

低强度运动对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡的保护作用*

金 怡^{1,2} 江钟立^{1,4} 招少枫³ 吴雏燕¹

摘要 目的:探讨不同强度的运动对 2 型糖尿病大鼠热休克蛋白 72(HSP72)基因的表达和心肌凋亡的影响。**方法:**雄性 SD 大鼠 36 只,分成糖尿病组(DFM)和对照组(CFM)。糖尿病造模成功后随机分成糖尿病非运动组(DRN),糖尿病高强度运动组(DRH),糖尿病低强度运动组(DRL);对照组分正常大鼠非运动组(CRN),正常大鼠高强度运动组(CRH),正常大鼠低强度运动组(CRL)。采用活动平板耐力运动 8 周,检测大鼠心肌 HSP72 基因表达以及 TUNEL 染色观察。**结果:**糖尿病大鼠心肌 HSP72 基因表达均显著低于正常大鼠,其中 CRL 组和 DRL 组显著高于 CRN 组和 DRN 组,而 CRH 组和 DRH 组显著低于 CRN 组和 DRN 组。DRN 组和 DRH 组心肌凋亡指数(AI)显著高于 CRN 组和 CRL 组,DRL 组心肌 AI 显著高于 CRL 组。Pearson 相关分析显示,在 DRN 组与 DRL 组 HSP72 mRNA 与心肌 AI 呈显著负相关($P<0.05$),而在 DRN 组与 DRH 组 HSP72 mRNA 与心肌 AI 无相关性。**结论:**低强度运动可以增加 HSP72 基因的表达,抑制糖尿病大鼠的心肌凋亡率,对糖尿病心肌病变具有保护作用。

关键词 运动; 2 型糖尿病; 细胞凋亡; 热休克蛋白

中图分类号: R587.3.1, R493 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2009)-01-0015-05

Protective effects of low-intensity exercises on myocardial apoptosis in diabetics rats/JIN Yi, JIANG Zhongli, ZHAO Shaofeng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(1):15-19

Abstract Objective: To investigate the effects of different intensity exercises on the expression of HSP72 mRNA and myocardial apoptosis in type 2 diabetic rats. **Method:** Thirty-six male Sprague-Dawley rats were divided into diabetic rats (DFM, $n=18$) and control rats (CFM, $n=18$). The diabetic rats were randomly sub-divided into non-exercises group (DRN), high-exercises group (DRH) and low-exercises group (DRL). The control rats were randomly sub-divided into non-exercises group (CRN), high-exercises group (CRH) and low-exercises group (CRL). The rats with exercises training were forced to run on treadmill for 8 weeks. The expression of HSP72 mRNA in cardiac muscle were determined with RT-PCR and myocardial apoptosis were observed with Tunel staining. **Result:** The expression of HSP72 mRNA of cardiac muscle in diabetic rats were significant lower than that in control rats. The expression of HSP72 mRNA in CRL and DRL groups were significantly higher than that in CRN and DRN groups. The expression of HSP72 mRNA in CRH and DRH groups were significantly lower than that in CRN and DRN groups. Apoptosis index (AI) of cardiac muscles in DRN and DRH groups were significantly higher than that in CRN and CRL groups. Myocardial AI in DRL groups was significantly higher than that in CRL groups. There was significantly negative correlation between expression of HSP72 mRNA and AI of cardiac muscles in DRL and DRN groups ($P<0.05$), which was not observed in DRH and DRN groups. **Conclusion:** Low-intensity exercises can increase expression of HSP72 mRNA and inhibit apoptosis rate of cardiac muscles in diabetic rats, which play an important role of protection from diabetic cardiomyopathy.

Author's address Department of Rehabilitation medicine, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

Key words exercises; type 2 diabetic mellitus; apoptosis; heat-shock protein

糖尿病是一组由于胰岛素分泌缺陷及(或)其生物学作用障碍引起的以高血糖为特征的代谢性疾病,它已经成为继肿瘤、心血管疾病之后导致死亡的第三大原因^[1]。据统计约 70% 的糖尿病患者最终死于心脑血管病变并发症^[2]。糖尿病心血管并发症包括冠状动脉病变和心肌病变(diabetic cardiomyopathy),后者是以心力衰竭为表现,与冠心病和瓣膜疾病无关的特异性糖尿病相关性心脏疾病。近年来大量的临床流行病学、病理学以及实验研

