

热休克蛋白 HSPA1A 促进肿瘤细胞增殖的研究

戚毓敏^{1,2}, 单 锴^{1,2}, 崔 静^{1,2}, 渠宏雁^{1,2}, 王 荣^{1,2}, 陈永泉^{*1,2}

(1. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 本研究主要探索热休克蛋白 A1A(HSPA1A)对 HeLa、HT29、PC3 这 3 种肿瘤细胞增殖的影响及其潜在机制。构建 HSPA1A 重组载体, 转染肿瘤细胞, 通过观察转染后细胞形态、MTT 测定结果和细胞周期, 探索 HSPA1A 对肿瘤细胞增殖的影响, 通过免疫荧光的方法确定 HSPA1A 对癌细胞增殖发挥作用的细胞定位。过表达 HSPA1A 后的肿瘤细胞, 细胞增殖明显增强, 细胞免疫荧光检查确定 HSPA1A 主要定位于细胞质中, 细胞周期实验表明转染 HSPA1A 主要加快细胞生长周期的 G1 期, 通过 Western Blot 确定了过表达 HSPA1A 使得 G1 期相关的 cyclin D1、CDK4、CDK6、cyclin E1 和 CDK2 上调, 推测 HSPA1A 可能作为伴侣蛋白质维持 cyclin D1-CDK4/CDK6 和 (或) cyclin E1-CDK2 相关蛋白质的稳定性加快细胞周期的 G1 期。HSPA1A 能够促进肿瘤细胞增殖, 且在细胞质中发挥增殖作用。本研究为基于 HSPA1A 的抗肿瘤药物研发提供了理论依据。

关键词: HSPA1A; PC3; HT29; HeLa; 增殖

中图分类号: TS 201.6 文章编号: 1673-1689(2021)03-0074-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.03.009

Heat Shock Protein A1A Promotes Proliferation of Cancer Cell

QI Yumin^{1,2}, SHAN Kai^{1,2}, CUI Jing^{1,2}, QU Hongyan^{1,2}, WANG Rong^{1,2}, CHEN Yongquan^{*1,2}

(1. Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This study was to explore the effects of heat shock protein A1A (HSPA1A) on the proliferation of HeLa, HT29 and PC3 tumor cells and their underlying mechanisms. HSPA1A recombinant vector was constructed to transfect tumor cells. The cell morphology, MTT and cell cycle after transfection were observed to explore the effect of HSPA1A on tumor cell proliferation. The cells that HSPA1A played a role in cancer cell proliferation were determined by immunofluorescence positioning. After overexpression of HSPA1A, cell proliferation of tumor cells was significantly enhanced. Cellular immunofluorescence confirmed that HSPA1A was mainly localized in the cytoplasm. Cell cycle assay showed that transfection of HSPA1A mainly accelerated the G1 phase of cell growth cycle, which was determined by Western Blot. Overexpression of HSPA1A up-regulated G1-related cyclin D1, CDK4, CDK6, cyclin E1, and CDK2. It was speculated that HSPA1A might serve as a chaperone protein to maintain the stability of cyclin D1-CDK4/CDK6 and cyclin E1-CDK2-related proteins and accelerate the G1 phase of cell cycle. HSPA1A can

收稿日期: 2020-02-09

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2017YFD0400200); 国家自然科学基金资助项目(3177153900); 江苏省重点研究发展计划项目(BE2018624); 国家一级学科食品科学与技术专业项目(JUFSTR20180101)。

* 通信作者: 陈永泉(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脂肪合成、代谢与癌症相关关系及机制研究。

E-mail: yqchen@jiangnan.edu.cn

promote tumor cell proliferation and play a role in the cytoplasm proliferation. This study provides a theoretical basis for the development of anti-tumor drugs based on HSPA1A.

