

SPARC基因过表达对卵巢癌淋巴结高转移细胞生物学特性的影响

谢一泓¹ 钟艳平² 王琪¹ 李力¹ 张新颖² 阮和云² 黎丹戎^{1*}

(¹广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021; ²广西医科大学医学科学实验中心, 南宁 530021)

摘要 该研究旨在探讨富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白基因(secreted protein acidic and rich in cysteine gene, SPARC)过表达对卵巢癌淋巴结高转移细胞(SKOV3-PM4)生物学特性的影响。构建SPARC基因的慢病毒表达载体并转染SKOV3-PM4细胞, Real-time PCR和Western blot验证转染后的表达效率, 激光共聚焦免疫荧光进行蛋白的细胞定位, 细胞计数法和集落形成实验测定细胞增殖能力, 流式细胞仪检测细胞周期, Transwell小室实验测定细胞体外侵袭、迁移能力。实验结果显示, SPARC蛋白存在于核周及胞质; 过表达SPARC基因后, SKOV3-PM4细胞增殖受到明显抑制($P<0.05$); 细胞周期检测结果显示, 各期改变无明显差异; 体外侵袭、迁移实验结果显示, SKOV3-PM4细胞侵袭、迁移能力显著降低($P<0.05$)。实验结果表明, SPARC基因在卵巢癌淋巴结转移中可能发挥抑癌基因的生物学作用。

关键词 卵巢肿瘤; 淋巴结转移; SPARC基因

The Effect of SPARC Gene Over-expression on Biological Characteristics of Human Ovarian Carcinoma Cells with Directional High Lymphatic Metastasis

Xie Yihong¹, Zhong Yanping², Wang Qi¹, Li Li¹, Zhang Xinying², Ruan Heyun², Li Danrong^{1*}

(¹Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

²Medical Scientific Research Centre of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of secreted protein acidic and rich in cysteine gene (SPARC) overexpression on biological characteristics of human ovarian carcinoma cells with directional high lymphatic metastasis (SKOV3-PM4). SPARC gene coding region was cloned into lentivirus vector. Lentivirus particles were infected into SKOV3-PM4 cells to upregulate the expression of SPARC gene. The expression level of SPARC was detected at both mRNA and protein levels by Real-time PCR and Western blot. The protein distribution was observed by cell immunofluorescence under laser confocal microscopy. The proliferative ability of SKOV3-PM4 cells was detected by cell counting method and colony formation test, and the cell cycle was measured by flow cytometry. The abilities of cell invasion and migration were examined by Transwell assay. The results showed that SPARC was in perinuclear region and the cytoplasm. Compared with

收稿日期: 2014-11-25 接受日期: 2015-01-06

国家自然科学基金(批准号: 81060218、81360502)和广西自然科学基金(批准号: 2014GXNSFAA118161)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0771-5358131, E-mail: danrongli@163.com

Received: November 25, 2014 Accepted: January 6, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81060218, 81360502) and the Guangxi Natural Science Foundation (Grant No.2014GXNSFAA118161)

*Corresponding author. Tel: +86-771-5358131, E-mail: danrongli@163.com

网络出版时间: 2015-03-05 16:58 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150305.1658.001.html>

the untransfected cells, cell growth curve and cell colony formation showed that the proliferative ability of SKOV3-PM4-SPARC cells was significantly inhibited ($P < 0.05$). There were no significant differences in cell cycle distribution. The invasion and migration capabilities of SKOV3-PM4-SPARC were also significantly decreased ($P < 0.05$). The abilities of proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells with directional high lymphatic metastasis were inhibited by *SPARC* gene over-expression. *SPARC* gene may play an important role in biological function as a tumor suppressor gene.

Keywords ovarian neoplasms; lymphatic metastasis; *SPARC* gene

卵巢癌是常见的女性生殖系统恶性肿瘤之一^[1], 死亡率高, 淋巴结转移是其肿瘤扩散的主要途径, 也是影响患者预后的重要因素^[2]。近年来研究发现, 富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC), 一种富含半胱氨酸的低分子糖蛋白, 参与细胞更新、组织重塑修复、胚胎发育、血管生成等, 能调节细胞增殖分化、抗黏附, 与肿瘤的发生发展、浸润转移关系密切。研究表明, SPARC在卵巢癌、乳腺癌、食管癌、黑色素瘤、胃癌等多种肿瘤中异常表达。本课题组前期通过抗体芯片、质谱分析和数据库检索发现, SPARC表达下调与卵巢癌淋巴结转移密切相关^[3]。由于目前对SPARC基因与卵巢癌淋巴结转移的关系及影响知之甚少, 该实验采用体外转染的方法使SPARC基因在卵巢癌淋巴结高转移细胞中过表达, 探讨SPARC基因在卵巢癌淋巴结转移过程中的生物学功能, 为阐明卵巢癌淋巴结转移发生发展的机制及开发针对性治疗提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞和质粒 卵巢癌淋巴结高转移细胞(SKOV3-PM4)(系本课题组自建, 并经生物学鉴定^[4])、大肠埃希菌感受态细胞DH-5 α 、人胚肾上皮细胞系293T和pH1、pH2质粒由广西医科大学医学科学实验中心肿瘤实验室保存。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640培养基、胎牛血清购自美国Corning公司; Trizol、Lipofectamine 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司; *Mlu* I和*Xho* I内切酶、DNA Marker、T4 DNA连接酶、PCR引物合成、逆转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; SPARC单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; GAPDH内对照抗体、二抗购自美国Abcam公司; FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)购自美国

