

# 慢病毒介导的 BAG-1L 基因对缺氧状态下人神经母细胞瘤细胞的保护作用

王芸 李庆淑 贾超 谢春雨 宋砚坤 张楠 曲彦

266023 山东青岛, 青岛大学医学部护理学院(王芸、谢春雨、宋砚坤、张楠); 266071 山东青岛, 青岛大学附属青岛市市立医院东院重症医学科(李庆淑、贾超、曲彦)

通讯作者: 曲彦, Email: qdquyan@aliyun.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.009

**【摘要】目的** 探讨慢病毒介导 Bcl-2 结合抗凋亡基因 1L(BAG-1L) 过表达对缺氧/复氧诱导人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y) 损伤的保护作用, 研究其对磷酸肌醇-3 激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT) 通路的影响。**方法** 体外培养 SH-SY5Y 细胞, 取对数生长期细胞分为重组慢病毒感染组(感染携带 BAG-1L 基因及荧光蛋白基因的重组慢病毒)、载体对照组(感染携带荧光蛋白基因但不携带 BAG-1L 基因的慢病毒)及细胞对照组(未感染慢病毒)。感染 48 h 后采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测靶细胞 BAG-1L 的表达; 3 组细胞经缺氧 8 h/复氧 24 h 处理后, 采用 CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测细胞活性; 采用别藻蓝蛋白标记的膜联蛋白 V/7-氨基放线菌素 D(Annexin V-APC/7-AAD) 双染法检测细胞凋亡, 并进行流式分析; 采用 Western Blot 试验检测细胞 BAG-1L、热休克蛋白 70(HSP70)、AKT 及磷酸化 AKT(p-AKT) 的蛋白表达。**结果** 重组慢病毒感染 48 h 后可观察到外源性 BAG-1L 特异性蛋白条带, 而细胞对照组和载体对照组无此特异性蛋白条带。经缺氧/复氧处理后, 重组慢病毒感染组细胞活性较细胞对照组和载体对照组均明显增高(A 值:  $0.689 \pm 0.036$  比  $0.425 \pm 0.013$ 、 $0.400 \pm 0.012$ ), 细胞凋亡明显减少[凋亡率:  $(26.97 \pm 1.82)\%$  比  $(36.60 \pm 1.45)\%$ 、 $(35.77 \pm 3.74)\%$ ], BAG-1L、HSP70、p-AKT 蛋白表达水平明显升高[BAG-1L 蛋白(灰度值):  $2.405 \pm 0.167$  比  $0.529 \pm 0.141$ 、 $0.601 \pm 0.099$ , HSP70 蛋白(灰度值):  $0.997 \pm 0.123$  比  $0.634 \pm 0.091$ 、 $0.584 \pm 0.106$ , p-AKT 蛋白(灰度值):  $1.234 \pm 0.118$  比  $0.661 \pm 0.210$ 、 $0.712 \pm 0.199$ , 均  $P < 0.01$ ]; 而 AKT 蛋白表达虽高于细胞对照组和载体对照组(灰度值:  $1.103 \pm 0.269$  比  $0.646 \pm 0.188$ 、 $0.791 \pm 0.326$ ), 但差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。细胞对照组和载体对照组各指标比较差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。**结论** 慢病毒介导的 BAG-1L 基因过表达可以保护神经细胞抵抗缺氧引起的损伤, 抑制细胞凋亡, 其保护作用可能与促进 PI3K/AKT 通路的激活有关。

**【关键词】** Bcl-2 结合抗凋亡基因; 神经细胞; 缺氧/复氧; 抗凋亡; PI3K/AKT 通路

**基金项目:** 国家自然科学基金(81571938, 81501706)

**Protective effect of BAG-1L mediated by lentivirus in human neuroblastoma cells induced by hypoxia** Wang

Yun, Li Qingshu, Jia Chao, Xie Chunyu, Song Yankun, Zhang Nan, Qu Yan

School of Nursing, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266023, Shandong, China (Wang Y, Xie CY, Song YK, Zhang N); Department of Critical Care Medicine, Affiliated Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China (Li QS, Jia C, Qu Y)

