

TGF- β 1经DNMT1调控肺癌A549细胞对 顺铂的敏感性

李德涛 吴艳凤 薛成军 侯玉磊 陈 辉*

(重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

摘要 转化生长因子- β 1(transforming growth factor-beta 1, TGF- β 1)与肿瘤的发生、发展以及凋亡关系密切, DNA甲基化关键酶DNMTs(DNA methyltransferases)在肿瘤发生及耐药中发挥重要作用, SPARC(secreted protein acidic and rich in cysteine)常因异常甲基化而表达下调。为探究肺癌对顺铂耐受的分子机制, 该研究以肺腺癌A549细胞为研究对象, 通过外源TGF- β 1作用A549细胞, 利用RT-PCR检测TGF- β 1作用后DNMTs和SPARC mRNA水平的变化以及A549细胞增殖能力和对顺铂敏感性的影响。结果显示: 5 ng/mL、10 ng/mL TGF- β 1作用24 h后, A549细胞DNMT1 mRNA表达均显著下调($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$), SPARC mRNA表达均显著上调($P < 0.001$ 、 $P < 0.001$); 5 ng/mL、10 ng/mL TGF- β 1作用后的A549细胞对顺铂的IC₅₀均显著低于对照组[(12.34 \pm 0.36) μ mol/L、(10.93 \pm 0.69) μ mol/L, 对照组为(21.54 \pm 1.21) μ mol/L; $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$]; 5 ng/mL、10 ng/mL TGF- β 1作用后的A549细胞在顺铂环境中, 其克隆数显著低于空白对照; 15 μ mol/L顺铂作用24 h时, 5 ng/mL、10 ng/mL TGF- β 1组细胞凋亡分数均显著高于空白对照($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。结果提示: TGF- β 1可下调A549细胞DNMT1的表达, 进而上调抑癌基因SPARC并增加其对顺铂的敏感性, 成功逆转肺腺癌A549细胞的恶性表型。该研究为进一步阐明肺癌对顺铂的耐受机制提供了新的思路。

关键词 TGF- β 1; DNMT1; A549细胞; 顺铂

TGF- β 1 Regulated the A549 Cells Sensitivity to Cisplatin through DNMT1

Li Detao, Wu Yanfeng, Xue Chengjun, Hou Yulei, Chen Hui*

(Clinical Laboratories, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract TGF- β 1 is closely associated with the occurrence, development and apoptosis of carcinogenesis. As the key regulative enzyme of DNA methylation, DNMTs play an important role in the occurrence of tumor and drug-resistance. The expression of SPARC in tumor is always reduced for aberrantly methylation. In order to demonstrate the resistive mechanism of cisplatin, human lung adenocarcinoma A549 cells were cultured. After treated with TGF- β 1, the changes of DNMTs and SPARC mRNA levels were detected by RT-PCR, and the effect of TGF- β 1 on A549 cell's viability and sensitivity to cisplatin were evaluated too. Results showed that after treated with 5 ng/mL and 10 ng/mL TGF- β 1 for 24 h, mRNA expressions of DNMT1 were reduced greatly ($P < 0.01$, $P < 0.001$), and SPARC were increased greatly ($P < 0.001$, $P < 0.001$); After exposed to different concentrations of cisplatin for 24 h, the IC₅₀

收稿日期: 2014-03-24 接受日期: 2014-07-08

重庆市自然科学基金(批准号: cstc2012jjA10105)和国家临床重点专科建设项目经费[财社2010(305)号]资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89012033, E-mail: chen1970chen@yahoo.com

Received: March 24, 2014 Accepted: July 8, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (Grant No.cstc2012jjA10105) and the National Key Clinical Specialties Construction Project of China [Grant No.2010(305)]

