

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

杨芳芳 徐小娜 胡丹 时飞 曲彦

【摘要】 目的 探讨重组腺病毒介导的热休克蛋白 70(HSP70)表达对神经元和胶质细胞缺氧/再复氧损伤的保护作用。方法 制备携带全长 HSP70 基因的重组腺病毒 vAd-HSP70,感染体外培养的神经元和胶质细胞,检测靶细胞中外源性 HSP70 的表达。感染 vAd-HSP70 24、48、72 h 组和感染 vAd-GFP 对照组的细胞经缺氧/再复氧处理后,分别测定细胞活性、细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活性及线粒体和胞质内细胞色素 C 含量。结果 感染 vAd-HSP70 的神经细胞可检测到外源性 HSP70 基因表达。经缺氧/再复氧处理,感染 vAd-HSP70 组细胞活性较感染 vAd-GFP 对照组明显增强(P 均 <0.05);感染 vAd-HSP70 24、48、72 h 组细胞培养上清液中 LDH 活性 $[(1480\pm121), (1023\pm106), (1132\pm197) \text{ U/L}]$ 均明显低于感染 vAd-GFP 对照组 $[(1976\pm190) \text{ U/L}]$,线粒体中细胞色素 C 含量 $(0.986\pm0.012, 1.028\pm0.007, 1.014\pm0.008)$ 均明显高于感染 vAd-GFP 对照组 (0.970 ± 0.003) ,而胞质中的细胞色素 C 含量 $(0.987\pm0.008, 0.960\pm0.005, 0.964\pm0.003)$ 则低于感染 vAd-GFP 对照组 $(1.011\pm0.005, P<0.05 \text{ 或 } P<0.01)$,其中以感染 48 h 最为理想(P 均 <0.01)。结论 腺病毒介导的外源性 HSP70 表达可保护神经元和胶质细胞抵抗缺氧/再复氧损伤,具有明确的细胞保护作用。

【关键词】 热休克蛋白 70; 腺病毒载体; 神经细胞; 缺氧/再复氧

Recombinant heat shock protein 70 induced by adenovirus protects neurons and glial cells against hypoxia/reoxygenation injury YANG Fang-fang*, XU Xiao-na, HU Dan, SHI Fei, QU Yan. * Intensive Care Unit, The Affiliated Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266011, Shandong, China

Corresponding author: QU Yan (Email: qdquyan@yahoo.com)

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect on neurons and glial cells against hypoxia/reoxygenation injury with recombinant heat shock protein 70 (HSP70) induced by adenovirus. **Methods** Neurons and glial cells in culture were divided into four groups; three groups were treated with recombinant adenovirus (vAd-HSP70) transfected human HSP70 gene at 24, 48 and 72 hours respectively, and vAd-GFP transfected cell served as control. Cells in different groups were subjected to hypoxia/reoxygenation, then the cell viability was analyzed by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method, lactate dehydrogenase (LDH) viability was evaluated with LDH staining kit, and cytochrome C (Cyt C) in mitochondria and cytoplasm were assessed by Western blotting. **Results** The expression of human HSP70 gene was detected in the vAd-HSP70 transfection group. After hypoxia/reoxygenation treatment, the cell viability in transfected groups was higher than that of control group (all $P<0.05$), the LDH viability of vAd-HSP70 transfected groups at different time points was $1480\pm121, 1023\pm106$, and $1132\pm197 \text{ U/L}$ respectively, and they were significantly lower than control group $[(1976\pm190) \text{ U/L}]$, all $P<0.01$. In transfected groups, the content of Cyt C in mitochondria $(0.986\pm0.012, 1.028\pm0.007, 1.014\pm0.008)$ was significantly higher than control group $(0.970\pm0.003, P<0.05 \text{ or } P<0.01)$. In contrast, the content of Cyt C in cytoplasm $(0.987\pm0.008, 0.960\pm0.005, 0.964\pm0.003)$ was lower than that of control group $(1.011\pm0.005, \text{ all } P<0.01)$. The protective effect was especially obvious when the cells were transfected by vAd-HSP70 at 48 hours (all $P<0.01$). **Conclusion** The expression of human HSP70 mediated by recombinant adenovirus may protect neurons and glial cells against hypoxia/reoxygenation in vitro.

【Key words】 heat shock protein 70; adenovirus vector; neurocyte; hypoxia/reoxygenation

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(Y2007C133);山东省青岛市市南区科技局资助项目(2006039)

作者单位:266011 山东青岛,青岛大学医学院附属医院市立医院 ICU(杨芳芳,胡丹,曲彦),麻醉科(时飞);青岛市卫生学校(徐小娜)

通信作者:曲彦,教授,Email:qdquyan@yahoo.com

作者简介:杨芳芳(1982-),女(汉族),山东省人,医学硕士,Email:amy820211@yahoo.cn.

热休克蛋白(HSPs)是机体细胞在热应激等不良环境下由热休克基因编码产生的一组具有高度保守性的应激蛋白,广泛存在于原核细胞和真核细胞中。实验研究表明,HSP70 在脑缺血、缺氧的早期特异性表达不仅可作为一种敏感的脑缺血、缺氧标志,也可能有利于神经细胞损伤后的修复^[1-2]。目前用何

种方法可有效诱导 HSP70 表达,抵抗脑缺血、缺氧后对神经细胞损伤尚无定论。本研究利用腺病毒介导的基因转染技术,将全长人 HSP70 基因导入体外培养的神经细胞中,观察外源性 HSP70 表达对缺氧/再复氧神经元和胶质细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 重组腺病毒制备及病毒滴度测定:重组腺病毒载体 pAd-HSP70 和腺病毒载体对照由本课题组构建并保存^[3]。将重组质粒 pAd-HSP70 用限制性核酸内切酶 PacI 线性化,脂质体法转染对数生长期的人胚肾 293 细胞,包装重组腺病毒(vAd-HSP70)。按文献[4]方法采用微量全细胞病理效应(CPE)法检测重组腺病毒滴度,按照公式计算病毒滴度[病毒滴度(pfu/ml)=接种细胞数×稀释度×10/加入病毒量(ml)]。

