氧钒离子结合于 GroEL(HSP60)并促进 GroEL 的解聚

雷万华 刘会雪 钟丽君 杨晓达* 王夔

(北京大学 药学院化学生物学系预防药物研究室, 医药分析中心, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083.)

* 联系人, E-mail: xyang@bjmu.edu.cn

摘要 对钒化合物在线粒体上的可能作用靶点进行研究, 发现氧钒离子在鼠肝线粒体的结合量达 (244 ± 58) nmol/mg 蛋白, 表观结合解离常数为 $(2.0 \pm 0.8) \times 10^{-16}$ mol/L. 使用凝胶排阻色谱将氧钒离子结合蛋白分离后, 用质谱方法和免疫试验鉴定线粒体中的主要钒结合蛋白为 60 kD 的热休克蛋白(HSP60). 实验发现, 氧钒离子结合于 HSP60 后导致 HSP60 的聚合体 GroEL 解聚. HSP60 是一个关键的分子伴侣, 许多研究表明它参与一些炎症和自身免疫性疾病(如 2 型糖尿病)的发病过程. 因此, HSP60 可能是钒化合物体内作用的一个非常重要的新靶点; 其相互作用可能与钒化合物的降血糖、抗癌的药理以及钒的毒性作用有关.

关键词 钒化合物 线粒体 GroEL(HSP60) 糖尿病

近些年来, 钒化合物的降血糖作用 [1,2] 以及对肿瘤的预防和治疗作用 [3] 受到国内外学者的广泛关注和深入研究. 钒化合物降糖效应的机理过去一直被认为是胰岛素的活化 [4] 和/或对蛋白酪氨酸激酶的抑制作用 [5], 然而对动物模型的研究发现, 钒化合物的降糖作用与其蛋白酪氨酸激酶的抑制作用没有明显的构效关系. 钒化合物的作用也被证明独立于胰岛素信号的传导过程 [6]. 此外, 钒化合物作为药物进入临床应用的毒性问题也得到很多的关注.

最近, 线粒体功能变化和糖尿病的关系受到重视 [7-12], 线粒体生物能的生产能力被认为是 2 型糖尿病发展的重要预警信号 [9,10]. 例如, 骨骼肌线粒体生物能的生产能力与 2 型糖尿病病人的胰岛素抵抗作用有着密切的关系 [12]; 2 型糖尿病病人的胰岛分泌胰岛素水平的下降与一系列线粒体功能的变化(ATP合成减少、线粒体膜电位降低等)有关联 [7]. 另外, 线粒体在许多与细胞凋亡和氧化损伤相关的细胞内的信号转导过程中起着重要的作用 [13]. 我们最近的研究结果表明, 钒酸盐和有机配体钒配合物在一定剂量内能增强细胞线粒体的膜电位, 诱导细胞内活性氧生成 [14]. 因此, 钒化合物影响线粒体的功能可能是其药理和/或毒性作用的至关重要的一个方面.

本文研究和分离了氧钒离子与线粒体的结合靶蛋白. 研究发现热休克蛋白 60 (HSP60) 是氧钒离子在细胞线粒体中的一个最主要的结合蛋白. 氧钒离子

与 HSP60 具有极高的亲和力, 并且结合作用可导致 HSP60 寡聚体(GroEL)解聚成为单体形式. 我们的实验发现将对钒化合物的生物学效应或毒理作用的机理阐明有重要的意义.

1 材料与方 法

() 材料. 鼠单克隆 HSP60 抗体(Clone LK-1) 购自 Sigma 公司(St. Louis, MO); 碱磷酶标记马抗鼠 IgG (H+L) 购自北京中杉金桥生物科技公司; 硫酸氧钒购自 Merck 公司(Darmstadt, Germany); 其他所用化学试剂均为分析纯.

() 鼠肝线粒体提取. 线粒体使用分级离心的方法从鼠肝中提取分离得到 [15]. 鼠肝悬浮于冷的匀浆液 (300 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L TES, 0.2 mmol/L EGTA, pH 7.2), 将匀浆液于 760 r/min 离心两次, 每次 10 min, 取上清液, 于 8740 r/min 离心 10 min, 同时制备 Percoll 梯度液 (18%, 30%, 60%). 将上述离心后所得的线粒体沉淀小心加到 Percoll 梯度液上面, 于 8740 r/min 离心 10 min. 位于 Percoll 梯度液 60%~30% 之间的沉淀即为线粒体, 再用匀浆液稀释 20 倍洗涤, 6800 r/min 离心 10 min. 以上操作均在 0~4℃ 完成. 线粒体用 Bradford 法测定总蛋白浓度 [16].

