

运输应激猪 HSPs mRNA 转录、分布及免疫器官 病理性损伤相关性研究

李玉保^{1,2,3}, 裴兰英², 鲍恩东¹, 王志亮³, 赵茹茜¹

(¹南京农业大学动物医学院, 南京 210095; ²聊城大学农学院, 山东聊城 252059; ³中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

摘要:【目的】研究长途运输应激对猪免疫器官的病理性损伤、HSPs mRNA 的分布和转录水平, 探讨其相关性。【方法】利用组织学、原位杂交和本实验室建立的猪 HSPs mRNA 一步法实时荧光定量 RT-PCR 技术平台等方法, 研究长途运输应激对猪免疫器官的病理性损伤、HSPs mRNA 的分布和转录水平的变化。【结果】在长途运输应激初期 (1~2 h), 淋巴结和脾脏出现急性病理性损伤变化, 损伤程度较为严重; 运输应激 4 h 时, 组织的病理性损伤与应激初期相似, 但血管的充血程度有所减轻; 淋巴结和脾脏中 HSP70 mRNA 的转录水平随着运输应激时间的延长一直呈现出上升的趋势, 运输应激持续到 10 h 时, HSP70 mRNA 的转录水平升到最高, 分别为对照组的 9.59 和 11.46 倍; HSP90 mRNA 的转录水平在应激初期 (1~2 h) 急剧升高 ($P < 0.01$), 运输应激 2 h 时, 淋巴结和脾脏中 HSP90 mRNA 的转录水平分别为对照组的 59.67 和 13.03 倍, 到运输应激持续到 6 h 后, 升高不再显著。HSPs mRNA 在淋巴结和脾脏细胞中的定位无肉眼可见的随着应激时间的延长而发生相应的变化, 但 HSP70 和 HSP90 mRNA 之间的定位存在着差异。【结论】运输应激可以导致组织损伤和 HSPs mRNA 转录水平的变化, 但对不同家族的 HSPs mRNA 转录水平的影响不同; HSP90 mRNA 的转录水平与组织损伤有着良好的相关性, 有望成为猪运输应激的判定指标之一。

关键词: 热休克蛋白; 荧光定量 PCR; 原位杂交; 组织损伤; 运输应激; 猪

Relationship Between Distribution, Transcription Level of HSPs mRNA and Immunity Tissue Pathological Lesion of Transport Stressed Pigs

LI Yu-bao^{1,2,3}, PEI Lan-ying², BAO En-dong¹, WANG Zhi-liang³, ZHAO Ru-qian¹

(¹College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ²College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng 252059, Shandong; ³China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, Shandong)

Abstract: 【Objective】To study the relationship between the distribution, transcription level of HSPs mRNA and immunity tissue pathological lesion of transport stressed pigs. 【Method】In situ hybridization, one-step fluorescence quantitative and histopathological methods were used to invest pathological lesion, HSPs mRNA distribution and transcription level in lymph node and spleen of transport stressed pigs. 【Result】Obvious acute histopathological changes were observed in lymph node and spleen at the beginning of transport stress (1-2 h). The level of HSP70 mRNA transcription increased continuously from the beginning of transportation. The inductions of HSP70 mRNA transcription in lymph node and spleen of 10 h transport stressed pigs were 9.59 and 11.46 times higher than that of the un-transport stressed pigs ($P < 0.01$). However, the transcription levels of HSP90 mRNA increased only at the beginning of transport stress, 59.67 and 13.03 times higher than that of the un-transport stressed pigs at 2 h transport stressed pigs in lymph node and spleen, respectively. The location of HSP70 and HSP90 mRNA did not change with the transport stress. 【Conclusion】Transport stress can affect the transcription of HSPs mRNA, and the effect is different between HSPs families.

收稿日期: 2007-04-26; 接受日期: 2007-11-06

基金项目: 国家自然科学基金 (30430420, 39770569, 30170682)、中德农业科技合作项目和聊城大学博士基金 (31805)

作者简介: 李玉保 (1978-), 男, 山东阳谷人, 博士, 研究方向为动物病理学。Tel: 0635-8239959; E-mail: liyubao@lcu.edu.cn。通讯作者鲍恩东 (1963-), 男, 内蒙古赤峰人, 教授, 博士, 研究方向为分子病理和免疫病理学。Tel: 025-84398669; E-mail: b_endong@njau.edu.cn

Furthermore, there is a good relationship between the concentration of HSP90 mRNA and pathological lesion of lymph node and spleen, and HSP90 mRNA might be a hallmark to determine stress.