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

**【Abstract】Objective** To investigate the protective effects of lentivirus mediated Bcl-2-associated athanogene 1L (BAG-1L) over-expression on human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) induced by hypoxia/re-oxygenation, and to study its effect on the phosphoinositide 3 kinase serine/threonine protein kinase (PI3K/AKT) pathway. **Methods** SH-SY5Y cells were cultured *in vitro*, and the cells at logarithmic phase were collected, and they were divided into recombined lentiviral infection group [infected by lentivirus containing BAG-1L and green fluorescent protein (GFP) gene], vector control group (infected by lentivirus containing GFP without BAG-1L gene) and cell control group (non-infection). Western Blot was used to detect the expression of BAG-1L in target cells after infection for 48 hours. SH-SY5Y cells were subjected to hypoxia for 8 hours and re-oxygenation for 24 hours, then the cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the cell activity, and the apoptosis was detected by flow cytometry after allophycocyanin labeled annexin V/7-amino actinomycin D (Annexin V-APC/7-AAD) staining. Western Blot was used to detect the protein expressions of BAG-1L, heat shock protein 70 (HSP70), AKT and phosphorylated AKT (p-AKT). **Results** After infection for 48 hours, exogenous BAG-1L protein bands were observed in recombined lentiviral infection group, but not observed in cell control group and vector control group. After hypoxia/re-oxygenation treatment, the cell viability in recombined lentiviral infection group was significantly higher than that in cell control group and vector control group (A value:  $0.689 \pm 0.036$  vs.  $0.425 \pm 0.013$ ,  $0.400 \pm 0.012$ ), apoptosis was significantly decreased [apoptosis rate:  $(26.97 \pm 1.82)\%$  vs.  $(36.60 \pm 1.45)\%$ ,  $(35.77 \pm 3.74)\%$ ], the protein levels of BAG-1L, HSP70 and p-AKT were significantly increased [BAG-1L protein (gray value):  $2.405 \pm 0.167$  vs.  $0.529 \pm 0.141$ ,  $0.601 \pm 0.099$ ; HSP70

protein (gray value):  $0.997 \pm 0.123$  vs.  $0.634 \pm 0.091$ ,  $0.584 \pm 0.106$ ; p-AKT protein (gray value):  $1.234 \pm 0.118$  vs.  $0.661 \pm 0.210$ ,  $0.712 \pm 0.199$ , all  $P < 0.01$ ], but the protein level of AKT was slightly increased (gray value:  $1.103 \pm 0.269$  vs.  $0.646 \pm 0.188$ ,  $0.791 \pm 0.326$ ) without statistically significant differences (both  $P > 0.05$ ). There was no significant difference in all parameters between cell control group and vector control group (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** Lentivirus mediated BAG-1L gene over-expression can protect nerve cells against hypoxic injury and apoptosis, and the protective effect may be related to the activation increase of pathway on PI3K/AKT.

**【Key words】** Bcl-2-associated athanogene; Nerve cell; Hypoxia/re-oxygenation; Anti apoptotic; PI3K/AKT pathway

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81571938, 81501706)

缺血性脑血管疾病是目前人类死亡的重要原因之一,尽管脑血管病诊疗水平不断提高,但仍具有高发病率、高致残率、高病死率的特点。美国流行病学研究预测,到2030年,发达国家65岁以上老年人中约1/5可能患有缺血性脑血管疾病<sup>[1]</sup>。因此,有必要积极寻求新的防治脑缺血性疾病的方法。研究证实,脑缺血时位于梗死核心的神经元往往发生快速坏死性死亡,而位于缺血半影区的神经元则发生延迟性死亡,这种延迟性死亡主要表现为细胞凋亡<sup>[2]</sup>。Bcl-2结合抗凋亡基因1(BAG-1)是一种编码多功能蛋白的抗凋亡基因,最初克隆时发现它是一种Bcl-2结合的抗凋亡分子,在众多功能中,其凋亡调控作用最为重要<sup>[3]</sup>。BAG-1主要有4种亚型,包括p50(BAG-1L)、p46(BAG-1M)、p33、p29(BAG-1S),各种亚型C-末端都具有BAG功能域,可与热休克蛋白70(HSP70)的三磷酸腺苷酶(ATP酶)结构域结合,形成一个有功能的活性构象,并调控其功能。本实验通过重组慢病毒感染体外培养人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y),探讨外源性BAG-1L表达对缺氧状态下细胞的保护作用,并进一步研究其对磷酸肌醇-3激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)通路的影响,为脑血管病的防治提供新的思路。

