

依托泊苷通过蛋白酶体通路诱导白血病细胞凋亡

叶 齐^{1,2}, 王 婧², 郭学青³, 陈崇宏¹, 张俊平² (1. 福建医科大学药学院药理学系, 福建 福州 350004; 2. 第二军医大学药学院生化药理学教研室, 上海 200433; 3. 联合基因公司, 上海 200092)

[摘要] 目的 研究拓扑异构酶II抑制剂依托泊苷诱导白血病细胞 HL-60 凋亡的分子机制。方法 细胞增殖和凋亡采用四唑氮盐 (MTT)法和流式细胞仪测定, 基因芯片技术检测依托泊苷作用于 HL-60 细胞 2 h后基因表达谱的变化。应用 GenMAPP分析软件分析细胞内反应通路。结果 依托泊苷半数抑制浓度 (IC₅₀)为 (30.17±0.26) μmol/L。依托泊苷促进 HL-60 细胞凋亡, 凋亡百分率由对照组 4.38% 增加到药物处理组的 53.96%, 能显著抑制细胞内蛋白酶体降解通路 ($Z \geq 3.8$), 抑制蛋白酶体通路中的 PSMB5、PSMB7、PSMB8、PSMC3、PSMC5、RPN1 和 HLA-A 表达。结论 依托泊苷抑制 DNA 拓扑异构酶 II 可通过抑制细胞内蛋白酶体相关基因表达导致细胞凋亡。

[关键词] 依托泊苷; 白血病细胞; 蛋白酶体; 基因芯片

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)01-0025-05

Etoposide induces apoptosis via ubiquitin-proteasome pathway in HL-60 leukemia cells

YE Qi^{1,2}, WANG Jing², GUO Xueqing³, CHEN Chonghong¹, ZHANG Junping² (1. Department of Pharmacology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 2. Department of Biomedical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. United Gene Holdings Ltd., Shanghai 200092, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the molecular mechanisms of Topoisomerase II inhibitor etoposide (induced apoptosis on human leukemia HL-60 cells. **Methods** Cell growth and apoptosis were determined by MTT assay and flow cytometry. cDNA microarray was used to assess sensitive early gene expression profiles and Genmapp software was used to gene cluster and pathway analysis of the drug response. **Results** Etoposide exhibited cell growth inhibition by 50% at the concentrations of (30.17±0.26) mol/L and induced cell apoptosis from 4.38% to 53.96%. Genmapp analysis showed that etoposide significantly inhibited ubiquitin-proteasome pathway ($Z \geq 3.8$) and decreased expression of genes involved in ubiquitin-proteasome pathway (PSMB5, PSMB7, PSMB8, PSMC3, PSMC5, RPN1 and HLA(A)). **Conclusion** Etoposide induces apoptosis via decreased expression of genes in ubiquitin-proteasome pathway.

[Key words] etoposide; leukemia cells; proteasome; cDNA microarray

依托泊苷 (鬼臼乙叉甙, etoposide VP-16)是从西藏鬼臼或美国盾叶鬼臼中提取的鬼臼毒素 (podophyllin)的半合成衍生物, 临床上用于治疗急性粒细胞白血病、小细胞肺癌、淋巴瘤、睾丸肿瘤等多种恶性肿瘤^[1]。研究表明, 依托泊苷为 DNA 拓扑异构酶 II (topoisomerase II, Topo II)抑制剂, 通过与 DNA Topo II 形成药物-Topo = DNA 可裂性三元复合物, 导致细胞产生剂量依赖性的 DNA 链断裂, 促使肿瘤细胞凋亡^[2]。虽然早在 20 多年前人们就知道依托泊苷的作用靶点为 DNA 拓扑异构酶 II, 但是依托泊苷与靶点作用后细胞内调控分子或反应通路仍未完全清楚。由于药物都是直接或间接地通过影响基因