Roche公司。纤连蛋白(fibronectin, FN)、Transwell穿膜小室和人工基膜基质凝胶Matrigel购自美国Corning Costar公司。

1.2 方 法

1.2.1 构建SPARC基因表达载体并包装慢病毒颗粒

检索GeneBank中SPARC(NM_003118.3)序列, 设计SPARC基因引物, 使用*Mlu* I和*Xho* I作为限制性内切酶酶切位点引入引物, 载体通用引物扩增。PCR反应总体系为25 μ L, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 57 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共30个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 产物于4 $^{\circ}$ C保存。1%琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物。纯化、回收产物, 送华大基因公司测定DNA序列, 测序结果与NCBI中SPARC基因序列行比对分析, 证明所获目的基因片段准确无误。回收纯化后, 用T4 DNA连接酶连接载体与目的基因, 将连接产物转化大肠埃希菌DH-5 α 感受态细胞, 用含100 μ g/mL氨苄青霉素的琼脂糖平板培养基于37 $^{\circ}$ C培养16 h, 挑选单克隆菌落, 接种于含氨苄青霉素的LB液中, 37 $^{\circ}$ C振荡培养16~20 h, 提取质粒。重组质粒采用PCR和双酶切法鉴定阳性的重组质粒并进行测序。

将重组慢病毒表达质粒与包装质粒pH1、pH2按Lipofectamine 2000操作说明共转染293T细胞, 同时将空载质粒与包装质粒pH1、pH2按Lipofectamine 2000操作说明共转染293T细胞。转染36 h后观察绿色荧光。转染48 h后收集细胞培养上清, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min离心10 min, 取上清即为病毒液, 用0.45 μ m滤器过滤后, -80 $^{\circ}$ C保存。

1.2.2 细胞培养和转染 卵巢癌淋巴结高转移细胞SKOV3-PM4常规培养于含10%胎牛血清RPMI-1640培养液中, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的饱和湿度培养箱中培养。在6孔板中接种处于对数生长期的SKOV3-PM4细胞, 待细胞生长至密度为90%进行转染, 加入病毒液, 轻轻震荡混匀培养, 24 h后弃去培养液, 更换

含10%血清的培养液继续培养。转染48 h的细胞进行嘌呤霉素(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)筛选,建立稳定过表达SPARC基因的细胞株。实验共分3组:空白对照组(不予任何转染处理的细胞)、阴性对照组[转染不含目的基因的空载体细胞(SKOV3-PM4-EGFP)]和实验组[转染SPARC基因的细胞(SKOV3-PM4-SPARC)]。

1.2.3 Real-time PCR检测SPARC mRNA表达水平

收集对数生长期细胞,提取总RNA,反转录为cDNA,采用Real-time PCR检测SPARC mRNA的表达水平。SPARC引物序列如下:上游引物为:5'-GCA GCA ATG ACA ACA AGA CCT-3';下游引物为:5'-ATT CGG TCA GCT CAG AGT CCA-3';GAPDH引物序列如下:上游引物为:5'-GTC AAG GCT GAG AAC GGG AA-3',下游引物为:5'-AAA TGA GCC CCA GCC TTC TC-3'。两步法行实时荧光定量:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min;之后95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min,共40个循环。每次在延伸阶段读取吸光度值。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法统计相对表达水平。

1.2.4 提取的总蛋白进行Western blot检测SPARC蛋白的表达水平 采用BCA法测定蛋白浓度。根据目的蛋白分子量大小配制分离胶和浓缩胶,等胶凝固好后,将其放入电泳槽中,加入足够的电泳液后准备上样,蛋白上样量为100 μg 。电泳结束后,使用转移电泳装置,冰浴200 mA恒流条件下电转100 min,将蛋白转移到PVDF膜上,用封闭液封闭已经转好的PVDF膜2 h,以SPARC或GAPDH抗体于4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育PVDF膜12 h, PBST洗膜3次,每次10 min。室温孵育PVDF膜2 h于辣根过氧化物酶共价的二抗, PBST洗膜3次,每次10 min。滴入化学发光液,凝胶图像处理系统观察并分析结果。

