

2D-DIGE – HPLC – *n*ESI MS/MS 对 2, 4-二硝基苯磺酸损伤 HaCaT 细胞差异蛋白质的鉴定

孙明忠¹, 杨帆², 侯志杰^{1,2}, 郭春梅^{1,2}, 郭一萌^{1,2}, 刘淑清²

(1. 大连医科大学 生物技术系, 辽宁 大连 116044; 2. 大连医科大学 生物化学教研室, 辽宁 大连 116044)

摘要: 采用 Cy2、Cy3 和 Cy5 荧光染料标记蛋白, 建立了人角质形成细胞 HaCaT 受 2, 4-二硝基苯磺酸 (DNBS) 刺激前后的双向胶内差异凝胶电泳 (2D-DIGE) 图谱, 每组平行样本数为 3。凝胶采用蛋白荧光染料 Deep Purple 进行后染色 (Post-stain)。DeCyder 定量分析软件在每块凝胶上平均检测到 1 200 个以上蛋白斑点, 每块胶上都匹配得到的相同蛋白质斑点有 846 个。其中有 7 个斑点丰度变化在 50% 以上, 统计学意义显著 (P 值小于 0.05)。利用高效液相色谱 – 电喷雾串联质谱 (HPLC – *n*ESI MS/MS) 成功鉴定 5 个表达上调的斑点分别为 X 染色体开放阅读框 26 (Coxrf26)、人辅分子伴侣 23 (PTGES3)、钙调蛋白 (CALM3)、肌球蛋白轻链 6 (MYL6) 和断裂点丛集区蛋白 1 (BANF1); 2 个表达下调蛋白斑点被鉴定为转录延伸因子 B 肽链 2 (TCEB2) 和核糖体蛋白 L23 (RPL23)。除 MYL6 被报道与皮肤疾病相关外, 其它蛋白与皮肤病变的关系有待研究。该研究得到的 7 个差异表达蛋白为 DNBS 类化学致癌物职业接触者皮肤病变研究提供了有价值的线索。

关键词: 2, 4-二硝基苯磺酸; 职业暴露; 2D-DIGE; HPLC – *n*ESI MS/MS; HaCaT

中图分类号: O657.63; O629.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 – 4957(2011)02 – 0146 – 06

doi: 10.3969/j.issn.1004 – 4957.2011.02.006

Detection and Identification of Differentially Expressed Proteins of HaCaT Cells Responding to 2, 4-Dinitrobenzene Sulfonic Acid Stimulation Using 2D-DIGE Coupled to HPLC – *n*ESI MS/MS

SUN Ming-zhong¹, YANG Fan², HOU Zhi-jie^{1,2}, GUO Chun-mei^{1,2}, GUO Yi-meng^{1,2}, LIU Shu-qing²

(1. Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: Protein fluorescent dyes, Cy2, Cy3 and Cy5, were used to label protein samples. The protein integrity expression profile of keratinocytes cell HaCaT stimulated by 2, 4-dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) was probed using two-dimensional difference in gel electrophoresis (2D – DIGE). And the differentially expressed protein spots were compared and selected. Triplicate samples of protein extracts were used for both the control HaCaT cell and the DNBS-treated HaCaT cell. Following the 2D – DIGE, the master DIGE gel was post-stained by using Deep Purple protein fluorescent dye. The results indicated that over 1200 protein spots were averagely resolved on each DIGE gel by DeCyder software analysis. 846 protein spots were matched for all three gels. And seven protein spots were found differentially expressed with the level above 50% due to the DNBS stimulation with statistically significance ($P < 0.05$). A proteomic approach, high performance liquid chromatography combined to nano-electro-spray ionization tandem mass spectrometry (HPLC – *n*ESI – MS/MS) was used for protein identification. The five up-regulated protein spots were identified as chromosome X open reading frame 26 (Coxrf26), human Co-chaperone P23 (PTGES3), calmodulin (Calm3), smooth muscle and non-muscle myosin alkali light chain 6 (MYL6), and breakpoint cluster region protein 1 (BANF1). The two down-regulated protein spots were identified as transcription elongation factor B polypeptide 2 (TCEB2) and RPL23 protein, respectively. Only myosin has been reported to be asso-