的表达及表达产物的功能而生效, 而基因芯片技术具有高通量、大规模、平行性地分析基因表达的能力, 对于药物作用分子机制研究具有很大的优势^[3]。本研究应用基因芯片技术分析依托泊苷作用于人白血病细胞系 HL-60 后的基因表达谱变化, 探讨其抗癌的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂 依托泊苷 (Sigma 公司产品)用二甲亚砜配制。RPMI 1640 培养基、四唑氮盐 (MTT)购于 Sigma 公司, 胎牛血清购于 Gibco BRL。ANNEXIN-V-FITC 凋亡检测试剂盒购于 Pharmingen 公司, 其它化学试剂均为分析纯国产试剂。

1.2 细胞增殖实验 HL-60 细胞系购于中国科学院上海细胞研究所, 细胞用含有 10% 胎牛血清 (美国 Gibco BRL)的 RPMI 1640 培养液 (美国 Sigma 公

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30472032)。

[作者简介] 叶齐 (1982-), 女, 博士研究生。

[通讯作者] 陈崇宏 . E-mail: chench2008@163.com,

张俊平 . E-mail: jzhang08@hotmail.com.

司)传代培养。细胞增殖采用四唑氮盐(MTT)法测定^[4]。对数生长期白血病 HL-60 细胞以 2×10^4 个细胞 ($100 \mu\text{l}$)加入 96 孔培养板中,实验组加入不同浓度的依托泊苷(Sigma 公司),每孔 $100 \mu\text{l}$ 每一浓度均设 5 个平行孔,对照组加入 $100 \mu\text{l}$ 含等体积药物溶剂 ($0.1\% \text{ Me}_2\text{SO}$)的培养液。培养板置于 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中继续培养 24 h 后,用 MTT 法测定细胞数,即结束前 4 h 弃去细胞培养上清,每孔加入 $20 \mu\text{l}$ MTT 溶液(浓度为 5 mg/ml),混匀,再放回培养箱内连续培养 4 h 后,弃上清,每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 二甲亚砜,振荡器上振荡 10 min,用 ELX 800 酶标仪在波长 490 nm 测定每孔的吸光度(A)值,并计算药物对细胞的生长抑制率。采用绘图软件 CurveExpert 1.3 对细胞抑制率与给药浓度作图,计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

1.3 细胞凋亡检测 按 ANNEXIN V-FITC 凋亡检测试剂盒的操作进行。取对数生长期 HL-60 细胞 (1×10^5)接种于 6 孔板,加入依托泊苷使终浓度为 IC_{50} ,实验对照组为含等量 DMSO 的培养液。细胞用 ANNEXIN V-FITC 试剂盒的结合缓冲液悬浮细胞 (10^6 细胞 / ml),从中吸取 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液再加 $5 \mu\text{l}$ ANNEXIN V (FITC 试剂和 $5 \mu\text{l}$ PI 在室温反应 15 min 再加入 $400 \mu\text{l}$ 结合缓冲液,用流式细胞仪测细胞凋亡率。

1.4 RNA 制备和芯片杂交 取对数生长期 HL-60 细胞 (1×10^6)接种于 9 cm 平皿中加入药物使终浓度为半数抑制浓度,实验对照组为含等量药物溶剂的培养液。细胞培养 2 小时后,用异硫氰酸胍和酚氯仿试剂一步法^[5]抽提对照组和药物组细胞总 RNA,用 Oligotex mRNA Kit (Qiagen, Germany)分离 mRNA,再用 RiboGreen RNA quantitation kit (Molecular Probes, Eugene, OR)测定 mRNA 含量。

