调的机制之一。DNA 甲基化通常导致某些抑癌基因的高甲基化失活, SPARC 基因是一种抑癌基因,甲基化能够使其功能性的失活。而通过抑制 DNA 甲基化可以恢复 SPARC 的表达,DNA 甲基化有望成为胰腺癌早期诊断的潜在生物学标记物以及治疗的靶点。因此,本文主要就 SPARC 的 DNA 甲基化在胰腺癌发生发展中的最新研究进展作一综述。

关键词: SPARC; DNA 甲基化; 胰腺癌

中图分类号: R735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)16-3188-03

Research Progress on DNA Methylation of SPARC and Pancreatic Cancer*

WU Dong-mei¹, HE Xiu-sheng^{1Δ}, GUO Xing-dan², WEN Rong²

(1 Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang, Hunan, Province, 421001, China; 2 Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang, Hunan, Province, 421001, China)

ABSTRACT: SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) is a protein, which is involved in diverse biological processes, such as cell proliferation, migration, apoptosis and angiogenesis. Previous studies have shown that DNA methylation widely present in pancreatic cancer, it may be one of the regulatory mechanisms of SPARC downregulated in pancreatic cancer and other gastrointestinal malignancies. SPARC is a tumor suppressor gene, aberrant DNA hypermethylation usually can be able to make it functional inactivation. However, the expression of SPARC can be recovered through inhibition of DNA methylation, DNA methylation is expected to be a potential biological marker for early diagnosis of pancreatic and therapeutic target. Therefore, in this review, we will make a summing up of the latest research progress of DNA methylation of SPARC in pancreatic cancer.

Key words: SPARC; DNA methylation; Pancreatic cancer

Chinese Library Classification: R735.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3188-03

前言

胰腺癌是消化道常见的恶性道肿瘤之一,以起病隐匿、进展快及预后差为特点。研究表明,胰腺癌死亡率较高,5 年生存率不足 4%^[1]。现阶段,对于大多数胰腺癌患者而言,手术切除仍然是其唯一可能治愈的手段^[2]。然而,大部分胰腺癌患者确诊时已经发展到晚期,由于其广泛的侵袭和/或转移导致无法实施手术切除^[3]。因此,寻求胰腺癌早期诊断的分子标记物及治疗的靶点,已成为当今胰腺癌研究领域的热点之一。

今年越来越多的研究表明,在胰腺癌、大肠癌以及卵巢癌等多种肿瘤细胞系中,富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC)的表达下调甚至表达缺失^[4-7]。而 DNA 甲基化是导致人类肿瘤抑制基因表达沉默常见的原因之一。因此,DNA 甲基化和富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC)有可能为胰腺癌的检测、预防以及治疗提供一种新的途径。本文主要就 SPARC 的 DNA 甲基化在胰腺癌中的研究进展作一综述。

1 富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC)

富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine, SPARC)又称作骨连接蛋白(osteonecfin)或基底膜 40 蛋白(BM40),属于基质细胞蛋白家族^[8]。其最早是由 Termine 等^[9]在骨组织中鉴定出来的,在软骨细胞和巨核细胞形成和分化过程中具有重要的作用^[10]。SPARC 蛋白编码的基因定位于人染色体 5q31.3-q32,包括 10 个外显子,全长 25.9kb^[11]。研究发现,该基因可能是一种肿瘤抑制基因^[12]。SPARC 蛋白是一种糖蛋白,其分子量由糖基化的状态决定,约为 32-43kDa^[13]。该根据结合离子的不同分为 3 个独立的区域^[14],依次是: I 区,氨基末端酸性钙离子结合区; II 区,铜离子结合区; III 区,细胞外钙离子结合区。通过其不同的结构域,SPARC 可以与各种分子伴侣相互作用,如细胞外基质结构蛋白、生长因子及细胞表面受体,从而导致光谱的生物学效应^[15]。此外,还有研究证实,SPARC 参与骨重塑、胶原蛋白纤维素生成、细胞增殖与迁

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172575);湖南省科技厅资助项目(2011SK3088;2011SK3089)

作者简介:吴冬梅(1986-),女,硕士研究生,医师,研究方向:肿瘤发病易感分子机制,E-mail: 342757989@qq.com

Δ 通讯作者:贺修胜(1958-),男,教授,研究方向:肿瘤发病易感分子机制,E-mail: hexiusheng@hotmail.com

(收稿日期:2013-07-31 接受日期:2013-08-28)