## 1 材料和方法

**1.1 主要材料和试剂:**SH-SY5Y细胞由青岛大学医学部生理学教研室提供;BAG-1L过表达慢病毒由上海吉凯基因化学技术有限公司包装;抗BAG-1L、HSP70、AKT及磷酸化AKT(p-AKT)抗体均购于英国Abcam公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG、CCK-8细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。流式细胞分析试剂盒购于美国eBioscience和BD公司。

**1.2 细胞培养:**将SH-SY5Y细胞用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的DMEM培养基,于37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%湿度的培养箱内培养,细胞生长达80%融合时用0.25%胰蛋白酶加0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代,选择处于对数生

长期生长良好的细胞用于实验。

**1.3 分组及慢病毒感染靶细胞方法:**将处于对数生长期的SH-SY5Y细胞,以 $4 \times 10^4$ /孔接种到24孔板,37℃培养过夜,次日更换新培养基后,分为重组慢病毒感染组(感染携带BAG-1L基因及荧光蛋白基因的重组慢病毒)、载体对照组(感染携带荧光蛋白基因但不携带BAG-1L基因的慢病毒)及细胞对照组(未感染慢病毒)。两个感染组细胞按照预实验得出的最佳感染复数(MOI=50)分别加入携带或不携带BAG-1L基因的病毒液以及感染添加剂聚凝胺5 μg/mL,混匀后置于细胞培养箱培养;12 h后更换新的培养基;48 h后荧光显微镜下观察感染率,并加入嘌呤霉素(预实验测定的最佳药物浓度为7 μg/mL)筛选出感染成功的细胞进行实验。

**1.4 缺氧/复氧细胞模型的制备:**3组细胞在无菌条件下更换成不含血清的低糖DMEM培养基,置于密闭培养罐中,放入厌氧袋和氧气指示剂,于37℃培养箱中给予缺氧处理8 h,然后换成正常培养基,常规条件下继续培养24 h复氧。

## 1.5 检测指标及方法

**1.5.1 CCK-8试剂盒检测细胞活性:**取对数生长期细胞,以 $5 \times 10^3$ /孔分别接种于96孔板中,每组均设6个平行孔;次日细胞贴壁后给予缺氧/复氧处理。吸出培养基,每孔加入100 μL培养基和10 μL CCK-8试剂,混匀后置于细胞培养箱孵育1 h。用酶标仪在波长450 nm处测定各孔吸光度(A)值,代表细胞活性,数值越大,表明细胞活性越高。测定孔A值=每孔A值-空白孔A值。

**1.5.2 别藻蓝蛋白标记的膜联蛋白V/7-氨基放线菌素D(Annexin V-APC/7-AAD)双染法检测细胞凋亡:**给予细胞缺氧/复氧处理后,用不含EDTA的胰蛋白酶消化并收集细胞。以 $1 \times 10^6$ 结合缓冲液重悬细胞,调节其浓度为 $1 \times 10^6$ /mL。取100 μL细胞悬液分别加入5 μL Annexin V-APC和5 μL 7-AAD,混匀后室温避光孵育15 min,再加入400 μL  $1 \times$ 结合缓冲液混匀,过滤后用流式细胞仪分析。

### 1.5.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测

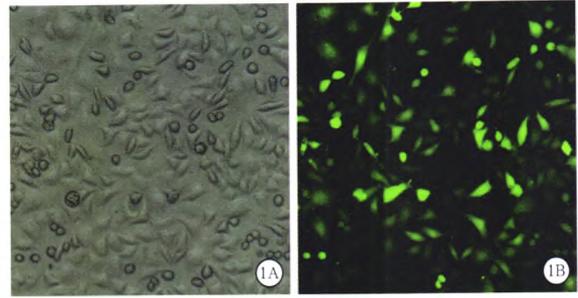
**1.5.3.1 感染 48 h 细胞 BAG-1L 蛋白表达:** 收集病毒感染细胞,裂解后提取总蛋白,BCA 蛋白定量,取 20 μg 蛋白上样行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜、封闭,加抗 BAG-1L 兔单克隆抗体(单抗,1:500)、HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:2000)后,加发光液,用 VILBER LOURMAT 凝胶图像分析系统显影分析。

