

## SPARC 通过竞争性结合胶原蛋白抑制 DDR2 的活化

卜 歆<sup>1</sup>, 于江天<sup>1</sup>, 张淑雅<sup>2</sup>, 赵 虎<sup>1</sup>, 苏 金<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710032; <sup>2</sup>宁夏医科大学生物化学与分子生物学教研室, 宁夏 银川 750004)

**[摘要]** 目的 探讨富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC)是否与盘状结构域受体2(DDR2)竞争性结合胶原蛋白,并观察SPARC对DDR2磷酸化水平的影响。方法 采用转染小干扰RNA的方法下调人前列腺癌细胞PC-3中DDR2的表达,观察对该细胞中SPARC mRNA表达水平的影响。在HEK293T细胞中同时过表达SPARC和DDR2,在有无胶原蛋白刺激的情况下,通过免疫沉淀及Western blot法检测DDR2磷酸化水平的变化。结果 下调DDR2会引起SPARC mRNA和蛋白表达水平显著下降;而SPARC能够抑制胶原蛋白刺激的DDR2磷酸化。结论 SPARC很可能通过竞争性结合胶原蛋白来抑制DDR2的活化。

**[关键词]** DDR2; SPARC; 胶原蛋白; 细胞外基质

**[中图分类号]** R392-33, Q279, Q74 **[文献标志码]** A

富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(secreted protein, acidic and rich in cysteine; SPARC),又称为骨连接蛋白、BM40等,是一个富含半胱氨酸的细胞外基质糖蛋白<sup>[1]</sup>。多种细胞如骨、角质形成细胞、神经母细胞、成骨细胞、眼视网膜细胞、软骨细胞等均可分泌SPARC。绝大多数SPARC是一种分泌蛋白,在细胞质合成后,进入高尔基体,在信号肽的引导下,分泌到细胞外。作为一种免疫系统相关的基因,SPARC可通过调节细胞增殖、分化、迁移以及细胞与细胞外基质的相互作用等,参与机体的多种生理和病理过程<sup>[2]</sup>。例如,SPARC可通过降解细胞外基质、抗黏附以及促进血管生成促进肿瘤转移和增殖<sup>[3]</sup>;调节多种干细胞的自我更新和增殖分化;以及调节细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相互作用、促进成纤维细胞增殖分化<sup>[4]</sup>从而加速肺纤维化进程等。

盘状结构域受体2(discoidin domain receptor 2, DDR2)属于受体酪氨酸激酶成员,主要表达于肺、骨骼肌、心肌、肾和皮肤等<sup>[5]</sup>。其主要配体为I型、III型和X型等胶原纤维。当DDR2与胶原配体结合后,活化自身的酪氨酸残基,导致下游信号分子的活化,介导细胞与ECM的信号转导,在多细胞生物的发育、肿瘤、关节炎、动脉粥样硬化以及肺纤维化等过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。

近来研究表明SPARC可特异性的结合胶原蛋白的GVMGFO基序<sup>[7]</sup>,而DDR2结合胶原蛋白的位点

也是GVMGFO基序<sup>[8]</sup>,提示二者之间可能存在竞争性结合胶原蛋白的关系。本研究通过过表达DDR2和SPARC,探讨在胶原蛋白刺激下SPARC对DDR2磷酸化的影响,以分析DDR2结合胶原蛋白的效率是否受到相应影响。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 人前列腺癌细胞PC-3细胞和人肾上皮细胞系HEK293T细胞均为本室保存所有。pcDNA3.1myc-his(-)-Sparc和pSecTag2B-Flag-myc-Ddr2两种质粒由本室构建并保存。DMEM培养基、胎牛血清购自HyClone公司;TRIzol、实时荧光定量PCR试剂盒、反转录试剂盒购自TaKaRa公司;Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司;I型胶原蛋白(collagen I)购自Roche公司;4G10 mAb购自Millipore公司;c-Myc mAb和protine G购自南京金斯瑞生物科技公司;近红外荧光素标记的山羊抗鼠IgG购自LI-COR公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 人前列腺癌细胞PC-3和人肾上皮细胞系HEK293T的培养** PC-3细胞和HEK293T细胞都用含有100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每2~3 d换液1次,用2.5 g/L的胰酶消化传代。

**1.2.2 siRNA序列的设计和合成** 根据NCBI基因数据库里人DDR2的mRNA序列(GenBank No: NM\_006182),设计人的DDR2干涉序列,为si-DDR2正义链:5'-CUAGAUGGCCU-UGGUGUCUUAC-3';反义链:5'-GUAAGACACCAAGCCAUC-UAG-3'。siRNA序列的合成由上海吉玛制药技术有限公司完成。

