

下调 BAG3 表达对胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响

李继强 段发亮 吴京雷 陈晓斌 张严国 丁 伟

【摘要】目的 探讨下调 BAG3 表达对胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响。方法 体外培养 U87 细胞,转染 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒构建 BAG3 低表达胶质瘤 U87 细胞株(低表达组),转染 pEGFP-shRNA 对照质粒为对照组;利用 RT-PCR 和免疫印迹法鉴定;利用 CCK8 和 EdU 检测 U87 细胞增殖,利用流式细胞术检测 U87 细胞凋亡。结果 与对照组相比,RT-PCR 和免疫印迹法检测结果显示低表达组 BAG3 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低( $P<0.05$ ),低表达组 24、48、72 h 细胞增殖水平均明显降低( $P<0.05$ ),低表达组细胞凋亡率明显增高( $P<0.05$ )。结论 下调胶质瘤 U87 细胞 BAG3 表达显著抑制其增殖、促进其凋亡。

【关键词】胶质瘤;U87 细胞;Bcl2 相关性抗凋亡基因 3;细胞增殖;细胞凋亡

【文章编号】1009-153X(2022)11-0913-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

Effect of down-regulation of BAG3 on proliferation and apoptosis of glioma U87 cells

LI Ji-qiang, DUAN Fa-liang, WU Jing-lei, CHEN Xiao-bin, ZHANG Yan-guo, DING Wei. Department of Neurosurgery, Wuhan NO. 1 Hospital, Wuhan 430022, China

【Abstract】Objective To explore the effect of down-regulation of BAG3 on the proliferation and apoptosis of glioma U87 cells. Methods U87 cells with down-regulation of BAG3 were reconstructed by transfection of shBAG3 plasmids, and were identified by the RT-PCR and western blotting. The proliferation of U87 cells was tested by CCK8 and EdU assay, and the apoptosis of U87 cells was tested by flow cytometry. Results The results of RT-PCR and western blotting showed that mRNA and protein expression levels of BAG3 were significantly down-regulated after transfection of shBAG3 plasmids. After transfection of shBAG3 plasmids, CCK8 and EdU assay showed that the proliferation of U87 cells was significantly inhibited and flow cytometry showed that the apoptosis of U87 cells was significantly promoted. Conclusions Down-regulation of BAG3 inhibits proliferation and promotes apoptosis of glioma U87 cells.

【Key words】Glioma; U87 cells; Bcl2-associated athanogene 3 (BAG3); Cell proliferation; Cell apoptosis

胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,即使采用手术切除联合术后放化疗等综合治疗,效果仍不理想<sup>[1-3]</sup>。作为一种恶性程度极高的肿瘤,胶质母细胞瘤存在部分癌基因的过度表达及抑癌基因表达受到抑制<sup>[4]</sup>,因此从基因及分子水平研究胶质母细胞瘤发生原因对于治疗胶质母细胞瘤具有重要意义。Bcl-2 相关性抗凋亡基因 3 (Bcl-2 associated athanogene 3, BAG3)是细胞在应激条件下高表达基因,增加细胞对应激条件的抵抗能力<sup>[5]</sup>。胶质瘤细胞处于相对缺氧状态,使 BAG3 蛋白表达显著增加,随胶质瘤级别的增加而明显增加<sup>[6,7]</sup>。本研究探讨下调 BAG3 基因表达对胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响。

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、pEGFP-BAG3-shRNA 质粒及 pEGFP-shRNA 对照质粒、Attractene 转染试剂、奥德赛扫描仪均为美国 LICOR 公司产品;CCK8 检测试剂盒、EdU 检测试剂盒、正置荧光显微镜和倒置荧光显微镜为日本 OLYMPUS 公司产品。

1.2 BAG3 低表达胶质瘤 U87 细胞株的构建和鉴定 胶质瘤 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。当 U87 细胞在培养皿中长满 90%后,用胰酶进行消化并接种于 6 孔板,继续采用含 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。加入 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒和 pEGFP-shRNA 对照质粒混匀后,加入 Attractene 转染试剂,室温静置 10~15 min,培养箱中培养 24 h 后换液,48 h 后在倒置荧光显微镜下观察质粒转染情况;用 RT-PCR 及免疫

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.11.010  
作者单位:430022,武汉市第一医院神经外科(李继强、段发亮、吴京雷、陈晓斌、张严国、丁 伟)