1.2 体外神经细胞的培养:取出生 24 h 内的新生昆明小鼠(购自青岛市药品检验所),断头取大脑皮质,制成细胞悬液,培养瓶中接种,CO₂ 培养箱中培养约 10 d,当细胞达 70%~80%融合时作为腺病毒感染的靶细胞(主要为神经元和胶质细胞),将靶细胞用含胎牛血清、青霉素、链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)于 CO₂ 培养箱中培养。

1.3 感染靶细胞及缺氧/再复氧模型的建立

1.3.1 实验分组:实验分为未感染组、感染 vAd-GFP 对照组以及感染 vAd-HSP70 实验组,以检测 HSP70 对神经细胞的保护作用。对照组:靶细胞感染 vAd-GFP 48 h 时给予缺氧/再复氧处理;实验 24、48 和 72 h 组:靶细胞感染 vAd-HSP70 后 24、48 和 72 h 时给予缺氧/再复氧处理。

Hela 细胞和 MCF-7 细胞在受到热刺激时,细胞内 HSP70 急剧增加,作为实验的阳性对照。

1.3.2 感染靶细胞:体外培养神经细胞达 70%~80%融合时,弃培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 1 次,接种低温保存的重组腺病毒悬液继续培养。

1.3.3 缺氧/再复氧模型:吸去感染细胞中 90%培养液,将细胞置于密闭容器,充入体积分数为 95% N₂ 和 5% CO₂ 的混合气体约 5 min,当容器内 O₂ 体积分数为 1% 左右时即形成缺氧环境,置 37 °C 培养箱缺氧 1 h,加正常培养基培养 1 h,完成复氧模拟。

1.4 病毒感染靶细胞效应的检测

1.4.1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测靶细胞中 HSP70 转录:收集重组腺病毒感染 48 h 后的各组细胞,TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒要求的标准条件合成 cDNA 用作 PCR

模板。利用 Primer primer 5.0 引物设计软件设计扩增 HSP70 编码基因的特异性引物。扩增条件:预变性 94 °C 5 min;然后 94 °C 1 min,58 °C 1 min,72 °C 1.5 min,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。取 5 μl PCR 扩增产物于含 0.5 mg/L 溴化乙锭的琼脂糖凝胶中电泳,将电泳后的凝胶在自动成像系统中观察结果。

1.4.2 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测靶细胞中 HSP70 蛋白表达:重组腺病毒感染靶细胞 48 h 后收集细胞,用裂解液提取细胞总蛋白,将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,依次加抗 HSP70 抗体(1:500 稀释)、兔抗鼠抗体(1:500 稀释)作用,最后 X 线胶片曝光、显影和定影后观察结果。

1.4.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞增殖:制备 1×10⁶ 个/L 的对数生长期细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板中。细胞过夜贴壁后,每孔再接种病毒,各组设 3 个平行孔,以无细胞培养液孔作为对照孔。经缺氧/再复氧处理后各孔加入 MTT 溶液继续培养 4 h,用二甲亚砜(DMSO)终止反应,振荡 10 min,用酶标检测仪测定 490 nm 波长处的吸光度(A)值。

1.4.4 乳酸脱氢酶(LDH)活性测定:取对数生长期细胞,接种于 24 孔培养板中,细胞过夜贴壁后每孔接种重组腺病毒 5 μl,各组设 6 个平行孔,经缺氧/再复氧处理后收集培养液上清,检测 LDH 活性。

1.4.5 细胞色素 C 定位检测:各组细胞经缺氧/再复氧后,用线粒体/胞质蛋白制备试剂盒提取线粒体和胞质蛋白,Western blotting 检测线粒体和胞质中细胞色素 C 的表达。

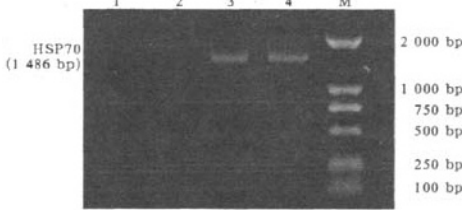
1.5 统计学分析:采用 Quantity One 灰度分析软件和 SPSS 13.0 软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒的制备及其滴度测定(彩色插图 1):将重组质粒 pAd-HSP70 用限制性核酸内切酶 PacI 线性化后转染 293 细胞,48 h 可在荧光显微镜下观察到绿色荧光,表明质粒转染成功,外源基因开始表达。随后荧光逐渐增多、增强,5~6 d 后细胞开始变圆、脱落;10 d 时约有 2/3 的细胞出现病变效应时收获细胞,反复冻融 3 次,离心去除细胞碎片,取 1/3 上清液接种于 70%~80%融合的 293 细胞中,3 d 出现病变效应时收集细胞。反复上述过程 4~5 次,细胞出现病变效应的时间越来越短,表明

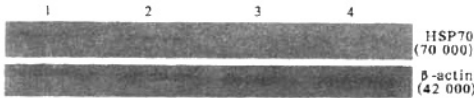
病毒滴度越来越高,即可获得大量有稳定感染性的重组腺病毒,命名为 vAd-HSP70,经检测病毒滴度为 2×10^8 pfu/ml,病毒对照命名为 vAd-GFP。

2.2 靶细胞中重组腺病毒 vAd-HSP70 的表达:重组腺病毒感染靶细胞后 24 h 可观察到弱绿色荧光;48 h 后感染率达 80%,表明腺病毒可有效感染靶细胞;72 h 观察到较强绿色荧光,但弱于感染 48 h 组(彩色插页图 2)。在接种重组腺病毒的靶细胞中可观察到 HSP70 编码基因 1 486 bp 的特异性扩增带,而未感染腺病毒和感染 vAd-GFP 的细胞无此条带,证明目的基因有效转录(图 3)。感染 vAd-HSP70 的细胞出现蛋白免疫印迹条带,而未感染腺病毒和感染 vAd-GFP 的细胞相应位置无特异条带,表明该蛋白条带系重组腺病毒 vAd-HSP70 感染靶细胞后编码产生的特异蛋白,即 HSP70(图 4)。