究的结果均证实糖尿病心肌病是一类独立的病理生理状态,是糖尿病的主要并发症。1972 年 Rubler^[3]等

* 基金项目:江苏省省级机关医院资助课题(L 200704)

1 南京医科大学第一临床医学院康复医学系,南京,210029

2 江苏省省级机关医院康复医学科

3 苏州大学第一附属医院康复医学科

4 通讯作者

作者简介:金怡,女,硕士研究生,主治医师

收稿日期:2008-03-18

首次提出糖尿病心肌病的概念,目前已经有研究证实了心肌细胞凋亡在糖尿病心肌病病程发展中是导致心功能不全的重要原因。

细胞凋亡参与了心血管疾病的发病过程,包括缺氧、缺血再灌注、心肌梗死和终末期的心衰等^[4]。在一些临床研究和动物实验中给予实验对象抗细胞凋亡的治疗能有效控制糖尿病心肌病的病程进展,这从另一方面证实了心肌细胞凋亡在糖尿病心肌病中的地位。

运动对心肌凋亡的调节研究近两年来越来越受关注。耐力运动不仅可以在生理情况下调节心肌凋亡,而且可以在病理情况下增强心肌的保护。运动对心肌细胞凋亡的调控主要是通过氧化应激、热休克蛋白以及腺苷酸活化蛋白激酶等机制实现的。热休克蛋白通过抑制线粒体信号通路与死亡受体通路的活化保护 H_2O_2 所致的心肌细胞凋亡。虽然不少研究已经开始关注糖尿病的心肌凋亡,但有关运动对糖尿病心肌凋亡信号调节方面的研究较少。因此本研究侧重观察不同运动强度耐力训练对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡率和热休克蛋白基因表达的影响,为糖尿病心血管并发症的治疗提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 动物

6 周龄雄性 SPF 级 Sprague Dawley 大鼠 36 只,体重为 $200 \pm 10g$,购自上海史莱克公司。饲养于南京医科大学实验动物中心 SPF 级动物房,环境温度为 $20-25^{\circ}C$,12/12h 昼夜规律,按每笼 6 只喂养。为避免实验环境的改变对大鼠的影响,所有大鼠饲养 2 周后进入实验。

1.2 型糖尿病大鼠模型的建立

随机将大鼠分为正常大鼠对照组(CFM)和模型组(DFM)。DFM 组大鼠共 24 只进食高糖高脂饲料(10.0%猪油,20.0%蔗糖,2.5%胆固醇,1.0%胆酸盐,66.5% 常规饲料),以诱导出胰岛素抵抗^[5]。高糖高脂饮食 4 周后,腹腔注射 $35 mg/kg$ (以 pH4.4 的 $0.1 mol/L$ 枸橼酸缓冲液新鲜配成 0.35%浓度)的链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ, Sigma 公司),1 周后测定非禁食血糖,其中 18 只大鼠非禁食血糖 $> 16.67 mmol/L$ 为成功造模的 2 型糖尿病大鼠,建模率达 75%,造模成功后即改为常规饲料喂养^[4]。CFM 组大鼠共 18 只采用常规饲料 (12%蛋白质,5%脂肪,67%碳水化合物,16%其他)喂养,同期注射枸橼酸缓冲液。将造模成功的 2 型糖尿病大鼠随机分为糖尿病非运动组 (DRN, $n=6$)、糖尿病高强度运动组

(DRH, $n=6$)、糖尿病低强度运动组 (DRL, $n=6$)。对照组大鼠随机分为正常非运动组 (CRN, $n=6$)、正常高强度运动组 (CRH, $n=6$)、正常低强度运动组 (CRL, $n=6$)。

1.3 运动程序

运动训练方式采用活动平板,运动程序参考朱红军的方案并加以改进^[6],运动时间增加到 60min。第 1—2 周,大鼠每周训练 5d,第 3—8 周,每周训练 4d,共训练 8 周^[5,7]。

1.4 标本采集及检测

运动训练组大鼠在最后一次运动结束后 24h 取材,而非运动大鼠也在饲养 8 周后取材。为避免进食量不同对血糖和胰岛素的影响,故测定空腹血糖和胰岛素,所以取材前所有大鼠禁食 12h。在大鼠腹腔内注射 1%戊巴比妥麻醉后,从腹主动脉抽血,取出部分新鲜心脏,立即用 50%的中性甲醛固定,12h 内封蜡备检。用冰冻钳取心肌,立即置于液氮内,后转入 $-80^{\circ}C$ 低温冰箱中保存备用。

