

• 基础实验研究论著 •

重组质粒 AHA1 的构建和表达及对 HeLa 细胞周期的影响*

蒋智文^{1,2}, 郑慧玲^{1,2}, 陈维春^{1,2,3}, 刘新光^{1,2,3,△}

(1. 广东医学院衰老研究所, 广东东莞 523808; 2. 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

摘要:目的 构建 AHA1 的真核表达质粒,并在 HeLa 细胞中进行表达,然后检测过表达的 AHA1 重组蛋白对 HeLa 细胞周期的影响。方法 提取 HeLa 细胞中总 RNA,逆转录成 cDNA 后,设计引物扩增 AHA1 基因的编码序列后构建到 pCMV-HA 真核表达载体中,转染 HeLa 细胞后使用 HA 标签抗体通过免疫印迹检测 AHA1 融合蛋白在细胞中的表达,最后分别使用流式细胞仪和 CCK-8 方法检测 HeLa 细胞的周期和增殖的变化。结果 pCMV-HA-AHA1 重组质粒经 PCR 和 DNA 限制性内切酶酶切鉴定,最后通过 DNA 测序并经序列相似性比对,确定 AHA1 重组质粒构建成功;在 HeLa 细胞中转染 pCMV-HA-AHA1 重组质粒后,免疫印迹结果显示 AHA1 融合蛋白在细胞确已经实现过表达,经流式细胞仪和 CCK-8 方法检测发现,过表达的 AHA1 蛋白对 HeLa 细胞的周期和增殖影响不大。结论 成功构建了 pCMV-HA-AHA1 重组质粒,并且在 HeLa 细胞成功过表达,且过表达的 AHA1 蛋白对 HeLa 细胞的周期和增殖影响不大。

关键词: HeLa 细胞; 免疫印迹法; 细胞周期

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)08-0913-03

Detected cell cycle and proliferation after the recombinant protein AHA1 was expressed in HeLa cells*

Jiang Zhiwen^{1,2}, Zheng Huiling^{1,2}, Chen Weichun^{1,2,3}, Liu Xin'guang^{1,2,3,△}

(1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Dongguan, Guangdong 523808, China;

3. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

Abstract: Objective To construct eukaryotic expression plasmid of AHA1 and express the recombinant protein in HeLa cells, and then detect HeLa cell cycle and proliferation. **Methods** HeLa cells' total RNA was extracted and reversed transcribed to cDNA, and then constructed pCMV-HA-AHA1 recombinant plasmid. After recombinant vector was transfected in HeLa cells, confirmed AHA1 fusion protein over-expressed by Western Blotting with HA antibody, and applied flow cytometry and CCK-8 assay detected cell cycle and cell proliferation. **Results** AHA1 recombinant vector was identified by PCR and DNA digestion, and was confirmed by DNA sequencing and BLAST compared. HeLa cell cycle and cell proliferation were almost unaffected by over-expressed AHA1 fusion protein. **Conclusion** AHA1 recombinant plasmid was constructed and over-expressed in the HeLa cells, but over-expressed AHA1 has little effect on the cell cycle and cell proliferation.

Key words: HeLa cells; immunoblotting; cell cycle

AHA1 是 Hsp90/Hsp70 分子伴侣机制中普遍存在的协同分子伴侣^[1]。AHA1 与 Hsp90 相互作用,并且 AHA1 结合于 Hsp90 的中部区域进而激发 ATPase 的活性^[2-3]。对于酵母和人类细胞中的下游蛋白,过表达的 AHA1 不仅能够帮助修复 Hsp90 行使分子伴侣的功能接近至野生型的水平,甚至还能够直接代偿 Hsp90 的部分功能^[4-5]。Hsp90 蛋白在维持细胞活力的信号通路中具有重要作用,抑制 Hsp90 蛋白能够阻断参与肿瘤形成的众多 Hsp90 下游蛋白的表达,所以 Hsp90 能够作为肿瘤治疗中的一个分子靶标^[6-7]。Hsp90 蛋白的抑制剂还能诱导 DNA 损伤、细胞周期停滞进而介导肿瘤细胞的衰老^[8-10]。17-丙炔胺基-17-去甲氧基格尔德霉素(17-AAG)、格尔德霉素和根赤壳菌素等 Hsp90 蛋白的抑制剂抑制肿瘤细胞的增殖时,AHA1 的表达量却持续上调^[8,11-12]。由此研究者猜想细胞中过表达的 AHA1 蛋白也可能对细胞的增殖具有一定

