

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01344

腺病毒介导的 HSP70 基因转染对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用

虞卫¹, 严煜², 张裕东², 倪庆^{1*}

1. 扬州市第一人民医院普通外科, 扬州 225200
2. 南通大学附属医院心胸外科, 南通 226001

[摘要] **目的:** 研究热休克蛋白 70(HSP70)基因转染对体外培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。**方法:** 体外原代培养乳鼠心肌细胞,以携带增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因的腺病毒载体(Ad. EGFP)按不同感染倍数(MOI)感染体外心肌细胞,通过荧光显微镜、流式细胞仪观察所构建腺病毒的感染力和安全性;应用含有人 HSP70 基因的重组腺病毒(Ad. HSP70)进行体外感染,采用 ELISA 法、Western 印迹法及免疫组化染色法检测 HSP70 基因在心肌细胞中的表达情况。利用体外心肌细胞缺氧/复氧损伤模型,研究 HSP70 基因转染对心肌细胞的保护作用。**结果:** 原代培养获得高纯度的乳鼠心肌细胞,随着 MOI 值升高,Ad. EGFP 的感染效率和基因表达增强,在 MOI 值为 50 时,Ad. EGFP 感染心肌细胞的效率高于 90%,在 MOI 值为 200 时,未见心肌细胞的生长明显受抑;ELISA 法、Western 印迹法证实转染的心肌细胞在正常生理状态下,可高水平表达 HSP70。免疫组化染色法结果显示,表达的 HSP70 主要分布于心肌细胞的胞质和胞核中;利用体外的缺氧/复氧损伤模拟在体的缺血/再灌注损伤,结果显示 Ad. HSP70 感染组的细胞活力、MTT 代谢率、细胞凋亡率、心肌酶谱的变化等指标均优于对照组($P < 0.05$)。**结论:** 重组腺病毒 Ad. HSP70 能够在体外高效、安全地感染心肌细胞,并成功表达 HSP70;HSP70 高表达对体外培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤具有显著的保护作用。

[关键词] 热休克蛋白 70;基因转染;心肌细胞;腺病毒载体;缺氧/复氧损伤

[中图分类号] R 654.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)12-1344-05

Protective effect of adenovirus-mediated heat shock protein 70 gene transfection against hypoxia/reoxygenation injury of cultured neonatal rat myocardiocytes

YU Wei¹, YAN Yu², ZHANG Yu-dong², NI Qing^{1*}

1. Department of General Surgery, The First People's Hospital of Yangzhou, Yangzhou 225200, China
2. Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001

[ABSTRACT] **Objective:** To study the protective effect of adenovirus-mediated heat shock protein 70 (HSP70) gene transfection against hypoxia/reoxygenation injury of cultured neonatal rat myocardiocytes. **Methods:** The neonatal rat cardiomyocytes were isolated, cultured, and transfected with Ad. EGFP. The transfection efficiency and safety were examined at various titrations by fluorescence microscope and flow cytometer. The cultured cardiomyocytes were then infected with adenovirus vector harboring HSP70 cDNA. Protein expression of HSP70 was evaluated by ELISA, Western blotting analysis and immunohistochemical methods. The cytoprotective effect of adenovirus-mediated HSP70 gene transfection was studied using *in vitro* myocardiocyte hypoxia/reoxygenation model. **Results:** High purity neonatal rat cardiomyocytes were obtained by primary culture. The infection efficiency and the EGFP expression increased with the increase of MOI. Over 90% of myocardiocytes were infected at MOI 50. The growth of myocardiocytes was not inhibited at MOI 200. ELISA and Western blotting analysis showed that the transfected myocardiocytes overexpressed HSP70 under normal physiological condition. Immunohistochemical analysis showed prominent overexpression of HSP70 in the cytoplasm and nuclei in HSP70 transfection group. Results of hypoxia/reoxygenation injury model showed that the cell vitality, MTT metabolism, cell apoptosis rate, and changes of myocardial enzyme spectrum were significantly improved in the gene transfection group compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Recombinant Ad. HSP70 can efficiently and safely infect myocardiocytes *in vitro*, leading to expression of HSP70 protein. Overexpression of HSP70 induced by adenovirus-mediated transfection has prominent protective effect against hypoxia/

[收稿日期] 2009-07-19 **[接受日期]** 2009-08-31

[基金项目] 南通大学创新基金. Supported by Innovation Fund of Nantong University.

