

热休克蛋白对短暂心肌缺血所致蛋白质聚集的影响

谭小军, 吴晓英, 张华莉, 邓恭华, 涂自智, 肖献忠

(中南大学湘雅医学院病理学与病理生理学教研室, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理生理学; 热休克蛋白对缺血心肌的保护作用; 蛋白质免疫印迹检测; 心肌缺血—再灌注损伤; 蛋白质聚集; α B-晶状体蛋白; 免疫电镜

[摘要] 为了观察短暂心肌缺血后心肌中蛋白质聚集物的产生, 探讨热休克蛋白 70 及 α B-晶状体蛋白对心肌中蛋白质聚集物的影响, 采用雄性 Wistar 大鼠制备在体缺血—再灌注损伤模型, 通过乙醇磷钨酸电镜观察蛋白质聚集物产生, 采用免疫电镜观察热休克蛋白 70 及 α B-晶状体蛋白对蛋白质聚集物的影响。结果发现: 缺血 15 min 再灌注 30 min 时, 心肌细胞中开始出现形态不规则的蛋白质聚集物, 聚集物主要分布在核周、线粒体周围及其两极。再灌注 4 h, 蛋白质聚集物达到高峰, 24 h 后逐渐减少, 72 h 基本恢复正常。④大鼠经热休克预处理及缺血预适应后, 15 min 缺血及 4 h 或 24 h 再灌注所致的心肌蛋白质聚集物的产生明显减少, 恢复速度加快, 再灌注 24 h 已基本恢复正常。④通过免疫电镜观察, 在假手术对照组, 心肌中热休克蛋白 70 表达水平很低。大鼠经热休克预处理后, 心肌中热休克蛋白 70 表达增多, 经缺血 15 min 再灌注 4 h 后, 热休克蛋白 70 与心肌中蛋白质聚集物共分布。在假手术对照组心肌中, α B-晶状体蛋白有一定量的组成型表达, 并均匀分布于胞浆之中。经热休克预处理、缺血预适应后缺血 15 min 再灌注 4 h 心肌中, α B-晶状体蛋白向肌丝移位, 主要位于 Z 线两侧的明带, 且与蛋白质聚集物共分布。本研究首次揭示了缺血—再灌注损伤时心肌细胞中蛋白质聚集物的形成、空间分布及其动态变化规律; 证实了热休克预处理及心肌缺血预适应可明显减轻缺血—再灌注所致心肌蛋白质聚集。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Heat Shock Proteins on Protein Aggregation Induced by Transient Myocardial Ischemia

TAN Xiao-Jun, WU Xiao-Ying, ZHANG Hua-Li, DENG Gong-Hua, TU Zi-Zhi, and XIAO Xian-Zhong

(Department of Pathophysiology, Xiang Ya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

[KEY WORDS] Myocardial Ischemia reperfusion Injury; Protein Aggregation; α B-cystallin; Immunoelectron Microscopy; Heat Shock Proteins; Ethanol Phosphotungstic Acid Electron Microscopy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether transient myocardial ischemia might cause protein aggregation, and to observe whether heat shock pretreatment and ischemic preconditioning could alleviate protein aggregation. **Methods** Myocardial ischemia-reperfusion injury model was prepared by ligation of left descending anterior coronary artery for 15 minutes then released for various durations in rats. Protein aggregates induced by ischemia-reperfusion injury in cardiomyocytes were observed by using ethanol phosphotungstic acid (EPTA) electron microscopy (EM). The influence of heat shock protein 70 (HSP70) and α B-crystallin on above protein damage was further investigated by immunoelectron microscopy. **Results** Myocardial ischemia-reperfusion resulted in protein aggregation, which appeared at 30 min of reperfusion, peaked at 4 h of reperfusion, decreased from 24 h of reperfusion and restored to normal at 72 h of reperfusion after 15 min of ischemia. ④Heat shock pretreatment (rectal temperature 42 °C for 15 min then recovery for 24 h) and ischemic preconditioning (ischemia for 3 min then reperfusion for 10 min) significantly decreased myocardial protein aggregates induced by 15 min of ischemia and 4 h of reperfusion and facilitated the restoration of myocardial protein damage. ④HSPs played key roles in the myocardial protection of heat shock pretreatment and ischemic preconditioning. In the present study, we found that HSP70 and α B-cystallin co-localized with protein aggregates in heat shock pretreatment and ischemic preconditioning groups. **Conclusion** This study, for the first time, demonstrated the formation, intracellular distribution and dynamic patterns of myocardial protein aggregates induced by ischemia-reperfusion injury, and found that heat shock pretreatment and ischemic preconditioning alleviated the formation of myocardial protein aggregates.