影响。本课题组尝试将 AHA1 构建到带有 AH 标签的真核表达载体上,转染 HeLa 细胞后,分别使用流式细胞仪测定细胞周期和 CCK-8 方法测定细胞的增殖。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 HeLa 细胞株购自中国科学院细胞库;大肠杆菌 E. coli DH5 α 为本室保存。

1.2 仪器与试剂 TRIzol 和 LipofectamineTM 2000 试剂购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒 PrimeScript II cDNA 首链合成试剂盒, EcoR I 和 Bgl II DNA 限制性内切酶以及 T4 DNA 连接酶均购自于 TaKaRa 公司;PCR 清洁试剂盒, DNA 凝胶回收试剂盒与质粒 DNA 小量提取试剂盒购自 Axygen 公司;质粒提取试剂盒购自 Roche 公司;HA 抗体购自 Roche 公司;PI 试剂购自 Sigma 公司;细胞计数试剂盒 CCK-8/WST-8 试剂盒购自株式会社同仁化学研究所。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672205、30871440、30971620、81170327);广东省自然科学基金资助项目(8452402301001450);广东省高等学校自然科学研究重点项目(06Z015);广东医学院科技创新基金资助项目(STIF201102);广东医学院青年基金资助项目(Q2010009)。

作者简介:蒋智文,男,研究实习员,主要从事细胞衰老相关机制研究。△ 通讯作者,E-mail:xgliu64@126.com。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 使用 Primer5.0 软件设计扩增 AHA1 基因编码序列的特异性引物如下:5'-CGG AAT TCT GAT GGC CAA GTG GGG TGA GGA G-3';5'-CCG AGA TCT CTA AAA TAA GCG TGC GCC ATA GCC-3'下划线部分为相应的 EcoR I、Bgl II 酶切位点,引物由上海生工合成。

1.3.2 扩增目的基因 HeLa 细胞总 RNA 提取按 TRIzol 试剂说明书进行,提取总 RNA 后,按照反转录试剂盒的说明书的步骤反转录合成 cDNA,然后使用合成的 AHA1 特异性引物进行 PCR,扩增条件为:94 ℃ 5 min,(94 ℃ 45 s,65 ℃ 1 min,72 ℃ 80 s) 30 次循环,72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存;PCR 结束后,使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,然后回收目的基因 AHA1 的 DNA 片段。

1.3.3 重组质粒 pCMV-HA-AHA1 的构建 使用 EcoR I 和 Bgl II 两种 DNA 限制性内切酶在 37 ℃ 水浴条件下分别酶切 AHA 基因片段和 pCMV-HA 质粒,回收酶切的 DNA 片段后使用 T4 DNA 连接酶于 16 ℃ 水浴锅中连接过夜,然后使用热激法转化 CaCl₂ 处理的 E. coli DH5α 的感受态细菌,倒置培养于 37 ℃ 温箱过夜后,挑取单菌落扩大培养后,分别使用 PCR 与 EcoR I 和 Bgl II 两种 DNA 限制性内切酶酶切的方式进行初步鉴定,最后送样品至上海生工测序并进行序列相似性分析比较,确定重组质粒构建成功。

1.3.4 提取质粒 使用质粒提取试剂盒大量提取构建成功的 pCMV-HA-AHA1 重组质粒,然后使用美国 Nanodrop 公司的 ND-1000 紫外分光光度仪测量其 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值和浓度,于 -20 ℃ 保存备用。

1.3.5 细胞转染 使用 Invitrogen 公司的 Lipofectamine™ 2000 转染真核质粒。24 h 后在 6 孔板中接种 1×10⁶ 个 HeLa 细胞,然后在细胞铺满 6 孔板的平面 80%~90% 的时候按操作说明进行转染,转染 48 h 后,收集细胞进行免疫印迹检测和细胞周期的检测。

1.3.6 免疫印迹 将提取的细胞总蛋白样品,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,低温快速速转 1 h,将蛋白转印至聚偏氟乙烯膜上,室温 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,添加抗体于 4 ℃ 孵育过夜,然后取出在室温条件下用含有 0.2% 吐温 20 的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液清洗 3 次,每次 10 min,之后添加辣根过氧化物酶标记的抗 HA 抗体于室温孵育 1 h,最后用含有 0.2% 吐温 20 的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液清洗 4 次,三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液浸泡数分钟后,添加辣根过氧化物酶显色液于暗室进行显影和定影。

