

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.04.003

双干扰质粒共转染对胃癌 BAG-1 基因亚型表达的抑制作用

王 丹¹,陈 铭¹,李静波¹,胡守亮²,杨继元³

Inhibitory Effects of Cotransfection of Two Short Hairpin RNA on Expression of BAG-1 Subtypes in Gastric Carcinoma

WANG Dan¹, CHEN Ming¹, LI Jingbo¹, HU Shouliang², YANG Jiyuan³

1. Department of Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434000, China, 2. Department of Nephrology, 3. Department of Oncology
Corresponding Author: YANG Jiyuan, E-mail: yangjiyuanchina@163.com

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression plasmids of short hairpin RNA(shRNA) specific for Bcl-2 associated athanogene 1(BAG-1);and to observe their inhibitory effects on the main subtypes expression of BAG-1 gene in human gastric carcinoma SGC-7901 cells. **Methods** Two distinct interference segment A and B of 64nt oligonucleotides which were located on two common exons of BAG-1 gene P29, P33, P46 subtypes and one negative control segment S, were designed and directionally cloned into eukaryotic expression plasmids pGenesil-1 containing kanamycin resistance gene and GFP to target the human BAG-1 mRNA coding region. Lipofectamin TM 2000 was used to cotransfect plasmids into SGC-7901 cells. Negative plasmid-transfected, untransfected SGC-7901 cells and transfected interference plasmids pGenesil-BAG-A and pGenesil-BAG-B served as negative, blank, and interference control respectively. Interference effects were measured by RT-PCR and Western blot. Cell proliferation was detected by MTT assay and cell growth curve was drawn to analyze the inhibitory effects. **Results** The clone was verified through restriction enzyme digestion and sequence analysis of hairpin-siRNA expression DNA segment and adjacent vector sequence. The transfection rate in SGC-7901 cells was 40%-50%. Compared with the untransfected control, the negative control cell BAG-1's gene expression showed no obvious difference. However, the mRNA and protein of BAG-1 in SGC-7901 cells was significantly inhibited by BAG-1 shRNA (both $P<0.01$). The inhibition rate of mRNA was $(63\pm9.8)\%$. The inhibition rate of P46 and P32 BAG-1 proteins were $(94.3\pm1.08)\%$ and $(66.1\pm6.5)\%$, respectively. The proliferation of cells was inhibited significantly compared with the control group. **Conclusion** The vectors containing hairpin-siRNA expression DNA segment are successfully constructed, and cotransfection plasmids of pGensil-BAG1-A and pGensil-BAG1-B can significantly inhibit BAG-1 gene's main subtype expression and cell proliferation of human gastric carcinoma SGC-7901 cells.

Key words:Gastric carcinoma; BAG-1 gene; Short hairpin RNA; RNA interference

摘 要:目的 构建针对人 BAG-1(Bcl-2-associated athanogene 1)基因的短发卡 RNA(short hairpin RNA,shRNA)真核表达质粒,探讨其对人胃癌 SGC-7901 细胞 BAG-1 主要亚型表达的抑制作用及对细胞生长的影响。**方法** 以人 BAG-1 mRNA 编码区为 RNA 干扰靶点,设计 2 条不同的位于 BAG-1 基因 P29、P33、P46、P50 亚型的两个通用外显子上 64nt 寡核苷酸干扰片段 A、B 及 1 条阴性对照片段 S,将其定向克隆到带有卡那霉素抗性和增强绿色荧光蛋白的真核表达载体 pGenesil-1 上,将其转染至 SGC-7901 细胞中,设空白对照组(未转染质粒 SGC-7901-Un)、阴性对照组(转染阴性对照质粒 pGensil-Neg)、

干扰组(转染干扰质粒 pGensil-BAG1-A 和 pGensil-BAG1-B),用 RT-PCR、Western blot 检测 BAG-1 基因的干扰效果。MTT 法检测细胞生长情况并绘制生长曲线。**结果** 酶切及测序结果证实, pGensil-BAG1-A 和 pGensil-BAG1-B 干扰质粒及阴性对照质粒 pGensil-S 构建成功。质粒在 SGC-7901