1.2.5 激光共聚焦免疫荧光观察SPARC细胞定位

将细胞浓度调整为 $1\times 10^5/\text{mL}$ 制备细胞爬片,进入对数生长期后弃培养液,预冷甲醇固定10 min, PBS清洗 3×10 min, 封闭液封闭玻片1 h后,室温2 h孵育一抗, PBS清洗玻片,室温避光孵育二抗2 h, 孵育DAPI 5 min, 封片剂封片,激光共聚焦显微镜观察。

1.2.6 细胞计数法绘制细胞生长曲线 取对数生长期的细胞,制成单细胞悬液,细胞密度为 $1\times 10^5/\text{mL}$ 。各组细胞接种于24孔板中,每孔100 μL ,设3个复孔。从接种当日起,每日同一时间从培养箱中取出细胞,胰酶消化细胞,计数板计数,共计数7 d,并绘制细胞生长曲线。按 $DT=t\times[\lg 2/(\lg N_t-\lg N_0)]$ (t 为培养时间,

N_t 为 t 时间后的细胞数, N_0 为接种细胞24 h后进行计数的细胞数)公式,计算细胞的倍增时间。

1.2.7 集落形成实验 将SKOV3-PM4、SKOV3-PM4-EGFP和SKOV3-PM4-SPARC细胞以1 000/孔的密度接种于6孔板,每组平行设3个复孔;将细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养14 d,中途换液观察细胞状态,终止培养后PBS洗涤3次,甲醇固定后, PBS洗涤3次, Giemsa染色,以 >50 个细胞数做为一个集落,光学显微镜计数集落数并拍照。

1.2.8 流式细胞术检测细胞周期变化 取对数生长期的细胞,将细胞浓度调至 $1\times 10^6/\text{mL}$,1 000 r/min离心5 min,用70%乙醇固定, PBS洗涤2次。用RNA酶(终浓度为0.05 g/L)处理30 min,加碘化丙啶(PI)避光染色30 min。流式细胞仪分析细胞周期各期的比例。

1.2.9 细胞体外侵袭能力测定 消化SKOV3-PM4、SKOV3-PM4-EGFP和SKOV3-PM4-SPARC三组对数生长期的细胞,将细胞浓度调整至 $5\times 10^4/\text{mL}$,取各组细胞悬液200 μL 分别接种于上层小室内,在下层小室加入含有20%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育24 h后取出滤膜,擦去Matrigel胶,甲醇固定20 min, Giemsa染色。显微镜观察并计数穿膜细胞数。

1.2.10 细胞体外迁移能力测定 除Transwell小室上室的聚碳酸滤膜表面未铺Matrigel基质胶外,其他实验操作与体外细胞侵袭能力实验步骤相同。

1.3 统计学方法

采用SPSS 16.0统计学软件对各实验结果进行分析。数据用均数 \pm 标准差(mean \pm S.D.)表示,组间比较用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

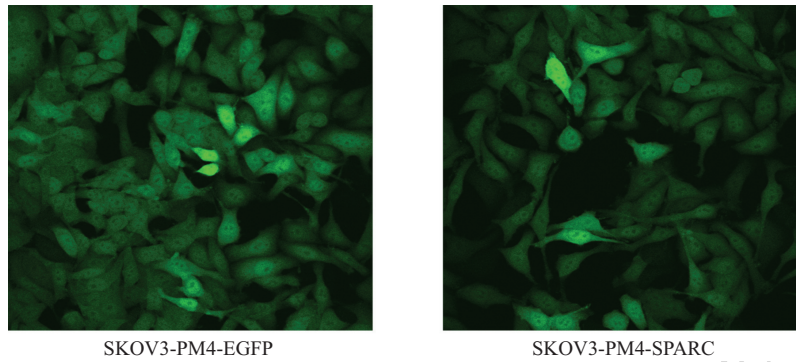
2 结果

2.1 慢病毒颗粒包装结果

倒置显微镜观察慢病毒转染,经嘌呤霉素筛选稳定表达绿色荧光GFP标记的SKOV3-PM4-EGFP、SKOV3-PM4-SPARC细胞(图1)。

2.2 SPARC基因过表达效率验证

SKOV3-PM4-SPARC细胞SPARC基因的表达强度是SKOV3-PM4-EGFP细胞的324.9倍、是SKOV3-PM4细胞的3.7倍,差异有统计学意义($P<0.05$,表1和图2A)。Western blot检测SPARC蛋白表达效率证实,SKOV3-PM4和SKOV3-PM4-EGFP细胞中SPARC的表达较弱,而SKOV3-PM4-SPARC细胞的SPARC表