1.3.7 细胞周期检测 离心收集细胞,使用磷酸盐缓冲液清洗细胞 1 次,加入含 50 μg/mL 溴化乙啶,100 μg/mL 核糖核酸酶 A,0.25% 聚乙二醇辛基苯基醚的磷酸盐缓冲液 1 mL,室温避光孵育 10 min 后,用微量加样器轻轻吹打数次,经滤膜过滤后,使用美国贝迪公司的 FACS Canto II 流式细胞仪检测 1×10⁴ 个细胞,结果用细胞周期拟合软件 ModFit 进行分析。

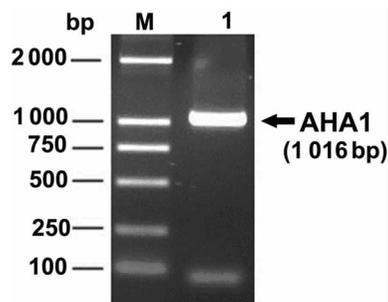
1.3.8 细胞增殖分析 在 HeLa 细胞分别转染 pCMV-HA-AHA1 重组质粒和空载体 48 h 后,消化细胞制备细胞悬液,分别在 96 孔板中接种等比例的上述两组细胞,每组细胞设 4 个复孔,将培养板放在培养箱(37 ℃,5% CO₂)中预培养 2 h,然后每孔加入 10 μL 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐(CCK8/WST-8)溶液,将培养板

在培养箱内孵育 2 h,取出 96 孔板,使用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 进行统计分析,数据资料采用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

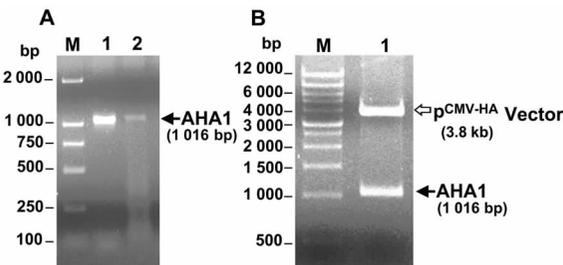
2.1 AHA1 基因编码序列的扩增 提取 HeLa 细胞总 RNA,经反转录,成功扩增出 AHA1 的基因片段,如图 1 所示 AHA1 基因大小为 1 016 bp,与预期结果相符。



M: DNA 标记物 DL2000;1:扩增的 AHA1 基因编码序列。

图 1 通过 RT-PCR 的方法从 HeLa 细胞中扩增 AHA1 的基因编码序列

2.2 重组质粒 pCMV-HA-AHA1 的构建和鉴定 将用 EcoR I 和 Bgl II 双酶切的的目的基因片段插入同样双酶切的 pCMV-HA 质粒中,构建 pCMV-HA-AHA1 重组质粒。挑选阳性克隆于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基培养,然后提取质粒进行 PCR 鉴定,结果如图 2A 所示,以所挑克隆的质粒为模板都能扩增出 AHA1 的基因编码序列,表明 AHA1 的基因编码序列可能已经插入到 pCMV-HA 载体中。提取其中的一个克隆的质粒进一步使用 EcoR I 和 Bgl II 两种 DNA 限制性内切酶进行酶切,然后经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图 2B,图中箭头所指示的是 AHA1 基因的编码序列,在其上方具有 pCMV-HA 空载体的片段,由此可以判定 AHA1 已经成功构建到 pCMV-HA 载体中。挑选一个阳性克隆的菌液送上海生工公司进行 DNA 测序,并通过序列相似性分析比较,发现重组质粒中的 AHA1 序列与 AHA1 基因的编码序列相符,与预期结果相符,表明 pCMV-HA-AHA1 重组质粒构建成功。



M: DNA 标记物;1,2:单克隆 1 和 2。

图 2 重组质粒 pCMV-HA-AHA1 重组质粒的 PCR 和 DNA 双酶切鉴定

2.3 AHA1 在 HeLa 细胞中的表达 在 HeLa 细胞中分别转染 AHA1 的重组质粒和空载体,48 h 后收集细胞裂解液,收集 HeLa 细胞的总蛋白裂解液,使用 HA 抗体通过免疫印迹检测 AHA1 真核表达载体在 HeLa 细胞中的表达。结果如图 3 所示,AHA1 融合蛋白在细胞中成功过表达。

2.4 AHA1 蛋白对细胞周期的影响 在 HeLa 细胞中分别转

染 AHA1 的重组质粒和空载体 48 h 后,使用流式细胞仪测定细胞的周期,分别计数 1×10^4 个细胞,然后使用细胞周期拟合的 ModFit 软件分析结果。重复试验 3 次,分别转染 AHA1 的重组质粒和空载体对 HeLa 细胞的 G_0/G_1 , S 和 G_2/M 期的影响无明显差别。