() 钒浓度的测定. 钒浓度的测定采用催化分光光度法测定, 原理基于 V() 催化氯酸钾氧化二甲基黄反应 [17]. 将 0~0.2 mmol/L 范围内的适量钒样品

加入到 2%硫酸, 100 mmol/L 酒石酸, 60 mmol/L 氯酸钾, 0.13 mmol/L 二甲基黄的反应液中, 此反应中 $V()$ 可以迅速被氯酸钾氧化成 $V()$, 催化反应在 95 °C 水浴中进行 5 min 后迅速取出用冷水冷却 3 min 中止反应. 然后将溶液置入酶标仪(Sunrise, Tecan, Switzerland)中于波长 516 nm 测量吸光度, 不加催化剂钒反应后的吸光度为 A_0 , 钒浓度在 0.02~0.2 mmol/L 范围内与 $\lg(A_0/A)$ 值成线性关系.

() 氧钒离子与线粒体结合力的测定. 按照 () 中的方法提取鼠肝线粒体, 将总蛋白浓度为 0.25 mg/mL 的线粒体与含有 (0~0.2 mmol/L) 氧钒离子的缓冲溶液 (0.25 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4) 在 25 °C 孵育 1 h (此时结合已达饱和, 并且线粒体形态未发生明显变化). 然后将孵育液于 7600 r/min 离心 10 min, 取出上清溶液按照 () 节中的方法测定上清溶液钒浓度 c_V . 游离 VO^{2+} 浓度按下面公式计算得出:

$[VO^{2+}] = K_d \cdot [VO^{2+}-EDTA] / [EDTA] = K_d \cdot c_V / (c_{EDTA} - c_V)$, 其中, $c_{EDTA} = 0.25$ mmol/L, K_d 为 pH 7.4 时 VO^{2+} -EDTA 减除酸效应系数后的条件结合解离常数 (3.98×10^{-16} mol/L [18]). 用总钒浓度减去上清溶液未结合钒浓度 c_V 即为线粒体结合钒浓度. 用 Microcal Origin™ 程序对钒结合曲线的数据进行 Hill 模型拟合, 从而得到氧钒离子-线粒体的表观解离常数和线粒体结合氧钒离子达饱和时的结合量.

() 线粒体蛋白凝胶排阻色谱分离. 鼠肝线粒体按 () 节中的方法制备. 将总蛋白浓度为 2.5 mg/mL 的线粒体与含有 1.0 mmol/L 氧钒离子的缓冲溶液 (1.0 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4) 在 25 °C 孵育 1 h, 然后将孵育液于 7600 r/min 离心 10 min. 将线粒体沉淀溶解在 10 mL 裂解缓冲液 (4% CHAPS, 4 mol/L 脲, 2 mol/L 硫脲, 65 mmol/L DTT) 中. 溶解后的蛋白样品进样到凝胶排阻色谱进行分离. 色谱条件为: Hitachi 638-50 HPLC; TOYOPEARL® HW-55F 凝胶柱 ($\phi 2.0$ cm $\times$ 30 cm); 进样量 1.0 mL; 洗脱液 (50 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 5% 正丁醇 [19], pH 7.5), 流速为 2.0 mL/min; 280 nm UV 吸收检测. 洗脱峰用自动样品收集器收集. 收集到的洗脱组分分别用硝酸消化后按 () 中的方法测定钒的含量.

含钒的洗脱组分进一步做变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) / 蛋白免疫印迹检测法 (Western blotting) 分析 [20], 使用 HSP60 单克隆抗体 (Clone LK-1) 和碱磷酶标记的马抗鼠 IgG (H+L) (二抗) 检测 HSP60 的含量;

碱磷酶标记二抗用 BCIP/NBT 作为底物检测. 同时从 SDS-PAGE 电泳胶中切取出相应条带, 用 MALDI-TOF 质谱 (LDI-1700, American Liner Scientific Company) 分析蛋白物种鉴定 [21].