[作者简介] 虞卫, 硕士, 主治医师. E-mail: yuweidoctor@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0514-87907450, E-mail: nxz_tjj@yangzhou.gov.cn

reoxxygenation injury of neonatal rat myocardiocytes.

[KEY WORDS] heat shock protein 70; gene transfection; myocardiocyte; adenovirus vector; hypoxia/reoxxygenation injury
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(12):1344-1348]

热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)可以在包括心肌细胞在内的多种细胞中表达。研究证实,热休克反应中,心肌细胞 HSP70 基因的转录水平升高, HSP70 表达增多,同时伴心肌抗缺血能力提高^[1-2],而且诱导的 HSP70 表达量与保护作用的强弱正相关^[3]。因此,如何安全高效地诱导 HSP70 的表达以保护心肌具有非常重要的意义。

应用质粒作为 HSP70 的基因载体可进行心肌细胞转染^[4],但是由于质粒的心肌转染效率较低,必须大量导入,易引起毒性反应。而腺病毒载体具有宿主范围广,包装容量大,对靶细胞的感染性高且病原性低,易纯化,致癌、致突变概率小等优点,在基因治疗中被认为是理想的基因转移载体^[5-6]。本研究利用含人 HSP70 基因的重组腺病毒(Ad. HSP70)感染体外培养的乳鼠心肌细胞,并制作缺氧/复氧损伤模型以复制临床实践中心肌的缺血/再灌注损伤情况,以此观察 HSP70 对心肌细胞的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 新生 SD 乳鼠(第二军医大学实验动物中心),参照 Simpson^[7-8]报道的方法进行新生 SD 乳鼠心肌细胞的分离、培养、纯度鉴定以及活力测定。Ad. HSP70 及 Ad. EGFP 由本课题组自行构建。

1.2 重组腺病毒载体的感染力及安全性检测 采用与 Ad. HSP70 同步构建的 Ad. EGFP 感染乳鼠心肌细胞,应用荧光显微镜(IX70, Olympus 公司)和流式细胞仪(FACSCalibur, 德国 Becton 公司)检测实验中所使用的重组腺病毒对心肌细胞的感染力及感染效率,观察心肌细胞的生长状态。

1.3 Ad. HSP70 感染细胞后 HSP70 的表达测定

1.3.1 ELISA 和蛋白质印迹法检测 HSP70 的表达

原代培养的心肌细胞培养于 6 孔培养板及 35 mm 培养皿内,调节培养板每孔的细胞数量为 1.5×10^5 ,培养皿内的细胞数为 1.5×10^6 ,培养 3 d 心肌细胞生长状态良好时,吸除上清液,0.1 mol/L PBS 漂洗 2 次,按 MOI 值 20 : 1 加入纯化的 Ad. HSP70 和 Ad. EGFP,体积以 PBS 补至覆盖底面,对照组仅加入 0.1 mol/L PBS。感染 1 h 后,弃上清液,每孔加 5% FBS IMDM 培养液,5% CO₂、37℃ 条件下培养。于感染后的第 1、2、3、5 和 7 天收集培养液,离心后, -80℃ 保存,留待 ELISA(丹麦 Dako 公司)检测,收集前 24 h 更

换培养液。感染的细胞中 HSP70 含量的测定采用 Western 印迹法(一抗鼠抗人 HSP70 单抗以及二抗羊抗小鼠单抗均购自美国 Stressgen 公司)。