移及肿瘤血管生成等不同的生物学过程^[12],与肿瘤的发生密切相关。

Sato^[13]等运用逆转录 PCR、Western blot 及免疫组化方法,从 mRNA 及蛋白质水平,检测 SPARC 基因在胰腺癌及非肿瘤性胰腺导管上皮细胞中的表达,研究结果表明,SPARC 在非肿瘤性胰腺导管上皮细胞中高表达,而在胰腺癌细胞系中低表达甚至表达缺失;将 SPARC 基因转染入胰腺癌细胞中,恢复该基因在胰腺细胞中的表达,结果显示,该细胞生长速度减慢,增殖与粘附能力降低;靶向敲除 SPARC 基因在正常胰腺细胞中的表达,并将该细胞接种于小鼠体内,发现与对照组比较,细胞生长速度加快,增殖及粘附能力增强,裸鼠成瘤时间早,生长速度加快^[16]。这些研究结果进一步表明,SPARC 可能是一种肿瘤抑制基因。

血管生成是肿瘤侵袭转移的先决条件之一。近来研究表明,SPARC 可以通过直接结合血管内皮生长因子(VEGF)来抑制血管内皮生长因子通路,从而阻止血管内皮生长因子与其受体相互结合^[17]。此外,SPARC 还可以结合血小板源性生长因子(PDGF)^[18],并且在体内通过下调基质金属蛋白酶(MMPs)和转化生长因子 β 1 抗体(TGF- β 1)间接地抑制血管生成^[19],从而抑制肿瘤的侵袭转移。另有研究表明,SPARC 可以结合各种细胞表面受体,包括整联蛋白和血管细胞粘附分子 1(VCAM-1),从而影响细胞粘附和迁移能力^[13]。最近研究发现,在 SPARC 表达缺失的情况下,基质金属蛋白酶-9(MMP9)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达增加,从而诱导肿瘤血管的生成,促进胰腺肿瘤生长并增强细胞侵袭转移的能力^[20]。总之,SPARC 蛋白在胰腺癌的发生发展中发挥重要的作用。

2 DNA 甲基化

DNA 甲基化是表观遗传学调控的重要组成部分,所谓 DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶的作用下,胞嘧啶(C)第 5 位碳原子结合 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)提供的甲基(-CH₃)生成 5'-甲基胞嘧啶的过程(图 1)。DNA 甲基化在真核生物体内大多发生在 5'-GC-3' 核苷酸(CpG)上^[21]。基因组 DNA CpG 丰富的区域被称为 CpG 岛,CpG 通常位于基因的启动子区域附近,长度约为 300-3000 bp。正常情况下,CpG 岛是以非甲基化形式存在的,这些受保护的 CpG 岛的异常甲基化(过度甲基化常见)能够导致启动子区域下游等位基因的失活。

DNA 甲基化是一个可逆的过程,DNA 甲基化转移酶(DNMTs)在此过程中发挥着重要的作用。目前,在哺乳动物中已经鉴定出 5 个具有催化活性的 DNMTs,分别为 DNMT1(其亚型有 DNMT1b、DNMT1o 和 DNMT1p)、DNMT2、DNMT3a、DNMT3b 以及 DNMT3L,其中具有甲基化转移酶活性的仅有 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b^[22]。

最近研究发现,表观遗传标记的水平和分布在癌症基因组中发生了很大的变化,表明表观遗传改变在肿瘤形成中发挥着重要的作用^[23]。然而,DNA 甲基化高甲基化是导致表观遗传学改变的关键机制,异常的 DNA 甲基化通常会引起肿瘤抑制基因失活或癌基因的活化,导致肿瘤的发生。

3 SPARC 的 DNA 甲基化与胰腺癌

1997 年,Schutte 等^[24]首次报道了在胰腺癌中发现 P16/CD-

KN1A 的高甲基化。此后,关于胰腺癌中相关基因的 DNA 异常甲基化的研究相继开展起来。2000 年,Ueki 等^[25]对 45 例胰腺癌患者中所存在的异常甲基化进行了分析,结果发现,14%的患者存在 CpG 岛甲基化表型;而且 CpG 岛甲基化表型的发生往往与患者的年龄及肿瘤的体积密切相关。另有研究确定了胰腺癌中一些常见的高甲基化基因,包括 SPARC、APC、REPRIMO 及 HHIP 等^[26]。此外,还发现异常甲基化随着肿瘤的侵袭性及阶段的增加而增加,这表明异常甲基化在胰腺中可能具有致癌的作用。