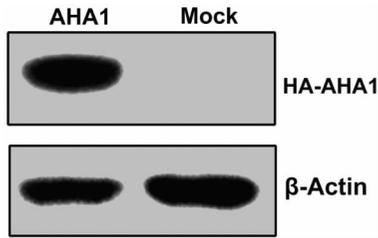


图 3 AHA1 重组蛋白的表达

2.5 AHA1 蛋白对细胞增殖的影响 在 HeLa 细胞中分别转染 AHA1 的重组质粒和空载体 48 h 后,使用 CCK-8 试剂盒检测过表达的 AHA1 融合蛋白对 HeLa 细胞增殖的影响,重复实验至少 3 次,进行统计学分析,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明过表达 AHA1 融合蛋白并不能影响 HeLa 细胞的增殖。

3 讨论

从酵母到人类细胞中, AHA1 蛋白都高度保守,并且 AHA1 蛋白定位于细胞的胞质中^[13-14]。而 AHA1 蛋白在细胞中主要是作为热激蛋白 Hsp90 分子伴侣机制中协同分子伴侣对下游蛋白进行调节^[1]。热激蛋白 Hsp90 家族是一组高度保守的蛋白质,在所有真核细胞中均有表达^[15]。Hsp90 形成的动力学复合体发挥分子伴侣的活性时需要协同分子伴侣和其他与之结合的蛋白的共同参与^[16],通过分子伴侣 Hsp90 介导的蛋白折叠和活化是一个依赖 ATP 驱使的复杂过程,这一过程受一类称之为协同分子伴侣的辅助蛋白调控^[17]。AHA1 是 Hsp90/Hsp70 分子伴侣机制中普遍存在的协同分子伴侣^[1]。AHA1 与 Hsp90 相互作用^[18],并且 AHA1 结合于 Hsp90 的中部区域进而激发 ATPase 的活性^[1]。AHA1 被认为是 Hsp90 的分子伴侣功能的阳性调节因子, Hsp90 蛋白的 Y313 位点的磷酸化促进 AHA1 的募集,并与 Hsp90 协同作用激发特定的下游蛋白进入活化状态^[18-19]。过表达的 AHA1 不仅能够修复 Hsp90 的分子伴侣功能接近至野生型的水平,甚至还能够直接代偿 Hsp90 的部分功能^[4-5]。

Hsp90 作为真核细胞中的分子伴侣和激蛋白广泛参与特定的结构和功能蛋白的成熟过程,并在信号转导过程中具有重要作用,而且还能影响细胞周期和存活,而抑制 Hsp90 蛋白则能够阻断参与肿瘤形成的众多 Hsp90 下游蛋白的表达,因此 Hsp90 已经被用作治疗癌症的分子靶标^[20]。而 17-AAG 等 Hsp90 蛋白的抑制剂在抑制肿瘤细胞的增殖时, AHA1 的表达量却持续上调^[12]。而细胞中 AHA1 的表达被沉默后,则能增强肿瘤细胞对 17-AAG 的敏感性^[12]。而在 HeLa 细胞中过表达 AHA1 蛋白后,检测 HeLa 细胞周期与增殖的变化时发现,在 HeLa 细胞单独过表达 AHA1 其实对细胞周期和增殖影响并不明显。这与在细胞中增加 AHA1 蛋白的表达量却不能影响肿瘤细胞对 17-AAG 的敏感性,似乎相一致。表明细胞中 AHA1 在细胞中作为 Hsp90 的协同分子伴侣,表达量的降低比表达量上调更有意义,这与 AHA1 作为 Hsp90 的分子伴侣功能的阳性调节因子,并能够在细胞中直接代偿 Hsp90

