

热休克蛋白 90 对氧化应激激活的大鼠血管平滑肌细胞细胞外信号调节激酶的作用

刘代华, 朱炳阳, 黄红林, 廖端芳

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管平滑肌细胞; 活性氧; 热休克蛋白 90; 细胞外信号调节激酶

[摘要] 目的 探讨热休克蛋白 90 对氧化应激激活的细胞外信号调节激酶的作用。方法 取 SD 雄性大鼠胸主动脉做原代平滑肌细胞培养。用 1 $\mu\text{mol/L}$ 可溶性鸟苷酰环化酶抑制剂 6-Anilinoquinoline 5, 8-quinolinedione (LY83583) 处理 4~12 代大鼠血管平滑肌细胞不同时间, 蛋白免疫印迹检测细胞内热休克蛋白 90、磷酸化和未磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2。用格尔德霉素(热休克蛋白 90 的特异性阻断剂)预处理细胞 30 min, 再用 LY83583 处理 120 min, 免疫共沉淀和蛋白免疫印迹检测热休克蛋白 90 与细胞外信号调节激酶及磷酸化的细胞外信号调节激酶的结合, 免疫荧光检测细胞核内磷酸化的细胞外信号调节激酶。结果 LY83583 处理 120 min 时细胞内热休克蛋白 90 表达达高峰, 较 0 min 时增加 9 倍, 与细胞外信号调节激酶 1/2 的第二个活化高峰一致。LY83583 处理血管平滑肌细胞 120 min 后, 热休克蛋白 90 与磷酸化的细胞外信号调节激酶 1/2 结合较对照组升高了 5.5 倍 ($P < 0.01$), 磷酸化的细胞外信号调节激酶 1/2 的量增加了 6.1 倍 ($P < 0.01$), 而细胞核内的磷酸化的细胞外信号调节激酶 1/2 也明显增加; 5 $\mu\text{mol/L}$ 格尔德霉素预处理后, LY83583 的这些效应则被阻断。结论 氧化应激增加大鼠血管平滑肌细胞内热休克蛋白 90, 并增加其与细胞外信号调节激酶 1/2 及磷酸化的细胞外信号调节激酶 1/2 的结合, 促进磷酸化的细胞外信号调节激酶 1/2 核转位。这可能是氧化应激激活大鼠中膜血管平滑肌细胞内细胞外信号调节激酶 1/2 信号通路活性的重要机制之一, 为抗氧化应激引起的血管中膜平滑肌细胞增殖提供新的分子靶点。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Heat Shock Protein 90 on Activated Extracellular Signal-Regulated Kinases in Oxidative-Stressed Vascular Smooth Muscle Cells of Rat

LIU Dai-Hua, ZHU Bing-Yang, HUANG Hong-Lin, and LIAO Duar-Fang

(Institute of Pharmacy & Pharmacology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Heat shock protein 90; Extracellular signal-regulated kinases; Reactive oxygen species; Vascular smooth muscle cells

[ABSTRACT] **Aim** Phosphorylation and nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) are most important for proliferation of oxidative-stressed vascular smooth muscle cells (VSMC) and heat shock protein 90 (HSP90) is involved in this process. We investigate whether heat shock protein 90 participated in extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway as a molecular chaperon. **Methods** Exposure vascular smooth muscle cells to LY83583 (6-Anilinoquinoline 5, 8-quinolinedione, produce reactive oxygen species, 1 $\mu\text{mol/L}$) for different time, then heat shock protein 90, extracellular signal-regulated kinases 1/2 and phospho extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cell lysates were measured by western blot. Vascular smooth muscle cells were incubated with geldanamycin (a special inhibitor of heat shock protein 90, 5 $\mu\text{mol/L}$) or vehicle for 30 min, then with LY83583 (1 $\mu\text{mol/L}$) for 120 min, heat shock protein 90 binding with extracellular signal-regulated kinases 1/2 and phospho extracellular signal-regulated kinases 1/2 were quafified by immunoprecipitation and western blot. The nuclear translocation of phospho extracellular signal-regulated kinases 1/2 were measured by immunofluorensense. **Results** Heat shock protein 90 increased in a time-dependent manner. It got the peak at 120 min which corresponded to the second peak of phospho extracellular signal-regulated kinases 1/2. Immunoprecipitation and western blot analysis showed that LY83583 increased the complex of heat shock protein 90-phospho extracellular signal-regulated kinases 1/2 about 5.5 times ($P < 0.01$) vs control, and phospho extracellular signal-regulated kinases 1/2 in total cell lysis (about 6.1 times vs control, $P < 0.01$) and nuclear increased too. Geldanamycin attenuated the effect of LY83583. **Conclusions** Heat shock protein 90 bound with phospho extracellular signal-regulated kinases 1/2 and promoted their nuclear translocation in oxidative-stressed vascular smooth muscle cells.