**1.5.3.2 缺氧/复氧处理后细胞 BAG-1L、HSP70、AKT、p-AKT 的蛋白表达:** 细胞经缺氧/复氧处理后加入抗 HSP70 兔单抗(1:1000)、抗 AKT 兔单抗(1:10000)、抗 p-AKT 兔单抗(1:5000)。用 Bio-Rad Quantity One 软件分析灰度值,结果以待测蛋白与内参照 β-肌动蛋白(β-actin)灰度值比值表示。

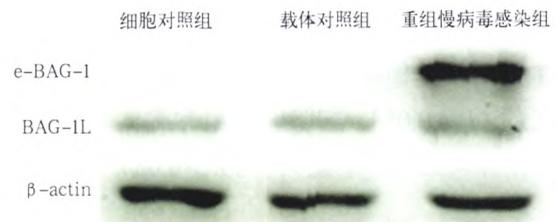
**1.6 统计学方法:** 采用 SPSS 17.0 软件分析数据,采用 Kolmogorov-Smirnov 法进行正态性检验,正态分布计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较方差齐用 LSD-*t* 检验,方差不齐用 Tamhane *T2* 法检验;非正态分布计量资料以中位数(四分位数)[ $M(Q_L, Q_U)$ ]表示,多组间比较用非参数 Kruskal-Wallis *H* 检验,两组间比较用 Mann-Whitney *U* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 慢病毒感染后 BAG-1L 的表达:** 荧光显微镜下显示(图 1),重组慢病毒可有效感染靶细胞,48 h 后感染效率达 80%。Western Blot 结果显示(图 2),重组慢病毒感染组可观察到外源性 BAG-1L 基因(e-BAG-1)特异性蛋白条带,且 e-BAG-1 在慢病毒包装过程中存在伴侣结合,蛋白条带较大;而细胞对照组和载体对照组无 e-BAG-1 特异性蛋白条带。



**图 1** 荧光显微镜下观察重组慢病毒感染 48 h 后人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y) Bcl-2 结合抗凋亡基因 1L(BAG-1L)的阳性表达 BAG-1L 过表达的 SH-SY5Y 细胞呈绿色荧光。明场下(A)可观察到细胞贴壁生长较好,细胞饱满且遮光性强;暗场下(B)可见绿色荧光,说明携带 BAG-1L 基因的重组慢病毒成功感染 SH-SY5Y 细胞 免疫荧光 中倍放大

