

慢病毒介导的热休克蛋白 70 基因对缺血 / 缺氧诱导嗜铬细胞瘤细胞内钙通道调节机制的研究

刘媛 关纯 郭璐璐 李庆淑 王芸 谢春雨 胡丹 曲彦

266071 山东青岛, 青岛大学医学院附属青岛市立医院东院重症医学科(刘媛、关纯、李庆淑、胡丹、曲彦); 266071 山东青岛, 青岛大学医学院(郭璐璐、王芸、谢春雨)

通讯作者: 曲彦, Email: qdquyan@aliyun.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.03.003

【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)细胞内质网钙稳态的影响及钙通道的调节机制。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 及绿色荧光蛋白(GFP)基因的慢病毒]、慢病毒对照组(感染含 GFP 但不含 HSP70 基因的慢病毒)及未感染组。采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测 PC12 细胞经缺血 / 缺氧处理 4、8、12、24 h 后的细胞活性,以选取最佳缺血 / 缺氧时间。采用实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测缺血 / 缺氧 8 h 时 HSP70、肌质 / 内质网 Ca^{2+} -ATP 酶亚型(SERCA2a、SERCA2b)、兰尼碱受体 2(RyR2)、三磷酸肌醇受体 1(IP3R1)的 mRNA 转录水平;采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测缺血 / 缺氧 8 h 时 HSP70、SERCA、IP3R 的蛋白表达水平;采用流式细胞仪检测细胞内活性氧(ROS)及游离钙离子($[\text{Ca}^{2+}]_i$)水平。结果 随着缺血 / 缺氧时间延长,各组细胞活性呈先增强后减弱的趋势,均于 8 h 时达峰值。缺血 / 缺氧 8 h 时,重组慢病毒感染组细胞活性较未感染组和慢病毒对照组均明显升高[A 值($\times 10^{-2}$): 20.3 ± 2.2 比 14.1 ± 2.1 、 15.0 ± 1.6 , 均 $P < 0.01$], HSP70 和 SERCA 的 mRNA 及蛋白表达均明显上调[HSP70 mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 为 0.785 ± 0.018 比 0.428 ± 0.019 、 0.423 ± 0.023 , HSP70 蛋白(灰度值)为 2.72 ± 0.20 比 1.56 ± 0.36 、 1.63 ± 0.41 , SERCA2a mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 为 0.971 ± 0.037 比 0.367 ± 0.014 、 0.347 ± 0.012 , SERCA2b mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 为 8.869 ± 0.162 比 3.015 ± 0.091 、 2.941 ± 0.091 , SERCA 蛋白(灰度值)为 2.84 ± 0.18 比 1.48 ± 0.26 、 1.52 ± 0.29], IP3R2 的 mRNA 及蛋白表达均明显下调[IP3R2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 为 0.183 ± 0.020 比 0.439 ± 0.020 、 0.433 ± 0.040 , IP3R2 蛋白(灰度值)为 1.15 ± 0.12 比 1.91 ± 0.20 、 1.83 ± 0.19], 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$), 而 RyR1 mRNA 表达差异无统计学意义[$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ($\times 10^{-3}$): 1.97 ± 0.63 比 2.02 ± 0.22 、 2.01 ± 0.09 , 均 $P > 0.05$]; 细胞内 ROS 及 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的荧光强度均显著降低(ROS 为 30.54 ± 1.23 比 58.03 ± 1.97 、 57.72 ± 2.35 , $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 34.50 ± 2.05 比 48.20 ± 3.02 、 46.80 ± 2.75 , 均 $P < 0.01$)。结论 外源性 HSP70 能维持 PC12 细胞内质网钙稳态,对细胞内质网钙释放通道 IP3R 及肌质网钙泵 SERCA 调控 Ca^{2+} 的通道蛋白具有显著影响,可能对缺血 / 缺氧引起的 PC12 细胞内损伤具有保护作用。

【关键词】 热休克蛋白 70; 缺血 / 缺氧; PC12 细胞; 内质网钙通道

基金项目: 国家自然科学基金(81571938, 81501706); 山东省自然科学基金(Y2007C133)

Effects of lentivirus-mediated heat shock protein 70 gene on endoplasmic reticulum calcium homeostasis and calcium channels of PC12 cells induced by ischemia and hypoxia