收稿日期: 2010 – 08 – 25; 修回日期: 2010 – 10 – 05

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目; 辽宁省自然科学基金资助项目 (2008S077); 辽宁教育厅重点实验室项目 (LS2010050)

通讯作者: 刘淑清, Tel: 0411 – 86110310, E-mail: lsqsmz@gmail.com

ciated with certain skin disease. Those seven protein candidates identified by current work might provide some useful clues for the risk assessment of skin diseases originated from occupational exposures to chemical carcinogens such as DNBS.

Key words: 2, 4-dinitrobenzene sulfonic acid; occupational exposure; 2-dimensional difference in gel electrophoresis; HPLC-nESI MS/MS; HaCaT

皮肤疾患已成为严重影响公众健康的主要疾病,其发病率逐年上升并呈年轻化趋势。这与臭氧层被破坏,紫外线辐射增强明显相关;也与化学化工染料的广泛使用与接触直接相关。化学致癌物质的广泛使用和接触已成为诱发各种皮肤病变的罪魁祸首之一^[1-2]。

以2,4-二硝基苯磺酸(DNBS)为代表的硝基磺酸类化学致敏物,在电镀、染料工业和油漆业中广泛使用,可引发过敏性皮炎、炎性肠炎、结肠癌等疾病^[3-4]。野外作业工人长期接受紫外线暴晒和大量接触化学致敏物,皮肤癌、过敏性皮炎和肠胃癌症患病率明显增高^[2-4]。但在蛋白水平对化学致敏物损伤皮肤细胞、诱导皮肤疾病的研究鲜有报道。

本研究以人角质形成细胞HaCaT为对象,采用2D-DIGE和HPLC-nESI MS/MS技术分离和鉴定了DNBS刺激下HaCaT细胞表达变化的蛋白分子。筛选出HaCaT应答DNBS诱导损伤直接相关蛋白,包括X染色体开放阅读框26(Cxorf26)、人辅分子伴侣23(PTGES3)、钙调蛋白(CALM3)、肌球蛋白轻链6(MYL6)、断裂点丛集区蛋白1(BANF1)、转录延伸因子B肽链2(TCEB2)和核糖体蛋白(RPL23),它们可作为DNBS类化学致敏物职业接触者皮肤发生病变的潜在标志物。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

RPMI 1640和胎牛血清(Gibco公司);细胞裂解液(Proteoprep™ Universal Extraction)、DNBS、甲酸(99%,Sigma公司);Cy2、Cy3、Cy5和Deep Purple染料、尿素、硫脲、IPG缓冲液、IPG胶条[24 cm, 3-10 NL(非线性)]、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺和碳酸氢铵(GE Health Care公司);胰蛋白酶(Promega公司);HPLC水和乙腈(美国Brodick Johnson公司)。

IPG phor II等电聚焦仪、Dalt 6电泳仪、HPLC、Typhoon 9400激光共聚焦扫描仪、DeCyder 6.5软件、Ettan™ Spot Picker(GE Health Care公司),C₁₈反相色谱柱(75 μm × 15 cm, Dionex公司),LTQ电喷雾串联质谱仪(Thermo Electron Corporation, 美国)。

1.2 细胞培养

HaCaT用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液在37℃、5%CO₂下培养,实验分两组:对照组(不加DNBS)和DNBS处理组。HaCaT在37℃和5%CO₂下孵育18 h, DNBS组经0.05% DNBS诱导2 h。

