

文章编号 1006-8147(2017)04-0290-05

论 著

# 人 GRP94 基因慢病毒载体构建及稳定表达 GRP94 蛋白的人宫颈癌 HeLa 细胞株筛选及鉴定

杨娅楠, 王 媛, 左志宇, 王鑫廷, 杨 洁

(天津医科大学免疫学系, 天津 300070)

**摘要** 目的: 构建人葡萄糖调节蛋白 94 (GRP94) 基因慢病毒载体, 筛选稳定表达 GRP94 蛋白的人宫颈癌细胞株, 筛选 GRP94 结合蛋白, 为探讨 GRP94 对宫颈癌的调控作用提供细胞模型。方法: 采用 RT-PCR 法从 HeLa 细胞中扩增 GRP94 基因片段, 连接到慢病毒载体 pLVX-IRES-Puro 中, 获得重组载体。瞬时转染 293T 细胞, 采用 Western blot 法检测 GRP94 蛋白表达量。pLVX-FLAG-GRP94 重组质粒通过与包装质粒共转染 293T 细胞, 获得重组慢病毒。以慢病毒感染 HeLa 细胞, 筛选并鉴定稳定表达 GRP94 蛋白的细胞株。用稳定表达 FLAG-GRP94 的 HeLa 细胞株, 银染后利用质谱筛选结合蛋白, 并经免疫共沉淀验证。结果: 重组慢病毒载体经双酶切和基因测序比对鉴定正确。HeLa 细胞经慢病毒感染、药物筛选后获得的稳定表达株中 GRP94 蛋白表达量高于野生型 HeLa 细胞 ( $P < 0.01$ )。成功钓取一种与肿瘤发生发展密切相关的 SND1 蛋白。结论: 成功构建了 GRP94 基因慢病毒载体 pLVX-FLAG-GRP94, 并筛选出稳定表达 GRP94 蛋白的 HeLa 细胞株, 为进一步明确肿瘤的发生、发展机制奠定了基础。

**关键词** 葡萄糖调节蛋白 94; 慢病毒载体; HeLa; SND1

中图分类号 Q7

文献标志码 A

## Construction of human GRP94 lentivirus vector and its application in screening human cervical cancer cell line HeLa for stable expression

YANG Ya-nan, WANG Yuan, ZUO Zhi-yu, WANG Xin-ting, YANG Jie

(Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:** To construct human GRP94 gene lentiviral vector and screen the HeLa cell line stably expressing GRP94 protein, to provide a cell line model for the study of GRP94 gene regulation in cervical cancer. **Methods:** The GRP94 gene fragment was amplified from HeLa cells by RT-PCR and ligated into lentiviral vector expression plasmid pLVX-IRES-Puro to obtain recombinant lentiviral vector pLVX-FLAG-GRP94. After transfection of 293T cells with pLVX-FLAG-GRP94 for 48 h, the expression of FLAG-GRP94 fusion protein was detected by Western blot. pLVX-FLAG-GRP94 recombinant plasmid was co-transfected with 293T cells to obtain recombinant lentivirus carrying FLAG-GRP94. The expression of FLAG-GRP94 protein in 293T cells transfected with recombinant plasmid was detected by Western blot. The GRP94-binding protein lysate was obtained by FLAG-small peptide elution using HeLa cell line which could stably express FLAG-GRP94. SDS-PAGE electrophoresis and silver staining were performed to select the binding protein. **Results:** Recombinant lentiviral vector was identified by restriction enzyme digestion and gene sequencing. The expression of GRP94 protein in transfected 293T cells was higher than that in wild type HeLa cells ( $P < 0.01$ ). The expression of GRP94 protein in HeLa cells was significantly higher than that in wild-type HeLa cells ( $P < 0.01$ ). The SND1 protein, which was closely related to tumor development and progression, was successfully detected by mass spectrometry and verified by immunoprecipitation. **Conclusion:** The GRP94 gene lentiviral vector pLVX-FLAG-GRP94 could be successfully constructed, and the HeLa cell line stably expressing GRP94 protein is screened, which lays a foundation for further study of the mechanism of tumorigenesis and development.