Liu Yuan, Guan Chun, Guo Lulu, Li Qingshu, Wang Yun, Xie Chunyu, Hu Dan, Qu Yan

Department of Critical Care Medicine, Affiliated Municipal Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China (Liu Y, Guan C, Li QS, Hu D, Qu Y); Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China (Guo LL, Wang Y, Xie CY)

Corresponding author: Qu Yan, Email: qdquyan@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of lentivirus-mediated heat shock protein 70 (HSP70) gene on calcium homeostasis and calcium channels of PC12 cells induced by ischemic and hypoxia and its mechanisms. **Methods** PC12 cells at logarithmic phase were collected, and they were divided into recombined lentiviral infection group [infected by lentivirus containing HSP70 and green fluorescent protein (GFP) fluorescein gene], lentivirus control group (infected by lentivirus containing GFP without HSP70 gene) and non-infection group. PC12 cells were subjected ischemia/hypoxia for 4, 8, 12, 24 hours, and the cell activity was determined by methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay test in order to determine the best time for ischemia/hypoxia. The mRNA expressions of HSP70, muscle/endoplasmic

reticulum Ca^{2+} -ATP isoforms (SERCA2a, SERCA2b), ryanodine receptor 2 (RyR2), and inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 (IP3R1) were determined by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the protein expressions of HSP70, SERCA, and IP3R were determined by Western Blot at 8 hours after ischemic/hypoxia. Flow cytometry was used to determine the levels of intracellular reactive oxygen (ROS) and intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). **Results** With the prolongation of time of ischemia/hypoxia, the cell viability in all groups showed an increase followed by a weakening, and peaked at 8 hours. The cell viability at 8 hours in lentiviral infection group was significantly higher than that of the non-infection group and lentivirus control group [*A* value ($\times 10^{-2}$): 20.3 ± 2.2 vs. 14.1 ± 2.1 , 15.0 ± 1.6 , both $P < 0.01$], the mRNA and protein expressions of HSP70 and SERCA in lentiviral infection group were significantly increased [HSP70 mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$): 0.785 ± 0.018 vs. 0.428 ± 0.019 , 0.423 ± 0.023 ; HSP70 protein (gray value): 2.72 ± 0.20 vs. 1.56 ± 0.36 , 1.63 ± 0.41 ; SERCA2a mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$): 0.971 ± 0.037 vs. 0.367 ± 0.014 , 0.347 ± 0.012 ; SERCA2b mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$): 8.869 ± 0.162 vs. 3.015 ± 0.091 , 2.941 ± 0.091 ; SERCA protein (gray value): 2.84 ± 0.18 vs. 1.48 ± 0.26 , 1.52 ± 0.29], and IP3R2 mRNA and protein expressions were significantly declined [IP3R2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$): 0.183 ± 0.020 vs. 0.439 ± 0.020 , 0.433 ± 0.040 ; IP3R2 protein (gray value): 1.15 ± 0.12 vs. 1.91 ± 0.20 , 1.83 ± 0.19], with statistically significant differences (all $P < 0.01$); no significant difference in RyR mRNA was found [$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ($\times 10^{-3}$): 1.97 ± 0.63 vs. 2.02 ± 0.22 , 2.01 ± 0.09 , both $P > 0.05$]; the relative fluorescence intensity of ROS and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in lentiviral infection group was significantly reduced (ROS: 30.54 ± 1.23 vs. 58.03 ± 1.97 , 57.72 ± 2.35 ; $[\text{Ca}^{2+}]_i$: 34.50 ± 2.05 vs. 48.20 ± 3.02 , 46.80 ± 2.75 , all $P < 0.01$). **Conclusion** Exogenous HSP70 can maintain calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum of PC12 cells, affect the Ca^{2+} channel protein regulated by calcium channel IP3R and calcium pump SERCA, which may cause hypoxia/ischemia intracellular injury.

【Key words】 Heat shock protein 70; Ischemia and hypoxia; PC12 cell; Endoplasmic reticulum calcium channel

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81571938, 81501706); Natural Science Foundation of Shandong Province of China (Y2007C133)