药物及溶剂对照组 mRNA 分别用 cDNA——链合成掺入荧光标记 dUTP (Cy5-dUTP/Cy3-dUTP)的方法制备 cDNA 探针,混合后在密封仓内与 14400 型人 cDNA 基因芯片 (United Gene Holdings Ltd, PRC) 42°C 杂交 16 h。杂交结束后按 BiDorri 洗片技术进行洗涤和晾干。再用 ScanArray 3000 (General Scanning 公司)扫描芯片,用 InaGene 3.0 软件 (BioDiscovery, Inc., USA)分析 Cy3/Cy5 两种荧光信号的强度和比值。实验重复 3 次。选择给药组与对照组的基因表达差异相差 2 倍以上 ($\text{ratio} \leq 0.5$ 或 ≥ 2)的基因作为差异表达基因^[6]。

1.5 药物反应通路分析 应用 GenMAPP 分析软件 (<http://www.genmapp.org/>)对药物基因表达谱进行分析,得到药物反应通路^[7],设定 Fisher 精

确检验计算出每条药物反应通路的 Z 值显著性差异标准 Z 值 ≥ 2 每个通路中 5 条以上基因发生变化作为药物反应通路分析标准。然后应用 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、BioCarta 数据库 (<http://www.biocarta.com/>)和 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>)等对基因功能及其通路注释。

2 结果

2.1 依托泊苷对白血病 HL-60 细胞增殖的影响 HL-60 细胞与依托泊苷 ($3.13 \sim 200 \text{ mol/L}$)共同孵育 24 h 后,用四唑氮盐 (MTT)法检测药物对肿瘤细胞生长的抑制作用,结果发现,依托泊苷能浓度依赖抑制 HL-60 细胞的增殖。采用绘图软件 CurveExpert 1.3 对细胞生长抑制率与对数浓度作图,得到回归方程 $Y = 20.72 \ln x - 20.59$ ($r = 0.99$) (图 1),计算半数抑制浓度 (IC_{50})为 (30.17 ± 0.26) mol/L 。

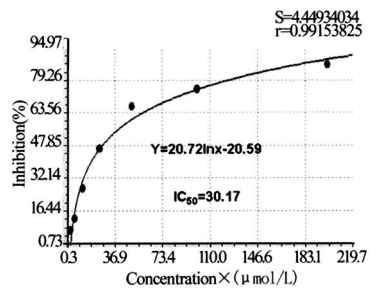


图 1 依托泊苷对白血病 HL-60 细胞增殖的影响 HL-60 细胞 (2×10^4) 加入不同浓度的依托泊苷孵育 24 h 后,用 MTT 法测定活细胞数,计算细胞生长抑制率。采用绘图软件 CurveExpert 1.3 计算半数抑制浓度 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)。

2.2 依托泊苷对白血病 HL-60 细胞凋亡的影响 用依托泊苷半数抑制浓度与 HL-60 细胞孵育 2 h 后,倒置显微镜下观察细胞形态未见变化,但药物作用 24 h 可见细胞破碎、数目减少,流式细胞仪进一步检测发现,细胞凋亡百分率由对照组 4.38% 增加到药物处理组的 53.96% (图 2)。

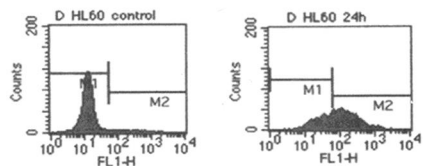


图 2 依托泊苷对白血病 HL-60 细胞凋亡的影响

2.3 依托泊苷对白血病 HL-60 细胞基因表达谱的影响 药物或溶剂对照处理细胞 2 h 后,分别提取 RNA 标记探针后与 cDNA 芯片杂交,按照分析基因

芯片的惯用标准,选择给药组与对照组的基因表达差异相差 2 倍以上 (ratio ≥ 2) 即 log₂[ratio] 绝对值 ≥ 1 的基因作为差异表达基因。结果显示,在依托泊苷诱发的基因表达谱中,在 3 张芯片均检测到的基因总数为 8 296 条,约占检测基因总数 14 112 条基因的 58.78%。差异表达基因总数为 695 条,其中上调 285 条,下调 410 条,表明依托泊苷能显著调节基因表达。