**Key words** GRP94; lentiviral vector; HeLa; SND1

葡萄糖调节蛋白 94 (glucose regulated protein, GRP94) 是一种分子伴侣, 主要贮存在内质网中, 参与内质网的应激反应, 是内质网应激反应中的重要因子<sup>[1-2]</sup>。此外, 在人类肿瘤中, GRP94 的高表达通常与胃癌、肝癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌及前列

腺癌相关, 其过表达可能是导致恶性肿瘤发生、发展的重要原因<sup>[3-4]</sup>。2016 年 8-11 月, 本研究构建了 GRP94 基因慢病毒载体, 包装病毒后感染并筛选稳定表达 GRP94 蛋白的人宫颈癌 HeLa 细胞株, 为进一步探讨 GRP94 在肿瘤中的作用提供体外细胞系模型。现将研究过程及结果报告如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料 慢病毒载体质粒 pLVX-IRES-Puro、包

基金项目 国家青年科学基金资助项目(31300709)

作者简介 杨娅楠(1987-), 女, 研究实习生, 硕士在读, 研究方向: 免疫学; 通信作者: 王鑫廷, E-mail: wangxinting@tmu.edu.cn。

装质粒 1 和包装质粒 2 由天津医科大学生物化学与分子生物学系石磊教授馈赠。HeLa 细胞系、293T 细胞系均为本实验室保存。感受态大肠杆菌 Trans1T1、Trans2K Plus II DNA Marker、T4 DNA 连接酶均购自北京全式金生物技术有限公司。去内毒素质粒提取试剂盒购自 Promega 公司,转染试剂 Polyethyleneimine 购自 Sigma 公司,转染试剂 Neofect 购自北京零客创智生物科技有限公司。限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 及逆转录试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司,PrimeSTAR 酶购自 Takara 公司,氨苄青霉素和 SYBR Green 均购自罗氏公司。兔抗人 GRP94 单克隆抗体购自 CST 公司,辣根过氧化物酶标记的抗鼠、抗兔 IgG 二抗和 LumiGlo 化学发光底物均购自 KPL 公司,BCA 蛋白检测试剂盒购自 Pierce 公司,嘌呤霉素购自北京索莱宝科技有限公司,胶回收试剂盒购自 Biomega 公司,引物合成及基因测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

**1.2 pLV-IRES-FLAG-GRP94 重组质粒构建** 根据 GRP94 的 CDS 序列(NM\_003299.2)设计含有 *EcoR* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶位点的 FLAG-GRP94 基因的引物序列,根据 FLAG 标签的位置,设计两种引物,第一种引物为去掉 GRP94 CDS 序列前 ATG:上游引物为 5'-CCGGAATTCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGAGGGCCCTGTGGGTGCT-3',下游引物为 5'-CGCGGATCCTTACAATTCATCTTTTTCAGCTGTAG-3';第二种引物为在 GRP94 目的片段前后各加一个 FLAG 标签:上游引物为 5'-CCGG AATTCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATGAGGGCCCTGTGGGTGCT-3',下游引物为 5'-CGCGGATCCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCA TCAATTCATCTTTTTCAG-3'。提取 HeLa 细胞的总 RNA 并进行逆转,以逆转录的 cDNA 为模板,PCR 扩增目的片段,条件为 95℃预变性 5 min,95℃15 s、55℃3 min,共 35 个循环,最后 72℃5 min,所得 PCR 产物大小为 2 454 bp。将获得的 PCR 产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定,将含有目的片段的凝胶块进行切胶,利用凝胶回收试剂盒回收目的片段。将目的片段的胶回收产物及 pLV<sub>x</sub>-IRES-Puro 慢病毒载体同时使用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶进行双酶切,37℃1 h,将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳后切胶回收目的片段及载体质粒的酶切产物。用 T4 DNA 连接酶将线性 pLV<sub>x</sub>-IRES-Puro 线性质粒与含有相同黏性末端的 GRP94 目的片段于常温下连接 1 h。将连接产物转化至 Trans1T1 感受态大肠杆菌,在含有氨苄青霉素抗性的 LB 平板上

筛阳性单克隆,挑取阳性克隆,摇菌扩增并进行菌落 PCR 鉴定,将 PCR 鉴定阳性的单克隆扩大培养,使用去内毒素质粒小提试剂盒提取重组质粒。

### 1.3 pLV<sub>x</sub>-IRES-FLAG-GRP94 重组质粒鉴定

**1.3.1 重组质粒酶切及基因测序** 使用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶对提取的重组质粒 pLV<sub>x</sub>-IRES-FLAG-GRP94 进行双酶切鉴定,并进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,根据酶切片段大小验证重组质粒是否构建成功;同时也对提取的重组质粒进行基因测序的鉴定,5' 测序引物及序列:CMV-F:CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG (Invitrogen),3' 测序引物及序列:IRES-R: CCTCACATTGCCAAAAGACG。

