

. 实验研究 .

稳定低表达 BAG3 的胶质母细胞瘤 U87 细胞株的构建及鉴定

李继强 杨吉安 邵灵敏 吴庭枫 刘宝辉 陈谦学

【摘要】目的 探讨构建稳定低表达 BAG3 的胶质母细胞瘤 U87 细胞株的方法。方法 利用 RNA 干扰技术提取 pEGFP-BAG3- shRNA 质粒后采用 ABI3130 基因测序仪进行测序鉴定,将鉴定后的质粒分别转染到胶质母细胞瘤 U87 细胞株,利用嘌呤霉素筛选转染的 U87 细胞,通过 RT-PCR、免疫印迹分析和免疫荧光染色等技术对转染后的 U87 细胞进行鉴定。结果 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒测序结果包含干扰序列,筛选后的干扰组和对照组 U87 细胞转染效率分别为 85%和 93%,RT-PCR 结果显示 shBAG3 质粒干扰组 BAG3 mRNA 表达量显著低于对照组 ($P<0.05$);免疫印迹分析及免疫荧光染色结果显示 shBAG3 质粒干扰组 BAG3 蛋白表达量显著低于对照组 ($P<0.05$)。结论 本研究所构建的胶质母细胞瘤 U87 细胞株能稳定低表达 BAG3,可用于后续 BAG3 在胶质母细胞瘤中的生物学作用及相关信号通路的研究。

【关键词】胶质母细胞瘤;U87 细胞株;BAG3;RNA 干扰

【文章编号】1009-153X(2015)06-0353-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 789

Construction and identification of U87 glioblastoma cell strain with a stable low expression of BAG3

Li Ji-qiang, YANG Ji-an, SHAO Ling-min, WU Ting-feng, LIU Bao-hui, CHEN Qian-xue. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To construct and identify glioblastoma U87 cell strain with a stable low expression of BAG3. Methods The plasmids of pEGFP-BAG3-shRNA were extracted by RNA interference technique and then were sequence by gene sequencing instrument ABI3130. The plasmids of pEGFP-BAG3-shRNA which met the sequence identical outcomes were transfected into U87 glioblastoma cell strain. The transfected U87 glioblastoma cell strains were sifted out by puromycin and then were identified by RT-PCR, western-blotting and immunofluorescence techniques. Results The sequencing outcomes showed that pEGFP-BAG3-shRNA plasmid contained objective gene interfering sequence. The percentage of tranfected U87 glioblastoma in shBAG3 group and shCtrl group were 85% and 93% respectively. The levels of BAG3 mRNA and protein expressions were significantly lower in shBAG3 group than those in shCtrl group. Conclusion U87 glioblastoma cell strain constructed by the present study can stably express BAG3 at a low level and may be used for the further research of the role of BAG3 in the globalstoma and its associated signaling pathways.

【Key words】Glioblastoma; U87 cell strain; BAG3; RNA interference

Bcl-2 相关性抗凋亡基因 3 (Bcl-2 associated athanogene 3, BAG3)是广泛存在于细胞胞浆中的一种抗凋亡蛋白,在促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进血管生成等方面发挥重要作用^[1,2]。正常细胞 BAG3 基因的表达受到严密的调控,当细胞发生癌变时,BAG3 表达显著增加,且 BAG3 表达量与肿瘤恶性程度呈正相关^[3]。本研究利用 shRNA 干扰技术构建稳定低表达 BAG3 的胶质母细胞瘤 U87 细胞株,为后续研究 BAG3 在胶质母细胞瘤中的生物学作用提供细胞水平实验材料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 DMEM 高糖培养基、胎牛血清、链霉素-青霉素双抗、嘌呤霉素、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗、BAG3 一抗、Licor 荧光二抗、Attractene 转染试剂、逆转录试剂盒、GAPDH 引物、BAG3 引物、红色荧光二抗、奥德赛扫描仪均购自美国 LICOR 公司,正置荧光显微镜、倒置荧光显微镜均为日本 OLYMPUS 公司产品。

1.2 细菌、质粒和细胞株 大肠杆菌 DH5 α 及 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒购自上海吉凯基因化学技术有限公司(一条干扰链 shBAG3: 5'-CTG ATG ATC GAA GAG TAT T-3'和一条阴性对照链 shCtrl: 5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3'),载体为