的部分功能,似乎也是殊途同归^[19]。这可能与 AHA1 蛋白主要是参与 Hsp90 下游蛋白的激活而不是稳定下游蛋白的功能相关^[12]。

而 Hsp90 蛋白的抑制剂还能诱导 DNA 损伤、细胞周期停滞进而介导肿瘤细胞的衰老。衰老和饮食限制能够改变小鼠脑和肝中的 Hsp90 与 20s 蛋白酶体复合体的相互作用^[8,21]。而在年老的沙鼠海马中 Hsp90 的蛋白水平显著高于成年的沙鼠海马^[16]。并且在衰老的人类成纤维细胞中,抑制 Hsp90 的活性导致 p53 迅速降解^[22],而在小细胞肺癌细胞中,抑制 Hsp90 的活性主要是导致早老而不是细胞死亡^[8]。而 Hsp90 蛋白的抑制剂 17AAG 则能促进细胞损伤进而介导细胞衰老^[7]。而 AHA1 作为 Hsp90 的协同分子伴侣,是否与 Hsp90 一样也在细胞衰老中具有一定的作用,目前还不得而知,虽然在细胞中过表达 AHA1 蛋白,并没有观察到 HeLa 细胞周期和增殖的变化,但这并不能排除 AHA1 在细胞衰老中同样具有一定的作用,下一步计划通过抑制 AHA1 在细胞中的表达,或许有助于揭示 AHA1 在细胞衰老中的功能。

参考文献

- [1] Ran F, Gadura N, Michels CA. Hsp90 cochaperone Aha1 is a negative regulator of the Saccharomyces MAL activator and acts early in the chaperone activation pathway[J]. J Biol Chem, 2010, 285 (18): 13850-13862.
- [2] Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, et al. Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1 [J]. Mol Cell, 2002, 10(6): 1307-1318.
- [3] Chua CS, Low H, Lehming N, et al. Molecular analysis of Plasmodium falciparum co-chaperone Aha1 supports its interaction with and regulation of Hsp90 in the malaria parasite[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(1): 233-245.
- [4] Mollapour M, Tsutsumi S, Truman AW, et al. Threonine 22 phosphorylation attenuates Hsp90 interaction with cochaperones and affects its chaperone activity[J]. Mol Cell, 2011, 41(6): 672-681.
- [5] Schmid S, Hugel T. Regulatory posttranslational modifications in hsp90 can be compensated by cochaperone aha1 [J]. Mol Cell, 2011, 41(6): 619-620.
- [6] Richardson PG, Mitsiades CS, Laubach JP, et al. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers[J]. Br J Haematol, 2011, 152 (4): 367-379.
- [7] Hasegawa A, Nakahara H, Kinoshita M, et al. Cellular and extracellular matrix changes in anterior cruciate ligaments during human knee aging and osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(1): R29.
- [8] Restall IJ, Lorimer IA. Induction of premature senescence by hsp90 inhibition in small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11076.
- [9] Calderwood SK. Heat shock proteins in breast cancer progression—a suitable case for treatment? [J]. Int J Hyperthermia, 2010, 26(7): 681-685.
- [10] Calderwood SK, Gong J. Molecular chaperones in mammary cancer growth and breast tumor therapy[J]. J Cell Biochem, 2012, 113 (4): 1096-1103.
- [11] Zaidi S, McLaughlin M, Bhide SA, et al. The HSP90 inhibitor NVP-AUY922 radiosensitizes by abrogation of homologous recombination resulting in mitotic entry with unresolved DNA damage[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35436. (下转第 918 页)

胞溶血性疾病诊断指标相互印证^[14-15]。值得一提的是,作为血红素组成部分的甘氨酸,在溶血组中含量升高,其在 3.56 ppm 处的亚甲基峰的化学位移值在溶血组中明显向高场漂移。相关研究表明,甘氨酸的化学位移与溶液 pH 值密切相关^[16],提示溶血发生后,血浆 pH 值也发生了相应改变。

代谢组学从全局角度研究机体全部小分子代谢物的对内因刺激所产生的应答,溶血导致血标本中多种小分子代谢物的浓度发生改变,而这种改变,将会扰乱或掩盖其他因素带来的变化。例如,本研究中发现葡萄糖含量降低,乳酸等糖酵解产物物质含量上升,就与多种癌症如肝癌、肺癌等疾病的代谢模式相似,容易导致模式识别分析产生错误的结果^[17-18]。

本研究采用基于 NMR 技术的代谢组学方法,首次探讨了溶血发生后,血浆中小分子代谢物的变化。研究结果表明,溶血导致血浆中多种小分子物质浓度发生改变,涉及糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢等多种代谢路径,会影响代谢组学分析的结果。因此,在代谢组学研究中,应尽量避免使用发生溶血的样本。

