

BFAR在胶质瘤中的表达及其与胶质瘤预后的关系

程哲,汪潮潮,吴娟,王棒,周星辰

(蚌埠医学院第二附属医院神经外科,安徽 蚌埠 233000)

摘要:目的 探讨双功能凋亡调节器(BFAR)在胶质瘤中的表达情况及其与胶质瘤患者预后的关系。方法 基于美国癌症基因数据库(TCGA)及中国脑胶质瘤基因组数据库(CGGA),分析胶质瘤临床标本中BFAR的表达情况及其与胶质瘤患者预后之间的关系、与凋亡相关基因的表达关系;通过Western blot及qRT-PCR验证BFAR蛋白及mRNA在胶质瘤细胞系中的表达情况。结果 基于TCGA数据库分析显示,低级别胶质瘤BFAR的表达高于非瘤脑组织($P<0.05$);胶质母细胞瘤BFAR表达高于非瘤脑组织($P<0.05$),且随着胶质瘤恶性程度增加,BFAR的表达量增加。BFAR低表达的胶质瘤患者总体生存时间长于BFAR高表达的胶质瘤患者($P<0.05$);高表达BFAR的高级别胶质瘤患者总体生存期短于低表达BFAR的高级别胶质瘤患者($P<0.05$);异柠檬酸脱氢酶(IDH)野生型胶质瘤患者BFAR表达高于IDH突变型患者($P<0.05$);非1p/19q联合缺失的胶质瘤患者BFAR表达高于1p/19q联合缺失的患者($P<0.05$)。基于TCGA数据库分析显示,胶质瘤中BFAR与抗凋亡相关蛋白Bcl-xl、Bcl-w、Mcl-1表达及促凋亡相关蛋白Bax、Bad、Bim表达密切相关($P<0.05$)。BFAR mRNA在胶质瘤细胞U251、T98和LN229中的表达比正常星形胶质细胞NHA中高($P<0.05$)。结论 BFAR在胶质瘤组织中及细胞系中高表达,其与胶质瘤患者的预后密切相关。

关键词:BFAR;胶质瘤;mRNA

中图分类号:R739.41

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.07.021

文章编号:1006-1959(2021)07-0078-04

The Expression of BFAR in Glioma and Its Relationship with the Prognosis of Glioma

CHENG Zhe,WANG Chao-chao,WU Juan,WANG Bang,ZHOU Xing-chen

(Department of Neurosurgery,Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College,Bengbu 233000,Anhui,China)

Abstract:Objective To investigate the expression of dual function apoptosis regulator (BFAR) in glioma and its relationship with the prognosis of patients with glioma.Methods Based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA),analyze the expression of BFAR in clinical specimens of glioma and its relationship with the prognosis of patients with glioma, and the relationship with the expression of apoptosis-related genes.The expression of BFAR protein and mRNA in glioma cell lines was verified by Western blot and qRT-PCR.Results Based on the analysis of the TCGA database, the expression of BFAR in low-grade gliomas was higher than that of non-tumor brain tissues ($P<0.05$);The expression of BFAR in glioblastoma was higher than that in non-tumor brain tissue ($P<0.05$),and as the malignant degree of glioma increases, the expression of BFAR increases. The overall survival time of glioma patients with low expression of BFAR was longer than that of patients with high expression of BFAR ($P<0.05$);The overall survival time of patients with high-grade glioma with high expression of BFAR was shorter than that of patients with high-grade glioma with low expression of BFAR ($P<0.05$);Isocitrate dehydrogenase (IDH) wild-type glioma patients had higher BFAR expression than IDH mutant patients ($P<0.05$);The expression of BFAR in glioma patients without 1p/19q combined deletion was higher than that in patients with 1p/19q combined deletion ($P<0.05$).Based on the analysis of the TCGA database, BFAR is closely related to the expression of anti-apoptosis-related proteins Bcl-xl, Bcl-w, and Mcl-1 and the expression of pro-apoptosis-related proteins Bax, Bad, and Bim in gliomas ($P<0.05$).The expression of BFAR mRNA in glioma cells U251, T98 and LN229 was higher than that in normal astrocytes NHA ($P<0.05$).Conclusion BFAR is highly expressed in glioma tissues and cell lines, and it is closely related to the prognosis of glioma patients.

