

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-05-0384-05

## 热休克蛋白 70 对过氧化氢所致乳鼠 心肌细胞核仁损伤的保护作用

王慷慨, 邓恭华, 肖卫民, 赵振宇, 蒋磊, 刘梅冬, 肖献忠

(中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 核仁; 心肌细胞; 过氧化氢; 热休克蛋白 70; 核仁分离

[摘要] 为探讨氧化应激时体外培养的新生 Wistar 大鼠心肌细胞核仁损伤以及热休克蛋白 70 对损伤核仁的保护作用, 用 0.5 mmol/L 过氧化氢处理原代培养的心肌细胞 0、30、60 min, 采用甲苯胺兰染色核仁及电镜技术观察核仁结构的改变; 并通过热休克预处理及反义技术诱导或阻断热休克蛋白 70 的表达, 观察其对核仁损伤的保护作用。结果发现, 光镜下过氧化氢损伤组心肌细胞核仁染色颗粒数增多, 电镜下核仁结构松散、核仁组份分离。热休克预处理导致心肌细胞中热休克蛋白 70 表达明显增加, 并使过氧化氢所致心肌细胞核仁损伤明显减轻。免疫组织化学显示过氧化氢可引起热休克蛋白 70 从胞浆到胞核, 再到核仁的移位。热休克蛋白 70 反义寡核苷酸很大程度上能阻断热休克预处理对心肌细胞核仁损伤的保护作用。结果提示, 过氧化氢可导致体外培养的新生大鼠心肌细胞核仁结构损伤, 热休克蛋白 70 高表达及其向核仁的移位对上述损伤具有明显保护作用。

[中图分类号] R361.1

[文献标识码] A

### The Protective Effect of Heat Shock Protein 70 on The Nucleolar Impairment of Cultured Neonatal Cardiomyocyte Induced by Hydrogen Peroxide

WANG Kang-Kai, DENG Gong-Hua, XIAO Wei-Min, ZHAO Zhen-Yu, JIANG Lei, LIU Mei-Dong, and XIAO Xiarr-Zhong  
(Department of Pathophysiology, XiangYa Medical College, Central Southern University, Changsha, Hunan 410078, China)

[MeSH] Nucleolus; Cardiomyocyte; Hydrogen Peroxide; Heat Shock Protein 70; Nucleolar Segregation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the nucleolar changes and the effect of heat shock protein 70 (HSP70) during the oxidative stress using an injury model of neonatal rat cardiomyocyte induced by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). **Methods** The nucleolar impairment induced by 0.5 mmol/L  $H_2O_2$  was observed with toluidine blue staining and electronic microscopy. The protective effect of HSP70 on nucleolar damage was investigated with heat shock pretreatment and antisense oligonucleotides of HSP70.

**Results**  $H_2O_2$  (0.5 mmol/L) significantly increased numbers of stained nucleolar granules, and resulted in obvious segregation of nucleolar components as indicated by staining with toluidine blue and electronic microscopy. Western blot analysis demonstrated that heat shock pretreatment induced expression of HSP70. Heat shock pretreatment significantly relieved the nucleolar impairment induced by  $H_2O_2$ . Moreover, it was showed by immunocytochemistry that  $H_2O_2$  mediated HSP70 translocation from cytoplasm to nucleus and nucleolus in cardiomyocyte. Additional investigation showed that HSP70 antisense oligonucleotide can remarkably block the protective effect of HSP70 against the nucleolar injury induced by  $H_2O_2$ . **Conclusions** The nucleolar impairment of primary cultured cardiomyocyte can be induced by  $H_2O_2$  and be protected by HSP70, which is over-expressed and translocated to the nucleolus in the process.