2.4 依托泊苷对蛋白酶体降解通路的影响 将差异表达基因数据输入 GeneMAPP 软件后,进一步分析药物反应通路。结果显示,依托泊苷能显著

抑制细胞内蛋白酶体降解通路 (Z ≥ 3.8)。基因芯片检测蛋白酶体降解通路中的 43 条基因,依托泊苷能显著调节其中的 8 条基因表达 (表 1, 图 3)。依托泊苷通过抑制表达蛋白酶体 26S 组分 PSMC3 (PROTEASOME 26S SUBUNIT, ATPase 3)、PSMC5 和 20S 亚单位 PSMB5、PSMB7 以及盖子亚单位 RPN1 (ribophorin I), PSMB8, HLA-A, 增加表达 20S 亚单位 PSMA1, 影响蛋白酶体降解细胞蛋白通路,但对泛素系统表达无影响。结果提示蛋白酶体依赖的蛋白降解途径参与了依托泊苷抗肿瘤作用机制。

表 1 依托泊苷对蛋白酶体降解通路基因表达的影响

Gene ID	Gene name	Average ratio
Hs_422990	Homo sapiens proteasome (prosome macropain) subunit beta type 5 (PSMB5), mRNA	0.34
Hs_518244	Homo sapiens ribophorin I (RPN1), mRNA	0.22
Hs_250758	Homo sapiens proteasome (prosome macropain) 26S subunit ATPase 3 (PSMC3), mRNA	0.44
Hs_79387	Homo sapiens proteasome (prosome macropain) 26S subunit ATPase 5 (PSMC5), mRNA	0.35
Hs_180062	Homo sapiens proteasome (prosome macropain) subunit beta type 8 (large multifunctional peptidase 7) (PSMB8), transcript variant 1, mRNA	0.27
Hs_213470	Homo sapiens proteasome (prosome macropain) subunit beta type 7 (PSMB7), mRNA	0.50
Hs_102798	Homo sapiens proteasome (prosome macropain) subunit alpha type 1 (PSMA1), transcript variant 1, mRNA	2.47
Hs_181244	Homo sapiens major histocompatibility complex class I A (HLA-A), mRNA	0.35

