

【基础研究】

通信作者:程振国(1971-),男,河南新乡人,学士,主任医师,研究方向:脑血管病、颅底肿瘤及功能性疾病;E-mail:2311430541@qq.com。

and its effect on proliferation and invasion of U87 cells. **Methods** The glioma tissues and adjacent tissues (from the edge of the tumor > 2 cm) from 73 patients with glioma were selected in Xinxiang Central Hospital from April 2011 to April 2017. The expressions of BAG3 protein in gliomas tissues and adjacent tissues were detected by immunohistochemistry. The human glioma U87 cells were cultured, and the U87 cells were randomly divided into siRNA-BAG3 group, siRNA-control sequence group and blank control group when the cell fusion degree was over 70%. The cells in the siRNA-BAG3 group were transfected with BAG3 interference sequence, and the cells in the siRNA-control sequence group were transfected with the negative control sequence, while the cells in the blank control group were not treated. The U87 cells were cultured for 48 hours after transfection. The expression of BAG3 mRNA in U87 cells was detected by real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. The expression of BAG3 protein in U87 cells was detected by Western blot. The proliferation of U87 cells was detected by cell counting kit-8. The cloning ability of U87 cells was detected by clone formation assay. The apoptosis of U87 cells was detected by flow cytometry. The invasion ability of U87 cells was detected by Transwell chamber. **Results** The high expression rate of BAG3 protein in glioma tissues was 73.97% (54/73), and the low expression rate was 26.03% (19/73). The high expression rate of BAG3 protein in adjacent tissues was 36.99% (27/73), and the low expression rate was 63.01% (46/73). The high expression rate of BAG3 protein in glioma tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($\chi^2 = 20.215$, $P < 0.05$). The expression of BAG3 protein in glioma tissues was not correlated with age, gender, tumor location, tumor diameter and Karnofsky score ($P > 0.05$); but the expression of BAG3 protein in glioma tissues was correlated with tumor grade ($P < 0.05$). The relative expression levels of BAG3 mRNA in U87 cells of siRNA-BAG3 group, siRNA-control sequence group and blank control group were 1.42 ± 0.11 , 2.17 ± 0.12 and 2.31 ± 0.18 , respectively; the relative expression levels of BAG3 proteins in U87 cells of siRNA-BAG3 group, siRNA-control sequence group and blank control group were 0.20 ± 0.12 , 0.84 ± 0.13 and 0.92 ± 0.12 , respectively. The relative expression levels of BAG3 mRNA and protein in U87 cells in siRNA-BAG3 group were significantly lower than those in the siRNA-control sequence group and the blank control group ($P < 0.05$); there was no significant difference in relative expression level of BAG3 mRNA and protein between siRNA-control sequence group and the blank control group ($P > 0.05$). When cultured for 24, 48, 72 and 96 hours, the proliferation ability of U87 cells in siRNA-BAG3 group was significantly higher than that in the siRNA-control sequence group and the blank control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the proliferation ability of U87 cells between siRNA-control sequence group and blank control group ($P > 0.05$). The number of clone of U87 cells in siRNA-BAG3 group, siRNA-control sequence group and blank control group was 30.76 ± 6.19 , 81.32 ± 3.55 and 85.07 ± 3.05 , respectively. The number of clone of U87 cells in siRNA-BAG3 group was significantly less than that in the siRNA-control sequence group and the blank control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the number of clone of U87 cells between the siRNA-control sequence group and the blank control group ($P > 0.05$). The apoptosis rates of U87 cells in the siRNA-BAG3 group, siRNA-control sequence group and blank control group were $(21.43 \pm 6.89)\%$, $(5.50 \pm 2.95)\%$ and $(7.37 \pm 3.31)\%$, respectively. The apoptosis rate of U87 cells in the siRNA-BAG3 group was significant higher than that in the siRNA-control sequence group and the blank control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in apoptosis rate of U87 cells between the siRNA-control sequence group and blank control group ($P > 0.05$). The number of invasive cells in the siRNA-BAG3 group, siRNA-control sequence group and blank control group was 116.92 ± 8.82 , 179.00 ± 11.64 and 172.48 ± 18.16 , respectively. The number of invasive cells in the siRNA-BAG3 group was significantly less than that in the siRNA-control sequence group and the blank control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the number of invasive cells between the siRNA-control sequence group and the blank control group ($P > 0.05$). **Conclusion** BAG3 protein is highly expressed in glioma tissues, and it was associated with malignancy. Specific silencing of BAG3 gene in human glioma U87 cells can effectively inhibit cell proliferation and invasion.