1.3.2 免疫组化方法检测 HSP70 的表达 乳鼠心肌细胞经分次消化分离后,制成细胞悬液,在 6 孔板内放入无菌盖玻片,将细胞接种在盖玻片上爬片,加入 5% FBS 的 IMDM,置于 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 孵育,72 h 后,心肌细胞生长状态良好时,吸除上清液,0.1 mol/L PBS 漂洗 2 次,按 MOI 值 20 : 1 加入纯化的 Ad. HSP70 和 Ad. EGFP,体积以 PBS 补至覆盖底面,对照组仅加入 0.1 mol/L PBS。感染 1 h 后,弃上清液,每孔加 5% FBS IMDM 培养液,5% CO₂、37℃ 条件下培养 3 d,按以下步骤做免疫组化染色:盖玻片上培养的细胞,用多聚甲醛室温固定 20~30 min→PBS 振荡清洗 3 次,10 min/次→加一抗(鼠抗人 HSP70 单抗),4℃ 过夜→PBS 振荡清洗 3 次,10 min/次加入→标记有 HR 的二抗 100 μl,37℃,孵育 30 min→PBS 振荡清洗 3 次,10 min/次→加入 DAB 底物,在显微镜下观察呈色反应,待显色适度彻底清洗后,加入苏木精衬染 1 min→彻底清洗后,盐酸分化 1 s,50℃ 温水返蓝 30 min→95% 乙醇脱水,电吹风吹干后,中性树脂封片。

1.4 心肌细胞缺氧/复氧模型的制备及重组腺病毒载体的治疗效果

1.4.1 心肌细胞缺氧/复氧模型的制备 参照 Webster 等^[9]方法,培养的心肌细胞生长接近融合状态时,弃去培养液,加入预先用高纯氮气(N₂ 95% 以上)饱和 40 min 的 D-Hank's 液(无糖)5 ml,并向培养瓶中充入高纯氮气(99.99%),置换培养瓶中的空气,然后用胶塞密闭瓶口,测血气 PO₂ ≤ 4.0 kPa,即成缺氧模型;细胞于缺氧环境中孵育 2 h,倾弃 D-Hank's 液,换以预先用纯氧(O₂ 95% 以上)饱和的 Hank's 液(含糖)5 ml,开放培养瓶瓶口,放入 CO₂ 孵箱(5% CO₂, 95% 空气),继续培养 6 h,即为复氧模型。

1.4.2 实验分组 原代培养的心肌细胞培养于培养瓶内,调节每个瓶的细胞数达到一致。培养 3 d 后,按实验设计要求分成损伤组、Ad. HSP70 感染组、正常对照组。(1)损伤组:培养的心肌细胞生长接近融合状态时,按照上述方法造成缺氧/复氧损伤;(2) Ad. HSP70 感染组:进行 Ad. HSP70 感染,感染 3 d 后采用上述同样方法造成缺氧/复氧损伤;

(3)正常对照组;实验时倒去培养液,用D-Hank's液清洗细胞2次,加入D-Hank's液,5%CO₂培养箱中37℃孵育。

1.4.3 观测指标 对各组细胞观测下述几项指标:(1)对心肌细胞搏动功能和形态的观察;(2)缺氧/复氧后心肌细胞活力的测定;(3)MTT代谢率测定;(4)心肌酶谱的测定;(5)心肌细胞凋亡的流式细胞仪测定;(6)透射电镜标本制备与细胞超微结构观察。

1.5 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用Stata 7.0软件进行统计学处理,采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 心肌细胞培养 分离纯化的心肌细胞接种后2h即开始贴壁生长。培养24h后,大部分贴壁生长。接种培养后12h即有贴壁的心肌细胞自发地收缩、搏动;48h后用 α -肌动蛋白单克隆抗体进行免疫组化鉴定,心肌细胞纯度>90%,细胞活力约为94%~96%。