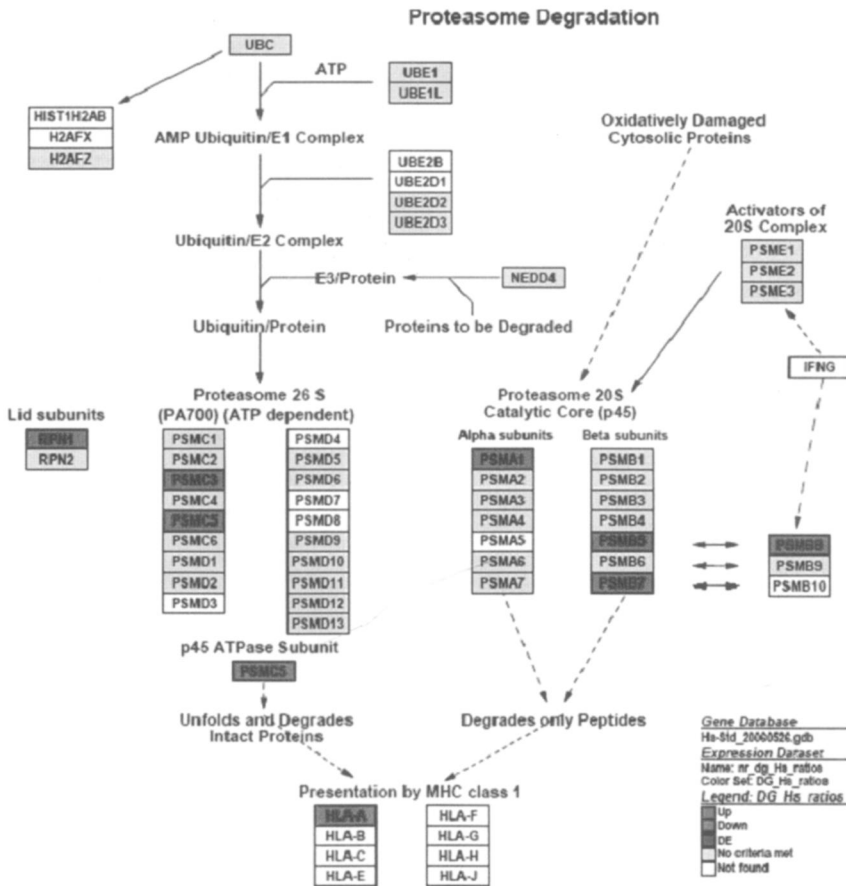


图 3 依托泊苷对蛋白酶体降解通路基因的影响

绿色和红色方框代表基因上调和下调,灰色方框为在芯片上的基因但药物无影响,白色方框为芯片上无此蛋白酶体通路基因。

3 讨论

目前普遍认为 DNA 拓扑异构酶 II 抑制剂依托泊苷促使肿瘤细胞凋亡与其形成药物-Topo-DNA 可裂性三元复合物, 导致细胞 DNA 链断裂密切相关。研究表明, 当去除药物后, 依托泊苷诱导的细胞 DNA 断裂很快就重新连接起来, 而重新连接的断裂 DNA 并不能阻止细胞的死亡^[8,9], 说明依托泊苷诱导细胞凋亡并不是 DNA 链断裂的直接结果, 而是 DNA 损伤引起某些细胞内通路变化最终导致细胞凋亡。为进一步研究依托泊苷抗肿瘤作用机制, 本研究应用基因芯片技术研究依托泊苷诱导凋亡的早期敏感反应基因表达谱, 并应用 Gernapp 分析软件分析药物细胞内反应通路, 结果发现, 依托泊苷能显著抑制细胞内蛋白酶体降解通路。

泛素-蛋白酶体通路 (ubiquitin-proteasome pathway) 是哺乳动物细胞内蛋白质选择性降解的重要途径之一, 参与了细胞内许多重要的生理生化过程, 如 DNA 修复、细胞周期的运转、细胞凋亡、信号传递、抗原的提呈、蛋白的跨膜定位等^[10~12]。泛素-蛋白酶体通路由泛素结合系统和蛋白酶体组成。泛素结合系统包括一系列酶: 泛素激活酶 (E1)、泛素结合酶 (E2)、泛素连接酶 (E3) 和泛素水解酶。蛋白酶体包括两种形式: 20S 复合物和 26S 复合物。在高等真核生物中, 20S 蛋白酶体是蛋白酶解的核心成分, 7 个 α 亚单位和 7 个 β 亚单位组成。26S 复合物由 20S 复合物与 PA700 调节蛋白 (19S 复合物) 组成。PA700 是一个较大的复合物, 由至少 18 个蛋白质组成。这些不同的亚基功能各异, 包含多种 ATP 酶及结合蛋白底物所必需的成分, 在泛素化蛋白质的选择性降解中起着重要作用。由于蛋白酶体在细胞增殖和凋亡等生物学功能的重要调控作用, 蛋白酶体系统已成为研制抗肿瘤药物的靶点^[13]。例如硼替佐米 (bortezomib, Valcade, PS341) 是哺乳动物细胞中 26S 蛋白酶体糜蛋白酶样活性的可逆抑制剂。体外试验证明硼替佐米对多种类型的肿瘤细胞具有细胞毒性, 体内试验证明硼替佐米能够延迟包括多发性骨髓瘤在内的肿瘤生长。治疗多发性骨髓瘤已经进入临床试验阶段^[14]。