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是导致急性心肌损伤的重要因素, 在临床上可见于体外循环下开心直视手术、冠脉搭桥、溶栓疗法、心脏移植等时的缺血再灌注损伤和心肌缺血、败血症休克、多器官功能衰竭等情况。不少学者证实, 活性氧如过氧

化氢(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )可通过损伤心肌细胞的多种细胞器如细胞膜、线粒体、内质网等而引起体外培养的心肌细胞急性损伤<sup>[1-5]</sup>。但迄今为止, 学术界对应激状态下细胞内与蛋白质合成密切相关的重要细胞器——核仁的变化则所知甚少。许多研究表明, 热休克蛋白(heat shock protein, HSP)具有明显的保护细胞损伤的作用<sup>[1,6,7]</sup>。我室以往的研究工作亦证实, 热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)和  $\alpha$ 、 $\beta$  晶状体蛋白对  $H_2O_2$  引起的心肌细胞损伤有保护作用<sup>[2]</sup>。近年来采用表达人类 HSP 的转基因小鼠<sup>[8]</sup>以及热休克因子 1 (heat shock factor 1, HSF1) 基因敲除技术<sup>[9]</sup>, 为 HSP 的细胞保护作用提

[收稿日期] 2002-06-24 [修回日期] 2002-09-25

[基金项目] 国家自然科学基金(30270533)资助, 国家重点基础研究(973)项目(G2000056908)资助。

[作者简介] 王慷慨, 男, 1972 年出生, 湖南平江人, 病理生理学讲师, 主要从事分子心血管病研究。邓恭华, 男, 1962 年出生, 湖南宁远县人, 病理生理学教授, 硕士研究生导师, 主要从事分子心血管病研究。肖献忠, 男, 1956 年出生, 湖南新化县人, 病理生理学教授, 博士研究生导师, 曾赴美国留学 3 年, 主要从事分子心血管病及败血症休克的分子机理研究。

供了直接证据。有研究表明, 应激时, 多种 HSP 向细胞核及核仁移位<sup>[10]</sup>, 但其生物学意义至今不明。本文拟采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对体外培养的乳鼠心肌细胞造成损伤, 观察核仁结构的改变, 并同时通过热休克预处理来诱导 HSP70 的表达以及采用 HSP70 反义寡核苷酸导入技术抑制 HSP70 的表达, 以揭示 HSP70 在保护这种核仁结构改变中的作用, 为进一步揭示心肌细胞急性损伤的发生机制以及寻找防治措施提供新的思路和理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

新生雄性 Wistar 大鼠(出生后 2~3 d), 由本校动物中心提供。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、兔抗 HSP70、兔抗 HSP25 单克隆抗体: Stressgen 公司产; SABC 免疫组织化学试剂盒: 博士德生物工程有限公司产; 乳酸脱氢酶试剂盒: 北京中生生物工程公司产; HSP70 反义、正义、随机寡核苷酸: 上海博亚生物工程公司合成; 脂质体: Life Technology 公司产。

### 1.2 新生 Wistar 大鼠心肌细胞原代培养

无菌条件下取出新生大鼠心脏, 剪除大血管、心房及结缔组织, 用无菌 D-Hanks 液洗净心腔血液后, 将心脏剪成约 1~2 mm 大小的碎块, 用含 0.1% 胰蛋白酶的无菌 D-Hanks 液多次消化心室肌组织, 制备成心肌细胞悬液。细胞经贴壁 1.5 h 后得以分离纯化, 用含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基调整细胞浓度, 以  $2.0 \times 10^8$  个/L 接种于培养瓶中。生长 2~3 d, 待细胞贴满瓶底, 且有节律搏动时, 取原代细胞进行试验。

### 1.3 实验分组

体外培养的新生 Wistar 大鼠心肌细胞随机分为 4 组: 正常对照组( $n=10$ , 重复 3 次), 心肌细胞中加入无血清 DMEM 培养基, 置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 3 h; ②H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组( $n=10$ , 重复 3 次), 心肌细胞中加入含 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的无血清 DMEM 培养基, 置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 3 h; ③热休克预处理后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组, 培养的心肌细胞置于 42℃ 恒温水浴锅中 30 min, 然后在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中恢复 6 h, 随后的处理同 ④组( $n=10$ , 重复 3 次); HSP70 反义寡核苷酸处理组, 心肌细胞中加入含 10 mg/L HSP70 反义寡核苷酸的无血清 DMEM 培养基, 置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 3 h, 随后的处理同 ④组( $n=10$ , 重复 3 次)。

### 1.4 核仁染色

用无菌预冷的磷酸盐缓冲液漂洗细胞, 4% 多聚甲醛/磷酸盐缓冲液固定, 磷酸盐缓冲液漂洗; 再用 0.1% 曲拉通 X-100/磷酸盐缓冲液处理细胞, 磷酸盐缓冲液荡洗; 1% 甲苯胺兰/1% 四硼酸钠染色液染色, 磷酸盐缓冲液反复荡洗, 甩干、封片, 观察并拍照。