() HSP60 的间接酶联免疫吸附法 (Indirect ELISA) 检测. 按文献方法 [20] 进行: 将 100 μ L 线粒体蛋白溶液稀释在 PBSN 溶液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.4 mmol/L KH_2PO_4 , 0.05% NaN_3 , pH 7.3) 中并包被在 ELISA 板 (Costar 3590) 上, 4 °C 过夜. ELISA 板各孔用 300 μ L 封闭液 (10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 0.5% BSA, 0.1% Tween 20, pH 7.5) 室温封闭 15 min. 充分倾出各孔内的溶液后, 加入 100 μ L HSP60 抗体到 ELISA 板各孔室温孵育 1~2 h. 倾出溶液, 洗涤 ELISA 板 3 次, 加入 100 μ L 碱磷酶标记马抗鼠 IgG (H+L) 到 ELISA 板各孔, 室温孵育 1 h. 洗涤 ELISA 板 3 次, 加入 100 μ L PNPP 底物到 ELISA 板各孔, 室温孵育 1 h 左右. 最后, 加入反应中止液 (0.5 mol/L NaOH) 中止反应, 用酶标仪在 405 nm 下检测吸光度.

() HSP60 的点印迹 (dot blotting) 检测. 10 μ L 蛋白溶液转移到聚偏二氟乙烯 PVDF 膜上, 将膜封闭后, 分别与 HSP60 单克隆抗体和酶标二抗温育 [20], 用 () 中的方法进行分析.

2 结果与讨论

2.1 氧钒离子与线粒体的结合

氧钒离子与线粒体的结合曲线示于图 1, 其中 0.25 mmol/L EDTA 作为竞争配体. 通过拟合 Hill 模型, 计算得到氧钒离子在线粒体上的结合量达 (244 ± 58) nmol/mg (蛋白), 表观结合解离常数约为 $(2.0 \pm$

图 1 氧钒离子与线粒体的结合曲线
每个数据都采用 3 次平行实验结果的平均值

0.8×10^{-16} mol/L. 作为对照, 偏钒酸根(VO_3^-)在线粒体的结合量只有 (161 ± 1) nmol/mg(蛋白), 表观结合解离常数为 $(6.4 \pm 1.5) \times 10^{-7}$ mol/L(结果未显示).

2.2 氧钒离子结合蛋白的分离鉴定

线粒体钒结合蛋白的凝胶色谱分离结果如图 2 所示. 线粒体与钒温育后, HPLC 色谱图在洗脱时间 38 min 处出现一个新的洗脱峰, 同时在这个洗脱峰检测出钒. SDS-PAGE 电泳检测出这个洗脱峰主要含 60-kDa 左右的一个蛋白条带(图 3 中插图); 用免疫试验验证它能被 HSP60 单抗特异性识别结合(图 3 中插图); 质谱分析也鉴定了这个蛋白为 HSP60(图 3).

为了进一步确定钒结合蛋白就是 HSP60, 进行了凝胶色谱流出曲线的 Indirect ELISA 分析, 结果如图 2 所示. 两个洗脱峰被检测出含有 HSP60, 一个是在较早的出峰时间 15 min 处, 另一个正好在富含钒的洗脱峰 38 min 处.

2.3 氧钒离子对 HSP60 聚合的影响

图 4 显示了线粒体蛋白与不同浓度的氧钒离子温育后的凝胶色谱变化; 其中用免疫点印迹对洗脱时间 15 和 38 min 的两个组分进行了 HSP60 含量的检测. 未与氧钒离子温育的线粒体蛋白洗脱峰中, 只有 15 min 的峰含有 HSP60. 随着温育氧钒离子浓度的

图 3 MALDI-TOF 质谱分析鉴定钙结合蛋白

(a) 蛋白从凝胶上切下, 在 MALDI-TOF 质谱上获得肽指纹图谱, 使用 MASCOT 在 NCBI 蛋白质数据库中检索。插图 of 钙结合蛋白组分 (38 min 蛋白峰) 的 SDS-PAGE 电泳和蛋白免疫印迹结果。Marker 为分子量标准。(b) 鼠肝线粒体蛋白 HSP60 的序列, 其中黑体部分表示得到确认的多肽碎片