本研究基因芯片结果显示, 依托泊苷对泛素系统表达无影响, 但能显著抑制 20S 蛋白酶体 β 亚单位 PSMB5 和 PSMB7 以及 PSMB8 表达。此外, 依托泊苷还抑制表达蛋白酶体 26S 组分 PSMC3、PSMC5 和以及盖子亚单位 RPN1 (ribophorin I)。文献报道, HL-60 细胞过表达 PSMB5 可增加其它 20S 蛋白酶体 β 亚单位的表达, 增加蛋白酶体数量和活性, 减

轻细胞对氧化应激反应, 增加细胞的存活率^[15]。而 PSMB5 过表达或基因突变则使蛋白酶体抑制剂硼替佐米产生耐药性^[16,17]。PSMC3 又称 human immunodeficiency virus Tat-binding protein-1 (TBP-1), 是蛋白酶体 26S 蛋白酶体 19S 调节亚基的核心组分, PSMC3 过表达可增加 P53 蛋白和活性, 促进细胞增殖^[18]。因此, 依托泊苷抑制蛋白酶体相关基因可能是其抑制细胞生长, 甚至最终导致细胞死亡的原因, 结果也提示依托泊苷抑制 DNA 拓扑异构酶 II 诱导细胞 DNA 损伤可能部分通过抑制蛋白酶体通路变化最终导致细胞凋亡。抑制蛋白酶体通路是依托泊苷抗肿瘤作用的重要机制。

【参考文献】

- [1] Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor [J]. *Eur J Cancer* 1998; 34(10): 1514.
- [2] Burden DA, Kingma PS, Froelich-Ammon SJ, *et al*. Topoisomerase II etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes [J]. *J Biol Chem* 1996; 271(46): 29238.
- [3] Kudoh K, Ramanna M, Ravath R, *et al*. Monitoring the expression profiles of doxorubicin induced and doxorubicin resistant cancer cells by cDNA microarray [J]. *Cancer Res* 2000; 60(15): 4161.
- [4] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55.
- [5] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction [J]. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156.
- [6] Zhang JP, Ying K, Xiao ZY, *et al*. Analysis of gene expression profiles in human HL-60 cell exposed to cantharidin using cDNA microarray [J]. *Int J Cancer* 2004; 108(2): 212.
- [7] Donger SW, Salomonis N, Dahlquist KD, *et al*. MAPPFinder using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene expression profile from microarray data [J]. *Genome Biol* 2003; 4(1): R7.
- [8] Long BH, Musial ST, Brattain MG. Comparison of cytotoxicity and DNA breakage activity of congeners of podophyllotoxin including VP16-213 and VM26: A quantitative structure activity relationship [J]. *Biochemistry* 1984; 23: 1183.
- [9] Locke JD, Howitz SB. Effect of VP-16-213 on the intracellular degradation of DNA in HeLa cells [J]. *Biochemistry* 1976; 15: 5443.
- [10] Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(3): 855.
- [11] Drexler HC. Programmed cell death and the proteasome [J]. *Apoptosis* 1998; 3(1): 1.
- [12] 彭睿, 秦俊川, 宋晓龄. 蛋白酶体结构和功能研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25(3): 235.

有一例复方甘草口服溶液引起咽部水肿的病例,就是由临床药师直接问诊发现的。该患者因“慢性结石性胆囊炎”于2009年4月10日行胆囊切除术。主诉无药物食物过敏史,4月15日服用复方甘草口服溶液10ml后,患者出现喉咙痒,主动向药师询问有没有药物治疗喉咙痒。药师没有简单地给予用药建议,而是仔细询问了患者食物与药物过敏史及目前的用药情况,患者回忆起儿时吃甘草桃肉后曾出现类似症状,从此不敢吃甘草桃肉,但患者不知食用的甘草和药用的甘草是否为同一类。因此,在临床医师问诊时没说起有甘草过敏史。药师得知这一情况后立即建议患者停药,医师采纳,停药后第二天患者上述症状好转。