2.2 重组腺病毒对心肌细胞的感染力及感染效率检测 应用同步构建的Ad. EGFP感染心肌细胞10~12h后,荧光显微镜下开始出现绿色荧光,感染后48~72h荧光强度最强,感染后7~8d逐渐衰减;随着MOI的增加,染色阳性率亦增加;MOI值为20时,荧光阳性率为65.7%(图1);MOI值为50时,荧光阳性率为96.5%;MOI值为200时荧光阳性率接近100%,但心肌细胞的生长并无明显抑制,而PBS对照组均未见有荧光表达。说明我们使用的重组腺病毒目的基因能有效地表达于乳鼠的心肌细胞,且体外感染效率高。用流式细胞仪检测Ad. EGFP转染心肌细胞后荧光细胞的阳性率,其结果与荧光显微镜下计数基本一致。

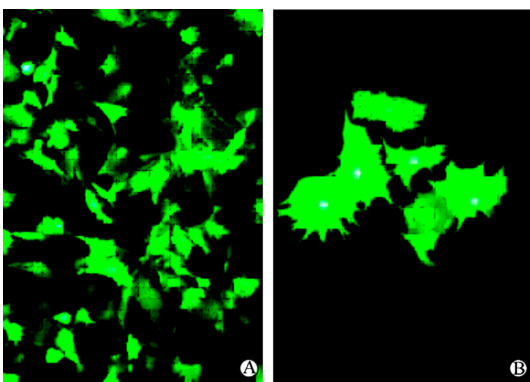


图1 转染Ad. EGFP的心肌细胞

Fig 1 Cardiomyocytes infected with Ad. EGFP MOI=20. Original magnification: $\times 200$ (A), $\times 400$ (B)

2.3 Ad. HSP70转染心肌细胞后HSP70的表达情况

2.3.1 ELISA法检测结果 Ad. HSP70感染组在转染后第1天即开始分泌HSP70[(10.8 \pm 0.17)ng/ml],第2、3天时分泌量达高峰[(84.6 \pm 0.57)、(90.4 \pm 0.12)ng/ml],随后逐渐降低,第5天为(37.5 \pm 0.41)ng/ml,第7天时培养上清中仍可检测到HSP70的存在[(12.2 \pm 0.29)ng/ml]。而Ad. EGFP组和PBS组的培养上清液中始终未检测到HSP70。

2.3.2 蛋白质印迹结果 如图2所示,正常心肌细胞及感染Ad. EGFP的心肌细胞中仅有少量HSP70表达,而转染了Ad. HSP70的心肌细胞内HSP70呈高表达。

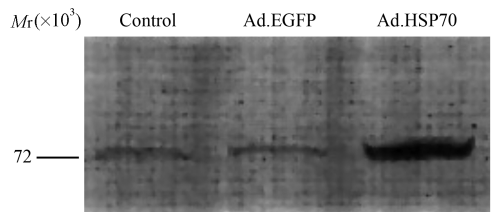


图2 蛋白质印迹检测HSP70蛋白表达结果

Fig 2 Western blotting results of HSP70 protein

2.3.3 免疫组化结果 免疫组化染色结果显示,感染Ad. HSP70的心肌细胞中HSP70阳性表达,主要分布于胞质、胞核(图3A);而Ad. EGFP组及PBS组HSP70蛋白表达阴性(图3B、3C)。

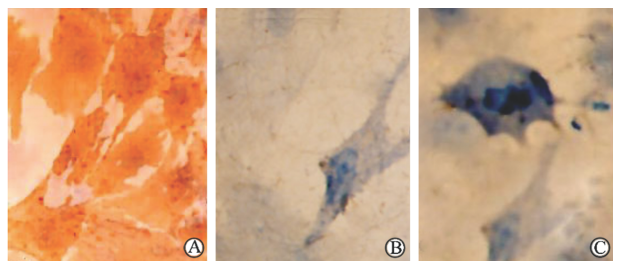


图3 心肌细胞HSP70免疫组化染色

Fig 3 Immunohistochemistry staining of HSP70 in cardiomyocytes A: Ad. HSP70 group; B: Ad. EGFP group; C: PBS group. Original magnification: $\times 400$