参考文献

- [1] Goodacre R. Making sense of the metabolome using evolutionary computation; seeing the wood with the trees[J]. *J Exp Bot*, 2005, 56(410): 245-254.
- [2] 颜贤忠, 赵剑宇, 彭双清, 等. 代谢组学在后基因组时代的作用[J]. *波谱学杂志*, 2004, 21(2): 263-271.
- [3] Yücel D, Dalva K. Effect of in vitro hemolysis on 25 common biochemical tests[J]. *Clin Chem*, 1992, 38(4): 575-577.
- [4] Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2006, 44(3): 311-316.
- [5] 刘志峰, 李大磊, 李春梅, 等. 血清标本溶血对大鼠血液生化指标的影响[J]. *毒理学杂志*, 2007, 20(6): 392-393.
- [6] Savorani F, Tomasi G, Engelsen SB. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra[J]. *J Magn Reson*, 2010, 202(2): 190-202.
- [7] Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, et al. 750 MHz ¹H and ¹H-

13C NMR spectroscopy of human blood plasma[J]. *Anal Chem*, 1995, 67(5): 793-811.

- [8] Sun L, Hu W, Liu Q, et al. Metabonomics reveals plasma metabolic changes and inflammatory marker in polycystic ovary syndrome patients[J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(5): 2937-2946.
- [9] 杨茂龙, 孙权森, 夏德深. 二维共轭正交偏最小二乘分析及图像识别应用[J]. *计算机工程与应用*, 2008, 44(29): 36-39.
- [10] Kochhar S, Jacobs DM, Ramadan Z, et al. Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics[J]. *Anal Biochem*, 2006, 352(2): 274-281.
- [11] Psihogios NG, Gazi IF, Elisaf MS, et al. Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics[J]. *NMR Biomed*, 2008, 21(3): 195-207.
- [12] 马亚楠, 刘树业. 生理体液法分析肝硬化及肝癌患者的血清氨基酸变化[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(11): 2088-2090.
- [13] 丁晓红, 穆文广. 肝硬化患者血细胞内氨基酸检测的临床研究[J]. *临床肝胆病杂志*, 1998, 14(2): 97-99.
- [14] Griffiths WJ, Fitzpatrick M. The effect of age on the creatine in red cells[J]. *Br J Haematol*, 1967, 13(2): 175-180.
- [15] Fehr J, Knob M. Comparison of red cell creatine level and reticulocyte count in appraising the severity of hemolytic processes[J]. *Blood*, 1979, 53(5): 966-976.
- [16] Xiao C, Hao F, Qin X, et al. An optimized buffer system for NMR-based urinary metabonomics with effective pH control, chemical shift consistency and dilution minimization[J]. *Analyst*, 2009, 134(5): 916-925.
- [17] Gao H, Lu Q, Liu X, et al. Application of ¹H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(4): 782-785.
- [18] Rocha CM, Carrola J, Barros AS, et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids; NMR-based metabonomics of blood plasma[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(9): 4314-4324.

(收稿日期: 2012-11-09)

(上接第 915 页)

- [12] Holmes JL, Sharp SY, Hobbs S, et al. Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4): 1188-1197.
- [13] Lotz GP, Lin H, Harst A, et al. Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17228-17235.
- [14] Haruta M, Sussman MR. The effect of a genetically reduced plasma membrane protonmotive force on vegetative growth of Arabidopsis[J]. *Plant Physiol*, 2012, 158(3): 1158-1171.
- [15] Passinen S, Valkila J, Manninen T, et al. The C-terminal half of Hsp90 is responsible for its cytoplasmic localization[J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(20): 5337-5342.
- [16] Lee CH, Park JH, Choi JH, et al. Heat shock protein 90 and its cochaperone, p23, are markedly increased in the aged gerbil hippocampus[J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(9): 768-772.
- [17] Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein

homeostasis; emerging mechanistic insights[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(7): 515-528.

- [18] Chua CS, Low H, Lehming N, et al. Molecular analysis of Plasmodium falciparum co-chaperone Aha1 supports its interaction with and regulation of Hsp90 in the malaria parasite[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(1): 233-245.
- [19] Xu W, Mollapour M, Prodromou C, et al. Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90-P50(CDC37)-AHA1 chaperone machine[J]. *Mol Cell*, 2012, 47(3): 434-443.
- [20] Imai J, Maruya M, Yashiroda H, et al. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome[J]. *EMBO J*, 2003, 22(14): 3557-3567.
- [21] Dasuri K, Zhang L, Ebenezer P, et al. Aging and dietary restriction alter proteasome biogenesis and composition in the brain and liver[J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130(11/12): 777-783.
- [22] Sisoula C, Trachana V, Patterson C, et al. CHIP-dependent p53 regulation occurs specifically during cellular senescence[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(1): 157-165.

(收稿日期: 2012-11-29)