**1.3.2 重组质粒 FLAG-GRP94 表达检测** 培养 293T 细胞生长至 60% 左右汇合时,在转染试剂 Polyethyleneimine 介导下将 A-4 重组质粒瞬时转染 293T 细胞,一部分细胞 24 h 后收集 RNA,逆转录为 cDNA;另一部分细胞 48 h 后收集蛋白,以野生型 293T 细胞及转染 pLV<sub>x</sub>-IRES-Puro 空载质粒的 293T 细胞作为对照。采用 Western blot 法对重组质粒 FLAG-GRP94 蛋白的表达进行检测。采用 Real-time PCR 法对重组质粒 FLAG-GRP94 mRNA 水平的表达进行检测。反应体系为:Fast Start Universal SYBR Green(ROX) 10 μL, Forward primer(10 μmol/L) 0.5 μL, Reverse primer (10 μmol/L) 0.5 μL, cDNA 50 ng,补水至 20 μL,每个样品重复 3 个副孔;反应程序:95℃10 min,以 95℃15 s、60℃30 s 进行共 40 个循环;使用 ABI 7500 SDS V1.4 软件分析实验结果。引物序列为:GRP94F: GGAGAGTCGTGAAGCAGTTGAG;GRP94 R:CCACCAAAGCACACGGAGATTC;β-actin F:CACCATTGGCAATGAGCGGTTC;β-actin R:AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT。

**1.4 HeLa 细胞嘌呤霉素最低致死浓度测定** 将 HeLa 细胞接种于 6 孔板,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基常规培养 24 h,分别加入 0、0.5、1、1.25、1.5 μg/mL 嘌呤霉素培养 3 d,当加入最小剂量的嘌呤霉素使培养的 HeLa 细胞全部死亡时,确定嘌呤霉素对 HeLa 细胞的最低致死浓度,后续研究则选择该浓度的嘌呤霉素进行抗药筛选。

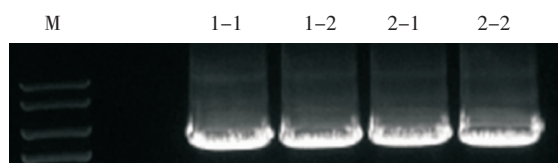
**1.5 慢病毒质粒包装** 将 293T 细胞用高糖 DMEM 培养基培养至 70%~80% 汇合率,转染前 2 h 换液,将重组质粒(或空载质粒)与包装质粒 1、包装质粒 2 以 22.5 μg:7.9 μg:14.6 μg 的比例与 500 μL opti-MEM 混匀,另用 500 μL opti-MEM 与 100 μL 转染试剂 Polyethyleneimine 混匀。将含有质粒的 opti-MEM 与含有 Polyethyleneimine 的 opti-MEM 轻弹混匀,

室温静置 20 min, 逐滴缓慢加入到 293T 细胞中, 培养 24 h 后, 收集病毒上清至离心管, 更换完全培养基继续培养 24 h, 再收集病毒上清至离心管, 将两次收集的病毒液 4 ℃、500×g 离心 10 min, 用 0.45 μm 的滤器过滤备用。收集病毒液后的 293T 细胞, 提取其总蛋白, 通过 Western blot 方法检测 FLAG-GRP94 蛋白表达量, 若正常表达 FLAG-GRP94 蛋白, 则该病毒液可用于 HeLa 细胞的感染。

**1.6 HeLa 细胞感染、稳定株筛选及鉴定** 将 HeLa 细胞常规培养至 6 cm 培养皿, 使其融合率达 60% 左右时弃掉培养基, 分别加入 pLV<sub>x</sub>-IRES-FLAG-GRP94 表达载体(或 pLV<sub>x</sub>-IRES-Puro 空载质粒)包装病毒液 5 mL, 补加 100 μL FBS 和 24 μg polybrene, 感染 24 h 后弃掉上清, 再次加入 5 mL 病毒液, 再过 24 h 后, 换成完全培养基, 加入最低致死浓度的嘌呤霉素进行筛选。筛选过程中以不转染质粒的野生型 HeLa 细胞作为对照, 待加药后此皿细胞全部死亡时, 继续加药 3~4 d 后, 撤掉药物培养。将一部分细胞冻存保种, 剩余的细胞提取其总蛋白, 通过 Western blot 方法检测 FLAG-GRP94 蛋白表达量。若筛选出的 HeLa 细胞能够持续稳定表达 FLAG-GRP94 融合蛋白, 则该稳定株构建完成。