收稿日期:2012-05-10;修回日期:2012-10-15
基金项目:湖北省教育厅自然科学科研资助项目(7012600905)
作者单位:1. 434000 湖北荆州,长江大学附属第一医院中心实验室,2. 肾内科,3. 肿瘤科
通信作者:杨继元, E-mail: yangjiyuanchina@163.com
作者简介:王丹(1986-),女,硕士,实验研究员,主要从事肿瘤细胞凋亡与信号转导的研究

细胞中的转染效率达 40%~50%。阴性对照组细胞 BAG-1 基因表达与空白对照组无明显差异,干扰组细胞 BAG-1 基因表达较空白对照组显著下降($P<0.01$),表达抑制率在 mRNA 水平为 $(63\pm9.8)\%$,在蛋白水平对 BAG1-P46、BAG1-P32 亚型的抑制率分别为 $(94.3\pm1.08)\%$ 、 $(66.1\pm6.5)\%$ 。生长曲线表明细胞生长受到了抑制。**结论** 针对人 BAG-1 基因的 shRNA 真核表达质粒 pGensil-BAG1-A 和 pGensil-BAG1-B 共转染能高效特异的抑制胃癌 SGC-7901 细胞中 BAG-1 主要亚型的表达,并抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的生长。

关键词: 胃癌;BAG-1 基因;短发卡 RNA;小分子干扰
中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A

0 引言

肿瘤形成过程中,随着对基因表达谱改变的深入研究,发现并识别一个新的特异的肿瘤标志物将会极大的促进对肿瘤的诊断、治疗及防治。近年来已有实验表明 BAG-1 基因特异性高表达和 BAG-1 的不同转录体的细胞定位与胃癌的恶性转化高度相关^[1-2],这使得通过靶向阻断 BAG-1 基因进而促进胃癌细胞凋亡的设想成为可能。实验采用 RNAi 技术,构建针对 BAG-1 基因的短发卡 RNA(shRNA)的干扰质粒并转染人胃癌 SGC-7901 细胞,观察其对 BAG-1 主要亚型表达及细胞生长的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源

主要材料:人 SGC-7901 细胞株(北京肿瘤研究所);pGensil-1 质粒(武汉晶赛公司);转染试剂为 lipofectamine 2000(Invitrogen 公司);质粒提取试剂盒(美国 Omega 公司);限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I 及 T4 连接酶(日本 Takara 公司);转录试剂盒(加拿大 Fermentas 公司);PCR 试剂盒(日本 Takara 公司);兔抗人 BAG-1 抗体(ab32109)(美国 Abcam 公司),针对 BAG-1P33、P46、P50 三个主要亚型的共同表位;HRP 标记的羊抗兔二抗(Jackson Immunoresearch 公司产品)。

1.2 质粒的构建及鉴定

1.2.1 Bag-1 shRNA 设计 Bag-1 基因的序列引自 GenBank Gene ID:573。采用 Ambion 公司的在线设计软件,将 Bag-1 基因的 Accession Number 或全长序列输入在线软件中,选两条 19nt 的序列, A 序列:GCACGACCTTCATGTTACC; B 序列:GAGGTT-GAACTAAAGAAGT; A、B 序列位于 BAG-1 基因 P29、P33、P46、P50 亚型的两个通用外显子上。另外设计一条由 B 序列随机重排而成的阴性对照:GAGTGTAATGCGATGAAAA。经过 NCBI 的

BLAST 工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 比对分析与人类其他基因序列无同源性。siRNA 的设计结构如下:*Bam*H I + 正义序列 + TTCAAGACG + 反义序列 + TTTT + *Hind* III。

siRNA 片段中间为 9nt 的茎环序列,将所选择的干扰片段呈反向互补加到茎环序列的两端,正义链的 3 端加 5 个胸腺嘧啶作为终止信号,正义链和反义链的 5' 分别加上限制酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 的粘端。为设计的 siRNA 片段分别命名 Oligo A(干扰序列 A)、Oligo B(干扰序列 B)和 Oligo Neg(阴性对照 Neg),由上海生工合成,见表 1。