*Corresponding author. Tel: +86-23-89012033, E-mail: chen1970chen@yahoo.com

网络出版时间: 2014-09-19 10:46 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0086.html>

of 5 ng/mL and 10 ng/mL TGF- β 1 groups [(12.34 \pm 0.36) μ mol/L, (10.93 \pm 0.69) μ mol/L] were decreased greatly than that of negative control [(21.54 \pm 1.21) μ mol/L] (P <0.01, P <0.01). The clone formation number of 5 ng/mL and 10 ng/mL TGF- β 1 groups were decreased greatly than that of negative control with different concentrations of cisplatin; The apoptosis fractions of 5 ng/mL and 10 ng/mL TGF- β 1 groups were obviously higher than that of negative control (P <0.05, P <0.01) with 15 μ mol/L cisplatin for 24 h. The present study indicated that TGF- β 1 could decrease the expression of *DNMT1* in A549 cells, then increase its sensitivity to cisplatin with the higher expression of *SPARC*, and finally, reverse the malignant phenotype of A549 cells successfully. These findings provide a new idea for further study on the cisplatin-resistance mechanism of lung cancer.

Key words TGF- β 1; DNMT1; A549 cell; cisplatin

肺癌是临床上发病率和死亡率极高的一种恶性肿瘤,其中80%是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[1-2]。由于其发病隐匿,三分之二的病人在诊断初期就高度转移并失去了手术的机会,以顺铂为基础的化疗方案能有效延缓病程,显著提高患者生存率。但随之出现的药物耐受,很大程度上减缓了药效,不仅增加了患者的负担,甚至加速患者的死亡。因此,研究肺癌对顺铂的耐受机制、寻找逆转肺癌对顺铂耐受的起始点和关键点显得极为重要。

转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是一种多效细胞因子,广泛参与细胞的增殖、分化、凋亡等过程^[3]。DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)是甲基化表观修饰的关键酶。此前报道显示, TGF- β 1通过调控DNMTs改变前列腺癌细胞的侵袭性^[3]。Nagaraju等^[4]在胰腺癌的研究中发现,抑制DNMTs的表达可以恢复抑癌基因*SPARC*(secreted protein acidic and rich in cysteine)的表达,增加胰腺癌细胞PNAC-1对化疗药物5-氟尿嘧啶的敏感性。TGF- β 1能否通过DNMTs及*SPARC*改变肺癌细胞的恶性表型,并调控其对顺铂的敏感性,至今未见报道。基于此,本研究拟通过外源性TGF- β 1作用肺腺癌A549细胞,初步探究TGF- β 1对DNMTs、*SPARC*的调控以及肺腺癌A549细胞对顺铂敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺腺癌A549细胞由重庆医科大学附属第一医院邱峰教授惠赠。

1.1.2 试剂 RPMI-1640培养基、新生小牛血清购自美国Hyclone公司;顺铂购自山东齐鲁制药有限公司;

TGF- β 1购自PeproTech公司;MTT购自美国Sigma公司;RNA提取试剂盒、逆转录酶以及Taq DNA聚合酶购自TaKaRa公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和外源性TGF- β 1作用 用含10%小牛血清的RPMI-1640培养基在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养A549细胞24 h。选择对数生长期的A549细胞,0.25%胰酶消化贴壁生长的A549细胞,用RPMI-1640培养基中和、收集细胞,离心弃上清, RPMI-1640培养基重悬,牛鲍氏计数板计数。按 2.5×10^5 /孔铺6孔板,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养24 h。换含1%小牛血清的RPMI-1640培养基在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养24 h。分别用5 ng/mL和10 ng/mL两个浓度的外源性TGF- β 1作用24 h,用于后续实验,并设立空白对照组(negative control group, NC)。

1.2.2 RT-PCR检测*DNMT1*及*SPARC*的表达水平 用Trizol法提取各组细胞总RNA,分光光度法检测RNA浓度,参照文献[3,5]设计引物,取400 ng总RNA,按TaKaRa逆转录试剂盒说明书合成cDNA序列,然后按以下步骤进行PCR反应:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,58 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。GAPDH以相同条件反应35个循环。PCR产物在2%的琼脂糖凝胶中120 V恒压电泳35 min。

