

慢病毒介导的热休克蛋白 70 基因对缺血 / 缺氧嗜铬细胞瘤细胞钙稳态的影响及机制研究

胡艳宁 李庆淑 李智 胡丹 曲彦

【摘要】 目的 探讨慢病毒介导的热休克蛋白 70 (HSP70) 基因表达对缺血 / 缺氧嗜铬细胞瘤 (PC12) 细胞钙稳态的影响及机制。方法 取对数生长期的 PC12 细胞,分为重组慢病毒感染组 (感染含 HSP70 及荧光蛋白基因的慢病毒)、慢病毒对照组 (感染含荧光蛋白而不含 HSP70 基因的慢病毒) 及未感染组 3 组。用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测转染细胞 HSP70 mRNA 表达,蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 HSP70 蛋白表达。PC12 细胞缺血 / 缺氧处理 4 h 后,用四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 检测细胞活性,乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒测定细胞上清液 LDH 水平,流式细胞仪检测细胞内游离钙离子 ($[Ca^{2+}]_i$) 浓度,ATP 酶试剂盒测定 Na^+-K^+-ATP 酶、 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶、总 ATP 酶活性。结果 重组慢病毒感染组 PC12 细胞 HSP70 mRNA 和 HSP70 蛋白表达呈阳性。经缺血 / 缺氧处理后,与慢病毒对照组和未感染组比较,重组慢病毒感染组细胞活性明显增强 (A 值: 0.575 ± 0.020 比 0.395 ± 0.014 、 0.363 ± 0.045 , $t_1=17.996$, $t_2=10.600$, 均 $P<0.001$), 细胞上清液中 LDH 水平明显降低 (U/L : 743.46 ± 23.68 比 935.43 ± 34.77 、 962.89 ± 26.68 , $t_1=11.179$, $t_2=15.044$, 均 $P<0.001$), $[Ca^{2+}]_i$ 浓度显著降低 [相对荧光强度: $(31.60 \pm 2.43)\%$ 比 $(41.48 \pm 3.33)\%$ 、 $(40.40 \pm 3.05)\%$, $t_1=5.853$, $t_2=5.502$, 均 $P<0.001$], Na^+-K^+-ATP 酶、 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶、总 ATP 酶活性显著升高 [Na^+-K^+-ATP 酶 ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$): 8.608 ± 0.307 比 6.728 ± 0.173 、 6.450 ± 0.091 , $t_1=9.237$, $P_1=0.001$, $t_2=11.675$, $P_2<0.001$; $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶 ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$): 10.523 ± 0.036 比 7.910 ± 0.209 、 8.064 ± 0.195 , $t_1=9.718$, $P_1=0.001$, $t_2=11.535$, $P_2<0.001$; 总 ATP 酶 ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$): 17.041 ± 0.324 比 14.150 ± 0.182 、 13.983 ± 0.085 , $t_1=16.113$, $t_2=17.602$, 均 $P<0.001$]。慢病毒对照组与未感染组各指标差异均无统计学意义。结论 HSP70 能维持缺血 / 缺氧 PC12 细胞钙稳态,可能是其抗凋亡的重要机制之一。

【关键词】 慢病毒; 热休克蛋白 70; 缺血 / 缺氧; PC12 细胞; 钙稳态

Effects of lentivirus-mediated heat shock protein 70 gene on calcium homeostasis in PC12 cells undergone ischemia and hypoxia Hu Yanling*, Li Qingshu, Li Zhi, Hu Dan, Qu Yan. * Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, Shandong, China

Corresponding author: Qu Yan, Department of Critical Care Medicine, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266000, Shandong, China, Email: qdqyan@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of lentivirus-mediated heat shock protein 70 (HSP70) gene on calcium homeostasis in PC12 cells undergone ischemia and hypoxia, and the mechanism involved. **Methods** PC12 cells at logarithmic phase were collected, and were divided into recombination lentivirus infection group (infected by lentivirus containing HSP70 and fluorescent gene), lentivirus control group (infected by lentivirus containing fluorescein without HSP70 gene) and non-infection group. HSP70 gene and protein expressions in PC12 cells were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. After being challenged with ischemia and hypoxia for 4 hours, the viability of cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), the levels of lactic acid dehydrogenase (LDH) in cell supernatant were determined by LDH measurement test kit. The concentration of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) was assayed by flow cytometer. The activities of $Na^+-K^+-ATPase$, $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase$ and total ATPase were measured by ATPase test kits. **Results** The expressions of exogenous HSP70 gene and protein were found by RT-PCR and Western Blot in the recombination lentivirus infection group. After being challenged with ischemia and hypoxia, the viability of cells in the recombination lentivirus infection group was increased significantly as compared with the lentivirus control group and non-infection group (A value: 0.575 ± 0.020 vs. 0.395 ± 0.014 ,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.04.014