SKOV3-PM4-EGFP

SKOV3-PM4-SPARC

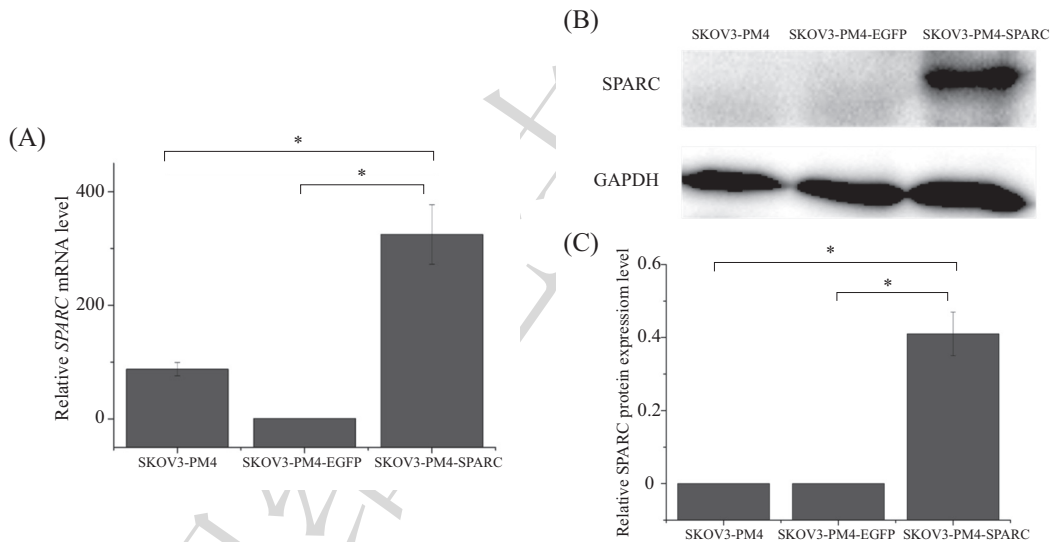
图1 慢病毒转染后荧光标记的细胞(200×)

Fig.1 The fluorescence-labeled cells of lentivirus transfection (200×)

表1 SPARC mRNA相对表达情况

Table 1 SPARC mRNA relative expression levels

| 组别 | 循环阈值(SPARC) | 循环阈值(GAPDH) | 相对表达量(SPARC) |
|-----------------|-------------|-------------|--------------------------------|
| Group | Ct(SPARC) | Ct(GAPDH) | $2^{-\Delta\Delta C_t}(SPARC)$ |
| SKOV3-PM4 | 21.07±0.21 | 14.82±0.47 | 87.80±11.79 |
| SKOV3-PM4-EGFP | 27.82±0.23 | 15.11±0.25 | 1 |
| SKOV3-PM4-SPARC | 20.84±0.39 | 16.47±0.14 | 324.93±52.37 |

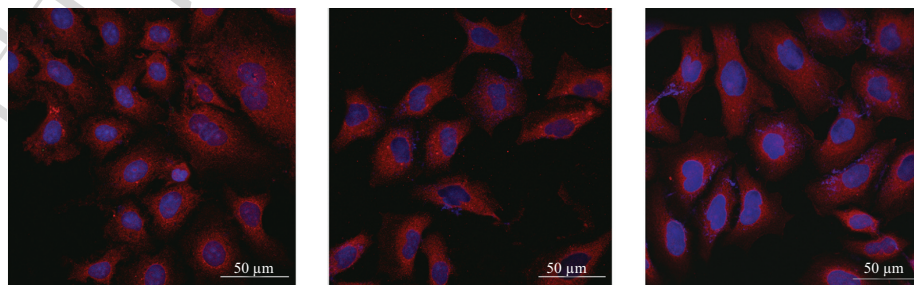


A: SPARC基因表达水平, $*P < 0.05$; B、C: SPARC蛋白表达水平。

A: relative SPARC mRNA level, $*P < 0.05$; B, C: the expression of SPARC protein level.

图2 SPARC基因和蛋白的表达水平

Fig.2 Expression level of SPARC gene and protein



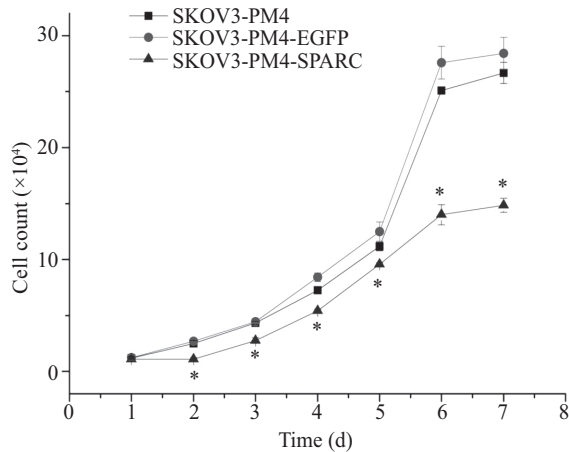
SKOV3-PM4

SKOV3-PM4-EGFP

SKOV3-PM4-SPARC

图3 SPARC蛋白位于核周及胞质

Fig.3 Distribution of SPARC protein in perinuclear region and the cytoplasm



* $P < 0.05$, 与SKOV3-PM4和SKOV3-PM4-EGFP组相比较。

* $P < 0.05$ vs SKOV3-PM4 group and SKOV3-PM4-EGFP group.