### 1.5 心肌细胞内热休克蛋白 70 免疫组织化学检测

根据博士德生物工程公司提供的免疫组织化学染色试剂盒说明书进行。先用预冷的磷酸盐缓冲液洗涤细胞两次, 每次 30 s, 然后用 4℃ 预冷的 4% 多聚甲醛固定, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温处理 10 min, 以灭活细胞中内源性过氧化物酶; 滴加适量 1:50 正常羊血清, 37℃ 封闭 2 h, 滴加 1:100 兔抗 HSP70 单克隆抗体, 4℃ 过夜, 加 1:100 的生物素化羊抗兔 IgG, 37℃ 孵育 60 min, 加工作液, 37℃ 孵育 60 min, 显色, 蒸馏水洗涤, 甩干, 封片。

### 1.6 免疫印迹

细胞用加样缓冲液裂解, 100℃ 水浴 10 min 后, 离心(10 000 g, 10 min), 收集上清, 采用福林-酚法进行蛋白定量。以 15 μg 蛋白/泳道上样, 经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转移至硝酸纤维素膜, 加封闭液, 室温封闭过夜。加用封闭液稀释至 1:2 000 的兔抗 HSP70 单克隆抗体, 室温下孵育 1.5 h, 洗膜液洗涤 3 次, 每次 15 min, 再加用封闭液稀释至 1:2 000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 室温下孵育 1 h, 洗膜液洗涤 3 次, 每次 15 min。显色约 2~5 min, 待蛋白条带显色清晰时, 中止反应, 拍照, 纪录结果。

### 1.7 热休克蛋白 70 反义寡核苷酸处理细胞实验

根据 Life Technology 公司提供的转染操作说明书以及 Hiroshi Ito 等<sup>[11]</sup>报道的方法进行。分别用 330 μL 无血清 DMEM 培养基溶解 HSP70 反义(5'-XT-GTTTTCTTGGCCAT-3', 全部硫代修饰)、正义(包括 HSP70 mRNA 起始密码子下游 15 个碱基, 5'-ATG-GCCAAGAAAACA-3')及随机(5'-GATTATCGTGT-TACT-3')寡核苷酸后, 取各寡核苷酸 40 μL 与 12 μL 脂质体混匀后加无血清 DMEM 培养基至 0.5 mL, 室温放置 30 min。另用无血清 DMEM 培养基洗涤细胞 3 遍后, 加入 1.5 mL 无血清 DMEM 培养基, 然后分别加入上述反义、正义、随机寡核苷酸与脂质体的混合物。3 h 后再加入 2 mL 含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基, 培养不同的时间后进行热休克预处理和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤处理。

### 1.8 统计学处理

数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两组间比较

用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 过氧化氢引起心肌细胞核仁的结构改变

心肌细胞经甲苯胺兰染色后, 在光镜下观察发现: 正常心肌细胞核仁染色颗粒一般为 1~ 2 个,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 30 min、1 h 后核仁染色颗粒数增加到 8~ 10 个(图 1, Figure 1)。电镜结果显示: 正常心肌细胞核仁结构致密, 各核仁组份集中; 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 1 h 后核仁松散, 各组份发生明显的分离(图 2, Figure 2)。