[收稿日期] 2006-09-19 [修回日期] 2006-11-06

[基金项目] 国家重点研究发展计划(973计划)资助项目(G2000056905), 国家自然科学基金(30470719)

[作者简介] 刘代华, 硕士, 研究方向为心血管药理学, 联系电话 021-50806600-5412, E-mail 为 liudaihualyh@yahoo.com.cn. 通讯作者黄红林, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, 联系电话 0734-8182408, E-mail 为 huanghonglinhui@yahoo.com.cn. 廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 dliao66@yahoo.com.cn.

氧化应激(oxidative stress)引起的血管中层平滑肌细胞增殖,在动脉粥样硬化和高血压等心血管疾病中起重要作用。氧化应激引起的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)增殖主要由细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK1/2)信号通路介导^[1-4]。体外培养的大鼠VSMC研究发现,氧化应激增加细胞外液中热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)、cyclophilin A和cyclophilin B等氧化应激诱导因子(secreted oxidative-stress factor, SOXF)分泌,活化ERK1/2,促进VSMC增殖^[3,4]。但这些氧化应激诱导因子作用于ERK1/2引起VSMC增殖的机制并不清楚。由于HSP90通常是以分子伴侣的形式参与信号通路的调控,本文主要探讨HSP90是否也以分子伴侣的形式在细胞内参与氧化应激激活的ERK1/2信号通路的调控。

1 材料与方法

1.1 材料

格尔德霉素(geldanamycin, Gel)购自Alomone Labs(美国)。可溶性鸟苷酰环化酶抑制剂(6-Anilinoquinoline-5,8-quinolinedione, LY83583)购自Cayman化学公司(美国)。蛋白A agrose购自Sigma(美国)。兔抗大鼠HSP90(H-114)、ERK1/2(C-14),小鼠抗大鼠p-ERK1/2(E-4)和 β -Actin(C-2),蛋白免疫印迹化学发光检测试剂盒购自Santa Cruz Biotechnology(美国)。辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔及山羊抗小鼠免疫球蛋白二抗购自武汉Boster。BCA蛋白含量测定试剂盒为Hyclone-Pierce(美国)产品。含酚红低糖DMEM粉末及胎牛血清为Gibco(美国)公司产品。

1.2 血管平滑肌细胞培养及鉴定

取 150 ± 5 g雄性SD大鼠胸主动脉中层平滑肌,贴块法培养细胞原代,实验用4~12代平滑肌细胞,处理前先用含0.1%胎牛血清的培养基饥饿24 h。取第二代传代细胞,采用小鼠抗大鼠 α -Actin抗体用SP免疫组织化学法鉴定VSMC。

1.3 细胞处理

用活性氧释放化合物LY83583($1 \mu\text{mol/L}$,用PBS溶解)处理4~12代VSMC不同时间(0 min、5 min、10 min、30 min、60 min、90 min、120 min和180 min)。

实验分为4组:对照组用PBS处理120 min; LY组用LY83583($1 \mu\text{mol/L}$, PBS溶解)处理120 min; Gel + DMSO + LY组先用Gel($5 \mu\text{mol/L}$, DMSO溶解)预处理30 min,再用LY83583($1 \mu\text{mol/L}$)处理120 min; DM-