1~4 依次为:未感染组、感染 vAd-GFP 对照组、感染 vAd-HSP70 组、阳性对照(Hela 细胞);M:Marker

图 3 RT-PCR 检测靶细胞中 HSP70 的表达



1~4 依次为:阳性对照(MCF-7 细胞)、感染 vAd-HSP70 组、感染 vAd-GFP 对照组、未感染组;括号内为相对分子质量

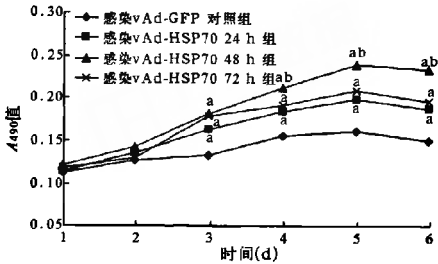
图 4 Western blotting 检测靶细胞中 HSP70 的表达

2.3 HSP70 表达对靶细胞活性的影响(图 5):培养 1 d 和 2 d 各实验组与对照组间细胞活性差异无统计学意义($P > 0.05$)。随培养天数增加,3 d 开始实验组细胞活性明显高于对照组(P 均 < 0.05),其中 vAd-HSP70 48 h 组细胞抗缺氧/再复氧损伤的能力最为明显,4 d 后 vAd-HSP70 24 h 组细胞活性低于 vAd-HSP70 48 h 组(P 均 < 0.05),5 d 后各组细胞活性均逐渐降低。

2.4 LDH 活性(表 1):对照组培养液中 LDH 活性明显高于各实验组,且 vAd-HSP70 24 h 组 LDH 活性明显高于 vAd-HSP70 48 h 和 72 h 组,其中感染 48 h 组 LDH 活性最低(P 均 < 0.01)。

2.5 细胞色素 C 的表达(表 1;图 6):各实验组线粒

体中细胞色素 C 含量均高于对照组,而胞质中的含量均低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验组中, vAd-HSP70 24 h 组细胞线粒体内细胞色素 C 含量明显少于 48 h 和 72 h 组,而该组胞质内细胞色素 C 含量明显高于 48 h 和 72 h 组(P 均 < 0.01)。



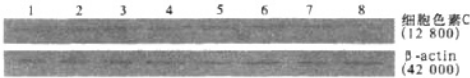
注:与感染 vAd-GFP 对照组比较,^a $P < 0.05$;与感染 vAd-HSP70 24 h 组比较,^b $P < 0.05$

图 5 HSP70 表达对靶细胞增殖的影响

表 1 各组细胞缺氧/再复氧后 LDH 活性及线粒体和胞质中细胞色素 C 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	LDH (U/L)	细胞色素 C(灰度比值)	
		线粒体	胞质
感染 vAd-GFP 对照组	1 976 ± 190	0.970 ± 0.003	1.011 ± 0.005
感染 vAd-HSP70 24 h 组	1 480 ± 121 ^b	0.986 ± 0.012 ^a	0.987 ± 0.008 ^b
感染 vAd-HSP70 48 h 组	1 023 ± 106 ^{bc}	1.028 ± 0.007 ^{bc}	0.960 ± 0.005 ^{bc}
感染 vAd-HSP70 72 h 组	1 132 ± 197 ^{bc}	1.014 ± 0.008 ^{bc}	0.964 ± 0.003 ^{bc}

注:与感染 vAd-GFP 对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与感染 vAd-HSP70 24 h 组比较,^c $P < 0.01$



1~4 依次为:感染 vAd-GFP 对照组、感染 vAd-HSP70 24、48 和 72 h 组线粒体;5~8 依次为:感染 vAd-GFP 对照组、感染 vAd-HSP70 24、48 和 72 h 组胞质;括号内为相对分子质量

图 6 Western blotting 检测各组线粒体和胞质中细胞色素 C 表达

3 讨论

Rordorf 等^[5]在加热(42.2 °C, 20 min)幼鼠的脑皮质培养液中发现,HSP72、HSP85 和 HSP70 的 mRNA 表达增加,经预处理的神经细胞在接触谷氨酸盐后不会即刻死亡,并首次提出了 HSPs 的神经保护作用。Liu 等^[6]报道,动物预缺血(6 min)能加速再次缺血(3 min)时海马 CA1 区 HSP70 基因转录表达,使 HSP70 蛋白合成增多,神经细胞对缺血产生耐受,从致死性缺血损伤中挽救了神经细胞,从而推测 HSP70 合成增多对神经细胞有保护作用。还有研究发现,HSP70 对应激性胃溃疡黏膜和缺

氧/再复氧肠上皮细胞具有保护作用^[7-8];心、肝、肺等组织细胞在热休克反应中 HSP70 基因转录水平升高、表达增多,并伴随细胞抗缺氧能力增强^[9-10]。

目前,基因治疗已被认为是有效的治疗方式。Rajdev 等^[11]同时阻塞 HSP70 转基因鼠与同类野生鼠大脑中动脉造成缺血 6 h 后,数据显示转基因鼠脑梗死体积明显小于野生鼠,HSP70 能显著保护脑组织对抗缺血性损伤。上述研究表明,诱导神经细胞中 HSP70 的表达有助于保护脑缺血、缺氧损伤。

本实验中采用重组腺病毒载体作为将外源性 HSP70 编码基因导入靶细胞的运载系统,该系统具有构建简单、宿主广泛、感染效率高、特异性强、安全性好等特点。经 293 细胞包装获得携带 HSP70 基因的重组腺病毒,由于其携带 GFP 编码基因,因此可在包装增殖的同时直接用荧光显微镜观察转染及感染效率;且重组腺病毒 vAd-HSP70 能有效感染小鼠原代神经细胞,用 RT-PCR 和 Western blotting 在重组腺病毒 vAd-HSP70 感染的神经细胞均可检测到 HSP70 表达,而未感染和感染 vAd-GFP 的神经细胞则为阴性,表明重组腺病毒能在靶细胞中有效表达。

MTT 可反映细胞内线粒体脱氢酶的活性,同时还间接反映细胞的存活情况,因此,MTT 比色法被广泛用作细胞呼吸和活性的检测方法,反映线粒体的整体功能。经缺氧/再复氧处理后,对照组细胞活性明显下降,推测可能与线粒体功能降低有关。与感染 vAd-GFP 对照组比较,感染重组腺病毒 vAd-HSP70 组细胞活性较强,以感染 48 h 时细胞活性最强,表明重组腺病毒介导的外源性 HSP70 表达能维持线粒体的整体功能,从而抵抗缺氧/再复氧损伤,起到细胞保护作用。