Key words: glioma; Bcl-2-associated anti-apoptosis gene 3; cell proliferation; cell invasion

胶质瘤是恶性程度最高的中枢神经系统肿瘤,其增殖能力强、浸润性生长,且与周边脑组织边界不清,患者中位生存时间约 1 a^[1]。目前,尽管临床诊断及治疗胶质瘤的技术不断进步,但患者预后并未明显改善^[2]。研究表明,胶质瘤的发生与进展是多基因、多步骤共同作用的结果^[3]。Bcl-2 相关抗凋亡基因 (Bcl-2-associated anti-apoptotic gene, BAG) 作为可与热休克蛋白 70 结合的一组伴侣蛋白家族,其与组织发育、细胞自噬、迁移、凋亡、骨架形成等多种生物学

功能密切相关^[4]。BAG3 是 BAG 家族的主要成员,研究表明,BAG3 在多种恶性肿瘤组织中呈高表达,在促进肿瘤细胞生长、抗凋亡、多药耐药等过程中发挥重要作用^[5]。本研究进一步探讨 BAG3 蛋白在胶质瘤组织中的表达,分析其与胶质瘤临床病理特征的关系,并利用小分子 RNA 干扰 (small interfering RNA, siRNA) 技术特异性沉默人胶质瘤 U87 细胞中 BAG3 基因,观察其对细胞增殖、凋亡和侵袭能力的影响,期为胶质瘤发病机制研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取 2011 年 4 月至 2017 年 4 月于新乡市中心医院神经外科手术切除的胶质瘤组织及癌旁组织(距瘤旁边缘 > 2 cm)标本各 73 例,男 39 例,女 34 例;年龄 19 ~ 77 (51.2 ± 10.4) 岁;肿瘤分级^[6]: I 级 6 例, II 级 22 例, III 级 17 例, IV 级 28 例。所有患者术前未接受放射治疗和化学治疗,术后经病理学检查确诊。胶质瘤组织及癌旁组织经甲醛固定,石蜡包埋保存。本研究通过医院医学伦理委员会批准,所有患者签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,兔抗人 BAG3 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,人胶质瘤 U87 细胞由新乡医学院基础医学院提供,达尔伯克改良伊格培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司, RNA 提取试剂盒和 Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,反转录和扩增试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, BAG3 和内参引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成, siRNA-BAG3 和 siRNA-对照序列由上海吉玛制药技术有限公司合成, 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自南京凯基生物科技股份有限公司, 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素标记/碘化丙啶 (annexin V-flourescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI) 凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, Transwell 小室购自美国 Coster 公司; 倒置相差显微镜购自上海绘统光学仪器有限公司, 实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购自美国 ABI 公司, 全自动凝胶电泳分析系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学法检测胶质瘤组织和癌旁组织中 BAG3 蛋白表达 取石蜡标本,连续切片,厚度约 5 μm,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,浸入 30 g · L⁻¹ 过氧化氢溶液中 20 min 以阻断内源性过氧化物酶;置于乙二胺四乙酸溶液中,微波加热至 98 ℃ 持续 15 min,冷却后加入山羊血清,室温下孵育 10 min;加入一抗(兔抗人 BAG3 多克隆抗体,稀释比例 1 : 1 200), 4 ℃ 过夜,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗 3 次;加入二抗,室温孵育 60 min;二氨基联苯胺染色,苏木精复染,脱水、透明、中性树脂封片;以 PBS 替代一抗作为阴性对照,光学显微镜下观察。每张切片均由 2 位病理科副主任医师独立完成阅片, BAG3 蛋白主要表达于细胞质和细胞膜。根据染色强度和阳性细胞比例采用半定量法进行评估^[7]: (1) 阳性细胞比例 ≤ 5% 为 0 分, 6% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分, > 75% 为 4 分; (2) 染色强度: 无染色为 0 分, 呈