印迹法检测细胞 BAG3 mRNA 及蛋白表达情况。根据转染质粒将 U87 细胞分为低表达组和对照组。

1.3 CCK8 试验检测细胞增殖 将转染质粒后且处于对数生长期 U87 细胞用胰蛋白酶消化,配制成细胞悬液,接种 96 孔板,每孔加入 100  $\mu$ l 细胞悬液(密度 8 000 个/孔),每组设置 6 个复孔。培养 12、24、48、72 h,每个孔加入 10  $\mu$ l CCK8 溶液继续孵育 2 h,使用酶标仪测定 450 nm 吸光度值(A450)。

1.4 EdU 细胞增殖试验 将转染质粒后且处于对数生长期 U87 细胞用胰蛋白酶消化,配置成细胞悬液,接种 6 孔板,每孔 2 000 个细胞,加入 DMEM 高糖培养基培养 12 h,显微镜下观察细胞贴壁情况。用细胞培养基按 1 000:1 的比例稀释 EdU 溶液,制备适量 50  $\mu$ M EdU 培养基,每孔加入 2 ml EdU 培养基继续培养 24 h。采用含 4%多聚甲醛的 PBS 缓冲液固定细胞,滴加 Apollo 染色剂染色,并用 DAPI 荧光染色剂染核,室温下避光作用 30 min,用含 0.1% Tween-20 的 PBS 在室温漂洗 3 次,每次 10 min,在正置荧光显微镜下观察染色情况。

1.5 流式细胞技术检测细胞凋亡 将转染质粒后且处于对数生长期 U87 细胞用胰蛋白酶消化,配置成细胞悬液,接种 6 孔板,每孔 8 000 个细胞,培养 48 h 后显微镜下观察细胞生长情况。用胰蛋白酶消化后收集细胞悬液,离心后去掉培养基,加入结合缓冲液,并加入碘化丙啶和 APC 染料,室温下避光孵育 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.6 RT-PCR 检测细胞 mRNA 表达 将转染质粒后且处于对数生长期 U87 细胞用胰蛋白酶消化,配置成细胞悬液,接种 6 孔板,每孔 8 000 个细胞,继续培养 48 h,用胰蛋白酶消化提取细胞。用 Trizol 提取细胞总 RNA,逆转录反应合成 cDNA,再进行 PCR 扩增。内参 GAPDH 引物上游 5'-CGGAGTCAACGGATTTG-GTCGTAT-3',下游 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGT-GAAGAC-3'; BAG3 引物上游 5'-CCCATGACCCA TCGAGAACTGC-3',下游 5'-GCTGGGAGGACAA GGAAGT-3'。

1.7 免疫印迹法检测蛋白表达 将转染质粒后且处于对数生长期 U87 细胞用胰蛋白酶消化,配置成细胞悬液,接种 6 孔板,每孔 8 000 个细胞,继续培养 72 h,刮取细胞,采用 RIPA 裂解液提取总蛋白,聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行转膜、封闭,然后 4  $^{\circ}$ C 条件下一抗孵育过夜,取出 PVDF 膜后进行二抗避光孵育 10 min。采用 Odyssey 红外激光成像系统进行成像。

1.8 统计学方法 应用 SPSS 21.0 软件分析;计量资料

以  $\bar{x}\pm s$  表示,用 *t* 检验; $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BAG3 低表达 U87 细胞株的构建结果 荧光显微镜下观察显示,两组 U87 细胞均出现 EGFP 表达,低表达组荧光强度降低(图 1);RT-PCR 和免疫印迹法检测结果显示低表达组 BAG3 mRNA 和蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ;图 2)。这表明 BAG3 低表达 U87 细胞株构建成功。

2.2 BAG3 低表达对 U87 细胞细胞增殖的影响 与对照组相比,低表达组 24、48、72 h 细胞增殖水平均明显降低( $P<0.05$ ;图 3、4)。

2.3 BAG3 低表达对 U87 细胞细胞凋亡的影响 与对

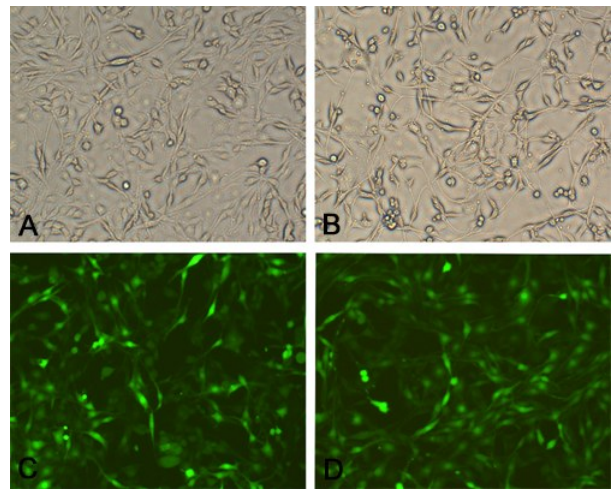


图 1 显微镜下观察 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒转染 U87 细胞的效果( $\times 100$ )  
A、B. 普通显微镜;C、D. 荧光显微镜;A、C. 转染 pEGFP-shRNA 对照质粒转染;B、D. 转染 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒

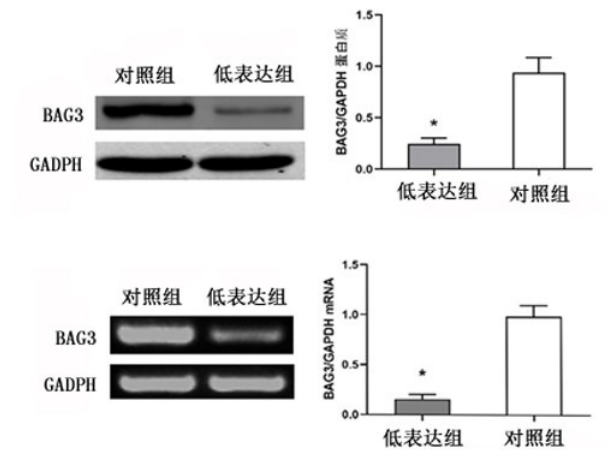


图 2 RT-PCR 和免疫印迹法检测 pEGFP-BAG3-shRNA 质粒转染 U87 细胞后 BAG3 mRNA 和蛋白表达水平与对照组相比,\*  $P<0.05$

照组相比,低表达组细胞凋亡率明显增高( $P<0.05$ ;图5)。

3 讨论

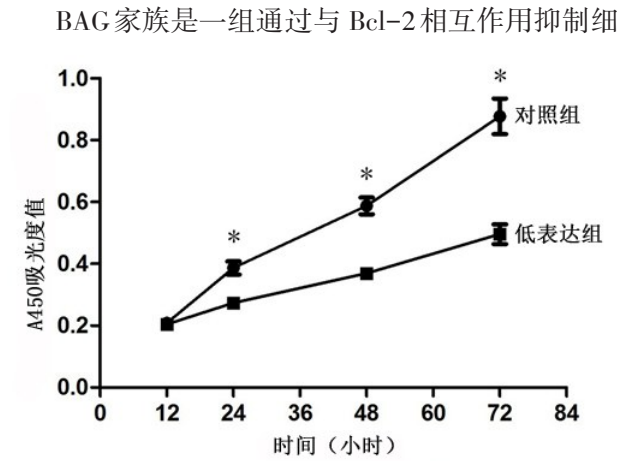


图3 CCK8法检测下调BAG3表达对U87细胞增殖水平的影响  
与低表达组相比,\* $P<0.05$

胞死亡的蛋白质。迄今为止,已鉴定了6种人源 BAG 家族蛋白:BAG1(RAP46/HAP46)、BAG2、BAG3 (CAIR-1/Bis/MFM6)、BAG4(SODD)、BAG5 和 BAG6 (BAT3/Scythe)<sup>[8]</sup>。BAG3 在一些肿瘤细胞和正常细胞作为抗凋亡因子和前自噬因子发挥作用,在调节细胞凋亡、发育、细胞运动、自噬、肿瘤转移以及介导细胞对应激的适应性方面起关键作用<sup>[9]</sup>。BAG3 在实体恶性肿瘤中过表达,发挥抗凋亡功能,与肿瘤的生长、侵袭、转移、耐药及预后有关。研究表明 BAG3 随胶质瘤恶性程度的增加,BAG3 蛋白表达量显著增加;可通过调节 NF- $\kappa$ B 活化,诱导 MMP-9 表达,进而影响胶质瘤细胞的侵袭能力;下调 BAG3 表达降低胶质瘤细胞侵袭能力<sup>[10]</sup>。另外,过表达 BAG3 可作用于 FOXM1、HIF-1、AIF 等多种细胞因子,降低 BAX、p53、NF- $\kappa$ B、p65 及 cleaved-caspase 3 等凋亡蛋白的表达并增加 Bcl2 抗凋亡蛋白的表达,进而抑制细胞凋亡<sup>[11-13]</sup>。本研究通过 shRNA 质粒转染的方法下调胶质母细胞瘤 U87 细胞株 BAG3 基因表达,结果表