细胞色素 C 的定位检测是细胞凋亡早期检测方法之一。正常情况下,细胞色素 C 存在于线粒体中,凋亡信号刺激使其从线粒体释放至细胞质中,细胞色素 C 作为一种信号物质,在细胞凋亡中发挥重要作用。经缺氧/再复氧处理后,对照组细胞线粒体内细胞色素 C 含量明显降低,而胞质内细胞色素 C 的含量明显增加,表明缺氧/再复氧可损伤线粒体功能,使细胞色素 C 从线粒体释放到胞质中。而感染 vAd-HSP70 组细胞色素 C 释放量较少,以感染 48 h 释放量最少,提示 HSP70 过表达对靶细胞缺氧/再复氧后的线粒体功能有一定程度的保护作用,这与 MTT 比色法检测细胞活性结果一致。

LDH 是细胞膜通透性增大或完整性破坏的标

志酶。本研究显示神经细胞缺氧/再复氧后,对照组细胞培养上清液 LDH 活性显著增加,表明缺氧/再复氧过程能导致细胞膜的损伤;而感染 vAd-HSP70 组细胞培养液中 LDH 活性较低,以感染 48 h 时下降最明显,提示外源性 HSP70 在靶细胞的表达能增强细胞膜稳定性,对细胞起到保护作用。

综上,本研究中成功构建了携带 HSP70 基因的重组腺病毒载体及包装了重组腺病毒 vAd-HSP70,重组腺病毒 vAd-HSP70 能有效感染体外培养的神经细胞,并能介导外源性 HSP70 基因的有效表达。进一步实验证实外源性 HSP70 表达对缺氧/再复氧损伤后的神经细胞有保护作用。

参考文献

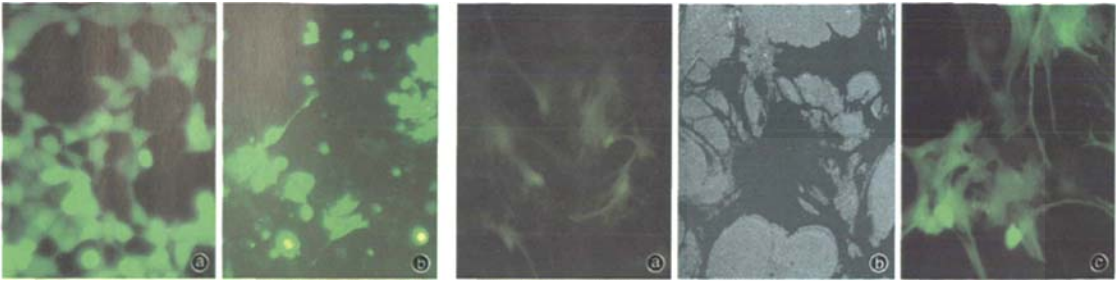
- [1] Kinouchi H, Sharp FR, Koistinaho J, et al. Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 KDa protein in neurons in the 'penumbra' following focal cerebral ischemia in the rat[J]. Brain Res, 1993, 619(1-2): 334-338.
- [2] Lowenstein DH, Chan PH, Miles MF. The stress protein response in cultured neurons: characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity[J]. Neuron, 1991, 7(6): 1053-1060.
- [3] 徐小娜,曲彦. 热休克蛋白 70 重组腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 青岛大学医学院学报, 2008, 44(2): 162-164, 167.
- [4] Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, et al. CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta; evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu → S alpha and sequential S mu → S gamma, S gamma → S alpha DNA recombination[J]. J Immunol, 1998, 161(10): 5217-5225.
- [5] Rordorf G, Korosetz WJ, Bonventre JV. Heat shock protects cultured neurons from glutamate toxicity[J]. Neuron, 1991, 7(6): 1043-1051.
- [6] Liu Y, Kato H, Nakata N, et al. Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus[J]. Neuroscience, 1993, 56(4): 921-927.
- [7] 王鹤,曲彦,胡丹. 热休克蛋白 70 对应激性胃溃疡黏膜的保护作用[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(7): 712-716.
- [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]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(2): 81-83.
- [9] Kawana K, Miyamoto Y, Tanonaka K, et al. Cytoprotective mechanism of heat shock protein 70 against hypoxia/reoxygenation injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(12): 2229-2237.
- [10] Jayakumar J, Suzuki K, Sammut IA, et al. Heat shock protein 70 gene transfection protects mitochondrial and ventricular function against ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation, 2001, 104(12 Suppl 1): I303-307.
- [11] Rajdev S, Hara K, Kokubo Y, et al. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction[J]. Ann Neurol, 2000, 47(6): 782-791.

(收稿日期: 2008-09-08 修回日期: 2008-09-27)

(本文编辑: 李银平)

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

(正文见681页)



①:转染48 h后, ②:转染10 d后
图1 荧光显微镜下观察重组质粒pAd-HSP70转染293细胞后的结果($\times 250$)

①:感染24 h, ②:感染48 h, ③:感染72 h
图2 荧光显微镜下观察重组腺病毒vAd-HSP70感染的靶细胞($\times 250$)

体外原代培养神经细胞液压冲击伤模型的建立

(正文见685页)

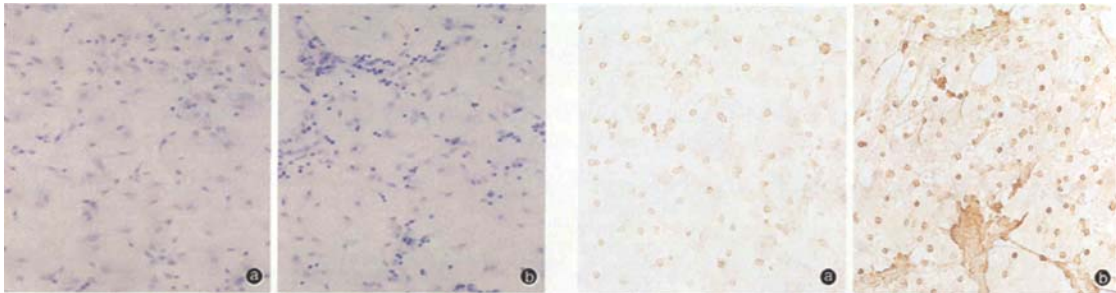


图2 光学显微镜下观察对照组(a)和损伤后8 h组(b)大鼠海马神经细胞形态学改变(甲苯胺蓝, $\times 200$)