血标本采集前大鼠禁食 12h,一般采集时间在早上 9 点钟以后,大鼠饲养 4 周 STZ 注射前和处死前测定体重、血糖、血胰岛素,STZ 注射后 1 周测定安静非禁食血糖。血标本在 1%戊巴比妥 ($30mg/kg$) 腹腔麻醉下从眼内眦静脉获取。血糖采用葡萄糖氧化酶法 (GOD-PAP) (上海荣盛生物技术有限公司),血清胰岛素测定采用大鼠专用胰岛素 ELISA 试剂盒 (Linco Research, USA) 测定。

1.5 RT-PCR

1.5.1 组织总 RNA 抽提:取冻存的心室肌 100mg,剪碎,放入 1ml 冰预冷的 Trizol (Invitrogen 公司, USA) 试剂中,冰上匀浆 (超速匀浆机, IKA 公司, USA),参照 Trizol 提取说明书的步骤提取总 RNA。总的 RNA 溶解于 DEPC 处理过的水中。并用分光光度计在 260nm 测定的 OD 值来初步定量及检测样品纯度。本实验样品的 OD260/OD280 比值在 1.7—2.0 之间,提示提取的 RNA 纯度良好。

1.5.2 RT-PCR 反应:RT 反应体系为: $2\mu g$ 总 RNA, MMLV Reverse Transcriptase 200U (Promega, USA), Ribonuclease Inhibitor 25U (TaKaRa), dNTP $1.25\mu l$ (各 $10mmol/L$), Oligo dt (15) $2\mu l$ ($50pmol/L$), $5 \times RT$ 缓冲液 $5\mu l$ 加 DEPC 处理过的水至总体积 $25\mu l$ 。具体步骤按照 Promega 说明书进行。PCR 反应体系为: $3\mu l$ cDNA, 1U Taq 酶 (TaKaRa), $2.0 mmol/L$ $MgCl_2$, $200\mu mol/L$ dNTP, $2.5\mu l$ $10 \times PCR$ 缓冲液,各基因上下游引物各 $0.5\mu l$ ($10pmol/L$),加双蒸水至总体积 $25\mu l$ 。PCR 扩增反应条件, $94^{\circ}C$ 预变性

3min94℃变性 45s,57℃/62℃退火 45s,72℃延伸 1min。72℃末端延伸 10min 后 4℃保存。各基因引物序列及扩增条件:

HSP72(Sense 5'TCGAGGAGGTGGATTAGAG3';Antisense 5'GGGATGCAAGGAAAAAC3'), β -actin (Sense 5'TCCTGTGGCATCCATGAAACT3';Antisense5'GAAGCATTTGCGGTGCACGAT3',GeneBank 号 NM_031144)。其中退火温度和循环数:HSP72 是 57℃,35 次, β -actin 是 57℃,32 次。

1.5.3 PCR 产物分析:取 5 μ l PCR 产物加 6 $\times$ 负缓冲液在 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭(Ethidium Bromide, EB)染色,用凝胶成像系统分析,测定各电泳条带 OD 值,以 β -actin 作为内参照是因为 β -actin 的表达不受运动的影响^[4]。计算 HSP72 基因的 mRNA 的相对含量,结果以各目的条带占 β -actin 条带密度的比值作为 mRNA 水平的定量指标。

1.6 心肌 HE 染色及心肌细胞凋亡 TUNEL 法检测

1.6.1 心肌 HE 染色:心肌组织用中性甲醛固定 24h 以上后取材,石蜡切块,每块连续切取两张 5 μ m 厚切片,分别置于干净玻片上,烤片 3h,病理切片经二甲苯及梯度乙醇脱蜡、脱水。苏木素染色,树脂胶封片。光学显微镜观察。

1.6.2 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡:连续切取两张 5 μ m 厚切片,烤片 3h。病理切片经二甲苯及梯度乙醇脱蜡、脱水。PBS 洗涤 2 次。蛋白酶 K 消化,室温放置 5min。蒸馏水洗涤 2 次。PBS 洗涤 5min。加洗涤反应缓冲液 37℃反应 1h 加入转换剂 AKP37℃反应 30min。PBS 振洗 3 次,DAB 显色 2—20min,用已知阳性片在显微镜下控制显色时间。自来水冲洗,脱水,透明,封片。