心肌缺血—再灌注损伤在临床上十分常见, 如 体外循环下行开心直视手术、心脏移植、冠心病心绞

[收稿日期] 2002-10-31 [修回日期] 2003-06-09

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(973)项目(G2000056908)、国家自然科学基金项目(30170373)资助

[作者简介] 谭小军, 男, 1972 年出生, 湖南省常宁市人, 硕士研究生, 从事心血管病理生理研究, 电话: 0731-4805491, E-mail: changda0680@sina.com。吴晓英, 女, 1968 年出生, 湖南省长沙市人, 硕士研究生导师, 病理学副教授, 从事细胞超微结构研究。肖献忠, 男, 1956 年出生, 湖南省新化县人, 病理生理学教授, 博士研究生导师, 从事心血管病理生理及败血症休克的分子机制研究, 电话: 0731-4805491, E-mail: xianzhongxiao@hotmail.com。

痛发作后,心肌梗死溶栓治疗,冠状动脉搭桥术等。缺血一再灌注可导致心肌结构损伤,包括细胞膜、线粒体、细胞骨架的改变及 DNA、膜磷脂及蛋白质等生物大分子的损伤^[1]。但在心肌缺血一再灌注损伤时,蛋白质损伤的表现形式是什么,特点如何,是否产生蛋白质聚集物,其动态变化规律怎样,迄今尚不清楚。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一类结构上十分保守、功能上非常广泛的蛋白质,存在于从原核生物到真核生物的所有生物细胞中。目前认为其基本功能是分子伴侣(molecular chaperone)功能,即参与其他蛋白质的折叠、转运、蛋白聚集物的解聚及变性蛋白质的降解^[2,3]。自 90 年代以来,我室及其他学者的研究已发现,热休克蛋白 70 及 α B-晶状体蛋白对心肌缺血一再灌注损伤及氧化应激损伤具有保护作用^[4,5],但对其保护作用的分子机制仍不明。在心肌缺血一再灌注损伤中,热休克蛋白 70 及 α B-晶状体蛋白是否通过其分子伴侣作用参与变性蛋白质的复性和蛋白质聚集物的解聚及降解等而发挥保护作用,需要进一步研究阐明。近 10 多年来,缺血预适应的心肌保护作用已引起广泛关注,但目前对其机制依然不十分清楚^[6]。HSP 在心肌缺血预适应中是否发挥作用及如何发挥作用,尚存在不少疑点及争论。

本课题拟采用大鼠在体心缺血一再灌注损伤为动物模型,通过乙醇磷钨酸电镜观察缺血一再灌注损伤后心肌细胞中是否有蛋白质聚集物的产生、蛋白质聚集物的空间分布特点及其动态变化规律,观察热休克预处理和缺血预适应对上述损伤是否具有保护作用,采用免疫电镜技术重点探讨热休克蛋白 70 及 α B-晶状体蛋白对上述损伤的影响,以进一步阐明心肌缺血一再灌注损伤发生的分子机理及热休克蛋白保护心肌损伤的机理,并为临床防治心肌缺血一再灌注损伤提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 Wistar 大鼠(250~300 g),由本校动物中心提供。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、兔抗热休克蛋白 70 单抗、兔抗 α B-晶状体蛋白多克隆抗体(Stressgen 公司);羊抗兔 IgG 胶体金(15 nm)(博士德生物工程有限公司);戊二醛、多聚甲醛、二甲砷酸盐、十二烷基磺酸钠(上海生物工程公司)。