Key words: Heat shock protein; FQ-PCR; *in situ* hybridization; Pathological lesion; Transport stress; Pig

0 引言

【研究意义】运输应激是影响猪健康福利、屠宰猪肉品质甚至导致猝死的重要原因之一,同时应激导致机体免疫力下降^[1],引起动物对病原微生物易感,生产性能降低,为世界畜牧业带来巨大的经济损失^[2,3]。研究运输应激猪免疫器官的病理性损伤、HSPs mRNA 转录、分布,揭示运输应激病理性损伤与 HSP mRNA 转录水平、组织细胞中的分布之间的相关性,同时为运输应激的判定提供科学依据。【前人研究进展】目前国际上,对应激的判定还没有统一的标准,甚至还用如心跳、呼吸等生理指标进行判定。应激时,机体组织细胞内热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)的量发生急剧变化以稳定改变了的细胞内环境,维持细胞的生存^[4,5]。但不同家族的 HSPs 的量在机体受到应激时表现出不同的变化趋势^[6]。运输应激时, HSP90 的含量明显下降,而 HSP27 的含量却升高^[7]。组织细胞中 HSPs 的量发生变化的原因可能是应激时 HSPs 基因转录水平的变化^[8],也可能是 HSPs 表达与消耗速度的变化,还可能是增多的 HSPs 来源于其它组织或细胞。Sanders 等^[9]就铜对 HSP60 的诱导以及 HSP60 的量的动态变化进行了研究,在 HSP60 的水平和铜的剂量之间建立了线性关系,并且确定了 HSP60 水平、维持时间与铜的剂量之间的相关性。【本研究切入点】本试验通过一步法荧光定量 RT-PCR、病理组织学等方法,对长途运输应激猪淋巴结和脾脏中 HSPs mRNA 的转录水平、组织病理性损伤进行研究,探讨运输应激病理性损伤与 HSPs mRNA 转录水平的相关性,为应激的判定提供科学依据。同时利用原位杂交方法,对 HSPs mRNA 进行了定位研究,探讨运输应激与 HSPs mRNA 在组织细胞中定位的相关性。【拟解决的关键问题】研究运输应激病理性损伤与 HSPs mRNA 转录水平之间的相关性,为运输应激的判定提供理论依据;对 HSP mRNA 进行定位研究,探讨其生物学作用。

1 材料与方法

1.1 试验动物及试验设计

将 18 头出栏育肥猪(品种:长白猪,体重:85~

90 kg)随机均分为 A、B、C、D、E、F 6 组,除对照组(A 组)猪仍然安置于正常饲养环境外,其它各试验组猪用动物运输车辆分别进行 1 h(B 组)、2 h(C 组)、4 h(D 组)、6 h(E 组)、10 h(F 组)的运输应激,路途运输模拟国内正常等级公路上的运输环境,时速 50~60 km·h⁻¹,当时外界温度为 20~25℃。及时剖杀运输到设定时间的试验猪,采取运输应激猪淋巴结和肾脏三份,一份利用中性福尔马林固定,进行组织学观察;另两份在液氮中速冻后保存于一 70℃冰柜中,用作原位杂交和荧光定量 RT-PCR 方法检测。

1.2 仪器和材料

AMV(D2620)、HS-Taq(DR007A)、Ribonuclease Inhibitor(D2310A)、RNA Marker(D508A)、DNA Marker(D501A)、DNase I(RNase Free, D2215)、Nde I(D1161A)均购自宝生物工程(大连)有限公司;SYBR Green I 染料,上海开放科技有限公司产品;pGEM-T 载体系统试剂盒(A3610)、体外转录系统试剂盒(P1440),Promega 公司产品;Dig RNA Labeling Kit(Cat.No.1175025)、Dig Nucleic Acid Detection Kit(Cat.No.1175041)购自罗氏公司;iCycler iQTM 荧光实时多波长 PCR 检测系统,美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 病理组织学检测 受试猪剖杀后,迅速采取淋巴结和脾脏,固定于 10%中性福尔马林溶液中。常规法石蜡包埋制片,切成 5 μm 厚的连续切片,H.E.染色,光镜下观察并拍照。

