

# 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

宋砚坤 李智 王奉涛 刘海燕 曲彦 王芸 谢春雨 胡丹

266071 山东青岛, 青岛大学附属青岛市市立医院重症医学科 (宋砚坤、李智、曲彦、胡丹); 266021 山东青岛, 青岛大学护理学院 (王奉涛、刘海燕、王芸、谢春雨)

通讯作者: 胡丹, Email: hudanicu@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.019

**【摘要】目的** 探讨 Bcl-2 结合抗凋亡基因(BAG-1)对缺氧/再复氧损伤后人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)的保护作用,以及对热休克蛋白 70(HSP70)表达的影响。**方法** 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,采用慢病毒介导的 RNA 干扰(RNAi)技术抑制 BAG-1 表达。将筛选好的细胞分为细胞对照组、慢病毒对照组(仅含荧光蛋白的慢病毒感染组)、BAG-1 小干扰 RNA (siRNA)组(即 BAG-1 基因沉默组,感染含 BAG-1 基因干扰序列及荧光蛋白的慢病毒),根据沉默序列不同分为 BAG-1 siRNA- $\alpha$  组、BAG-1 siRNA- $\beta$  组。感染重组慢病毒后 72 h 采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 SH-SY5Y 细胞中 BAG-1 和 HSP70 蛋白表达;缺氧处理后采用 CCK-8 测定各组细胞活性;用流式细胞仪检测细胞凋亡情况;用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测各组细胞 HSP70 转录水平。**结果** 慢病毒感染后 72 h, Western Blot 检测结果表明 BAG-1 siRNA- $\beta$  组干扰效果优于 BAG-1 siRNA- $\alpha$  组。各组细胞活性均随缺氧时间延长而呈先增强后减弱的趋势,且于 8 h 时达峰。经缺氧处理 8 h 后, BAG-1 siRNA- $\beta$  组细胞活性(吸光度(A)值)明显低于细胞对照组、慢病毒对照组及 BAG-1 siRNA- $\alpha$  组( $0.59 \pm 0.09$  比  $0.94 \pm 0.12$ 、 $0.90 \pm 0.11$ 、 $0.91 \pm 0.14$ , 均  $P < 0.01$ ); BAG-1 siRNA- $\beta$  组凋亡细胞率明显高于细胞对照组、慢病毒对照组及 BAG-1 siRNA- $\alpha$  组[( $34.63 \pm 3.46$ )% 比 ( $14.83 \pm 3.75$ )%、( $19.93 \pm 6.49$ )%、( $16.40 \pm 1.18$ )%, 均  $P < 0.01$ ]。BAG-1 siRNA- $\beta$  组 HSP70 蛋白及 mRNA 转录水平与细胞对照组、慢病毒对照组及 BAG-1 siRNA- $\alpha$  组比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。**结论** BAG-1 基因在缺氧神经细胞中能够发挥保护作用,减少细胞凋亡,其保护作用可以独立于 HSP70 基因。

**【关键词】** Bcl-2 结合抗凋亡基因; 热休克蛋白 70; 神经细胞; 缺氧/再复氧; 细胞凋亡; RNA 干扰

**基金项目:** 国家自然科学基金(81571938, 81501706); 山东省青岛市民生科技计划项目(15-9-2-77-nsh)

**Effects of Bcl-2 associated with athanogene-1 gene silencing on heat shock protein 70 expression and human neuroblastoma cell apoptosis induced by hypoxia** Song Yankun, Li Zhi, Wang Fengtao, Liu Haiyan, Qu Yan, Wang Yun, Xie Chunyu, Hu Dan

Department of Critical Care Medicine, Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China (Song YK, Li Z, Qu Y, Hu D); Qingdao University School of Nursing, Qingdao 266021, Shandong, China (Wang FT, Liu HY, Wang Y, Xie CY)