Key words:BFAR;Glioma;mRNA

胶质瘤(glioma)为最常见的原发性中枢性神经系统的恶性肿瘤,具有高致死致残率^[1-3],其中胶质母细胞瘤(GBM)的发病率最高,占原发中枢系统恶性肿瘤的46.1%。尽管目前胶质瘤的诊疗技术不断更新,包括最大范围内的肿瘤切除手术联合放化疗、基因靶向治疗、免疫治疗及电场疗法等,但胶质瘤患者平均生存期仅为12个月,且5年生存率不足5%^[4-7],因此,研究胶质瘤的发病机制尤为重要。双功能凋亡调节器(bifunctional apoptosis regulator,BFAR),其可以调控凋亡信号通路,一方面其能促进Bcl-2和

Bcl-XL的相互作用,同时其也可以直接或间接与Caspase-8和Caspase-10的前体作用,从而阻碍Fas介导的凋亡信号通路^[8]。研究表明^[9],BFAR在组织中的表达具有高度特异性,在脑组织中为高表达。但目前关于BFAR与起源于脑组织的胶质瘤研究较少,基于此,本研究通过肿瘤相关数据库来分析BFAR在胶质瘤中组织标本中的表达情况以及其与胶质瘤患者临床预后之间的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 数据库分析 使用癌症基因组图谱(cancer genome atlas,TCGA)在线数据库(GEPIA,<http://gepi-a.cancer-pku.cn/>)分析BFAR在低级别胶质瘤(LGG)及胶质瘤母细胞瘤(GBM)中的表达,应用中国脑胶质瘤基因组图谱(Chinese glioma genome atlas,CGGA,<http://www.cgga.org.cn>)数据库分析BFAR在

基金项目:1.安徽自然科学基金项目(编号:1908085QH334);2.蚌埠医学院研究生科研创新计划项目(编号:Byycx20033)

作者简介:程哲(1988.10-),男,安徽凤阳人,硕士,主治医师,主要从事脑胶质瘤基础与临床研究

通讯作者:周星辰(1988.3-),男,安徽蚌埠人,硕士,主治医师,主要从事脑胶质瘤细胞及干细胞的基础与临床研究

各个级别胶质瘤中的表达情况。

1.2 材料 人脑胶质瘤细胞 U251、T98 和 LN229 由苏州大学附属第二医院脑神经实验室惠赠;正常人脑星形细胞株 NHA 购于合肥希研生物公司;细胞培养液 DMEM 及胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;Trizol 试剂购于上海 Sangon Biotech 公司;RIPA、PMSF 试剂及 BCA 试剂盒购于上海碧云天公司;BFAR 及 GAPDH 引物由上海 Sangon Biotech 合成;EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 及 TransStart Tip Green qPCR Super Mix 购于 TRANS 公司;BFAR、GAPDH 一抗购于中国 ABclonal 公司;二抗(羊抗兔)购于 BIOMIKY 公司。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR) 提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度。根据试剂盒中步骤:在每个反应中加入 2.0 μg RNA,70 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 3 min,取出后冷却至室温,加 0.5 μl 逆转录酶后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min。20 μl 反应体系中含 2 μl cDNA,在 Roche Light Cycler96 仪器上进行 45 个循环反应,按照 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s。设 3 个重复组,结果以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值计算。BFAR 及 GAPDH 的引物如下:BFAR 正向,5'-GAGTTTGCTTGGGACTGGTTGGAG-3',反向,5'-GAGGCACGGTCTTCAGTTCACTTC-3';GAPDH 正向,5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3',反向,5'-GAAGGCTGGGGCTCATT-3',以 GAPDH 的 mRNA 表达水平作为内参。

1.4 Western Blot 提取细胞总蛋白,BCA 法测蛋白质浓度,配置 8%的分离胶,5%的浓缩胶;每孔上样 10 μl ,分别以浓缩胶 80 V,30 min,分离胶 120 V,1 h 电泳;200 mA 湿转 2 h;1% BSA 室温下封闭 1 h;一抗:BFAR(1:1000)、GAPDH(1:1000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,