## 2 结果

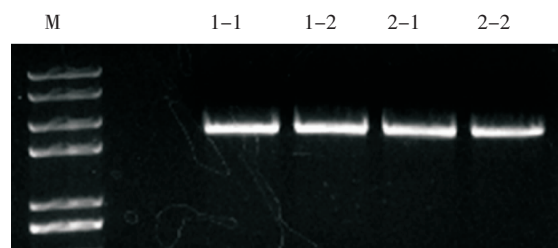
**2.1 GRP94 目的片段** PCR 扩增目的片段长度约为 2 454 bp, 见图 1。该 PCR 产物切胶回收后经 *EcoR* I / *Bam* H I 双酶切后产物见图 2, 可用于后续的连接反应。



M: Trans2K Plus II DNA Marker; 1-1、1-2: 第 1 种引物 PCR 产物; 2-1、2-2: 第 2 种引物 PCR 产物

图 1 FLAG-GRP94 目的片段电泳图

Fig 1 Electrophoresis of target fragment of FLAG-GRP94



M: Trans2K Plus II DNA Marker; 1-1、1-2 和 2-1、2-2: 分别为 2 种 GRP94 PCR 产物经 *EcoR* I / *Bam* H I 双酶切后的产物

图 2 FLAG-GRP94 目的片段双酶切后产物电泳图

Fig 2 Electrophorogram of the products after double digestion of the target fragment of FLAG-GRP94

**2.2 线性 pLV-IRES-Puro 质粒载体** pLV-IRES-Puro 质粒载体的图谱见图 3, 完整的 pLV-IRES-Puro 质粒电泳后条带见图 4 左, 质粒经 *EcoR* I / *Bam* H I 双酶切后, 在 8 100 bp 左右出现条带(图 4 右), 双酶切后的条带经切胶回收后用于后续的连接反应。

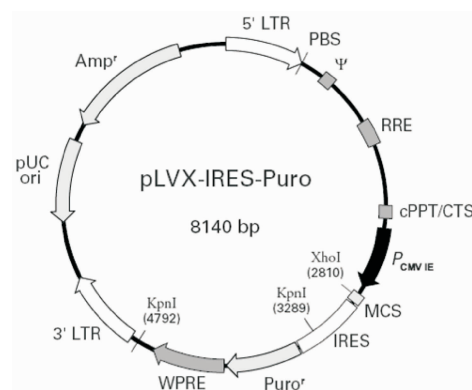
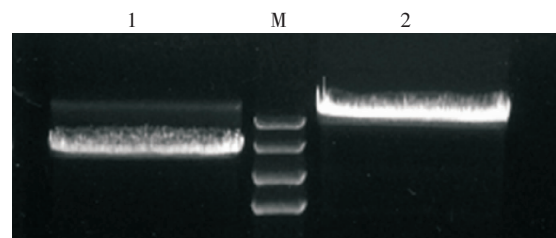


图 3 pLV-IRES-Puro 质粒图谱

Fig 3 Plasmid map of pLV-IRES-Puro



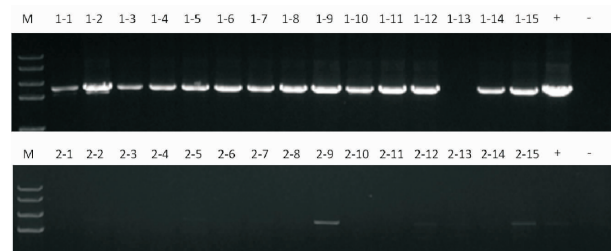
M: Trans2K Plus II DNA Marker; 1: pLV-IRES-Puro 空载质粒; 2: pLV-IRES-Puro 质粒 *EcoR* I / *Bam* H I 双酶切后产物

图 4 线性 pLV-IRES-Puro 质粒载体双酶切前后电泳图

Fig 4 Electrophoresis map of pLV-IRES-Puro plasmid vector before and after double digestion

**2.3 重组真核表达质粒 pLV-IRES-FLAG-GRP94 鉴定结果**

**2.3.1 筛选阳性单克隆菌落 PCR** 结果显示 1-1~1-15 号菌落除去 1-13 均为阳性 PCR 结果, 2-9、2-12、2-15 为第 2 种引物阳性 PCR 结果, 因此选取 1-4 号和 2-9 号单克隆菌落进行后续研究(图 5)。