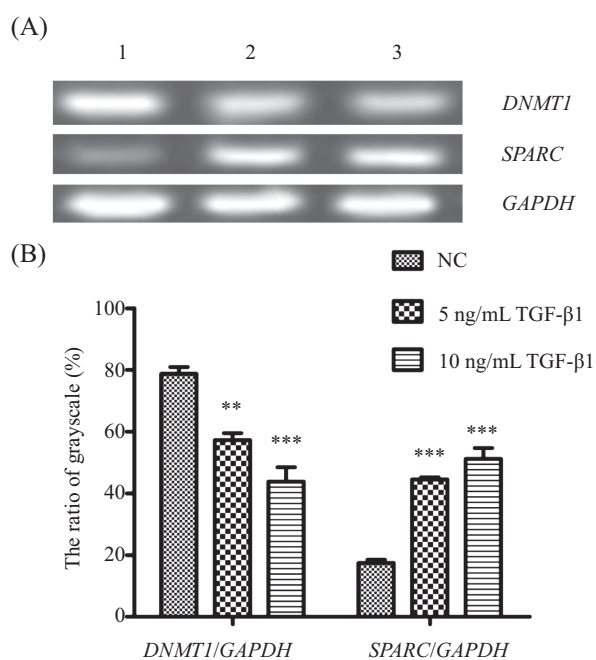
1.2.3 MTT法检测细胞活力并计算IC₅₀ 选择经不同浓度TGF- β 1作用24 h的A549细胞,按 5×10^3 /孔初始细胞密度铺96孔板,并设空白调零孔。每个药物浓度设5个平行孔。常规培养24 h后,加入顺铂使终浓度分别为:0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ mol/L。培养20 h以后每孔加5 mg/mL的MTT试剂20 μ L,继续培养4 h,弃细胞培养液,每孔加150 μ L DMSO,避光摇床震荡10 min,酶标仪在490 nm波长处读取吸光度,计算IC₅₀。

1.2.4 细胞克隆形成实验 选择经不同浓度TGF- β 1作用24 h后的A549细胞,按 5×10^3 /孔的初始细胞密度铺12孔板,培养24 h后,分别给予0, 2, 20 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂作用24 h。连续培养5 d,弃去细胞培养液,用PBS缓冲液清洗2次,甲醇避光固定15 min,流水缓慢冲洗2次,结晶紫染色5 min,流水缓缓冲去染液,待干燥后计数各组克隆形成数。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 选择经不同浓度TGF- β 1处理24 h后的细胞,按 2×10^5 /孔铺6孔板,常规培养24 h,给予15 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂继续培养24 h,消化收集细胞,PBS洗3次,800 r/min离心5 min,收集细胞。加入500 μL 的Binding buffer悬浮细胞并加入5 μL Propidium Iodide,混匀,室温条件下避光反应15 min,然后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3 统计学处理

所有实验至少重复3次,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。



A: 不同浓度TGF- β 1作用24 h后DNMT1、SPARC在mRNA水平的变化。1: NC组; 2: 5 ng/mL TGF- β 1组; 3: 10 ng/mL TGF- β 1组; B: 不同浓度TGF- β 1作用24 h后DNMT1、SPARC与GAPDH的灰度比值。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与NC组比较。

A: the mRNA changes of DNMT1 and SPARC after treated with different concentrations of TGF- β 1 for 24 h. 1: NC group; 2: 5 ng/mL TGF- β 1 group; 3: 10 ng/mL TGF- β 1 group; B: the ratio of DNMT1 or SPARC to GAPDH after treated with different concentrations of TGF- β 1 for 24 h. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NC group.

图1 不同浓度TGF- β 1作用后DNMT1和SPARC在mRNA水平的变化

Fig.1 The mRNA changes of DNMT1 and SPARC after treated with different concentrations of TGF- β 1

不同实验组之间的比较用 F 检验,所有数据用SPSS 19.0软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