Keywords: HSPA1A, PC3, HT29, HeLa, proliferation

热休克蛋白(HSP)^[1]通常可以在机体遭受应激时大量表达^[2],可以帮助细胞耐受外界环境压力,也称为热应激蛋白,具有高度保守性^[3]。热休克蛋白通常根据相对分子质量大小进行分类,HSP70指的是相对分子质量在 7×10^4 左右的热休克蛋白,主要有HSPA1A、HSPA5、HSPA8、HSPA9。HSP70是热休克蛋白家族被研究较多的蛋白质之一^[4],也是其中表达量较高的热休克蛋白之一。HSP70主要起到分子伴侣作用,主要帮助蛋白质正确折叠,清除老旧或者受损的细胞^[5]。HSP70主要存在于细胞质中,在细胞质中发挥保护细胞的作用^[6],如HSPA5定位于内质网,HSPA9则位于线粒体上起到细胞保护的作用。同时也有研究表明,氧化应激时HSP70,如HSPA8会进入细胞核中,发生核位移,在细胞核中起到保护细胞的作用。诱导型HSP70(HSPA1A),也称为HSP72^[7],在正常生理条件下表达量较低,在发生应激时,则会大量表达,HSPA1A主要通过应激诱导大量表达从而发挥作用。HSPA1A诱导后具有保护细胞的作用。例如,HSPA1A基因通过抑制核因子- κ B(NF- κ B)激活来抑制促炎细胞因子基因转录^[8],促炎细胞因子的下调保护细胞免受应激反应,防止细胞损伤或死亡从而保护机体免受应激伤害^[9]。

恶性肿瘤是当下发病死亡率较高的疾病之一。恶性肿瘤的治疗是医学和生命科学的研究重点也是难点。肿瘤的主要特点就是肿瘤细胞无限制增殖,这种增殖是不受控的,因此抑制肿瘤细胞增殖是行之有效的肿瘤治疗方案之一。研究表明,在大多数肿瘤细胞中均可观察到HSPA1A蛋白水平的增加^[10],Sampson等^[11]认为癌细胞拥有额外扩增的中心体,作者确定了一种新的途径,通过NIMA相关激酶6(NEK6)和HSPA1A促进中心体聚类。NEK6及其上游激活剂可以将HSPA1A靶向到具有扩增中心体的细胞极,因此NEK6-HSPA1A可以用于靶向具有扩增中心体的癌细胞,促进细胞增殖。Wan等^[12]发现在体外建立非小细胞肺癌NCI-H1650的亚系,即用54℃热处理使其具有较高的耐热性,发现其比原来的细胞活力和增殖速率明显加快,通过Western Blot发现其HSPA1A表达量上调且用抑

制剂VER155008(HSPA1A的抑制剂)能够抑制这种细胞的活力和增殖速率。这些说明HSPA1A与癌细胞增殖相关,因此推测HSPA1A可能在肿瘤细胞的生存和增殖中扮演着重要角色。

细胞增殖周期,是细胞从上一个有丝分裂结束到下一个有丝分裂结束的过程。有丝分裂包括分裂间期和分裂期,而分裂间期包括G1期、S期、G2期。G1期主要为DNA复制提供相关物质,G1期决定了细胞是否会发生分裂,若不发生分裂则走向G0期,因此G1期也被称为细胞周期的限制点。S期主要复制染色体,G2期主要为有丝分裂期。调节细胞周期的蛋白质主要有两类,它们相互配合,包括细胞周期蛋白,即cyclins;细胞周期蛋白依赖激酶,即CDKs,它们的相互作用能够共同调节细胞周期。如cyclin D1能够与CDK4/CDK6发生相互作用,从而使G1期的周期抑制蛋白——抑癌基因成视网膜瘤蛋白(Rb)发生磷酸化并从E2F转录因子上解离,E2F可以加速细胞的G1期,cyclin D1起到促进基因转录的功能;cyclin E1对应的周期蛋白激酶是CDK2,其可以与CDK2结合,起到作用与cyclin D1-CDK4/CDK6这条途径相同。研究表明cyclin通常在肿瘤发生中失调,如cyclin D1是一种原癌基因,推测其过度表达是细胞过度增殖并产生肿瘤的原因之一,目前已经在膀胱癌、淋巴瘤、肺癌等多种癌症细胞中发现cyclin D1的过表达。cyclin E1同样也与肿瘤细胞的恶性增殖有关,如食管癌、胃癌、肝癌等多种癌症中发现cyclin E1增多,也有研究表明cyclin E1的持续过表达会导致G1期缩短。目前HSPA1A与周期相关蛋白以及激酶的关系尚不清楚。

作者主要探索HSPA1A对4种肿瘤细胞增殖的影响,并探究HSPA1A发挥作用的亚细胞定位以及对周期的影响。在此基础上,HSPA1A有望成为一个新的肿瘤治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