Corresponding author: Hu Dan, Email: hudanicu@126.com

**【Abstract】Objective** To investigate the protective effects of Bcl-2 associated with athanogene-1 (BAG-1) gene on human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) injury induced by hypoxia/reoxygenation, and its influence on heat shock protein 70 (HSP70) expression. **Methods** The SH-SY5Y cells at logarithmic growth phase were collected. Lenti virus mediated RNA interference (RNAi) technology was used to suppress the BAG-1 expression. The cells screened out can be divided into four groups: the cell control group with no lentivirus infection, lentivirus control group (containing only fluorescein protein lentivirus infection), BAG-1 siRNA group (BAG-1 siRNA silencing group), including BAG-1 siRNA- $\alpha$  group and BAG-1 siRNA- $\beta$  group with lentivirus containing fluorescein protein (GFP) but at different BAG-1 siRNA target sites of silencing. Western Blot was used to detect the protein expression of BAG-1 and HSP70 in target cells after infectious recombination lentivirus for 72 hours; the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the activity of four different group cells after hypoxia; the flow cytometry was used to detect the cell apoptosis; the HSP70 mRNA transcription level were detected by real-time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) respectively in each group. **Results** After lentiviral infection for 72 hours, the Western Blot results showed that in the two BAG-1 siRNA silencing groups, the interference effect of BAG-1 siRNA- $\beta$  group was superior to that of BAG-1 siRNA- $\alpha$  group. The cell viability of each group showed an increase followed by a decrease with the prolongation of hypoxia time, and reaching the peak at 8 hours. After hypoxia for 8 hours being given, the cell viability in BAG-1 siRNA- $\beta$  group was significantly lower than that of the cell control group, lentivirus control group and BAG-1 siRNA- $\alpha$  group (A value:  $0.59 \pm 0.09$  vs.  $0.94 \pm 0.12$ ,  $0.90 \pm 0.11$ ,  $0.91 \pm 0.14$ ,  $P < 0.01$ ); the cell apoptosis rate was obviously higher in BAG-1 siRNA- $\beta$  than that

in the above three groups [(34.63 ± 3.46)% vs. (14.83 ± 3.75)%, (19.93 ± 6.49)%, (16.40 ± 1.18)%, all  $P < 0.01$ ]. There were no statistically significant differences in the HSP70 protein level and mRNA transcription level between BAG-1 siRNA- $\beta$  group, and the cell control group, lentivirus control group and BAG-1 siRNA- $\alpha$  group respectively (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** BAG-1 gene can play a role in protection of hypoxia nerve cells, reduce the apoptosis, and its protective effect can be independent of HSP70 gene.

**【Key words】** Bcl-2 associated with athanogene-1; Heat-shock proteins; Neural cells; Hypoxia/reoxygenation; Apoptosis; RNA interference

目前脑血管疾病具有高发病率、高致残率、高病死率的特点。从多个角度探讨其发病机制和寻找确实有效的干预措施一直是国内外众多学者研究的热点。脑是人体对缺氧最为敏感的器官,而缺血性脑血管疾病是由于脑动脉血流短暂或持久减少引起,最终导致脑组织缺血缺氧。研究证实,缺血中心区周边的半影区所出现的细胞延迟性退化表现为细胞凋亡,而半影区神经元的延迟性死亡决定了最终的脑梗死面积<sup>[1-2]</sup>。因此,可以通过抗凋亡来促进这部分神经元的存活,从而防治脑缺血损伤。

Bcl-2 结合抗凋亡基因(BAG-1)可以与 Bcl-2、热休克蛋白同源蛋白 70/热休克蛋白 70 (HSC70/HSP70)和激素受体等多种细胞内分子结合,参与细胞凋亡、增殖和信号转导等。HSP70 作为脑缺血所诱导的一种神经元保护性物质,在应激状况下可显著升高,因而受到医学界的广泛关注。BAG-1 是 HSP70 的共分子蛋白,在脑缺血缺氧状态下 BAG-1 的作用和机制以及与 HSP70 的相互作用尚不明确,且 BAG-1 的神经保护作用及机制也鲜有报道。本研究通过对 BAG-1 基因进行沉默,探讨 BAG-1 对缺氧状态下细胞的作用,以及其作为共分子蛋白是否会影响 HSP70 的抗凋亡作用。