1.3 细胞蛋白的提取

弃去HaCaT细胞中的培养液,用含Ca²⁺、Mg²⁺的磷酸缓冲液洗涤3次,在含10%胎牛血清的RPMI 1640中孵育6 h。收集细胞并经0.25%胰蛋白酶消化,12 000 r/min离心15 min,弃去培养液,收集细胞团;快速用Tris-HCl缓冲液(20 mmol/L, pH 7.4)洗涤2次,然后加细胞裂解液重悬细胞,冰浴下超声破碎,作用5 s,间歇10 s,15个循环。在4℃下以20 000 g离心15 min,收集上清液,每组样品样本数为3,共6组蛋白样品,分别标记为C1、C2、C3、DNBS1、DNBS2和DNBS3。

1.4 双向胶内差异凝胶电泳(2D-DIGE)

用50 mmol/L NaOH溶液将各样品pH值调至8.5,进行分组并制备内标(Ins)(表1),以400 pmol CyDye:50 μg蛋白的比例进行样品标记,未标记各组蛋白混合物150 μg与标记的蛋白混合,按文献[5-6]完成等电聚焦和SDS PAGE(12%)电泳。采用Typhoon 9400扫描仪获取凝胶图像,Cy2、Cy3和Cy5的激发/发射波长分别为488/520、532/580、633/670(nm/nm)。采用Deep Purple荧光染料对凝胶蛋白斑点进行后染色^[5-6]。运用DeCyder 6.5软件对凝胶图像进行蛋白斑点检测和量化、胶匹配、各组间蛋白斑点丰度变化、分子量和等电点确定。所得差异表达蛋白斑点均经统计学分析(Student t检验),表达差异大于1.5倍(P<0.05)。

表 1 2D-DIGE 各组样品组成及分配

Table 1 Compositions and gel assignments of six samples for 2D-DIGE

Gel	Cy2(Ins) *	Cy3 labelling	Cy5 labelling	Unlabelled**
1	50 μ g	50 μ g C1	50 μ g DNBS1	150 μ g
2	50 μ g	50 μ g DNBS1	50 μ g C2	150 μ g
3	50 μ g	50 μ g C3	50 μ g DNBS3	150 μ g

* the mixture of 8.33 μ g of each samples from C1, C2, C3, DNBS1, DNBS2 and DNBS3; ** the mixture of 25 μ g of each samples from C1, C2, C3, DNBS1, DNBS2 and DNBS3

1.5 差异表达蛋白的 HPLC – nESI MS/MS 鉴定

切取的蛋白斑点凝胶颗粒置于 0.5 mL EP 管内, 按文献[5 – 7]进行胰蛋白酶解。HPLC 和 nESI MS/MS 条件参照文献[5 – 8]。蛋白鉴定通过 TurboSequest Bioworks 软件检索完成: 肽段质量误差为 ± 1.6 ; MS/MS 最大误差为 ± 0.8 ; Xc 值单电荷时为 1.9, 2 个电荷时为 2.5; 蛋白检出概率低于 10^{-3} , 检测肽段数在 2 个以上时为肯定结果。

2 结果与讨论

2.1 DNBS 对 HaCaT 细胞蛋白表达的改变

3 块胶上检测到的蛋白斑点分别为 1 337、1 205 和 1 169 个, 模式一致 (见图 1)。Cy2、Cy3 和 Cy5 的激发和发射波长各不相同, 同一块胶上可同时测定 3 个样品; 图 1A、B 和 C 分别是胶 1 上获得 Cy2 标记内标、Cy3 标记对照组样品 C1、Cy5 标记处理组样品 DNBS1 的图像, D 图是上述 3 个图像的叠加。以斑点数最多的凝胶 2 为母胶 (1 337 个点), BVA 软件匹配不同胶间斑点, 每块胶上都匹配得到的相同蛋白质斑点有 846 个。凝胶 Deep Purple 后染色图像经 DeCyder 软件分析和匹配胶上蛋白斑点 (图 1E), 确定了 7 个差异表达 50% 以上的斑点为 518、999、1128、1132、1142、1174 和 1179 (图 1F)。蛋白斑点 518、999、1128、1142 和 1174 表达上调, 1132 和 1179 表达下调。