3.2 周查房记录 我们简化了药历,并将其列入《周查房记录》中,《周查房记录》是医师药师共同制定的另一项记录文件,内容包括:药品不良反应监测、重点关注的病人简明药历分析、本周所涉及的临床知识与药学知识的学习讨论、中外文献检索等。使药师在日常实践中有针对性地学习、由点及面,加强基础医学、药学理论知识的学习,做到温故知新。

3.3 师生交流 每周末药师将《药学问诊表》和《周查房记录》以电子邮件方式发送至带教医师、住院医师及其他临床药师邮箱中,带教医师评价后再以电子邮件的形式反馈给学员,并安排在下周一治疗组内讨论。对大家感兴趣的专题,药师做好课件给医师讲课。如住院患者中有1例病人因中药黄药子引起药物性肝损伤,临床药师及时查阅相关文献并作专题讲座,临床药师全面系统地讲解了药物性肝损伤的机制、易患因素、常见的引发肝脏损害的药品、诊断标准、预防等,医师、药师双方都得到了学习和提高。

4 讨论

通过一年多的学习与培训,临床药师能够在模

拟药学会诊中大胆提出问题并提供药物治疗方案,能够为患者提供出院带药治疗的建议。临床药师不仅得到了医师的信任,更得到了患者的信任,医师从排斥药师到接纳临床药师,患者从不明白临床药师为什么要查房到主动向临床药师询问药物治疗相关的问题,所有这些变化与医师和药师的共同努力是分不开的。

在我国,如果以1981年卫生部在《医院药剂工作条例》及1982年卫生部在《全国医院工作条例》中列入临床药学内容为标志,国内临床药学的发展已经有20多年的历史^[3],20年来医院药师为走出药房,直接面对患者做出了不懈的努力,临床药师队伍在不断壮大,药师的职责从药品保障逐步向药学服务转变。同时,作为医师,我们应当诚心接纳临床药师加入我们的治疗团队,在临床药师具备了承担专科工作基本能力后,还可以进一步邀请临床药师参与到临床回顾性研究和前瞻性研究中,使临床药师加入到临床医学教育和科研的行列。总之,临床医师参与到培养临床药师的教学中,与药师共同探索和实践现阶段临床药师在职培养的模式,有利于临床药师在短期内融入临床,尽快成为临床治疗团队中的一员。

【参考文献】

- [1] 丁建平,齐晓涟. 临床医师参与神经内科重症监护专业临床药师带教工作的探讨[J]. 中国药房, 2008, 19(17): 1356.
- [2] 吴方建. 培养药师的临床思维,提高药物治疗能力[J]. 中国药师, 2008, 11(7): 789.
- [3] 崔纯莹,崔国辉. 关于我国实施临床药师培养的思考[J]. 中华医学教育杂志, 2007, 27(5): 12.

[收稿日期] 2009-09-17

[修回日期] 2009-10-20

(上接第28页)

- [13] Elliott PJ, Ross JS. The proteasome: a new target for novel drug therapies[J]. Am J Clin Pathol 2001, 116(5): 637.
- [14] Zavisnik I, Kleberg L, Kaiser M, et al. Proteasome as an emerging therapeutic target in cancer[J]. Curr Pharm, 2007, 13: 471.
- [15] Chondrogianini N, Tzavekas C, Pemberton AJ et al. Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers an ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates[J]. J Biol Chem, 2005, 280(12): 11840.
- [16] Lü S, Yang J, Chen Z, et al. Different mutants of PSM B5 confer

varying bortezomib resistance in T lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from the Jurkat cell line[J]. Exp Hematol 2009, 37(7): 831.

- [17] Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein[J]. Blood 2008, 112(6): 2489.
- [18] Com PG, McDonald ER 3rd, Heman JG, EHD eiry WS. Tat binding protein-1: a component of the 26S proteasome, contributes to the E3 ubiquitin ligase function of the von Hippel-Lindau protein[J]. Nat Genet 2003, 35(3): 229.

[收稿日期] 2009-06-29

[修回日期] 2009-08-31