

热休克蛋白 70 对氧化应激所致核仁素裂解的影响

王慷慨, 蒋磊, 刘可, 刘梅冬, 王浩, 易宇欣, 袁灿, 鄂顺梅, 石永忠, 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] 病理学与病理生理学; 热休克蛋白 70 对氧化应激所致核仁素裂解的影响; 免疫印迹法; 热休克蛋白 70; 核仁素; 氧化应激; 过氧化氢; 热休克反应

[摘要] 为探讨热休克蛋白 70 对氧化应激(0.5 mmol/L 过氧化氢)所致核仁素裂解的影响及其机制, 采用免疫印迹技术检测氧化应激诱导核仁素的裂解; 通过热休克反应和构建热休克蛋白 70 转基因细胞观察热休克反应与热休克蛋白 70 对核仁素裂解的影响, 同时采用免疫共沉淀技术检测热休克蛋白 70 与核仁素之间的相互作用。结果发现, 0.5 mmol/L 过氧化氢可导致多种细胞的核仁素发生裂解(有 80 kDa 裂解片段出现), 而且最早出现裂解片段的时间都在过氧化氢处理 30 min 到 1 h 左右; 热休克预处理及转热休克蛋白 70 后均引起热休克蛋白 70 的表达明显增加, 同时显著抑制抑制氧化应激所致核仁素裂解片段的出现, 免疫共沉淀结果显示在氧化应激时热休克蛋白 70 与核仁素直接结合, 形成复合物。以上结果提示, 热休克反应与热休克蛋白 70 可以显著抑制氧化应激所致核仁素的裂解, 其机理与氧化应激时热休克蛋白 70 与核仁素直接结合有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Heat Shock Protein 70 on Cleavage of Nucleolin Induced by Oxidative Stress

WANG Kang-Kai, JIANG Lei, LIU Ke, LIU Mei-Dong, XIAO Wei-Min, WANG Hao, YI Yu-Xin, YUAN Can, E Shun-Mei, SHI Yong-Zhong, and XIAO Xiann-Zhong

(Department of Pathophysiology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Heat Shock Protein 70; Nucleolin (C23); Oxidative Stress; Hydrogen Peroxide; Heat Shock Response

[ABSTRACT] **Aim** To observe the cleavage of nucleolin (also named C23) during apoptosis induced by oxidative stress and clarify the effect of heat shock protein 70 (HSP70) on cleavage of nucleolin and its possible molecular mechanism. **Methods** 0.5 mmol/L hydrogen peroxide (H_2O_2) was added into cultured cells to mimic oxidative stress. Cleavage of C23 were detected by using immunoblotting; Heat shock response (HSR) and HSP70 transgenic cell lines were used to observe the effect of HSR and HSP70 on cleavage of C23 induced by oxidative stress, and the relationship between HSP70 and C23 was evaluated by using co-immunoprecipitation. **Results** Activity of caspase-3 increased significantly after 2 h of 0.5 mmol/L H_2O_2 treatment, and reached peak at 12 h. The cleavage of C23 appeared 30 min to 1 h after treatment of H_2O_2 as indicated by a cleaved fragmentation of 80 kDa, which was significantly inhibited by HSR and HSP70. Furthermore co-immunoprecipitation study indicated that HSP70 could bind directly to C23 during H_2O_2 treatment. **Conclusions** Oxidative stress could induce the activation of caspase-3, cleavage of C23 and apoptosis; and HSP70 could inhibit significantly the cleavage of C23 induced by oxidative stress and its mechanism was related to the interaction between HSP70 and C23 during oxidative stress.

氧化应激损伤的基本机制是活性氧对组织细胞的损伤。活性氧不仅可以攻击细胞膜和细胞器, 还可以破坏蛋白质、膜磷脂和核酸, 最终导致细胞坏死或凋亡^[1,2]。核仁素(nucleolin, 又称为 C23)是真核细胞核仁中最主要的蛋白质, 不仅直接参与核糖体的生物合成与成熟, 还参与细胞增殖、生长与核仁结构的发生等过程^[3]。近期研究发现, 大田酸(okadaic acid)^[4]和 T 淋巴细胞介导^[5]的细胞凋亡中核仁素发生了裂解。活性氧可以导致细胞凋亡^[6,7], 但活性氧