淡黄色为 1 分, 呈黄棕色为 2 分, 呈棕黄或黄褐色为 3 分; (3) 以阳性细胞比例得分和染色强度得分的乘积对结果进行判定, 0 分为阴性, 1 ~ 6 分为弱阳性, > 6 分为强阳性; 以阴性或弱阳性作为 BAG3 蛋白低表达, 以强阳性作为 BAG3 蛋白高表达。

1.3.2 U87 细胞培养及分组 将 U87 细胞置于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 中, 于含体积分数 5% CO₂ 的 37 ℃ 恒温箱中培养。取对数生长期细胞, 胰蛋白酶消化, 接种于 6 孔板中培养, 待细胞融合度达 70% 以上时进行分组, 并利用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒转染: (1) siRNA-BAG3 组: 转染 BAG3 干扰序列 5'-AAGGUUCAGACCAUCUUGGAA-3'; (2) siRNA-对照序列组: 转染阴性对照序列 5'-CCGUAUCGUAAGCAGUACU-3'; (3) 空白对照组: 不作任何处理。转染后继续培养 48 h, 完成后续实验。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 法检测各组 U87 细胞中 BAG3 mRNA 表达 取各组转染后培养 48 h 的细胞, 胰蛋白酶消化, 加入细胞裂解液, 用 TRIzol 法获得各组细胞中总 RNA, 并检测总 RNA 纯度。取 10 μg 总 RNA 反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行扩增。引物序列: BAG3 上游引物序列为 5'-CATCCAG-GAGTGCTGAAAGTG-3', 下游引物序列为 5'-TCT-GAACCTTCCTGACACCG-3'; β-actin 上游引物序列为 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3', 下游引物序列为 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAG-3'。PCR 反应条件: 95 ℃ 10 min, 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 74 ℃ 30 s, 连续循环 38 次, 每个样本均设 3 个平行反应复孔。采用 2^{-ΔΔCt} 法获得各组细胞中 BAG3 mRNA 相对表达量。

1.3.4 Western blot 法检测 U87 细胞中 BAG3 蛋白表达 取各组转染培养 48 h 的细胞, 加入细胞裂解液, 用总蛋白提取试剂盒获得总蛋白, 用二喹啉甲酸法蛋白浓度检测试剂盒测定总蛋白浓度。取 60 μg 总蛋白, 应用 120 g · L⁻¹ 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至聚偏氟乙烯膜上, 室温下以 50 g · L⁻¹ 脱脂奶粉封闭 60 min, 将一抗兔抗人 BAG3 多克隆抗体按 1 : 500 稀释后加入, 4 ℃ 过夜孵育, 含 Tween-20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液洗涤 3 次, 将二抗按 1 : 5 000 稀释后加入, 室温下孵育 60 min, 含 Tween-20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液洗涤 3 次; 内参为磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)。利用 Image J 图像分析软件对各条带灰度值进行分析, 获得细胞中 BAG3 蛋白相对表达量。

1.3.5 CCK-8 法检测 U87 细胞增殖情况 取各组转染后培养 48 h 的细胞, 胰蛋白酶消化, 接种于 96 孔板, 调整细胞密度为每孔 2 × 10³ 个, 每组设 6 个复孔, 加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM, 37 ℃ 恒温培养, 分别于培养 12、24、48、72、96 h 时加入 CCK-8 液 10 μL, 摇晃均匀, 避光孵育 120 min, 应用酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔吸光度。

1.3.6 克隆形成实验检测 U87 细胞克隆能力 取各组转染后培养 48 h 的细胞,胰蛋白酶消化,接种 6 孔板,调整细胞密度为每孔 200 个,每组设 6 个复孔,培养 10 d 后,多聚甲醛固定 20 min,5 g · L⁻¹ 结晶紫染色 25 min,以 ≥50 个细胞作为 1 个克隆,计数各组细胞克隆数量。

1.3.7 流式细胞仪检测 U87 细胞凋亡情况 取各组转染后培养 48 h 的细胞,胰蛋白酶消化,接种于 96 孔板,调整细胞密度为 1 × 10⁹ L⁻¹,取 1 mL 细胞悬液,置于离心管内,4 ℃ 下 1 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,留取沉淀,PBS 冲洗 3 次,加入结合缓冲液 200 μL,充分混匀,分别加入 Annexin V 和 PI 各 5 μL,避光反应 15 min,加入结合缓冲液 400 μL,60 min 内检测细胞凋亡情况。