1.2.2 合成干扰序列退火、载体与片段的连接及转化 合成的 Oligos 单链分别用无核酸酶无菌水稀释,正反链等摩尔混合。加入退火缓冲液(10 倍浓缩液:100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA),加入适量去核酸酶的双蒸水,使终体积中各 Oligo 浓度为 100 nmol/ml,退火缓冲液用浓缩液稀释 10 倍,94℃ 水浴退火自然冷却至室温。退火产物储存于 -20℃。取 pGensil-1 空质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 于 37℃ 水浴,酶切 4 h。酶切后进行载体胶回收,电泳鉴定后与 siRNA 小片段进行连接。质粒与插入片段摩尔数比例为 1:10,连接过夜,连接产物直接转化大肠杆菌 DH5 α 感受态。转化后感受态细胞经 37℃ 摇床复苏后,涂布于含卡拉霉素(25 ng/ μ l)平板,放入 37℃ 培养箱孵育过夜。

1.2.3 重组载体的酶切鉴定 每个平板挑取 3 个克隆于 5 ml 含卡拉霉素(25 ng/ μ l) LB(luria-Bertani)细菌培养液中,37℃ 摇床生长 2~4 h 至菌液混浊,提取质粒做酶切鉴定:重组质粒分别用 *Hind* III、*Eco*R I 双酶切。若质粒重组正确,会在多克隆位点的 *Bam*H I 和 *Hind* III 间多出 60 bp 片段,在远端选择 *Eco*R I 与 *Hind* III 进行双酶切会出现较空质粒大的片段。对酶切鉴定正确的质粒送公司测序。鉴定正确的克隆进行保种和质粒的大量抽提。分别命名为 pGenesil-BAG1-A, pGenesil-BAG1-B, pGenesil-Neg。

1.3 转染 SGC-7901 细胞及转染阳性单克隆的筛选

SGC-7901 细胞生长至对数生长期时,接种于 24 孔板中,培养至汇合度为 70%~80%。前期实验探索的最优的质粒与脂质体质量体积比为 1:2。配制 A 液:加 2.5 μ g 质粒 pGenesil-BAG1-A 和 2.5 μ g 质粒 pGenesil-BAG1-B 于不含血清及抗生素的 RPMI 1640 培养液中,混匀后静置 5 min。配制 B 液:将 10 μ l 脂质体混合于不含血清及抗生素的 RPMI

1640 培养液中,轻轻混匀后静置 5 min。混合 A 液和 B 液,室温孵育 30 min,将混合物加入 6 孔板中,4~6 h 后换成不含抗生素的 RPMI1640 培养液继续培养。阴性对照组(转染阴性对照质粒 pGenesil-Neg)命名为 pGenesil-Neg 组和空白对照组(未转染质粒)命名为 SGC-7901-Un 组。分别于 24、48、72 h 后荧光显微镜下观察结果。将转染 24 h 后的细胞换以含 20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,于相差显微镜下放大 200 倍观察细胞形态;同一视野在激发波长为 488 nm 的荧光下检测 GFP 表达。共计观察 5 个视野,记录每个视野表达绿色荧光的细胞数和细胞总数,计算出表达 GFP 细胞的比例,取均数。(转染效率 = 发绿色荧光的细胞数/细胞总数)。

转染后 48 h 加入含 G418 500 mg/L 的 RPMI 1640 培养液,培养至空白对照组细胞全部死亡,继续培养 1 周,更换为不含 G418 的 RPMI 1640 培养液扩增细胞,所得三组细胞分别为 SGC-7901-Un 组、pGenesil-Neg 组、pGenesil-BAG1-A + pGenesil-BAG1-B 组。