目前对脑缺氧损伤及继发性脑损害的分子机制研究已涉及兴奋性氨基酸、钙离子稳态失衡、自由基形成、蛋白酶激活及基因表达改变等方面,其中钙超载是神经细胞缺血/缺氧继发性损伤后的重要环节^[1]。缺血/缺氧诱导的钙超载主要来源于细胞内外 Ca^{2+} 转运异常和储存 Ca^{2+} 过度释放。正常生理状态时,细胞内钙储存器参与维持细胞内钙稳态,即细胞通过肌质/内质网 Ca^{2+} -ATP 酶 (SERCA) 从胞质中摄取 Ca^{2+} ,通过三磷酸肌醇受体 (IP3R) 及兰尼碱受体 (RyR) 释放 Ca^{2+} 。热休克蛋白 70 (HSP70) 可以增加心肌细胞 SERCA、RyR 表达及活性,通过 RyR 促进 Ca^{2+} 从内质网释放入胞质,增加的胞质钙可以通过 SERCA 重摄取进入内质网,同时 HSP70 亦可增加 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体 (NCX) 的活性,提示 HSP70 可能通过 NCX 增加胞质钙的转出,从而调控钙稳态^[2]。本课题组前期研究表明,外源性 HSP70 对缺血/缺氧大鼠脑组织具有明确的保护作用^[3]。但目前关于脑缺血时 HSP70 对神经细胞 SERCA、RyR 和 IP3R 等表达及活性的影响机制尚未见报道。本研究通过构建重组慢病毒载体 vLe-HSP70 转染体外嗜铬细胞瘤细胞 (PC12 细胞),研究外源性 HSP70 对缺血/缺氧 PC12 细胞内质网钙通道的影响,进一步探讨 HSP70 脑保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料: PC12 细胞由青岛大学生理教研室提供。HSP70 过表达慢病毒 (上海瑞赛生物技术有限公司),胎牛血清、胰酶 (美国 Hyclome 公司), DMEM、TRIzol 试剂 (美国 Gibco 公司); 实时定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 试剂盒 (瑞士罗氏公司); 抗 HSP70 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司), 抗 SERCA 多克隆抗体、抗 IP3R 多克隆抗体 (美国 CST 公司); 钙离子荧光探针 Fluo-3AM 和活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (江苏碧云天生物技术研究所以)。

1.2 细胞培养: 将 PC12 细胞用含 10% 胎牛血清、100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 完全培养基培养,待细胞贴壁生长至融合状态、密度达 85% 时,用胰酶消化传代。选择生长良好且处于对数生长期的 PC12 细胞用于实验。

1.3 细胞转染及分组: 参照本课题组前期研究中的方法构建重组慢病毒载体 vLe-HSP70 转染体外 PC12 细胞^[4],转染成功的 PC12 细胞加入灭活菌素进行定期筛选。将筛选合格的细胞分为 3 组: 重组慢病毒感染组感染含 HSP70 及绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的慢病毒,慢病毒对照组感染含 GFP 但不含 HSP70 基因的慢病毒,未感染组不予转染,各组细胞终密度均为 5×10^8 个/L。

1.4 缺血 / 缺氧模型的制备: 将 3 组状态和数量相同的细胞加入无血清低糖培养液覆盖细胞, 置于密闭容器, 内置吸氧袋, 同时充入 1% O₂、5% CO₂ 和 94% N₂ (5 L/min), 4~5 min 后容器内氧浓度可低至 1%^[5], 置 37 °C 孵箱培养 4、8、12、24 h。

1.5 四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 检测细胞活性: 将细胞悬液接种于 96 孔板, 5 × 10³ 个 / 孔, 设 6 个复孔, 待细胞贴壁后缺氧处理 4、8、12、24 h, 每孔加 500 mg/L MTT 液 20 μL, 4 h 后吸出上清液 (留结晶), 加 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO) 终止反应, 振板 10 min, 于波长 490 nm 处检测各组细胞吸光度 (A) 值, 实验重复 3 次。测试孔 A 值 = 每孔 A 值 - 空白孔 A 值。

1.6 RT-qPCR 检测 PC12 细胞 HSP70、SERCA、RyR、IP3R 转录水平: 收集各组细胞, TRIzol 法提取细胞总 RNA, 去 DNA 处理后反转录合成 cDNA 作为 PCR 模版; 编码基因引物由南京金斯瑞生物科技服务有限公司设计并合成。RT-qPCR 反应步骤按试剂盒说明书进行, 共 40 个循环, 每次循环结束均检测荧光信号, 扩增结束后分析融解曲线, 确定扩增产物特异性。每个样本设 4 个复孔, 实验重复 3 次, 取均值。计算基因重复扩增的 ΔCt 值, 以 2^{-ΔΔCt} 表示各实验组与内参基因表达的差异倍数。