1.2 动物模型和分组

雄性 Wistar 大鼠(250~300 g)术前禁食过夜。用 0.3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉(50 mg/kg),行气管插管,将气管插管连接到呼吸机,做胸骨正中切口,开胸,剪开心包,从左心耳及肺动脉圆锥之间穿线,记录正常心电图。然后分别按如下步骤进行。实验随机分成假手术组、缺血一再灌注损伤组、热休克预处理保护组和缺血预适应保护组:假手术组:只穿线,不结扎,15 min 后取左室前下壁心肌组织。④缺血一再灌注损伤组:结扎 15 min,松解结扎线,关闭胸腔,恢复胸腔负压,分别再灌注不同的时间(30 min 和 2、4、24、48、72 h),记录相应时间点心电图,在各再灌注时间点取左室前下壁心肌组织。④热休克预处理保护组:大白鼠用 0.3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后,置红外线加热灯下加热,使其肛温升至 42℃,维持 15 min,待恢复 24 h 后进行心肌缺血一再灌注损伤实验。结扎左冠状动脉前降支 15 min 后再灌注 4 h 或 24 h。记录各时间点心电图并取左室前下壁心肌组织。④缺血预适应保护组:大白鼠经缺血 3 min 再灌注 10 min 的缺血预适应后,再缺血 15 min,再灌注 4 h 或 24 h。记录相应时间点的心电图并取左室前下壁心肌组织。

1.3 蛋白质免疫印迹检测

取经热休克预处理并恢复不同时间(6、12、24、48、72 h)的大鼠左室前下壁心肌组织,加裂解液(25 mmol/L Tris·HCl, 26 mmol/L 氟化钾, 5 mmol/L 乙二胺四乙酸)于心肌组织中[心肌组织:裂解液=1:5(体积比)]。冰上磨匀浆,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清,采用福林-酚法进行蛋白定量。制备好的蛋白样品分装保存于-80℃冰箱。以 80 μ g 蛋白/泳道上样,经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转膜至硝酸纤维素膜,加封闭液(10 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5; 100 mmol/L NaCl; 0.1% 吐温 20; 2% 白蛋白)室温封闭过夜。加 1:2 000 兔抗热休克蛋白 70 单克隆抗体,室温下孵育 1.5 h, TBS (1 000 mL, pH 7.4, Tris·HCl 3 g, NaCl 8 g, KCl 0.2 g)洗涤 3 次,每次 15 min。再加 1:2 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,室温下孵育 1 h, TBS 洗涤 3 次,每次 15 min,显色约 2~5 min。待蛋白条带显色清晰时,终止反应,拍摄照片,记录结果。

1.4 乙醇磷钨酸电镜观察

用冰冻的 0.1 mol/L 二甲砷酸盐缓冲液配成的 2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛溶液,用震动器将心肌标本切成厚约 200 μ m 的组织块。置于 0.1 mol/L 二甲砷酸盐缓冲液配成的 4% 戊二醛溶液(pH 7.4)后固定 1 h。再以梯度(30%、50%、70%、90% 和

100%) 乙醇脱水, 乙醇磷钨酸液(10 mL 100% 乙醇溶解 0.1 g 磷钨酸, 再加 4 滴 95% 的乙醇) 中染色 50 min, 在染色 25 min 时换乙醇磷钨酸液一次。组织块在干丙酮中进一步脱水, 然后包埋在 Durcupan ACM 树脂中, 切成 500 Å 的薄片, 于电镜下观察蛋白质聚集物的存在及分布。

1.5 免疫电镜观察

用含 0.1% 戊二醛溶液的 4% 多聚甲醛溶液固定(不用四氧化锇做第二步固定), 用 100% 乙醇脱水但不用锇酸染色, 树脂包埋, 切成厚度为 0.1 μm 的薄片, 300 目金网收集。0.1 mol/L PBS(pH 7.2) 洗 5 min, 1% 双氧水洗 10 min, 再用 PBS 配成的 1% 白蛋白封闭 20 min。用 PBS 稀释的 1:200 兔抗热休克蛋白 70 或兔抗 αB-晶状体蛋白的一抗孵育 2 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 再用 PBS 所配 3% 正常羊血清洗

5 min。加胶体金标记的二抗孵育 1 h(采用 PBS 稀释的 1:40 羊抗兔 IgG 胶体金, 15 nm), PBS 液洗 3 次, 每次 5 min, 双蒸水洗 3 次, 每次 5 min。滤线栅风干, 并用乙酸铀和 Satoh 铅复染, 在 JEOL 100CX 电镜下观察。阴性对照组不加一抗, 余皆同上。