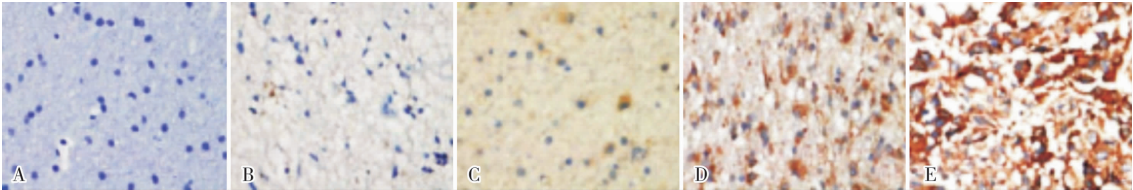
1.3.8 Transwell 小室检测 U87 细胞侵袭能力 将 Matrigel 胶平铺于 Transwell 小室上室,风干后备用。取各组转染培养 48 h 的细胞,胰蛋白酶消化,PBS 重悬细胞,调整细胞密度为 2.5 × 10⁹ L⁻¹,取 200 μL 细胞悬液加入小室上室,500 μL 含体积分数

10% 胎牛血清的培养液加入下室,于 37 ℃ 恒温培养 24 h,取出小室,弃去多余的培养液,多聚甲醛固定,结晶紫染色,用棉签将散落细胞轻轻除去,利用倒置显微镜观察,随机取 10 个高倍视野,计数穿膜细胞数。实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析和最小显著性差异法;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤组织和癌旁组织中 BAG3 蛋白表达比较 结果见图 1。胶质瘤组织中 BAG3 蛋白高表达率为 73.97% (54/73),低表达率为 26.03% (19/73);癌旁组织中 BAG3 蛋白高表达率为 36.99% (27/73),低表达率为 63.01% (46/73);胶质瘤组织中 BAG3 蛋白高表达率显著高于癌旁组织,差异有统计学意义($\chi^2 = 20.215, P < 0.05$)。



A: 癌旁组织;B: I 级胶质瘤;C: II 级胶质瘤;D: III 级胶质瘤;E: IV 级胶质瘤。

图 1 胶质瘤组织和癌旁组织中 BAG3 蛋白表达(免疫组织化学, ×400)

Fig.1 Expression of BAG3 protein in glioma tissues and adjacent tissues(immunohistochemistry, ×400)

2.2 BAG3 蛋白表达与胶质瘤患者临床参数的关系 结果见表 1。胶质瘤组织中 BAG3 蛋白表达与患者的年龄、性别、肿瘤位置、肿瘤直径及 Karnofsky 评分无关 ($P > 0.05$),而与肿瘤分级有关 ($P < 0.05$)。

表 1 BAG3 蛋白表达与胶质瘤患者临床参数之间的关系
Tab.1 Relationship between BAG3 protein expression and clinical parameters in patients with glioma

临床参数	n	BAG3 蛋白		χ^2	P
		高表达/例(%)	低表达/例(%)		
年龄					
≥50 岁	47	34(72.34)	13(27.66)	0.183	0.669
<50 岁	26	20(76.92)	6(23.08)		
性别					
男	39	30(76.92)	9(23.08)	0.379	0.538
女	34	24(70.59)	10(29.41)		
肿瘤位置					
小脑幕上	59	45(76.27)	14(23.73)	0.844	0.358
小脑幕下	14	9(64.29)	5(35.71)		
肿瘤直径					
>3 cm	38	27(71.05)	11(28.95)	0.351	0.554
≤3 cm	35	27(77.14)	8(22.86)		
Karnofsky 评分					
>80	19	13(68.42)	6(31.58)	0.411	0.521
≤80	54	41(75.93)	13(24.07)		
肿瘤分级					
I ~ II 级	28	16(57.14)	12(42.86)	6.682	0.010
III ~ IV 级	45	38(84.44)	7(15.56)		

2.3 3 组 U87 细胞中 BAG3 mRNA 表达比较 siRNA-BAG3 组、siRNA-对照序列组和空白对照组 U87 细胞中 BAG3 mRNA 相对表达量分别为 1.42 ± 0.11、2.17 ± 0.12 和 2.31 ± 0.18; siRNA-BAG3 组 U87 细胞中 BAG3 mRNA 相对表达量显著低于 siRNA-对照序列组和空白对照组,差异均有统计学意义 ($t = 11.236、10.480, P < 0.05$); siRNA-对照序列组与空白对照组 U87 细胞中 BAG3 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义 ($t = 1.708, P > 0.05$)。