**1.2.3 siRNA的转染** 将PC-3细胞接种于6孔板上,待细胞生

收稿日期: 2013-02-08; 接受日期: 2013-04-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81100044; 30901335; 31100787); 国家重点基础研究发展计划(973)(2010CB529705)

作者简介: 卜 歆(1983-),女,陕西西安人,助教,硕士

Tel: 029-84774516-17; E-mail: julia0102@126.com

\* Corresponding author, 苏 金, E-mail: sujin923@fmmu.edu.cn



长汇合至 70%~80% 时, 按照 Lipofectamine™ 2000 的使用说明按照实验步骤进行转染。同时设阴性对照 NC。转染 8 h 后换液, 48 h 后收细胞。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 DDR2 的 mRNA 表达水平**  
用 TRIzol 法提取分别转染了 si-DDR2 和无关对照 (NC) 的 PC-3 细胞的总 RNA, 核酸蛋白测定仪确定 RNA 浓度后用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 检测 *Ddr2* 和 *Sparc* 的表达。*Ddr2* 上游引物序列: 5'-CTCCCA-GAATTTGCTCCAG-3', 下游引物序列: 5'-GCCACATCTTTTC-CTGAGA-3', 扩增产物长度为 191 bp。*Sparc* 上游引物序列: 5'-AGAAGGTGTCAGCAATGAC-3', 下游引物序列: 5'-TG-TAGTCCAGGTGGAGCTTG-3', 扩增产物长度为 111 bp。内参 GAPDH 上游引物序列: 5'-TTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3', 下游引物序列: 5'-CAGGCGCCAATACGACCAAATC-3', 扩增产物长度为 110 bp。由北京奥科生物技术有限责任公司合成。实时荧光定量 PCR 的反应体系为: SYBR® Premix Ex Taq™ (2 ×) 12.5 μL, Rox (50 ×) 0.5 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL, 双蒸水 10 μL, 总体系 25 μL。

**1.2.5 质粒的转染** 将 HEK293T 细胞接种于 6 孔板上, 当细胞长汇合至 60%~70% 时, 按照 Lipofectamine™ 2000 的使用说明进行转染。将 pcDNA3.1myc-his(-)-*Sparc* 和 pSecTag2B-Flag-myc-*Ddr2* 这两种质粒共转染 HEK293T 细胞, 同时将 pSecTag2B-Flag-myc-*Ddr2* 质粒转染 HEK293T 细胞为阳性对照, 未转染的 HEK293T 细胞为阴性对照。转染 8 h 后换液。

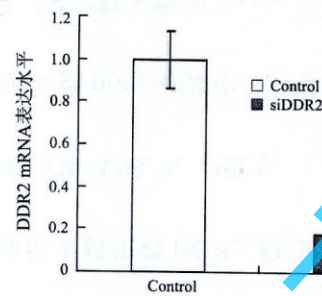
**1.2.6 免疫共沉淀** 转染 16~18 h 后消化细胞, 共转染的细胞接种在预先铺有 I 型胶原蛋白的 6 孔板上, 转染 pSecTag2B-Flag-myc-*ddr2* 质粒的细胞分别接种在未铺和铺有 I 型胶原蛋白的 6 孔板上, 未转染的细胞接种在铺有 I 型胶原蛋白的 6 孔板上。待细胞贴壁后弃去培养液, 用 1 × PBS 洗 3 次, 每孔加 500 μL 的免疫共沉淀裂解液 (IP Lysis buffer), 冰上放置 10 min 后用细胞刮刮下细胞, 12 000 r/min 离心 10 min, 分别吸取 50 μL 上清, 加 5 μL 10 × 上样缓冲液煮沸 10 min 后冻存于 -20℃ 待用。其余上清分别加入 1 μg c-Myc mAb, 置于 4℃ 孵育过夜, 12 h 后分别加 30 μL 蛋白 G 4℃ 孵育 1 h, 12 000 r/min 离心 30 s 后吸弃上清, 用 800 μL 免疫共沉淀裂解液洗沉淀 4 次, 吸尽上清后加 20 μL 2 × 上样缓冲液振荡混匀, 煮沸 10 min 后离心取上清冻存于 -20℃ 待用。

**1.2.7 Western blot 法检测 DDR2 蛋白磷酸化** 将免疫沉淀后的样品以及对照样品做 Western blot, 100 g/L 的 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转于 NC 膜上。50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入小鼠抗 4G10 mAb (1:1 000), 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 10 min × 3 次; 加入 Dylight 680 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:10 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 10 min × 3 次。使用 Odyssey 远红外成像系统对膜上的荧光信号进行检测。