2 结果

2.1 缺血一再灌注所致心肌细胞中蛋白质聚集物的产生、分布及动态变化规律

采用乙醇磷钨酸电镜观察到, 假手术对照组核膜周围、线粒体周围及胞浆中皆无蛋白质聚集物的存在。缺血 15 min 再灌注 30 min 后, 核膜周围及线粒体的两极开始出现一些大小不一、形态不规则的蛋白质聚集物, 再灌注 4 h 时最多, 24 h 后逐渐减少, 至 72 h 基本恢复正常(图 1, Figure 1)。

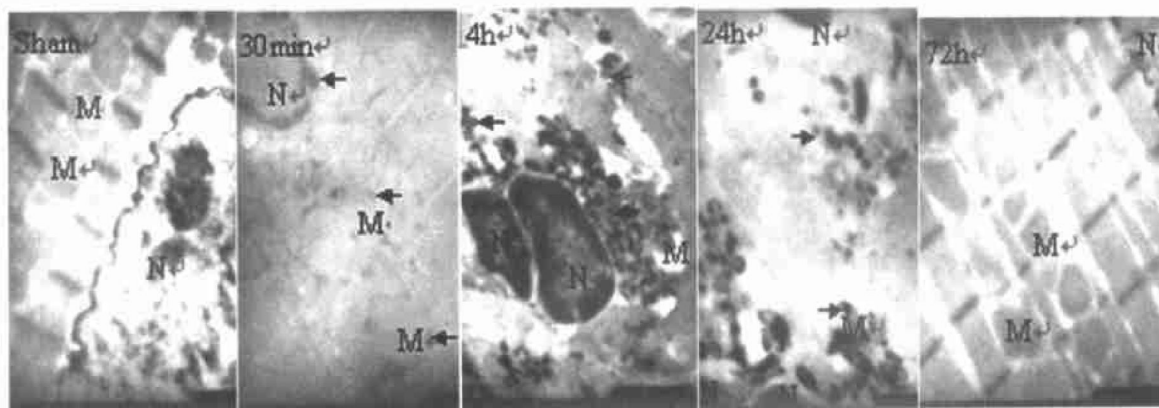


图 1. 乙醇磷钨酸电镜显示缺血一再灌注所致心肌细胞蛋白质聚集物的产生、分布特点和动态变化规律 Sham、30 min、4 h、24 h 和 72 h 分别表示假手术组、缺血 15 min 再灌注 30 min、4 h、24 h 和 72 h。N: 细胞核; M: 线粒体。放大倍数: 15 000 倍。

Figure 1. Electron micrographs of ethanolic phosphotungstic acid staining in cardiomyocytes in sham-operated controls and ischemia reperfusion groups

2.2 热休克预处理及缺血预适应对心肌缺血一再灌注损伤的影响

大鼠经热休克预处理及缺血预适应后, 15 min 缺血及 4 h 或 24 h 再灌注所致的心肌蛋白质聚集物产生明显减少, 恢复速度加快, 再灌注 24 h 已基本恢复正常(图 2, Figure 2)。

2.3 热休克蛋白在热休克预处理及缺血预适应中的作用

大白鼠经热休克预处理(42 °C, 15 min), 于室温下恢复 6 h 后, 心肌中热休克蛋白 70 的表达水平开始增加, 24 h 达到高峰并维持至 48 h, 72 h 后开始减少; αB-晶状体蛋白于恢复 24 h 表达明显增多(未附图)。采用免疫电镜观察到: 在假手术对照组, 心肌

中热休克蛋白 70 表达水平很低。大鼠经热休克预处理后, 免疫印迹显示心肌中热休克蛋白 70 表达增多, 经缺血 15 min 再灌注 4 h 后, 心肌中可见热休克蛋白 70 的存在, 且热休克蛋白 70 与心肌中蛋白质聚集物共分布(图 3, Figure 3)。在缺血一再灌注组或缺血预适应保护组, 15 min 缺血及 24 h 再灌注亦诱导少量热休克蛋白 70 的表达及热休克蛋白 70 与蛋白质聚集物共分布(结果未显示)。

在假手术对照组, 心肌中有一定量 αB-晶状体蛋白的表达, 并分布于胞浆之中。在缺血 15 min 再灌注 4 h 的心肌中, αB-晶状体蛋白向肌丝移位。经缺血一再灌注 24 h(结果未显示)、热休克预处理及缺血预适应后缺血一再灌注, 心肌中 αB-晶状体蛋