图4 *SPARC*基因过表达对SKOV3-PM4细胞生长的影响 (mean±S.D.)

Fig.4 Effect of *SPARC* over-expression on the proliferation of SKOV3-PM4 cells (mean±S.D.)

达明显增强($P < 0.05$, 图2B)。

2.3 细胞免疫荧光结果

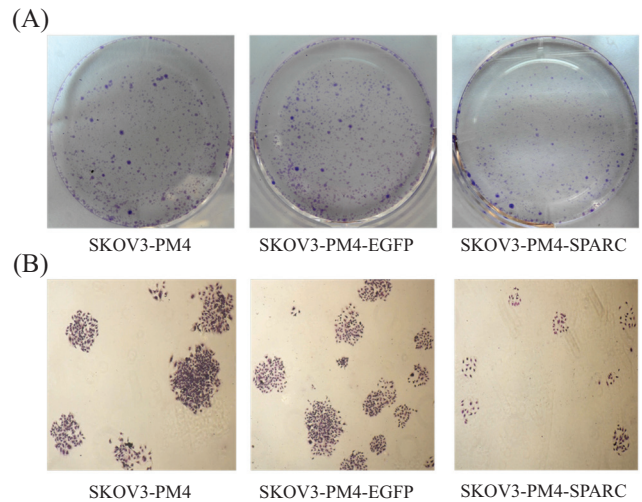
细胞免疫荧光测定 *SPARC*蛋白的细胞定位。结果显示, *SPARC*蛋白存在于核周及胞质(图3)。

2.4 *SPARC*基因表达对SKOV3-PM4细胞生长的影响

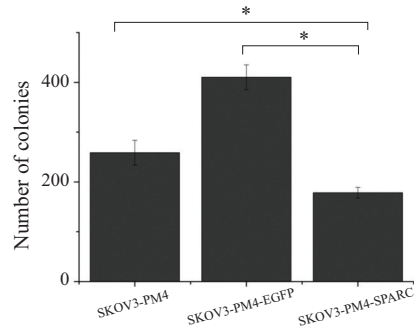
自第2 d起, 转染 *SPARC*基因的SKOV3-PM4细胞生长状态受到明显抑制, 第2~7 d检测差异有统计学意义($P < 0.05$, 图4)。SKOV3-PM4、SKOV3-PM4-EGFP和SKOV3-PM4-SPARC的细胞倍增时间分别为(37.20±1.87) h、(37.19±1.83) h和(44.54±2.89) h ($P < 0.05$), 过表达 *SPARC*的SKOV3-PM4细胞细胞倍增时间明显延长, 表明 *SPARC*具有抑制SKOV3-PM4细胞增殖的功能。

2.5 *SPARC*基因过表达对SKOV3-PM4细胞集落形成能力的影响

集落形成实验结果显示, SKOV3-PM4-SPARC细胞集落形成数为(178.33±10.69), 明显低于SKOV3-



(C)



A: 细胞集落形成(Giemsa染色); B: 集落形成形态(40×); C: SKOV3-PM4-SPARC细胞集落形成数降低, * $P < 0.05$ 。

A: the colonies were stained by Giemsa; B: the cellular morphology of colony formatting (40×); C: the number of colonies of SKOV3-PM4-SPARC cells were decreased. * $P < 0.05$.

图5 *SPARC*基因过表达对SKOV3-PM4细胞集落形成能力的影响 Fig.5 Effect of *SPARC* over-expression on cloning formation ability of SKOV3-PM4 cells

PM4细胞(258.67±24.83)和SKOV3-PM4-EGFP细胞(410.33±25.03), 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图5)。

2.6 *SPARC*基因过表达对细胞周期的影响

SKOV3-PM4-SPARC细胞与SKOV3-PM4和SKOV3-PM4-EGFP细胞相比较, 各期改变不明显, 差异无统计学意义(表2和图6)。

2.7 细胞体外侵袭能力测定

SKOV3-PM4、SKOV3-PM4-EGFP和SKOV3-

表2 *SPARC*基因过表达对SKOV3-PM4细胞周期分布的影响(mean±S.D., %)

Table 2 Effect of *SPARC* over-expression on cycle distribution in SKOV3-PM4 cells (mean±S.D., %)

| 组别 | G ₁ 期 | G ₂ 期 | S期 |
|-----------------|----------------------|----------------------|------------|
| Group | G ₁ phase | G ₂ phase | S phase |
| SKOV3-PM4 | 64.25±0.98 | 16.11±0.06 | 19.65±1.04 |
| SKOV3-PM4-EGFP | 69.06±0.61 | 11.33±0.95 | 19.62±0.35 |
| SKOV3-PM4-SPARC | 71.87±0.82 | 10.86±0.35 | 17.27±0.47 |