基金项目:山东省自然科学基金(Y2007C133);山东省青岛市市南区科技局项目(2014-14-041-YY)

作者单位:266071 山东青岛,青岛大学医学院(胡艳宁);266000 山东青岛,青岛市市立医院重症医学科(李庆淑、李智、胡丹、曲彦)

通讯作者:曲彦, Email: qdqyan@aliyun.com

0.363 ± 0.045, $t_1 = 17.996$, $t_2 = 10.600$, both $P < 0.001$), the levels of LDH in culture medium and the concentration of $[Ca^{2+}]_i$ were decreased significantly [LDH (U/L): 743.46 ± 23.68 vs. 935.43 ± 34.77, 962.89 ± 26.68, $t_1 = 11.179$, $t_2 = 15.044$, both $P < 0.001$; $[Ca^{2+}]_i$ relative fluorescence: (31.60 ± 2.43)% vs. (41.48 ± 3.33)%, (40.40 ± 3.05)%, $t_1 = 5.853$, $t_2 = 5.502$, both $P < 0.001$], and the activities of $Na^+-K^+-ATPase$, $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase$ and total ATPase were increased significantly [$Na^+-K^+-ATPase$ ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$): 8.608 ± 0.307 vs. 6.728 ± 0.173, 6.450 ± 0.091, $t_1 = 9.237$, $P_1 = 0.001$, $t_2 = 11.675$, $P_2 < 0.001$; $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase$ ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$): 10.523 ± 0.036 vs. 7.910 ± 0.209, 8.064 ± 0.195, $t_1 = 9.718$, $P_1 = 0.001$, $t_2 = 11.535$, $P_2 < 0.001$; total ATPase ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$): 17.041 ± 0.324 vs. 14.150 ± 0.182, 13.983 ± 0.085, $t_1 = 16.113$, $t_2 = 17.602$, both $P < 0.001$]. There was no statistical difference in above indexes between lentivirus control group and non-infection group. **Conclusion** HSP70 can maintain the PC12 cells calcium homeostasis, which may be one of the important mechanisms of anti-apoptosis.

【Key words】 Lentivirus; Heat shock protein 70; Ischemia and hypoxia; PC12 cell; Calcium homeostasis

缺氧缺血性脑病 (HIE) 是指各种原因所致脑部血液供应障碍, 导致脑组织出现缺血 / 缺氧性损伤, 并发相应的神经功能缺损, 其发生机制极其复杂, 可以是多种因素或机制同时或先后作用的结果, 致残率和病死率均很高^[1], 且随着人口老龄化不断加快, HIE 的发病率和病死率也在不断增加^[2-3]。

热休克蛋白 (HSP) 是原核生物和真核生物体内高度保守的一种应激蛋白, 是生物体应激状态下产生的保护性蛋白。HSP 按分子质量大小分为不同的家族, 其中 HSP70 是研究最深入的一种。大量研究证实, HSP70 对 HIE 具有保护作用, 但其抗凋亡的具体机制仍不清楚。Ca²⁺ 在细胞活动中起重要作用, 细胞内钙离子稳态的改变可能是细胞凋亡发生过程中重要的中间介质。目前关于外源性 HSP70 对嗜铬细胞瘤 (PC12) 细胞钙稳态影响的研究不多。本实验通过慢病毒介导外源性 HSP70 基因在 PC12 细胞内稳定表达, 检测细胞活性、乳酸脱氢酶 (LDH)、游离钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 及钙稳态相关酶 $Na^+-K^+-ATPase$ 、 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase$ 、总 ATP 酶活性的变化, 旨在探讨 HSP70 对 PC12 细胞钙稳态的影响, 为研究 HSP70 的神经保护作用机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料: PC12 细胞由青岛大学生理教研室提供。HSP70 过表达慢病毒由上海瑞赛生物技术有限公司进行包装。抗 HSP70 抗体购自中国香港 Abcam 公司; 钙离子荧光探针 Fluo-3 AM 购自上海碧云天生物技术研究; 胎牛血清及 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 混合气体购自青岛信和源气体有限公司。LDH 及超微量 ATP 酶测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 细胞培养: PC12 细胞用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5%CO₂、95% 湿度的培