白表达增多, 向肌丝移位, 主要位于 Z 线两侧的明带, 并与蛋白质聚集物共分布(图 4, Figure 4)。

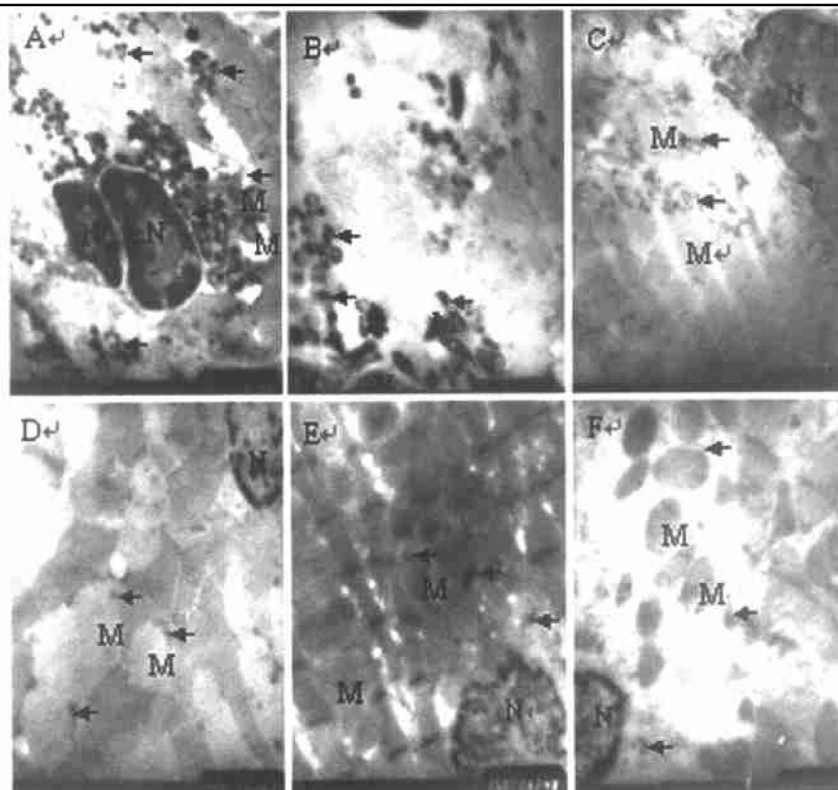


图 2. 乙醇磷钨酸电镜示热休克预处理及缺血预适应对缺血一再灌注损伤所致蛋白质聚集物的影响 A、B 分别表示缺血一再灌注 4 h、24 h; C、D 分别表示热休克预处理后缺血一再灌注 4 h、24 h; E、F 分别表示缺血预适应后缺血一再灌注 4 h、24 h。N: 细胞核; M: 线粒体。放大倍数: 15 000 倍。

Figure 2. Ethanolic phosphotungstic acid electron microscopy showing the effect of heat shock pretreatment and ischemic preconditioning on protein aggregates induced by ischemia-reperfusion injury