Forma371 CO₂细胞培养箱、1300系列A2型生物安全柜、Attune NxT流式细胞仪、1510 Multican

GO 全波长酶标仪:购自 Thermo(美国)有限公司;
T-SAM 倒置荧光显微镜:购自 Nikon(日本)有限公司。

PRMI 1640 完全培养基、DMEM 高糖培养基、
体积分数 10%胎牛血清:购自 Gibco(美国)有限公
司;PI 染色试剂盒:购自上海生工(上海)有限公司;
转染试剂 Lipofectamine 3000:购自 Thermo(美国)有
限公司。

HSPA1A、cyclin D1、CDK4、CDK6、cyclin E1、
CDK2:购自 Protein tech(中国)有限公司。

人结肠癌细胞系 HT29、人非小细胞肺癌细胞
A549、人宫颈癌上皮细胞 HeLa、人前列腺上皮细胞
PC3:购自中国科学院上海分院。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代 轻轻吸去旧培养液,使用
磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer saline,PBS)洗 1 遍
后,加入胰酶消化,然后加入完全培养基,吹打 5 次
将细胞悬液移至新离心管中,200 g 离心 5 min,弃
去上清液。重新加入新鲜完全培养基,轻吹混匀,将
细胞悬液根据所需密度分配在培养皿或多孔板中,
补足新鲜完全培养基,将细胞放回细胞培养箱中培
养 3 d 后传代。

1.2.2 细胞转染 细胞种板,约 1 000 个/孔。种板
完成后 12~24 h 内完成细胞转染。准备无菌无酶 EP
管,配置转染体系,以 96 孔板为例,每孔加入 5 μ L
转染体系。转染体系配置:无血清培养基中加入质
粒,按 96 孔板每个孔 0.1 μ g 加入质粒轻轻混匀,按
每个孔 0.3 μ L 加入转染试剂,静置 10 min。将配置
的转染体系溶液加入孔板中,4 h 后更换成完全培
养基,继续培养 24 h 后,通过观察荧光判断转染效
率,进行后续实验。

1.2.3 MTT 配置 MTT 储存液,质量浓度为 5 mg/mL,
溶液为 PBS,避光溶解至无沉淀,用 0.22 μ m 无菌水
系滤膜过滤除菌,避光保存。使用时,用无血清的培
养基稀释至终质量浓度 0.5 mg/mL,吸去孔板中原
有的培养基,每孔加入 100 μ L 稀释的 MTT 工作
液,继续培养 4 h,此时底部会有紫色结晶。小心吸
出孔内的 MTT。每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜,在酶
联免疫检测仪上低速振荡 20 min,使结晶物充分溶
解,在 OD_{570 nm} 处测量各孔的吸光度。

1.2.4 PI 单染色法测细胞周期 转染过后培养 48 h
的细胞,用胰酶消化,200 g 离心 5 min 收集细胞。加
入 2 mL PBS 重悬细胞,200 g 离心 5 min 进行清

洗,加入 70%(体积分数)的乙醇(PBS),4 $^{\circ}$ C 固定过
夜。400 g 离心 10 min,收集细胞去废液,PBS 清洗。
加入 1 mL PI 染液重悬细胞进行染色,冰上避光孵
育 45 min。流式细胞仪检测,通道为 FL2。

1.2.5 Western Blot 配制 SDS-PAGE 胶,上样,每
孔 25 μ g 蛋白质,设置 90 V 电压进行电泳,当条带
分开至需要的位置,开始转膜,设置 300 mA,冰上
进行转膜(NC 膜,GE)120 min;转膜结束,将膜放入
含 5 g/dL 脱脂乳粉的 TBST 中,室温摇床封闭 1 h。
TBST 洗膜 3 次,5 min/次,加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
吸出一抗,TBST 清洗 3 次,5 min/次。加入相应二抗
10 mL 室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,5 min/次。配
制发光液,凝胶成像仪显影成像。

1.2.6 免疫荧光 在 12 孔板中将处理结束的细胞
爬片用预冷的 PBS 清洗,用 4%(体积分数)的多聚
甲醛在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光固定 45 min,TBST 清洗
玻片 5 次,1 min/次,用含 0.5%(体积分数)Triton X-
100、5%(体积分数)FBS(PBS 配制)的封闭液进行
封闭打孔,室温避光封闭打孔 45 min,弃去封闭液,
将爬片从孔板中取出,放在载玻片上,滴加稀释好
的一抗,完全覆盖爬片并放入湿盒,4 $^{\circ}$ C 过夜。弃去
一抗,PBST 清洗爬片 5 次,1 min/次。加荧光二抗至
完全覆盖爬片,湿盒中室温避光孵育 45 min,PBST
清洗爬片 5 次,1 min/次,滴加 DAPI 避光孵育 30
min,PBST 清洗爬片 5 次,1 min/次。吸干爬片上的
液体,用含抗淬灭剂的封片液封片,激光共聚焦观察。