是否可引起核仁素的断裂还有待进一步证实。热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)是公认的分子伴侣, 具有明显的减轻细胞损伤作用^[7-10]。HSP70 是 HSP 超家族中诱导表达最多的成员之一^[9], 在减轻心肌细胞和 C2C12 细胞凋亡中发挥重要作用^[10], 但 HSP70 能否抑制氧化应激时核仁素的断裂尚未见文献报道。本文以向体外培养的细胞中加入 0.5 mmol/L H_2O_2 模拟氧化应激模型, 观察氧化应激和 HSP70 对核仁素裂解的影响, 并探讨其机理。

[收稿日期] 2004-04-12 [修回日期] 2004-05-22

[基金项目] 国家自然科学基金(30300177; 30270533)、国家 973 重点项目(G2000056908)及教育部博士点专项基金(20020533032)资助

[作者简介] 王慷慨, 讲师。肖献忠, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病和败血症休克的分子机制研究。

1 材料与方法

1.1 材料

新生 Wistar 大鼠(出生后 2~3 天),雌雄不拘,由本校动物中心提供。小鼠 RAW264.7 巨噬细胞及 K562 细胞由中国科学院上海细胞生物学研究所提供;DMEM、RPMI1640 培养基和脂质体转染试剂盒为生命技术公司产;无支原体小牛血清为杭州四季青生物工程公司产;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔、兔抗山羊 IgG、正常小鼠 IgG 和鼠抗 HSP70 单克隆抗体均为 Stressgen 公司产;羊抗 HSP70 多克隆抗体和兔抗核仁素多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产;蛋白 G 和蛋白 A 琼脂糖珠为法马西亚公司产;正常兔血清和正常小鼠 IgG 由武汉博士德生物技术公司产;G418 为 Alexis Biochemicals 产;pcDNA3.1 真核表达载体为克隆特克公司产。

1.2 热休克蛋白 70 转基因细胞株的建立

根据生命技术公司提供的转染操作说明书进行。用无血清 DMEM 培养基溶解 20 μg 人 HSP70 真核表达质粒(pcDNA3.1-HSP70, 本室蒋碧梅老师构建^[6]),与含 12 μL 脂质体的无血清 DMEM 培养基充分混匀,室温放置 30 min。RAW264.7 小鼠巨噬细胞用无血清 DMEM 培养基洗涤 3 遍后,加入 1.5 mL 无血清 DMEM 培养基,然后分别加入 pcDNA3.1-HSP70 真核表达质粒与脂质体的 0.5 mL 混合物。6 h 后再加入 2 mL 含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基,24 h 后分瓶。第二天加入含 1 g/L G418 和 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养基进行筛选。一个月后得到两个细胞克隆,随后改用含 0.5 g/L G418 和 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养基进行维持。另取 RAW264.7 小鼠巨噬细胞,转染 pcDNA3.1 空载体,用 G418 进行同样筛选后用于对照。

1.3 细胞培养及处理

新生 Wistar 大鼠心肌细胞培养按本室已建立的方法进行^[7]。细胞培养按常规方法进行,简述如下:原代心肌细胞用含 20% 新生小牛血清的 DMEM 培养基,RAW264.7 巨噬细胞及 K562 细胞用含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养基,转 pcDNA3.1-HSP70 或 pcDNA3.1 的 RAW264.7 转基因细胞用含 0.5 g/L 和 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养基。热休克反应采用 43 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h,然后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恢复 12 h。氧化应激采用终浓度为 0.5 mmol/L H_2O_2 的无血清 DMEM 或 RPMI1640(含或不含 G418)培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育不同时间。

1.4 免疫印迹分析

按《分子克隆实验指南》所载方法进行。用 1 \times SDS 加样缓冲液裂解细胞-收集细胞蛋白质,采用 Bradford 法进行蛋白定量,制备好的蛋白样品置-

70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。每泳道上样 10 μg (原代心肌细胞)或 30 μg (其它细胞)蛋白,经 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶(70 V 和 120 V 分别电泳 2 h 和 4 h)电泳后,电转膜至硝酸纤维素膜,先后加入鼠抗 HSP70 单抗,或兔抗核仁素,或羊抗 HSP70 多克隆抗体,及辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠或羊抗兔或兔抗羊 IgG 孵育,DAB 显色试剂盒进行显色(内标采用丽春红染色或检测 β -actin)。