1.4 RT-PCR 法检测 BAG-1 基因的干扰效果

转染后 48 h,按 Trizol 说明书提取细胞总 RNA,DEPC 水溶解并保存,紫外分光光度法测 RNA 浓度及纯度,取 RNA 5 μ g,按反转录试剂盒说明书操作,将总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 BAG-1、GAPDH。BAG 上游引物:5'-AGGGCAGCAGTGAACCAG-3',BAG 下游引物:5'-AAATCCTTGGGCAGAAAACC-3',扩增产物长度为 310bp。BAG-1 上下游引物位于亚型 P50、P46、P33 的通用外显子上。GAPDH 上游引物:5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3',GAPDH 下游引物 5'-TTCACACCCATGACGAACAT-3',扩增产物为 193bp。PCR 反应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 30 s,共扩增 35 个循环,最后 72℃延伸 8 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,Alpha Imager 2200 凝胶成像系统扫描分析,以 BAG-1/GAPDH 吸光度值表示目的基因的相对表达水平。

1.5 Western blot 法检测 BAG-1 基因的干扰效果

转染后 72 h,收集六孔板中的细胞,加入细胞裂解液 200 μ l,PMSF 2 μ l,冰上裂解 30 min,4℃13 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,BCA 法定量。取 20 μ g 总蛋白与 1/4 体积的 5 $\times$ 上样缓冲液混合,100℃变性 10 min,SDS-PAGE 电泳,转膜至硝酸纤维素膜,TBST 洗膜,封闭液封闭 1 h,分别以 1:500、1:2500 兔抗人 BAG-1、GAPDH 抗体 4℃过夜,TBST 洗膜,1:10 000 HRP 标记的羊抗兔 IgG

抗体室温孵育 1 h,TBST 洗膜,TCM 化学发光显色,X 线片显影,定影。Alpha Imager 2200 测定 BAG-1/GAPDH 灰度面积比值。

1.6 MTT 法检测细胞增殖活力

取对数生长期的细胞,以每孔 5 $\times$ 10³个细胞接种于 96 孔培养板中,分为 3 组:未转染组(SGC-7901-Un 组)、干扰组(pGenesil-BAG1-A + pGenesil-BAG1-B 组)、阴性对照组(转染阴性对照质粒 pGenesil-Neg 组),每组设 5 个复孔。转染 6h 后加入完全培养液,在 37℃、5% CO₂条件下培养,每日取 1 块板,连续检测 7d。检测时每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ l,继续 37℃孵育 4 h,吸弃孔内培养液,每孔加入 150 μ l DMSO,37℃振荡 10 min,酶标仪 570 nm 处测吸光度(A),计算各组的 A₅₇₀ 均值,绘制细胞生长曲线。

1.7 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行分析,两两比较采用方差分析和 F 检验。

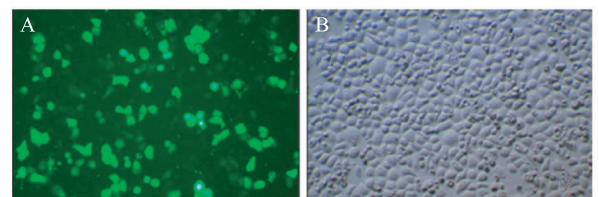
2 结果

2.1 针对 BAG-1 基因的干扰质粒的构建

质粒载体 pGensil-1 是武汉晶赛公司合成的 shRNA 真核表达载体,含 U6 启动子,BamH I、Hind III、EcoR I 酶切位点,EGFP 作为转录效率指示标记,含原核筛选标志 Kan 和真核筛选标志 neo。重组质粒在多克隆位点的 BamH I 和 Hind III 间多出 60bp 片段,在远端选择 EcoR I 与 Hind III 进行双酶切出现较空质粒大的片段。对酶切鉴定正确的质粒送公司测序。测序结果证实目的基因正确插入,序列与设计的序列相同。