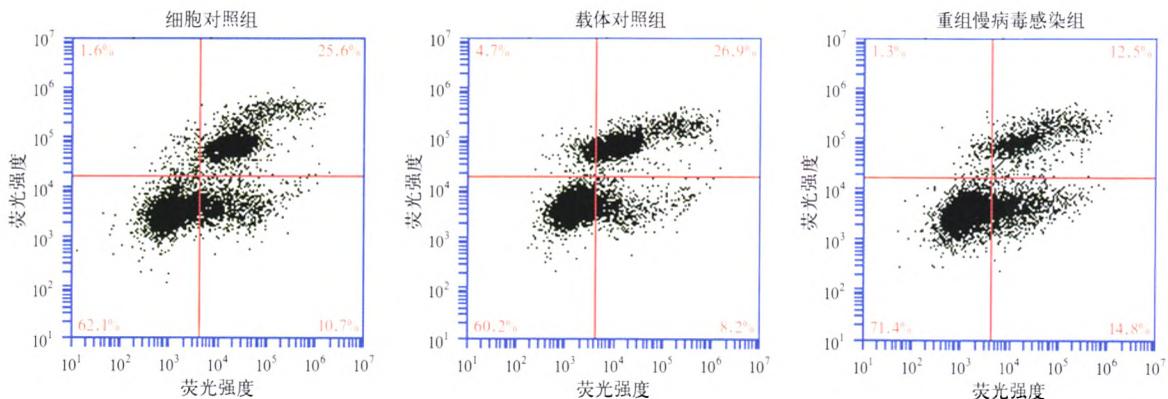


BAG-1L 为 Bcl-2 结合抗凋亡基因 1L, e-BAG-1 为外源性 BAG-1L 基因, β-actin 为 β-肌动蛋白

**图 2** 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y) BAG-1L 蛋白表达

**2.2 BAG-1L 过表达对缺氧/复氧处理后 SH-SY5Y 细胞活性的影响(表 1):** 经缺氧 8 h/复氧 24 h 处理后,重组慢病毒感染组 SH-SY5Y 细胞活性明显高于细胞对照组和载体对照组(均  $P < 0.01$ ),表明细胞增殖活跃,生长能力较强;而后两组无明显差异( $P > 0.05$ )。

**2.3 BAG-1L 过表达对缺氧/复氧处理后 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响(图 3;表 1):** 经缺氧 8 h/复氧 24 h 处理后,重组慢病毒感染组细胞凋亡率明显低于细胞对照组和载体对照组(均  $P < 0.01$ ),而后两组无明显差异( $P > 0.05$ )。



注: BAG-1L 为 Bcl-2 结合抗凋亡基因 1L, SH-SY5Y 为人神经母细胞瘤细胞;左上象限代表坏死细胞,右上象限代表晚期凋亡细胞,左下象限代表正常状态细胞,右下象限代表早期凋亡细胞;各象限数字代表相应状态下细胞所占百分比

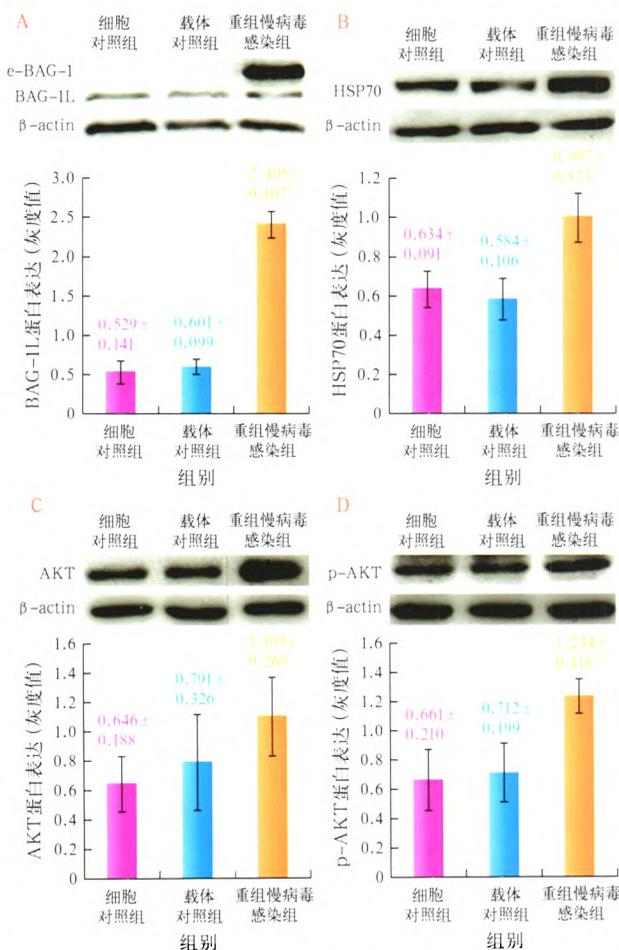
**图 3** 流式细胞仪检测 BAG-1L 过表达对缺氧/复氧处理后 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

**表1 BAG-1L 过表达对缺氧/复氧处理后 SH-SY5Y 细胞活性及凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本数(孔)	细胞活性(A 值)	细胞凋亡(%)
细胞对照组	18	0.425 ± 0.013	36.60 ± 1.45
载体对照组	18	0.400 ± 0.012	35.77 ± 3.74
重组慢病毒感染组	18	0.689 ± 0.036 <sup>ab</sup>	26.97 ± 1.82 <sup>ab</sup>