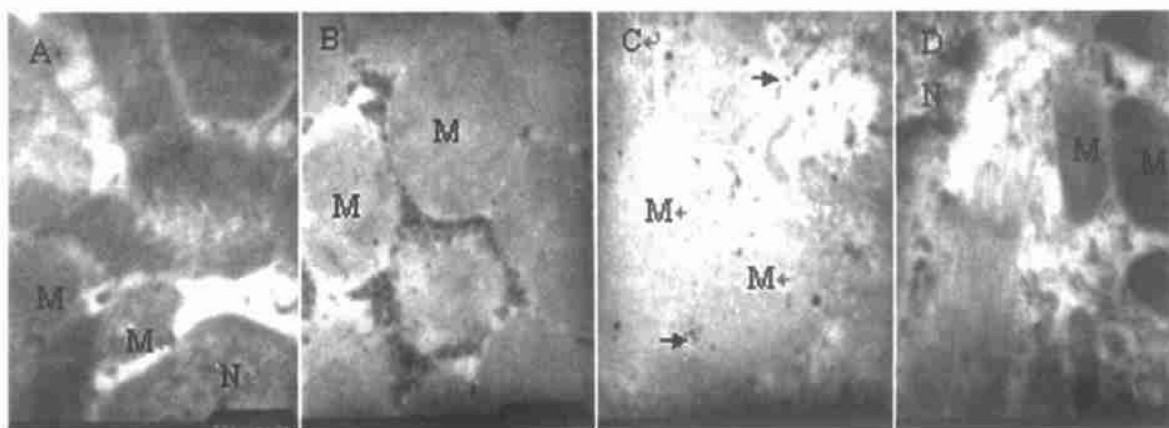


图 3. 免疫电镜示热休克蛋白 70 在缺血一再灌注损伤心肌中的分布 A、B、C、D 分别示假手术组、缺血一再灌注 4 h、热休克预处理后缺血一再灌注 4 h、缺血预适应后缺血一再灌注 4 h。箭头示 HSP70 与蛋白质聚集物共分布。N: 细胞核; M: 线粒体。放大倍数: 40 000 倍。

Figure 3. HSP70 immunogold labeling in the myocardium

3 讨论

3.1 缺血一再灌注导致心肌中蛋白质聚集物产生

本研究采用乙醇磷钨酸电镜观察到, 短暂心肌缺血可导致心肌细胞中蛋白质聚集物的形成, 缺血 15 min 再灌注 30 min 时心肌细胞中开始出现形态不

规则的蛋白质聚集物。聚集物主要分布于核周、线粒体周围及其两极。

正常状态下, 细胞中的功能蛋白质折叠成一定的空间构型而发挥其生物学作用, 蛋白质的疏水基团多位于分子内部。在心肌缺血一再灌注损伤时, 由于大量氧自由基的产生, 使得心肌中蛋白质受损,

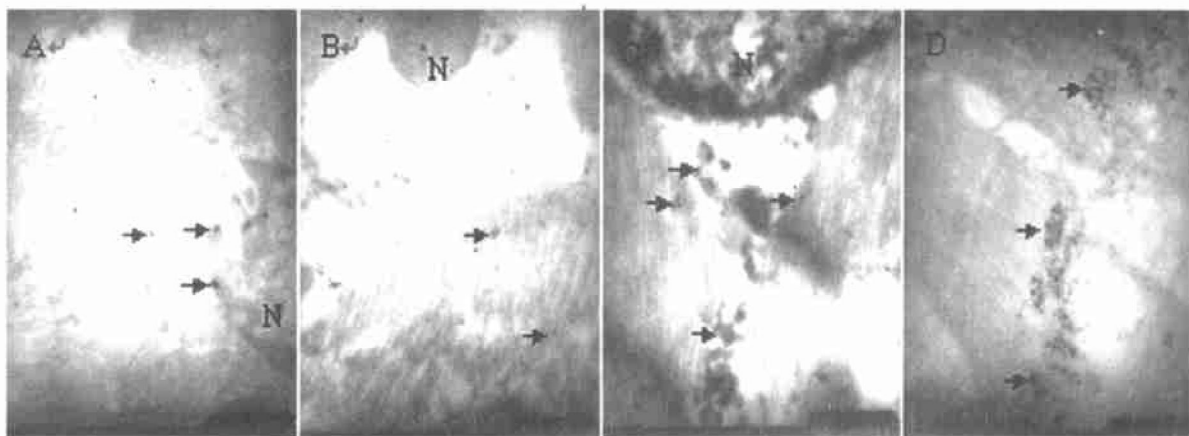


图 4. 免疫电镜示 α B-晶状体蛋白在缺血一再灌注损伤心肌中的分布 A、B、C、D 分别表示假手术组、缺血一再灌注 4 h、热休克预处理后缺血一再灌注 4 h、缺血预适应后缺血一再灌注 4 h。N: 细胞核; M: 线粒体。放大倍数: 40 000 倍。

Figure 4. α B-crystallin immunogold labeling in cardiomyocytes

暴露其分子内部的疏水基团。受损蛋白质通过各自疏水基团互相结合, 形成大的蛋白质聚集物, 而将富含极性氨基酸的片段显露在聚集物的表面^[7]。由于乙醇磷钨酸易与这些极性氨基酸片段反应, 故使蛋白质聚集物显色, 在电镜下表现为形态不规则的电子致密区。早在 1966 年及 1968 年, Bloom 及 Aghajarian 等采用乙醇磷钨酸染色法, 于电镜下清晰显示了在 CA1 椎体神经元内存在变性蛋白质聚集物。2001 年 Hu 等亦采用同样方法观察到脑缺血一再灌注后 CA1 椎体神经元内有蛋白质聚集物的产生^[8], 并进一步发现上述变性蛋白质聚集物中有泛素的分布^[9]。本研究采用类似方法, 首次发现短暂心肌缺血(15 min) 及再灌注后, 心肌细胞中有大量蛋白质聚集物产生, 且发现上述蛋白质聚集物中有热休克蛋白 70 及 α B-晶状体蛋白的分布。