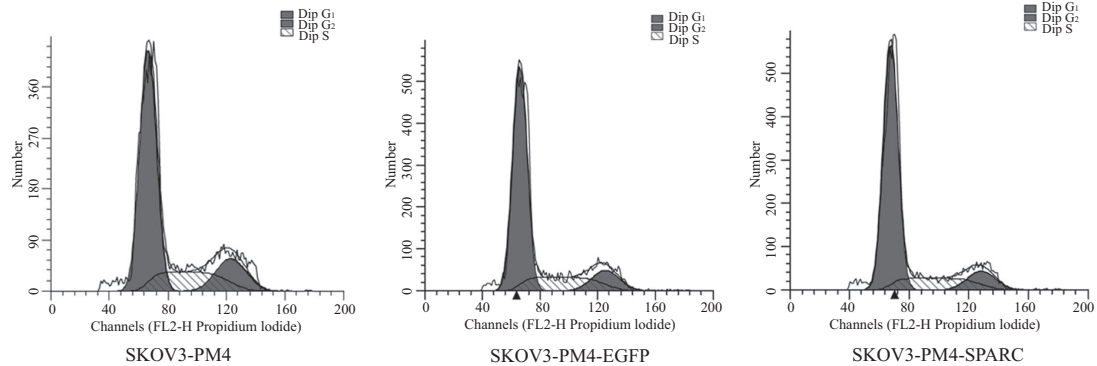
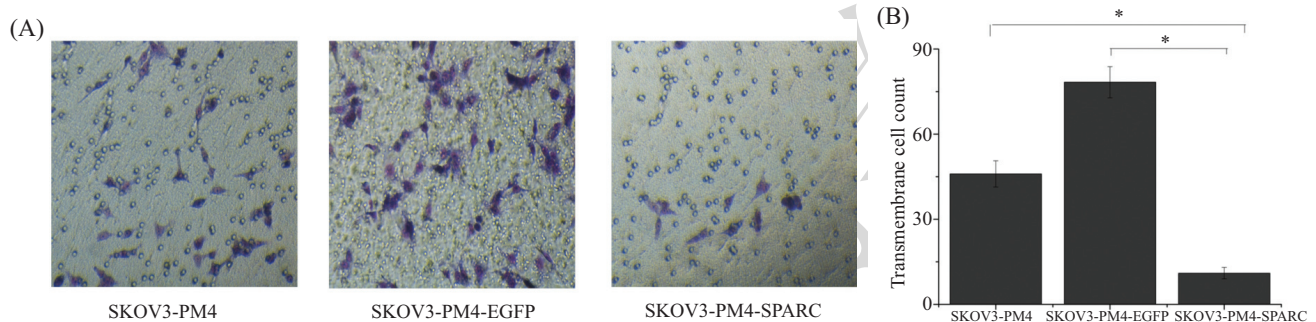


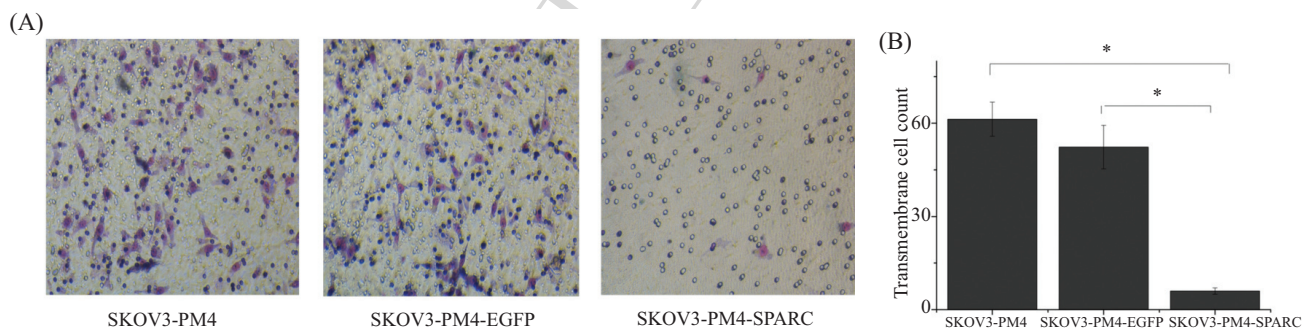
图6 流式细胞仪检测细胞周期峰型图
Fig.6 Peak type figures of flow cytometric analysis



A: 穿膜细胞Giemsa染色(200×); B: 各细胞侵袭能力的改变, * $P < 0.05$ 。

A: transmembrane cells were stained by Giemsa (200×); B: changes in invasion ability, * $P < 0.05$.

