

毛兰素诱导结肠癌SW480细胞凋亡的分子机制*

崔旭琴^{1,2} 苏鹏² 朱启或^{1,2} 安君霞² 王晶² 吴坚^{1**} 唐亚雄^{2**}

(¹西南交通大学生命科学与工程学院 成都 610031)

(²中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘要 毛兰素是名贵中药材石斛的活性化合物之一,研究了其对结肠癌SW480细胞的增殖抑制作用及其诱导的细胞凋亡分子机制.实验表明,毛兰素能显著抑制结肠癌SW480细胞的增殖,且随着药物浓度与时间增加,抑制率呈明显的剂量时间效应,48 h半数抑制浓度 IC_{50} 为24.5 nmol/L;毛兰素能显著诱导结肠癌SW480细胞凋亡,并诱导细胞周期阻滞于G2-M期;分子机制研究显示,毛兰素通过下调XIAP、Bcl-xL蛋白表达以及激活Caspase-9、Caspase-7、Caspase-3和PARP活性从而诱导SW480细胞凋亡.结果表明毛兰素可能对结肠癌的防治具有潜在药用价值.图6 参17

关键词 毛兰素;人结肠癌细胞SW480;细胞增殖;细胞凋亡;细胞周期;石斛;中药

CLC R965 : Q949.718.430.6

Molecular Mechanism of Apoptosis of Human Colorectal Cancer SW480 Cells Induced by Erianin*

CUI Xuqin^{1,2}, SU Peng², ZHU Qiyu^{1,2}, AN Junxia², WANG Jing², WU Jian^{1**} & TANG Yaxiong^{2**}

(¹School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

(²Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract The antitumor potential of erianin, one of the active compounds of the traditional Chinese medicine, *Dendrobium*, was investigated. Herein, erianin's action on proliferation, apoptosis and cycle progression of human colorectal cancer SW480 cells was evaluated especially. The results *in vitro* demonstrated that erianin significantly suppressed proliferation of SW480 cancer cells in a dose- and time-dependent manner which was associated with induced apoptosis and cell cycle G2-M arrest, and the IC_{50} value was 24.5 nmol/L after 48 h exposure to erianin. Mechanistically, erianin could down-regulate the expression of XIAP and Bcl-xL proteins, activate Caspase-9, Caspase-7, Caspase-3 and PARP activity, and lead to marked apoptotic inhibitory effect of SW480 cells. These findings suggest that erianin may be a promising antitumor drug for prevention and treatment of colon cancer. Fig 6, Ref 17

Keywords erianin; SW480; proliferation; apoptosis; cell cycle; *Dendrobium*; Chinese medicine

CLC R965 : Q949.718.430.6

结直肠癌 (Colorectal cancer, CRC) 为人类高发恶性肿瘤,近20年来其发病率呈明显上升趋势,严重危害人类健康.据统计,世界范围内每年新增近一百万例结肠癌病人,而随着我国经济发展和人民生活水平的不断提高特别是生活方式与膳食结构的显著改变,我国的结肠癌发病率也逐年上升.尽管目前结肠癌的诊治领域取得了相当进展,但是病人手术后会出现复发或转移性病变导致预后极差,其5年期生存率一直徘徊在50%左右,而目前尚无特效治疗药物.因此,对化疗相对敏感的结直肠癌而言,继续寻找高效低毒副作用的

抗癌新药物非常必要也任重道远^[1~2].

基于天然产物的抗肿瘤药物研发近年来一直是抗肿瘤药物研发的热点,临床上常用的抗癌药物如紫杉醇等大多也来自天然产物.石斛是我国常用但濒临灭绝的名贵中药材,为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 多种植物的新鲜或干燥茎的统称.现代药理学研究表明石斛具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力、扩张血管以及抗血小板凝集等作用,近年来其抗肿瘤研究越来越受到重视,但具体哪些成分有效,哪些无效,有效成分与活性之间的相互关系以及相关分子机制则少有涉及.深入开展石斛抗肿瘤活性的物质基础及其分子机制研究,对于合理利用石斛属植物资源具有重要的理论和现实意义^[3~4].