1.3.2 RNA 的提取及纯化 利用 TRIZOL 一步法提取试验猪淋巴结和脾脏样品的总 RNA^[9]。琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量, -70℃保存备用。

1.3.3 引物设计 根据文献[10]进行引物设计。GAPDH 上游引物:5'-GAAGGTCGGAGTGA-ACGGAT-3';下游引物:5'-CATGGGTAGAATCATAC-TGGAA-CA-3'。HSP70 上游引物:5'-GCCCTGAATCC-GCAGATA-3';下游引物:5'-TCCCCACGGTAGGA-AACG-3'。HSP90 上游引物:5'-AATCGCCCAGTTGA-TGTCG-3';下游引物:5'-TGTCCTACTATCGTGAGGG-TCC-3'。引物由宝生物(大连)工程有限公司合成。

1.3.4 一步法 RT-PCR 及扩增片段的亚克隆 进行 RT-PCR, 扩增片段克隆到 pGEM-T 体外转录载体, 操作步骤均按照文献[10]的方法进行。

1.3.5 体外转录制备探针及浓度检测 根据 Dig RNA Labeling Kit 说明进行体外转录, 制备 HSP70 和 HSP90 的 RNA 探针, 并按照说明书检测其浓度。

1.3.6 原位杂交 -70°C 保存的淋巴结和脾脏样品在 10%中性多聚甲醛中固定 12 h; 梯度酒精脱水、二甲苯透明; 常规石蜡包埋; 切制 $5\ \mu\text{m}$ 连续切片, 45°C 烤片; 水化。贴于载玻片上的组织切片 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.2) 漂洗 10 min; $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸/ $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.2) 漂洗 $5\ \text{min}\times 2$; 0.4% TritonX-100/ $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.2) 漂洗 15 min; $1\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 蛋白酶 K 37°C 处理 30 min; 10%多聚甲醛 PBS (pH 7.2) 固定 5 min; $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.2) 漂洗 5 min; Washing Buffer 洗涤 5 min; 0.25% 醋酸酐 ($0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三乙醇胺配制) 室温处理 10 min; Blocking solution 封闭 30 min; 将其放入杂交液 (地高辛核酸探针含量 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 中 43°C 保温 12~16 h; $4\times\text{SSC}$, 37°C 漂洗 15 min; $2\times\text{SSC}$ (含 RnaseA, $20\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), 37°C 漂洗 30 min; $1\times\text{SSC}$, 37°C 漂洗 15 min; $0.5\times\text{SSC}$, 37°C 漂洗 15 min; $0.05\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.2) 漂洗 $5\ \text{min}\times 2$; Antibody solution 室温作用 4 h; $0.05\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.2) 冲洗 $5\ \text{min}\times 3$; Washing buffer 冲洗 $5\ \text{min}\times 2$; Detection buffer 冲洗 $5\ \text{min}\times 2$; 在底物溶液中避光作用 3~16 h; 利用高压的 DEPC 处理水终止反应; 95%酒精脱水 15 min; 100%酒精脱水 15 min; 二甲苯透明 15 min; 中性树胶封片; 显微镜观察并拍照。

阴性对照试验: 杂交液中不含有任何探针, 其余步骤与样品检测相同。

结果判定: 阳性反应信号为细胞中出现深蓝色颗粒。

1.3.7 一步法实时荧光定量 PCR 操作均按照文献[10]方法进行。体外转录 RNA 作为标准品制作标准曲线, 进行一步法实时荧光定量 PCR 检测。每一个样品分别检测 HSP70、HSP90 和 GAPDH 的 mRNA 转录水平, 3 个重复。根据荧光曲线的 Ct 值以及标准曲线计算定量结果。

2 结果与分析

2.1 淋巴结和脾脏的病理性损伤

2.1.1 淋巴结 运输应激初期 (1~2 h), 淋巴结被膜和小梁中小动脉扩张, 充满红细胞; 淋巴窦扩张,

其中可见淡红染的浆液性渗出物, 甚至可见灶状出血。应激持续到 4 h 时, 淋巴窦中可见大量淡红染的渗出物, 淋巴小结生发中心可见淋巴细胞和网状细胞核碎片, 淋巴细胞数量略见减少。应激持续到 6 h 和 10 h 时, 淋巴结的病理性损伤与应激 4 h 时相似, 但充血现象略有减轻。