图7 *SPARC*基因过表达对SKOV3-PM4细胞侵袭能力的影响
Fig.7 Effect of *SPARC* over-expression on invasion ability of SKOV3-PM4 cells



A: 穿膜细胞Giemsa染色(200×); B: 各细胞迁移能力的改变, * $P < 0.05$ 。

A: transmembrane cells were stained by Giemsa (200×); B: changes in migration ability, * $P < 0.05$.

图8 *SPARC*基因过表达对SKOV3-PM4细胞迁移能力的影响
Fig.8 Effect of *SPARC* over-expression on migration ability of SKOV3-PM4 cells

PM4-SPARC穿膜细胞数目分别为(46.0±4.6)、(78.3±5.5)和(11.0±2.0), 过表达*SPARC*的SKOV3-PM4体外侵袭能力显著降低($P < 0.05$)(图7)。

2.8 细胞体外迁移能力测定结果

SKOV3-PM4、SKOV3-PM4-EGFP和SKOV3-PM4-SPARC穿膜细胞数目分别为(61.3±5.5)、(52.3±7.0)和(6.0±1.0), 过表达*SPARC*的SKOV3-PM4体外迁移能力显著降低($P < 0.05$)(图8)。

3 讨论

*SPARC*是具有多种生物学功能、分布广泛的分泌性基质蛋白, 参与组织分化重塑、修复及细胞更新、血管生成等过程^[5-6], 与多种肿瘤的发生发展有密切关系^[7]。*SPARC*被分泌到基质中, 与细胞因子(如 β -FGF、VEGF、PDGF、TGF- β 等^[8-11])相互作用, 通过调节细胞因子的活性影响细胞的增殖。研究发现, 上皮细胞-间充质细胞转化(epithelial-mes-

enchymal transition, EMT)过程是正常细胞失去极性而向恶性肿瘤转化的重要过程, SPARC的表达改变与EMT过程密切相关。肉瘤样肾细胞癌中, 其EMT过程伴随SPARC的表达上调^[12], 而口腔鳞癌及其转移灶中, SPARC表达上调随EMT过程减弱^[13]。已有的研究表明, SPARC具有组织特异性, 在不同肿瘤中作用不同, 甚至起到相反作用, 如在黑色素瘤、乳腺癌中可促进肿瘤细胞增殖; 而在食管癌、胰腺癌、前列腺癌中, SPARC起到抑制肿瘤细胞增殖作用, 这可能与SPARC本身及其蛋白水解产物在组织重塑及生长中起双向调节作用有关^[5]。研究表明, 人卵巢癌细胞中的SPARC可通过抑制整合素 α_v 、 β_1 、 β_3 和 β_5 亚基的表达, 抑制肿瘤的黏附及增殖, 并通过抑制FAK、MAPK信号通路抑制肿瘤生长^[14]。本课题组前期通过建立裸鼠体内荷人卵巢癌SKOV3细胞并在其淋巴结转移中克隆出亚系, 即具有淋巴结对高转移潜能的亚克隆第四代SKOV3-PM4细胞^[4]与人淋巴管内皮细胞共培养, 采用抗体芯片和iTRAQ-2D-LC-MALDI-TOF/TOF/MS方法检测各组细胞培养基中的蛋白, 筛选出差异明显的分泌蛋白并对其行生物信息学分析, 实验发现, 卵巢癌淋巴结对高转移的细胞SPARC蛋白低表达^[3]。因此, 本研究通过基因转染的方法在卵巢癌淋巴结对高转移细胞SKOV3-PM4上调SPARC基因的表达, 以证实SPARC基因过表达对肿瘤细胞生物学特性的影响, 明确SPARC在卵巢癌淋巴结对转移的发生和发展中所起的作用。研究结果表明: SPARC蛋白存在于核周及胞质; 过表达SPARC基因的细胞增殖生长受到明显抑制, 细胞倍增时间延长, 集落形成能力减弱。以上提示, SPARC在卵巢癌淋巴结对转移发生、发展中可能作为抑癌基因发挥生物学作用。

侵袭迁移是恶性肿瘤的基本生物学特征, 肿瘤细胞可通过自身形态改变和分泌各种蛋白酶降解胞外基质从而促进细胞移动。具有淋巴结对高转移潜能的亚克隆第四代SKOV3-PM4细胞与亲本细胞SKOV3相比, EMT过程明显, MMP2分泌增多, 迁移速率增加^[15-16]。而有研究发现, SPARC与多种肿瘤的侵袭迁移密切相关, 最重要的是其与基质金属蛋白酶(MMPs)的相互作用。敲除SPARC基因的肺癌和卵巢癌小鼠易于发生腹腔转移且其MMPs浓度增高, 促进基底膜降解^[9]。本研究利用Transwell体外侵袭迁移实验, 模拟体内基膜中的IV型胶原和层黏连