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.06.011
作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科(李继强、杨吉安、邵灵敏、吴庭枫、刘宝辉、陈谦学)
通讯作者:陈谦学, E-mail: chenqx666@sohu.com

GV248 质粒,表达氨苄青霉素原核抗性、嘌呤霉素真核抗性、绿色荧光蛋白。胶质母细胞瘤 U87 细胞株来自于武汉大学人民医院中心实验室保存,U87 细胞采用含 10% 胎牛血清和 1% 链霉素-青霉素双抗的 DMEM 高糖培养基培养。

1.3 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒的提取及鉴定 分别将含有 pEGFP-BAG3-shRNA 的干扰质粒和阴性对照质粒的感受态大肠杆菌 DH5 α 接种在具有氨苄青霉素抗性的 LB 平板上培养并挑选单菌落克隆,将挑选出来的单克隆菌落接种到含氨苄抗性的 150 ml LB 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 转/min 摇床过夜。采用 QIAGEN 公司的中量质粒抽提试剂盒提取 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒 100 μl 。利用 ABI 3130 基因测序仪对提取的质粒进行测序,测序引物序列为 5'-GGA AAG AAT AGT AGA CAT AAT AGC-3'。

1.4 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒的转染及筛选 将消化后的胶质母细胞瘤 U87 细胞接种于 6 孔板,采用含 10% 胎牛血清和 1% 链霉素-青霉素双抗的 DMEM 高糖培养基培养,当细胞增殖到覆盖培养基底部 90% 以上面积时进行转染。取两支无菌 EP 管,加入 100 μl 不含血清及双抗的 DMEM 高糖培养基,别分向培养基中加入 1.2 μl 干扰链 shBAG3 质粒和阴性对照链 shCtrl 质粒,混匀后分别加入 4.5 μl Attractene 转染试剂,轻轻混匀后室温下静置 10~15 min 以便转染复合体的形成,将转染体系分别加入含有 2 ml 培养基的 U87 细胞孔中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 的培养箱中培养。24 h 后给细胞换液,48 h 后在倒置荧光显微镜下观察质粒转染情况。利用 10% 嘌呤霉素筛选转染细胞,当细胞增殖到 95% 以上时,向培养基中加入 10% 嘌呤霉素 1 μl ,每日观察细胞生长情况及绿色荧光蛋白表达情况,当存活细胞剩余 10%~20% 时给细胞换液,重复筛选步骤 4~5 次。

1.5 稳定低表达 BAG3 的胶质母细胞瘤 U87 细胞株的鉴定 采用 RT-PCR、免疫印迹、免疫荧光染色等方法对构建的稳定低表达 BAG3 的胶质母细胞瘤 U87 细胞株进行鉴定。RT-PCR 引物:内参 GAPDH 引物上游:5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3';下游:5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'。BAG3 引物上游:5'-CCC ATG ACC CAT CGA GAA ACT GC-3';下游:5'-GCT GGG AGG ACA AGG AAC TG-3'。

2 结果

2.1 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒鉴定结果 ABI 3130

基因测序仪测序结果显示质粒序列中包含 5'-CTG ATG ATC GAA GAG TAT T-3' 的碱基序列,表明质粒构建成功。

2.2 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒的转染及筛选结果 shBAG3 干扰质粒和 shCtrl 阴性对照质粒转染 48 h 后,荧光显微镜下观察转染效率显示,shBAG3 干扰组转染效率为 22%,shCtrl 对照组为 29%。利用嘌呤霉素筛选 4 个周期后,shBAG3 干扰组转染效率为 85%,shCtrl 对照组为 93%。见图 1。

2.3 鉴定结果

2.3.1 RT-PCR 结果 干扰组 BAG3 mRNA 表达水平显著低于对照组($P < 0.05$),见图 2。

2.3.2 免疫印迹分析结果 干扰组 BAG3 蛋白表达量显著低于对照组($P < 0.05$),见图 3。

2.3.3 免疫荧光染色结果 干扰组 BAG3 蛋白表达率 [(38 \pm 8)%]明显低于对照组 [(91 \pm 6)%; $P < 0.05$],见图 4。