## 1 材料和方法

**1.1 主要实验材料:** DMEM、TRIzol 试剂购自美国 GIBco 公司,胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司;抗 BAG-1 及 HSP70 单克隆抗体购自中国香港 Abcam 公司。BAG-1 干扰慢病毒由上海吉凯基因化学技术有限公司包装。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔或小鼠免疫球蛋白 G(IgG)、CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。流式细胞分析试剂盒购于美国 eBioscience 和 BD 公司。RIPA 裂解液购自北京康为世纪生物科技有限公司。实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂盒购于瑞士 Roche 公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养:** 神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)由青岛大学生理教研室提供。采用含 10% 胎牛血

清、2% 双抗(100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素)的 DMEM 完全培养基,置于 37 °C,湿度为 95%,CO<sub>2</sub> 浓度为 5% 的培养箱培养,细胞贴壁生长达 80% 汇合时,用 0.25 g/L 的胰蛋白酶消化传代。选择对数生长期且生长良好的细胞用于实验。

**1.2.2 慢病毒感染、细胞筛选及分组:** 感染前 1 d,将处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以  $3 \times 10^4$  个/孔的密度接种至 24 孔板,置于 37 °C 培养箱内培养过夜。次日根据预实验确定的条件,进行慢病毒感染。分别于感染 48 h 和 72 h 观察荧光,感染后 72 h 进行嘌呤霉素筛选(预实验确定最优浓度为 7 mg/L),最终感染效率 > 75%。将筛选好的细胞分为细胞对照组(即正常 SH-SY5Y 细胞组);慢病毒对照组(仅含荧光蛋白的慢病毒感染组);BAG-1 siRNA 组(即 BAG-1 基因沉默组,感染含 BAG-1 基因干扰序列及荧光蛋白的慢病毒),根据沉默序列的不同可分为 BAG-1 小干扰 RNA- $\alpha$  (siRNA- $\alpha$ ) 组和 BAG-1 siRNA- $\beta$  组。

**1.2.3 缺氧/再复氧损伤细胞模型的构建:** 取生长状态良好的 4 组细胞更换无血清低糖 DMEM 培养基,置于有厌氧产气袋的密闭培养罐内,将培养罐放于 37 °C 培养箱培养 4、8、12、24 h 后更换为正常培养基,再置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养 24 h,构建缺氧/再复氧损伤细胞模型。

## 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 CCK-8 测定细胞活性:** 细胞培养至对数生长期后接种至 96 孔板,每组设 6 个平行孔,每孔细胞数为 5 000 个。次日细胞贴壁后缺氧处理 4、8、12、24 h,再复氧 24 h 后检测细胞活性。吸出原培养液,每孔加入 100  $\mu$ L 培养液、10  $\mu$ L CCK-8 溶液,置 37 °C 培养箱内 1 h。用酶标仪测定 450 nm 波长处各孔吸光度值(A 值),A 值与活性细胞数成正比,去掉最大值和最小值用于统计分析,实验重复 3 次。

**1.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡情况:** 4 组细胞缺氧 8 h 再复氧 24 h,胰蛋白酶消化后收集细胞,调整细胞终浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL。每 100  $\mu$ L 细胞悬液加入膜联蛋白-V-别藻蓝蛋白(Annexin V-APC)及 7-氨基放线菌素 D(7-AAD)各 5  $\mu$ L,避光孵育

15 min 后加入 400 μL 结合缓冲液混匀, 260 目滤网过滤后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

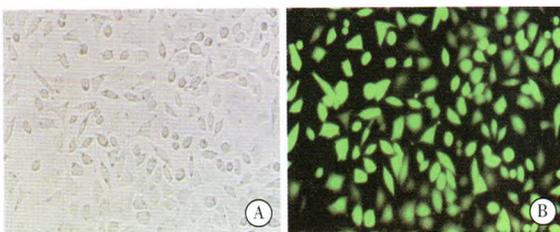
**1.3.3 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测细胞中 BAG-1、HSP70 的蛋白表达水平:** 分别收集慢病毒感染后 72 h 及缺氧处理 8 h 的 4 组细胞, 加入成比例的 RIPA 裂解液及苯甲基磺酰氟 (PMSF), 冰上裂解细胞后, 4 °C 离心取上清液, 即为细胞总蛋白。提取蛋白加入上样缓冲液, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 蛋白转至硝酸纤维素膜上后洗膜、封闭, 用一抗、二抗依次孵育, 加入显影液显影。最后采用 Bio-Rad Quantity One 软件分析灰度值, 以待测蛋白与内参照 β-肌动蛋白 (β-actin) 灰度值比值表示 HSP70 蛋白的相对含量。