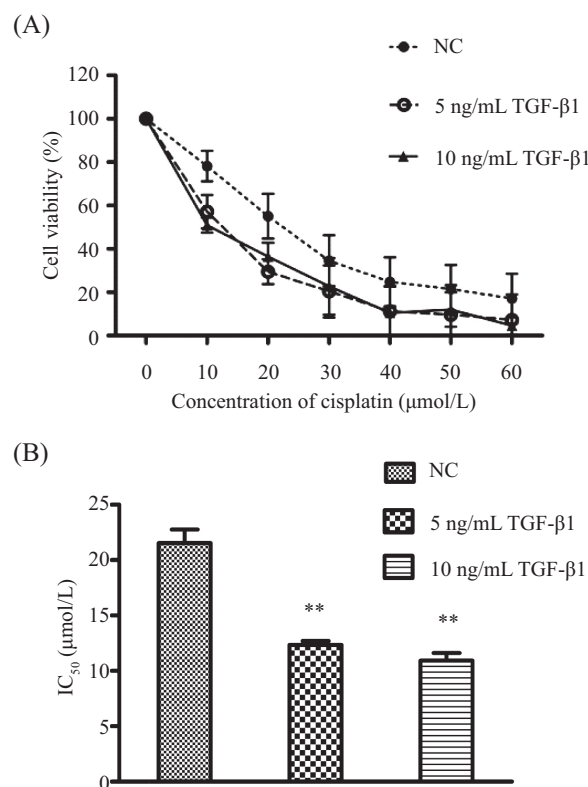
2 结果

2.1 TGF- β 1对A549细胞DNMT1及SPARC的作用

5 ng/mL TGF- β 1、10 ng/mL TGF- β 1作用A549细胞24 h后, DNMT1 mRNA水平较空白对照组显著下降($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$),而 SPARC mRNA水平显著升高($P < 0.001$ 、 $P < 0.001$)。5 ng/mL TGF- β 1和10 ng/mL TGF- β 1组之间 DNMT1和 SPARC的 mRNA表达无显著差异($P > 0.05$, 图1)。

2.2 TGF- β 1对A549细胞活力及顺铂IC₅₀的影响

5 ng/mL、10 ng/mL TGF- β 1作用A549细胞24 h以后,在不同浓度的顺铂培养液中,细胞活力均显著低于NC,但5 ng/mL TGF- β 1组、10 ng/mL TGF- β 1组



A: 不同浓度顺铂作用后各组细胞活力的变化; B: 不同浓度顺铂作用24 h后各组IC₅₀的变化, ** $P < 0.01$, 与NC组比较。

A: the changes of cell viability among different groups; B: the changes of IC₅₀ among different groups with different concentrations of cisplatin for 24 h; ** $P < 0.01$ vs NC group.

图2 TGF- β 1对细胞活力及顺铂IC₅₀的影响

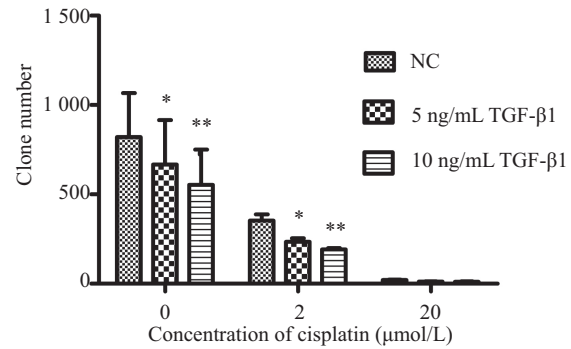
Fig.2 The effect of TGF- β 1 on cell viability and IC₅₀ of cisplatin

之间细胞活力无显著差异(图2A)。

空白对照组、5 ng/mL TGF- β 1组、10 ng/mL TGF- β 1组的 IC_{50} 分别是: (21.54 \pm 1.21) μ mol/L、(12.34 \pm 0.36) μ mol/L和(10.93 \pm 0.69) μ mol/L。其中, 5 ng/mL TGF- β 1、10 ng/mL TGF- β 1组 IC_{50} 显著低于NC组(P <0.01、 P <0.01), 5 ng/mL TGF- β 1组和10 ng/mL TGF- β 1组之间 IC_{50} 无显著差异(P >0.05, 图2B)。

2.3 TGF- β 1对A549细胞克隆形成能力的影响

在0 μ mol/L、2 μ mol/L顺铂作用下, 空白对照组细胞克隆形成数显著高于5 ng/mL TGF- β 1组和10 ng/mL TGF- β 1组, 差异具有统计学意义(P <0.05、 P <0.01); 5 ng/mL TGF- β 1组和10 ng/mL TGF- β 1组之