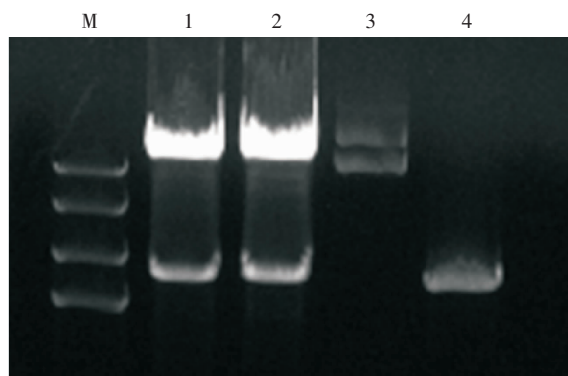
M: Trans2K Plus II DNA Marker; 1-1 ~ 1-15: 分别为第 1 种引物阳性单克隆菌落 PCR 产物; 2-1 ~ 2-15: 分别为第 2 种引物阳性单克隆菌落 PCR 产物; + 为阳性对照; - 为阴性对照

图 5 重组质粒单克隆菌落 PCR 产物电泳图

Fig 5 Electrophorogram of recombinant plasmid monoclonal colony PCR product



**2.3.2 重组质粒酶切及基因测序** 将构建的 1-4 号和 2-9 号重组质粒进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 的双酶切,产生的条带大小与预期相符(图 6),且重组质粒基因测序结果正确,证明 FLAG-GRP94 功能片段已成功插入到 pLV-IRES-Puro 的多克隆位点上。



M:Trans2K Plus II DNA Marker;1,2: 分别为 1-4、2-9 号阳性单克隆菌落提取的 pLV-IRES-FLAG-GRP94 重组质粒经 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切后产物;3:4 号阳性单克隆菌落提取的重组质粒;4:GRP94 的目的片段

图 6 重组质粒 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切产物电泳图

Fig 6 Electrophorogram of recombinant plasmid double digestion products

**2.3.3 FLAG-GRP94 重组质粒转染 293T 细胞后蛋白水平变化** 重组质粒转入 293T 细胞后,1-4 重组质粒 FLAG-GRP94 蛋白表达正常,GRP94 蛋白表达升高,而 2-9 重组质粒 GRP94 表达正常,但 FLAG 蛋白表达较低,因此 1-4 重组质粒构建成功(图 7)。

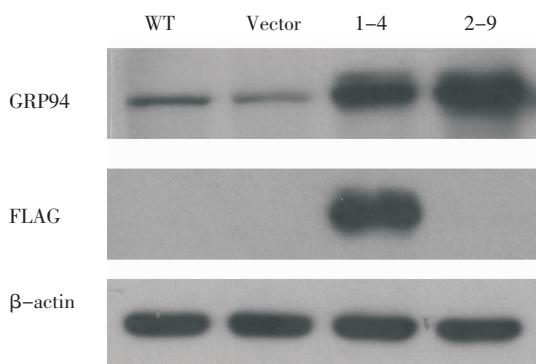


图 7 Western blot 法检测 FLAG-GRP94 融合蛋白表达

Fig 7 The expression of FLAG-GRP94 fusion protein detected by Western blot

**2.3.4 FLAG-GRP94 重组质粒转染 293T 细胞后 GRP94 mRNA 水平变化** 以野生型及转染空载质粒的 293T 细胞作为对照,将 1-4 重组质粒转入 293T 细胞后其 GRP94 mRNA 水平明显升高(图 8)。

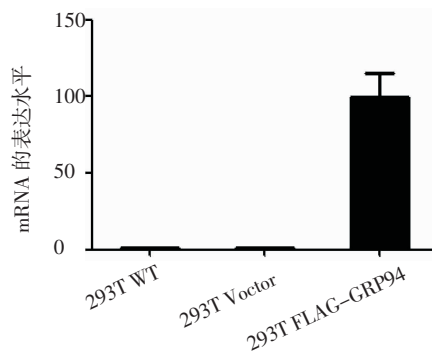


图 8 Real-time PCR 法检测重组质粒 FLAG-GRP94 mRNA 水平变化

Fig 8 Real-time PCR was used to detect the expression of FLAG-GRP94 mRNA

**2.4 HeLa 细胞稳定表达 FLAG-GRP94 蛋白的细胞株的鉴定**

**2.4.1 HeLa 细胞嘌呤霉素最低致死浓度测定结果** HeLa 细胞加嘌呤霉素筛选结果显示,加入 1.25、1.5  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素培养的 HeLa 细胞 48 h 后全部死亡,加入 0.5、1  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素的全培养基培养的 HeLa 细胞部分死亡,由此确定嘌呤霉素对 HeLa 细胞的最低致死浓度为 1.25  $\mu$ g/mL,后续研究选择 1.25  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素进行抗药筛选。