1.7 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测靶细胞 HSP70 蛋白表达: 经灭瘟菌素定期筛选, 收集各组细胞, 用 200 μL 放射免疫沉淀试剂 (RIPA) 裂解液 + 2 μL 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 提取细胞总蛋白, 取 50 μg 蛋白加样, 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、转膜、洗膜、封闭, 依次加一抗 (1:1000 稀释)、二抗 (1:4000 稀释), 最后加入发光液, 显影仪显影, 采用 Bio-Rad Quantity One 软件分析灰度值, 以待测蛋白与内参照 β-肌动蛋白 (β-actin) 的灰度值比值表示蛋白含量。

1.8 ROS 和细胞内游离钙离子 ([Ca²⁺]_i) 水平测定: 取对数生长期各组细胞接种于 6 孔板, 细胞贴壁后给予缺氧处理 8 h, 胰酶消化, 收集细胞, 分别参照 ROS 及钙离子荧光探针 Fluo-3 AM 试剂盒说明书操作, 装载探针后用流式细胞仪检测及分析数据, 取 3 次实验的均值。

1.9 统计学方法: 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用 *F* 检验, 两两比较用 LSD-*t* 检验; *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSP70 过表达对缺血 / 缺氧诱导 PC12 细胞活性的影响 (表 1): 随缺血 / 缺氧时间延长, 各组细胞活性呈先上升后下降的趋势, 均于缺血 / 缺氧 8 h 达峰值, 且 8 h 时重组慢病毒感染组细胞活性明显高于未感染组和慢病毒对照组 (均 *P* < 0.01), 而后两组细胞活性接近 (*P* > 0.05)。

表 1 外源性 HSP70 过表达对缺血 / 缺氧 PC12 细胞不同时间点细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	培养时间 (× 10 ⁻² , A 值)			
		4 h	8 h	12 h	24 h
未感染组	6	13.0 ± 3.1	14.1 ± 2.1	13.6 ± 1.9	13.1 ± 1.1
慢病毒对照组	6	12.2 ± 1.8	15.0 ± 1.6 ^a	13.8 ± 1.2 ^a	13.5 ± 0.9 ^{ab}
重组慢病毒感染组	6	19.6 ± 1.2	20.3 ± 2.2 ^{cd}	15.6 ± 1.1 ^{ab}	15.3 ± 0.9 ^{ab}
<i>F</i> 值		48.326	50.629	42.746	42.889
<i>P</i> 值		0.021	0.012	0.023	0.023

注: HSP70 为热休克蛋白 70, PC12 为嗜铬细胞瘤细胞; 与本组 4 h 比较, ^a*P* < 0.01; 与本组 8 h 比较, ^b*P* < 0.01; 与未感染组比较, ^c*P* < 0.01; 与慢病毒对照组比较, ^d*P* < 0.01

2.2 HSP70 过表达对缺血 / 缺氧 PC12 细胞 HSP70、SERCA、RyR1、IP3R2 mRNA 表达的影响 (表 2): PC12 细胞缺血 / 缺氧 8 h 时, 3 组间仅 RyR1 mRNA 表达差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。与未感染组和慢病毒对照组比较, 重组慢病毒感染组 HSP70 和 SERCA 亚型 2a、2b 的 mRNA 表达均显著上调, IP3R2 mRNA 表达明显下调 (均 *P* < 0.01); 未感染组与慢病毒对照组各基因转录水平差异无统计学意义 (均 *P* > 0.05)。