增加, 洗脱时间 15 min 的洗脱峰高度以及其中的 HSP60 含量逐渐减少, 同时洗脱时间 38 min 的洗脱峰高度以及其中的 HSP60 含量逐渐增加。

3 小结

上述实验结果显示, 氧钒离子与线粒体蛋白有很大的结合力 ($K_d = 2.0 \times 10^{-16}$ mol/L) (图 1)。对比之下, 偏钒酸根和线粒体蛋白的结合力较小 (6.4×10^{-7} mol/L), ESR 检测钒与线粒体作用后的氧化还原价态并没有变化 (结果未给出)。

用凝胶色谱分离对氧钒离子有较高的选择性结

合的蛋白 (图 2)。结果表明, 此蛋白为 HSP60, 证据包括: () 该蛋白能被 HSP60 单抗所识别; () indirect ELISA 实验表明富含钒的洗脱峰与富含 HSP60 的洗脱峰正好重叠; () 质谱分析表明, 蛋白序列符合 HSP60, 并在蛋白数据库中为唯一的检索结果。

钒在血浆中有五价的钒酸根离子和四价的氧钒离子两种形式, 而钒酸根离子在进入细胞的过程都被还原成氧钒离子 [22]。在以钒化物给药的动物实验中, 约 90% 的钒都以氧钒离子的形式存在鼠组织中 [23]。目前已知的与氧钒离子有较强结合的蛋白质

图4 与不同浓度氧钒离子温育后的线粒体蛋白分离色谱图

A~D: 0, 0.5, 1.0, 1.5 mmol/L. (a) 280 nm 吸光度检测的蛋白含量; (b) 洗脱时间 15 和 38 min 的洗脱峰分别用免疫点印迹检测 HSP60 的含量; (c) 免疫点印迹的定量结果

有很多, 比如铁蛋白、转铁蛋白、白蛋白、钙磷酸酶^[24~27]和F₁-ATPase^[28,29]等. 但这些氧钒离子结合蛋白的结合力一般都在 10^{-10} mol/L 左右^[30]. 相比之下, HSP60 可能是钒化合物最主要的体内作用的一个靶点.

HSP60 在线粒体内是丰度最大的蛋白质之一^[31], 正常状态以 14 个亚基形成的寡聚体形式存在^[32]. 从图 4 可见, HSP60 寡聚体出现在较早的洗脱峰(洗脱时间 15 min)中. 与氧钒离子温育后, 氧钒离子结合的 HSP60 单体则出现在了洗脱时间 38 min 的洗脱组分中. 随着温育氧钒离子浓度的增加, HSP60 寡聚体的量越来越少, 而 HSP60 单体的量越来越多. 因此, 氧钒离子与 HSP60 的结合导致了 HSP60 由寡聚体解聚为单体形式. 同时从图 2 可见, 氧钒离子绝大部分集中在洗脱时间 38 min 的 HSP60 单体洗脱组分中, 在洗脱时间 15 min 的组分 HSP60 寡聚体中结合的氧钒离子相对很少(扣除背景值后). 这说明氧钒离子主要结合于 HSP60 单体蛋白, 并且亲和力远远高于与其他蛋白物种的结合.

氧钒离子对 HSP60 的作用与钒酸根显然不同. 钒酸ADP复合物作为ATP类似物能够与许多ATP酶活性的蛋白结合, 如肌球蛋白, F₁-ATPase, 肌动蛋白等^[33~36]. 曾经报道聚合的钒酸根离子能抑制肌动蛋白的聚合, 也能较小程度地诱导肌动蛋白的解聚^[37]. 但是, 钒酸ADP复合物不能诱导 HSP60 聚合体GroEL的

构象变化和对底物蛋白的折叠^[33]. 根据GroEL的结构特点^[38,39], 我们推测氧钒离子可能结合于GroEL的ATP结合位点, 进一步的研究正在进行中.