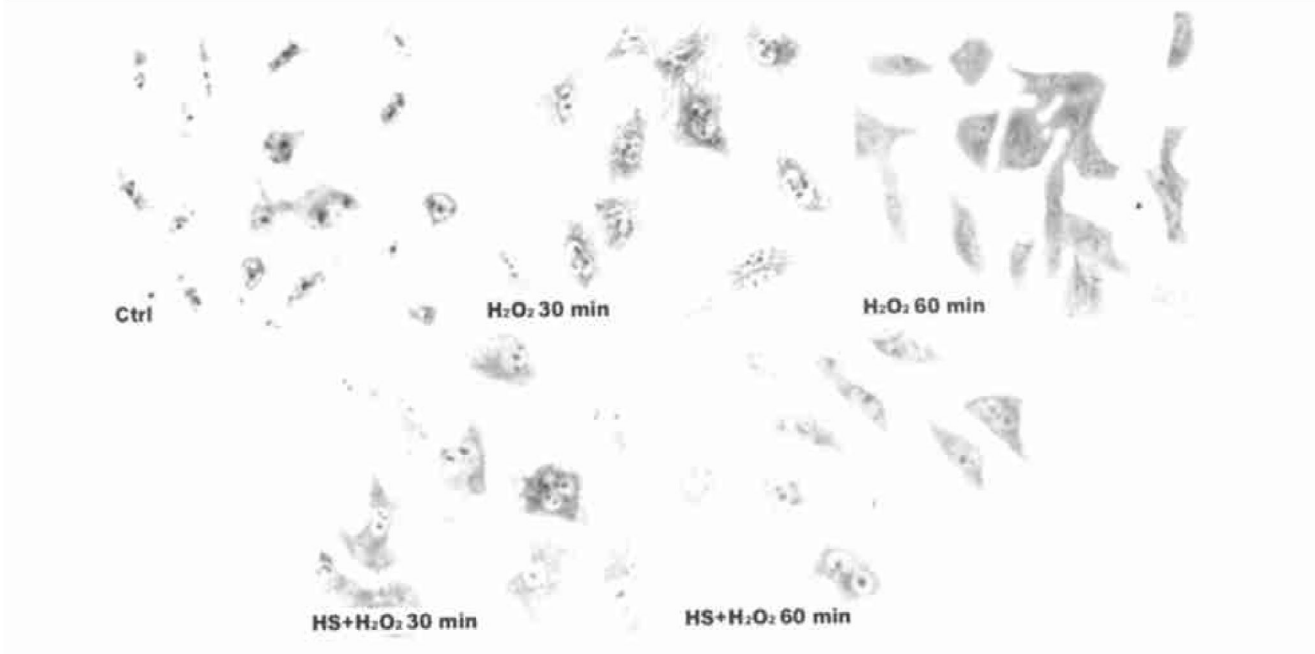


图 1. 甲苯胺兰染色法示过氧化氢所致心肌细胞核仁结构的改变。

Figure 1. Toluidine blue staining showing the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mmol/L) on the nucleolar changes of cardiomyocytes (20 × 10).

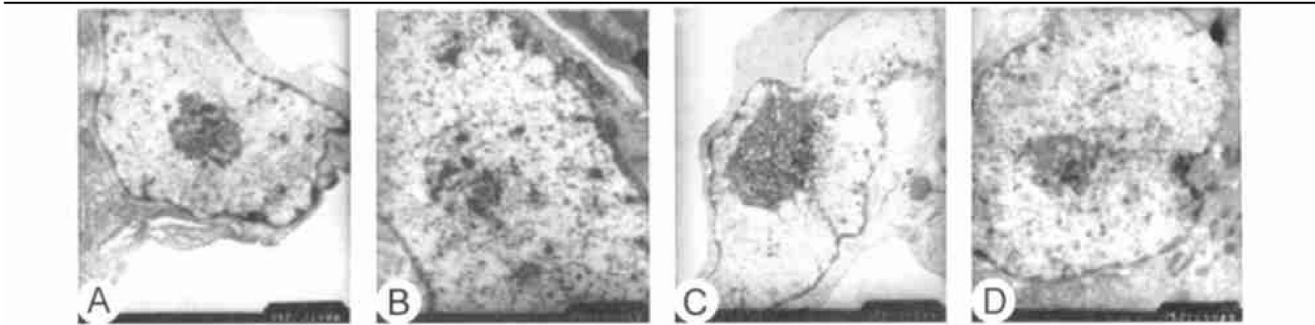


图 2. 电镜示热休克预处理对过氧化氢所致心肌细胞核仁结构改变的影响。

Figure 2. Electronic microscopy showing the effect of heat shock pretreatment on nucleolar changes induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mmol/L, 1 h) (15 000 ×). A: Control; B: Cells were treated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mmol/L) for 1 h; C: Cells were pretreated with heat shock (42 °C, 30 min, recovered for 6 hours) prior to their exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mmol/L) for 1 h; D: Cells were treated with HSP70 antisense oligonucleotide before heat shock pretreatment and exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mmol/L) for 1 h.