毛兰素是石斛的活性化合物之一,从化学结构上看,属联苄类化合物,化学名为2-甲氧基-5-[2-(3,4,5-三甲氧基-苯基)-乙基]-苯酚 (图1),研究表明此类化合物具有抗肿瘤活性,但对其抗肿瘤详细分子机制及其靶标蛋白还知之甚少.毛兰素对人结肠癌细胞的抗癌活性也鲜有报道^[5~8].因此,本文通过体外研究毛兰素对结肠癌细胞凋亡与细胞周期的影响,从而探讨其可能的抗癌分子机制.

收稿日期: 2011-04-11 接受日期: 2011-05-12

*中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (No. KSCX2-EW-J-22)、四川省国际合作计划 (No. 2011HH0012)、国家自然科学基金项目 (No. 81072662) 和中国科学院“西部之光”人才培养计划重点项目资助. Supported by the Frontier Field Project of the Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-J-22), the International Cooperation Program of Sichuan, China (No. 2011HH0012), the National Natural Science Foundation of China (No. 81072662) and the “Western Light” Foundation of the Chinese Academy of Sciences

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: tangyx@cib.ac.cn; wujianer@sina.com)

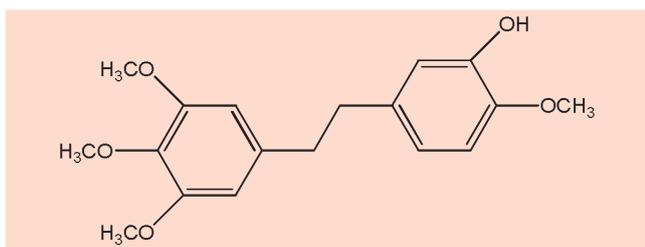


图1 毛兰素的化学结构
Fig. 1 Chemical structure of erianin

1 材料与方法

1.1 细胞株、药材与试剂

人结肠癌细胞株SW480、HCT116由中国科学院成都生物研究所肿瘤信号转导与分子药理实验室引进与保藏,用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基(100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素)于37 ℃、5% CO₂条件下进行常规细胞培养.细胞培养所用主要试剂购自Invitrogen公司,PARP、Caspase-9、Caspase-7、XIAP、Bcl-xL、β-actin及HRP偶联的羊抗兔/鼠IgG等抗体购自Cell Signaling Technology公司,Caspase-3活性测定试剂盒购自凯基生物公司,MTT、DAPI购自Sigma公司,其余试剂均为国产分析纯.

1.2 细胞活性MTT检测

MTT测定参照文献[9]进行.首先,分别接种人结肠癌细胞SW480、HCT116对数生长期 2×10^4 个细胞于24孔细胞培养板上,3个复孔,细胞贴壁后加入不同浓度毛兰素,共设8个药物浓度梯度,分别为0.1% DMSO和9.8、19.6、39.3、78.5、157.1、392.6、785.3 nmol/L毛兰素,药物处理48 h后加入新鲜配制终浓度为1 mg/mL的MTT [3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐]溶液并于37 ℃温育3 h,全波长酶标仪检测570 nm波长吸光度,0.1% DMSO作为阴性对照,计算毛兰素对细胞生长的抑制率与半数抑制浓度IC₅₀;然后,将不同浓度梯度的毛兰素分别处理人结肠癌细胞SW480 1 d、3 d、5 d后,进而绘制SW480细胞的生长曲线,重复试验3次并作统计处理.

1.3 细胞形态检测

参照文献[10]进行.培养SW480细胞至饱和度70%,分别用0.1% DMSO与39.3 nmol/L毛兰素处理细胞48 h,吸出培养基,1xPBS洗涤3次后于倒置显微镜下观察.

1.4 DAPI染色

参照文献[11]进行.培养SW480细胞至饱和度为50%~80%,分别用0.1% DMSO与39.3 nmol/L毛兰素处理细胞48 h,然后加入4%多聚甲醛固定细胞30 min后,1xPBS洗涤一次后,加入终浓度为1 μg/mL DAPI染色液染色5 min,PBS润洗,细胞涂片经风干固定后于正置荧光显微镜下镜检,荧光激发波长为350 nm,发射波长为460 nm.