TUNEL 染色切片中细胞核有紫蓝色颗粒者为阳性细胞即凋亡细胞。在高倍镜($\times 400$ 倍)下随机选择 10 个独立视野,测定阳性染色核蓝色的凋亡细胞核数(A1-10)。在高倍镜下找到 HE 染色对应的连续切片相应区域,计数视野总细胞核数(B1-10)。将计算每张切片的凋亡百分比 $(=A1+\dots+A10/B1+\dots+B10)$ 。以心肌凋亡阳性细胞数占总心肌细胞数的百分比作为心肌细胞凋亡指数(apoptosis index,AI)。

1.7 统计学分析

各组实验数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),相关分析采用 Pearson 法。数据由 SPSS 11.0 统计软件包进行处理,以 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 饮食及运动对体重、血糖、胰岛素的影响

见表 1—2。

表 1 不同饲料喂养 4 周后大鼠的体重和生化指标($\bar{x}\pm s$)

组别	体重(g)	空腹血糖(mmol/L)	空腹胰岛素(ng/ml)
CFM 组	360.67 $\pm$ 14.39	4.24 $\pm$ 0.65	0.54 $\pm$ 0.20
DFM 组	382.83 $\pm$ 17.5 ^①	5.69 $\pm$ 0.94 ^②	0.88 $\pm$ 0.20 ^②

DFM 组与 CFM 组相比:① $P<0.05$;② $P<0.01$

表 2 STZ 注射后实验大鼠生化指标 ($\bar{x}\pm s$)

组别	STZ 注射后 1 周非	STZ 注射后 9 周	
	禁食血糖(mmol/L)	空腹血糖(mmol/L)	空腹胰岛素(ng/ml)
CFM 组	5.40 $\pm$ 0.71	4.69 $\pm$ 0.82	0.48 $\pm$ 0.20
DFM 组	17.36 $\pm$ 3.60 ^②	21.41 $\pm$ 2.33 ^②	0.41 $\pm$ 0.29

DFM 组与 CFM 组相比:① $P<0.05$;② $P<0.01$

2.2 运动对 HSP72 基因表达的作用

HSP72 基因 RT-PCR 产物的凝胶电泳图见(图 1),在糖尿病和对照组心肌组织中均有表达。心肌 HSP72mRNA 的表达在所有糖尿病组(DRN、DRH、DRL)均显著低于非糖尿病大鼠各组(CRN、CRL、CRH)($P<0.01$)。各组组间比较显示,CRL 组比 CRN 组表达显著增高,而 CRH 组却显著低于 CRL 组和 CRN 组;DRL 组表达显著高于 DRN 组,而 DRH 组的表达显著低于 DRL 组和 DRN 组(见图 2)。

2.3 运动对心肌细胞凋亡的影响

糖尿病大鼠 3 组心肌 AI 显著高于 CRL 组,DRN 组和 DRH 组的心肌 AI 显著高于 CRN 组(图 3—4,见前置彩色插页)。

Marker DRN DRH DRL CRN CRH CRL

图 1 糖尿病正常大鼠心肌 HSP72mRNA 表达的琼脂糖凝胶条带



图 2 糖尿病正常大鼠各组心肌 HSP72mRNA 的表达

a,与 DRN 组比较 $P<0.05$;b,与 DRH 组比较 $P<0.05$;c,与 DRL 组比较 $P<0.05$;d,与 CRN 组比较 $P<0.05$;e,与 CRH 组比较 $P<0.05$ 。

2.4 运动强度对心肌 HSP72 基因表达与 AI 间相关关系的影响

Pearson 相关分析显示,在 DRN 组+DRL 组 HSP72 mRNA 与 AI 呈负相关($P=0.000$, $r=-0.884$, $n=12$,图 5-A),而在 DRN 组+DRH 组 HSP72 mRNA 与 AI 无相关性(图 5-B)。