养箱内培养, 细胞达到 80% 融合时以 0.25% 胰酶消化传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 慢病毒转染 PC12 细胞及分组: 将对数生长期的 PC12 细胞以 1×10^4 个 / mL 浓度接种到 6 孔板, 37 °C 培养过夜, 次日更换新的培养基后根据感染预实验得出的最佳感染复数 (MOI 值 = 100) 加入病毒液以及感染添加剂聚凝胺 (polybrene, 5 μg /mL), 混匀后置于细胞培养箱培养; 10 h 后更换新的培养基, 72 h 后在荧光显微镜下观察转染率, 并加入灭瘟菌素 (预实验测定的最佳药物浓度为 2.0 μg /mL) 筛选出感染病毒的细胞。将细胞分成重组慢病毒感染组 (感染含 HSP70 及荧光蛋白基因的慢病毒)、慢病毒对照组 (感染含荧光蛋白而不含 HSP70 基因的慢病毒) 及未感染组 3 组。

1.4 缺血 / 缺氧细胞模型的制备: 在无菌条件下加入不含血清的培养液, 使其将细胞覆盖即可, 将 3 组细胞同时置于密闭容器中, 充入 95% N₂ 和 5% CO₂ 气体 5 L/min, 4 ~ 5 min 后容器内可达到无氧状态^[4], 置 37 °C 孵箱培养 4 h。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测细胞内 HSP70 mRNA 表达: 收集各组细胞, 采用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA, 经 DNA 酶 I 处理后按照反转录试剂盒要求的标准条件合成 cDNA, 用作 PCR 模版。HSP70 编码基因引物由南京金斯瑞生物科技服务有限公司合成。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。取 4 μL PCR 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶自动成像系统观察结果。

1.5.2 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测细胞内 HSP70 蛋白表达: 收集细胞, 用裂解液提取细胞总蛋白, 取 50 μg 蛋白上样进行凝胶电泳, 经转膜、

封闭,依次加抗 HSP70 抗体、羊抗兔 IgG 抗体作用,最后加发光液后显影仪上显影,并观察结果。

1.5.3 四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 检测细胞活性:取对数生长期的细胞悬液接种到 96 孔板中,每孔约 4 000 个细胞;细胞贴壁后给予缺氧处理 4 h,在 96 孔板中每孔加入 MTT 液 20 μ L;4 h 后吸出上清液,每孔加入 150 μ L 二甲亚砷 (DMSO) 终止反应。用酶标仪在波长 490 nm 处测定各孔吸光度 (A) 值,实验重复 3 次。以 A 值间接代表细胞活性,A 值越大,表明细胞越有活性。

1.5.4 LDH 活性和 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度测定:取对数生长期的各组细胞分别接种于 96 孔板,每组均设 6 个复孔,细胞过夜贴壁后给予缺氧处理 4 h,收集细胞上清液,参照 LDH 测定试剂盒说明书测定 LDH 活性,参照 Fluo-3^{AM} 测定试剂盒说明书应用流式细胞仪测定 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度,取 3 次实验的平均值。

1.5.5 Na^+-K^+-ATP 酶、 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶、总 ATP 酶活性测定:取对数生长期的各组细胞分别接种到 24 孔板,细胞过夜贴壁后给予缺氧处理 4 h,收集细胞并用生理盐水制备成 10^6 个/mL 细胞悬液,用超声破碎仪破碎细胞,离心取上清进行蛋白定量。参照试剂盒说明书于分光光度计 636 nm 处测定 A 值。

1.6 统计学方法:采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜下观察 PC12 细胞形态学:刚传代的 PC12 细胞呈悬浮状,透亮圆形,体积小;传代 24 h 后大部分细胞贴壁并出现突起,以双突起多见;48 h 后细胞饱满,遮光性强,并相互连接成网 (图 1)。