2 结果与分析

2.1 过表达 HSPA1A 对癌细胞增殖的影响

采用作者所在实验室构建成功的 HSPA1A 大
肠杆菌重组载体(含有 GFP 标签(非融合表达)的
pEB),将质粒转染 HeLa、HT29、PC3 细胞,48 h 后收
集 pEB 细胞蛋白质,通过 Western Blot 验证能否在
这 3 个细胞中表达成功,Western Blot 显示 HSPA1A
在转染重组质粒的细胞中表达成功。

将验证过的质粒分别再次转染 HeLa、HT29、
PC3,转染 24 h 后拍摄细胞图片,48 h 后进行 MTT
实验。24 h 后通过细胞图片(见图 1~图 3)可以明显
观察到瞬时转入 HSPA1A 质粒后癌细胞密度增加,
细胞增殖加快。48 h 后通过 MTT 实验可知转染后
活细胞数目增多(见图 4),进一步证明了 HSPA1A
能够加快肿瘤细胞的增殖。

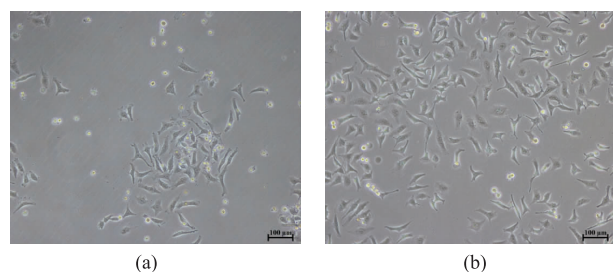


图1 HeLa 转染 pEB 空载(a)与 HSPA1A(b)后的细胞形态
Fig. 1 Cell morphology after pEB (left) and HSPA1A (right) transferred into HeLa

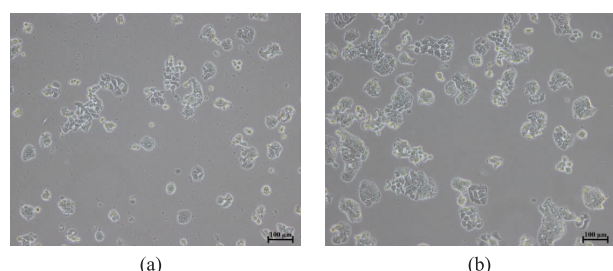


图2 HT29 转染 pEB 空载(a)与 HSPA1A(b)后的细胞形态
Fig. 2 Cell morphology after pEB (left) and HSPA1A (right) transferred into HT29

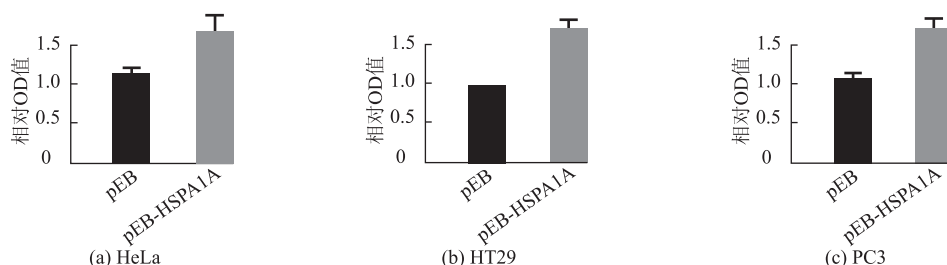


图4 HeLa、HT29、PC3 转染 pEB 空载与 HSPA1A 后 48 h 的细胞存活率

Fig. 4 Cell viability of HeLa, HT29, PC3 transfected pEB at no load (left) and HSPA1A (right) for 48 h

可以与 DNA 结合, 因此其荧光强度直接反映了细胞内 DNA 含量。通过流式细胞仪检测 PI 荧光强度可以估计细胞内 DNA 含量继而确定细胞周期。

HT29 细胞转染 pEB 空载后, 位于 G1 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 65.38%; 位于 G2 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 0.54%; 位于 S 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 34.08%。转染 HSPA1A 后位于 G1 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 57.15%; 位于 G2 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 1.69%; 位于 S 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 41.16%(见图 6)。