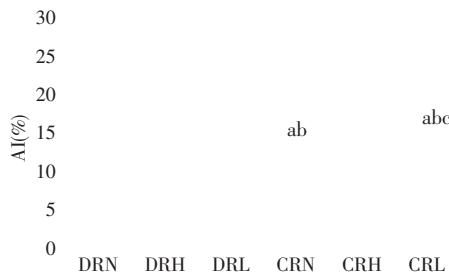


图3 糖尿病及对照组大鼠心肌凋亡率

a 与 DRN 组比较 $P<0.05$; b 与 DRH 组比较 $P<0.05$; c 与 DRL 组比较 $P<0.05$ 。

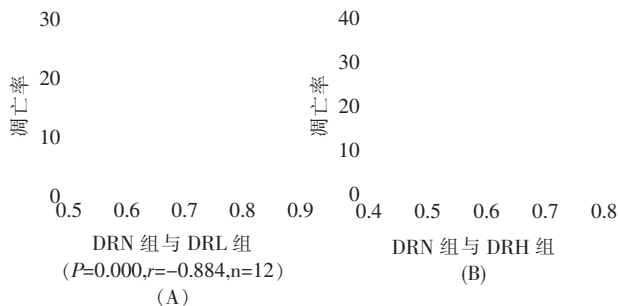


图5 心肌 AI 与 HSP72mRNA 表达间相关关系

3 讨论

2 型糖尿病的发病机制是胰岛素抵抗继而出现胰岛 β 细胞功能受损,临床上在血糖增高之前往往就已经存在胰岛素抵抗的现象。本实验参考国外 Reed 和国内郭啸华的方法^[4,9],首先给予高糖高脂饲料喂养 4 周造成大鼠胰岛素抵抗,出现体重增加(肥胖)、轻度血糖增高、高甘油三酯、高胆固醇和代偿性的高胰岛素血症。这些与人类的糖尿病前期,胰岛素抵抗的状态是相似的。然后注射小剂量的 STZ 破坏胰岛 β 细胞的功能,使其发生高血糖的现象,成功建立了 2 型糖尿病的动物模型。本模型具有高血糖、胰岛素抵抗的代谢特点。

近年研究显示糖尿病可以引起心肌细胞的凋亡,心肌凋亡引起糖尿病心肌病变越来越多受到关注。Murphy 等研究发现心肌在 STZ 注射后的 4d 就出现细胞凋亡现象^[22],体外研究也显示心肌暴露于高糖 24h 出现了同样的现象^[23],提示糖尿病在早期就能造成心肌的凋亡。由于细胞凋亡可以在多个水平受到严格的调控,因此,通过干预或操纵心肌细胞凋亡的途径,可以为糖尿病心肌病提供一种新的治疗方式。本研究结果显示糖尿病大鼠心肌凋亡率显著高于正常大鼠。在糖尿病大鼠,低强度运动组心肌凋亡率与正常大鼠非运动组相似,且高于正常大鼠低运动组;而高强度运动组心肌凋亡率显著高于正常大鼠非运动组和低强度运动组,提示低运动强度可以降低糖尿病大鼠的心肌凋亡,对心肌有一定的

保护作用。

HSPs 家族是一个高度保守的蛋白家族,主要功能是通过其分子伴侣作用即与新生未折叠、错叠或聚集的蛋白质相结合,使某些蛋白质聚集物解离,加速肽链正确的折叠和重折叠,维持某些蛋白的形态以利其跨膜转运,促进变性蛋白的降解与清除,重新激活某些酶,以维护细胞的功能与生存^[10]。按其分子量可分为 6 个家族:HSP110 家族、HSP90 家族、HSP70 家族、HSP60 家族、HSP40 家族、小 HSP 家族。HSP70 家族尤其在运动诱导的保护和凋亡中起重要作用。HSP70 家族包括胞浆结构型 Hsc70 (或 HSP73),胞浆诱导型 HSP70(或 HSP72),内质网 Bip (或 Grp78)和线粒体 mt-HSP70。其中 HSP72 在心脏中起保护作用,如 HSP72 对缺血再灌注损伤的心肌细胞起保护作用^[11],而且过表达 HSP72 的转基因小鼠可以减少因缺血再灌注损伤而造成的心肌梗死的面积^[12-14]。近来研究表明 HSP70 是一个潜在的抗凋亡蛋白^[15],通过调节线粒体介导途径发挥抗凋亡作用^[16-17]。HSP72 被认为是心脏的保护因子^[18],可以由运动诱导增加其表达^[19],运动训练后的哺乳动物心肌发现 HSP 合成增加^[19-20]。Adam 在研究阿霉素诱导的心脏疾病中发现低强度耐力运动具有保护心脏的功能^[21]。本研究结果显示正常大鼠 HSP72 基因表达显著高于糖尿病大鼠。在正常大鼠组,低强度运动组的 HSP72 基因表达高于非运动组,高强度运动组的 HSP72 基因表达显著低于非运动组。这种趋势也存在于糖尿病大鼠组。提示低强度运动能够诱导心肌细胞热休克蛋白转录基因的表达,高强度运动则起到相反的效果。