SO+ LY组先用DMSO预处理30 min,再用LY83583($1 \mu\text{mol/L}$)处理120 min。

1.4 蛋白免疫印迹试验

用冰PBS洗涤处理好的VSMC 3次,用含有25 mmol/L MES、0.15 mol/L NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、60 mmol/L Octyl glucoside、2 $\mu\text{mol/L}$ leupeptin、1 mmol/L PMSF的裂解液在冰浴条件下裂解细胞,4 $^{\circ}\text{C}$, $8\,000 \times g$ 离心10 min,取上清液,BCA法进行蛋白定量。取相等的蛋白样本(80 μg 总蛋白量/泳道)加入等体积上样缓冲液和5% β -巯基乙醇,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮3 min,使蛋白变性。10% SDS-PAGE电泳(积层胶80 mV,分离胶120 mV)、转膜(100 mA 120 min或60 mA 240 min)至PVDF膜上。5%脱脂牛奶室温封闭60 min,1:1 000加入兔抗大鼠HSP90、ERK1/2及小鼠抗大鼠p-ERK1/2、 β -actin多克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(或37 $^{\circ}\text{C}$, 90 min),TBS-T洗膜。1:1 500加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG或山羊抗小鼠IgG,室温孵育60 min(或37 $^{\circ}\text{C}$, 45 min),TBS-T洗膜,显影。结果用Alphalmager 2200图像分析仪分析,以面积和吸光度的乘积即积分吸光度表示。

1.5 免疫沉淀试验

收集细胞总蛋白,定量,取等量蛋白,补齐致100 μL ,加入2 μL 的兔抗大鼠HSP90的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育45 min,然后加入蛋白A agrose以沉淀HSP90抗原-抗体复合物,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min。 $2\,000 \times g$ 离心2 min,轻轻的吸出上清,尽量吸尽液体,用裂解液清洗3次,最后用50 μL PBS重悬蛋白复合物,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。临用前加入适量5 \times sample buffer(Tris base 0.31 mol/L, pH 6.8, 2.5% SDS, 50%甘油, 0.125% brusphephenol蓝),100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸5 min,使蛋白变性,蛋白免疫印迹检测ERK1/2和p-ERK1/2。

1.6 免疫荧光

将处理后的细胞用PBS洗3次,每次5 min,用含0.01% Triton X-100的PBS处理1 min,再用100%甲醇-20 $^{\circ}\text{C}$ 固定3 min,用含1%山羊血清的PBS(pH 7.5)封闭30 min以阻断与抗体非特异结合的位点,兔抗大鼠的p-ERK1/2一抗用含1%山羊血清稀释(1:50),加到6孔板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 水育,孵育30 min。用37 $^{\circ}\text{C}$ PBS洗3次,每次10 min, FITC标记的二抗用1%山羊血清稀释(1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 水育,孵育30 min,用37 $^{\circ}\text{C}$ PBS洗3次,每次10 min。荧光倒置显微镜观察。

1.7 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS11.0统计软件分析,组间 Q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠血管平滑肌细胞鉴定

取第二代传代细胞, 采用小鼠抗大鼠 α Actin 抗体用 SP 免疫组织化学法鉴定血管平滑肌细胞肌动蛋白, 可见阳性结果即胞浆呈棕黄色(图 1)。

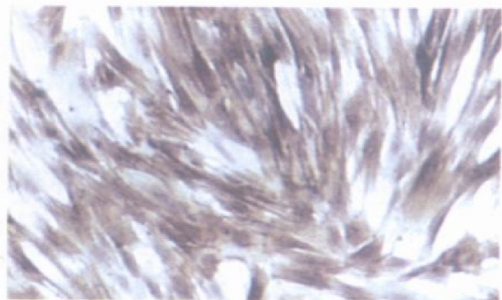


图 1. SP 免疫组织化学法鉴定血管平滑肌细胞肌动蛋白 α Actin ($\times 100$)