线粒体是细胞能量代谢的重要场所, 又是自由基产生的主要来源。心肌缺血一再灌注损伤时线粒体结构及功能受损, 致心肌细胞氧化一磷酸化受阻, 能量代谢障碍, 氧自由基产生增多, 可能使线粒体周围及其两极积累更多的蛋白质聚集物^[10]。

蛋白质聚集物在再灌注 30 min 时开始出现, 表明蛋白质损伤发生较早, 可能是心肌损伤的早期标志之一。蛋白质聚集物在 24 h 后开始减少, 至 72 h 基本恢复正常, 表明结扎大鼠左冠状动脉前降支 15 min 所致的心肌缺血尚属可逆性损伤。在上述过程中, 心肌细胞通过各种自我保护、自我修复能力恢复了细胞的正常结构与功能。蛋白质聚集物的产生与清除是一种动态平衡。正常状态下, 细胞内产生的少量变性蛋白质、错误折叠的蛋白质(或其它多余的蛋白质) 可通过热休克蛋白的分子伴侣作用予以重

新折叠, 或通过泛素一蛋白酶体降解成多肽碎片及氨基酸, 因而无蛋白质聚集物在细胞中堆积^[11]。心肌缺血一再灌注损伤时, 由于氧自由基产生过多, 致使大量蛋白质受损, 细胞中 HSP 水平不能满足需要。同时, 缺血一再灌注所产生的氧自由基亦可使泛素一蛋白酶体功能受抑制^[12], 使变性蛋白质的清除减少, 从而导致再灌注后 0.5~24 h 内心肌细胞中大量蛋白质聚集物的形成。这些蛋白质聚集物的存在, 可能干扰心肌细胞电生理, 影响心肌细胞的代谢及舒缩功能。再灌注 24 h 后(相当于缺血预适应的延迟相), 由于各种 HSP、抗氧化酶及其它细胞保护性基因表达的上调, 心肌细胞经过自我修复, 重新折叠或清除变性受损的蛋白质, 使心肌细胞的结构与功能得以逐步恢复。

3.2 热休克预处理及缺血预适应明显减轻了缺血一再灌注所致的心肌蛋白质损伤

乙醇磷钨酸电镜显示, 大鼠经热休克预处理(肛温 42℃, 15 min, 恢复 24 h) 或心肌缺血预适应(缺血 3 min, 再灌注 10 min) 后, 15 min 缺血以及 4 h 或 24 h 再灌注所致的心肌蛋白质聚集物的产生明显减少, 且其恢复速度加快, 再灌注 24 h 已基本恢复正常。免疫印迹显示, 热休克预处理导致热休克蛋白 70 及 α B-晶状体蛋白表达明显增加, 表明 HSP 表达增加是热休克预处理保护心肌损伤的可能机制之一。缺血预适应心肌保护作用的机制十分复杂, 目前仍未完全阐明。本研究首次观察到, 缺血预适应的心肌保护作用与其减少蛋白质聚集物的形成有关。其具体机制有待进一步研究阐明。

3.3 热休克蛋白在热休克预处理及缺血预适应所致心肌保护中的作用

免疫电镜显示,在假手术对照组,心肌中热休克蛋白 70 表达水平很低。大鼠经热休克预处理后,免疫印迹显示心肌中热休克蛋白 70 表达增加,经缺血 15 min 再灌注 4 h 后,可见心肌中热休克蛋白 70 与蛋白质聚集物发生共分布,表明热休克蛋白 70 参与了蛋白质聚集物的解聚、复性和降解。热休克蛋白 70 是细胞中诱导表达最多的一种 HSP,它与变性蛋白质所暴露的疏水侧链结合,在 HSP40 的辅助下激活三磷酸腺苷酶,水解三磷酸腺苷,从而使变性蛋白质重新折叠^[13]。此外,热休克蛋白 70 还参与了泛素-蛋白酶体介导的变性蛋白质的降解^[14]。