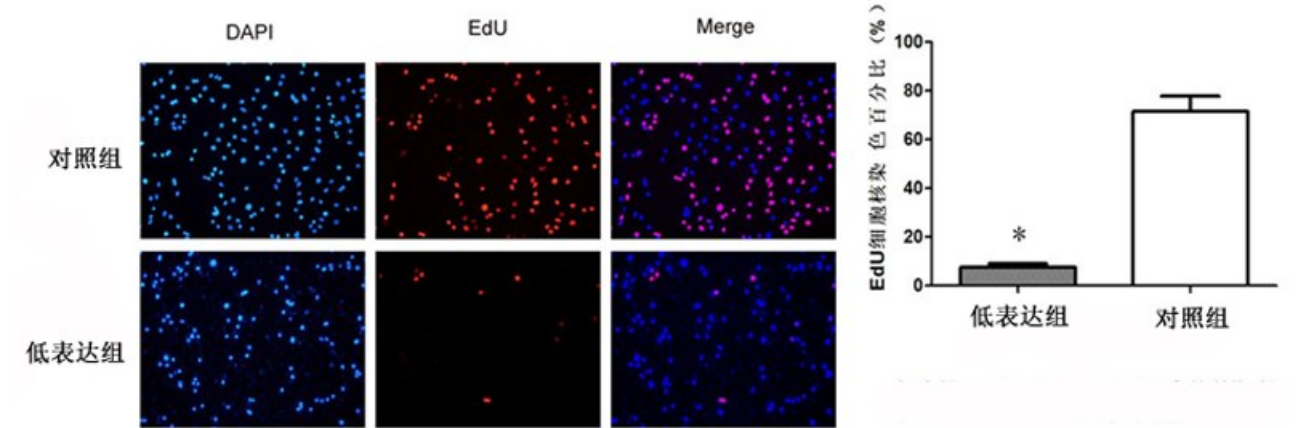


图4 EdU 染色法检测下调BAG3表达对U87细胞增殖水平的影响  
与对照组相比,\* $P<0.05$

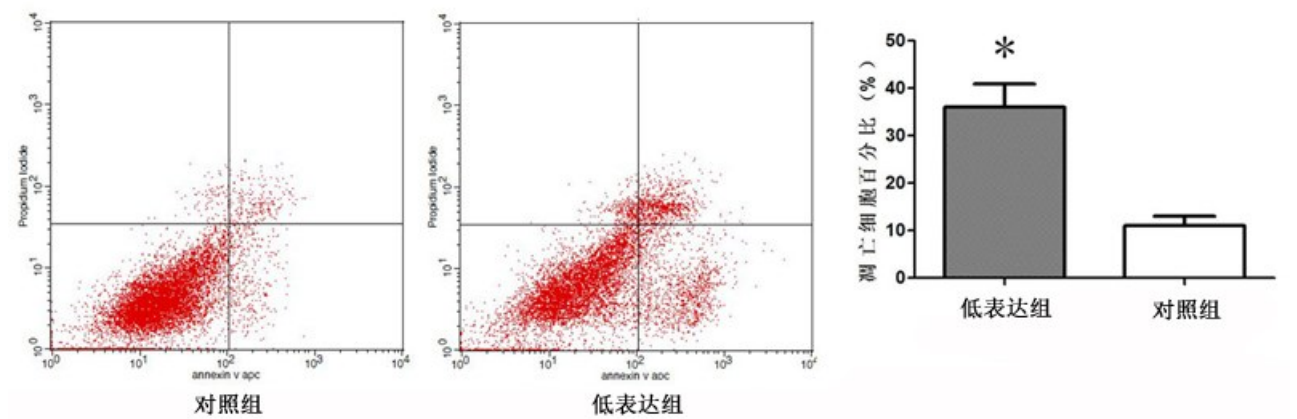


图5 流式细胞术检测下调BAG3表达对U87细胞凋亡水平的影响  
与对照组相比,\* $P<0.05$



明,下调 BAG3 基因表达能抑制胶质母细胞瘤 U87 细胞株的增殖并促进其凋亡。

【参考文献】

[1] 胡峻龙,赵世光.替莫唑胺治疗脑胶质瘤的新进展[J].中国临床神经外科杂志,2021,26(8):647-649.  
[2] 赵海康,潘力,张亮,等.替莫唑胺通过 TFRC 抑制 U87 胶质瘤细胞增殖和侵袭[J].中国临床神经外科杂志,2019,24(11):685-689.  
[3] 刘艳霞,李雨浓,傅若秋,等. BAG3 的结构和功能的研究进展[J].生命科学,2017,29(11):1133-1140.  
[4] 刘宝辉,孙前,袁凡恩,等.高级别胶质瘤的治疗进展[J].中国临床神经外科杂志,2021,26(5):380-384.  
[5] Sherman MY, Gabai V. The role of Bag3 in cell signaling [J]. J Cell Biochem, 2022, 123(1): 43-53.  
[6] Antonietti P, Linder B, Hehlhans S, *et al.* Interference with the HSF1/HSP70/BAG3 pathway primes glioma cells to matrix detachment and BH3 mimetic-induced apoptosis [J]. Mol Cancer Ther, 2017, 16(1): 156-168.  
[7] Zhu H, Wu W, Fu Y, *et al.* Overexpressed BAG3 is a poten-