1.5 细胞周期分布

细胞流式分析检测方法参见文献[12],先将0.1% DMSO和浓度为19.6 nmol/L、39.3 nmol/L、78.5 nmol/L的毛兰素分别加入到SW480细胞中,24 h后收集细胞,细胞先后经70%冰乙醇-20 ℃过夜固定、PBS洗涤3次以及50 μg/mL PI染料避光染色30 min,最后通过流式细胞仪检测细胞周期中G₁、S、

G₂-M各期分布并统计分析结果.

1.6 Caspase-3活性检测

参照文献[13]进行,先将0.1% DMSO和浓度为19.6 nmol/L、39.3 nmol/L、78.5 nmol/L的毛兰素分别处理SW480细胞24 h,收集并洗涤细胞,于冰上裂解细胞20~60 min,4 ℃离心1 min,吸取50 μL含100~200 μg蛋白裂解液,加入50 μL的2xReaction Buffer以及5 μL Caspase-3底物,并于37 ℃避光孵育4 h,最后使用全波长酶标仪检测405波长吸光度,计算 $D_{\text{诱导剂}}/D_{\text{阴性对照}}$ 的倍数,从而确定药物对Caspase-3的活性程度,并作统计分析.

1.7 蛋白提取与Western blot

采用RIPA裂解法提取药物处理后细胞总蛋白,Western blot参见文献[14].简言之,在50~80 μg总蛋白中加入适量4xSDS-PAGE上样缓冲液,并于100 ℃条件下变性5 min,8%~15% SDS-PAGE电泳分离后转移到硝酸纤维素膜上,经5%脱脂奶粉封闭后,先后用于抗PARP、Caspase-9、Caspase-7、XIAP、Bcl-xL等一抗抗体孵育过夜以及辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗抗体孵育,采用ECL法通过X-光片曝光显影从而检测相应蛋白表达,免疫印迹最后经洗涤后用β-actin作为内参确定蛋白上样量.

1.8 统计学分析

采用T检验与随机区间实验方差统计分析所有实验数据, $P < 0.05$ 被认为具有显著差异性.

2 结果与分析

2.1 毛兰素对人结直肠癌细胞生长的抑制作用

为测定毛兰素对人结直肠癌细胞的增殖影响,首先评估了不同浓度毛兰素对人结肠癌细胞SW480以及HCT116的影响,给药细胞48 h后经MTT法测定其抗肿瘤活性.图2-A表明,毛兰素对这两种细胞株的生长均有显著的抑制作用,处理48 h的IC₅₀分别为24.5 nmol/L (SW480)和45.0 nmol/L (HCT116) ($P < 0.05$).重点考察了毛兰素对SW480细胞凋亡的影响及其可能的分子机制,图2-B表明不同浓度毛兰素处理SW480细胞1 d、3 d、5 d后对其细胞增值的抑制作用具有明显的时间与浓度效应关系.

2.2 毛兰素诱导SW480细胞的凋亡

细胞形态学研究表明,经毛兰素处理24 h后的人结直肠癌细胞SW480生长明显受到抑制,贴壁细胞数目大为减少,出现细胞典型的凋亡形态特征变化现象,细胞体积缩小,连接消失,与周围的细胞脱离,细胞质密度增加,DAPI染色清晰表明给药后的细胞核固缩并碎裂成小块,凋亡小体数目明显增多(图3).

2.3 毛兰素对细胞周期分布的影响

为探明毛兰素是否会干扰细胞周期的进程,采用流式细胞仪分析SW480细胞在0.1% DMSO对照以及19.6、39.3、78.5 nmol/L毛兰素处理后的细胞周期分布状况.图4表明不同浓度毛兰素处理24 h后G₂-M期细胞百分比比例随着毛兰素剂量增加而显著增加,表明毛兰素能诱导SW480细胞G₂-M期阻滞从而抑制肿瘤细胞生长.