α B-晶状体蛋白是分子量为 22 kDa 的一种小分子 HSP。在假手术对照组心肌中, α B-晶状体蛋白显示一定量的组成型表达,并均匀分布在胞质之中。经热休克预处理及缺血预适应后,心肌中 α B-晶状体蛋白表达增多。在心肌缺血一再灌注损伤时, α B-晶状体蛋白向肌丝移位,主要位于 Z 线两侧的明带,并与蛋白质聚集物共分布,表明在心肌缺血一再灌注损伤中, α B-晶状体蛋白不仅参与蛋白质聚集物的解聚、复性和降解,而且参与细胞骨架的稳定^[15]。

本研究首次描述了缺血一再灌注损伤时心肌细胞中蛋白质聚集物的形成、空间分布特点及动态变化规律;发现热休克预处理及缺血预适应对缺血一再灌注所致的蛋白质损伤具有保护作用,而热休克蛋白在上述保护中具有重要意义;采用免疫电镜初步揭示热休克蛋白 70 可能通过使变性受损蛋白质复性、解聚及降解而发挥心肌保护作用,而 α B-晶状体蛋白则不仅参与蛋白质聚集物的解聚、复性及降解,而且可能参与细胞骨架的稳定。

[参考文献]

- [1] Korge P, Goldhaber JL, Weiss JN. Phenylarsine oxide induces mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, **280** (5): H2 203-213
- [2] Benjamin JJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 1998, **20** (2): 15-17
- [3] Lund PA. Microbial molecular chaperones. *Adv Microb Physiol*, 2001, **44**: 93-140
- [4] 肖献忠, 罗正曜. 热休克预处理抗过氧化氢所致心肌细胞损伤保护作用的细胞分子机理. *中国病理生理学杂志*, 1997, **13** (1): 65-69
- [5] 王慷慨, 邓恭华, 肖卫民, 赵震宇, 蒋磊, 刘梅冬, 等. 热休克蛋白 70 对过氧化氢所致鼠心肌细胞核仁损伤的保护作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 384-388
- [6] 吕青兰, 袁灿, 张华莉, 陈广文, 王尧玲, 邓恭华, 等. 用 cDNA 芯片检测大鼠心肌缺血预适应后基因表达谱的改变. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (3): 189-193
- [7] Wickner S, Maunz MR, Gottesum S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 1999, **286**: 1 888-893
- [8] Hu BR, Martone ME, Jones YZ, Liu CL. Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *J Neurosci*, 2000, **20** (9): 3 191-199
- [9] Ouyang YB, Hu BR. Protein ubiquitination in rat brain following hypoglycemic coma. *Neurosci Lett*, 2001, **298** (3): 159-162
- [10] Ouyang YB, Tan Y, Comb M, Liu CL, Martone ME, Siesjo BK, et al. Survival and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of AKT, release of cytochrome C and activation of caspase-like proteases. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, **19** (10): 1 126-135
- [11] Wigley WC, Fabunmi RP, Lee MG, Marino CR, Muallem S, DeMartino GN, et al. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol*, 1999, **145** (3): 481-490
- [12] Keller JN, Huang FF, Zhu H, Yu J, Ho YS, Kindy TS. Oxidative stress-associated impairment of proteasome activity during ischemic reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, **20** (10): 1 467-473
- [13] Tanaka S, Kitagawa K, Ohtsuki T, Yagita Y, Takasawa K, Hori M, et al. Synergistic induction of HSP40 and HSC70 in the mouse hippocampal neurons after cerebral ischemia and ischemic tolerance in gerbil hippocampus. *J Neurosci Res*, 2002, **67** (1): 37-47
- [14] Wyttenbach A, Cammichael J, Swartz J, Furlong RA, Narain Y, Rankin J, et al. Effects of heat shock, heat shock protein 40 (HSP40), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (6): 2 898-903
- [15] Goenka S, Raman B, Ramakrishna T, Rao CM. Unfolding and refolding of a quinone oxidoreductase: alpha-crystallin, a molecular chaperone, assists its re-activation. *Biochem J*, 2001, **359** (Pt 3): 547-556