2.4 HSP70对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用

2.4.1 HSP70对心肌细胞的形态及搏动功能的影响 培养的正常心肌细胞呈梭形或不规则三角形,有伪足,核呈卵圆形并居中,搏动规则,频率为80~120次/min,缺氧/复氧损伤后,心肌细胞皱缩变圆,伪足减少,大多搏动停止,Ad. HSP70实验组心肌细胞的形态变化明显小于损伤组,且生长较好。

2.4.2 HSP70对细胞存活率的影响 缺氧/复氧损

伤组细胞存活率低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 Ad. HSP70 感染组细胞生长相对

良好, 虽较正常对照组细胞存活率低 ($P < 0.05$), 但高于损伤组 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 各组心肌细胞的存活率、MTT 代谢率、细胞凋亡率、心肌细胞酶谱的比较

Tab 1 Comparison of cardiomyocyte survival rate, metabolic rate of MTT, apoptotic rate and myocardial enzymes in each group

($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	Vitality(%)	MTT(D_{490})	Apoptotic rate (%)	Cardiac enzymes $\bar{x} \pm s$ / (IU · L ⁻¹)		
				LDH	CPK	α -HBDH
Control	94.95 ± 1.89	0.097 0 ± 0.022 1	8.1 ± 0.41	16.37 ± 0.51	1.00 ± 0.00	22.62 ± 2.26
Injury	55.88 ± 5.67*	0.048 6 ± 0.007 7*	34.2 ± 1.72*	39.12 ± 4.61*	27.75 ± 6.52*	59.00 ± 1.31*
Ad. HSP70	69.00 ± 4.19* [△]	0.068 2 ± 0.007 6* [△]	14.4 ± 0.81* [△]	25.25 ± 3.01* [△]	19.25 ± 1.38* [△]	35.00 ± 6.00* [△]

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs injury group

2.4.3 HSP70 对 MTT 代谢率的影响 缺氧/复氧造成心肌细胞损伤, 使其 MTT 代谢率降低, 损伤组与正常对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Ad. HSP70 感染组的 MTT 代谢率虽然较正常对照组有所下降, 但仍然高于损伤组 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.4.4 各组心肌细胞凋亡率的变化 流式细胞术对各组细胞的凋亡率进行测定, 发现低于 G₁ 期的亚二倍体细胞 (即凋亡细胞) 在损伤组有较高的发生率, 明显高于其他两组; Ad. HSP70 感染组虽然也有一定的细胞凋亡率, 但明显低于损伤组 ($P < 0.05$), 而正常对照组基本无细胞凋亡 (表 1)。

2.4.5 HSP70 对缺氧/复氧损伤的心肌细胞酶谱的影响 缺氧/复氧损伤后心肌细胞上清液中 LDH、CPK、 α -HBDH 的含量均较对照组高 ($P < 0.05$),

Ad. HSP70 感染组的心肌酶谱虽较正常对照组高 ($P < 0.05$), 但上清液中 LDH、CPK、 α -HBDH 的含量均较损伤组低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.4.6 电镜观察 电镜下可以见到, 正常组心肌细胞的超微结构清晰, 线粒体嵴排列规则, 异染色质均匀 (图 4A); 损伤组许多细胞表现为细胞凋亡的形态, 如胞质浓缩、胞膜起泡、核异染色质浓集于周边, 细胞器相对完整, 可见到凋亡小体形成, 同时有较多的肌原纤维结构不清, 部分溶解, 线粒体分布紊乱, 明显的肿胀, 大小不一, 少数有破裂 (图 4B); 而 Ad. HSP70 组的心肌细胞肌原纤维结构尚清楚, 线粒体均匀分布在肌原纤维之间, 仅出现轻至中度的肿胀 (图 4C)。