## 2 结果

**2.1 siRNA 干扰效果的检测** PC-3 细胞转染 siRNA 48 h 后收细胞, 进行实时荧光定量 PCR 检测 (图 1), 表明 *Ddr2* 的 mRNA 表达水平受到了显著抑制, 干涉

效果明显。

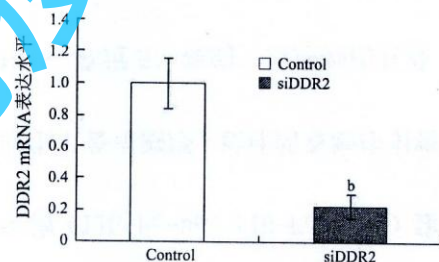


<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs control.

图 1 *Ddr2* mRNA 表达水平的变化

## 2.2 干涉 *Ddr2* 后检测 *Sparc* 的 mRNA 表达变化

因为 DDR2 和 SPARC 都可特异性的结合胶原蛋白的 GVMGFO 基序, 当 PC-3 细胞转染 siRNA 干涉成功后, 检测 *Sparc* 的 mRNA 表达变化。结果显示, 当 *Ddr2* 被干涉之后, *Sparc* 的 mRNA 表达水平也发生了显著的下降 (图 2)。

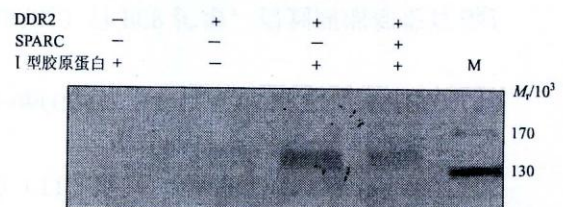


<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs control.

图 2 *Sparc* mRNA 表达水平的变化

## 2.3 SPARC 对 DDR2 磷酸化水平的影响

将 pcDNA3.1myc-his(-)-*Sparc* 和 pSecTag2B-Flag-myc-*Ddr2* 两种质粒共转染 HEK293T 细胞后, 以单独转染 pSecTag2B-Flag-myc-*Ddr2* 质粒的 HEK293T 细胞为阳性对照, 免疫沉淀后 Western blot 法检测 DDR2 的磷酸化水平 (图 3)。结果显示 SPARC 能够显著抑制胶原蛋白活化后 DDR2 的磷酸化水平。



M: 蛋白  $M_r$  marker.

图 3 SPARC 可抑制 I 型胶原蛋白介导的 DDR2 磷酸化

## 3 讨论

DDR2 属于一类特殊的受体型蛋白酪氨酸激酶



(RTK), 结构上含有胞外盘状结构域(DR)、一段较长的邻跨膜区和具有催化活性的胞质内蛋白酪氨酸激酶区<sup>[9]</sup>。DDR2 分子的 DR 形成了空间结构上相邻的三个 loops, 负责与配体-纤维型胶原蛋白的结合, 从而介导 DDR2 的活化<sup>[9]</sup>。活化后的 DDR2 则可通过介导细胞分泌基质金属蛋白酶<sup>[10]</sup>、促进细胞增殖<sup>[11]</sup>及成骨细胞分化<sup>[12]</sup>、参与类风湿关节炎<sup>[13]</sup>等病理过程来发挥其参与细胞外基质重建及组织修复等功能。

SPARC 是一种保守进化的糖蛋白, 可以调节细胞基质的相互作用, 并且可以和胶原蛋白相结合<sup>[15]</sup>。SPARC 是胶原蛋白形成 ECM 过程中的重要的因子, 尤其在成人组织纤维化胶原蛋白的沉积中具有重要作用。作为 IV 型胶原蛋白基底膜的伴侣蛋白, SPARC 对无脊椎动物的胚胎发育非常重要。缺失 SPARC 的小鼠会早发白内障、皮肤松弛和骨丢失, 这些表型起因于缺失 SPARC 会干扰胶原蛋白的原纤维合成和细胞黏附<sup>[16]</sup>。近年来, SPARC 在肿瘤免疫过程中发挥的免疫调节作用也愈来愈受到重视, 例如, 使用免疫调节药来那度胺治疗骨髓增生异常综合征后, SPARC 的表达显著上调被认为是该药发挥疗效的作用机制之一<sup>[17]</sup>; 而胶质母细胞瘤放疗后也可检测到 SPARC 的上调。