2.2 氧化应激大鼠血管平滑肌细胞不同时间后细胞内热休克蛋白 90 的蛋白表达和细胞外信号调节激酶 1/2 的活化

蛋白质免疫印迹法检测细胞内 HSP90 蛋白表达和 ERK1/2 及其活化, 并用与 β Actin 的灰度比进行统计学分析。1 μ mol/L 的 LY83583 处理平滑肌细胞不同时间后, 细胞内 HSP90 表达逐渐增加, 120 min 时达到高峰, 较 0 min 时升高了约 9 倍; ERK1/2 在 5 min 时表达增加, 之后维持在高表达的水平; p-ERK1/2 在 10 min 和 120 min 有 2 个活化高峰。HSP90 在细胞内的表达高峰与 p-ERK1/2 的第二个活化高峰一致(图 2)。

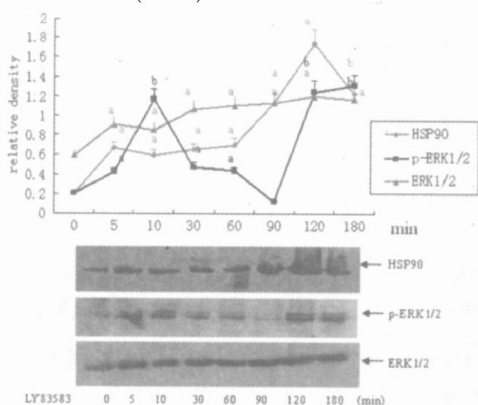


图 2. 蛋白质免疫印迹法检测 LY83583 处理大鼠血管平滑肌细胞不同时间后细胞内热休克蛋白 90 的蛋白表达和细胞外信号调节激酶 1/2 的活化($\bar{x} \pm s, n = 4$) a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与同组的 0 min 比较。

2.3 氧化应激后热休克蛋白 90 与细胞外信号调节激酶 1/2 和磷酸化的细胞外信号调节激酶 1/2 的结合增加

用 HSP90 的一抗沉淀后再用 ERK1/2 及 p-ERK1/2 的抗体检测, 并用各组灰度值与 Ig G 和对照组的灰度值之比进行统计学分析。LY83583 处理血管平滑肌细胞 120 min 后 HSP90 与 ERK1/2 及 p-ERK1/2 结合较对照组分别升高了 1.6 倍($P < 0.05$)和 5.5 倍($P < 0.01$); 而 5 μ mol/L geldanamycin (HSP90 特异性的阻断剂) 预处理 30 min 后, LY83583 则不能增加二者的结合, 但用 DMSO (geldanamycin 的溶媒) 预处理则不能降低由 LY83583 处理引起的结合(图 3 和表 1)。

表 1. LY83583 促进血管平滑肌细胞内热休克蛋白 90 与细胞外信号调节激酶 1/2 和磷酸化的细胞外信号调节激酶 1/2 的结合($\bar{x} \pm s, n = 4$)

分 组	ERK1/2 相对灰度值	p-ERK1/2 相对灰度值
对照组	1	1
LY 组	1.62 \pm 0.23 ^{ac}	5.53 \pm 0.31 ^{bd}
Gel+ DMSO+ LY	1.12 \pm 0.15	0.87 \pm 0.13
DMSO+ LY	1.83 \pm 0.27 ^{ac}	5.72 \pm 0.32 ^{bd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 Gel+ DMSO+ LY 组比较。

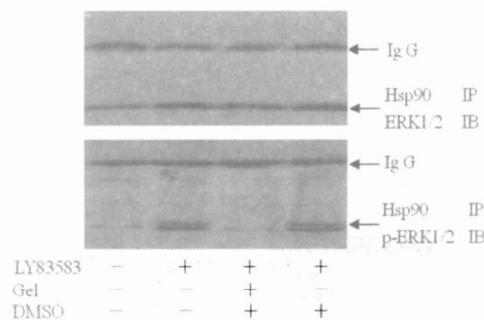


图 3. LY83583 处理 120 min 后血管平滑肌细胞内热休克蛋白 90 与细胞外信号调节激酶 1/2 和磷酸化的细胞外信号调节激酶 1/2 结合增加

2.4 热休克蛋白 90 与细胞外信号调节激酶 1/2 和磷酸化的细胞外信号调节激酶 1/2 的结合能增加细胞内磷酸化的细胞外信号调节激酶 1/2

提取细胞总蛋白, 蛋白质免疫印迹检测 ERK1/2 和 p-ERK1/2, 用二者的灰度值分别与相应的 β Actin 和对照组的灰度值比较得到相对灰度值。统计分析结果表明 LY83583 处理 VSMC 120 min 后, 细胞内 ERK1/2 表达较对照组增高 1.3 倍($P < 0.05$), 而 p-ERK1/2 的量增加了 6.1 倍($P < 0.01$); 5 μ mol/L