2.2 PC12 细胞中 HSP70 的 mRNA 和蛋白表达:RT-PCR 结果显示 (图 2),重组慢病毒感染组可观察到 HSP70 编码基因 286 bp 的特异扩增带;而慢病毒对照组和未感染组 PC12 细胞无此条带。Western Blot 结果显示 (图 3),重组慢病毒感染组可观察到 HSP70 特异性蛋白条带;而慢病毒对照组和未感染组 PC12 细胞无此条带。

2.3 外源性 HSP70 过表达对 PC12 细胞活性影响 (表 1):重组慢病毒感染组 PC12 细胞活性明显高于慢病毒对照组与未感染组 (均 $P < 0.01$),表明细胞有较强的生长能力;而慢病毒对照组与未感染组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。

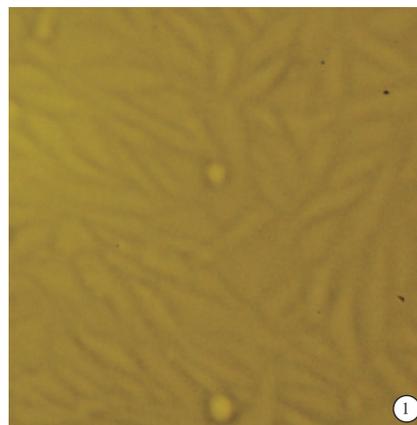
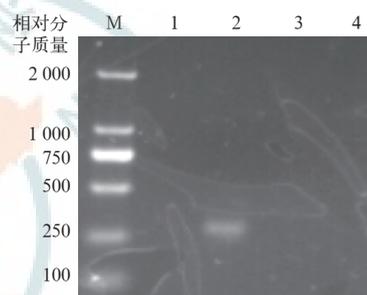
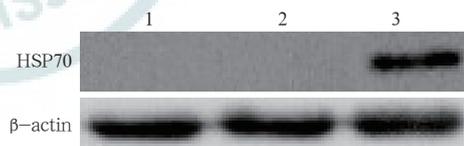


图 1 光镜下观察嗜铬细胞瘤 PC12 细胞传代 48 h 时细胞饱满,遮光性强,并相互连接成网 中倍放大



RT-PCR 为反转录-聚合酶链反应,PC12 细胞为嗜铬细胞瘤,HSP70 为热休克蛋白 70;M 为 Marker,1 为阴性对照,2 为重组慢病毒感染组,3 为慢病毒对照组,4 为未感染组

图 2 RT-PCR 检测 PC12 细胞中 HSP70 mRNA 的表达



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验,PC12 细胞为嗜铬细胞瘤,HSP70 为热休克蛋白 70, β -actin 为 β -肌动蛋白;1 为未感染组,2 为慢病毒对照组,3 为重组慢病毒感染组

图 3 Western Blot 检测 PC12 细胞中 HSP70 的蛋白表达

2.4 外源性 HSP70 过表达对 PC12 细胞 LDH 漏出水平影响 (表 1):各组细胞缺氧处理 4 h 后,重组慢病毒感染组细胞上清液中 LDH 活性低于慢病毒对照组与未感染组 (均 $P < 0.01$);而慢病毒对照组与未感染组细胞上清液中 LDH 活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 外源性 HSP70 过表达对 PC12 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度影响 (表 1):重组慢病毒感染组 PC12 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 相对荧光强度明显低于慢病毒对照组和未感染组 (均 $P < 0.01$);而慢病毒对照组与未感染组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 外源性 HSP70 过表达对 PC12 细胞 ATP 酶活