二抗:1:10000 室温下孵育 1 h;ECL 曝光显影。

1.5 统计学方法 数据统计采用 GraphPad Prism 8 及 SPSS 17.0 软件处理,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,生存分析采用 Log-Rank 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

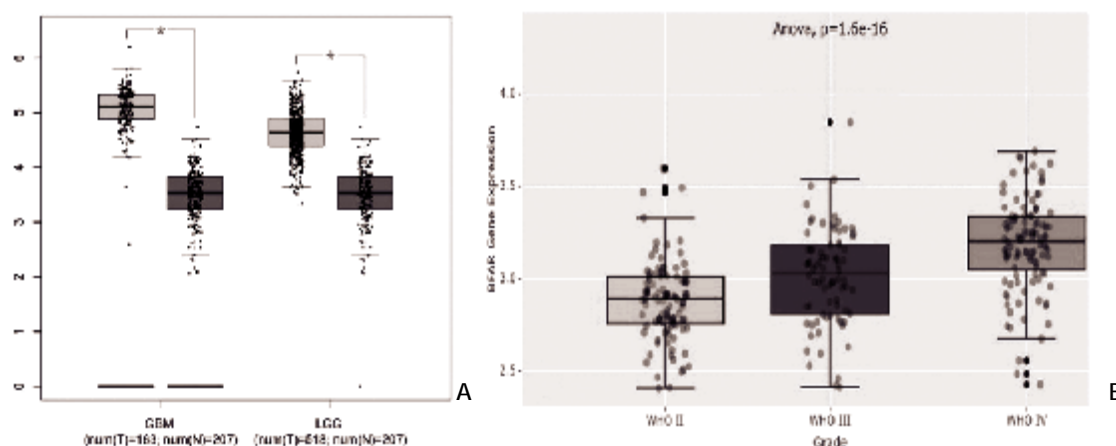
2 结果

2.1 BFAR 在胶质瘤中的表达情况 基于 TCGA 数据库分析显示,低级别胶质瘤 BFAR 的表达高于非瘤脑组织($P<0.05$);胶质母细胞瘤 BFAR 表达高于非瘤脑组织($P<0.05$),且随着胶质瘤恶性程度增加,BFAR 的表达量增加,见图 1。

2.2 BFAR 在胶质瘤中的预后情况 BFAR 低表达的胶质瘤患者总体生存时间长于 BFAR 高表达的胶质瘤患者($P<0.05$);高表达 BFAR 的高级别胶质瘤患者总体生存期短于低表达 BFAR 的高级别胶质瘤患者($P<0.05$);异柠檬酸脱氢酶(IDH)野生型胶质瘤患者 BFAR 表达高于 IDH 突变型患者($P<0.05$);非 1p/19q 联合缺失的胶质瘤患者 BFAR 表达高于 1p/19q 联合缺失的患者($P<0.05$),见图 2。