2.1.2 脾脏 运输应激初期 (1~2 h), 脾小体中央动脉及被膜毛细血管扩张, 充满红细胞; 红髓中可见大量红细胞。运输应激到 4 h 时, 红髓中红细胞数量有所减少, 中央动脉周围淋巴细胞鞘和生发中心的淋巴细胞数量减少, 其中可见散在的淋巴细胞和网状细胞核碎片。运输应激到 6~10 h, 脾脏的应激损伤与应激 4 h 时没有显著的差异。

2.2 HSP70 mRNA 和 HSP90 mRNA 在淋巴结和脾脏中的定位

HSP70 和 HSP90 mRNA 在淋巴结和脾脏中的定位无肉眼可见的随着应激时间的延长而发生相应的变化。HSP70 mRNA 在脾脏血管内皮细胞和淋巴细胞核中呈强阳性染色, HSP90 mRNA 在脾脏血管内皮细胞、淋巴细胞核以及部分淋巴细胞胞浆中呈现出强阳性杂交信号; HSP70 mRNA 在淋巴结中淋巴小结的小结帽区和副皮质区的淋巴细胞上呈强阳性, HSP90 mRNA 在淋巴结中淋巴小结的暗区和明区淋巴细胞上强表达 (图)。

2.3 运输应激对淋巴结和脾脏中 HSP70 mRNA 和 HSP90 mRNA 转录水平的影响

由表可见, 在淋巴结和脾脏中, HSP70 mRNA 的量随着应激时间的延长, 持续升高 ($P<0.01$), 运输应激持续到 10 h 时升到最高, 分别为对照组的 9.53 和 11.46 倍。HSP90 mRNA 在运输应激的初期急剧升高, 运输应激持续到 2 h 时, 淋巴结和脾脏中 HSP90 mRNA 的量分别为对照组的 59.67 和 13.03 倍 ($P<0.01$), 运输应激 6 h 后, 和对照组相比没有显著性差异。

3 讨论

应激广泛的存在于畜牧业生产的过程中, 严重影响动物机体免疫力和生产性能。专家普遍认为, 2006 年在中国流行的猪“无名高热”主要是由于多种应激因素引起动物机体免疫下降, 所导致的多种疾病的混合感染。本文以运输应激猪作为试验模型, 研究了运输应激时免疫器官的病理性损伤与 HSPs mRNA 转录水平、组织细胞定位的相关性。