tial therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia [J]. Ann Hematol, 2014, 93(3): 425-435.  
[8] 胡平,叶立果,陈谦学.脑胶质瘤 IDH 基因突变的分子机制及其相关靶向治疗的研究进展[J].中国临床神经外科杂志,2022,27(5):405-406.  
[9] Roperto S. Role of BAG3 in bovine deltapapillomavirus-mediated autophagy [J]. J Cell Biochem, 2022, 123(1): 59-64.  
[10] Linder B, Klein C, Hoffmann ME, *et al.* BAG3 is a negative regulator of ciliogenesis in glioblastoma and triple-negative breast cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2022, 123: 77-90.  
[11] Sherman MY, Gabai V. The role of BAG3 in cell signaling [J]. J Cell Biochem, 2022, 123(1): 43-53.  
[12] De Marco M, Troisi J, Giugliano L, *et al.* BAG3 interacts with p53 in endometrial carcinoma [J]. Cell Oncol, 2020, 43(5): 957-960.  
[13] Rocchi A, Wollebo HS, Khalili K. Rrotien quality control in glioblastoma: a review of the current literature with new perspectives on therapeutic targets [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9734.

(2021-11-19 收稿,2022-07-31 修回)

(上接第 912 页)

[8] 刘彤,何沛邦,李明昌.特发性正常压力脑积水发病机制的研究新进展[J].中国临床神经外科杂志,2021,26(2):133-136.  
[9] Yang H, Wang H, Andersson U. Targeting inflammation driven by HMGB1 [J]. Front Immunol, 2020, 11: 484.  
[10] Volchuk A, Ye A, Chi L, *et al.* Indirect regulation of HMGB1 release by gasdermin D [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4561.  
[11] Paudel YN, Angelopoulou E, Piperi C, *et al.* HMGB1-mediated neuroinflammatory responses in brain injuries: potential mechanisms and therapeutic opportunities [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13): 4609.  
[12] Muhammad S, Chaudhry SR, Kahlert UD, *et al.* Targeting high mobility group box 1 in subarachnoid hemorrhage: a systematic review [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2709.  
[13] Watanabe M, Miyajima M, Nakajima M, *et al.* Expression analysis of high mobility group box-1 protein (HMGB-1) in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum of the congenital hydrocephalus (H-Tx) rat [J]. Acta Neurochir Suppl, 2012, 113: 91-96.  
[14] Lorente L, Martín MM, Ortiz-López R, *et al.* Association

between serum sFasL concentrations and sepsis mortality [J]. Infect Dis (Lond), 2021, 53(1): 38-43.  
[15] Kajikawa O, Herrero R, Chow YH, *et al.* The bioactivity of soluble Fas ligand is modulated by key amino acids of its stalk region [J]. PLoS One, 2021, 16(6): e0253260.  
[16] Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, *et al.* High serum soluble Fas ligand levels in non-survivor traumatic brain injury patients [J]. Neurocrit Care, 2021, 35(1): 249-254.  
[17] Felderhoff-Mueser U, Herold R, Hochhaus F, *et al.* Increased cerebrospinal fluid concentrations of soluble Fas (CD95/Apo-1) in hydrocephalus [J]. Arch Dis Child, 2001, 84(4): 369-372.  
[18] Zhong H, Li X, Zhou S, *et al.* Interplay between RAGE and TLR4 regulates HMGB1-induced inflammation by promoting cell surface expression of RAGE and TLR4 [J]. J Immunol, 2020, 205(3): 767-775.  
[19] Felderhoff-Mueser U, Buhrer C, Groneck P, *et al.* Soluble Fas (CD95/Apo-1), soluble Fas ligand, and activated caspase 3 in the cerebrospinal fluid of infants with posthemorrhagic and nonhemorrhagic hydrocephalus [J]. Pediatr Res, 2003, 54(5): 659-664.

(2021-10-15 收稿,2022-08-30 修回)