HeLa 细胞转染 pEB 空载后, 位于 G1 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 53.71%; 位于 G2 期的细

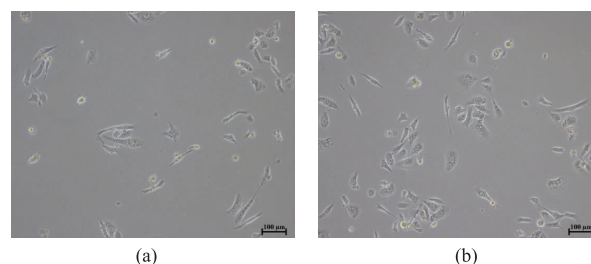


图3 PC3 转染 pEB 空载(a)与 HSPA1A(b)后的细胞形态
Fig. 3 Cell morphology after pEB (left) and HSPA1A (right) transferred into PC3

2.2 免疫荧光

为探究 HSPA1A 在肿瘤细胞中的亚细胞定位, 进行免疫荧光实验。转染 48 h 后进行免疫荧光处理。pEB 载体带 GFP 基因, 因此转染成功的细胞带弥散性绿色荧光。HSPA1A 蛋白用红色荧光标记, 细胞核用 DAPI 进行染色。

转染 HSPA1A 后, 红色荧光标记的 HSPA1A 停留于细胞质中, 并未与细胞核重叠, 可得出结论 HSPA1A 主要在肿瘤细胞的细胞质中发挥作用(见图 5)。

2.3 周期实验

由于细胞周期各阶段的 DNA 含量不同, 而 PI

胞占有所有细胞数目的比例为 1.58%; 位于 S 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 44.72%。转染 HSPA1A 后位于 G1 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 48.26%; 位于 G2 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 1.40%; 位于 S 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 50.34%(见图 7)。

PC3 细胞转染 pEB 空载后, 位于 G1 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 56.42%; 位于 G2 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 2.38%; 位于 S 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 41.20%。转染 HSPA1A 后位于 G1 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 53.46%; 位于 G2 期的细胞占有所有细胞数目的比例为 2.71%; 位于 S 期的细胞占有所有细胞数目的比例