**2.4.2 慢病毒质粒包装的 293T 细胞 FLAG-GRP94 蛋白的检测** 见图 9。

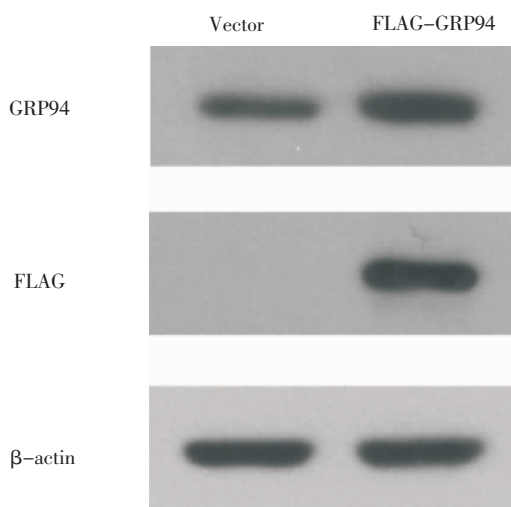


图 9 293T 细胞转染重组质粒及包装质粒后 FLAG-GRP94 蛋白的表达

Fig 9 Expression of FLAG-GRP94 protein in 293T cells transfected with recombinant plasmid

**2.4.3 慢病毒感染 HeLa 细胞后 FLAG-GRP94 蛋白水平变化** 见图 10。

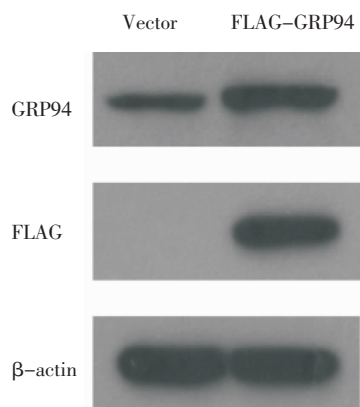


图 10 HeLa 细胞慢病毒感染后 FLAG-GRP94 蛋白的表达

Fig 10 Expression of FLAG-GRP94 protein in HeLa cells infected with lentivirus

2.5 FLAG-GRP94-HeLa 细胞株中 FLAG-GRP94 富集蛋白 见图 11、12。

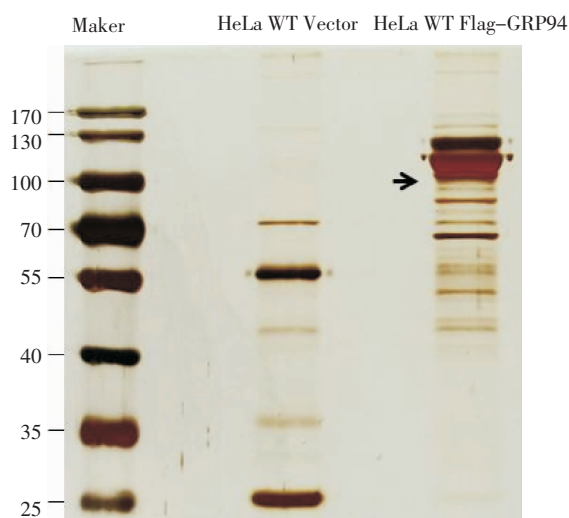


图 11 与 GRP94 结合蛋白, 箭头指向位置为 SND1 蛋白

Fig 11 Pulative protein interacted with GRP94, arrows pointed at SND1 Protein

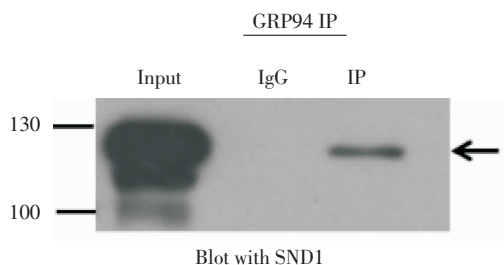


图 12 HeLa 细胞中免疫共沉淀鉴定 GRP94 蛋白与 SND1 相互作用

Fig 12 GRP94 co-immunoprecipitated by SND1

### 3 讨论

GRP94 是一类应激分子, 与热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 有着很高的同源性<sup>[2]</sup>, 是 HSP90 家族中的重要成员。GRP94 主要存在于内