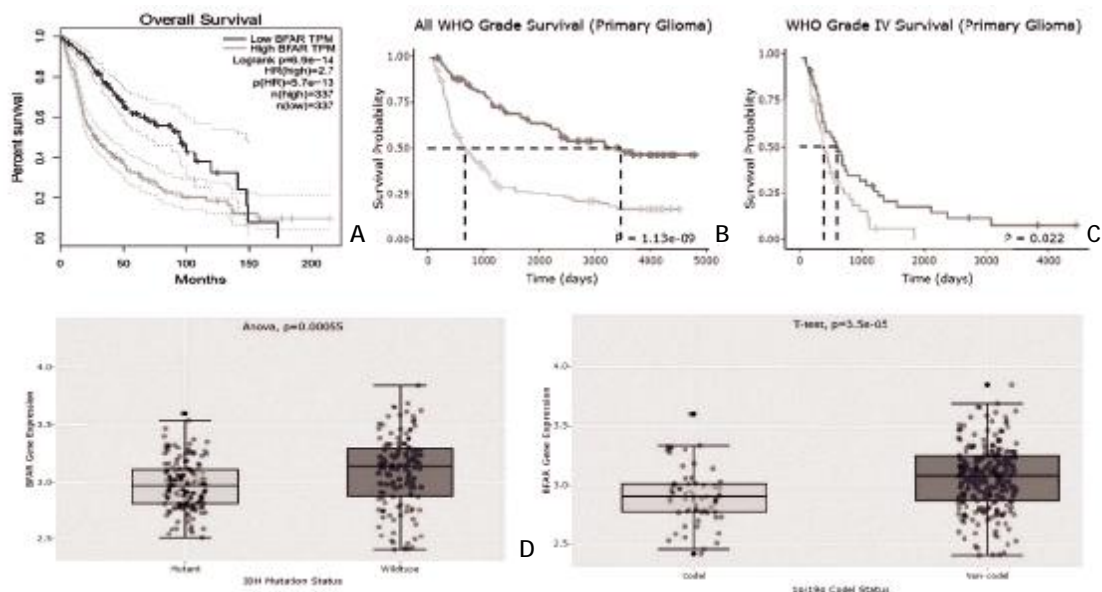
2.3 BFAR 在胶质瘤中与凋亡相关基因表达的相关性 基于 TCGA 数据库分析显示,胶质瘤中 BFAR 与抗凋亡相关蛋白 Bcl-xl、Bcl-w、Mcl-1 表达及促凋亡相关蛋白 Bax、Bad、Bim 表达密切相关($P<0.05$),见图 3。

2.4 BFAR 在胶质瘤细胞中表达情况 BFAR 蛋白在胶质瘤细胞 U251、T98 和 LN229 中的表达比正常星形胶质细胞 NHA 中高($P<0.05$);定量 PCR 显示,BFAR mRNA 在胶质瘤细胞 U251、T98 和 LN229 中的表达比正常星形胶质细胞 NHA 中高($P<0.05$),见图 4。



注:A:低级别胶质瘤及胶质母细胞瘤中 BFAR 表达情况;B:不同胶质瘤恶性程度间 BFAR 表达情况

图 1 BFAR 在胶质瘤中的表达情况



注:A、B:胶质瘤;C:高级别胶质瘤;D:IDH是否突变的胶质瘤;E:1p/19q是否联合缺失的胶质瘤

图2 胶质瘤中BFAR表达与预后的关系

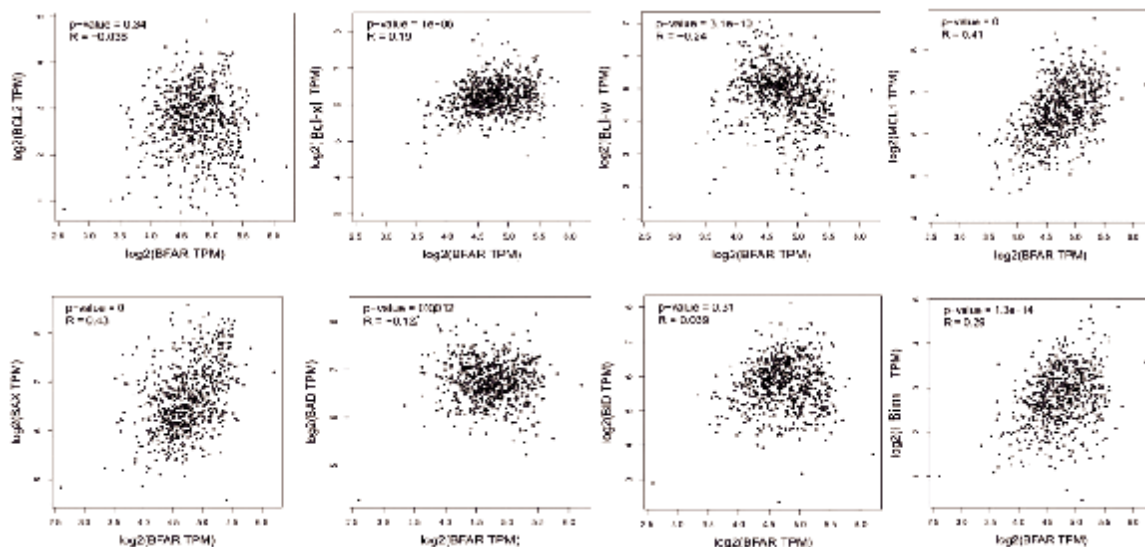
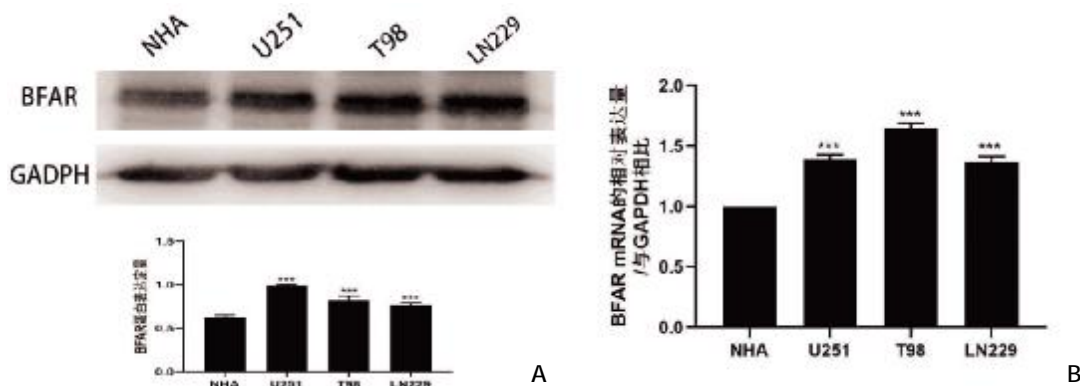