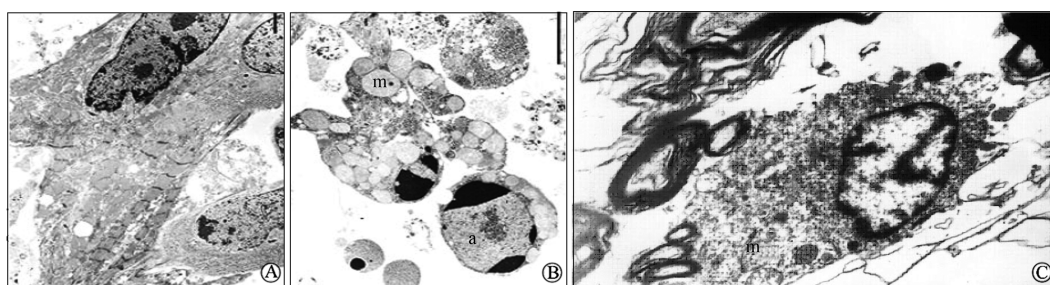


图 4 各组心肌细胞电镜下观察

Fig 4 Electron microscopic images of cardiomyocytes in each group

A: Control group; B: Injury group; C: Ad. HSP70 group. a: Apoptotic body; m: Mitochondrion. Original magnification: $\times 10\ 000$

3 讨论

热休克蛋白广泛存在于原核和真核细胞内。正常生理状态下, 如细胞的增殖、分化, 胚胎的生长、发育, 激素的刺激等, 热休克蛋白呈现基础性表达, 其含量仅占总蛋白的 5%~10%。但在应激条件下, 热休克蛋白的表达会明显增加, 而且会发生移位, 即从细胞质转移至细胞核。在热休克蛋白家族中, 相对分子质量为 70 000 的 HSP 家族在正常的细胞表达较低,

应激状态下可显著升高, 因而其成为 HSP 家族中最受关注、研究得最为深入的一个家族。

大量的研究表明, HSP70 对心肌缺血/再灌注过程中的保护作用主要表现在以下几个方面: (1) 作为分子伴侣, 参与蛋白质分子的正确折叠, 维持其天然构象; 参与蛋白质的转运; 协助变性蛋白的降解; 此外还能有效地干扰氧自由基对心肌的损害等^[10-11]。(2) HSP70 可以使细胞抗氧自由基酶活性和合成增加, 还可作为“分子伴侣”保护细胞内的抗

氧自由基酶免受损伤,从而达到清除自由基的抗氧化作用^[12]。(3)HSP70在心肌保护过程中不仅起到分子伴侣的作用,保护心肌细胞抗损伤及促进功能恢复,还可减轻缺氧复氧后的内皮损伤^[13]。(4)HSP70的抗凋亡作用,目前的研究已发现如下可能相关的机制:①HSP70通过结合并抑制应激活化蛋白激酶 JNK(较早存在于应激诱导的凋亡信号通路中的成分)的活性,从而抑制 JNK 介导的凋亡^[14];②HSP70可抑制热应激所致的细胞色素 C 从线粒体的释放,并能与凋亡蛋白酶活化因子 1(apoptotic protease activating factor 1, Apaf 1)的 Caspase 募集结构域直接结合,抑制凋亡蛋白酶活化因子 1 的寡聚化及 Caspase-9 的活化。HSP70 还可与线粒体释放的凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)直接结合,抑制其介导的 Caspase 非依赖性细胞凋亡^[15-16];③抗细胞凋亡的多功能蛋白(BAG-1)为热休克同源蛋白 70(HSC70)及 HSP70 的 ATP-ADP 循环的核苷酸转换因子,通过调节 HSP70 的伴侣活性来获得抗凋亡功能等。(5)HSP70 还可以通过抑制 NF- κ B 来下调促炎因子的表达,此外,它还可以直接调控炎症反应时 TNF- α 的表达等^[17]。

本实验以腺病毒为载体,将 HSP70 基因转入体外培养的心肌细胞,实验证明,转染后的心肌细胞可以高水平表达 HSP70。在随后建立的心肌细胞的缺氧/复氧损伤模型中,Ad. HSP70 感染组在形态学的改变、细胞存活率、心肌酶谱的测定、细胞的凋亡率、细胞的超微结构的改变等方面都较损伤组有明显改善,说明利用基因的转染技术使心肌细胞内源性 HSP70 表达增高,在缺氧/复氧过程中可以起到较好的保护作用。