2.2 转染效率

转染 48 h 后,荧光显微镜下观察,可见特异性绿色荧光蛋白表达,转染效率约为 40%~50%,见图 1。



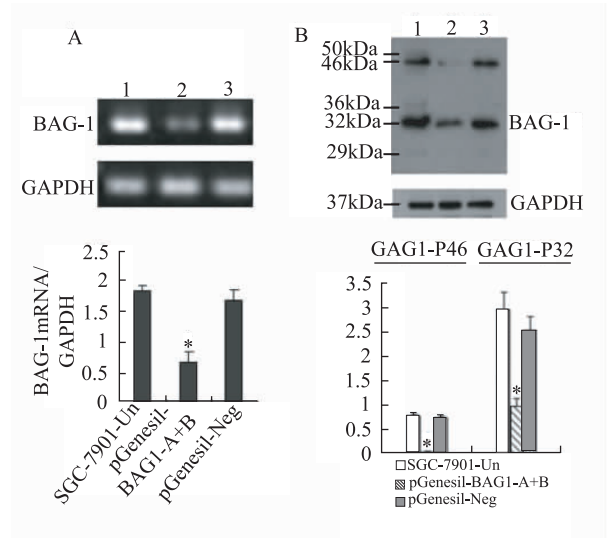
A:SGC-7901 cells transfected with plasmids at 48h under a fluorescence microscope show a strong specific expression of green fluorescence;B:the same filed cells under an optical microscope, confluence of cells>90%. Comparing figure 1A and 1B, the expression ratio of green fluorescence in the cell is 40% to 50%

图 1 转染 48 h 后荧光下的 SGC-7901 细胞(×200)

Figure 1 Fluorescence of SGC-7901 at 48 h after transfection(×200)

2.3 RT-PCR 检测结果

未转染组和阴性对照组细胞的 BAG-1 mRNA 相对 GAPDH 表达量分别为(1.84 ± 0.08)、(1.69 ± 0.16),两者比较差异无统计学意义($P = 0.26$)。干扰组细胞的 BAG-1mRNA 相对表达量为(0.67 ± 0.16),与未转染组和阴性对照组细胞比较,差异有统计学意义($F = 63.47, P < 0.01$)。同时加入干扰质粒 pGenesil-BAG1-A 和 pGenesil-BAG1-B 对 BAG-1 mRNA 表达的抑制率约为(63 ± 9.8)%,见图 2。



SGC-7901 cells transfected with the interference plasmid BAG-1 and negative control, 48 h total cellular RNA and 72 h after transfection for the detection of total protein were extracted after transfection.

Compared with the pGenesil-Neg group, * : $P < 0.01$
1: non-transfected plasmid SGC-7901-Un group; 2: interference plasmid pGenesil-BAG1-A + B group; 3: negative control pGenesil-Neg group.

图 2 SGC-7901 细胞转染 BAG-1 干扰质粒及阴性对照 48h 的 RT-PCR(A)和 72 h 的蛋白印迹(B)检测 BAG-1 表达结果

Figure 2 The results of RT-PCR at 48h (A) and Western blot at 72 h (B) analysis of BAG-1 expression in human gastric carcinoma SGC-7901 cells after transfection

2.4 Western blot 检测干扰结果

在胃癌 SGC-7901 细胞中 BAG-1 基因有 5 种大小不同的蛋白产物,5 种蛋白分别为 P50、P46、P36、P32、P29,与 Zheng 等^[1]研究结果一致。P46 和 P32 条带较深,为胃癌 SGC-7901 细胞中 BAG-1 基因表达的主要亚型。P50、P36、P29 条带较浅,在胃癌 SGC-7901 细胞中表达量较少。

未转染组和阴性对照组细胞的 BAG1-P46 相对表达量分别为(0.79 ± 0.04)、(0.75 ± 0.03),两者比

较差异无统计学意义($P = 0.19$)。干扰组细胞的 BAG1-P46 相对表达量为(0.045 ± 0.007),与未转染组和阴性对照组细胞比较,差异有统计学意义($F = 682.04, P < 0.01$),同时加入干扰质粒 pGenesil-BAG-1-A 和 pGenesil-BAG-1-B 对 BAG1-P46 蛋白表达的抑制率为(94.3 ± 1.08)%。