1.5 免疫沉淀

按 Anderson 等^[11]方法进行。简述如下:pcDNA3.1-HSP70 RAW264.7 转基因细胞经 0.5 mmol/L H_2O_2 处理 1 h 后(对照不加过氧化氢),弃去培养基并用冷磷酸盐缓冲液洗涤细胞 3 次;甩干水后加入 4 mL 裂解缓冲液(150 mmol/L 氯化钠,1% NP40,0.5% 脱氧胆酸钠盐,0.1% 十二烷基磺酸钠,50 mmol/L Tris pH 8.0,完全蛋白酶抑制剂混合物),4 $^{\circ}\text{C}$ 轻微振荡裂解 5 min 后收集于 2 mL 灭菌离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 kr/min 离心 5 min,取上清,采用 Bradford 法进行蛋白定量;同时取适量蛋白 G 和蛋白 A,4 $^{\circ}\text{C}$ 10 kr/min 离心 1 min,弃上清,400 μL 裂解缓冲液洗涤 3 次后用适量裂解缓冲液重悬蛋白 G/A;随后将获得的细胞总蛋白质以 500 μg 分装于 1.5 mL 灭菌离心管中,并加入 25 μL 蛋白 G/A,封口膜包紧后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 磁力搅拌孵育过夜(约 10~12 h);4 $^{\circ}\text{C}$ 12 kr/min 离心 2 min,取上清置于另一 1.5 mL 灭菌离心管中,分别加入目标蛋白质相应的单克隆或多克隆抗体 2 μg ,蛋白 G/A 25 μL ,封口膜包紧后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 磁力搅拌孵育 4 h;4 $^{\circ}\text{C}$ 12 kr/min 离心 2 min,弃上清,适量裂解缓冲液洗涤沉淀 3 次后分别加入 20 μL 2 \times SDS,煮沸 5 min,12 kr/min 离心 2 min,取上清进行免疫印迹分析。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 判断为有统计学意义。

2 结果

2.1 热休克反应细胞和转基因细胞中热休克蛋白 70 的表达

经热休克反应(heat shock response, HSR)恢复 12 h 后,原代心肌细胞 HSP70 的表达显著增高, K562 细胞和 RAW264.7 细胞均有 HSP70 表达(图 1A, Figure 1A)。在构建的人 HSP70 基因的真核表达载体 pcDNA3.1-HSP70(系列鉴定结果未显示),随后采用脂质体转染技术将表达载体导入 RAW264.7 细胞并

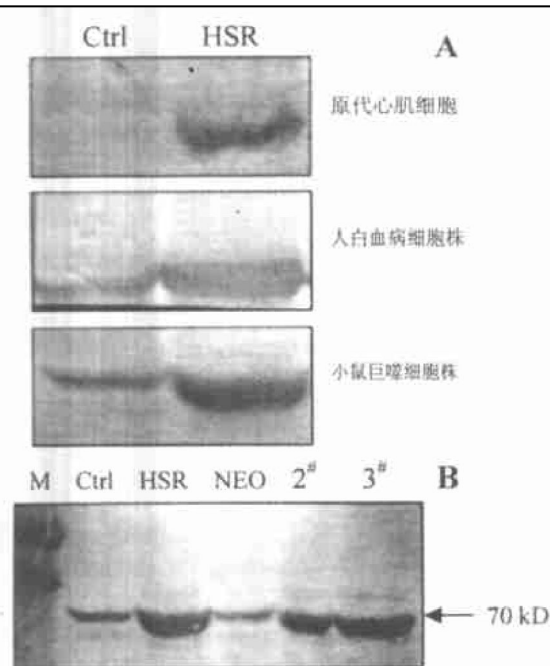


图 1. 热休克反应诱导热休克蛋白 70 在三种细胞 (A) 和 RAW264.7 细胞克隆 (B) 中的表达 Ctrl 为正常细胞, HSR 为经热应激处理恢复后的细胞, M 为分子标准, NEO 为转空载体细胞, 2[#] 和 3[#] 分别为两个转入 HSP70 的细胞克隆。