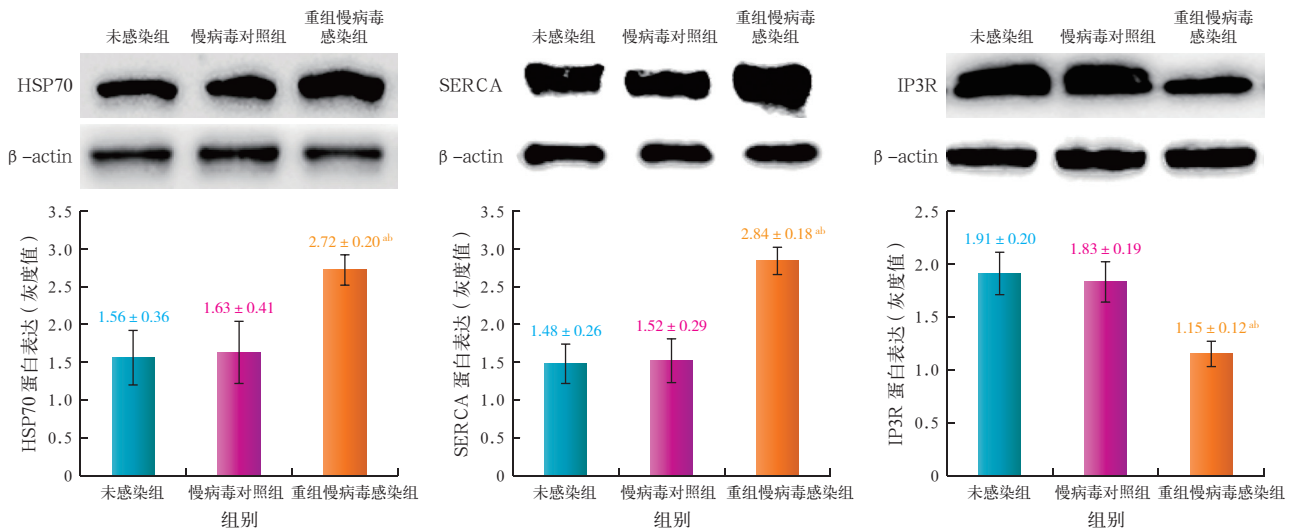
2.3 HSP70 过表达对缺血 / 缺氧 PC12 细胞 HSP70、SERCA、IP3R 蛋白表达的影响 (图 1): 3 组细胞 RyR mRNA 表达水平无统计学差异, 故未检测 RyR 的蛋白水平。PC12 细胞缺血 / 缺氧 8 h 时, 3 组均可观察到特异性蛋白条带; 重组慢病毒感染组 HSP70、SERCA 蛋白表达较未感染组和慢病毒对照组均显著上调, 而 IP3R 蛋白表达明显下调 (均 *P* < 0.01); 未感染组和慢病毒对照组比较差异均无统计学意义 (均 *P* > 0.05)。

2.4 HSP70 过表达对缺血 / 缺氧 PC12 细胞内 ROS 生成和 [Ca²⁺]_i 水平的影响 (表 3): 缺血 / 缺氧 8 h 时, 重组慢病毒感染组 ROS 和 [Ca²⁺]_i 水平明显低于未感染组和慢病毒对照组 (均 *P* < 0.01); 未感染组和慢病毒对照组比较差异无统计学意义 (均 *P* > 0.05)。

表2 外源性 HSP70 过表达对缺血 / 缺氧 PC12 细胞 8 h 时 HSP70、SERCA、RyR1、IP3R2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)				
		HSP70	SERCA2a	SERCA2b	RyR1 ($\times 10^{-3}$)	IP3R2
未感染组	4	0.428 ± 0.019	0.367 ± 0.014	3.015 ± 0.091	2.02 ± 0.22	0.439 ± 0.020
慢病毒对照组	4	0.423 ± 0.023	0.347 ± 0.012	2.941 ± 0.091	2.01 ± 0.09	0.433 ± 0.040
重组慢病毒感染组	4	0.785 ± 0.018 ^{ab}	0.971 ± 0.037 ^{ab}	8.869 ± 0.162 ^{ab}	1.97 ± 0.63	0.183 ± 0.020 ^{ab}
F 值		579.840	2683.370	9693.808	0.071	320.434
P 值		0.006	0.002	<0.001	0.761	0.009

注: HSP70 为热休克蛋白 70, PC12 为嗜铬细胞瘤细胞, SERCA2a、SERCA2b 为肌质 / 内质网 Ca^{2+} -ATP 酶亚型 2a、2b, RyR1 为兰尼碱受体 1, IP3R2 为三磷酸肌醇受体 2; 与未感染组比较, ^a $P < 0.01$; 与慢病毒对照组比较, ^b $P < 0.01$



注: HSP70 为热休克蛋白 70, PC12 为嗜铬细胞瘤细胞, SERCA 为肌质 / 内质网 Ca^{2+} -ATP 酶, IP3R 为三磷酸肌醇受体, β-actin 为 β-肌动蛋白; 与未感染组比较, ^a $P < 0.01$; 与慢病毒对照组比较, ^b $P < 0.01$

图1 外源性 HSP70 过表达对缺血 / 缺氧 PC12 细胞 8 h 时 HSP70、SERCA、IP3R 蛋白表达的影响

表3 外源性 HSP70 过表达对缺血 / 缺氧 PC12 细胞 8 h 时 ROS 及 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	ROS (荧光强度)	$[Ca^{2+}]_i$ (荧光强度)
未感染组	6	58.03 ± 1.97	48.20 ± 3.02
慢病毒对照组	6	57.72 ± 2.35	46.80 ± 2.75
重组慢病毒感染组	6	30.54 ± 1.23 ^{ab}	34.50 ± 2.05 ^{ab}
F 值		34.670	26.030
P 值		0.012	0.008