有研究显示热休克蛋白具有抑制心肌凋亡的作用。前期研究我们检测了糖尿病大鼠心肌 Bcl-2 和 Bax 的基因表达,发现饮食和运动均能诱导糖尿病大鼠的心肌抗凋亡基因的表达;饮食控制加低强度耐力运动还具有抑制促凋亡基因的表达,强化对糖尿病心肌的保护作用^[23]。本研究显示糖尿病大鼠低运动强度组和非运动组心肌凋亡率和热休克蛋白呈负相关,即随着热休克蛋白增多,心肌凋亡率降低;而在高强度运动和非运动组促凋亡和抗凋亡指标之间无相关性。提示低强度运动能够诱导增加 HSP72 基因的表达,抑制心肌细胞凋亡,对糖尿病心肌病变具有保护作用;而高强度运动减少了 HSP72 基因的表达,不能有效抑制心肌细胞凋亡,不利于心肌的保护作用。因此,采用低强度运动处方将有助于预防糖尿病心肌病变的发生和发展。

4 小结

低强度运动可以降低糖尿病大鼠的心肌凋亡, 增加心肌保护因子 HSP72 基因的表达, 低运动强度组心肌凋亡率和热休克蛋白呈负相关, 提示低强度运动可能通过增加热休克蛋白的合成抑制心肌细胞凋亡, 增强对心肌细胞保护作用。

参考文献

- [1] Albright A. What is public health practice telling us about diabetes[J]? J Am Diet Assoc, 2008, 108(4):S12—8.
- [2] Air EL, Kissela BM. Diabetes, the Metabolic Syndrome, and Ischemic Stroke: Epidemiology and possible mechanisms [J]. Diabetes Care, 2007, 30(12): 3131—3140.
- [3] Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis [J]. Am J Cardiol, 1972, 30(3): 595—602.
- [4] Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. Metabolism, 2000, 49:1390—1394.
- [5] 招少枫, 江钟立. 心肌细胞凋亡与运动调控[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(4):372—375.
- [6] 朱红军, 江钟立, 张秀伟, 等. 耐力训练对糖尿病大鼠骨骼肌 p38 信号激酶的调节作用 [J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(4):249—252.
- [7] 王磊, 江钟立, 招少枫. 饮食和运动干预对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌 CuZnSOD mRNA 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(5):388—392.
- [8] Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, et al. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles [J]. FASEB J, 2004, 18:1150—1152.
- [9] 郭啸华, 刘志红, 李恒, 等. 高糖高脂饮食诱导的 2 型糖尿病大鼠模型及其肾病特点[J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10(5):290—294.
- [10] Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein[J]. Science, 2002, 295:1852—1858.
- [11] Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, et al. Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery [J]. Circ Res, 1988, 63: 543—549.
- [12] Hutter JJ, Mestral R, Tam Ekw, et al. Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decreases infarct size in vivo[J]. Circulation, 1996, 94: 1408—1411.
- [13] Radford NB, Fina M, Benjamin IJ, et al. Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:2339—2342.
- [14] Trost SU, Omens JH, Karlson WJ, et al. Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70[J]. J Clin Invest, 1998, 101:855—862.
- [15] Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, et al. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. Biochem[J]. Biophys Res Commun, 2001, 286:433—442.
- [16] Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, et al. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70 [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2:476—483.
- [17] Li CY, Lee JS, Ko YG, et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation [J]. J Biol Chem, 2000, 275:25665—25671.
- [18] Snoeckx LHEH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, et al. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology[J]. Physiol Rev, 2001, 81: 1461—1497.
- [19] Harris MB, Starnes JW. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280: H2271—H2280.
- [20] Locke M, Noble EG, Atkinson BG. Exercising mammals synthesize stress proteins[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 1990, 258: C723—C729.
- [21] Chicco AJ, Hydock DS, Carole M, et al. Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity[J]. J Appl Physiol, 2006, 100: 519—527.
- [22] Murphy RM, Watt KK, Cameron SD, et al. Effects of creatine supplementation on housekeeping genes in human skeletal muscle using real-time RT-PCR [J]. Physiol Genomics, 2003, 15(2):163—174.
- [23] 招少枫, 江钟立, 王磊. 饮食和运动干预对 2 型糖尿病大鼠心肌 Bcl-2 和 Bax 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(5): 393—397.