质网腔中, 是内质网典型分子伴侣之一, 参与内质网蛋白的折叠、装配、运输、降解<sup>[5]</sup>。GRP94 能够参与调节内质网应激, 当细胞内环境处于低氧、低糖、低 pH 等异常条件下, 大量未折叠蛋白或错误折叠蛋白在内质网中异常聚集, 为了消除这种内质网应激现象, 内质网会迅速启动未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR), 分子伴侣 GRP94 随之表达上调, 与内质网应激元件等产生相互作用从而诱导细胞凋亡<sup>[6-8]</sup>。此外, 在免疫调节过程中, GRP94 参与抗原受体蛋白肽链的折叠, 确保抗原受体的正确合成和表达。在免疫应答中, GRP94 能够参与 MHC I、MHC II 抗原提呈途径, 作为抗原肽提呈分子, 将抗原提呈于细胞表面, 从而诱发特异的细胞免疫<sup>[9-10]</sup>。有研究表明, 从肿瘤发生开始, 癌细胞就会产生葡萄糖调节应激反应<sup>[11-13]</sup>。在正常细胞中 GRP94 处于低表达状态, 一旦处于应激状态 GRP94 将持续高表达, 但是在肿瘤细胞中没有任何刺激下, GRP94 也会呈高表达状态, 这是由于肿瘤细胞中缺血、缺氧、局部酸中毒等异常因素诱使肿瘤细胞产生应激反应, 使 GRP94 持续高表达。GRP94 这种过表达趋势, 使其在多种肿瘤发生发展过程中起重要的辅助作用。

为了进一步探索 GRP94 对肿瘤的调控作用, 本研究课题将 GRP94 基因插入慢病毒表达载体 pLV<sub>x</sub>-IRES-Puro, 构建 pLV<sub>x</sub>-IRES-FLAG-GRP94 重组质粒。随后, 将构建好的 pLV<sub>x</sub>-FLAG-GRP94 重组质粒与病毒包装质粒同时转染到 239T 细胞中, 进行病毒包装。用重组慢病毒感染 HeLa 细胞, 进行药物筛选, 获得 GRP94 蛋白稳定表达的 HeLa 细胞株, 经检测其 GRP94 蛋白表达量高于野生型 HeLa 细胞 ( $P < 0.01$ )。GRP94 蛋白稳定表达的 HeLa 细胞株的获得, 可作为 GRP94 蛋白过表达载体应用于肿瘤等疾病的功能研究, 有助于从细胞和分子水平深入探讨 GRP94 蛋白在肿瘤细胞的发生发展过程中的作用机制。

#### 参考文献:

- [1] Marzec M, Eletto D, Argon Y. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(3):774
- [2] Eletto D, Dersh D, Argon Y. GRP94 in ER quality control and stress responses[J]. Semin Cell Dev Biol, 2010, 21(5):479
- [3] Chen W T, Ha D, Kanel G, et al. Targeted deletion of ER chaperone GRP94 in the liver results in injury, repopulation of GRP94-positive hepatocytes, and spontaneous hepatocellular carcinoma development in aged mice[J]. Neoplasia, 2014, 16(8):617
- [4] Chen W T, Tseng C C, Pfaffenbach K, et al. Liver-specific knockout of GRP94 in mice disrupts cell adhesion, activates liver progenitor

(下转第 319 页)