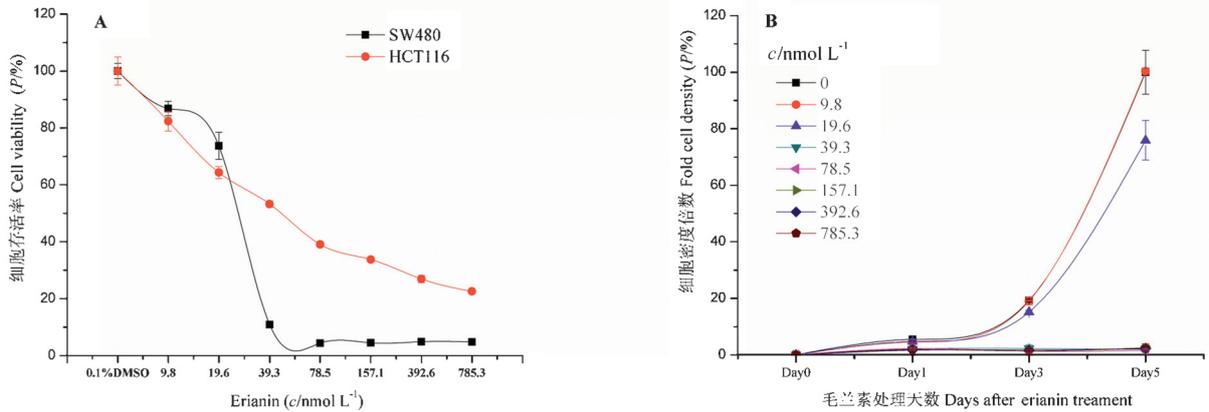


图2 毛兰素对结肠癌细胞的增殖抑制作用

Fig. 2 The inhibitory effects of erianin on human colorectal cancer cell

A: 毛兰素对结肠癌细胞HCT116和SW480的增殖抑制作用; B: 毛兰素对结肠癌细胞SW480生长抑制具有时间和浓度效应关系

A: The inhibitory effects of erianin on human colorectal cancer cells HCT116 and SW480; B: Growth inhibitory effects of erianin on SW480 cells in time- and dose-dependent manners

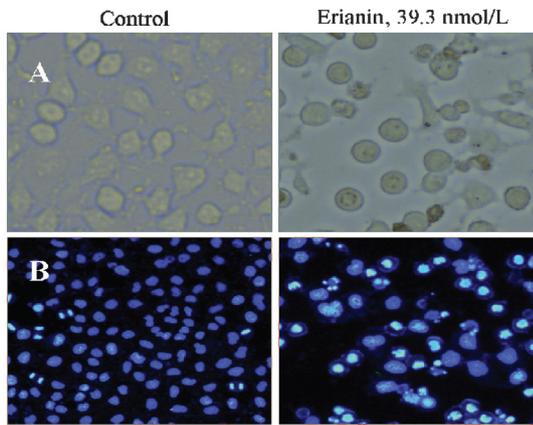


图3 毛兰素诱导SW480细胞凋亡(400×)

Fig. 3 Apoptosis of SW480 cells induced by erianin (400×)

A: 活细胞形态学观察; B: DAPI染色 A: Live cell morphology under phase-contrast light microscope; B: DAPI staining of nuclear morphology under fluorescence microscope