图3 胶质瘤中BFAR的表达与凋亡相关基因的关系



注:A:胶质瘤细胞U251、T98、LN229中BFAR蛋白表达情况;B:胶质瘤细胞U251、T98、LN229中BFAR mRNA表达情况

图4 胶质瘤细胞中BFAR表达情况

3 讨论

胶质瘤具有高度的侵袭性和致死性,虽然临床上治疗方式不断更新,但患者的总体预后仍较差^[9]。因此,在胶质瘤的发病机制及相关药物治疗中需积极探索寻找新的基因或者通路来调控胶质瘤的生长及侵袭^[10]。BFAR 为凋亡调控相关基因,然而有关其在胶质瘤中的研究甚少。

本研究基于 TCGA 数据库分析显示,低级别胶质瘤 BFAR 的表达高于非瘤脑组织($P<0.05$);胶质母细胞瘤 BFAR 表达高于非瘤脑组织($P<0.05$),且随着胶质瘤恶性程度增加,BFAR 的表达量增加;且 BFAR 低表达的胶质瘤患者总体生存时间长于 BFAR 高表达的胶质瘤患者($P<0.05$);高表达 BFAR 的高级别胶质瘤患者总体生存期短于低表达 BFAR 的高级别胶质瘤患者($P<0.05$),提示胶质瘤中 BFAR 的表达情况可以作为其预后判断的指标之一。异柠檬酸脱氢酶家族包括 IDH1、IDH2 和 IDH3 这 3 种异构酶,胶质瘤多伴有 IDH1、2 的突变,而伴有 IDH 突变的胶质瘤患者往往预后较好^[12]。少突胶质细胞瘤中染色体 1p/19q 联合性缺失最为常见,1p/19q 联合缺失的胶质瘤患者总生存期和无进展生存期较长^[13-15]。大量研究表明胶质瘤一旦合并 IDH 突变及 1p/19q 联合缺失其对放疗化疗更敏感。本研究中异柠檬酸脱氢酶(IDH)野生型胶质瘤患者 BFAR 表达高于 IDH 突变型患者($P<0.05$);非 1p/19q 联合缺失的胶质瘤患者 BFAR 表达高于 1p/19q 联合缺失的患者($P<0.05$),提示胶质瘤中 IDH 突变及 1p/19q 联合缺失可使胶质瘤患者对放疗化疗更敏感,因此 BFAR 影响胶质瘤预后很有可能与胶质瘤的放疗化疗相关。