应激时, HSP70 对维持细胞内环境的动态平衡起

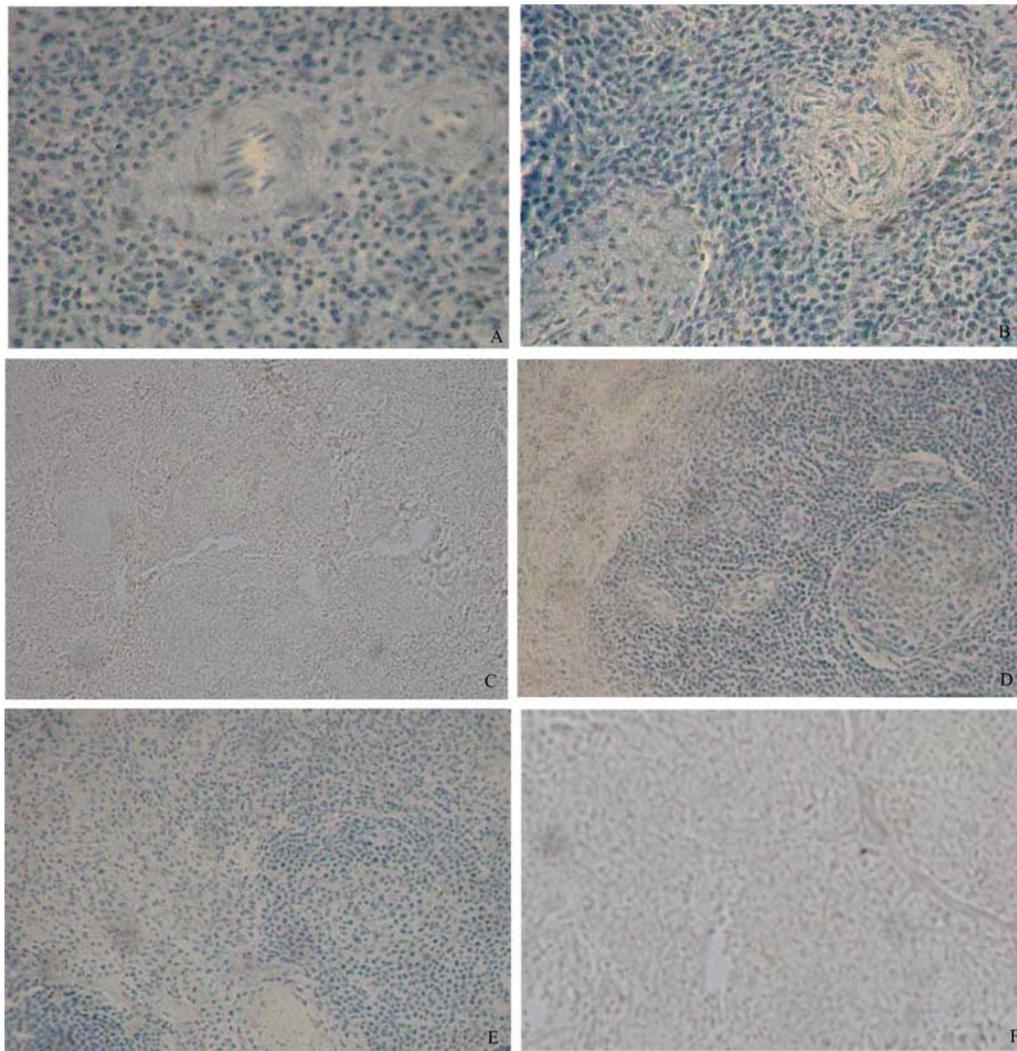
表 运输应激受试猪淋巴结和脾脏中 HSP70 mRNA 和 HSP90 mRNA 转录水平的变化

Table Changes of HSP70 mRNA and HSP90 mRNA transcription level in lymph node and spleen of transport stressed pigs

组别 Group	应激持续时间 Stressing time (h)	淋巴结 Lymph node		脾脏 Spleen	
		HSP70 mRNA	HSP90 mRNA	HSP70 mRNA	HSP90 mRNA
A	Control	3.60±0.77Aa	8.10±1.60Aa	1.73±0.40Aa	2.87±0.59Cd
B	1	13.29±0.56Bb	113.28±9.37Bb	6.13±0.59Bb	20.33±1.56Bb
C	2	19.16±1.21Cc	483.30±59.35Cc	11.60±2.6Cc	37.41±2.66Aa
D	4	22.11±0.93Cc	18.32±1.17ABa	12.82±1.42Cc	15.87±2.81Bc
E	6	20.67±1.73Cc	5.21±0.83Aa	17.63±2.01Dd	4.93±1.92Cd
F	10	34.54±3.57Dd	7.94±1.96ABa	19.83±2.11 Dd	2.53±1.32Cd

小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$), 大写字母不同表示差异极显著 ($P<0.01$)

The different capital and small letters in the same column stand for significance at 0.01 and 0.05 level



A. HSP70 mRNA 在脾脏血管内皮细胞和淋巴细胞核中呈强阳性着染 (ISH×200); B. HSP90 mRNA 在脾脏血管内皮细胞和淋巴细胞核中呈强阳性着染 (ISH×200); C. 脾脏阴性对照 (ISH×200); D. HSP70 mRNA 在淋巴小结的小结帽和副皮质区呈强阳性着染 (ISH×200); E. HSP90 mRNA 在淋巴小结的生发中心淋巴细胞上强表达 (ISH×200); F. 淋巴结阴性对照 (ISH×200)

A. Special hybridization sign of HSP70 mRNA on the wall of blood vessel and some lymphocyte in spleen (ISH×200); B. Special hybridization sign of HSP90 mRNA on the wall of blood vessel and some lymphocyte in spleen (ISH×200); C. Spleen without probe as negative control (ISH×200); D. HSP70 mRNA is detected preferentially on some lymphocyte in the cap and paracortex zone of lymphoid nodules (ISH×200); E. Positive HSP90 mRNA cells in germinal center of lymph node (ISH×200); F. Lymph node without probe as negative control (ISH×200)