表 1 外源性 HSP70 过表达对缺血 / 缺氧 PC12 细胞活性、LDH 水平、[Ca²⁺]_i 浓度及 ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	细胞活性 (A 值)	LDH (U/L)	[Ca ²⁺] _i (相对 荧光强度, %)	N ⁺ -K ⁺ -ATP 酶 ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶 ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	总 ATP 酶 ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
未感染组 (1)	6	0.363 ± 0.045	962.89 ± 26.68	40.40 ± 3.05	6.450 ± 0.091	8.064 ± 0.195	13.983 ± 0.085
慢病毒对照组 (2)	6	0.395 ± 0.014	935.43 ± 34.77	41.48 ± 3.33	6.728 ± 0.173	7.910 ± 0.209	14.150 ± 0.182
重组慢病毒感染组 (3)	6	0.575 ± 0.020	743.46 ± 23.68	31.60 ± 2.43	8.608 ± 0.307	10.523 ± 0.036	17.041 ± 0.324
各组间比较的 F/P 值		74.046/ < 0.001	103.529/ < 0.001	19.964/ < 0.001	93.550/ < 0.001	86.420/ < 0.001	241.073/ < 0.001
两组间比较 1:2 的 t/P 值		1.665/ 0.127	1.533/ 0.156	0.588/ 0.570	2.455/ 0.070	0.872/ 0.432	1.575/ 0.190
两组间比较 1:3 的 t/P 值		10.600/ < 0.001	15.044/ < 0.001	5.502/ < 0.001	11.675/ < 0.001	11.535/ < 0.001	17.602/ < 0.001
两组间比较 2:3 的 t/P 值		17.996/ < 0.001	11.179/ < 0.001	5.853/ < 0.001	9.237/ 0.001	9.718/ 0.001	16.113/ < 0.001

注: HSP70 为热休克蛋白 70, PC12 细胞为嗜铬细胞瘤, LDH 为乳酸脱氢酶, [Ca²⁺]_i 为游离钙离子浓度

性影响 (表 1): 重组慢病毒感染组 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶和总 ATP 酶活性均高于慢病毒对照组和未感染组 (均 $P < 0.01$); 而慢病毒对照组与未感染组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

3 讨论

PC12 细胞为来源于大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤克隆的细胞株, 体外培养具有类似神经元的特性, 不仅能聚集成堆, 长出纤维突起, 还可以分泌儿茶酚胺、多巴胺和去甲肾上腺素等神经递质, 在国内外的研究中被广泛用作神经元的体外模型^[5]。

脑组织代谢旺盛, 血流丰富, 因此极易受到缺血 / 缺氧的影响而引起神经功能损害。HIE 的病理生理学机制是一个极其复杂的过程, 血流中断后短时间内就能引起能量衰竭, 导致神经细胞的炎症、坏死和凋亡, 脑组织坏死、软化, 最终导致脑功能丧失, 从而继发性引起神经系统功能性障碍^[6]。

HSP70 是热休克蛋白家族中被研究最多、关注最广的成员之一^[7], 几乎存在于所有细胞中, 在正常细胞中含量极低, 但在应激状态下可成倍增加, 对心、肝、脑、肾等都有保护作用。李晓鲁等^[8]报道, 外源性 HSP70 可增强肠上皮细胞生长及增殖能力, 从而保护其抵抗缺氧 / 再复氧损伤; 李锐等^[9]报道, 诱导 HSP70 的表达可减轻大鼠肾缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤; HSP70 在哺乳类动物脑损伤后迅速诱导产生, 对机体和脑部都有明显的保护作用^[10]; 范德义等^[11]证实, HSP70 抗体通过细胞免疫反应达到保护脑细胞的作用; 赵翠等^[12]报道, 适当时间的缺血预处理对脑 I/R 损伤有保护作用; Ge 等^[13]报道, 缺血预处理大鼠海马 CA1 区可诱导 HSP70 表达, 减少神经细胞凋亡; 刘颖等^[14]报道, HSP70 可能通过提高细胞抗氧化应激能力、抑制炎症反应以及抑制细胞凋亡, 在缺血性脑卒中中发挥保护作用。脑缺血后 HSP70 蛋白表达时间与神经元凋亡的时序基本吻合, 提示 HSP70 参与了抑制细胞凋亡^[15]。

本实验采用携带外源性 HSP70 基因的慢病毒感染 PC12 细胞, 观察外源性 HSP70 在 PC12 细胞内稳定表达后对该细胞钙稳态的影响。结果显示, PC12 细胞经缺血 / 缺氧处理后, 重组慢病毒感染组细胞活性明显增强。表明 HSP70 可以抵抗缺血 / 缺氧对 PC12 细胞线粒体的损伤。LDH 是一种糖酵解酶, 广泛存在于机体的各种组织细胞中, 细胞膜受损后 LDH 从胞质内漏出, 故检测细胞上清液中 LDH 水平可间接反映细胞的损伤程度^[16], 细胞损伤越严重, LDH 水平越高。本研究显示, 重组慢病毒感染组上清液中 LDH 水平明显低于慢病毒对照组和未感染组。提示 HSP70 可抵抗缺血 / 缺氧对 PC12 细胞线粒体的损伤。