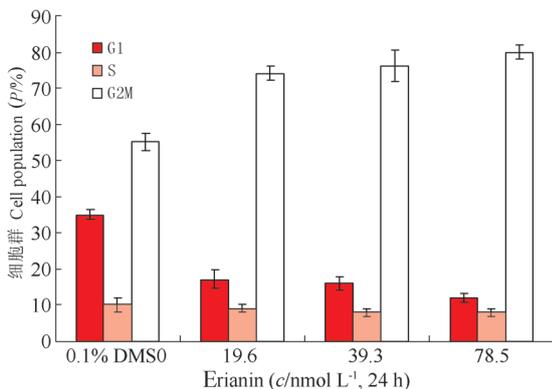


图4 毛兰素诱导SW480细胞周期G2-M阻滞

Fig. 4 G2-M arrest of SW480 cells induced by erianin

2.4 毛兰素对Caspase-3活性的影响

为检测毛兰素对SW480细胞Caspase-3活性的影响, 采用分光光度法测定了其活性, 图5表明, 毛兰素呈剂量依赖方式有效地激活了Caspase-3活性。

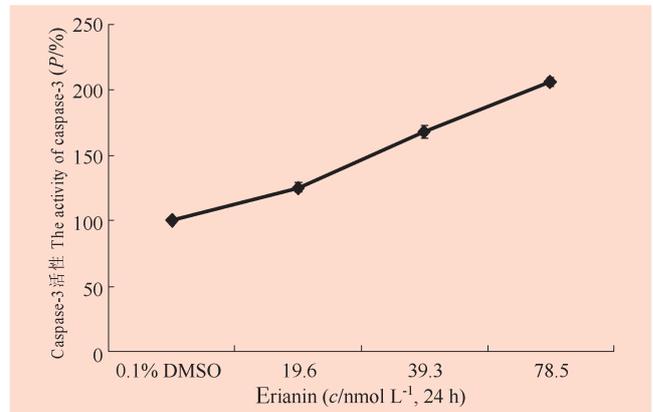


图5 毛兰素激活SW480细胞Caspase-3活性

Fig. 5 Caspase-3 of SW480 cells activated by erianin

2.5 Western blot检测毛兰素对Caspase-9、Caspase-7、PARP、Bcl-xL及XIAP表达的影响

为进一步阐明毛兰素诱导结肠癌细胞凋亡的分子机制, 通过采用0.1% DMSO对照以及19.6、39.3、78.5 nmol/L毛兰素处理SW480细胞24 h并提取相应细胞总蛋白, 通过Western Blot检测其对PARP、Caspase-9、Caspase-7、XIAP、Bcl-xL等表达的影响。图6表明, 39.3 nmol/L和78.5 nmol/L毛兰素能显著诱导SW480细胞poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) 经Caspase切割为 $M_r 89 \times 10^3$ 的降解产物, 也能显著诱导Caspase-7酶原活性并切割为 $M_r 20 \times 10^3$ 、 30×10^3 的降解产物以及诱导Caspase-9酶原活性并切割为 $M_r 17 \times 10^3$ 、 37×10^3 的降解产物; 此外, 78.5 nmol/L毛兰素能明显下调抗凋亡蛋白Bcl-xL的蛋白表达。总之, 毛兰素可通过抑制下调Bcl-xL与XIAP表达以及激活Caspase-9、Caspase-7及PARP活性等从而实现其抗癌活性。

3 讨论

肿瘤细胞凋亡信号通路关键调控分子近年来已成为分子靶向抗肿瘤药物研发的重要靶点之一。细胞凋亡是近20年来肿瘤病因学、病理学以及抗肿瘤分子药理学等的研究热

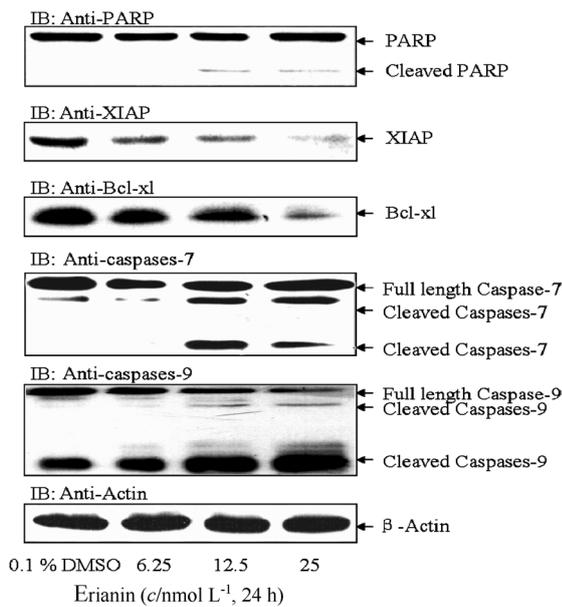


图6 毛兰素下调XIAP、Bcl-xL并激活Caspase-9、caspase-7及PARP活性
Fig. 6 Down-regulations of XIAP, Bcl-xL and activations of Caspase-9, Caspase-7 and PARP by erianin

点, 研究表明细胞凋亡组成一个非常复杂的调控网络, 而线粒体在细胞凋亡网络通路中尤为重要. 一般认为, 含BH3结构域的Bcl-2家族成员中促凋亡蛋白如Bax、Bak、Bad、Bik、Bim、Bid等当接受到胞内死亡信号激活后与该家族中的抗凋亡蛋白如Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1等蛋白相互作用形成同源或异二聚体, 从而引起线粒体膜通透性改变、跨膜电位丢失、诱导细胞色素C从线粒体释放到细胞浆中, 而释放到细胞浆里的细胞色素C与凋亡蛋白酶活化因子Apaf-1形成多聚复合物, 并通过Apaf-1氨基端的Caspase募集结构域招募胞质中的Caspase-9前体, 导致Caspase-9酶原自我剪切活化从而启动Caspase级联反应过程, 激活下游的Caspase-3及Caspase-7并剪切相应底物, 最终引起细胞凋亡^[15]. 与这些研究报告一致的是, 本研究表明毛兰素能显著抑制SW480癌细胞的生长并诱导细胞凋亡, 激活Caspase-9、Caspase-7、Caspase-3以及PARP活性, 即毛兰素可通过启动Caspase级联反应从而诱导结肠癌细胞凋亡.