蛋白等成分, 研究SPARC对肿瘤细胞侵袭迁移能力的影响。实验结果表明, 过表达SPARC后细胞穿膜数显著减少, 提示SPARC可抑制卵巢癌淋巴结对高转移细胞的侵袭和迁移, 这可能与SPARC促进细胞变形、调节细胞的黏附以及细胞外基质和基质金属蛋白酶的产生等作用相关^[17]。

综上所述, SPARC在卵巢癌淋巴结对转移的发生发展中起抑制作用, 可为卵巢癌淋巴结对转移的病因、预防、治疗等提供新靶点。但这种作用可能是多种因素共同作用所致, 由于本研究仅通过体外培养细胞株进行观察, 其体内作用及机制尚有待于进一步的深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Jemal A, Bray F, Melissa M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- 2 Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: Integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 355-66.
- 3 Zhang XY, Yin FQ, Liu L, Gao T, Ruan HY, Guan X, et al. Effects of HLEC on the secreted proteins of epithelial ovarian cancer cells prone to metastasize to lymph nodes. *Cancer Boil Med* 2013; 10(4): 221-6.
- 4 阮和云, 黎丹戎, 李力, 冠潇, 张玮. 卵巢上皮性癌淋巴道定向高转移细胞系的建立及其生物学特性的鉴定. *中华妇产科杂志* (Ruan Heyun, Li Danrong, Li Li, Guan Xiao, Zhang Wei. Establishment of human ovarian carcinoma cell lines with directional highly lymphatic metastasis and study of their biological characteristics. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology*) 2007; 42(7): 482-6.
- 5 Said NA, Elmarakby AA, Imig JD, Fulton DJ, Motamed K. SPARC ameliorates ovarian cancer-associated inflammation. *Neoplasia* 2008; 10(10): 1092-104.
- 6 Schellings MW, Vanhoutte D, Swinnen M, Cleutjens JP, Debets J, Leeuwen RE, et al. Absence of SPARC results in increased cardiac rupture and dysfunction after acute myocardial infarction. *J Exp Med* 2009; 206(1): 113-23.
- 7 Tai IS, Tang MJ. SPARC in cancer biology: Its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist Updat* 2008; 11(6): 231-46.
- 8 Socha MJ, Said N, Dai Y, Kwong J, Ramalingam P, Trieu V, et al. Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia* 2009; 11(2): 126-35.
- 9 Said N, Socha MJ, Olearczyk JJ, Elmarakby AA, Imig JD, Motamed K. Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC. *Mol Cancer Res* 2007; 5(10): 1015-30.
- 10 Mantoni TS, Schendel RR, Rodel F, Niedobitek G, Al-assar O, Masamune A, et al. Stromal SPARC expression and patient survival after chemoradiation for non-resectable pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(11): 1806-15.
- 11 Brune K, Hong SM, Li A, Yachida S, Abe T, Griffith M, et al. Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers.

- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17(12): 3536-42.
- 12 Conant JL, Peng Z, Evans MF, Naud S, Cooper K. Sarcomatoid renal cell carcinoma is an example of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Pathol* 2011; 64(12): 1088-92.
- 13 Vered M, Dayan D, Yahalom R, Dobriyan A, Barshack I, Bello IO, *et al.* Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 127(6): 1356-62.
- 14 Said N, Najwer I, Motamed K. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) inhibits integrin-mediated adhesion and growth factor-dependent survival signaling in ovarian cancer. *Am J Pathol* 2007; 170(3): 1054-63.
- 15 卢迎新, 高婷, 陈艳华, 张新颖, 李力, 谢一泓, 等. 卵巢上皮性癌淋巴结高转移细胞和脐静脉内皮细胞交互和共同培养后细胞特征的变化. *中华妇产科杂志*(Lu Yingxin, Gao Ting, Chen Yanhua, Zhang Xinying, Li Li, Xie Yihong, *et al.* Characteristics change of the human directional highly lymphatic metastasis ovarian carcinoma cell and venous endothelial cell after establishment of their condition culture and co-culture cell system. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2014; 49(7): 510-5.
- 16 刘丽, 黎丹戎, 钟艳平, 李力, 高婷, 阮和云, 等. 卵巢癌细胞与卵巢癌淋巴定向高转移细胞分泌蛋白差异初筛. *中华肿瘤防治杂志*(Liu Li, Li Danrong, Zhong Yanping, Li Li, Gao Ting, Ruan Heyun, *et al.* Screening for lymphatic metastasis-associated differentially expressed secretory protein in ovarian carcinoma cell lines with directional highly lymphatic metastasis. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment* 2013; 20(14): 1053-6.
- 17 Rotlant J, Liu D, Yan YL, Postlethwait JH, Westerfield M, Du SJ. **Sparc (Osteonectin) functions in morphogenesis of the pharyngeal skeleton and inner ear.** *Matrix Biol* 2008; 27(6): 561-72.

中国细胞生物学