综上所述,本研究利用腺病毒介导的 HSP70 的基因转染技术无需应激刺激、无应激损伤,表达稳定,对心肌细胞无不良作用,保护作用较好,为心肌的缺血/再灌注损伤的保护措施提供了一条新的思路。

[参考文献]

- [1] Pan Y X, Ren A J, Zheng J, Rong W F, Chen H, Yan X H, et al. Delayed cytoprotection induced by hypoxic preconditioning in cultured neonatal rat cardiomyocytes: role of GRP78[J]. *Life Sci*, 2007, 81: 1042-1049.
- [2] Guisasaola M C, Desco Mdel M, Gonzalez F S, Asensio F, Dulin E, Suarez A, et al. Heat shock proteins, end effectors of myocardium ischemic preconditioning[J]? *Cell Stress Chaperones*, 2006, 11: 250-258.
- [3] He M, Guo H, Yang X, Zhang X, Zhou L, Cheng L, et al. Functional SNPs in HSPA1A gene predict risk of coronary heart disease[J]. *PLoS One*, 2009, 4: e4851.
- [4] 杜亮,郭兰敏,劳萍,王春霞,胡海燕. HSP70 基因转染对人心肌细胞的保护作用[J]. *山东大学学报:医学版*, 2000, 38: 179-181.
- [5] Jones J M, Koch W J. Gene therapy approaches to cardiovascular disease[J]. *Methods Mol Med*, 2005, 112: 15-35.
- [6] Hammond H K, McKirnan M D. Angiogenic gene therapy for heart disease: a review of animal studies and clinical trials[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 49: 561-567.
- [7] Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response[J]. *J Clin Invest*, 1983, 72: 732-738.
- [8] Simpson P. Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating[J]. *Circ Res*, 1985, 56: 884-894.
- [9] Webster K A, Discher D J, Bishopric N H. Cardioprotection in an *in vitro* model of hypoxic preconditioning[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27: 453-458.
- [10] Williamson C L, Dabkowski E R, Dillmann W H, Hollander J M. Mitochondria protection from hypoxia/reoxygenation injury with mitochondria heat shock protein 70 overexpression [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294: H249-H256.
- [11] Baljinnyam E, Hasebe N, Morihira M, Sumitomo K, Matsusaka T, Fujino T, et al. Oral pretreatment with ebselen enhances heat shock protein 72 expression and reduces myocardial infarct size[J]. *Hypertens Res*, 2006, 29: 905-913.
- [12] Suzuki K, Murtuza B, Sammut I A, Latif N, Jayakumar J, Smolenski R T, et al. Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction[J]. *Circulation*, 2002, 106 (12 Suppl 1): I 270- I 276.
- [13] Zhang S, Zhang P, Guo J, Jia Z, Ma K, Liu Y, et al. Enhanced cytoprotection and angiogenesis by bone marrow cell transplantation may contribute to improved ischemic myocardial function [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 25: 188-195.
- [14] Kaljusto M L, Stenslökken K O, Mori T, Panchenko A, Frantzen M L, Valen G, et al. Preconditioning effects of steroids and hyperoxia on cardiac ischemia-reperfusion injury and vascular reactivity[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2008, 33: 355-363.
- [15] Siu P M, Bryner R W, Martyn J K, Alway S E. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles [J]. *FASEB J*, 2004, 18: 1150-1152.
- [16] Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin S A, Maise C, Daugas E, Zamzami N, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 839-843.
- [17] Nakabe N, Kokura S, Shimozawa M, Katada K, Sakamoto N, Ishikawa T, et al. Hyperthermia attenuates TNF-alpha-induced up regulation of endothelial cell adhesion molecules in human arterial endothelial cells[J]. *Int J Hyperthermia*, 2007, 23: 217-224.