图3 光学显微镜下观察对照组(a)和损伤后8 h组(b)大鼠海马神经细胞COX-2阳性表达(免疫细胞化学, $\times 200$)

异丙酚和依达拉奉对脑缺血/再灌注损伤保护作用的研究比较

(正文见691页)

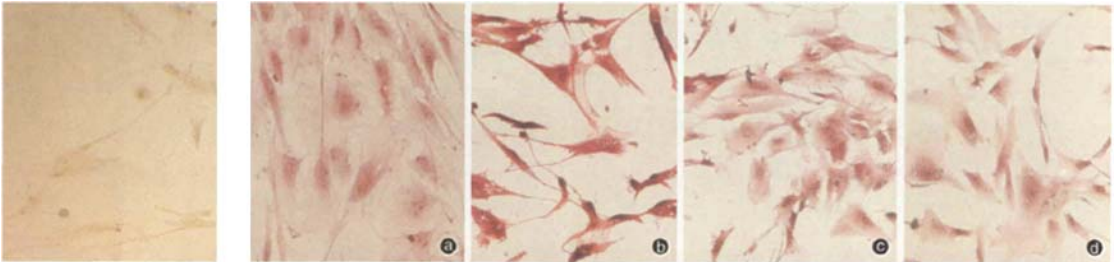
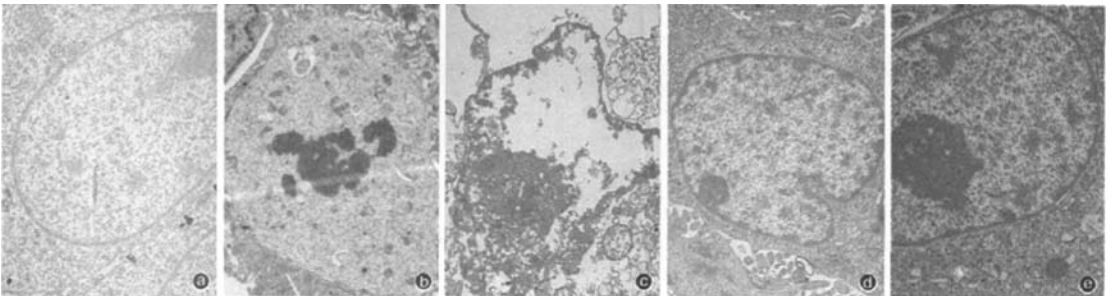


图1 光学显微镜下观察大鼠大脑皮质神经细胞(免疫组化, $\times 500$)

①:正常对照组, ②:药物损伤组, ③:异丙酚 3 mg/L组, ④:依达拉奉组
图2 倒置相差显微镜下观察各组大鼠大脑皮质神经细胞的形态学变化(HE, $\times 200$)



①:正常对照组($\times 2\ 000$), ②:药物损伤组凋亡细胞($\times 1\ 000$), ③:药物损伤组坏死细胞($\times 2\ 000$),

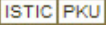
④:异丙酚 3 mg/L 组($\times 2\ 000$), ⑤:依达拉奉组($\times 2\ 000$)

图3 透射电镜下观察各组大鼠大脑皮质神经细胞形态学变化

研究

作者: [杨芳芳](#), [徐小娜](#), [胡丹](#), [时飞](#), [曲彦](#), [YANG Fang-fang](#), [XU Xiao-na](#), [HU Dan](#), [SHI Fei](#), [QU Yan](#)

作者单位: [杨芳芳, 胡丹, 曲彦, YANG Fang-fang, HU Dan, QU Yan \(青岛大学医学院附属市立医院ICU, 山东青岛, 266011\)](#), [徐小娜, XU Xiao-na \(青岛市卫生学校\)](#), [时飞, SHI Fei \(青岛大学医学院附属市立医院麻醉科, 山东青岛, 266011\)](#)

刊名: [中国危重病急救医学](#) 

英文刊名: [CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE](#)

年, 卷(期): 2008, 20(11)

被引用次数: 0次

参考文献(11条)

- [1. Rordorf G;Koroshetz WJ;Bonventre JV Heat shock protects cultured neurons from glutamate toxicity 1991\(06\)](#)
- [2. Zan H;Cerutti A;Dramituios P CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta:evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu→S alpha and sequential S mu→ S gamma, S gs mma→ S alpha DNA recombination 1998\(10\)](#)
- [3. 徐小娜;曲彦 热休克蛋白70重组腺病毒载体的构建及鉴定\[期刊论文\]-青岛大学医学院学报 2008\(02\)](#)
- [4. Lowenstein DH;Chan PH;Miles MF The stress protein response in cultured neurons:characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity 1991\(06\)](#)
- [5. Rajdev S;Hara K;Kokubo Y Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction 2000\(06\)](#)
- [6. 李晓鲁;彭毅志;袁志强 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\[期刊论文\]-中国危重病急救医学 2003\(02\)](#)
- [7. 王鹤;曲彦;胡丹 热休克蛋白70对应激性胃溃疡黏膜的保护作用\[期刊论文\]-世界华人消化杂志 2007\(07\)](#)
- [8. Liu Y;Kato H;Nakata N Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning isehemia in rat hippocampus 1993\(04\)](#)
- [9. Kawana K;Miyamoton Y;Tanonaka K Cytoprotective mechanism of heat shock protein 70 against hypoxia/reoxygenation injury 2000\(12\)](#)
- [10. Jayakumar J;Suzuki K;Sammut IA Heat shock protein 70 gene transfection protects mitochondrial and ventricular function against ischemia-reperfusion injury 2001\(z\)](#)
- [11. Kinouchi H;Sharp FR;Koistinaho J Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 KDa protein in neurons in the 'penumbra' following focal cerebral ischemia in the rat 1993\(1-2\)](#)

相似文献(10条)