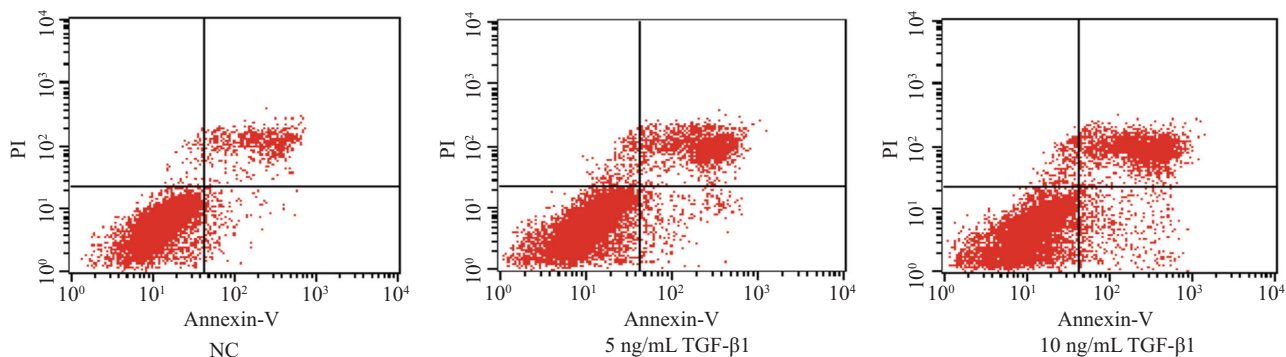


* P <0.05, ** P <0.01, 与NC组比较。

* P <0.05, ** P <0.01 vs NC group.

图3 TGF- β 1在不同浓度顺铂作用下对克隆形成能力的影响

Fig.3 The effect of TGF- β 1 on the clone forming ability with different concentrations of cisplatin



各组凋亡分数分别为: NC组, (2.23 \pm 0.16)%; 5 ng/mL TGF- β 1组, (2.94 \pm 0.24)%; 10 ng/mL TGF- β 1组, (4.58 \pm 0.28)%。

The apoptosis fractions as follow: NC group, (2.23 \pm 0.16)%; 5 ng/mL TGF- β 1 group, (2.94 \pm 0.24)%; 10 ng/mL TGF- β 1 group, (4.58 \pm 0.28)%.

图4 TGF- β 1对顺铂诱导的凋亡能力的影响

Fig.4 The effect of TGF- β 1 on apoptosis induced by cisplatin

间克隆形成数无显著差异(P >0.05); 在20 μ mol/L顺铂作用下, 三组之间无显著差异(P >0.05, 图3)。

2.4 TGF- β 1对顺铂诱导的A549细胞凋亡能力的影响

在15 μ mol/L顺铂作用下, 5 ng/mL TGF- β 1组和10 ng/mL TGF- β 1组的凋亡分数较NC组显著增加(P <0.05、 P <0.01); 5 ng/mL TGF- β 1组和10 ng/mL TGF- β 1组有显著差异(P <0.05, 图4)。

3 讨论

在发展中国家, 肺癌是导致男性死亡率最高的肿瘤。由于大部分患者在初诊时已发生转移, 5年生存率往往低于15%^[2]。以顺铂为基础药物的联合化疗作为肺癌的主要治疗方案^[6], 能够有效地减缓疾病进程, 提高患者的5年生存率。但顺铂耐受的出现, 导致治疗效果不好, 其毒副作用突显, 给患者带来极

大的痛苦。因此, 研究肺癌对顺铂的耐受机制显得尤为重要。TGF- β 1作为一种多效细胞因子, 广泛参与多种类型细胞的发展、转移及凋亡过程。其在肿瘤的不同进程中发挥着抑制和促进肿瘤生长两种不同的作用^[7]。DNA异常甲基化与肿瘤发生、发展以及肿瘤化疗耐药的产生有很大的关系^[8], 虽有研究证实, TGF- β 1在前列腺癌中能够改变DNMTs的表达^[3], 但TGF- β 1和DNMT1与肺癌对顺铂化疗耐受的关系尚未见报道。