BFAR 被认为可以调控凋亡信号通路,一方面可以作用于抗凋亡相关基因,另一方面可以调控于促凋亡相关基因,其对凋亡信号的调控处于动态平衡状态。本研究基于 TCGA 数据库分析显示,胶质瘤中 BFAR 与抗凋亡相关蛋白 Bcl-xl、Bcl-w、Mcl-1 表达及促凋亡相关蛋白 Bax、Bad、Bim 表达密切相关($P<0.05$),但关于胶质瘤中 BFAR 调控凋亡相关通路及基因的机制还需要大量基础研究进一步探索。此外,本研究结果显示,BFAR 蛋白在胶质瘤细胞 U251、T98 和 LN229 中的表达比正常星形胶质细胞 NHA 中高($P<0.05$);定量 PCR 显示,BFAR mRNA 在胶质瘤细胞 U251、T98 和 LN229 中的表达比正常星形胶质细胞 NHA 中高($P<0.05$),提示 BFAR 在胶质瘤细胞中表达上调。

综上所述,BFAR 在胶质瘤中表达上调且与胶质瘤患者的预后密切相关,其中与促凋亡及抗凋亡

相关基因表达关系密切。然而 BFAR 在胶质瘤中是如何调控凋亡通路及其与胶质瘤的耐放化疗之间的关系都需要进一步的研究,其很有可能成为胶质瘤治疗的靶点基因。

参考文献:

- [1]Wesseling P,Capper D.WHO 2016 Classification of gliomas[J].Neuropathol Appl Neurobiol,2018,44(2):139-150.
- [2]Liang S,Fan X,Zhao M,et al.Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of adult diffuse glioma-related epilepsy[J].Cancer Med,2019,8(10):4527-4535.
- [3]Chen W,Zheng R,Baade PD,et al.Cancer statistics in China, 2015[J].CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [4]Stylli SS.Novel Treatment Strategies for Glioblastoma[J].Cancers(Basel),2020,12(10):2883.
- [5]Bai J,Varghese J,Jain R.Adult Glioma WHO Classification Update,Genomics,and Imaging:What the Radiologists Need to Know[J].Top Magn Reson Imaging,2020,29(2):71-82.
- [6]Brito C,Azevedo A,Estevés S,et al.Clinical insights gained by refining the 2016 WHO classification of diffuse gliomas with: EGFR amplification,TERT mutations,PTEN deletion and MGMT methylation[J].BMC Cancer,2019,19(1):968.
- [7]Xu S,Tang L,Li X,et al.Immunotherapy for glioma:Current management and future application[J].Cancer Lett,2020(476):1-12.
- [8]Zhang H,Xu Q,Stanislaw K,et al.BAR:an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2000(97):2597-2602.
- [9]Roth W,Kermer P,Krajewska M,et al.Bifunctional apoptosis inhibitor(BAR)protects neurons from diverse cell death pathways[J].Cell Death Differ,2003,10(10):1178-1187.
- [10]Kristensen BW,Priesterbach-Ackley LP,Petersen JK,et al. Molecular pathology of tumors of the central nervous system[J]. Ann Oncol,2019,30(8):1265-1278.
- [11]Tamtaji OR,Mirzaei H,Shamshirian A,et al.New trends in glioma cancer therapy:Targeting Na⁺/H⁺ exchangers [J].J Cell Physiol,2020,235(2):658-665.
- [12]Wu F,Li GZ,Liu HJ,et al.Molecular subtyping reveals immune alterations in IDH wild-type lower-grade diffuse glioma[J].J Pathol,2020,251(3):272-283.
- [13]Miller JJ,Shih HA,Andronesi OC,et al.Isocitrate dehydrogenase-mutant glioma:Evolving clinical and therapeutic implications[J].Cancer,2017,123(23):4535-4546.
- [14]Zhu Z,Lan Y,Wang L,et al.A nuclear transport-related gene signature combined with IDH mutation and 1p/19q codeletion better predicts the prognosis of glioma patients [J].BMC Cancer, 2020,20(1):1072.
- [15]Miller JJ,Loebel F,Juratli TA,et al.Accelerated progression of IDH mutant glioma after first recurrence [J].Neuro Oncol, 2019,21(5):669-677.

收稿日期:2021-01-27;修回日期:2021-02-09

编辑/王海静