未转染组和阴性对照组细胞的 BAG1-P32 相对表达量分别为(2.96 ± 0.36)、(2.55 ± 0.27),两者比较差异无统计学意义($P = 0.12$)。干扰组细胞的 BAG1-P32 相对表达量为(0.99 ± 0.15),与未转染组和阴性对照组细胞比较,差异有统计学意义($F = 43.12, P < 0.01$),同时加入干扰质粒 pGenesil-BAG-1-A 和 pGenesil-BAG-1-B 对 BAG1-P32 蛋白表达的抑制率为(66.1 ± 6.5)%,见图 2。

2.5 细胞生长曲线

将未转染组、干扰组、阴性对照组的细胞连续 7 d 行 MTT 法,结果显示干扰组的 SGC-7901 细胞生长明显慢于未转染组和阴性对照组的细胞,见图 3。

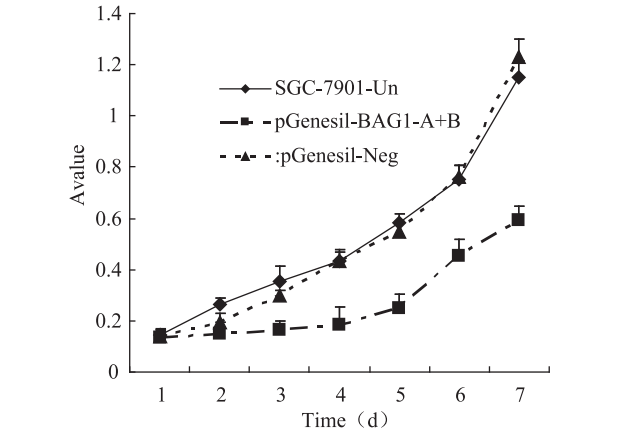


图 3 BAG-1 干扰质粒转染 SGC-7901 细胞后 MTT 检测细胞增殖

Figure 3 The effect of BAG-1 shRNA on the proliferation of SGC-7901 cells by MTT

3 讨论

BAG-1 是一种多功能结合蛋白,可与 BCL-2 形成复合物,增强细胞抗凋亡能力。还可以与雄激素、雌激素、糖皮质激素、肝细胞生长因子等结合,通过多种途径调节它们的功能、抑制细胞凋亡、促进肿瘤发生。BAG-1 在多种肿瘤细胞及肿瘤组织中均有高表达,其在胞核及胞质中的表达水平可作为多种肿瘤早期诊断及预后的生物学指标^[3-7]。以往的研究表明,BAG-1 分为 4 个不同的亚型,分别为 P29、P32、P46、P50,其中 P29 主要分布于细胞膜,P32 和 P46 主要分布于细胞质,P50 主要分布于细胞核^[8]。在胃癌组织中,BAG-1 的表达率显著高于正常胃黏

膜组织及胃癌旁增生组织,但 BAG-1 各种亚型与肿瘤分化的关系有待进一步探讨^[9-11]。

本实验采用 RNAi 技术,设计合成针对 BAG-1 基因的 shRNA,构建到真核表达载体 pGensil-1/NEO 的 hU6 启动子下游,重组质粒 pGenesil-BAG1-A、pGenesil-BAG1-B、pGenesil-Neg 经酶切、测序证实无误 Western blot 及 RT-PCR 结果显示,干扰质粒 pGenesi-BAG1-A 和 pGenesil-BAG1-B 共转染 SGC-7901 细胞,能显著干扰 BAG-1 基因的表达,干扰后 BAG-1 mRNA 和蛋白同时减少。阴性对照质粒 pGenesil-Neg 对 SGC-7901 中 BAG-1 基因的表达没有明显影响,证明所选用的质粒载体和阴性对照序列对 BAG-1 基因不产生非特异性干扰。A、B 序列位于 BAG-1 基因 P29、P33、P46、P50 亚型的两个通用外显子上,质粒 pGenesil-BAG1-A 和 pGenesil-BAG1-B 分别为针对 BAG-1 mRNA 不同区域的序列,同时转染 SGC-7901 细胞后,对 mRNA 水平的抑制率为 $(63.0 \pm 9.8)\%$,在蛋白水平对 BAG1-P46、BAG1-P32 亚型的抑制率分别为 $(94.3 \pm 1.08)\%$ 、 $(66.1 \pm 6.5)\%$ 。干扰效率可能会由于靶序列位置的不一而不同,本实验采用 pGenesil-BAG1-A 和 pGenesil-BAG1-B 两种干扰片段共转染的方法,能显著抑制胃癌 SGC-7901 中 BAG-1 的表达。本实验通过 MTT 检测,结果表明 pGenesil-BAG1-A 和 pGenesil-BAG1-B 两种干扰片段共转染的方法能明显抑制 SGC-7901 细胞的增殖能力。这可能与 shRNA 有效抑制了 BAG-1 主要亚型表达有关,促增殖能力受到抑制,细胞生长变慢。为今后进一步研究 BAG-1 基因在肿瘤发生、发展中的作用机制提供了实验基础,并为 siRNA 的临床应用及胃癌的分子靶向治疗提供了实验基础。