geldanamycin(HSP90 特异性的阻断剂) 预处理不能降低因 LY83583 刺激引起的 ERK1/2 蛋白表达的增加, 但是能降低其活化($P < 0.01$) (图 4 和表 2)。

表 2. 格尔德霉素预处理降低氧化应激引起平滑肌细胞内磷酸化细胞外信号蛋白激酶 1/2 的增加 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	ERK1/2 相对灰度值	p-ERK1/2 相对灰度值
对照组	1	1
LY	1.27 ± 0.13 ^a	6.13 ± 0.52 ^{bd}
Gel+ DMSO+ LY	1.35 ± 0.21 ^a	1.15 ± 0.20
DMSO+ LY	1.30 ± 0.17 ^a	6.06 ± 0.47 ^{bd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 Gel+ DMSO+ LY 组比较。

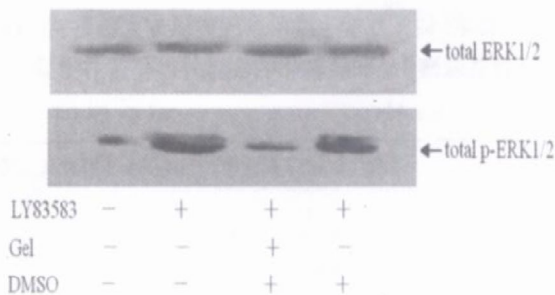


图 4. 蛋白质免疫印迹检测热休克蛋白 90 对氧化应激引起的血管平滑肌细胞内磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 增加的影响

2.5 氧化应激后热休克蛋白 90 对磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 核转位的影响

LY83583 处理 120 min 能显著增加细胞核内 p-ERK1/2; 5 μmol/L Gel(HSP90 特异性的阻断剂) 预处理后 LY83583 的这种效应被降低(图 5)。

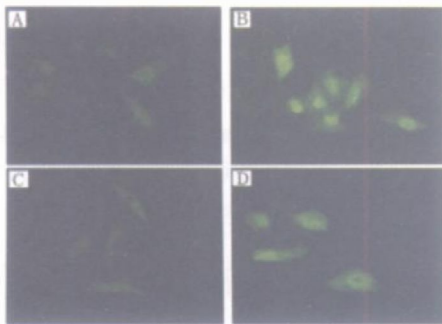


图 5. 免疫荧光检测热休克蛋白 90 对氧化应激的血管平滑肌细胞内磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 核转位的影响($\times 400$) A 为对照组, B 为 LY83583 组, C 为 Gel+ DMSO+ LY 组, D 为 DMSO+ LY 组。

3 讨论

细胞外信号调节激酶(ERK1/2) 是丝裂原蛋白

活化激酶家族的重要成员, 可被多种胞外刺激介导的细胞信号转导通路激活, 与细胞增殖肥大关系密切^[5]。LY83583 能自由通过细胞膜进入 VSMC 内, 通过 NADH/NADPH 氧化酶产生 O_2^- 。Liao 等^[3,4] 在对体外培养的大鼠 VSMC 实验中用 1 μmol/L 的 LY83583 模拟氧化应激, 发现培养液中的 HSP90 和 Cyclophilin A 等氧化应激诱导因子增多, 从而促进 ERK1/2 活化, 继而引起 VSMC 的增殖。本实验用 1 μmol/L 的 LY83583 模拟氧化应激, 刺激体外培养的大鼠 VSMC 不同时间, 发现细胞内的 ERK1/2 表达增加, 但与刺激时间无关, 这可能与 HSP90 与 ERK1/2 结合增加其稳定性、后期通过转录翻译水平来上调 ERK1/2 有关, 本文中未深入探讨。p-ERK1/2 在受到氧化应激刺激 10 min 和 120 min 后出现 2 个活化高峰, 以上结果与文献报道一致, 氧化应激中 ERK1/2 的前一个活化高峰主要依赖于蛋白激酶 C 和钙调蛋白, 120 min 的活化高峰机制比较复杂^[3,4]。实验还发现细胞内 HSP90 随氧化应激刺激时间的延长逐渐增加, 在 120 min 达到高峰, 与 ERK1/2 的第二个活化高峰一致。文献报道 VSMC 氧化应激后细胞外液中的 HSP90 增加, 但本实验结果不能证明细胞内增加的 HSP90 是否与细胞外液中增加的 HSP90 有关。