Ca²⁺ 作为细胞内重要的信使之一, 广泛参与多种细胞功能, 国内外大量研究证实, 细胞内钙超载可通过不同机制引起多种细胞损伤^[17], 钙超载是细胞死亡的最终通路^[18-19]。因此, 钙稳态改变可能是细胞凋亡的重要机制之一。Liu 等^[20]报道, 诱导大鼠分离心室肌细胞 I/R 损伤模型的 HSP70 表达时, 可维持细胞内钙稳态的平衡。Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶和总 ATP 酶都是广泛存在于真核细胞膜的跨膜蛋白, 可通过水解 ATP 酶来维持细胞内外离子的平衡, 它们可以通过不同的机制来维持细胞内相对较低的 Ca²⁺ 浓度^[21-22]。本实验结果显示, 重组慢病毒感染组 [Ca²⁺]_i 荧光强度明显降低, ATP 酶活性则明显升高。表明 HSP70 是通过调节 ATP 酶活性来维持缺血 / 缺氧 PC12 细胞钙稳态的。

本研究还表明, HSP70 可保护缺血 / 缺氧 PC12 细胞线粒体功能和细胞膜的完整性, 这一结果与我们先前的研究结果一致^[23]。同时也符合 Yenari 等^[24]报道的结果, 即将外源性 HSP70 直接注射至大鼠脑内, 在大脑中动脉阻断 1 h 后能显著提高神经元存活率。另外, 本研究结果还显示, HSP70 可以通过调节细胞膜 ATP 酶的活性素维持 PC12 细胞钙稳态,

从而起到抗凋亡作用,这一机制在国内很少报道。

综上所述,外源性 HSP70 可从不同的作用点来保护缺血/缺氧性脑细胞,并通过调节 ATP 酶活性来维持缺血缺氧 PC12 细胞钙稳态,该发现为临床上 HIE 提供了新的治疗前景。