本研究利用不同浓度的外源TGF- β 1作用A549细胞24 h后发现: *DNMT1* mRNA表达下调; A549细胞对顺铂的 IC_{50} 减小, 凋亡分数增大; 在一定顺铂浓度下, 细胞克隆形成能力显著降低。这提示在A549细胞中, TGF- β 1可能通过抑制DNMT1的表达增加其对顺铂的敏感性。多效细胞因子TGF- β 1在肿瘤的进展中主要发挥两种不同的作用, 在早期抑制肿

瘤细胞的生长、促进凋亡,而在中晚期则发挥促进细胞迁移和血管生成等作用^[9]。Zhang等^[3]在前列腺癌的研究中利用TGF- β 1诱导前列腺癌细胞CaP中DNMT1、DNMT3a、DNMT3b的表达,进而增加前列腺癌细胞CaP的侵袭性。Perlman等^[10]在肝癌的研究中利用不同浓度的TGF- β 1作用AML12细胞发现,TGF- β 1经Fas受体蛋白Daxx调控JNK的表达而诱导细胞的凋亡。Gajewska等^[11]研究发现,给予2 ng/mL TGF- β 1的刺激即能检测牛乳腺癌细胞的自噬和凋亡标志物MAP1、LAC3和Beclin1显著增加,进而引起牛乳腺癌细胞的凋亡;我们在肺癌中发现,TGF- β 1发挥着促进凋亡、抑制增殖的作用。

DNMT1作为DNA甲基化调控的关键调控酶之一,其在肺癌患者中表达往往增加。徐洪涛等^[12]运用组织芯片和免疫组化技术比较84例肺癌组织及健康人肺组织发现,肺癌组织中的DNMT1的阳性表达率显著高于健康人肺组织,并且DNMT1的表达与肺癌病理类型、低分化和淋巴转移相关。Xing等^[13]运用实时荧光定量PCR技术检测了148个NSCLC肿瘤标本,发现DNMT1高表达的NSCLC患者预后较差,均表明DNMT1与肺癌的发生发展密切相关。本研究采用外源性TGF- β 1作用A549细胞,成功地下调了DNMT1的表达,并最终影响其对顺铂的敏感性。Mutze等^[14]在胃癌的研究中也得到了类似的结果,发现83%的患者癌组织DNMT1高表达,而DNMT1低表达的胃癌患者,对治疗往往有较好的应答性和较高的生存率;在顺铂耐受的胃癌细胞株AGS中,利用发夹RNA技术下调基因DNMT1的表达,与DNMT1阻断剂地西他滨的协同作用,显著地逆转了AGS细胞对顺铂的耐药性。Nagaraju等^[4]在胰腺癌细胞株PANC-1中发现,利用姜黄素类似物EF31、Mi-aPaCa-2抑制DNMT1的表达导致抑癌基因SPARC、P16和E-cadherin的表达上调,进而抑制胰腺癌细胞株PANC-1的增殖。这均表明, DNMT1参与调控多种肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。我们在肺癌中首次发现DNMT1的这一作用受TGF- β 1的调控。

SPARC是一种与生长、重塑和组织修复有关的基质细胞糖蛋白。SPARC作为一种抑癌基因,在卵巢癌^[15]、胰腺癌^[16]和急性髓系白血病^[17]等中的研究较多。Tang等^[18]通过在直肠癌MIP101细胞中转导SPARC重组质粒,发现caspase-8信号通路增强,并且MIP101对5-氟尿嘧啶的敏感性增强。Pan等^[19]在肺

癌细胞中利用非固醇类抗炎药(NS398)的启动子脱甲基化作用恢复SPARC的表达,并减弱肺癌细胞的侵袭性。我们在肺癌的研究中首次发现,SPARC可在TGF- β 1的作用下经DNMT1表达上调,从而增加A549细胞对顺铂的敏感性。