分子伴侣不仅与胞内蛋白的折叠与组装密切相关, 影响蛋白质的转运、定位或分泌, 而且与信号转导中的信号分子的活性状态与活性行为相关连, 具有重要的生理意义^[6,7]。HSP90 作为一种分子伴侣, 常和 Cdc37、Cyp40 等联合分子伴侣、客体蛋白形成复合物, 调节信号分子的成熟、定位或转运^[8-13]。氧化应激中 ERK1/2 的后一个活化高峰机制比较复杂, 本实验中与细胞内 HSP90 高峰一致。由此, 推测 HSP90 也可能以分子伴侣的形式参与 ERK1/2 第二个活化高峰的信号调控, 由于在细胞定位和时间上有了可能, 所以本实验也就选取了 120 min 这个时间点。

格尔德霉素为 HSP90 天然的抑制剂, 通过与 HSP90 肽链 N 端 ADP/ATP 位点结合, 抑制 HSP90 的弱 ATP 酶活性, 妨碍其分子伴侣功能的发挥^[14,16]。本实验用细胞总蛋白进行免疫共沉淀, 结果显示氧化应激能增加 HSP90 与 p-ERK1/2 结合, 但格尔德霉素预处理后能减低氧化应激引起的这种效应。由于实验采用的是细胞总蛋白来进行免疫沉淀, 说明格尔德霉素减低 HSP90 与 p-ERK1/2 的结合是通过与细胞内的 HSP90 相互作用, 但本实验结果并不能说明格尔德霉素是否会与细胞外的 HSP90 结合来减

少 p-ERK1/2。实验还发现格尔德霉素并不能完全阻断氧化应激引起的 HSP90 与 p-ERK1/2 的结合,说明 HSP90 上至少有 2 个不同的结合位点, p-ERK1/2 只有一部分是与 HSP90 肽链 N 端 ADP/ATP 位点结合。实验还发现预先用格尔德霉素阻断 HSP90,可以减少氧化应激激活的 p-ERK1/2,但 ERK1/2 无影响,推测 HSP90 与 ERK1/2 的结合可能与 ERK1/2 的活化有关,也可能与 ERK1/2 或者 p-ERK1/2 的稳定性有关,还有待进一步实验证实。免疫荧光实验结果显示氧化应激后细胞核内 p-ERK1/2 增加,格尔德霉素能减弱这种效应。说明 HSP90 与 p-ERK1/2 的结合对于 p-ERK1/2 的核转位有重要作用。有理由相信,HSP90 与 ERK1/2 信号通路机制的进一步阐明,将会为防治氧化应激引起的血管平滑肌细胞增殖提供新的分子靶点。

[参考文献]