**1.3.4 RT-qPCR 检测 SH-SY5Y 细胞 HSP70 mRNA 表达:** 收集缺氧 8 h 再复氧 24 h 的各组细胞, TRIzol 法提取细胞总 RNA, 测定 RNA 纯度, 去 DNA 处理后反转录合成 cDNA 作为 PCR 模板。操作步骤按试剂盒说明书进行; 引物分别由南京金斯瑞生物科技有限公司及北京擎科生物技术有限公司设计并合成。扩增条件: 95 °C 预变性 30 s, 1 个循环; 然后 95 °C、10 s, 60 °C、20 s, 97 °C、1 s, 45 个循环。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。

**1.4 统计学方法:** 使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 Turkey 检验;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

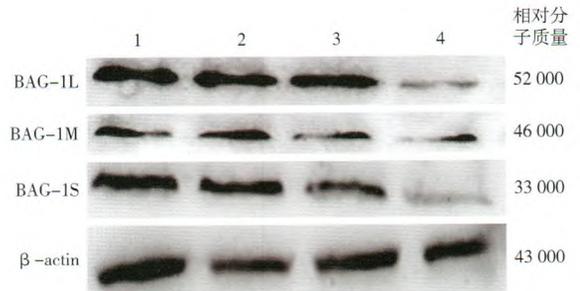
**2 结果**

**2.1 慢病毒感染及 BAG-1 基因沉默效果:** 重组慢病毒感染 SH-SY5Y 细胞 72 h, 嘌呤霉素筛选后观察荧光, 感染效率均在 75% 以上 (图 1), 可以进行后续试验。用 Western Blot 检测 BAG-1 特异性蛋白条带, 结果显示, BAG-1 siRNA-β 组干扰效果优于 BAG-1 siRNA-α 组 (图 2)。



注: A 为明场 SH-SY5Y 慢病毒感染细胞; B 为暗场 SH-SY5Y 慢病毒感染细胞

图 1 荧光显微镜下观察重组慢病毒感染 SH-SY5Y 细胞情况 (低倍放大)



注: 1 为细胞对照组; 2 为慢病毒对照组; 3 为 BAG-1 siRNA-α 组; 4 为 BAG-1 siRNA-β 组

图 2 Western Blot 检测 SH-SY5Y 细胞中 BAG-1 蛋白表达

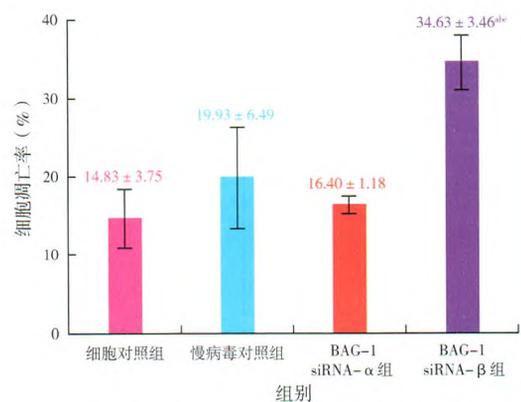
**2.2 BAG-1 基因沉默对缺氧 SH-SY5Y 细胞活性的影响 (表 1):** 各组细胞活性随缺氧时间延长呈先上升后下降的趋势, 且均在缺氧 8 h 的活性最高, BAG-1 siRNA-β 组细胞活性明显低于细胞对照组、慢病毒对照组、BAG-1 siRNA-α 组 (均  $P < 0.05$ )。

表 1 各组不同缺氧时间细胞活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (孔)	细胞活性 (A 值)			
		缺氧 4 h	缺氧 8 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h
细胞对照组	12	0.71 ± 0.14	0.94 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.08 <sup>a</sup>
慢病毒对照组	12	0.70 ± 0.11	0.90 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.09 <sup>a</sup>
BAG-1 siRNA-α 组	12	0.74 ± 0.10	0.91 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.09 <sup>a</sup>
BAG-1 siRNA-β 组	12	0.49 ± 0.10	0.59 ± 0.09 <sup>bcd</sup>	0.31 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.06 <sup>c</sup>
F 值		12.070	24.327	9.866	2.854
P 值		< 0.010	< 0.010	< 0.010	0.048