HSP60 作为线粒体里必不可少的功能蛋白参与着许多细胞内的生命活动, 主要是作为分子伴侣在 HSP10 的协同下并依赖ATP水解的方式折叠装配新合成的蛋白质^[39]. 除了大部分分布在线粒体内基质外, 约有 15%~20%的HSP60 分布在线粒体外, 包括细胞表面^[40]. 有研究者报道, 在应激和凋亡条件下细胞表面HSP60 的表达增高^[41]. 有一组研究人员还发现在胰腺β细胞中表达了一组HSP60 相关的蛋白质^[42], 后来又发现在非肥胖型糖尿病(NOD)小鼠模型中, 胰腺β细胞损伤和T淋巴细胞对HSP60 家族蛋白质的自发性免疫反应有关^[43,44]. 本文的结果发现, 氧钒离子能够和HSP60 以高亲和力结合并且促使 HSP60 聚合体GroEL的解聚. 钒的这种作用, 很可能与氧钒离子的细胞毒性或者钒化合物抗糖尿病和抗癌作用有关. 因此, 进一步研究氧钒离子与HSP60 之间的相互作用是非常必要和有意义的.

参 考 文 献

- 1 Willsky G R, Goldfine A B, Kostyniak P J, et al. Effect of vanadium() compounds in the treatment of diabetes: *in vivo* and *in vitro* studies with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(). *J Inorg Biochem*, 2001, 85: 33—42
- 2 Heyliger C E, Tahiliani A G, McNeill J H. Effect of vanadate on

- elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science*, 1985, 227(4693): 1474—1477[DOI]
- 3 Evangelou A M. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol/Hematol*, 2002, 42: 249—265[DOI]
- 4 Posner B I, Faure R, Burgess J W, et al. Peroxovanadium compounds. *J Biol Chem*, 1994, 269(6): 4596—4604
- 5 Huyer G, Liu S, Kelly J, et al. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem*, 1997, 272(2): 843—851[DOI]
- 6 Li J, Elberg G, Sekar N, et al. Antilipolytic actions of vanadate and insulin in rat adipocytes mediated by distinctly different mechanisms. *Endocrinology*, 1997, 138(6): 2274—2279[DOI]
- 7 Anello M, Lupi R, Spampinato D, et al. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 2005, 48: 282—289[DOI]
- 8 Petersen K F, Dufour S, Shulman G I. Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *PLoS Med*, 2005, 2(9): 0879—0884
- 9 Petersen K F, Dufour S, Befroy D, et al. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2004, 350(7): 664—671[DOI]
- 10 Petersen K F, Befroy D, Dufour S, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: Possible role in insulin resistance. *Science*, 2003, 300(5622): 1140—1142[DOI]
- 11 Boirie Y. Insulin regulation of mitochondrial proteins and oxidative phosphorylation in human muscle. *Trends Endocrinol Metab*, 2003, 14(9): 393—394[DOI]
- 12 Kelley D E, He J, Menshikova E V, et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, 51: 2944—2950[DOI]
- 13 Pollack M, Leeuwenburgh C. Apoptosis and aging: Role of the mitochondria. *J Gerontol Ser A-Biol Sci Med Sci*, 2001, 56A(11): B475—B482
- 14 Yang X G, Yang X D, Yuan L, et al. The permeability and cytotoxicity of insulin-mimetic vanadium compounds. *Pharm Res*, 2004, 21(6): 1026—1033[DOI]
- 15 Susin S A, Larochette N, Geuskens M, et al. Purification of mitochondria for apoptosis assays. *Methods Enzymol*, 2000, 322: 205—208
- 16 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—254
- 17 张爱梅, 崔惠, 秦延河. 氯酸钾-二甲基黄-钒()体系催化光度法测定钒. *分析实验室*, 1994, 13(3): 44—51
- 18 周同惠. *分析化学手册*. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 1997. 517
- 19 Penn N, Mackler B. Microsomal DPNH cytochrome c reductase. *Biochim Biophys Acta*, 1958, 27(3): 539—543
- 20 Wiley J. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996
- 21 Xiao K, Shenoy S K, Nobles K, et al. Activation-dependent conformational changes in {beta}-arrestin 2. *J Biol Chem*, 2004, 279(53): 55744—55753[DOI]
- 22 Verma S, Cam M C, McNeill J H. Nutritional factors that can favorably influence the glucose/insulin system: Vanadium. *J Am Coll Nutr*, 1998, 17(1): 11—18
- 23 Sakurai H, Tsuchiya K, Nukatsuka M, et al. Insulin-like effect of vanadyl ion on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol*, 1990, 126(3): 451—459
- 24 Heinemann G, Fichtl B, Mentler M, et al. Binding of vanadate to human albumin in infusion solutions, to proteins in human fresh frozen plasma, and to transferrin. *J Inorg Biochem*, 2002, 90: 38—42[DOI]
- 25 Harris W R, Carrano C J. Binding of vanadate to human serum transferrin. *J Inorg Biochem*, 2001, 22(3): 201—218[DOI]
- 26 Grady J K, Shao J L, Arosio P, et al. Vanadyl() binding to mammalian ferritins. An EPR study aided by site-directed mutagenesis. *J Inorg Biochem*, 2000, 80: 107—113[DOI]
- 27 Parra-Diaz D, Wei Q, Lee E Y C, et al. Binding of vanadium () to the phosphatase calcineurin. *FEBS Lett*, 1995, 376: 58—60[DOI]
- 28 Frasch W D. Vanadyl as a probe of the function of the F₁-ATPase-Mg²⁺ cofactor. *J Bioenerg Biomembr*, 2000, 32(5): 539—546[DOI]
- 29 Chen W, LoBrutto R, Frasch W D. EPR spectroscopy of VO²⁺-ATP bound to catalytic site 3 of chloroplast F₁-ATPase from *Chlamydomonas* reveals changes in metal ligation resulting from mutations to the phosphate-binding loop threonine (bT168). *J Biol Chem*, 1999, 274(11): 7089—7094[DOI]
- 30 Nechay B R, Nanninga L B, Nechay P S E. Vanadyl() and vanadate () binding to selected endogenous phosphate, carboxyl, and amino ligands; calculations of cellular vanadium species distribution. *Arch Biochem Biophys*, 1986, 251(1): 128—138[DOI]
- 31 Scheffler N K, Miller S W, Carroll A K, et al. Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometric identification of mitochondrial proteins from an SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Mitochondrion*, 2001, 1: 161—179[DOI]
- 32 Xu Z H, Horwich A L, Sigler P B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP) 7 chaperonin complex. *Nature*, 1997, 388: 741—750[DOI]
- 33 Chaudhry C, Farr G W, Todd M J, et al. Role of the γ-phosphate of ATP in triggering protein folding by GroEL-GroES: Function, structure and energetics. *Embo J*, 2003, 22(19): 4877—4887[DOI]
- 34 Nadanaciva S, Weber J, Senior A E. Binding of the transition state analog MgADP-fluoroaluminate F₁-ATPase. *J Biol Chem*, 1999, 274: 7052—7058[DOI]
- 35 Park S, Ajtai K, Burghardt T P. Mechanism for coupling free energy in ATPase to the myosin active site. *Biochemistry*, 1997, 36: 3368—3372[DOI]
- 36 Combeau C, Carlier M F. Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF₃ and AlF₄. *J Biol Chem*, 1988, 263: 17429—17436
- 37 Ramos S, Manuel M, Tiago T, et al. Decavanadate interactions with actin: Inhibition of G-actin polymerization and stabilization of dcameric vanadate. *J Inorg Biochem*, 2006, 100(11): 1734—1743
- 38 陈忠, 苏维埃, 汤章城. 碗豆热激蛋白 Hsp60 对酶的高温保护功能及其机理. *科学通报*, 1999, 44(20): 2171—2175
- 39 Ostermann J, Horwich A L, Neupert W, et al. Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature*, 1989, 341(6238): 125—130[DOI]
- 40 Soltys B J, Gupta R S. Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. *Exp Cell Res*, 1996, 222: 16—27[DOI]
- 41 Gupta S, Knowlton A A. HSP60, bax, apoptosis and the heart. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(1): 51—58[DOI]
- 42 Brudzynski K, Cunningham I A, Martinez V. A family of hsp60-related proteins in pancreatic beta cells of non-obese diabetic (NOD) mice. *J Autoimmun*, 1995, 8: 859—874[DOI]
- 43 Birk O S, Douek D C, Elias D, et al. A role of Hsp60 in autoimmune diabetes: Analysis in a transgenic model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1032—1037[DOI]
- 44 Birk O S, Elias D, Weiss A S, et al. NOD mouse diabetes: The ubiquitous mouse Hsp60 is a β-cell target antigen of autoimmune T cells. *J Autoimmun*, 1996, 9: 159—166[DOI]

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-11-1246>