蛋白质组学技术为高通量筛选各种疾病相关蛋白靶标提供了高效技术平台^[5-6,9]。本文采用 2D-DIGE 研究了 DNBS 损伤 HaCaT 细胞差异表达蛋白的分离和鉴定, 一块胶上包含 3 个样品, 消除了胶内差异; 不同凝胶间引入相同

内标, 消除了胶与胶间的差异。经全自动背景扣除、定量、归一化、胶内匹配, 通过 Cy3/Cy2 及 Cy5/Cy2 比率进行定量, 对蛋白表达差异的检测限为 7%^[5-6]。本实验选取具有统计学意义 ($P < 0.05$)、差异表达 50% 以上的斑点, 确保了实验结果的可靠性。凝胶后染色采用 Deep Purple, 比银染线性动态范围高 3 个数量级, 且有利于后续蛋白质谱鉴定^[5-6], 有效克服了考染与银染定量线性动态范围窄、结果不可靠、人为因素大的缺点, 同时克服了 Cy 染料通过化学键与蛋白反应可能造成的与未经 Cy 标记的同一蛋白电泳迁移率的差异^[5-6], 进一步提高了实验结果的精确性和可靠性。

2.2 差异表达蛋白定量及 HPLC – nESI MS/MS 鉴定

7 个蛋白斑点在 DIGE 凝胶上的表观分子量和质谱鉴定匹配蛋白的理论分子量吻合良好。蛋白斑点 1179 的理论 pI 为 11.0, 而其在凝胶上的表观 pI 约为 6.9, 这可能是由于蛋白质的翻译后修饰导致其

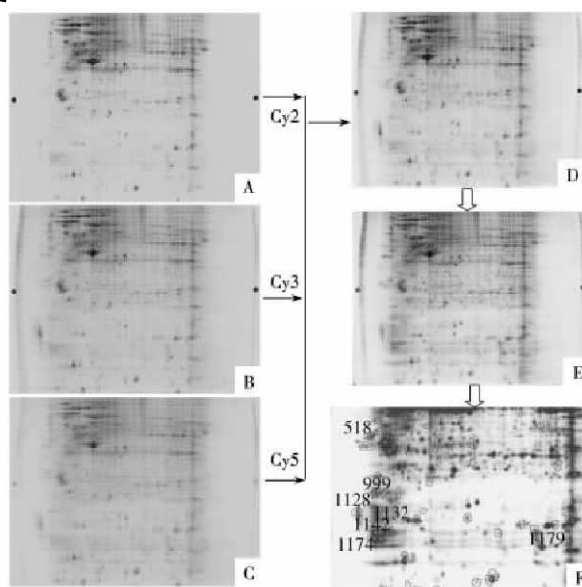


图 1 HaCaT 细胞和经 DNBS 处理的 HaCaT 细胞的 2D-DIGE 图谱

Fig. 1 2D-DIGE images of HaCaT cells with and without DNBS treatment

A. gel image of Cy2-labelled internal standard; B. gel image of Cy3-labelled HaCaT cell; C. gel image of Cy5-labelled DNBS-treated HaCaT; D. overlaid gel image; E. gel image stained with Deep Purple; F. differentially expressed protein spots