Figure 1. Western blot analysis demonstrating the effect of heat shock response on heat shock protein 70 expression in cardiomyocyte, K562, RAW264.7 (A), and HSP70-RAW264.7 (B)

经过 G418 多轮筛选后得到两个细胞克隆 (2[#], 3[#])。该两细胞克隆中 HSP70 表达均明显高于转空载体的细胞 (neo) 和正常细胞 (图 1B, Figure 1B)。

2.2 热休克反应影响 H₂O₂ 所致细胞核仁素断裂

免疫印迹发现, 未加 H₂O₂ 的对照组仅显示一条 110 kDa 的核仁素带, 0.5 mmol/L H₂O₂ 处理原代培养的新生大鼠心肌细胞 30 min, 用核仁素多克隆抗体可检测到另一条分子质量约为 80 kDa 的裂解带 (图 2A, Figure 2A), H₂O₂ 处理 3 h 和 6 h 最为明显, 此时 110 kDa 条带几乎消失, 而仅存 80 kDa 条带, 说明 0.5 mmol/L H₂O₂ 能够引起核仁素发生断裂。紧挨 110 kDa 条带处可见一条分子质量约为 105 kDa 显色较弱的条带, 其具体意义不太清楚, 可能为核仁素的去磷酸化形式。

为了证明氧化应激所致核仁素断裂并非心肌细胞的特有现象, 我们同时观察了氧化应激对 RAW264.7 巨噬细胞、K562 白血病细胞中核仁素的影响。RAW 巨噬细胞中核仁素断裂条带 (80 kDa) 出现几乎与原代心肌细胞同步, 氧化应激处理 12 h 最为明显 (图 2B, Figure 2B)。同样, K562 白血病细胞中也出现了较为明显的核仁素裂解片段 (图 2C, Figure 2C)。上述结果充分说明, 核仁素 80 kDa 裂解

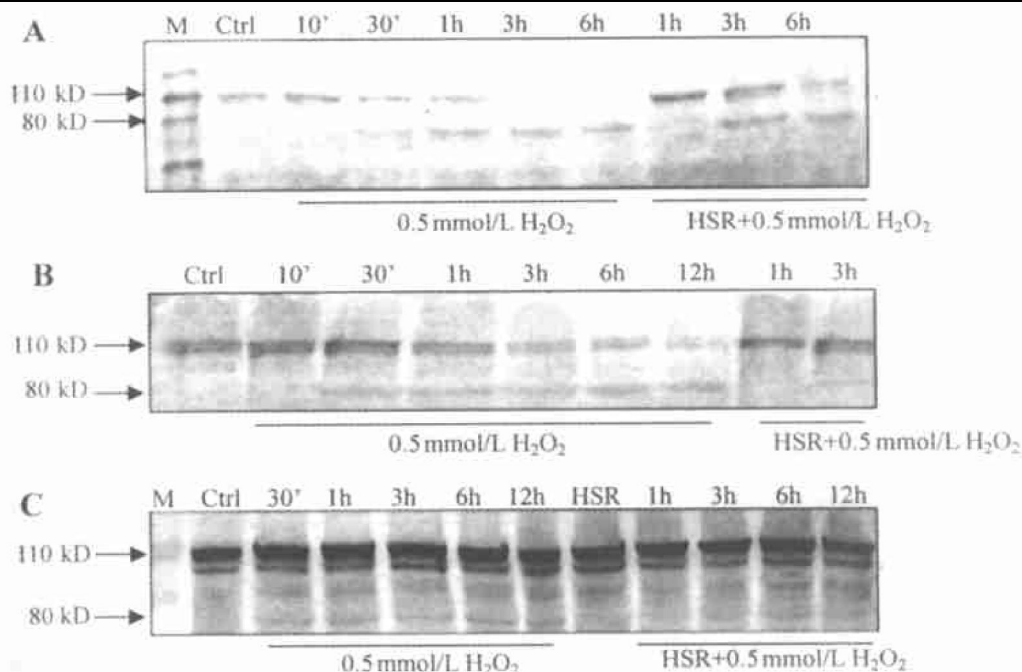


图 2. 热休克反应对 H₂O₂ 所致原代心肌细胞 (A)、RAW264.7 细胞 (B) 以及 K562 细胞 (C) 中核仁素裂解的抑制作用 M 为蛋白分子质量标准品, Ctrl 为正常生长细胞裂解物; HSR 为经 43 °C 热应激处理 1 h, 37 °C 恢复 12 h 后的细胞裂解物; 30'、1 h、3 h、6 h 和 12 h 分别表示直接用过氧化氢或细胞经热休克处理后再用过氧化氢处理 30 min、1 h、3 h、6 h 和 12 h 后收集的细胞裂解物。