注: 与缺氧 4 h 比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与细胞对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与慢病毒对照组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与 BAG-1 siRNA-α 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 与缺氧 8 h 比较, <sup>\*</sup> $P < 0.01$

**2.3 BAG-1 基因沉默对缺氧 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响 (图 3 ~ 4):** BAG-1 siRNA-β 组细胞凋亡率明显高于细胞对照组、慢病毒对照组、BAG-1 siRNA-α 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ )。



注: 与细胞对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与慢病毒对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与 BAG-1 siRNA-α 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$

图 3 各组细胞凋亡情况比较

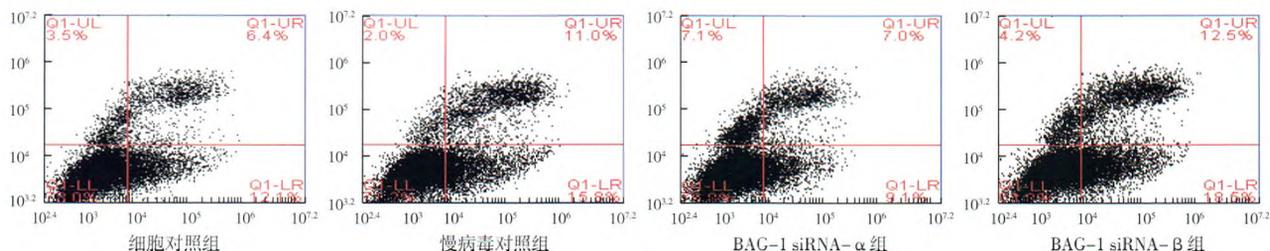
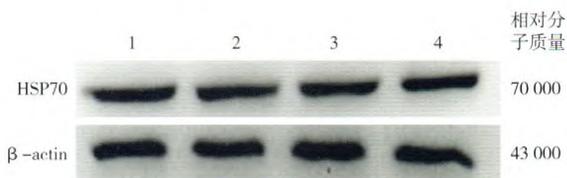


图 4 BAG-1 基因沉默对细胞凋亡的影响

2.4 BAG-1 基因沉默后对 HSP70 蛋白及 mRNA 表达的影响(图 5; 表 2): 4 组细胞 HSP70 蛋白及 mRNA 表达比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。



注: 1 为细胞对照组; 2 为慢病毒对照组; 3 为 BAG-1 siRNA-α 组; 4 为 BAG-1 siRNA-β 组

图 5 Western Blot 检测 SH-SY5Y 细胞中 HSP70 蛋白表达

表 2 各组细胞缺氧 8 h HSP70 蛋白和 mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	HSP70 蛋白 (灰度值)	HSP70 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
细胞对照组	1.440 ± 0.105 (6)	0.816 ± 0.106 (12)
慢病毒对照组	1.325 ± 0.169 (6)	0.802 ± 0.118 (12)
BAG-1 siRNA-α 组	1.355 ± 0.232 (6)	0.761 ± 0.084 (12)
BAG-1 siRNA-β 组	1.430 ± 0.117 (6)	0.796 ± 0.095 (12)
F 值	0.702	0.638
P 值	0.562	0.595

注: 括号内为样本数

### 3 讨论

BAG-1 1995 年由 Takayama 等<sup>[3]</sup> 利用重组的人 Bcl-2 蛋白在对胚胎 cDNA 表达基因库进行筛选时首先发现, 相对分子质量为 29 000, 并证实其可以通过与 Bcl-2 结合而增强其抗凋亡活性。同年, Zeiner 等<sup>[4]</sup> 在寻找活化的糖皮质激素受体结合蛋白时发现了相对分子质量为 46 000 的 BAG-1。人类 BAG-1 基因位于第 9p12 号染色体上, 包含 7 个外显子, 通过 mRNA 不同的翻译起始位点, 编码包括相对分子质量为 52 000 的 BAG-1L、46 000 的 BAG-1M、33 000 的 BAG-1S 及 29 000 的 BAG-1 等 4 个亚型。目前, 对 BAG-1 在肿瘤细胞抗凋亡中作用的研究较多, 而对其在脑内神经元凋亡中的作用及机制还知之甚少<sup>[5-8]</sup>。但有研究表明, 神经元损伤时, 凋亡细胞中的 BAG-1 表达水平下降,