### 2.2 热休克预处理对过氧化氢所致心肌细胞核仁损伤的保护作用

2.2.1 热休克预处理对过氧化氢所致心肌细胞核仁损伤的保护作用 心肌细胞经甲苯胺兰染色后, 在光镜下观察发现: 热休克预处理组心肌细胞核仁染色颗粒较损伤组减少, 为 2~ 3 个, 与正常心肌细胞核仁染色颗粒相当(图 1, Figure 1)。电镜下观

察发现: 细胞经热休克预处理后, 其细胞核仁较损伤组紧密, 未见明显的核仁组份分离(图 2C, Figure 2C), 能明显增强对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的耐受性。

2.2.2 热休克预处理对心肌细胞热休克蛋白 70 表达的影响 免疫印迹法显示热休克预处理 3 h, 心肌细胞中 HSP70 的表达增加, 6~ 12 h 达高峰, 并维持至 24 h(图 3, Figure 3)。

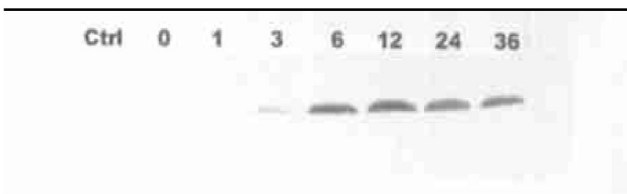


图 3. 免疫印迹法示热休克预处理对心肌细胞热休克蛋白 70 合成的影响。

**Figure 3. Western blot analysis demonstrating the effect of heat shock pretreatment on HSP70 expression in cardiomyocyte.** Ctrl: Cells were incubated at 37 °C as control; 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36: Cells were incubated at 42 °C for 30 min and recovered at 37 °C for 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36 h respectively.

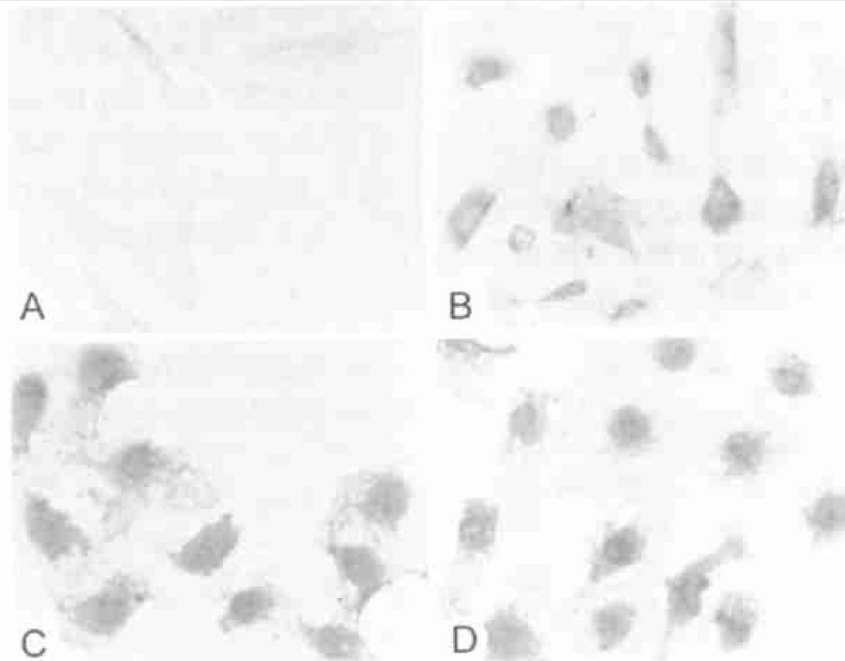


图 4. 免疫组织化学染色法示过氧化氢诱导的热休克蛋白 70 在心肌细胞中的分布。

**Figure 4. Immunohistochemical analysis demonstrating the translocation of HSP70 induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mmol/L) in cardiomyocytes (20 × 10).** A: Normal cells; B: Cells were recovered for 6 h after heat shock pretreatment; C, D: Heat shocked cells were exposed to 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15, 30 min respectively.