Figure 2. Western blot analysis demonstrating the protective effect of heat shock response on cleavage of C23 induced by hydrogen peroxide in cardiomyocyte (A), RAW (B), and K562 (C)

片段的出现是各种细胞遭受氧化应激时发生的普遍现象。不管是原代心肌细胞、RAW264.7 巨噬细胞和 K562 白血病细胞, H_2O_2 损伤 1 h 均出现了明显的 80 kDa 蛋白条带。经热休克反应的细胞再次暴露于 H_2O_2 1 h, 该条带几乎都消失。暴露 3 h 才出现该条带, 灰度扫描定量分析提示 RAW264.7 细胞此时 80 kDa 条带的灰度为 H_2O_2 损伤组该带的 1/4; 在 K562 细胞中该带只有 H_2O_2 损伤组的 1/3。

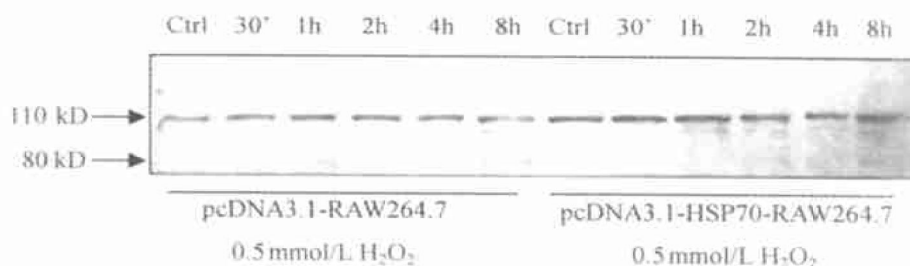


图 3. 热休克蛋白 70 对 H_2O_2 所致 RAW264.7 细胞中核仁素裂解的抑制作用 Ctrl 为正常生长细胞裂解物; 30 min、1 h、2 h、4 h 和 8 h 分别表示直接用过氧化氢处理转 pcDNA3.1-RAW264.7 和转人 HSP70 的 RAW264.7 细胞 30 min、1 h、2 h、4 h 和 8 h 后收集的细胞裂解物。

Figure 3. Heat shock protein 70 gene transfection inhibits cleavage of nucleolar protein C23 induced by hydrogen peroxide in RAW264.7 cell

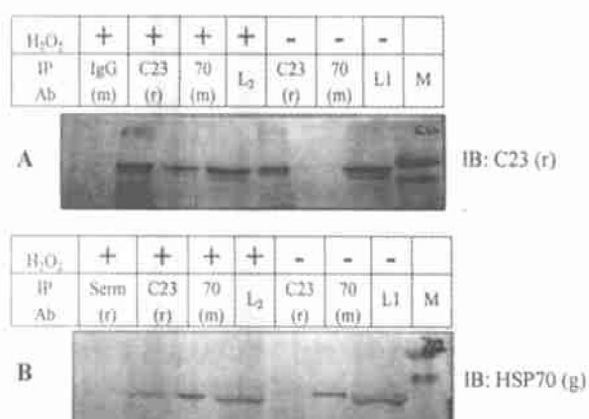


图 4. 采用免疫共沉淀和免疫印迹技术分析热休克蛋白 70 与核仁素之间的相互作用 M 为蛋白分子质量标准品; r 代表兔; m 代表小鼠; g 代表山羊; L1 为正常培养的转人 HSP70 基因的 RAW264.7 巨噬细胞裂解物; L2 为 H_2O_2 处理转人 HSP70 基因的 RAW264.7 巨噬细胞 1 h 的细胞裂解物; IP Ab 为免疫共沉淀所用抗体; IB 为免疫印迹; 70 代表热休克蛋白 70。