参考文献:

[1] Zheng HC, Xu XY, Xing YN, *et al.* Nuclear or cytoplasmic localization of Bag-1 distinctly correlates with pathologic behavior and outcome of gastric carcinomas[J]. Hum Pathol, 2010, 41(5): 724-36.

[2] Naishiro Y, Adachi M, Okuda H, *et al.* BAG-1 accelerates cell motility of human gastric cancer cells[J]. Oncogene, 1999, 18(21): 3244-51.

[3] Wang YD, Cheng J, Chen JC, *et al.* BAG-1 genetic polymorphisms predict clinical responses to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer[J]. Zhongguo Zhong Liu Lin Chuang, 2011, 38(10): 572-5. [王亚帝, 成健, 陈君臣, 等. BAG-1 基因多态性与晚期非小细胞肺癌患者铂类药物敏感性的关系[J]. 中国肿瘤临床 2011, 38(10): 572-5.]

[4] Han CM, Wu GM, Gao S, *et al.* Expression and clinical significance of bag-1 proteins in oral squamous cell carcinoma[J]. Kou Qiang Yi Xue Yan Jiu, 2010, 26(3): 424-7. [韩成敏, 吴国民, 高尚, 等. Bag-1 蛋白在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 口腔医学研究, 2010, 26(3): 424-7.]

[5] Liu H, Liang Y, Li Y, *et al.* Gene silencing of BAG-1 modulates apoptotic genes and sensitizes lung cancer cell lines to cisplatin-induced apoptosis[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(10): 832-40.

[6] Sun NF, Meng QY, Hu SY, *et al.* Correlation between the expression of the BAG-1 gene and clinicopathologic factors in colorectal cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(10): 1419-24.

[7] Millar EK, Anderson LR, McNeil CM, *et al.* BAG-1 predicts patient outcome and tamoxifen responsiveness in ER-positive invasive ductal carcinoma of the breast[J]. Br J Cancer, 2009, 100(1): 123-33.

[8] Lüders J, Demand J, Papp O, *et al.* Distinct isoforms of the cofactor BAG-1 differentially affect Hsc70 chaperone function[J]. J Biol Chem, 2000, 275(20): 14817-23.

[9] Wang WY, Tang HW, Zhang ZP, *et al.* Expression of Bag-1 and Bcl-2 and its significance in gastric cancer[J]. Shi Jie Hua Ren Xiao Hua Za Zhi, 2005, 13(10): 1186-9. [王文勇, 唐红卫, 张志培, 等. 胃癌组织中 Bag-1 和 Bcl-2 的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(10): 1186-9.]

[10] Shi JG, Wang L, Zhang Y, *et al.* The anti-apoptotic protein BAG-1 expression and significance in gastric cancer tissue microarray[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2004, 20(4): 498-9. [师建国, 王丽, 张勇, 等. 抗凋亡蛋白 BAG-1 在胃癌组织芯片中的表达及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(4): 498-9.]

[11] Liman J, Faida L, Dohm CP, *et al.* Subcellular distribution affects BAG1 function[J]. Brain Res, 2008, 1198: 21-6.

[编辑:安 凤;校对:刘红武]