pI 发生改变^[5,7-8]; 除蛋白斑点 1179 外, 其余 6 个蛋白斑点的理论 pI 和实验测得 pI 吻合良好。蛋白斑点 518、999、1128、1142 和 1174 表达分别上调 50%、60%、80%、50% 和 80%; 1132 和 1179 分别下调 100% 和 50% (见表 2, $P < 0.05$)。HPLC-nESI MS/MS^[5-8] 是目前最常用的蛋白鉴定方法, 可同时捕捉肽段的一级和二级质谱信息, 结果精准。518、999、1128、1132、1142、1174 和 1179 经 nESI MS/MS 鉴定为 Cxor26、PTGES3、CALM3、TCEB2、MYL6、BANF1 和 RPL23 (表 2)。1128 被鉴定为 Calm3, MS/MS 确定出 7 个肽段: MKD TDSEEEIR、LTDEEVDEM * IR、M * KDTDSEEEIREAFR、DTDSEEEIREAFR、VFDKDCNGYISAAELR、LTDEEVDEMIR、EAFSLFDKDGDTTITK 和 EADIDGDCQVNYEEFVQM * M * T AK (其中 * 表示残基被氧化) (见表 2 与图 2A)。MS/MS 信息包括肽段的分子质量、序列位置和覆盖率。图 2B 是肽段 VFDKDCNGYISAAELR 的 MS/MS 图谱, 肽段离子的 y 系列碎片峰, 包括 y_2 、 y_3 、 y_4 、 y_5 、 y_6 、 y_7 、 y_8 、 y_9 、 y_{10} 、 y_{11} 、 y_{12} 和 y_{13} ; b 系列碎片峰包括 b_5 、 b_6 、 b_7 、 b_8 、 b_9 、 b_{10} 、 b_{12} 、 b_{14} 和 b_{15} ; 另外还检测到 b_5 和 b_{12} 脱水碎片峰以及 y_{10} 和 b_{14} 脱氨基碎片峰, 与该肽段的序列完全吻合。

表 2 差异表达蛋白质的 HPLC-nESI MS/MS 鉴定结果
Table 2 Differentially expressed proteins identified by HPLC-nESI MS/MS

Spot No.	Fold change *	P value **	Accession No. ***	Protein description	Matched peptides	M_w /pI	Sequence coverage (%)	Protein probability
518	1.5	1.6×10^{-4}	30354299	Chromosome X open reading frame 26	13	26.0/4.57	51.0	4.00×10^{-12}
999	1.6	3.7×10^{-4}	9257073	A Chain A, Crystal structure of human co-chaperone P23	4	15.1/5.0	38.0	6.44×10^{-2}
1128	1.8	1.1×10^{-4}	58218968	Calmodulin	7	17.2/3.90	54.0	2.00×10^{-11}
1132	-2.0	1.6×10^{-3}	6005890	Transcription elongation factor B polypeptide 2	5	13.1/4.58	35.0	8.00×10^{-9}
1142	1.5	2.3×10^{-4}	88999583	Myosin light polypeptide 6	10	16.9/4.41	53.0	5.00×10^{-9}
1174	1.8	4.5×10^{-2}	3002951	Breakpoint cluster region protein 1	7	15.5/6.13	37.0	1.00×10^{-12}
1179	-1.5	2.8×10^{-3}	38571606	RPL23 protein	2	14.9/11.0	24.0	5.00×10^{-12}

* indicates protein expression fold changes between DNBS-treated HaCaT cell and the control HaCaT cell, 1.5 and -1.5 represent 50% increase and 50% decrease in protein expressions for treated sample relative to the control; ** P values are for the statistics analysis of the gel spots; *** represents the gene identification number