- [1] Velarde V, Cerda PM, Duarte C, Arancibia F, Abbott E, Gonzalez A, et al. Role of reactive oxygen species in bradykinin induced proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Biol Res*, 2004, **37** (3): 419-430
- [2] Yamakawa T, Tanaka S, Yamakawa Y, Kamei J, Numaguchi K, Motley ED, et al. Lysophosphatidylcholine activates extracellular signal-regulated kinases 1/2 through reactive oxygen species in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (5): 752-758
- [3] Jin ZG, Melaragno MC, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress [J]. *Circ Res*, 2000, **87** (9): 789-796
- [4] Liao DF, Jin ZG, Baas AS, Daum G, Gygi SP, Aebersold R, et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (1): 189-196
- [5] 秦旭平, 廖端芳. 血管平滑肌细胞增殖及其调控[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 450-454
- [6] Bohlen SP. HSP90 mutants disrupt glucocorticoid receptor ligand binding and destabilize aporeceptor complexes [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270** (49): 29 433-438
- [7] Pratt L, Digiosia J, Swenson JN, Trampe B, Martin CB Jr. Reversible fetal hydrops associated with indomethacin use [J]. *Obstet Gynecol*, 1997, **90** (4pt2): 676-678
- [8] Sharp S, Workman P. Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Adv Cancer Res*, 2006, **95**: 323-348
- [9] Miyata Y, Ikawa Y, Shibuya M, Nishida E. Specific association of a set of molecular chaperones including HSP90 and Cdc37 with MOK, a member of the mitogen-activated protein kinase superfamily [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (24): 21 841-848
- [10] Sain N, Krishnan B, Omerod MG, De Rienzo A, Liu WM, Kaye SB, et al. Potentiation of paclitaxel activity by the HSP90 inhibitor 17-allylaminor 17-demethoxygeldanamycin in human ovarian carcinoma cell lines with high levels of activated AKT [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, **5** (5): 1 197-208
- [11] Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to HSP90 [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97** (20): 10 832-837
- [12] Papanthanasias AE, MacDonald NJ, Bencsura A, Vu HA. F1F0-ATP synthase functions as a co-chaperone of HSP90-substrate protein complexes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **345** (1): 419-429
- [13] Young JC, Moarefi I, Hartl FU. HSP90: a specialized but essential protein folding tool [J]. *J Cell Biol*, 2001, **154** (2): 267-273
- [14] Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery [J]. *Exp Biol Med*, 2003, **228** (2): 111-133
- [15] Uehara Y. Natural product origins of HSP90 inhibitors [J]. *Curr Cancer Drug Targ*, 2003, **3** (5): 325-330
- [16] Workman P. Pharmacogenomics in cancer drug discovery and development: inhibitors of the HSP90 molecular chaperone [J]. *Cancer Detect Prev*, 2002, **26** (6): 405-410

(此文编辑 胡必利)

•读者•作者•编者•

关于 E-mail 投稿的要求及注意事项

本刊编辑部

由于网络的发展,E-mail 投稿已成为越来越多的期刊编辑部采用,我刊也不例外。与传统信函邮寄投稿相比较,E-mail 投稿具有快捷、方便、直观等特点,且费用低廉。然而,在接受 E-mail 投稿过程中我们发现,稿件文本不一,格式各异。有些甚至直接将文章放在书写窗口内,经过传输,文章早已面目全非,又没有纸打印稿作对照,不知文章里写了些什么,尤其是当今计算机病毒肆虐,新的病毒层出不穷,一不小心染上病毒,整个文件就要被删除。为规范 E-mail 投稿,确保其安全性,我刊特作如下规定:

- 1、E-mail 投稿时,必须把文章作为附件发送,严禁将文章放在 E-mail 书写窗口内。
- 2、附件中的文章应为 Word 格式。书写时,进入 Word 界面后,应首先进入页面设置窗口设置页面,参数如下: 纸型为 A4; ④页边距上为 2.0 mm,下为 2.0 mm,左为 2.2 mm,右为 2.0 mm; ④文档网格为每行 45 个汉字,每页 40 行; 字体为中文宋体、常规、五号。然后点击选择其它参数,如“单倍行距”、“两端对齐”、“页面显示”等。
- 3、插图粘贴于正文相应位置中,表格直接在正文中绘制;标题与注释直接写于正文相应位置,严禁以文本框形式插入。
- 4、E-mail 投稿时,科研基金资助项目批准书的复印件和单位介绍信这两件不要扫描放入 E-mail 内,请另用信函形式邮寄编辑部,以方便存档。
- 5、请在 E-mail 附件内写明联系方式。
- 6、我刊的 E-mail 投稿地址为 dmzjb@163.net 或 dmzjb@163.com,二者选一即可。