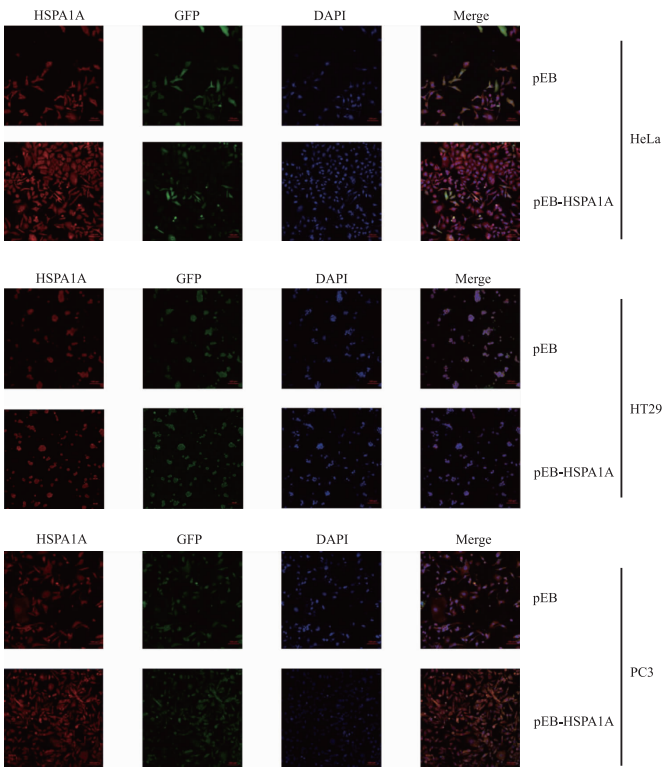


图 5 3 种细胞转染 pEB 空载与 HSPA1A 的免疫荧光

Fig. 5 Immunofluorescence of three cells transfected pEB and HSPA1A

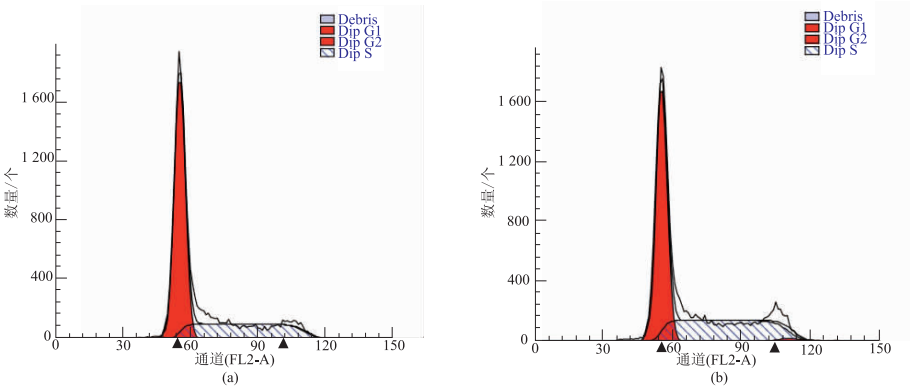


图 6 HT29 转染 pEB 空载(a)与 HSPA1A(b)后的细胞周期

Fig. 6 Cell cycle after HT29 transfection of pEB empty (left) and HSPA1A (right)

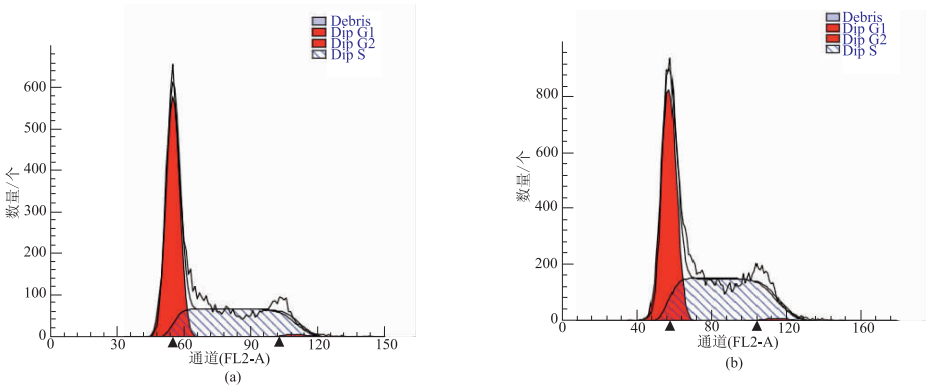


图 7 HeLa 转染 pEB 空载(a)与 HSPA1A(b)后的细胞周期

Fig. 7 Cell cycle after HeLa transfection of pEB empty (left) and HSPA1A (right)

为 43.83%(见图 8)。

G1 期称为 DNA 合成前期,由细胞周期实验可知 HSPA1A 过表达后,处于 G1 期的细胞明显变少。

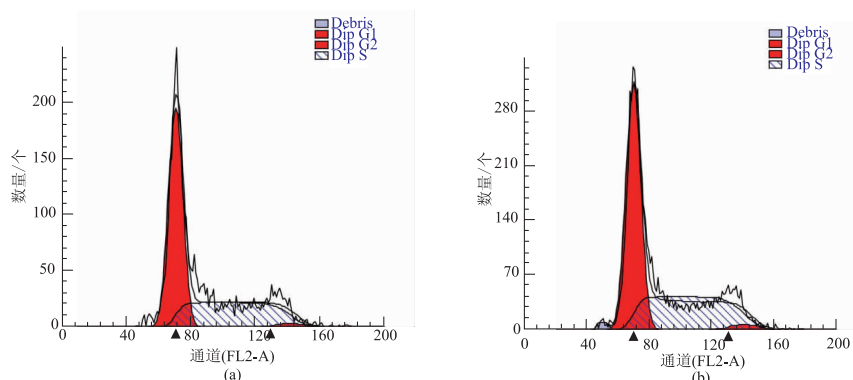


图 8 PC3 转染 pEB 空载(a)与 HSPA1A(b)后的细胞周期图

Fig. 8 Cell cycle after PC3 transfection of pEB empty (left) and HSPA1A (right)

2.4 HSA1A 对周期蛋白的影响

通过周期实验确定,HSPA1A 能够加速细胞的 G1 期,推测可能是肿瘤细胞增殖加快的原因。为探究过表达 HSPA1A 以后对 G1/S 检查点相关的细胞周期蛋白(cyclin D1,cyclin E1)、细胞周期蛋白依赖激酶(CDK4、CDK6、CDK2)的影响,对 3 种肿瘤细胞进行转染,转染 48 h 后,收集细胞进行 Western Blot。