图 HSP70 mRNA 和 HSP90 mRNA 在脾脏和淋巴结中的分布
Fig. Location of HSP70 mRNA and HSP90 mRNA in spleen and lymph node

着重要作用。如转录表达 HSP70 基因的细胞多表现为热耐受, 而用 HSP70 单克隆抗体微量注射可明显降低细胞对热应激的耐受性^[11]。HSP70 表达增加, 可以提高小鼠对类毒素致死效应的抵抗力, 减少细胞骨架的损伤^[12]。将人的 HSP70 基因转入到大鼠胚胎细胞系, 使转染细胞持续的过量表达人 HSP70, 这些细胞可耐受类似缺血损伤^[13]、缺氧损伤和高热损伤^[14]。Lee 等在分析二例死于伴有心脏疾患的长途运输猪的心肌组织内各种病理生理指标改变的过程中, 偶然发现 HSP90 的表达明显减少^[15]; 鲍恩东等^[6]报道, 运输应激 6 h 时, 骨骼肌中 HSP70 有所增加, 而 HSP90 却减少。这种 HSP90 家族在长途运输应激后, 出现表达量的进行性降低, 是对以往动物受到应激刺激后 HSP 表达量增加这一结果的重要补充, 有助于重新审视和指导 HSP 的相关性研究。运输应激时, HSP70 mRNA 的转录水平随着应激时间的延长持续升高, 而 HSP90 mRNA 的转录在应激初期增高, 后期增高不再显著, 说明 HSP70 和 HSP90 在转录的调节方式上有所不同, 这种调节方式的不同可能是因为 HSP90 和 HSP70 在细胞内行使的生物功能不同有关, HSP70 参与蛋白的组装、折叠和转运, 而 HSP90 更趋向于与一些功能蛋白如酶、激素受体结合形成复合物, 调节它们的活性, HSP90 还跟其它热休克蛋白基因转录区结合, 可能参与调节这些基因的转录, 通过调节一些功能蛋白包括其它热休克蛋白行使功能, 因此代表一个更高级的作用机制。在运输应激初期, 淋巴结和脾脏皆出现明显的急性病理性损伤, 运输应激到 6 h 时, 病变并没有加剧, 且充血有所减轻, 症状有所缓解, 这也许与 HSP70 的高水平转录、表达, HSP70 对组织细胞的保护有关。HSP90 mRNA 转录水平在应激初期急剧升高, 而应激持续到 6~10 h 时, 升高不再显著, 与组织损伤的进程有着良好的相关性, 有望成为应激判定的指标之一。

原位杂交结果显示, 在淋巴结中, HSP70 mRNA 和 HSP90 mRNA 广泛分布于淋巴细胞中, HSP70 mRNA 在淋巴小结的小结帽和副皮质区比较集中, 而 HSP90 mRNA 在淋巴小结的暗区和明区更为集中。HSP90 的转录易受生长因子诱导^[16], 并且 HSP90 可以抑制线粒体通路和死亡受体通路所介导的细胞凋亡^[17,18], HSP90 能与一些细胞周期调控因子结合, 从正负两方面参与细胞的周期调控, 维持细胞正常的分裂速度^[19]。淋巴小结的小结帽区和副皮质区主要是成熟淋巴细胞聚集, 而淋巴小结的暗区由幼稚的 B 淋巴

细胞密集而成, 细胞分化相比较多, 增殖能力较强, 有处于分化过程中不同阶段的淋巴细胞, 在明区主要完成对 B 淋巴细胞的筛选, 启动一些特异性不强的淋巴细胞的凋亡程序。HSP90 mRNA 在这些细胞上高水平转录, 提示在应激时 HSP90 参与调控这些细胞的增殖和分化, 阻止应激时激素和细胞因子的变化而引起的淋巴细胞凋亡或无意义早熟, 从组织形态学角度证实了 HSP90 的生物学作用。

4 结 论

运输应激可以导致免疫器官损伤和 HSPs mRNA 转录水平的变化, 但对不同家族的 HSPs mRNA 转录水平的影响不同; HSP90 mRNA 的转录水平与组织损伤有着良好的相关性, 有望成为猪运输应激的判定指标之一。