前期研究表明^[12],SPARC 通常在恶性肿瘤细胞中表达下调,而启动子区域异常甲基化可以导致 SPARC 表达沉默,从而促进肿瘤的发生。接触烟草、重金属及农药等危险品可以导致 DNA 的异常甲基化,在许多疾病的发生发展中起着核心的作用^[27]。近来研究表明,SPARC 基因启动子区 CpG 岛异常甲基化,可以抑制 SPARC 的表达^[2]。Gao 等^[28]发现,与 CpG 1 区甲基化相比,CpG 2 区甲基化在早期胰腺癌发生中更常被检测到;而且 SPARC 基因 CpG 2 区的甲基化与肿瘤的大小以及接触烟草烟雾和酒精等密切相关。Sato 等^[15]在原发性胰腺癌中发现 SPARC 基因启动子区存在异常的甲基化,从而导致该基因表达沉默。基因表达谱分析证实,SPARC 的 mRNA 在非肿瘤性胰腺导管上皮细胞中表达,而在胰腺癌细胞系中并不表达;同时发现胰腺癌细胞在含有 SPARC 蛋白分泌的的无血清培养基中培养,其生长受到抑制,间接地说明 SPARC 基因的沉默可以导致胰腺癌的发展。这些研究结果表明,CpG 2 区异常甲基化可能适合作为肿瘤发生的标记物用于早期胰腺癌的初步筛查;然而,其敏感性和特异性以及可实用性,还有待进一步的研究证实。

如今,异常 DNA 甲基化已经成为研究最广泛的表观遗传学变化,它通过抑制特定的肿瘤抑制基因启动子区域的转录而导致该基因沉默或通过促进基因组的不稳定导致染色体的缺失^[29,31],从而导致各种恶性肿瘤的发生。针对异常的 DNA 甲基化可以被逆转,最近有研究,通过使用药物如 5-氮杂-2-脱氧胞苷处理胰腺癌细胞后,发现表达沉默的 SPARC 基因可以得到逆转^[12]。另有研究,采用全基因组筛选技术确定肿瘤中异常甲基化靶向的基因,同时也不断地表明在胰腺癌、宫颈癌及大肠癌细胞系中通过 5-氮杂-2-脱氧胞苷可以诱导恢复 SPARC 的表达^[32,33]。然而,在目前的条件下,异常 DNA 甲基化在胃肠道肿瘤学领域中的临床应用是有限的。临床试验评估虽然已经提高了甲基化定量分析的作用,如使用 MSP 检测出的胰腺癌患者往往具有很强的家族史^[34,35]。但是这些检测的敏感性和特异性尚未得到证实并且它们的作用目前只用于研究目的。因此,在发展临床试验之前临床前工作仍然需要解决存在的问题。

总之,这些研究结果表明,SPARC 启动子区域异常 DNA 甲基化可以被逆转,这可能成为胰腺癌治疗中的一个新的靶点。

4 小结与展望

综上所述,异常 DNA 甲基化可能是胰腺癌中 SPARC 蛋白表达异常的调控机制。前期研究发现,异常 DNA 甲基化导致肿瘤抑制基因 SPARC 的沉默,而这种现象在胰腺癌中广泛存在,与胰腺癌的临床侵袭行为密切相关。异常甲基化是一个可逆的过程,通过抑制 DNMT 酶可以提高抑癌基因的表达。因

此,针对 SPARC 的异常 DNA 甲基化的这一研究,将为胰腺癌的早期诊断、治疗及预防开辟新的领域。目前,关于 SPARC 的 DNA 异常甲基化在胰腺癌中的作用机制虽然有了初步的了解,但是其确切的分子机制尚未完全探明,其如何应用于临床工作也有待于进一步的研究证实,更需要对 SPARC 的 DNA 异常甲基化在胰腺癌中的调控机制进行深入的探索。

参考文献(References)