3 讨论

肿瘤细胞的恶性增殖是导致胶质母细胞瘤预后较差的主要原因^[4]。胶质瘤细胞的恶性增殖是肿瘤细胞的增殖与凋亡之间的平衡关系被打破,抗凋亡基因表达增加,促凋亡基因表达显著减少,多条诱导细胞凋亡的信号通路被抑制,细胞增殖加速而凋亡被抑制^[5,6]。BAG3 是在肿瘤组织中表达显著增加的一种抗凋亡基因,在正常组织中表达量较低。BAG3 在肿瘤组织中高表达与肿瘤细胞所处的缺氧微环境导致的多种转录因子蛋白表达增加有关^[7,8];此外,肿瘤细胞处于应激状态时表达的热休克因子也能在转录水平上调 BAG3 的表达^[9]。BAG3 高表达能促进多种抗凋亡蛋白表达,抑制肿瘤细胞凋亡,同时能增加肿瘤的侵袭性并促进肿瘤血管生成^[10],因此 BAG3 可能在肿瘤细胞恶性增殖方面发挥重要作用。RNA 干扰技术主要通过将特异性外源性核苷酸片段转染细胞,并在细胞内与特定基因片段结合,进而抑制基因转录后的调节^[11,12]。目前常用的核苷酸片段载体有 siRNA 和 shRNA。siRNA 是单链反义核苷酸片段,进入细胞内可直接与细胞表达的特定 mRNA 结合并抑制 mRNA 表达;shRNA 通常是含有特定核苷酸片段的质粒,进入细胞内随细胞增殖而复制,能在细胞中稳定表达,shRNA 质粒上可带有某些抗生素的抗性基因片段和荧光蛋白基因片段,用于质粒的筛选的鉴定,shRNA 质粒在细胞内表达的有效产物即 siRNA,其优点在于能稳定表达特异性核苷酸干

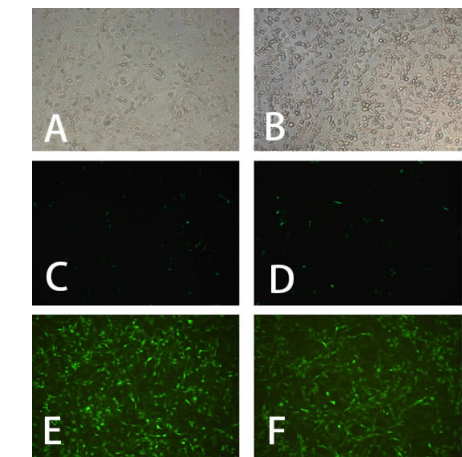


图 1 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒转染及筛选结果
A、B: 转染前; C、D: 转染 48 h; E、F: 嘌呤霉素筛选 4 个周期; A、C、E 为对照组; B、D、F 为干扰组

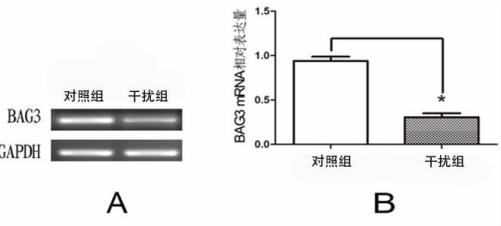


图 2 RT-PCR 结果
A: 琼脂糖凝胶电泳; B: BAG3 mRNA 相对表达量; BAG3: Bcl-2 相关性抗凋亡基因 3; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; * $P < 0.05$

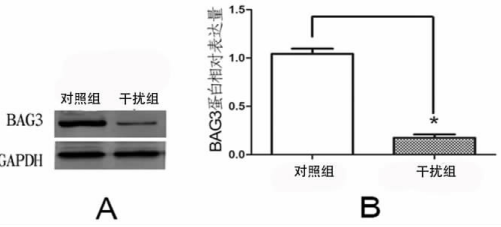


图 3 免疫印迹分析结果
A: 琼脂糖凝胶电泳; B: BAG3 蛋白相对表达量; BAG3: Bcl-2 相关性抗凋亡基因 3; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; * $P < 0.05$