References

- [1] 李玉保, 付旭彬, 孙培明, 王志亮, 鲍恩东. 急性持续热应激对肉鸡免疫系统的影响. 农业生物技术学报, 2005, 13(3): 394-395.
Li Y B, Fu X B, Sun P M, Wang Zh L, Bao E D. Effects of Broiler Immune Parameter by Heat Stressing. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(3): 394-395. (in Chinese)
- [2] Schtte A. Transport tauglichkeit von Schweinen. In: Hartung J. *Hygiene and Tierschutz Beim Tiertransport*. Hannover: Proc. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1994: 83-89.
- [3] Warriss P D, Brown S N. A survey of mortality in slaughter pigs during transport and lairage. *The Veterinary Record*, 1994, 134(20): 513-515.
- [4] Arrigo A P, Landry J. Expression and function of the low-molecular weight heat shock proteins. In: Morimoto R I, Tissieres A, Georgopoulos C (eds). *Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperons*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994: 335-373.
- [5] Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo A P, Chauffert B, Mehlen P. HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Research*, 1997, 57: 2661-2667.
- [6] 鲍恩东, Sultan K R, Nowak B, Hartung J. 运输应激猪骨骼肌中热应激蛋白 HSP70 和 HSP90 的表达. 南京农业大学学报, 2001, 24(1): 81-84.
Bao E D, Sultan K R, Nowak B, Hartung J. Expression of HSP70 and HSP90 family in skeletal muscles of transport stressed pigs. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2001, 24(1): 81-84. (in Chinese)
- [7] 鲍恩东, Sultan K R, Nowak B, Hartung J. 热应激蛋白在运输应激

- 的猪肾脏中的表达. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 230-232.
- Bao E D, Sultan K R, Nowak B, Hartung J. Expression of heat shock proteins in kidney of transport-stressed pigs. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2001, 9(3): 230-232. (in Chinese)
- [8] Shyu W C, Kao M C, Chou W Y, Hsu Y D, Soong B W. Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells. *Molecular Neuroscience*, 2000, 2(4): 771-774.
- [9] Sanders B M, Martin L S, Nelson W G, Phelps D K, Welch W. Relationships between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope for growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Marine Environmental Research*, 1991, 31: 81-97.
- [10] Li Y B, Bao E D, Wang Z L, Zhao R Q. Detection of HSP mRNA translation in transport stressed pigs by fluorescence quantitative RT-PCR. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(3): 361-367.
- [11] Laszlo A. Evidence for two states of thermotolerance in mammalian cells. *International Journal of Hyperthermia*, 1998, 4: 513.
- [12] Endemann M, Bergmeister H, Bidmon B, Boehm M, Csaicsich D, Malaga-Dieguez L, Arbeiter K, Regele H, Herkner K, Aufricht C. Evidence for HSP-mediated cytoskeletal stabilization in mesothelial cells during acute experimental peritoneal dialysis. *American Journal of Physiology (Renal Physiology)*, 2007, 292: F47-F56.
- [13] Mestril R, Chi S H, Sayen M R, O'Reilly K, Dillmann W H. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 1994, 93(2): 759-767.
- [14] Heads R J, Latchman D S, Yellon D M. Stable high level expression of a transfected human HSP70 gene protects a heart-derived muscle cell line against thermal stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1994, 26(6): 695-699.
- [15] Lee W C, Lin K Y, Chiu Y T, Lin J H, Cheng H C, Huang H C, Yang P C, Liu S K, Mao S J. Substantial decrease of heat shock protein 90 in ventricular tissues of two sudden-death pigs with hypertrophic cardiomyopathy. *The FASEB Journal*, 1996, 10(10): 1198-1204.
- [16] Vamvakopoulos N O. Tissue-specific expression of heat shock proteins 70 and 90: potential implication for differential sensitivity of tissues to glucocorticoids. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1993, 98(1): 49-54.
- [17] Zhao C, Wang E. Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. *Cell Signal*, 2004, 16(3): 313-321.
- [18] Concannon C G, Orrenius S, Samali A. Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expression*, 2001, 9(4-5): 195-201.
- [19] Galea-Lauri J, Latchman D S, Katz D R. The role of the 90-kDa heat shock protein in cell cycle control and differentiation of the monoblastoid cell line U937. *Experimental Cell Research*, 1996, 226(2): 243-254.

(责任编辑 林鉴非)