结果表明过表达 HSPA1A 在细胞中可以促进 cyclin D1、cyclin E1、CDK4、CDK6、CDK2 的表达(见图 9)。cyclin D1、cyclin E1、CDK4、CDK6、CDK2 作为确定的 G1/S 检查点相关周期蛋白和周期蛋白依赖性激酶,其表达量增多,可以帮助细胞周期加快。其中 HeLa 细胞中 CDK4、CDK6、cyclin D1、cyclin E1 明显增加,HT29 中 CDK2、CDK4、CDK6、cyclin D1、cyclin E1 均发生明显上调,PC3 中 CDK4 发生明显上调。推测 HSPA1A 可能促进 cyclin D1 和 CDK4/CDK6 的结合和(或)cyclin E1 和 CDK2 的结合,HSPA1A 作为伴侣蛋白质可能通过稳定 cyclin D1-CDK4/CDK6 和 (或)cyclin E1-CDK2 这两条途径中相关蛋白质,上调相应蛋白质含量,使细胞增殖加快。

2.5 讨论

当细胞受到应激时,细胞中的应激诱导型 HSP70 发挥保护细胞的作用^[13]。HSP70 家族由几个高度同源的成员组成^[14],包括 HSPA1A、HSPA5、HSPA8、HSPA9^[15]。HSPA1A 定位与细胞质和细胞核中^[16],HSPA5 定位于细胞内质网上,是一个钙离子

大多数细胞处于 S 期和 G2/M 期即 DNA 合成中后期。因此,过表达 HSPA1A 可以加速肿瘤细胞的 G1 期。

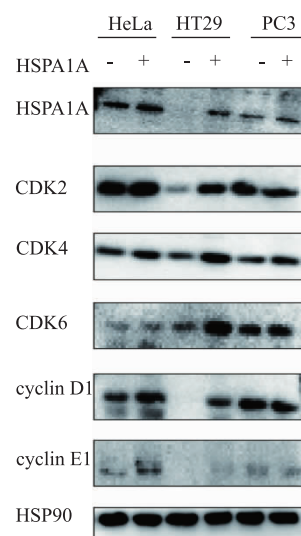


图 9 HSPA1A 对周期蛋白相关蛋白质的影响

Fig. 9 Effect of HSPA1A on cyclins and CDKs

结合蛋白质,HSPA8 蛋白质均匀分布于整个细胞,HSPA9 作为线粒体伴侣蛋白质,主要定位于线粒体中^[17]。有证据表明 HSP70 在癌症中过表达,这种伴侣蛋白质的高表达与肿瘤的产生和预后不良反应有关^[18]。例如,HSP70 过表达是早期肝细胞和前列腺癌的标志,也是大肠癌和乳腺癌晚期癌细胞结转移的标志之一^[19]。

目前 HSPA1A 对细胞的增殖作用及相关机制尚未有明确的研究。已有的研究表明,外源性的 HSPA1A 可以促进肿瘤的生长。HSPA1A 通过 TLR2 和 TLR4 信号传导促进 H22 肝癌细胞的增殖,推测 HSPA1A 充当 TLR2 和 TLR4 的内源性配

体,以促进肿瘤生长^[20]。

3 结 语

本研究发现 HSPA1A 可以促进 PC3、HT29、HeLa 这 3 种肿瘤细胞增殖。通过免疫荧光发现 HSPA1A 主要在细胞质中发挥增殖作用,PI 染色发现 HSPA1A 主要加速了肿瘤细胞的 G1 期。在过表达 HSPA1A 后,发现 G1/S 检查点相关的周期蛋白和周期蛋白依赖激酶表达量均上调。肿瘤细胞中,基础氧化应激与蛋白质合成均有上调,HSPA1A 作

为伴侣蛋白质,可以帮助蛋白质正确折叠,同时稳定蛋白质构象。因此,肿瘤中高表达 HSPA1A 可能通过稳定 cyclin D1-CDK4/CDK6 和(或)cyclin E1-CDK2 这两条途径中的相关蛋白质帮助细胞加速通过 G1/S 检查点。

HSPA1A 能够有效促进癌细胞增殖,因此通过寻找靶向 HSPA1A 的药物有望抑制肿瘤细胞的增殖,对于临床肿瘤的治疗有重要作用。但是 HSPA1A 在细胞质中起到伴侣作用,以及其他肿瘤细胞中的作用尚待研究。