### 2.3 热休克蛋白 70 反义寡核苷酸阻断热休克预处理对过氧化氢所致心肌细胞核仁损伤的保护作用

**2.3.1 热休克蛋白 70 反义寡核苷酸对热休克预处理所致热休克蛋白 70 表达的影响** 采用免疫印迹法检测, 结果显示: 细胞经 HSP70 反义寡核苷酸处理 3 h 及 1 h 后, 再进行热休克预处理, 均能明显抑制 HSP70 的表达; 而正义和随机寡核苷酸进行相同处理后, 对 HSP70 的表达无明显影响(图 5, Figure 5)。

**2.3.2 热休克蛋白 70 反义寡核苷酸阻断热休克预处理对过氧化氢所致心肌细胞核仁损伤的保护作用** 电镜结果显示, HSP70 反义寡核苷酸处理后能部分消除热休克预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致核仁损伤的保护作

**2.2.3 过氧化氢损伤时热休克蛋白 70 在心肌细胞中的分布** 免疫组织化学检测结果显示: 细胞经热休克预处理并恢复 6 h 后, HSP70 表达增加, 表现为细胞胞浆和核周染色较正常明显加深。经热休克处理的细胞再暴露于 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中 15 min, 发现 HSP70 向胞核移位, 表现为胞浆染色变浅而胞核染色加深; 暴露 30 min 时发现 HSP70 从胞核向核仁移位, 核浆染色变浅, 而核仁染色则加深(图 4, Figure 4)。

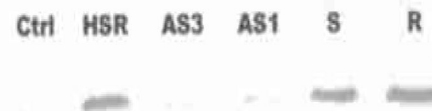


图 5. 免疫印迹法示热休克蛋白 70 反义寡核苷酸对热休克蛋白 70 诱导合成的影响。

**Figure 5. Western blot analysis showing the effect of HSP70 anti-sense ribonucleotide on HSP70 expression induced by heat shock pretreatment.** Ctrl: Normal cells; HSR: Heat shocked cells were recovered for 6 h at 37 °C; AS3, AS1: Cells treated with HSP70 anti-sense ribonucleotide (for 3 h and 1 h respectively) were exposed to heat shock for 30 min at 42 °C and recovered for 6 h at 37 °C; S, R: Cells treated with HSP70 sense and random ribonucleotide for 3 h respectively were exposed to heat shock for 30 min at 42 °C and recovered for 6 h at 37 °C.

用,其核仁结构比热休克预处理组松散,有一定程度的核仁组份分离,但优于 $H_2O_2$ 损伤组(图2D, Figure 2D)。

### 3 讨论

#### 3.1 过氧化氢引起心肌细胞核仁结构改变

作为核糖体生物合成的场所,核仁在细胞蛋白质的合成中发挥了重要作用。近来研究表明,核仁在多种应激原如热应激<sup>[12]</sup>、顺铂<sup>[13]</sup>等的作用下,可发生组份的分离。本研究发现 $0.5\text{ mmol/L } H_2O_2$ 可引起心肌细胞核仁组份分离,主要表现为:光镜下采用甲苯胺兰染色显示, $H_2O_2$ 损伤30 min和60 min时,核仁染色颗粒较正常对照组明显增多;电镜结果显示 $H_2O_2$ 损伤60 min较正常对照组的核仁结构明显松散,组份完全分离。目前对上述核仁结构变化的分子基础、发生机制及其生物学意义,仍不清楚。

#### 3.2 热休克预处理对过氧化氢所致心肌细胞核仁损伤的保护作用及其与热休克蛋白70的关系

我室以前的工作表明:热休克预处理通过诱导热休克蛋白的表达对 $H_2O_2$ 所致心肌细胞损伤具有保护作用<sup>[2]</sup>。本实验发现,热休克预处理对 $H_2O_2$ 所致心肌细胞核仁损伤具有保护作用,甲苯胺兰染色结果显示,热休克预处理组细胞核仁着色颗粒较单纯损伤组明显减少。电镜结果显示,热休克预处理组细胞核仁结构较单纯损伤组紧密,没有明显的核仁组份分离。

另外,免疫印迹检测结果显示,心肌细胞经热休克预处理恢复3 h时,HSP70表达增加,恢复6~12 h时达高峰。免疫组织化学结果亦显示,HSP70的表达量较正常对照组明显增多,细胞经热休克预处理后再用 $H_2O_2$ 损伤时,HSP70先向胞核,随后向核仁移位。以上结果提示,热休克预处理对 $H_2O_2$ 所致心肌细胞核仁结构改变的保护作用与HSP70诱导的高表达及其向核仁移位有关。