针对细胞凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis proteins, IAP)为靶点研发高效低毒抗癌药物具有重要的临床治疗意义. IAPs是含BIR、RING以及CARD三个结构域的内源性凋亡抑制蛋白家族, 作为凋亡抑制效力最强的X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)因参与细胞周期、细胞凋亡与增殖的调控以及血管生成等过程近年来备受关注. XIAP作为唯一既与凋亡启动因子Caspase-9结合又与效应因子Caspase-3、Caspase-7相结合的凋亡抑制蛋白, 其主要通过BIR结构域和RING锌指结构域抑制Caspase活性、调节核因子NF- κ B等参与信号转导过程, 但自身又受到不均一核糖核酸蛋白c1和c2等的正向调节以及XAF1、Smac/DIABLO、Omi/HtrA2等的负向调节^[16]. 更为重要的是, 研究已经揭示XIAP在正常组织中低水平表达,

而在多种恶性肿瘤中表达显著提升, 特别与结直肠癌的发生发展显著相关^[17]. 因此, 针对肿瘤组织异常表达的XIAP靶点开发高效低毒抗癌药物对于结直肠癌的预防与治疗具有相当重要的理论意义与潜在的临床价值. 有趣的是, 我们发现毛兰素能显著下调XIAP从而促进SW480癌细胞凋亡, 尽管其详细的分子调控机制仍然知之甚少, 但这无疑为基于XIAP靶点的分子靶向先导药物的研发提供了新的思路与方法.

总之, 本研究首次报道我国特色名贵中药材石斛中活性化合物毛兰素对人结肠癌细胞具有显著的增殖抑制作用及其诱导细胞凋亡的初步分子机制, 结果表明毛兰素能通过诱导激活细胞凋亡、诱导细胞周期G2-M期阻滞从而抑制肿瘤细胞生长. 毛兰素化学结构与抗癌活性之间的相互关系以及精准分子靶标与分子调控机制则尚需深入研究.

References

- 1 Labianca R, Merelli B. Screening and diagnosis for colorectal cancer: Present and future. *Tumori*, 2010, **96** (6): 889-901
- 2 Tsao AS, Kim ES, Hong WK. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin*, 2004, **54** (3): 150-180
- 3 Ding XY (丁小余), Zhang WM (张卫明), Wang ZT (王峥涛), Xu LS (徐璐珊). Summarization of the studies of taxonomy and pharmacognosy of ethnological materials of *Dendrobium*. *Chin Acad Med Mag Org* (中国医学生物技术应用杂志), 2003, **8** (1): 1-14
- 4 Chen XM (陈晓梅), Guo SX (郭顺星). Advances in the research of constituents and pharmacology of *Dendrobium*. *Nat Prod Res & Dev* (天然产物研究与开发), 2001, **13** (1): 70-75
- 5 Li YM, Wang H, Liu GQ. Erianin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, **22** (11): 1018-1022
- 6 Gong YQ, Fan Y, Wu DZ, Yang H, Hu ZB, Wang ZT. *In vivo* and *in vitro* evaluation of erianin, a novel anti-angiogenic agent. *Eur J Cancer*, 2004, **1** (41): 1554-1565
- 7 Gong YQ, Yi Fan, Lei Liu, Wu DZ, Chang ZL, Wang ZT. Erianin induces a JNK/SAPK-dependent metabolic inhibition in human umbilical vein endothelial cells. *In vivo*, 2004, **18** (2): 223-228
- 8 Hong W (洪卫), Ma SL (马胜林), Du LB (杜灵彬), Feng JG (冯建国), Ling YT (凌雨田), Mou HZ (牟瀚周), Guo Y (郭勇). Experimental study of erianin inducing in gastric carcinoma. *China Cancer* (中国肿瘤), 2008, **17** (6): 499-501
- 9 Tang Y, Simoneau AR, Xie J, Shahandeh B, Zi X. Effects of the kava chalcone flavokawain A differ in bladder cancer cells with wild-type versus mutant p53. *Cancer Prev Res*, 2008, **1** (6): 439-451
- 10 Tang Y, Simoneau AR, Liao WX, Yi G, Hope C, Liu F, Li S, Xie J, Holcombe RF, Jurnak FA, Mercola D, Hoang BH, Zi X. WIF1, a Wnt pathway inhibitor, regulates SKP2 and c-myc expression leading to G1 arrest and growth inhibition of human invasive urinary bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2009, **8** (2): 458-468
- 11 Tang Y, Li X, Liu Z, Simoneau AR, Xie J, Zi X. Flavokawain B, a kava