Figure 4. The interaction between heat shock protein 70 and C23 was detected by using immunoprecipitation (IP) and immunoblotting (IB) in transgenic cell (pcDNA3.1-HSP70-RAW264.7)

2.4 热休克蛋白 70 与核仁素之间的相互作用

免疫共沉淀技术分析发现, 未加 H_2O_2 时, 鼠抗 HSP70 单克隆抗体共沉淀产物中检测不到核仁素

2.3 热休克蛋白 70 影响 H_2O_2 所致核仁素断裂

采用免疫印迹技术检测 H_2O_2 处理后的转空载体和转 HSP70 基因的转基因细胞中核仁素的裂解。结果发现, 转空载体细胞在 H_2O_2 处理 1 h 就出现了较为明显的 80 kDa 裂解片段, 8 h 最为明显; 而转 HSP70 细胞在 H_2O_2 处理后 80 kDa 裂解片段出现较晚、较少(图 3, Figure 3)。

(图 4A, Figure 4A); 同样兔抗核仁素多克隆抗体共沉淀产物中也检测不到 HSP70 (图 4B, Figure 4B); 加入 H_2O_2 处理 1 h 后, 在鼠抗 HSP70 单克隆抗体共沉淀产物中则能检测到核仁素 (图 4A, Figure 4A), 同样兔抗核仁素多克隆抗体共沉淀产物中也能检测到 HSP70 (图 4B, Figure 4B)。此结果提示, 在氧化应激时, HSP70 与核仁素有相互结合。

3 讨论

目前认为, 细胞凋亡的发生主要是通过两条信号转导通路(死亡受体通路和线粒体信号通路)的激活, 引起天冬氨酸蛋白酶 (Caspase-3) 活化所致^[12]。本室以往的研究亦证明 0.5 mmol/L H_2O_2 可以导致原代心肌细胞及 C2C12 肌源细胞发生凋亡^[6,7]。

核仁素(nucleolin)作为一种定位于核仁的磷酸蛋白, 是目前发现的 271 种核仁蛋白质中含量最多的, 约占核仁蛋白总量的 10%^[3,13,14]。其功能涉及核糖体的生物合成、细胞增殖、生长、胚胎发生、胞质分裂、染色质复制与核仁的发生等过程的调控。有研究表明, T 淋巴细胞介导的细胞凋亡中^[5], T 细胞和自然杀伤细胞通过分泌穿孔素(perforin)和丝氨酸蛋白酶将靶细胞打孔, 使颗粒酶 A(granzyme A)更容易接近核仁素, 从而激活其自身降解过程。断裂的

核仁素则可以直接激活核酸内切酶,使 DNA 发生断裂。Kito 等^[4]证实诱导的 saos-2 和 MG63 细胞凋亡与核仁素的断裂及其表达下调有关。氧化应激诱导的细胞凋亡是否也伴随核仁素的裂解呢?我们采用免疫印迹技术检测了多种细胞中核仁素的动态变化,结果发现氧化应激引起细胞凋亡时也导致了原代心肌细胞、RAW264.7 巨噬细胞和 K562 白血病细胞中核仁素裂解,提示在氧化应激诱导的细胞凋亡中核仁素裂解是一种较为普遍的现象。尽管并无证据阐明核仁素的裂解与细胞凋亡之间的关系,但仍难回答核仁素的裂解仅仅是细胞凋亡的一种伴随现象抑或促进/引起了细胞凋亡的发生。

热休克反应对细胞损伤具有保护作用已得到公认,我室以往的工作亦充分证明了这一结论^[6,8,10]。本研究证明热休克反应能抑制 H₂O₂ 所致的核仁素的裂解。热休克反应减轻细胞损伤的分子机理与其可以诱导多种应激蛋白质包括热休克蛋白家族、过氧化物酶,以及 Cu²⁺-Zn²⁺-SOD 等表达上调有关,其中最主要的是热休克蛋白家族^[15]。