2.4 3 组 U87 细胞中 BAG3 蛋白表达比较 结果见图 2。siRNA-BAG3 组、siRNA-对照序列组和空白对照组 U87 细胞中 BAG3 蛋白相对表达量分别为 0.20 ± 0.12、0.84 ± 0.13 和 0.92 ± 0.12; siRNA-BAG3 组 U87 细胞中 BAG3 蛋白相对表达量显著低于 siRNA-对照序列组和空白对照组,差异均有统计学意义 ($t = 8.956、10.460, P < 0.05$); siRNA-对照序列组与空白对照组 U87 细胞中 BAG3 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ($t = 1.074, P > 0.05$)。

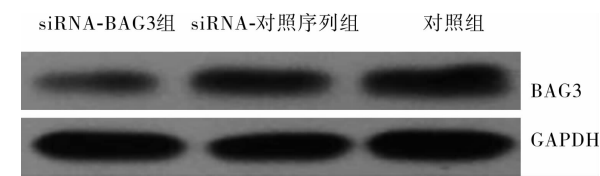


图 2 3 组 U87 细胞中 BAG3 蛋白表达(Western blot)

Fig.2 Expressions of BAG3 protein in U87 cells in the three groups(Western blot)

2.5 3 组 U87 细胞增殖能力比较 结果见图 3 和表 2。培养 12 h 时 3 组 U87 细胞增殖能力比较差异无统计学意义($P>0.05$)。培养 24、48、72、96 h 时 siRNA-BAG3 组 U87 细胞增殖能力显著低于 siRNA-对照序列组和空白对照组,差异均有统计学意义

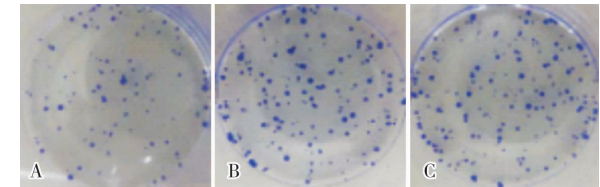
表 2 3 组 U87 细胞增殖能力比较

Tab.2 Comparison of the proliferation ability of U87 cells among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞增殖能力(吸光度)				
		培养 12 h	培养 24 h	培养 48 h	培养 72 h	培养 96 h
空白对照组	6	0.11 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.51 ± 0.02	0.67 ± 0.12	0.79 ± 0.03
siRNA-对照序列组	6	0.14 ± 0.07	0.39 ± 0.04	0.49 ± 0.05	0.70 ± 0.07	0.82 ± 0.12
siRNA-BAG3 组	6	0.12 ± 0.02	0.27 ± 0.05 ^a	0.36 ± 0.03 ^a	0.50 ± 0.07 ^a	0.60 ± 0.06 ^a
F		0.687	24.356	28.975	9.152	13.797
P		0.518	0.000	0.000	0.003	0.000

注:与 siRNA-对照序列组和空白对照组比较^a $P<0.05$ 。

2.6 3 组 U87 细胞克隆形成能力比较 结果见图 4。克隆形成实验结果显示,siRNA-BAG3 组、siRNA-对照序列组和空白对照组 U87 细胞克隆形成数分别为 30.76 ± 6.19 、 81.32 ± 3.55 、 85.07 ± 3.05 ; siRNA-BAG3 组 U87 细胞克隆形成数显著少于 siRNA-对照序列组和空白对照组,差异均有统计学意义($t=17.349$ 、 19.278 , $P<0.05$); siRNA-对照序列组与空白对照组 U87 细胞克隆形成数比较差异无统计学意义($t=1.968$, $P>0.05$)。



A:siRNA-BAG3 组;B:siRNA-对照序列组;C:空白对照组。

图 4 3 组 U87 细胞克隆形成能力比较

Fig.4 Comparison of the colony forming ability of U87 cells among the three groups