- [1. 期刊论文 韩世伟, 张忠涛, 王宇, Han Shi-wei, Zhang Zhong-tao, Wang Yu 构建人热休克蛋白70基因重组腺病毒载体及鉴定 -中国组织工程研究与临床康复2010, 14\(37\)](#)

背景:腺病毒载体作为低毒高效的基因载体已被广泛应用,但是人热休克蛋白70基因腺病毒载体较为少见. 目的:构建重组人热休克蛋白70基因的腺病毒载体,鉴定外源基因在真核细胞中的良好表达. 方法:采用AdMax腺病毒系统将外源基因人热休克蛋白70基因重组入腺病毒载体中,转染人胚肾293细胞并重组包装出毒,检测外源基因的表达和病毒滴度. 结果与结论:观察转染后的人胚肾293细胞出现明显细胞病变效应后,收获并纯化重组病毒;荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况良好,Western blot检测人热休克蛋白70蛋白表达良好,收获病毒的滴度为 1×10^{11} efu/mL,证明实验已成功构建携带人热休克蛋白70基因的重组腺病毒载体.

- [2. 学位论文 徐小娜 热休克蛋白70重组腺病毒载体的构建及鉴定 2008](#)

目的:构建人热休克蛋白70(heat shock protein70, HSP70)的腺病毒表达载体,旨在将成功构建的携带外源基因HSP70的重组腺病毒感染靶细胞,从

而为进一步探讨HSP70对对应状态下细胞的保护作用奠定了实验基础。

方法: 自热休克处理后的人宫颈癌细胞系HeLa中提取细胞总RNA, 经逆转录反应后, 利用人工合成的引物行PCR扩增, 获得目的基因HSP70的cDNA。将外源cDNA定向亚克隆到pAdTrack-CMV质粒上, 采用AdEasy系统在原核细胞: E. coli BJ5183中完成穿梭质粒pAdTrack-CMV-HSP70与骨架质粒pAdEasy-1之间的高效 ϕ 199重组, 构建HSP70重组腺病毒载体。重组体经筛选后, 脂质体法转染人胚肾293细胞, 包装产生重组腺病毒vAd-HSP70。最后, 收获病毒进行滴度鉴定, 用RT-PCR方法检测目的基因在人宫颈癌HeLa细胞的转录表达。

结果: 通过PCR、序列测定以及限制性酶切证实HSP70基因能够正确插入腺病毒表达载体, 并在HEK293细胞中包装出重组腺病毒; 荧光显微镜下可观察到GFP的表达, 收获病毒的滴度为 3.2×10^{12} IU/L, 获得了病毒滴度较高的重组腺病毒。

结论本研究成功的构建了pAd-HSP70重组腺病毒表达载体, 并在人胚肾293细胞中包装获得重组腺病毒vAd-HSP70, 且证明了重组腺病毒vAd-HtSP70可在人宫颈癌系HeLa细胞内稳定表达目的基因并有效转录。

3. 期刊论文 [秦磊, 余斌, 高广勇, 施勤, 钱海鑫 Cre/LoxP位点特异性重组系统构建Ad. CMV-热休克蛋白70腺病毒载体及其对肝细胞缺血再灌注损伤的保护作用 -中华实验外科杂志2007, 24\(1\)](#)

目的 探讨重组腺病毒介导的热休克蛋白70(HSP70)基因转染对肝细胞缺血再灌注损伤的保护作用。方法 用Cre酶介导的loxP位点特异性重组的方法, 构建HSP70腺病毒载体; 体外转染人正常肝细胞株, 检测HSP70的表达水平; 对照组(转染空载体组)、转染HSP70 24、48、72 h组细胞经缺氧再复氧处理后, 分别对细胞的存活率进行检测分析。结果 重组产物经鉴定后为包含有HSP70全长序列的腺病毒载体, HSP70基因位于其CMV启动子控制之下, 浓度为 3.0×10^{10} pfu/ml, 共2 ml。Ad. CMV-HSP70转染组细胞HSP70基因表达为阳性, 对照组无表达; 经缺氧再复氧处理后, Ad. CMV-HSP70处理组活力较对照组明显增强, 死亡细胞明显减少。结论 Cre酶介导的loxP位点特异性重组是一种简单、高效的腺病毒载体构建方法, 具有构建速度快、成功率高、准确率高等特点。

4. 学位论文 [秦磊 Ad. CMV-HSP70腺病毒载体的构建及其对大鼠移植肝的保护作用 2004](#)

背景: 当前, 阻碍器官移植发展的两个主要障碍是免疫排斥和移植物的缺血再灌注损伤。在器官移植前将外源性的目的基因转入移植物, 以期表达的功能性蛋白可以缓解免疫排斥反应和缺血再灌注损伤, 这是移植领域的一种新的设想, 其前景十分诱人。有效的基因治疗方案需要将目的基因稳定、高效地转入移植物的实质和/或非实质细胞, 并能产生功能蛋白。病毒载体, 特别是复制缺陷性的腺病毒载体在这方面具有天然的优势, 因为他能转染处于非增殖期的实质细胞, 尽管重组腺病毒载体介导的基因表达有一定的时限性, 但对于术后移植物的急性损伤(例如IRI、超排), 14-28天的表达时间是足够的。第一部分: 目的: 用改良双袖套法建立稳定的大鼠原位肝脏移植模型。结论: 改良的二袖套法具有无肝期短、手术成功率高、大鼠术后存活时间长的优点, 是大鼠原位肝移植的理想术式。第二部分: 目的: 探讨热休克预处理对移植肝的保护作用。结论: 热休克预处理可以有效地保护移植肝, 缓解长时间冷保存引起地缺血再灌注损伤, 改善受术后肝功能, 延长受体存活时间。第三部分: 目的: 构建重组腺病毒载体Ad. CMV-HSP70, 将人热休克蛋白70基因置于mCMV启动子控制之下。结论: Cre酶介导的loxP位点特异性重组是一种简单、高效的腺病毒载体构建方法, 具有构建速度快、成功率高、准确率高等特点。第四部分: 目的: 观察我们构建的Ad. CMV-HSP70腺病毒载体在大鼠体内的表达及其对大鼠原位肝脏移植中移植肝的保护作用。结论: 我们构建的Ad. CMV-HSP70可以在大鼠体内有效表达。经门静脉注射的方法(3×10^6 /只)可以有效的将目的基因转染入大鼠肝脏, 高表达Hsp70的移植肝对缺血再灌注损伤具有较强的耐受能力, 其作用机制可能是通过抑制TNF- α 表达、抑制肝细胞的凋亡发生引起的。