- mid-regional pro-adrenomedullin test combination in sepsis diagnosis[J]. *Clin Chem Laborat Med*, 2013, 51 (5):1059
- [2] Rey C, García-Hernández I, Concha A, et al. Pro-adrenomedullin, pro-endothelin-1, procalcitonin, C-reactive protein and mortality risk in critically ill children: a prospective study[J]. *Crit Care*, 2013, 17(5):240
- [3] Weiner M L, Ferguson H E, Thorsrud B A, et al. An infant for muller toxicity and toxicokinetic feeding study on carrageenan in preweaning piglets with special attention to the immune system and gastrointestinal tract[J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 77(1):120
- [4] Kim K Y, Yong D, Lee K, et al. Burkholderia sepsis in children as a Hospital-Acquired infection[J]. *Yonsei Med J*, 2016, 57(1):97
- [5] Deis J N, Creech C B, Estrada C M. Procalcitonin as a marker of severe bacterial infection in children in the emergency department[J]. *Pediatr Emerg Care*, 2010, 26(1):51
- [6] 徐燕平,侯韬. 血清降钙素原与前白蛋白及C-反应蛋白对儿童感染诊断的应用的评价[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(18):1893
- [7] Zhu F, Jiang Z, Li W H, et al. Clinical significance of serum procalcitonin level monitoring on early diagnosis of severe pneumonia on children[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(22):4300
- [8] Pundiche M, Sarbu V, Unc O D, et al. Role of procalcitonin in monitoring the antibiotic therapy in septic surgical patients[J]. *Chirurgia (Bucur)*, 2012, 107(1):71
- [9] Bouadma L, Luyt C E, Tubach F, et al. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care Units: a multicentre randomized controlled trial[J]. *Lancet*, 2010, 375(9713):463
- [10] Oncel M Y, Erdevi O, Uras N, et al. Is pro-adrenomedullin a more useful maker in hospitalized infants with sepsis[J]. *Eur J Pediatr*, 2014, 173(1):127
- [11] Roca A, Oluwalana C, Camara B, et al. Prevention of bacterial infections in the newborn by pre-delivery administration of azithromycin: Study protocol of a randomized efficacy trial[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2015, 15(1):302
- [12] 陈云霞,李春盛. 肾上腺髓质素对急诊社区获得性肺炎患者的预后和危险分层价值[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(2):115
- [13] Angeletti S, Dicunzo G, Fioravanti M, et al. Procalcitonin, MR-proadrenomedullin, and cytokines measurement in sepsis diagnosis: Advantages from test combination[J]. *Dis Markers*, 2015, 2015(10):951532
- [14] Debiante L, Hachem R Y, Ai W I, et al. The utility of proadrenomedullin and procalcitonin in comparison to C-reactive proteins as predictions of sepsis and bloodstream infections in critically in patients with cancer[J]. *Crit Care Med*, 2014, 42(12):2500
- [15] Sánchez M S, Hernández J C, Hernándezbou S, et al. Pro-adrenomedullin usefulness in the management of children with community-acquired pneumonia a preliminar prospective observational study [J]. *BMC Res Notes*, 2012, 5(1):363
- [16] Zhu Y, Li C. Diagnostic value of combination of biomarkers in patients with sepsis and severe in emergency department[J]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2014, 26(3):153
- [17] Von Haehling S, Filippatos G S, Papassotiropoulos J, et al. Mid-regional pro-adrenomedullin as a novel predictor of mortality in patients with chronic heart failure[J]. *Eur J Heart Fail*, 2010, 12(5):484
- [18] Travaglino F, Berardinis B D, Magrini L, et al. Utility of procalcitonin (PCT) and Mid regional pro-adrenomedullin (MR-proADM) in risk stratification of critically ill febrile patients in Emergency Department (ED) A comparison with APACHE II Score[J]. *BMC Infect Dis*, 2012, 12(1):184
- [19] Jordan I, Corniero P, Balaguer M, et al. Adrenomedullin is a useful biomarker for the prognosis of critically ill septic children [J]. *Biomark Med*, 2014, 8(9):1065

(2016-10-11 收稿)

(上接第 294 页)

- cells, and accelerates liver tumorigenesis[J]. *Hepatology*, 2014, 59(3):947
- [5] Mao C, Wang M, Luo B, et al. Targeted mutation of the mouse Grp94 gene disrupts development and perturbs endoplasmic reticulum stress signaling[J]. *PLoS One*, 2010, 5(5):e10852
- [6] Lee S, Song R, Lee M, et al. A molecular chaperone glucose-regulated protein 94 blocks apoptosis induced by virus infection[J]. *Hepatology*, 2008, 47(3):854
- [7] Ni M, Lee A S. ER chaperones in mammalian development and human diseases[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(19):3641
- [8] Lev A, Dimberu P, Das S, et al. Efficient cross-priming of antiviral CD8+ T cells by antigen donor cells is GRP94 Independent[J]. *J Immunol*, 2009, 183(7):4205
- [9] Mimnaugh E, Xu W, Vos M, et al. Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(5):551
- [10] Liu B, Li Z. Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin[J]. *Blood*, 2008, 112(4):1223
- [11] Tomida A, Suzuki H, Kim H, et al. Glucose-regulated stresses cause decreased expression of cyclin D1 and hypophosphorylation of retinoblastoma protein in human cancer cells[J]. *Oncogene*, 1996, 13(12):2699
- [12] Hua Y, White-Gilbertson S, Kellner J, et al. Molecular chaperone gp96 is a novel therapeutic target of multiple myeloma[J]. 2013, 19(22):6242
- [13] Wu Y D, Song J D. The expression of glucose regulated protein-94 in colorectal carcinoma cells treated by Sodium butyrate[J]. *Cell Res*, 2000, 10(2):115

(2016-11-21 收稿)