2.7 3 组 U87 细胞凋亡率比较 siRNA-BAG3 组、siRNA-对照序列组和空白对照组细胞凋亡率分别为 $(21.43 \pm 6.89)\%$ 、 $(5.50 \pm 2.95)\%$ 、 $(7.37 \pm 3.31)\%$; siRNA-BAG3 组细胞凋亡率显著高于 siRNA-对照序列组和空白对照组,差异均有统计学意

($P<0.05$); siRNA-对照序列组与空白对照组 U87 细胞增殖能力比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

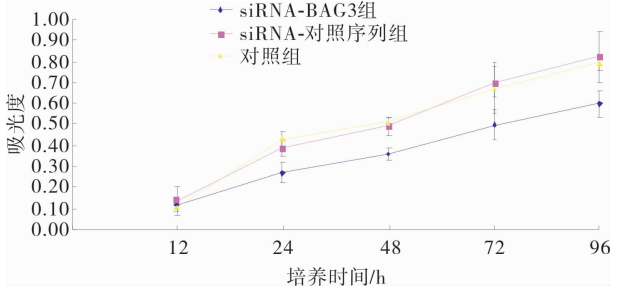
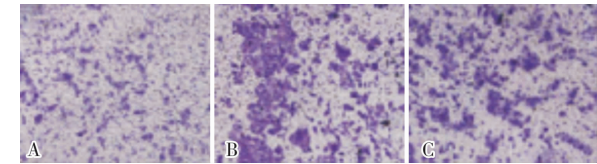


图 3 3 组 U87 细胞增殖能力比较

Fig.3 Comparison of the proliferation ability of U87 cells among the three groups

义($t=5.208$ 、 4.508 , $P<0.05$); siRNA-对照序列组与空白对照组细胞凋亡率比较差异无统计学意义($t=1.031$, $P>0.05$)。

2.8 3 组 U87 细胞侵袭能力比较 结果见图 5。siRNA-BAG3 组、siRNA-对照序列组和空白对照组侵袭细胞数分别为 116.92 ± 8.82 、 179.00 ± 11.64 、 172.48 ± 18.16 ; siRNA-BAG3 组侵袭细胞数显著少于 siRNA-对照序列组和空白对照组,差异均有统计学意义($t=10.410$ 、 6.740 , $P<0.05$); siRNA-对照序列组与空白对照组侵袭细胞数比较差异无统计学意义($t=0.740$, $P>0.05$)。



A:siRNA-BAG3 组;B:siRNA-对照序列组;C:空白对照组。

图 5 3 组 U87 细胞侵袭能力比较(结晶紫染色, $\times 400$)

Fig.5 Comparison of the invasive ability of U87 cells among the three groups(crystal violet staining, $\times 400$)

3 讨论

胶质瘤是恶性脑肿瘤的主要类型,具有发病率高、生存率低等特点,5 a 病死率仅次于胰腺癌和肺

癌^[8],现有的治疗手段并不能明显延长患者生存时间^[9-10]。研究表明,侵袭性生长是胶质瘤难以根治且易复发的主要因素^[11]。因此,积极探讨影响胶质瘤细胞增殖及侵袭力的相关机制,有望为改善患者预后提供思路。BAG3 作为一种抗凋亡蛋白,是热休克蛋白 70 重要的伴侣蛋白,可通过与热休克蛋白 70 结合而在多种病理生理过程中发挥重要作用,在维持及促进肿瘤细胞增殖、生存及迁移等过程中起关键性作用^[5],与白血病^[12]、乳腺癌^[13]、卵巢癌^[14]等多种恶性肿瘤的发生、进展密切相关。本研究结果显示,胶质瘤组织中 BAG3 蛋白表达显著高于癌旁组织,说明 BAG3 蛋白可能参与了胶质瘤的发生与发展。本研究结果显示,BAG3 蛋白表达与胶质瘤分级有关,分级越高,BAG3 蛋白表达越高,提示 BAG3 蛋白表达与胶质瘤恶性程度有关,其可能参与了胶质瘤的发展过程。