提示 BAG-1 在神经元存活中可能具有一定的作用<sup>[9]</sup>。而创伤后大鼠大脑皮质 BAG-1 表达增加, 表明 BAG-1 可能参与了创伤性脑损伤的病理变化<sup>[10]</sup>。SH-SY5Y 细胞来源于人神经母细胞瘤, 是一种分化程度比较低的肿瘤细胞, 该细胞形态呈锥形, 作为拟神经细胞模型, 广泛应用于神经系统疾病发病和防治机制以及药物作用的研究<sup>[11-12]</sup>。张壮等<sup>[13]</sup> 在探讨麝香酮对脑保护作用的研究中也采用了 SH-SY5Y 细胞作为缺血缺氧神经细胞模型。本研究采用 SH-SY5Y 细胞模拟神经细胞缺氧/再复氧损伤, 经缺氧处理 8 h 再复氧 24 h 后, CCK-8 检测细胞活性发现, BAG-1 有效沉默可抑制细胞增殖, 表明 BAG-1 沉默后 SH-SY5Y 细胞不能有效抵抗细胞缺氧/再复氧导致的线粒体损伤。流式细胞检测结果也显示, BAG-1 有效沉默可诱发缺氧状态下 SH-SY5Y 细胞凋亡, 进一步证实了 BAG-1 在神经细胞凋亡中发挥的作用。

HSPs 是应激状态下生物体内产生的一种保护性蛋白, 其中 HSP70 是 HSPs 家族中最重要, 也是被研究最多、关注最广的成员之一, 其在正常细胞中含量很低, 但在应激状态下会明显增加, 发挥保护作用。于航等<sup>[14]</sup> 在药物对脑损伤术后影响的研究中发现, 药物可影响脑损伤术后应激反应过程中 HSP70 的表达, 从而发挥脑保护作用。在脑缺血缺氧时, HSP70 基因存在早期特异性表达, 表明其既可以作为一种敏感的脑缺血缺氧检测指标, 也可能有利于神经细胞损伤后的修复。范德义等<sup>[15]</sup> 测定了脑梗死患者血浆 HSP70 抗体水平, 并指出 HSP70 抗体增高是反映脑组织损伤程度的标志。Popp 等<sup>[16]</sup> 在对短暂性局灶性脑缺血大鼠模型的研究中发现, 再灌注后 24 h, 大鼠梗死核心区周围的 HSP70 水平达到高峰。本课题组前期研究<sup>[17-19]</sup> 也证实了外源性 HSP70 的表达水平在缺氧/再复氧损伤后神经细胞中的保护作用, 并对其部分机制进行了研究。对稳定表达外源性 HSP70 基因的 PC12 进行缺血缺氧处理, 发现 HSP70 可调节 ATP 酶活性及细胞膜钙通

道,维持钙稳态,发挥抗凋亡作用<sup>[17-18]</sup>。研究证实,BAG-1 可通过其 BAG 功能域与 HSP70 及其 HSC70 的 ATP 酶结构域相结合,作为共分子伴侣,调节分子伴侣活性<sup>[3, 20]</sup>。通过 X 射线晶体力学和核磁共振得到了 BAG 域和 BAG-1/HSP70 相互作用的三维结构<sup>[21-22]</sup>。尽管文献报道了 BAG-1 及 HSP70 的抗凋亡作用,且有研究表明 BAG-1 与 HSP70 的相互作用对乳腺癌细胞和心肌细胞的存活至关重要,但 BAG-1/HSP70 在脑缺血损伤神经元凋亡中的作用及机制尚不明确<sup>[23-24]</sup>。本研究结果显示,BAG-1 基因有效沉默后,缺氧 8 h 处理 SH-SY5Y 细胞,无论是蛋白水平,还是 mRNA 转录水平,各组 HSP70 表达差异均无统计学意义,与国外的研究研究结果<sup>[25-26]</sup>一致。有研究证实,BAG-1 过表达可引起 HSP70 过表达<sup>[27-28]</sup>。本研究中 BAG-1 沉默后细胞凋亡增加,而 HSP70 表达差异无统计学意义,推测 BAG-1 的部分作用可以独立于 HSP70, BAG-1 基因可能通过反式激活诱导 HSP70 的活性,但缺乏使其稳定的能力。