热休克蛋白大多为分子伴侣,其主要作用是与新生、未折叠、错折叠或聚集的蛋白质相结合,使某些蛋白质解离,减少产生不溶性聚集物的危险性,并帮助需要折叠的蛋白正确折叠;维持某些肽链的伸展状态,以利于其跨膜转运,在线粒体、内质网等不同区域内发挥作用;同时还能促进某些变性蛋白的降解和清除;维持酶的动力学特征,以维护细胞功能^[15,16]。HSP70 是 HSP 超家族中诱导表达增加最多的成员之一^[9],我们采用反义技术已证实 HSP70 在减轻心肌细胞损伤中发挥了最重要的作用^[10]。本研究仍试图探讨 HSP70 是否能抑制氧化应激所致细胞核仁素的裂解,因此我们构建了人 HSP70 的真核表达载体 pcDNA3.1-HSP70,并将其导入 RAW264.7 巨噬细胞构建了稳定表达人 HSP70 的转基因细胞株。在确认该克隆细胞中有 HSP70 蛋白的过表达后,发现用 H₂O₂ 处理时核仁素裂解的发生比转空载体的细胞要轻和晚,结果提示 HSP70 能显著抑制氧化应激所致细胞核仁素的裂解。为了阐明 HSP70 抑制氧化应激所致细胞核仁素的裂解的分子机理,我们进一步采用免疫共沉淀技术检测了核仁素与

HSP70 之间的关系。结果显示没有 H₂O₂ 时 HSP70 与核仁素并无相互作用,而当存在有 H₂O₂ 时 HSP70 与核仁素结合形成蛋白质复合体。HSP70 可能通过其分子伴侣作用抑制氧化应激所致的核仁素裂解。

尽管本研究已提供了核仁素与 HSP70 相互作用的证据,但其相互结合的结构域或位点是什么,二者为直接结合或间接结合等目前仍不清楚。另外,核仁素裂解在细胞凋亡中的作用以及核仁素裂解的位点也都有待进一步研究确认。

[参考文献]

- [1] Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal*, 1999, **11** (2): 77-85
- [2] Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, Datta AG. Oxidative stress induced ischemic heart disease: protection by antioxidants. *Curr Med Chem*, 2004, **11** (3): 369-387
- [3] Srivastava M, Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J*, 1999, **13** (14): 1 911-922
- [4] Kito S, Shimizu K, Okamura H, Yoshida K, Morimoto H, Fujita M, et al. Cleavage of nucleolin and argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins in apoptosis-induced cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **300** (4): 950-956
- [5] Pasternack MS, Bleier KJ, McInerney TN. Granzyme A binding to target cell proteins. Granzyme A binds to and cleaves nucleolin in vitro. *J Biol Chem*, 1991, **266** (22): 14 703-708
- [6] 蒋碧梅,肖卫民,石永忠,刘梅冬,唐道林,夏珂,等. Smac/DIABLO 在过氧化氢所致 C2C12 肌原细胞凋亡中的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (6): 923-929
- [7] 肖卫民,蒋碧梅,石永忠,刘梅冬,唐道林,夏珂,等. 从凋亡信号通路探讨热休克蛋白保护过氧化氢所致心肌细胞凋亡的机制. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 283-286
- [8] 肖献忠. 心血管源性保护的分子机制研究. *中国病理生理杂志*, 2002, **18** (13): 1 660-662
- [9] Sarto C, Binz PA, Mocarelli P. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1 218-226
- [10] 王慷慨, DENG Gong-hua, TU Zr-zhi, YI Yr-xin, WANG Hao, LIU Ke, et al. Study of effect of HSP70 on acute injury of cardiomyocyte induced by hydrogen peroxide using antisense oligonucleotides. *中国现代医学杂志*, 2004, **14** (1): 12-16
- [11] Anderson NG. Co-immunoprecipitation. Identification of interacting proteins. *Methods Mol Biol*, 1998, **88** (1): 35-45
- [12] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001, **411** (6835): 342-348
- [13] Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*, 2002, **12** (1): 1-11
- [14] Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci*, 1999, **112** (Pt6): 761-772
- [15] Kregel KC. Molecular biology of thermoregulation invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, 2002, **92** (5): 2 177-186
- [16] Xianzhong Xiao, Ivor J Benjamin. Stress-response proteins in cardiovascular disease. *Am J Hum Genet*, 1999, **64** (3): 685-690

(此文编辑 胡必利)