注: BAG-1L 为 Bcl-2 结合抗凋亡基因 1L, SH-SY5Y 为人神经母细胞瘤细胞; 与细胞对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与载体对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

**2.4 BAG-1L 过表达对缺氧/复氧处理后 SH-SY5Y 细胞 BAG-1L、HSP70 及 PI3K/AKT 通路蛋白表达的影响(图 4):** 经缺氧 8 h/复氧 24 h 处理后, 重组慢病毒感染组 BAG-1L、HSP70、p-AKT 蛋白表达较细胞对照组和载体对照组均显著上调(均  $P < 0.01$ ); AKT 蛋白较其他两组虽有上调, 但差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。细胞对照组和载体对照组蛋白表达差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。



BAG-1L 为 Bcl-2 结合抗凋亡基因 1L, SH-SY5Y 为人神经母细胞瘤细胞, HSP70 为热休克蛋白 70, PI3K/AKT 为磷酸肌醇-3 激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, p-AKT 为磷酸化 AKT, e-BAG-1 为外源性 BAG-1L 基因,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白; 与细胞对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与载体对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

**图 4** 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 BAG-1L 过表达对缺氧/复氧处理后 SH-SY5Y 细胞 BAG-1L(A)、HSP70(B)及 PI3K/AKT 通路蛋白 AKT(C)、p-AKT(D)表达的影响

### 3 讨论

SH-SY5Y 细胞株来自人脑恶性肿瘤, 是一种分化水平较低的肿瘤细胞。该细胞繁殖快, 细胞形态、生理和生化功能与正常神经细胞相似, 广泛应用于神经系统疾病发病机制和药物作用机制研究<sup>[4-5]</sup>。因此, 在研究缺血性脑血管病中也有一定代表意义。

BAG-1 是 1995 年 Takayama 等<sup>[3]</sup>发现的一种多功能抗凋亡基因, 可与 Bcl-2 形成复合物, 促进其抗细胞凋亡的能力。目前对于 BAG-1 的研究多集中于其在肿瘤细胞凋亡中的作用<sup>[6-10]</sup>, 但对于其在脑内神经元凋亡中的作用及机制还知之甚少。体内实验证实, 在脑发育过程中, 不成熟神经元 BAG-1 蛋白表达水平很高, 随着神经元的成熟, BAG-1 蛋白表达逐渐下调; 进一步研究表明, BAG-1 敲除胚胎可发生严重的神经元凋亡, 导致胚胎死亡, 说明 BAG-1 蛋白在神经元存活中可能具有潜在作用<sup>[11]</sup>。

研究证实, 高表达 BAG-1 可抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)激活和活性氧(ROS)产生, 在体外培养神经细胞中发挥抗凋亡作用<sup>[12]</sup>。本课题组前期研究表明, 经缺氧/复氧处理后, 神经细胞内 ROS 产生增加<sup>[13-14]</sup>。本研究结果显示, 经缺氧 8 h/复氧 24 h 处理后, 重组慢病毒感染组细胞增殖活性明显高于细胞对照组和载体对照组, 提示 BAG-1L 过表达可抵抗缺氧/复氧对 SH-SY5Y 细胞线粒体的损伤。流式细胞分析结果也显示, 重组慢病毒感染组细胞凋亡率较细胞对照组、载体对照组明显降低。本课题组前期研究也显示, BAG-1 基因敲除后, 缺氧/复氧处理 SH-SY5Y 细胞活性降低, 细胞凋亡增加<sup>[15]</sup>, 表明 BAG-1 可抑制缺氧/复氧引起的神经细胞凋亡。

PI3K/AKT 通路是维持细胞存活的重要信号通路, 多种神经营养因子通过激活 PI3K/AKT 信号通路抑制细胞凋亡, 发挥脑保护作用<sup>[16-17]</sup>。AKT 是 PI3K 直接的下游作用靶点, 通过磷酸化一系列凋亡调控蛋白, 如 Bad、caspase-9、核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) 等, 进一步调节抗凋亡基因转录, 促进细胞存活<sup>[18]</sup>。Kitagawa 等<sup>[19]</sup>首次发现 AKT 在脑缺血时被激活, 提示 PI3K/AKT 信号通路参与了脑缺血的病理过程。本实验 Western Blot 检测结果显示, SH-SY5Y 细胞经缺氧/复氧处理后, 重组慢病毒感染组 p-AKT 蛋白表达水平较细胞对照组和载体对照明显升高, 提示 BAG-1 可能通过促进 PI3K/AKT 信号通路的激活进而抑制缺氧/复氧导致的神经细胞凋亡。