HSP70作为分子伴侣(molecular chaperone)帮助应激时变性、聚集、错误折叠或未折叠蛋白质的复性、解聚与重新折叠<sup>[6,7]</sup>。在本实验中,甲苯胺兰染色和免疫组织化学结果显示,先有核仁结构的改变( $H_2O_2$ 损伤10 min即出现),后有HSP70的核仁移位( $H_2O_2$ 损伤30 min后才向核仁移位)。因此HSP70进入核仁后,可能通过发挥其分子伴侣功能减轻 $H_2O_2$ 所致的核仁结构及功能的改变。

HSP70反义寡核苷酸导入进一步证实了HSP70对 $H_2O_2$ 所致心肌细胞核仁损伤的保护作用,结果

显示HSP70反义寡核苷酸通过抑制HSP70表达,在很大程度上能阻断热休克预处理对 $H_2O_2$ 所致心肌细胞核仁结构损伤的保护作用。这一结果进一步证实,热休克预处理对 $H_2O_2$ 所致心肌细胞核仁结构变化的保护作用与HSP70诱导表达及其向核仁移位有关。本文所用反义寡核苷酸顺序已证实能明显抑制HSP70表达<sup>[11]</sup>,反义寡核苷酸经脂质体转染后,进入细胞核和胞浆,与HSP70 mRNA或其前体特异结合,阻断其翻译而抑制HSP70的表达,从而减轻热休克预处理对核仁结构改变的保护作用。

本实验中反义寡核苷酸未能完全抑制热休克预处理的保护作用,与热休克预处理诱导HSP70的大量表达外,还可诱导 $\alpha$ 、 $\beta$ 晶状体蛋白<sup>[2]</sup>、HSP25、HSP68等其它热休克蛋白以及过氧化物酶等的表达有关<sup>[6]</sup>。本实验也发现,在热休克预处理后心肌细胞中HSP25的表达也明显增高(资料未显示)。

鉴于核仁具有十分重要和复杂的功能,核仁损伤时,有关核仁功能的变化,活性氧损伤心肌细胞核仁的分子机理,HSP70保护核仁损伤的分子靶以及其它热休克蛋白在核仁保护中的作用等问题,尚待进一步研究阐明。

#### [参考文献]

- Turner NA, Xia F, Azhar G, et al. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathway in H9C2 cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, **30** (9): 1789-801
- 肖卫民, 袁开宇, 肖献忠, 等.  $\alpha$ 晶状体蛋白在保护过氧化氢所致心肌细胞损伤中的作用. 湖南医科大学学报, 2000, **25** (3): 223-226
- Danie PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia*, 2000, **14** (12): 2035-044
- Chakraborti T, Das S, Mondal M, et al. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal*, 1999, **11** (2): 77-85
- Van de Water B, Wang Y, Asmellash S, et al. Distinct endoplasmic reticulum signaling pathways regulate apoptosis and necrotic cell death following iodoacetamide treatment. *Chem Res Toxicol*, 1999, **12** (10): 943-951
- Ivor J Benjamin, D Randy McMillan. Stress (heat shock) proteins molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 1998, **83**: 117-132
- Xianzhong Xiao, Ivor J Benjamin. Stress response proteins in cardiovascular disease. *Am J Hum Genet*, 1999, **64**: 685-690
- Radford NB, Fina M, Benjamin IJ, et al. Cardiac-protective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 2339-342
- Xiao X, Zuo X, Alberta A, et al. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J*, 1999, **18** (21): 5943-952
- 孙金建. 热休克蛋白70的分布调节及功能. 国外医学·生理病理科学与临床分册, 1997, **17** (1): 7-9
- Hiroshi Ito, Takashi Shimojo, Hiroyuki Fujisaki, et al. Thermal preconditioning protects rat cardiac muscle cells from doxorubicin induced apoptosis. *Life Sciences*, 1999, **64** (9): 755-761
- Morecillo G, Gorab E. Special intranucleolar distribution of HSP70 during heat shock in polytene cells. *Exp Cell Res*, 1997, **236**: 361-370
- Horky M, Wurzer G, Kotala VV, et al. Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *J Cell Sci*, 2001, **114** (Pt4): 663-670

(此文编辑 曾学清)