5. 期刊论文 [李晓鲁, 彭毅志, 袁志强, 黄跃生, 杨宗城 热休克蛋白70基因重组腺病毒载体微胶囊化及口服转染的研究 -中华烧伤杂志2003, 19\(3\)](#)

目的为利用热休克蛋白70(heat-shock protein, HSP70)防治严重烧伤后缺血缺氧性损伤的基因治疗提供可行的基因转染途径。方法利用微胶囊技术包裹含HSP70基因的复制缺陷型重组腺病毒载体, 检测其在人工胃、肠液中的融出率, 并进行大鼠的口服转染, 检测目的基因表达。结果用微胶囊技术可成功包裹腺病毒载体。制备的微胶囊在人工胃液中仅有少量崩解, 而在肠液中则半数崩解。RT-PCR检测大鼠口服转染微胶囊后目的基因表达确切。结论利用微胶囊技术可成功包裹含HSP70基因的腺病毒载体, 并保护其免受胃液损伤, 在肠道中被释放吸收。

6. 期刊论文 [虞卫, 严煜, 张裕东, 倪庆, YU Wei, YAN Yu, ZHANG Yu-dong, NI Qing 腺病毒介导的HSP70基因转染对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用 -第二军医大学学报2009, 30\(12\)](#)

目的: 研究热休克蛋白70(HSP70)基因转染对体外培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。方法: 体外原代培养乳鼠心肌细胞。以携带增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因的腺病毒载体(Ad. EGFP)按不同感染倍数(MOI)感染体外心肌细胞, 通过荧光显微镜、流式细胞仪观察所构建腺病毒的感染力和安全性; 应用含有人HSP70基因的重组腺病毒(Ad. HSP70)进行体外感染, 采用ELISA法、Western印迹法及免疫组化染色法检测HSP70基因在心肌细胞中的表达情况。利用体外心肌细胞缺氧/复氧损伤模型, 研究HSP70基因转染对心肌细胞的保护作用。结果: 原代培养获得高纯度的乳鼠心肌细胞, 随着MOI值升高, Ad. EGFP的感染效率和基因表达增强, 在MOI值为50时, Ad. EGFP感染心肌细胞的效率高于90%, 在MOI值为200时, 未见心肌细胞的生长明显受抑; ELISA法、Western印迹法证实转染的心肌细胞在正常生理状态下, 可高水平表达HSP70。免疫组化染色法结果显示, 表达的HSP70主要分布于心肌细胞的胞质和胞核中; 利用体外的缺氧/复氧损伤模拟在体的缺血/再灌注损伤, 结果显示Ad. HSP70感染组的细胞活力、MTT代谢率、细胞凋亡率、心肌酶谱的变化等指标均优于对照组($P < 0.05$)。结论: 重组腺病毒Ad. HSP70能够在体外高效、安全地感染心肌细胞, 并成功表达HSP70; HSP70高表达对体外培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤具有显著的保护作用。

7. 期刊论文 [宋晓聪, 杨芳芳, 胡丹, 曲彦 腺病毒介导的热休克蛋白70表达对神经元氧化应激损伤的保护作用 -中国全科医学2010, 13\(5\)](#)

目的 探讨重组腺病毒介导的HSP70表达对过氧化氢(H₂O₂)诱导的神经元和胶质细胞损伤的保护作用。方法 用携带全长HSP70基因的重组腺病毒vAd-HSP70感染体外培养的神经元和胶质细胞, RT-PCR、Western blotting检测靶细胞中外源性HSP70的表达。vAd-HSP70感染组、vAd-GFP感染组和未感染组细胞经0.5 mmol/L的H₂O₂处理后, MTT检测细胞活力, 乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒检测细胞培养上清液中LDH活力, 透射电镜观察细胞超微结构变化。结果 vAd-HSP70感染组的细胞可检测到外源性HSP70基因表达。H₂O₂处理后, vAd-HSP70感染组细胞活力较其他组明显增强($P < 0.01$), vAd-HSP70感染组、vAd-GFP感染组、未感染组细胞培养上清液中LDH活力分别为(976 ± 106)、(1332 ± 197)、(1380 ± 121), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。电镜结果显示, vAd-HSP70感染组细胞膜较vAd-GFP感染组和未感染组完整清晰, 无明显线粒体肿胀及细胞核溶解等不可逆损伤情况。结论 腺病毒介导的外源性HSP70表达可保护神经元和胶质细胞抵抗H₂O₂损伤, 具有明确的细胞保护作用。

8. 学位论文 [郭朝晖 转染人热休克蛋白70基因\(hHSP70\)对大鼠同种异体移植肝缺血再灌注的影响 2008](#)

目的:
1、构建热休克蛋白70基因(HSP 70)重组5型腺病毒载体, 为研究HSP 70的基因治疗奠定基础。
2、采用“两袖套一支架管”法建立大鼠的左肺原位移植动物模型, 为研究肺移植再灌注损伤提供较为稳定的实验基础。利用HSP 70内源性细胞保护的生物学特性, 以大鼠同种异体左肺原位移植为动物模型, 以人HSP 70为目的基因, 复制缺陷的5型重组腺病毒载体为介导, 通过离体肺的肺静脉灌注, 诱导体内高表达HSP 70, 观察其对大鼠移植肺IRI的影响。
方法:
1、利用基因重组技术, 构建hHSP70转基因载体, 制备、包装腺病毒。
2、应用改良的“两袖套一支架管”法, 通过对套管的制作、供肺的灌注和获取及套接技术等方面进行改进, 单人肉眼直视下完成供受体肺动脉、肺静脉和支气管的吻合。
3、以SD大鼠为供受体, 改良的“两袖套一支架管”法建立大鼠的左肺原位移植动物模型, 实验分LPDG保存液对照组、空白载体组和hHSP70基因转染组, 分别灌注10℃加入肝素液、单纯腺病毒载体和hHSP70基因重组腺病毒载体(5×10^9 PFU), 然后在10℃LPDG-glucose液中保存3小时后移入受体, 另设假手术对照组。移植肺再灌注后4h, 检测以下指标: 血气分析; 干-湿重比率; 移植肺组织中MDA含量、SOD和MPO的活性; 病理组织学检查; hHSP70、FNF- α 、IFN- γ 、IL-6、NF-B、Bax、Bcl-1的表达情况; 细胞凋亡检测。