晶体衍射学实验证实 SPARC 具有可特异性结合胶原蛋白的 GVMGFO 基序, 而 DDR2 与胶原蛋白结合的位点也是 GVMGFO 基序, 结合前述的 SPARC、DDR2 的功能研究, 推测 DDR2 与 SPARC 之间很可能存在相互竞争结合胶原蛋白的关系。通过设计特异的 siRNA 干涉片段, 将细胞内 DDR2 的表达水平下调, 发现 SPARC 的表达也随之下调, 提示在细胞内水平, DDR2 可能参与促进 SPARC 的表达。而在共转染实验中, 经胶原蛋白刺激活化的 DDR2 的磷酸化水平能够被 SPARC 下调, 则提示 SPARC 能够抑制 DDR2 的活化。这种 DDR2 促进 SPARC 的表达, 而 SPARC 又反过来抑制 DDR2 活化的关系有可能是一种反馈抑制的机制, 因为 SPARC 是一种分泌蛋白, 可在信号肽的引导下分泌到细胞外。因此在细胞外, 受 DDR2 影响从而表达上调的 SPARC 可通过其 GVMGFO 基序特异地结合胶原蛋白, 从而减少 DDR2 与胶原蛋白的结合, 这种竞争结合胶原蛋白的现象使 DDR2 的磷酸化受到抑制, 促使其活性下调。DDR2、SPARC 与胶原蛋白的关系反映了细胞及 ECM 在信号转导方面的复杂联系, SPARC 通过竞争结合胶原蛋白来抑制 DDR2 活化可能在细胞外基质重建过程中发挥重要作用。

## 参考文献:

- [1] Cheng L, Sage EH, Yan Q. SPARC fusion protein induces cellular adhesive signaling[J/OA]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53202.
- [2] Atorrasagasti C, Peixoto E, Aquino JB, et al. Lack of the matricellular protein SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) attenuates liver fibrogenesis in mice[J/OA]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e54962.
- [3] Chen J, Wang M, Xi B, et al. SPARC is a key regulator of proliferation, apoptosis and invasion in human ovarian cancer[J/OA]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42413.
- [4] Shibata S, Ishiyama J. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is upregulated by transforming growth factor (TGF)-beta and is required for TGF-beta-induced hydrogen peroxide production in fibroblasts[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2013, 6(1): 6.
- [5] Kim D, You E, Min NY, et al. Discoidin domain receptor 2 regulates the adhesion of fibroblasts to 3D collagen matrices[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(5): 1113-1118.
- [6] Kawai I, Hisaki T, Sugura K, et al. Discoidin domain receptor 2 (DDR2) regulates proliferation of endochondral cells in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(3): 611-617.
- [7] Hohenester E, Sasaki T, Giudici C, et al. Structural basis of sequence-specific collagen recognition by SPARC[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(47): 18273-18277.
- [8] Caratelli F, Bihan D, Stathopoulos S, et al. Crystallographic insight into collagen recognition by discoidin domain receptor 2[J]. *Structure*, 2009, 17(12): 1573-1581.
- [9] Poudel B, Yoon DS, Lee JH, et al. Collagen I enhances functional activities of human monocyte-derived dendritic cells via discoidin domain receptor 2[J]. *Cell Immunol*, 2012, 278(1-2): 95-102.
- [10] Holt DW, Henderson ML, Stockdale CE, et al. Osteoarthritis-like changes in the heterozygous sedc mouse associated with the HtrA1-Ddr2-Mmp-13 degradative pathway: a new model of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(5): 430-439.
- [11] Herrera-Herrera ML, Quezada-Calvillo R. DDR2 plays a role in fibroblast migration independent of adhesion ligand and collagen activated DDR2 tyrosine kinase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 429(1-2): 39-44.
- [12] Kawai I, Hisaki T, Sugura K, et al. Discoidin domain receptor 2 (DDR2) regulates proliferation of endochondral cells in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(3): 611-617.
- [13] Zhang Y, Su J, Yu J, et al. An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation[J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(3): 604-617.
- [14] Ren T, Zhang J, Zhang J, et al. Increased expression of discoidin domain receptor 2 (DDR2): a novel independent prognostic marker of worse outcome in breast cancer patients[J/OA]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 397.
- [15] Guameri V, Dieci MV, Conte P. Enhancing intracellular taxane delivery: current role and perspectives of nanoparticle albumin-bound paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2012, 13(3): 395-406.
- [16] Atorrasagasti C, Peixoto E, Aquino JB, et al. Lack of the matricellular protein SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) attenuates liver fibrogenesis in mice[J/OA]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e54962.
- [17] Pellagatti A, Jadersten M, Forsblom AM, et al. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q-syndrome patients[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(27): 11406-11411.