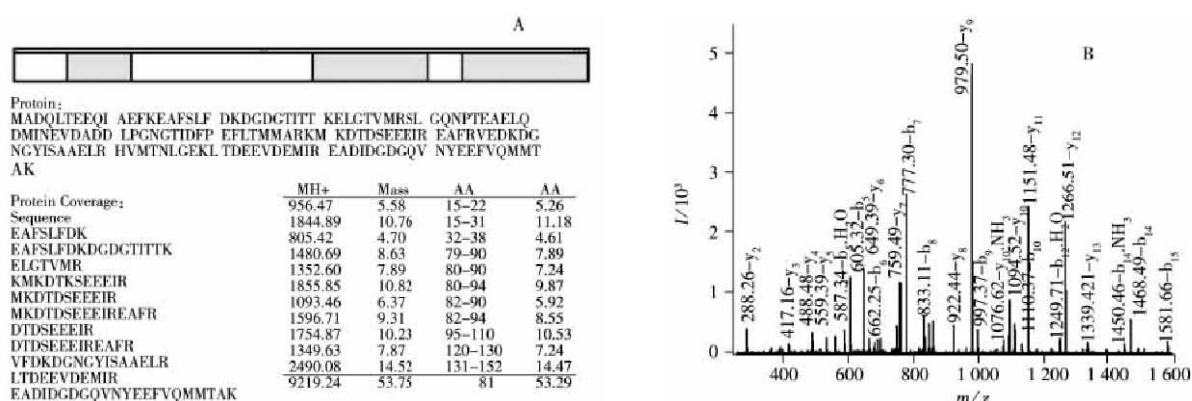


图 2 蛋白斑点 1128 的质谱鉴定结果

Fig. 2 Protein identification result for protein spot 1128 by mass spectrometry analysis
A. MS identification result; B. MS/MS spectrum of identified peptide VFDKDCNGYISAAELR

2.3 差异表达蛋白功能分析

7 个差异表达蛋白中, CALM3 和 MYL6 为钙离子选择结合蛋白。CALM 可抑制角质形成细胞增殖^[10], 肌球蛋白 II 通过 MAPK 调控其磷酸化来调节人原代角质形成细胞的迁移, 肌球蛋白轻链也参与细胞迁移调节和表皮伤口愈合^[11-12]。钙调蛋白样蛋白通过上调人角质形成细胞肌球蛋白 10 的表达, 在皮肤分化和伤口再上皮化中起作用^[13], 提示肌球蛋白与钙调蛋白在角质形成细胞甚至皮肤损伤中相互关联。二者的生物学功能与胞内 Ca^{2+} 浓度相关^[11,13], 若 Ca^{2+} 浓度失衡, 将导致钙结合蛋白表达转

移,细胞形态发生变化,进而引起细胞损伤^[11]。CALM3和MYL6在DNBS处理HaCaT细胞中显著高表达,其异常表达与皮肤损伤机制值得深入研究。

蛋白p23(PTGES3)是人热休克蛋白90(Hsp90)的辅伴侣分子,C端去除的PTGES3主要以单体形式与Hsp90结合,进而调节Hsp90功能^[14-15];PTGES3被裂解为17 ku的稳定片段,严重影响Hsp90复合物在白血病治疗中的作用^[15];其N端DYX1C1结构域的高表达与乳腺肿瘤恶化相关^[16]。本文研究首次表明PTGES3高表达与角质形成细胞DNBS损伤相关。断裂点丛集区家族蛋白(BCR)具有丝氨酸激酶活性、SH2结合活性和GTPase激活活性。在脑膜瘤中,BCR的mRNA水平下调,但BCR蛋白的具体生物学功能尚不清晰^[17]。本文结果明确表明BCR中的BANP1蛋白与HaCaT的DNBS损伤相关,可能是皮肤病变的一个潜在因素。

TCEB2被报道与双相情感障碍疾病的病理生理学起因相关^[18],也有报道称该蛋白的表达异常与宫颈癌的发生相关^[19]。TCEB2蛋白在DNBS处理的HaCaT中下调100%,与皮肤疾病的发生有一定相关性。

关于RPL23与胃癌细胞SGC7901多耐药性的相关研究指出,其mRNA和蛋白水平的上调可提高SGC7901细胞对长春新碱、阿霉素、5-氟尿嘧啶和顺铂的耐药性,对肿瘤化疗不利^[20]。RPL23在DNBS处理的HaCaT细胞中显著下调(-1.5倍),是HaCaT细胞的应激性反应所致,可作为以DNBS为代表的较强化学致癌物损伤皮肤细胞的标记物。

人Cxorf26蛋白是Strausberg等^[21]得到的7800个开放阅读框中的一个,仅有核苷酸序列,功能未知。本实验表明DNBS可明显导致Cxorf26蛋白表达水平上调(1.5倍),鉴定出的肽段有13个,氨基酸序列覆盖率51%。显然,Cxorf26与皮肤细胞损伤直接相关。