- chalcone, exhibits robust apoptotic mechanisms on androgen receptor-negative, hormone-refractory prostate cancer cell lines and reduces tumor growth in a preclinical model. *Intern J Cancer*, 2010, **127** (8): 1758-1768
- 12 Yee DS, Tang Y, Li X, Liu Z, Guo Y, Ghaffar S, McQueen P, Atreya D, Xie J, Simoneau AR, Hoang BH, Zi X. The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition. *Mol Cancer*, 2010, **9** (1): 162
- 13 Tang Y, Parmakhtiar B, Simoneau AR, Xie J, Fruehauf J, Lilly M, Zi X. Lycopene enhances docetaxel's effect in castration-resistant prostate cancer associated with insulin-like growth factor I receptor levels. *Neoplasia*, 2011, **13** (2): 108-119
- 14 Gao YR (高雅蓉), An JX (安君霞), Zhu QY (朱启斌), Li F (李甫), Ma CY (马超英), Wang MK (王明奎), Tang YX (唐亚雄). Inhibitory effect of Raddeanin A in human non-small cell lung cancer H460 cells. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2010, **12** (5): 637-641
- 15 Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 2004, **73**: 87-106
- 16 Kashkar H. X-linked inhibitor of apoptosis: A chemoresistance factor or a hollow promise. *Clin Cancer Res*, 2010, **16** (18): 4496-4502
- 17 Connolly K, Mitter R, Muir M, Jodrell D, Guichard S. Stable XIAP knockdown clones of HCT116 colon cancer cells are more sensitive to TRAIL, taxanes and irradiation *in vitro*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, **64** (2): 307-316



肿瘤生物治疗基础与临床应用

侯建华 等 著 科学出版社出版(2011年7月) ISBN 978-7-03-031833-6 ¥150.00 16开本 圆脊精装

内容简介

肿瘤生物治疗是当今肿瘤治疗学发展最快的领域, 主要包括肿瘤基因治疗、免疫治疗、细胞因子治疗和分子靶向药物治疗等。由于肿瘤生物治疗具有高度的特异性, 毒副作用低, 在临床上已显示出良好的应用前景。本书涵盖了肿瘤生物治疗学研究和临床应用领域中最重要、最活跃和最前沿的领域, 内容新颖, 资料翔实。本书共分三篇, 第一篇集中介绍了肿瘤生物治疗的研究基础, 包括肿瘤病因学和发病机制以及相应的基因治疗、分子靶向治疗和免疫治疗的研究进展; 第二篇介绍了肿瘤生物治疗的临床应用, 包括生物治疗领域各种治疗手段的单独应用和与传统治疗手段的联合应用; 第三篇介绍体细胞免疫治疗规范化操作和实验室管理, 可为同行从业人员提供有益的参考。

本书从基础理论到临床应用较系统地介绍了肿瘤生物治疗的原理、临床应用, 以及生物治疗规范化操作和实验室管理, 可供广大肿瘤专业研究人员、临床医师、药物开发科技人员、开展生物治疗的技术人员, 以及在校学习的学生阅读。

欢迎邮购各类图书 欢迎致电索要书目

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇 电话: 010-64017301 E-mail: zhouwenyu@mail.sciencep.com

网上订购: <http://shop.sciencepress.cn>; 卓越网; 当当网

科学出版中心生物分社 电话: 010-64012501 网址: www.lifescience.com.cn E-mail: lifescience@mail.sciencep.com