综上所述,BAG-1 可以对抗缺氧/再复氧导致的神经细胞损伤,减少缺氧引起的细胞凋亡,且这种抗凋亡作用可以独立于 HSP70,而 BAG-1/HSP70 相互作用在神经细胞凋亡中的具体分子机制是本课题组后续深入研究的方向。

### 参考文献

- [1] 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): 2002-2008.
- [2] Nita DA, Nita V, Spulber S, et al. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat [J]. *J Cell Mol Med*, 2001, 5(2): 163-170.
- [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.
- [4] Zeiner M, Gehring U. A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(25): 11465-11469.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Ma F, Zhang M, Gong W, et al. MiR-138 Suppresses Cell Proliferation by Targeting Bag-1 in Gallbladder Carcinoma [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126499.
- [8] Wang YD, Ha MW, Cheng J, et al. The role of expression and polymorphism of the BAG-1 gene in response to platinum-based chemotherapeutics in NSCLC [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 979-986.
- [9] Hayashi T, Sakai K, Sasaki C, et al. Loss of bag-1 immunoreactivity in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Brain Res*, 2000, 852(2): 496-500.
- [10] Xu T, Wang X, Cao M, et al. Increased expression of BAG-1 in rat brain cortex after traumatic brain injury [J]. *J Mol Histol*, 2012, 43(3): 335-342.
- [11] Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, et al. Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 129-134.
- [12] Zhang H, Gao Y, Zhao FL, et al. Hydrogen sulfide-induced processing of the amyloid precursor protein in SH-SY5Y human neuroblastoma cells involves the PI3-K/Akt signaling pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(2): 265-272.
- [13] 张壮,闫彦芳,赵可星,等.麝香酮对 SH-SY5Y 神经细胞缺氧/缺血和再给氧损伤的保护作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(6): 340-343.
- [14] 于航,王迪芬,王小智,等.丙泊酚和咪达唑仑对脑损伤术后应激指标的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2016, 23(3): 299-302.
- [15] 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.
- [16] Popp A, Jaenisch N, Witte OW, et al. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke [J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4764.
- [17] 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.
- [18] 郭璐璐,贾超,曲彦,等.热休克蛋白 70 对缺血/缺氧嗜铬细胞瘤细胞细胞膜钙通道的调节机制 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28(4): 314-318.
- [19] 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.
- [20] Takayama S, Xie Z, Reed JC. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(2): 781-786.
- [21] 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.
- [22] Briknarova 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.
- [23] Townsend PA, Cutress RI, Carroll CJ, et al. BAG-1 proteins protect cardiac myocytes from simulated ischemia/reperfusion-induced apoptosis via an alternate mechanism of cell survival independent of the proteasome [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(20): 20723-20728.
- [24] Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, et al. BAG-1 prevents stress-induced long-term growth inhibition in breast cancer cells via a chaperone-dependent pathway [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(14): 4150-4157.
- [25] Nollen EA, Kabakov AE, Brunsting JF, et al. Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(7): 4677-4682.
- [26] Nollen EA, Brunsting JF, Song J, et al. Bag1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(3): 1083-1088.
- [27] Tare RS, Townsend PA, Packham GK, et al. Bcl-2-associated athanogene-1 (BAG-1): a transcriptional regulator mediating chondrocyte survival and differentiation during endochondral ossification [J]. *Bone*, 2008, 42(1): 113-128.
- [28] Kermer P, Digicaylioglu MH, Kaul M, et al. BAG1 over-expression in brain protects against stroke [J]. *Brain Pathol*, 2003, 13(4): 495-506.

(收稿日期: 2016-09-27)