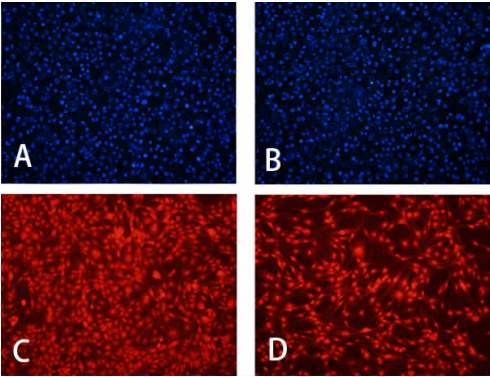


图 4 免疫荧光染色结果
A、B: DAPI 染核; C、D: BAG3 染色; A、C 为对照组; B、D 为干扰组; BAG3: Bcl-2 相关性抗凋亡基因 3

扰片段,使得细胞特定基因蛋白稳定低表达^[13,14]。

本研究采用质粒转染技术,在基因测序证实质粒包含干扰序列后将 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒及其对照质粒 pEGFP-Ctrl-shRNA 转染到胶质母细胞瘤 U87 细胞株,并用嘌呤霉素进行转染细胞筛选,利用荧光显微镜观察荧光表达情况从而确定 shBAG3 干扰组和 shCtrl 对照组转染效率分别为 85% 和 92%,构建的胶质母细胞瘤 U87 细胞株能稳定低表达 BAG3,可以用于后续 BAG3 在胶质母细胞瘤中的生物学作用及相关信号通路的研究。

【参考文献】

[1] Chiappetta G, Basile A, Barbieri A, *et al.* The anti-apoptotic BAG3 protein is expressed in lung carcinomas and regulates small cell lung carcinoma (SCLC) tumor growth [J]. *Onco-target*, 2014, 5(16): 6846-6853.

[2] Cotugno R, Basile A, Romano E, *et al.* BAG3 down-modulation sensitizes HPV18(+) HeLa cells to PEITC-induced apoptosis and restores p53 [J]. *Cancer lett*, 2014, 354(2): 263-271.

[3] Festa M, Del Valle L, Khalili K, *et al.* BAG3 protein is over-expressed in human glioblastoma and is a potential target for therapy [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(6): 2504-2512.

[4] Urbańska K, Sokołowska J, Szmidi M, *et al.* Glioblastoma multiforme--an overview [J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2014, 18(5): 307-312.

[5] Xia W, Fu W, Cai X, *et al.* Angiogenin promotes U87MG cell proliferation by activating nf- κ b signaling pathway and downregulating its binding partner FHL3 [J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(2): e0116983.

[6] Qin JJ, Wang JM, Du J, *et al.* Radixin knockdown by RNA interference suppresses human glioblastoma cell growth in vitro and in vivo [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(22): 9805-9812.

[7] Xiao H, Tong R, Cheng S, *et al.* BAG3 and HIF-1 α coexpression detected by immunohistochemistry correlated with prognosis in hepatocellular carcinoma after liver transplantation [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014(1), 1-9.

[8] Cesaro E, Montano G, Rosati A, *et al.* WT1 protein is a transcriptional activator of the antiapoptotic bag3 gene [J]. *Leukemia*, 2010, 24(1): 1204-1206.

[9] Franceschelli S, Rosati A, Lerosé R, *et al.* Bag3 gene expression is regulated by heat shock factor 1 [J]. *J Cell*

- Physiol, 2008, 215(3):575-577.
- [10] Habata S, Iwasaki M, Sugio A, *et al.* BAG3 increases the invasiveness of uterine corpus carcinoma cells by suppressing miR29b and enhancing MMP2 expression [J]. *Oncol Rep*, 2015, 4(1):3831.
- [11] Khanna M, Saxena L, Rajput R, *et al.* Gene silencing: a therapeutic approach to combat influenza virus infections[J]. *Future Microbiol*, 2015, 10(1): 131-140.
- [12] Laganà A, Veneziano D, Russo F, *et al.* Computational design of artificial RNA molecules for gene regulation [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1269(1): 393-412.
- [13] Xu L, Wang X, He H, *et al.* Structure-based design of novel chemical modification of the 3'-overhang for optimization of short interfering RNA performance [J]. *Biochemistry*, 2015, 54(5): 1268-1277.
- [14] Wang K, Park JO, Zhang M. Treatment of glioblastoma multiforme using a combination of small interfering RNA targeting epidermal growth factor receptor and β -catenin [J]. *J Gene Med*, 2013, 15(1): 42-50.
- (2015-02-28 收稿, 2015-04-08 修回)