- [1] Hamidi T, Cano CE, Grasso D, et al. NUPR1 works against the metabolic stress-induced autophagy-associated cell death in pancreatic cancer cells[J]. *Autophagy*, 2013, 9(1):95-97
- [2] Nagaraju GP, El-Rayes BF. SPARC and DNA methylation: possible diagnostic and therapeutic implication in gastrointestinal cancers[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(1):10-17
- [3] Vincent A, Herman J, Schulick R, et al. Pancreatic cancer [J]. *Lancet*, 2011, 378(9791):607-620
- [4] Wang L, Yang M, Shan L, et al. The role of SPARC protein expression in the progress of gastric cancer [J]. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(3): 697-702
- [5] Chan JM, Ho SH, Tai IT. Secreted protein acidic and rich in cysteine-induced cellular senescence in colorectal cancers in response to irinotecan is mediated by P53 [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(5): 812-819
- [6] Socha MJ, Said N, Dai Y, et al. Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer[J]. *Neoplasia*, 2009, 11(2):126-135
- [7] Gokul G, Khosla S. DNA methylation and cancer[J]. *Subcell Biochem*, 2012, 6:597-625
- [8] Chiodoni C, Colombo MP, Sangaletti S. Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis [J]. *Cancer Metastasis*, 2010, 29(2):295-307
- [9] Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, et al. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen [J]. *Cell*, 1981, 10(26): 99-105
- [10] Tai IT, Tang MJ. SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy[J]. *Drug Resist Updat*, 2008, 11(6):231-246
- [11] Swaroop A, Hogan BL, Francke U. Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin /BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33 [J]. *Genomics*, 1988, 2(1): 37-47
- [12] Nagaraju GP, Sharma D. Anti-cancer role of SPARC, an inhibitor of adipogenesis[J]. *Cancer Treat Rev*, 2011, 37(7):559-566
- [13] Kaufmann B, Muller S, Hanisch FG, et al. Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity[J]. *Glycobiology*, 2004, 14(7):609-619
- [14] Chlenski A, Cohn SL. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression[J]. *Semin Cell Der Biol*, 2010, 21(1):55-65
- [15] Sato N, Fukushima N, Maehara N, et al. SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor stromal interactions[J]. *Oncogene*, 2003, 22(32):5021-5030
- [16] Puolakkainen PA, Brekken RA, Muneer S, et al. Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis [J]. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(4):215-224
- [17] Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of protein[J]. *Int J Biochem Cell Der Biol*, 2012, 44(3):480-488
- [18] Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, et al. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(4):1281-1285
- [19] Lau CP, Poon RT, Cheung ST, et al. SPARC and Hevin expression correlate with tumour angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Pathol*, 2006, 210(4):459-468
- [20] Arnold S, Mira E, Muneer S, et al. Forced expression of MMP9 rescues the loss of angiogenesis and abrogates metastasis of pancreatic tumors triggered by the absence of host SPARC [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2008, 233(7):860-73
- [21] Sproul D, Meehan RR. Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation[J]. *Brief Funct Genomics*, 2013, 12(3):174-190
- [22] Liu WR, Shi YH, Peng YF, et al. Epigenetics of hepatocellular carcinoma: a new horizon [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(13): 2349-2360
- [23] You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? [J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(1):9-20
- [24] Schutte M, Hruban RM, Geradts J, et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(15):3126-3130
- [25] Ueki T, Toyota M, Sohn T, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7):1835-1839
- [26] Vincent A, Omura N, Hong SM, et al. Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(13): 4341-4354
- [27] Yi JM, Dhir M, Guzzetta AA, et al. DNA methylation biomarker candidates for early detection of colon cancer [J]. *Tumor Biol*, 2012, 33(2):363-372
- [28] Gao A, Zuo X, Liu Q, et al. Methylation of PARP-1 promoter involved in the regulation of benzene-induced decrease of PARP-1 mRNA expression[J]. *Toxicol Lett*, 2010, 195(2-3):114-118
- [29] Matsubara N. Epigenetic regulation and colorectal cancer [J]. *Dis Colon Rectum*, 2012, 55(1):96-104
- [30] González CA, Agudo A. Carcinogenesis, prevention and early detection of gastric cancer: where we are and where we should go[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(4):745-753
- [31] Caffarelli E, Filetici P. Epigenetic regulation in cancer development [J]. *Front Biosci*, 2012, 17:2682-2694
- [32] Sova P, Feng Q, Geiss G, et al. Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(1):114-123
- [33] Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention[J]. *Oncogene*, 2007, 26(37):5310-5318
- [34] Fukushima N, Walter KM, Uek T, et al. Diagnosing pancreatic cancer using methylation specific PCR analysis of pancreatic juice[J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2(1):78-83
- [35] Yan I, McFaul C, Howes N, et al. Molecular analysis to detect pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk groups[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(7):2124-2130