3 结 论

蛋白质是生物功能的执行者和体现者,本文通过HaCaT细胞模型,利用2D-DIGE和HPLC-nESI MS/MS分离和鉴定了HaCaT细胞对DNBS作用下的差异表达蛋白,筛选出7个与HaCaT细胞受化学致癌物损伤直接相关的蛋白,为化学致癌物诱发皮肤疾病的研究提供了新的蛋白靶标,为研究相应环境条件下皮肤有效防护提供了有价值的线索。

参考文献:

- [1] HOUSMAN T S, FELDMAN S R, WILLIFORD P M, FLEISCHER A B Jr, GOLDMAN N D, ACOSTAMADIEDO J M, CHEN G J. Skin cancer is among the most costly of all cancers to treat for the medicare population[J]. J Am Acad Dermatol, 2003, 48(3): 425-429.
- [2] HARPER M. Assessing workplace chemical exposures: the role of exposure monitoring[J]. J Environ Monit, 2004, 6(5): 404-412.
- [3] RIJNIERSE A, KOSTER A S, NIJKAMP F P, KRANEVELD A D. Critical role for mast cells in the pathogenesis of 2,4-dinitrobenzene-induced murine colonic hypersensitivity reaction[J]. J Immunol, 2006, 176(7): 4375-4384.
- [4] CUZZOCREA S, MCDONALD M C, MAZZON E, MOTA-FILIPPE H, CENTORRINO T, TERRANOVA M L, CICCOLO A, BRITTI D, CAPUTI A P, THIEMERMANN C. Calpain inhibitor I reduces colon injury caused by dinitrobenzene sulphonic acid in the rat[J]. Gut, 2001, 48(4): 478-488.
- [5] SUN M Z, LIU S, TANG J, WANG Z, GONG X, SUN C, GREENAWAY F T. Proteomics analysis of two mice hepatocarcinoma ascites syngeneic cell lines with high and low lymph node metastasis rates provide potential protein markers for tumor malignancy attributes to lymphatic metastasis[J]. Proteomics, 2009, 9(12): 3285-3302.
- [6] LIU S, SUN M Z, TANG J, WANG Z, SUN C, GREENAWAY F T. High-performance liquid chromatography/nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry, two-dimensional difference in-gel electrophoresis and gene microarray identification of lymphatic metastasis-associated biomarkers[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(8): 3172-3178.
- [7] SUN M Z, GUO C, TIAN Y, CHEN D, GREENAWAY F T, LIU S. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: a novel snake venom L-amino acid oxidase from Agkistrodon blomhoffii ussuriensis[J]. Biochimie, 2010, 92(4): 343-349.
- [8] 刘淑清, 张巧巧, 张操, 孙明忠, 李建立, 吴玉群, 孙立新. 电泳结合串联质谱法分析中国蛇岛蝮蛇毒蛋白[J]. 分析测试学报, 2009, 28(6): 709-713.