参考文献

- [1] Lees KR, Zivin JA, Ashwood T, et al. NXY-059 for acute ischemic stroke [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354 (6): 588-600.
- [2] Banecka-Majkutewicz Z, Sawula W, Kadziński L, et al. Homocysteine, heat shock proteins, genistein and vitamins in ischemic stroke—pathogenic and therapeutic implications [J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59 (4): 495-499.
- [3] Lucke-Wold BP, Turner RC, Lucke-Wold AN, et al. Age and the metabolic syndrome as risk factors for ischemic stroke: improving preclinical models of ischemic stroke [J]. *Yale J Biol Med*, 2012, 85 (4): 523-539.
- [4] Hu D, Chen F, Guan C, et al. Anti-hypoxia effect of adenovirus-mediated expression of heat shock protein 70 (HSP70) on primary cultured neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91 (9): 1174-1182.
- [5] Shafer TJ, Atchison WD. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies [J]. *Neurotoxicology*, 1991, 12 (3): 473-492.
- [6] Lemiale V, Huet O, Vigué B, et al. Changes in cerebral blood flow and oxygen extraction during post-resuscitation syndrome [J]. *Resuscitation*, 2008, 76 (1): 17-24.
- [7] Tsukimi Y, Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24 (1): 1-9.
- [8] 李晓鲁, 彭毅志, 袁志强, 等. HSP70 基因转染对缺氧-再复氧肠上皮细胞生长能力影响的研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2003, 15 (2): 81-83.
- [9] 李锐, 李润玖, 张彧. 热休克蛋白 70 在大鼠肾缺血/再灌注损伤中的表达及血必净注射液干预作用的研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15 (5): 293-295.
- [10] 于年强, 窦以河, 孙鹏. HSP70 在颅脑损伤后的神经保护作用研究进展 [J]. *山东医药*, 2013, 53 (40): 91-93.
- [11] 范德义, 姜丹, 董明国, 等. 高血压脑梗死与血浆热休克蛋白 70 抗体水平关系的研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2006, 18 (5): 297-299.
- [12] 赵攀, 熊利泽, 董海龙, 等. 远程缺血预处理对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2007, 19 (6): 340-342.
- [13] Ge PF, Luo TF, Zhang JZ, et al. Ischemic preconditioning induces chaperone hsp70 expression and inhibits protein aggregation in the CA1 neurons of rats [J]. *Neurosci Bull*, 2008, 24 (5): 288-296.
- [14] 刘颖, 章超凡, 芮耀诚. 热休克蛋白 70 对缺血性脑卒中的保护作用 [J]. *药学服务与研究*, 2014, 14 (2): 111-114.
- [15] 方媛, 孙圣刚, 梅元武, 等. 脑缺血再灌注后 HSP70 蛋白的表达及其与凋亡的关系 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2001, 9 (6): 321-322.
- [16] 周晓峰, 黄丁丁, 王迪芬, 等. 丙泊酚预处理对谷氨酸损伤大鼠脑组织的保护作用研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2012, 24 (12): 750-753.
- [17] 高利平, 方海立. 钙超载与细胞损伤 [J]. *四川医学*, 2004, 25 (9): 1039-1041.
- [18] Emel'ianova VP, Baranova LA, Siniushkina SS, et al. A role of protein kinase C in signal reactions in outer segments of the bovine retinal rods [J]. *Biofizika*, 2002, 47 (5): 886-891.
- [19] Zucchi R, Ghelardoni S, Carnicelli V, et al. Ca²⁺ channel remodeling in perfused heart: Effects of mechanical work and interventions affecting Ca²⁺ cycling on sarcolemmal and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channels [J]. *FASEB J*, 2002, 16 (14): 1976-1978.
- [20] Liu J, Kam KW, Borchert GH, et al. Further study on the role of HSP70 on Ca²⁺ homeostasis in rat ventricular myocytes subjected to simulated ischemia [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290 (2): C583-591.
- [21] 李石, 郭芳, 董惠, 等. Na⁺-K⁺-ATP 酶参与缺氧所致大鼠皮质神经元内钙升高 [J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28 (1): 44-47.
- [22] Barber D, Hunt J, Ehrlich M. Inhibition of calcium-stimulated ATPase in the hen brain P2 synaptosomal fraction by organophosphorus esters: relevance to delayed neuropathy [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2001, 63 (2): 101-113.
- [23] 杨芳芳, 徐小娜, 胡丹, 等. 腺病毒介导的热休克蛋白 70 在神经元和胶质细胞中的抗缺氧研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2008, 20 (11): 681-684.
- [24] Yenari MA, Fink SL, Sun GH, et al. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy [J]. *Ann Neurol*, 1998, 44 (4): 584-591.

(收稿日期: 2014-11-03) (本文编辑: 李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

百草枯中毒相关诊断国家标准及专家共识导读

百草枯作为一种广谱、高效、对环境污染小的有机杂环类除草剂,广泛应用于全球 140 多个国家的农业生产中。近年来,国内急性百草枯中毒人数急剧增长,已成为我国急性中毒防治的突出难题,引起了社会各界的广泛关注。随着基础研究与临床救治实践的不断进步,国内一些学者与学会组织相继制定了百草枯中毒诊治的各种专家共识或诊断标准。

2013 年,原国家卫生部颁布了“职业性急性百草枯中毒的诊断”国家标准,随后国内急诊医学专家又制定了“急性百草枯中毒诊治专家共识”和“百草枯中毒诊断与治疗泰山共识”。国家标准和专家共识中对百草枯中毒的治疗进行了分析及规范,并提出了相应的推荐意见,相信对临床一线医务人员能起到很好的指导作用。

本刊将上述国家标准和两个专家共识制作成电子书刊登于本刊的官方网站上供大家查阅,读者通过扫描二维码或登录本刊网站 (<http://www.cccm-em120.com>) 即可方便、快捷地在“标准与指南”栏目中查阅到“职业性急性百草枯中毒的诊断国家标准”“急性百草枯中毒诊治专家共识”和“百草枯中毒诊断与治疗泰山共识”,并能深度了解国家标准和专家共识的具体内容。



扫描二维码阅读指南,从左至右分别为国家标准“职业性急性百草枯中毒的诊断”、“急性百草枯中毒诊治专家共识”和“百草枯中毒诊断与治疗泰山共识”