结果:

- 1、成功构建了HSP 70基因重组5型腺病毒载体。
- 2、连续进行大鼠左肺原位移植20例, 手术成功率85%, 平均总手术操作时间65±10 min, 病理组织学检查证实移植肺再灌注后4h成功复制了典型的肺IRI。
- 3、基因转染组再灌注后4h, RT-PCR、免疫组化染色证实移植肺成功表达特异性的hHSP70基因产物。与对照组比较, PaO2明显上升, W/D降低, 差别有显著意义(P<0.05); MDA含量和MPO活性明显下降, SOD活性明显升高(P<0.05); TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、NF- κ B和Bax的表达水平下降(P<0.05); Bcl-2表达水平升高(P<0.05)。光镜观察转染组肺泡间质水肿减轻, 炎症细胞浸润减少, 细胞凋亡减少。

结论:

- 1、成功构建携带hHSP70基因的重组腺病毒载体能在239细胞系中包装成具有感染性的重组腺病毒。病毒颗粒滴度高、纯度好, 重组腺病毒感染哺乳动物细胞后能表达目的蛋白, 为重组腺病毒应用研究奠定基础。
- 2、应用改良的“两袖套一支架管”法, 通过技术改进, 成功建立大鼠左肺原位移植动物模型。手术由单人肉眼直视下完成, 能基本模拟临床的肺移植过程, 适合研究肺的IRI。
- 3、离体供肺经肺静脉灌注转染外源性目的基因切实有效。
- 4、腺病毒载体介导hHSP 70转基因治疗通过抑制TNF- α 、IFN- γ 和IL-6等炎症细胞因子, 减轻过氧化作用, 有效地抑制移植肺的IRI。5、HSP70转基因治疗使bax/bcl-2比值减少, 起到抗细胞凋亡的作用。

9. 期刊论文 [虞卫. 严煜. 张裕东. YU Wei. YAN Yu. ZHANG Yudong 含有人热休克蛋白基因的重组腺病毒转染乳鼠心肌细胞的实验研究 -交通医学2009, 23 \(6\)](#)

目的:研究含有人热休克蛋白70(HSP70)基因的重组腺病毒对乳鼠心肌细胞的转染效率以及基因转染后HSP70的表达. 方法:体外原代培养乳鼠心肌细胞, 以携带增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因的腺病毒载体(Ad. EGFP)按不同感染倍数(MOI)体外感染心肌细胞, 通过荧光显微镜、流式细胞仪观察所构建的腺病毒的感染力和安全性;应用含有人HSP70基因的重组腺病毒(Ad. HSP70)进行体外感染, 采用ELISA法、Western印迹法及免疫组化染色法检测HSP70基因在心肌细胞中的表达情况. 结果:Ad. EGFP感染心肌细胞的效率高于90%, 在MOI值为200时, 未见心肌细胞的生长明显受抑;ELISA法、Western印迹法以及免疫组化染色法证实转染的心肌细胞在正常生理状态下, 可高水平表达HSP70. 结论:重组腺病毒Ad. HSP70能够在体外高效、安全地感染心肌细胞, 并成功地表达HSP70.

10. 学位论文 [虞卫 腺病毒介导的HSP70基因转染对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤保护作用的实验研究 2005](#)

目的

研究HSP70基因转染技术对体外培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤保护作用的可行性。

方法

1. 体外原代培养乳鼠心肌细胞, 以Ad. EGFP按不同MOI值体外转染心肌细胞, 通过荧光显微镜、流式细胞仪观察所构建的腺病毒的感染力和安全性。
2. 分离培养乳鼠心肌细胞, 应用含有人HSP70基因的重组腺病毒(Ad. HSP70)进行体外转染, 采用ELISA法、Western-blot法及免疫组化染色法检测HSP70基因在心肌细胞中的表达。
3. 体外心肌细胞缺氧/复氧损伤模型可以模拟在体心肌缺血/再灌注损伤。将体外培养的乳鼠心肌细胞随机分成三组: Ad. HSP70转染组、损伤组和正常对照组。前两组进行缺氧/复氧损伤, 正常对照组仅用D-Hank's液处理。观察各组心肌细胞的形态、活力、超微结构、MTT代谢率、心肌酶谱以及凋亡率, 研究HSP70基因转染后, 对心肌细胞的保护作用。

结果

1. 原代培养获得高纯度的乳鼠心肌细胞。随着MOI值升高, Ad. EGFP的转染效率和基因表达增强, 在MOI值为50时, Ad. EGFP转染心肌细胞的效率高于90%, 在MOI值为200时, 未见心肌细胞的生长明显受抑。
2. ELISA结果显示在Ad. HSP70转染后的第一天心肌细胞即分泌HSP70蛋白, 第三天时分泌量达到最大, 随后逐渐降低。相比之下, 在Ad. EGFP组和PBS组的培养上清液中未检测到HSP70. Western-blot法证实转染的心肌细胞在正常生理状态下, 可高水平表达HSP70. 免疫组化染色法结果显示, 在转染Ad. HSP70的心肌细胞中, HSP70表达阳性。主要分布于心肌细胞的胞浆和细胞核中; 而Ad. EGFP组和PBS组HSP70表达呈阴性。
3. 利用体外的缺氧/复氧损伤模拟在体的缺血/再灌注损伤, 结果显示实验组的细胞活力、MTT代谢率、凋亡率、心肌酶谱的变化等指标均优于对照组(P<0.05)。

结论

重组腺病毒Ad. HSP70能够在体外高效、安全地转染心肌细胞, 并成功地表达HSP70。基因转染造成的HSP70的高表达对体外培养的乳鼠心肌细胞的缺氧/复氧损伤具有显著的保护作用。

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwbjyxx200811012.aspx
授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: 9e32186d-c5f1-47d5-a269-9ee5011679d8

下载时间: 2011年5月16日