- [9] NETEA-MAIER R T, HUNSUCKER S W, HOEVENAARS B M, HELMKE S M, SLOOTWEG P J, HERMUS A R, HAUGEN B R, DUNCAN M W. Discovery and validation of protein abundance differences between follicular thyroid neoplasms[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1572-1580.
- [10] MAC N S, DAWSON R A, CROCKER G, TUCKER W F, BITTNER B, SINGLETON J G, HUNTER T, TIERNEY D F. Antiproliferative effects on keratinocytes of a range of clinically used drugs with calmodulin antagonist activity[J]. *Br J Dermatol*, 1993, 128(2): 143-150.
- [11] BETAPUDI V, RAI V, BEACH J R, EGGLEHOF T. Novel regulation and dynamics of myosin II activation during epidermal wound responses[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(6): 980-991.
- [12] IOCONO J A, COLLERAN K R, REMICK D G, GILLESPIE B W, EHRLICH H P, GARNER W L. Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds[J]. *Wound Repair Regen*, 2000, 8(3): 216-225.
- [13] BENNETT R D, MAUER A S, PITTELKOW M R, STREHLER E E. Calmodulin-like protein upregulates myosin-10 in human keratinocytes and is regulated during epidermal wound healing in vivo[J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 29(3): 765-769.
- [14] WEAVER A J, SULLIVAN W P, FELTS S J, OWEN B A, TOFT D O. Crystal structure and activity of human p23, a heat shock protein 90 co-chaperone[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 23045-23052.
- [15] GAUSDAL G, GJERTSEN B T, FLADMARK K E, DEMOL H, VANDEKERCKHOVE J, DOSKELAND S O. Caspase-dependent, geldanamycin-enhanced cleavage of co-chaperone p23 in leukemic apoptosis[J]. *Leukemia*, 2004, 18(12): 1989-1996.
- [16] CHEN Y, ZHAO M, WANG S, CHEN J, WANG Y, CAO Q, ZHOU W, LIU J, XU Z, TONG G, LI J. A novel role for DYX1C1, a chaperone protein for both Hsp70 and Hsp90, in breast cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(9): 1265-1276.
- [17] WOZNIAK K, PIASKOWSKI S, GRESNER S M, GOLANSKA E, BIENIEK E, BIGOSZEWSKA K, SIKORSKA B, SZYBKA M, KULCZYCKA-WOJDALA D, ZAKRZEWSKA M, ZAWLIK I, PAPIERZ W, STAWSKI R, JASKOLSKI D J, OCH W, SIERUTA M, LIBERSKI P P, RIESKE P. BCR expression is decreased in meningiomas showing loss of heterozygosity of 22q within a new minimal deletion region[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008, 183(1): 14-20.
- [18] CHETCUTI A, ADAMS L J, MITCHELL P B, SCHOFIELD P R. Microarray gene expression profiling of mouse brain mRNA in a model of lithium treatment[J]. *Psychiatr Genet*, 2008, 18(2): 64-72.
- [19] WEI L, WANG Z, CUI T, YI F, BU Y, DING S, MA Y, SONG F. Proteomic analysis of cervical cancer cells treated with adenovirus-mediated MDA-7[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(4): 510-516.
- [20] SHI Y, ZHAI H, WANG X, HAN Z, LIU C, LAN M, DU J, GUO C, ZHANG Y, WU K, FAN D. Ribosomal proteins S13 and L23 promote multidrug resistance in gastric cancer cells by suppressing drug-induced apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 296(2): 337-346.
- [21] STRAUSBERG R L, FEINGOLD E A, GROUSE L H, DERGE J G, KLAUSNER R D, COLLINS F S, WAGNER L, SHENMEN C M, SCHULER G D, ALTSCHUL S F, ZEEBERG B, BUETOW K H, SCHAEFER C F, BHAT N K, HOPKINS R F, JORDAN H, MOORE T, MAX S I, WANG J, HSIEH F, DIATCHENKO L, MARUSINAK, FARMER A A, RUBIN G M, HONG L, STAPLETON M, SOARES M B, BONALDO M F, CASAVANT T L, SCHEETZ T E, BROWNSTEIN M J, USDIN T B, TOSHIYUKI S, CARNINCI P, PRANGE C, RAHA S S, LOQUELLANO N A, PETERS G J, ABRAMSON R D, MULLAHY S J, BOSAK S A, MCEWAN P J, MCKERNAN K J, MALEK J A, GUNARATNE P H, RICHARDS S, WORLEY K C, HALE S, GARCIA A M, GAY L J, HULYK S W, VILLALON D K, MUZYNY D M, SODERGREN E J, LU X, GIBBS R A, FAHEY J, KETTEMAN M, MADAN A, RODRIGUES S, SANCHEZ A, WHITING M, YOUNG A C, SHEVCHENKO Y, BOUFFARD G G, BLAKESLEY R W, TOUCHMAN J W, GREEN E D, DICKSON M C, RODRIGUEZ A C, GRIMWOOD J, SCHMUTZ J, MYERS R M, BUTTERFIELD Y S, KRZYWINSKI M I, SKALSKA U, SMAILUS D E, SCHNERCH A, SCHEIN J E, JONES S J, MARRA M A. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26): 16899-16903.