注: HSP70 为热休克蛋白 70, PC12 为嗜铬细胞瘤细胞, ROS 为活性氧, $[Ca^{2+}]_i$ 为细胞内游离钙离子; 与未感染组比较, ^a $P < 0.01$; 与慢病毒对照组比较, ^b $P < 0.01$

3 讨论

PC12 细胞分布于大鼠肾上腺, 属髓质嗜铬细胞瘤的克隆细胞株, 体外培养可有类神经元特性, 神经元样 PC12 细胞已被广泛用于神经系统生理、病理及药理等多方面研究^[6-7]。本实验参照相关文献^[8]

方法, 以成熟 PC12 细胞作为神经细胞的模型。

HSP 为机体受到不同刺激后产生的一类应激蛋白, HSP70 属 HSP 家族中高度保守的应激蛋白^[9]。研究证明, HSP70 可参与免疫反应, 抵抗肿瘤坏死因子 (TNF) 和内毒素的损伤, 从而保护细胞^[10]。亦有实验证明, HSP70 可以通过抑制 ROS 和细胞有害因子生成, 从而保护细胞和组织免受炎症损伤^[11]。HSP70 对脑缺血损伤有一定保护作用, 缺血耐受性被认为与 HSP70 基因过表达密切相关^[12]。有文献报道 HSP70 在肠黏膜组织及肾缺血 / 缺氧性损伤细胞中的表达显著增加, 可能与细胞启动自我保护机制有关^[13-14]。罗东林等^[15]研究发现, 创伤并休克后肝组织中中性粒细胞减少, HSP70 增加, 提示在创伤并休克过程中, 中性粒细胞和 HSP70 与肝组织损伤有关。本课题组前期研究结果表明, 外源性 HSP70 对神经元和胶质细胞缺氧 / 再复氧损伤具有保护作用^[16]。

氧是细胞能量代谢的重要原料,细胞缺氧时,细胞内的氧依赖性活性酶及细胞膜结构受损,通透性增加,ROS分泌增多,细胞线粒体受损,呼吸功能进行性减退,能量供应减少,代谢减退,以致细胞死亡^[17-18]。有文献报道,用氧糖剥夺(OGD)实验模型(即细胞置于无血清培养基中放入含1% O₂、5% CO₂、94% N₂的培养箱内培养)可模拟体内缺血/缺氧环境^[19-20]。

本研究用MTT观察缺血/缺氧处理神经元样PC12细胞,结果显示,重组慢病毒感染组细胞活性明显增强,且以缺氧8h时细胞活性最强,证明HSP70可抵抗缺血/缺氧对PC12细胞线粒体的损伤,与Larsen等^[21]研究结果一致。

Ca²⁺作为细胞内的第二信使,在细胞损伤过程中发挥了极其重要的作用^[22]。细胞在静息状态下,通过内质网膜上Ca²⁺通道(SERCA、IP3R和RyR),维持Ca²⁺浓度在外低内高的状态。正常情况下,内质网腔内Ca²⁺主要由IP3R和RyR释放入胞质,胞质内Ca²⁺再通过SERCA摄入内质网腔中,以维持细胞内Ca²⁺动态平衡^[23]。IP3R与RyR的结构具有部分相似性,被公认是调节胞质内Ca²⁺平衡的膜受体。三磷酸肌醇(IP3)是细胞信号转导中的第二信使,与IP3R特异性结合可引起内质网中储存Ca²⁺释放,致Ca²⁺在胞质内升高。IP3R主要分布于细胞内质网中^[24],有3种亚型,其中IP3R2主要分布于神经胶质细胞^[25]。当细胞缺血/缺氧时,IP3与受体结合后发生构象改变,开放Ca²⁺通道,释放内质网中的Ca²⁺,激活Ca²⁺依赖钙调磷酸酶,使细胞发生一系列反应,最终导致细胞损伤或凋亡。有文献证实,肌质网IP3R/RyR介导胞质内Ca²⁺水平变化与子宫肌细胞缺氧凋亡有关^[26]。高益宁等^[27]证明,SERCA抑制剂可使缺血/缺氧胞质内的Ca²⁺无法及时泵回内质网,导致Ca²⁺平衡失调,囊泡摄取Ca²⁺能力进行性下降,提示SERCA会影响内质网钙储存功能。