BAG-1 主要表达 p50(BAG-1L)、p46(BAG-1M)、p33 和 p29(BAG-1S) 4 种亚型, 相对分子质量分别为 52000、46000、34000、29000<sup>[20]</sup>。BAG-1 各种亚型都具有 BAG 功能域, 可能与 BAG-1 抗凋亡作用密切相关。BAG-1 通过结构域与 HSP70 结合, 形成一个有活性的构象并调控其功能<sup>[21-23]</sup>。Zeiner 等<sup>[24]</sup> 研究证明, BAG-1 与 HSP70 结合可通过抑制 HSP70 介导的变性蛋白重折叠, 减少热休克引起的细胞凋亡。Kermer 等<sup>[15]</sup> 研究证实, BAG-1 可以通过上调 HSP70/ 热应激同源蛋白 70(HSC70) 水平发挥对脑缺血的保护作用。本课题组前期实验亦表明, 外源性 HSP70 表达可有效减轻神经元缺氧/复氧损伤的程度<sup>[25]</sup>。本研究结果也显示, 重组慢病毒感染组 HSP70 表达明显上调, 细胞凋亡减少, 提示 BAG-1 可能与 HSP70 相互作用, 从而发挥抗细胞凋亡效应。

综上, 在缺氧/复氧状态下, 重组慢病毒介导的 BAG-1L 基因在体外培养 SH-SY5Y 细胞中有效表达, 可抑制缺氧/复氧引起的细胞凋亡, 可能与上调 HSP70 表达, 促进 PI3K/AKT 通路激活有关, 为临床治疗缺血缺氧导致的脑损伤提供了新的思路。