为进一步探讨 BAG3 与胶质瘤细胞生物学特性的关系,本研究利用 siRNA 技术特异性沉默 BAG3 基因,实时荧光定量 PCR 和 Western blot 实验结果显示,siRNA-BAG3 组 U87 细胞中 BAG3 mRNA 和蛋白相对表达量均降低,提示人胶质瘤 U87 细胞中 BAG3 基因表达被成功沉默。有研究指出,BAG3 可通过促进热休克蛋白 70 与细胞凋亡相关基因 Bax 结合而阻断 Bax 介导的细胞凋亡,从而促进细胞存活^[15]。本研究 CCK-8 和克隆形成实验结果显示,与 siRNA-对照序列组和空白对照组相比,24、48、72、96 h 时 siRNA-BAG3 组 U87 细胞增殖能力下降,且细胞克隆形成数量减少,说明特异性沉默 BAG3 基因表达可抑制 U87 细胞的增殖能力,提示 BAG3 可能参与了胶质瘤细胞增殖及生长过程。本研究结果显示,与 siRNA-对照序列组和空白对照组相比,siRNA-BAG3 组 U87 细胞凋亡率增加,说明特异性沉默 BAG3 基因可促进细胞凋亡发生。本研究结果显示,与 siRNA-对照序列组和空白对照组比较,siRNA-BAG3 组侵袭细胞数减少,说明特异性沉默 BAG3 基因可抑制 U87 细胞的侵袭能力,提示 BAG3 可能参与了胶质瘤细胞侵袭过程。

综上所述,BAG3 蛋白在胶质瘤组织中呈高表达,且与肿瘤恶性程度有关,其可能通过促进人胶质瘤 U87 细胞增殖与侵袭、减少细胞凋亡而参与胶质

瘤的发生和发展过程,有望为胶质瘤靶向治疗提供新的靶位。

参考文献:

- [1] MCGRANAHAN T,LI G,NAGPAL S. History and current state of immunotherapy in glioma and brain metastasis[J]. *Ther Adv Med Oncol*,2017,9(5):347-368.
- [2] 杨文涛,于喜贞,李正友,等. 胶质瘤综合治疗方法研究进展[J]. 新乡医学院学报,2016,33(1):70-72,77.
- [3] WALSH K M,WIENCKE J K,LACHANCE D H,et al. Telomere maintenance and the etiology of adult glioma[J]. *Neuro Oncol*,2015,17(11):1445-1452.
- [4] BEHL C. Breaking BAG: the co-chaperone BAG3 in health and disease[J]. *Trends Pharmacol Sci*,2016,37(8):672-688.
- [5] SHERMAN M Y,GABAI V L. Hsp70 in cancer,back to the future[J]. *Oncogene*,2015,34(32):4153-4161.
- [6] LOUIS D N,OHGAKI H,WIESTLER O D,et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. *Acta Neuropathol*,2007,114(2):97-109.
- [7] HU W,YANG Y,XI S,et al. Expression of CPEB4 in human glioma and its correlations with prognosis[J]. *Medicine (Baltimore)*,2015,94(27):e979.
- [8] BUNEVICIUS A,DELTUVA V P,TAMASAUSKAS A. Association of pre-operative depressive and anxiety symptoms with five-year survival of glioma and meningioma patients: a prospective cohort study[J]. *Oncotarget*,2017,8(34):57543-57551.
- [9] 赵建辉,胡世颀,李兵,等. 胶质瘤临床诊疗研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2017,16(4):374-377.
- [10] 单娇,王新军,王世勋,等. 促红细胞生成素产生肝细胞受体 A2 在儿童脑胶质瘤中的表达及其意义[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(5):357-360.
- [11] LI M,HAN S,SHI X. In situ dendritic cell vaccination for the treatment of glioma and literature review[J]. *Tumour Biol*,2016,37(2):1797-1801.
- [12] ZHU H,WU W,FU Y,et al. Overexpressed BAG3 is a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Ann Hematol*,2014,93(3):425-435.
- [13] LIU B Q,ZHANG S,LI S,et al. BAG3 promotes stem cell-like phenotype in breast cancer by upregulation of CXCR4 via interaction with its transcript[J]. *Cell Death Dis*,2017,8(7):e2933.
- [14] QIU S,SUN L,JIN Y,et al. Silencing of BAG3 promotes the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin via inhibition of autophagy[J]. *Oncol Rep*,2017,38(1):309-316.
- [15] KARPEL-MASSLER G,BÂ M,SHU C,et al. TIC10/ONC201 synergizes with Bcl-2/Bcl-xL inhibition in glioblastoma by suppression of Mcl-1 and its binding partners *in vitro* and *in vivo*[J]. *Oncotarget*,2015,6(34):36456-36471.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)