本实验结果显示,3组细胞钙摄取能力均下降;HSP70和SERCA基因活性增强,IP3R基因活性降低,而RyR基因活性变化不明显,各基因在蛋白水平也有相同的改变。说明神经细胞中肌质网对钙的摄取功能下降,细胞内质网和肌质网受到一定程度的破坏;重组慢病毒感染组钙摄取能力较未感染组和慢病毒对照组都有不同程度的提高,提示增加HSP70对内质网和肌质网具有一定的保护作用。

与本课题组前期的研究结果一致^[4-5];同时也符合Yenari等^[28]报道的外源性HSP70能显著提高神经元存活率的结论。通过后期研究发现,细胞内钙摄取能力可能通过增加HSP70调整SERCA和IP3R的活性来完成。说明HSP70可以调节细胞内质网钙通道的活性,维持PC12细胞钙稳态,从而起到抗凋亡的作用,这一机制在国内很少报道。

综上所述,本研究结果显示,在应激状态下,重组慢病毒可介导外源性HSP70在缺血/缺氧大鼠脑组织中有效表达,提高HSP70基因表达可以维持PC12细胞钙稳态,对神经细胞有保护作用,为进一步开展脑缺血/缺氧的防治提供了实验基础。

参考文献

- [1] Kumar VS, Gopalakrishnan A, Naziroğlu M, et al. Calcium ion—the key player in cerebral ischemia [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21 (18): 2065–2075. DOI: 10.2174/0929867321666131228204246.
- [2] 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. DOI: 10.1152/ajpcell.00145.2005.
- [3] 娜妮娜, 宋晓聪, 胡丹, 等. 腺病毒介导的热休克蛋白70对脑缺血缺氧大鼠保护作用的研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2011, 23 (6): 365–367. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.06.014. Huan SS, Song XC, Hu D, et al. The protective effect of heat shock protein 70 gene transfection on rats with cerebral hypoxia-ischemia [J]. *Chin Crit Care Med*, 2011, 23 (6): 365–367. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.06.014.
- [4] 胡艳宁, 李庆淑, 李智, 等. 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 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (4): 295–299. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.04.014. Hu YN, Li QS, Li Z, et al. Effects of lentivirus-mediated heat shock protein 70 gene on calcium homeostasis in PC12 cells undergone ischemia and hypoxia [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (4): 295–299. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.04.014.
- [5] 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. DOI: 10.1002/jnr.23240.
- [6] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73 (7): 2424–2428. DOI: 10.1073/pnas.73.7.2424.
- [7] Dijkmans TF, van Hooijdonk LW, Schouten TG, et al. Temporal and functional dynamics of the transcriptome during nerve growth factor-induced differentiation [J]. *J Neurochem*, 2008, 105 (6): 2388–2403. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05338.x.
- [8] 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.
- [9] Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology [J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 80 (2): 183–201. DOI:10.1016/S0163-7258(98)00028-X.
- [10] Meldrum KK, Burnett AL, Meng X, et al. Liposomal delivery of heat shock protein 72 into renal tubular cells blocks nuclear factor-kappaB activation, tumor necrosis factor-alpha production, and