#### 参考文献

- [1] Dorsey ER, George BP, Leff B, et al. The coming crisis: obtaining care for the growing burden of neurodegenerative conditions [J]. *Neurology*, 2013, 80 (21): 1989-1996. DOI: 10.1212/WNL.0b013e318293e2ce.
- [2] Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1993, 24 (12): 2002-2009. DOI: 10.1161/01.STR.24.12.2002.
- [3] Takayama S, Sato T, Krajewski S, et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity [J]. *Cell*, 1995, 80 (2): 279-284. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90410-7.
- [4] 冯波, 王蓉, 盛树力. 神经退行性疾病研究中拟神经细胞模型: 人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 的来源特性及应用 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10 (6): 121-123. DOI: 10.3321/j.issn.1673-8225.2006.06.054.  
Feng B, Wang R, Sheng SL. Mimic model of nerve cells in the study of neurodegenerative disease: Origin, characteristics and application of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y [J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2006, 10 (6): 121-123. DOI: 10.3321/j.issn.1673-8225.2006.06.054.
- [5] 邹荣军, 梁祖凤, 石婉婷, 等. 氯化钴诱导 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤作用的研究 [J]. *吉林医药学院学报*, 2015, 36 (1): 12-14.  
Zou RJ, Liang ZF, Shi WT, et al. Cobalt chloride induced hypoxia on SH-SY5Y cells [J]. *J Jilin Med Coll*, 2015, 36 (1): 12-14.
- [6] 李美霞, 林刚, 林巍, 等. bag-1 和 bcl-2 在诊断非小细胞肺癌中的临床意义 [J]. *实用医学杂志*, 2012, 28 (20): 3372-3374. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2012.20.020.  
Li MX, Lin G, Lin W, et al. The clinical significance of bag-1 and bcl-2 in the diagnosis of non-small cell lung cancer [J]. *J Pract Med*, 2012, 28 (20): 3372-3374. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2012.20.020.
- [7] Aveic S, Viola G, Accordi B, et al. Targeting BAG-1: a novel strategy to increase drug efficacy in acute myeloid leukemia [J]. *Exp Hematol*, 2015, 43 (3): 180-190.e6. DOI: 10.1016/j.exphem.2014.10.016.
- [8] Liu H, Lu S, Gu L, et al. Modulation of BAG-1 expression alters the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33 (2): 365-374. DOI: 10.1159/000356676.
- [9] Ni W, Chen B, Zhou G, et al. Overexpressed nuclear BAG-1 in human hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis and resistance to doxorubicin [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114 (9): 2120-2130. DOI: 10.1002/jcb.24560.
- [10] 兰涛, 张金生, 任俊华, 等. Bcl-2 和 Bag-1 在结肠癌组织中的表达及其意义 [J]. *中国全科医学*, 2011, 14 (12): 1314-1317. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2011.12.012.  
Lan T, Zhang JS, Ren JH, et al. Expressions of Bcl-2 and Bag-1 in Colon Carcinoma and Its Significance [J]. *Chin Gen Pract*, 2011, 14 (12): 1314-1317. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2011.12.012.
- [11] Kermer P, Krajewska M, Zapata JM, et al. Bag1 is a regulator and marker of neuronal differentiation [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9 (4): 405-413. DOI: 10.1038/sj.cdd/4400972.
- [12] Schulz JB, Bremen D, Reed JC, et al. Cooperative interception of neuronal apoptosis by BCL-2 and BAG-1 expression: prevention of caspase activation and reduced production of reactive oxygen species [J]. *J Neurochem*, 1997, 69 (5): 2075-2086. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69052075.x.
- [13] 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/缺氧诱导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.
- [14] 刘媛, 关纯, 郭璐璐, 等. 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 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (3): 205-210. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.03.003.  
Liu Y, Guan C, Guo LL, et al. 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 [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28 (3): 205-210. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.03.003.
- [15] 宋砚坤, 李智, 王奉涛, 等. Bcl-2 结合抗凋亡基因沉默对缺氧状态下人神经母细胞瘤细胞凋亡及热休克蛋白 70 表达的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2017, 24 (1): 68-72. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.003.  
Song YK, Li Z, Wang FT, et al. Effects of BCL-2 associated with athanogene-1 gene silencing on heat shock protein 70 expression and human neuroblastoma cell apoptosis induced by hypoxia [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2017, 24 (1): 68-72. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.003.
- [16] Dudek H, Datta SR, Franke TF, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt [J]. *Science*, 1997, 275 (5300): 661-665. DOI: 10.1126/science.275.5300.661.
- [17] Frebel K, Wiese S. Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation [J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34 (Pt 6): 1287-1290. DOI: 10.1042/BST0341287.
- [18] Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion [J]. *J Invest Surg*, 2007, 20 (3): 195-203. DOI: 10.1080/08941930701366471.
- [19] Kitagawa H, Warita H, Sasaki C, et al. Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain [J]. *Neurosci Lett*, 1999, 274 (1): 45-48. DOI: 10.1016/S0304-3940(99)00676-X.
- [20] Doong H, Vrtilas A, Kohn EC. What's in the 'BAG'?—a functional domain analysis of the BAG-family proteins [J]. *Cancer Lett*, 2002, 188 (1-2): 25-32. DOI: 10.1016/S0304-3835(02)00456-1.
- [21] Briknarová K, Takayama S, Brive L, et al. Structural analysis of BAG1 cochaperone and its interactions with Hsc70 heat shock protein [J]. *Nat Struct Biol*, 2001, 8 (4): 349-352. DOI: 10.1038/86236.
- [22] Sondermann H, Scheufler C, Schneider C, et al. Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors [J]. *Science*, 2001, 291 (5508): 1553-1557. DOI: 10.1126/science.291.5508.1553.
- [23] Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, et al. BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70 [J]. *EMBO J*, 1997, 16 (16): 4887-4896. DOI: 10.1093/emboj/16.16.4887.
- [24] Zeiner M, Gebauer M, Gehring U. Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins [J]. *EMBO J*, 1997, 16 (18): 5483-5490. DOI: 10.1093/emboj/16.18.5483.
- [25] 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.

(收稿日期: 2016-09-12)