综上,本研究初步证实外源性TGF- β 1通过下调DNMT1恢复其下游抑癌基因SPARC的表达,增加肺癌A549细胞对顺铂的敏感性。我们的结果首次提示:TGF- β 1 \rightarrow DNMT1 \rightarrow SPARC可能是TGF- β 1调控肺癌对顺铂敏感性的通路之一,这将为研究肺癌对顺铂化疗耐受提供新的思路,有助于进一步阐明肺癌对顺铂耐受的分子机制,有望为化疗药物的设计提供新的靶点。

参考文献 (References)

- 1 Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64(1): 9-29.
- 2 Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2010; 60(5): 277-300.
- 3 Zhang Q, Chen L, Helfand BT, Jang TL, Sharma V, Kozlowski J, *et al*. TGF- β regulates DNA methyltransferase expression in prostate cancer, correlates with aggressive capabilities, and predicts disease recurrence. *PLoS One* 2011; 6(9): e25168.
- 4 Nagaraju GP, Zhu S, Wen J, Farris AB, VN, Diaz R, *et al*. Novel synthetic curcumin analogues EF31 and UBS109 are potent DNA hypomethylating agents in pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2013; 341(2): 195-203.
- 5 Jiang Y, Zhu Y, Shi Y, He Y, Kuang Z, Sun Z, *et al*. Downregulation of SPARC expression inhibits the invasion of human trophoblast cells *in vitro*. *PLoS One* 2013; 8(7): e69079.
- 6 Monroy-Estrada HI, Chirino YI, Soria-Mercado IE, Sánchez-Rodríguez J. Toxins from the Caribbean sea anemone *Bunodopsis globulifera* increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2013; 19(1): 12.
- 7 Wakefield LM, Roberts AB. TGF-hsignaling: Positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(1): 22-9.
- 8 Chang X, Monitto CL, Demokan S, Kim MS, Chang SS, Zhong X, *et al*. Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers. *Cancer Res* 2010; 70(7): 2870-9.
- 9 Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol* 2011; 223(2): 205-18.
- 10 Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. TGF- β -induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 2001; 3(8): 708-14.
- 11 Gajewska M, Gajkowska B, Motyl T. Apoptosis and autophagy induced by TGF-B1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56 Suppl 3: 143-57.
- 12 徐洪涛,王佐舟,刘 娣,李庆昌,戴顺东,王恩华. DNMT1高表达与beta-catenin蓄积及肺鳞癌、腺癌的恶性表型相关. 中国

- 肺癌杂志 (Xu Hongtao, Wang Zuozhou, Liu Di, Li Qingchang, Dai Shundong, Wang Enhua. High expression of DNMT1 was correlated with beta-catenin accumulation and malignant phenotype of lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Chin J Lung Cancer* 2010; 13(9): 856-60.
- 13 Xing J, Stewart DJ, Gu J, Lu C, Spitz MR, Wu X, *et al.* Expression of methylation-related genes is associated with overall survival in patients with non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2008; 98(10): 1716-22.
- 14 Mutze K, Langer R, Schumacher F, Becker K, Ott K, Novotny A, *et al.* DNA methyltransferase 1 as a predictive biomarker and potential therapeutic target for chemotherapy in gastric. *Eur J Cancer* 2011; 47(12): 1817-25.
- 15 Yiu GK, Chan WY, Ng SW, Chan PS, Cheung KK, Berkowitz RS, *et al.* SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol* 2001; 159(2): 609-22.
- 16 Puolakkainen PA, Brekken RA, Muneer S, Sage EH. Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis. *Mol Cancer Res* 2004; 2(4): 215-24.
- 17 DiMartino JF, Lacayo NJ, Varadi M, Li L, Saraiya C, Ravindranath Y, *et al.* Low or absent SPARC expression in acute myeloid leukemia with MLL rearrangements is associated with sensitivity to growth inhibition by exogenous SPARC protein. *Leukemia* 2006; 20(3): 426-32.
- 18 Tang MJ, Tai IT. A Novel Interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. *J Biol Chem* 2007; 282(47): 34457-67.
- 19 Pan MR, Chang HC, Chuang LY, Hung WC. The nonsteroidal anti-inflammatory drug NS398 reactivates SPARC expression via promoter demethylation to attenuate invasiveness of lung cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233(4): 456-62.