- subsequent ischemia-induced apoptosis [J]. *Circ Res*, 2003, 92 (3): 293-299. DOI: 10.1161/01.RES.0000057754.35180.99.
- [11] Vanitallie TB. Stress: a risk factor for serious illness [J]. *Metabolism*, 2002, 51 (6 Suppl 1): 40-45. DOI: 10.1053/meta.2002.33191.
- [12] Willoughby DS, Priest JW, Nelson M. Expression of the stress proteins, ubiquitin, heat shock protein 72, and myofibrillar protein content after 12 weeks of leg cycling in persons with spinal cord injury [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2002, 83 (5): 649-654. DOI: 10.1053/apmr.2002.31184.
- [13] 袁志强, 彭毅志, 李晓鲁, 等. 严重烧伤早期肠黏膜组织热休克蛋白 70 的表达规律 [J]. *中华危重病急救医学*, 2005, 17 (5): 264-267. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2005.05.003.
- Yuan ZQ, Peng YZ, Li XL, et al. Expression of heat shock protein 70 in intestinal mucosa during the early stage after severe burns and its significance [J]. *Chin Crit Care Med*, 2005, 17 (5): 264-267. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2005.05.003.
- [14] 李锐, 李润玖, 张戡. 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. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2008.05.011.
- Li R, Li RJ, Zhang Y. A research of intervention of Xuebijing injection on expression of heat shock protein 70 in rats with renal ischemia/reperfusion injury [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2008, 15 (5): 293-295. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2008.05.011.
- [15] 罗东林, 周继红, 刘宝华, 等. 糖皮质激素受体和热休克蛋白 70 在大鼠创伤失血性休克肝组织中的变化及其意义 [J]. *中华危重病急救医学*, 2005, 17 (11): 651-653. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2005.11.004.
- Luo DL, Zhou JH, Liu BH, et al. Changes in glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 in liver tissue after trauma with hemorrhagic shock in rats [J]. *Chin Crit Care Med*, 2005, 17 (11): 651-653. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2005.11.004.
- [16] 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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2008.11.012.
- Yang FF, Xu XN, Hu D, et al. Recombinant heat shock protein 70 induced by adenovirus protects neurons and glial cells against hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2008, 20 (11): 681-684. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2008.11.012.
- [17] Taylor CT, Pouyssegur J. Oxygen, hypoxia, and stress [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1113 : 87-94. DOI: 10.1196/annals.1391.004.
- [18] Boutilier RG. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia [J]. *J Exp Biol*, 2001, 204 (Pt 18): 3171-3181.
- [19] Merkel MJ, Liu L, Cao Z, et al. Estradiol abolishes reduction in cell death by the opioid agonist Met5-enkephalin after oxygen glucose deprivation in isolated cardiomyocytes from both sexes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295 (1): H409-415. DOI: 10.1152/ajpheart.01018.2007.
- [20] Wohnsland S, Burgers HF, Kuschinsky W, et al. Neurons and neuronal stem cells survive in glucose-free lactate and in high glucose cell culture medium during normoxia and anoxia [J]. *Neurochem Res*, 2010, 35 (10): 1635-1642. DOI: 10.1007/s11064-010-0224-1.
- [21] Larsen EC, Hatcher JF, Adibhatla RM. Effect of tricyclodecan-9-yl potassium xanthate (D609) on phospholipid metabolism and cell death during oxygen-glucose deprivation in PC12 cells [J]. *Neuroscience*, 2007, 146 (3): 946-961. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.02.022.
- [22] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13 (3): 184-190. DOI: 10.1038/ncb0311-184.
- [23] Luciani DS, Gwiazda KS, Yang TL, et al. Roles of IP3R and RyR Ca²⁺ channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death [J]. *Diabetes*, 2009, 58 (2): 422-432. DOI: 10.2337/db07-1762.
- [24] Smith IF, Parker I. Imaging the quantal substructure of single IP3R channel activity during Ca²⁺ puffs in intact mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (15): 6404-6409. DOI: 10.1073/pnas.0810799106.
- [25] Dent MA, Raisman G, Lai FA. Expression of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor during axogenesis and synaptic contact in the central and peripheral nervous system of developing rat [J]. *Development*, 1996, 122 (3): 1029-1039.
- [26] 杨伟红, 戴虹, 程忠平, 等. 肌质网 IP3R/RyR 介导胞浆内钙离子浓度变化与子宫肌瘤细胞缺氧凋亡的研究 [J]. *实用妇产科杂志*, 2013, 29 (4): 265-270. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6946.2013.04.011.
- Yang WH, Dai H, Cheng ZP, et al. The Relationship between Cytosolic Calcium Concentration Changes Mediated by Sarcoplasmic Reticulum IP3R/RyR and Uterine Leiomyoma Cells Apoptosis Under Hypoxic Condition [J]. *J Pract Obstet Gynecol*, 2013, 29 (4): 265-270. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6946.2013.04.011.
- [27] 高益宁, 王丹音, 潘宗富, 等. 基于光镜表型的促神经元亚型分化药物初筛法 [J]. *浙江大学学报 (医学版)*, 2012, 41 (4): 373-380. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2012.04.004.
- Gao YN, Wang DY, Pan ZF, et al. Phenotype-based primary screening for drugs promoting neuronal subtype differentiation in embryonic stem cells with light microscope [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2012, 41 (4): 373-380. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2012.04.004.
- [28] 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. DOI: 10.1002/ana.410440403.

(收稿日期: 2015-12-28)

(本文编辑: 孙茜, 李银平)