参考文献:

- [1] 彭乔烽,陈明,马小梅,等. 热休克蛋白 HSP70 家族功能研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医,2019,49(5):18-20.
- [2] 刘嘉敏,赵元君. HSP70 的研究进展及其在生物医学中的应用[J]. 教育教学论坛,2017(50):61-62.
- [3] 梁红霞. 乙肝相关肝癌患者血清热休克蛋白 70、白介素-8 水平测定及其诊断价值[J]. 肿瘤基础与临床,2018,31(2):106-107.
- [4] ABHA G,ANKUSH B,KAZUE H T. HSP70 and HSP90 in neurodegenerative diseases[J]. **Neuroscience Letters**,2020,716(4):234.
- [5] 尚冰清,单晨. 热休克蛋白及其与疾病的关系[J]. 临床医药文献电子杂志,2018,5(37):198.
- [6] 黄春梅,卢童,周治军,等. 热休克蛋白 70 在肾癌中的表达及临床意义[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志,2018,10(3):173-174.
- [7] VOLLOCH V Z,SHERMAN M Y.Oncogenic potential of HSP72[J]. **Oncogene**,1999,18(24):36-48.
- [8] 李世龙,张宝,宋扬,等. 热休克蛋白联合检测在结直肠癌中的诊断价值研究[J]. 临床误诊误治,2019,32(1):23-27.
- [9] 樊欣,彭仁. 热休克蛋白 70:生物学功能与作用机制研究进展[J]. 生命科学,2019,31(3):270-278.
- [10] SASI B K,SONAWANE P J,GUPTA V,et al. Corrigendum to " coordinated transcriptional regulation of Hsp70 gene by multiple transcription factors:crucial roles for HSF-1,NF- κ B,and CREB"[J]. **Journal of Molecular Biology**,2014,426(3):116-135.
- [11] SAMPSON J,O'REGAN L,DYER M,et al. Hsp72 and Nek6 cooperate to cluster amplified centrosomes in cancer cells[J]. **Cancer Research**,2017,77(18):122-134.
- [12] WAN J,WU W,HUANG Y,et al. Incomplete radiofrequency ablation accelerates proliferation and angiogenesis of residual lung carcinomas via HSP70/HIF-1 α [J]. **Oncology Reports**,2016,34(34):23-28.
- [13] 赵凌云,齐鲁楠,游雪梅. 热休克蛋白 70 在肝细胞癌中的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志,2017,31(6):528-532.
- [14] OLIVERIO R,NGUYEN P,KDEISS B,et al. Functional characterization of natural variants found on the major stress inducible 70-kDa heat shock gene,HSPA1A,in humans[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,2018,506(4):799-804.
- [15] HOSSEINI S A,ZILAEI M,SHOUSHTARI M H,et al. An evaluation of the effect of saffron supplementation on the antibody titer to heat-shock protein (HSP)70,hsCRP and Spirometry test in patients with mild and moderate persistent allergic asthma:a triple-blind,randomized placebo-controlled trial[J]. **Respiratory Medicine**,2018,145(3):28-34.
- [16] KOWALCZYK M,KUCIA K,OWCZAREK A,et al. Association studies of HSPA1A and HSPA1L gene polymorphisms with schizophrenia[J]. **Archives of Medical Research**,2018,49(5):342-349.
- [17] AMBROSE A J,ZERIO C J,SIVINSKI J,et al. A high throughput substrate binding assay reveals hexachlorophene as an inhibitor of the ER-resident HSP70 chaperone GRP78[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**,2019,29(14):1689-1693.
- [18] HU B,LI M,YU X,et al. Diverse expression regulation of *Hsp70* genes in scallops after exposure to toxic *Alexandrium dinoflagellates*[J]. **Chemosphere**,2019,234(9):62-69.
- [19] SCHMIDT E,GEHRMANN M,DARK M,et al. Extracellular function of intracellular and cellular heat shock proteins in Gary: response in cancer therapy[J]. **Reproductive Biology**,2007,81(1):15-27.
- [20] WU F H,YUAN Y,LI D,et al. Extracellular HSPA1A promotes the growth of hepatocarcinoma by augmenting tumor cell proliferation and apoptosis-resistance[J]. **Cancer Letters**,2012,317(2):157-164.