Investigation on the Gene Expression Pattern of Abnormal Limb of Mouse Embryo Following Exposure to MNNG

GUO Miao-li[1], ZHU Jiang-bo[2], CHEN Rong-fang[2], ZHANG Tian-bao[2,*]
(1. *Department of Military Hygiene*, 2. *Department of Health Toxicology*, *Second Military Medical University*, *Shanghai* 200433, China)

应用基因表达谱芯片研究 MNNG 诱致小鼠胚胎畸形肢体基因表达的变化

郭苗莉[1]/朱江波[2]/陈蓉芳[2]/张天宝[2,*]
(1. 第二军医大学军队卫生学教研室，上海 200433；2. 第二军医大学卫生毒理学教研室，上海　200433)

【摘要】背景与目的：研究 N-甲基-N'-硝基-N-甲基亚硝基胍(N-methy-N'-nitro-N-nitrosoguandine, MNNG)诱致小鼠胚胎畸形肢体基因表达的变化，筛选肢体畸形相关基因。 材料与方法：应用含有 8 192 条小鼠基因的 cDNA 表达谱芯片，对 MNNG 诱致的孕 14 d 胎鼠畸形肢体组织及正常肢体组织的基因表达谱进行分析。 结果：畸形肢体组织共筛到差异表达基因 287 条，其中下调 214 条，上调 73 条。结论：MNNG 诱致的小鼠胚胎肢体短肢、少趾畸形可引起很多基因的表达改变，涉及与凋亡有关的基因、与生长因子或生长因子样物质有关的基因、结构基因及很多功能未知的相关基因，差异表达基因中以下调基因居多，这些结果可为进一步研究肢体短肢、少趾畸形的形成机制提供依据。

【关键词】N-甲基-N'-硝基-N-甲基亚硝基胍；肢体畸形；基因表达谱；聚类分析；小鼠
中图分类号：Q754　　文献标识码：A　　文章编号：1004－616X(2005)02－0071－05

【*ABSTRACT*】**BACKGROUND & AIM:** To analyse the gene expression profiles in abnormal and normal developmental limbs of GD14 embryo mice. **MATERIAL AND METHODS:** A series of expression microarray analysis of abnormal limb were initiated by cDNA microarray which representing a set of 8 192 mice genes. **RESULTS:** By applying this cDNA microarray we identified 287 differentially expressed genes, among which 73 upregulated and 214 downregulated. **CONCLUSION:** cDNA microarray for analysis of gene expression patterns is a powerful method to identify teratogenicity-related gene. Further analysis of these differentially expressed genes will be helpful for understanding the molecular mechanism of teratogenicity.

【*KEY WORDS*】N-methy-N'-nitro-N-nitrosoguandine; gene expression profiles; abnormal limb; cluster analysis; mouse

一般估计，大约 3 %的新生儿出生时有严重的先天畸形。我国出生监测资料显示每年有 $(30\sim40)\times10^4$ 缺陷儿出生。化学因素是导致畸形等发育异常的重要原因之一。化学物致畸是可以采取措施加以控制和预防的，高通量筛检致畸物，阐明化学致畸的分子机制，建立快速准确鉴定人类致畸物的方法和种间外推方法，是发育毒理学面临的迫切任务，其核心是致畸作用分子机制的问题。

我们运用以已知致畸物甲基亚硝基胍（N-methy-N'-nitro-N-nitrosoguandine, MNNG）作为受试物，在致畸敏感期即器官发生期给予孕鼠建立小鼠肢体异常发育模型动物，在此基础上应用基因芯片[1]观察正常肢体及畸形肢体的基因表达谱的改变，揭示肢体畸形发生相关基因，为阐明化学物致畸作用的可能分子机制提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　受试物及给药途径　受试物 MNNG(产品号

收稿日期：2004－05－21；修订日期：2004－07－14
基金项目：国家 973 课题分题(No.2002 CB512901)，国家自然科学基金(No.39870657, 30070662)
作者简介：郭苗莉(1974－　)，女，山西省灵石人，硕士，助教，研究方向：发育毒理学。
* **Correspondence to**: ZHANG Tian-bao Tel: 86－21－25070325, E-mail: tbzhang@toxsmmu.com

12994-1) Sigma 产品，采用 30 %乙醇为溶剂，给药途径为腹腔注射。

1.2 实验动物 选用 ICR 种小鼠，购自上海市计划生育研究所西普尔－必凯实验动物有限公司，8～10 周龄，雌鼠 25～30 g，雄鼠 30～35 g。按雌雄 1∶1 合笼，查见阴栓者为孕期第一天，将孕鼠随机分为实验组和对照组。妊娠 d 12，实验组腹腔一次注射 0.001 ml/g 体重的 MNNG 液。对照组注射溶剂。

1.3 组织的收集 实验组和对照组小鼠于孕鼠 14 d(Gestational Day 14, GD14) 颈脱臼处死，剖开子宫，从子宫内取出胎鼠，取实验组胎鼠左前肢畸形肢体和对照组相应组织，液氮速冻后存于－80 ℃。

1.4 探针制备 取适量组织液氮中捣碎，转移到 1.5 ml 离心管，加入 1 ml TRIZOL 试剂，混匀，室温放置 5 min，加入 200 μL 三氯甲烷，充分振荡混匀，室温 2～3 min，4 ℃，12 000 g 离心 15 min，小心取上清加入等体积异丙醇，混匀，室温放置 10 min，4 ℃、12 000 g 离心 10 min，弃上清，沉淀用 75 %的乙醇 1 ml 清洗，4 ℃ 7 500 g 离心 5 min 沉淀溶于 30 μL RNase-free 的水中，紫外分析；LiCl 沉淀纯化后用 Milli-Q 水彻底溶解沉淀，紫外分析及电泳检测显示获得高质量的总 RNA，采用 Oligotex mRNAMidi Kit(Quagen 公司) 分离纯化为 mRNA。每 1 份探针取 4 μg mRNA 参照 Schena 方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化，在一链合成中掺入荧光标记 dUTP，用 Cy3-dUTP 标记正常组织 mRNA，Cy5-dUTP 标记畸形组织 mRNA。

1.5 靶 DNA 制备 用通用测序 PCR 引物扩增博星基因集团拥有的 8 192 个基因克隆作为模板，PCR 反应及产物纯化用标准方法[2]进行，通过琼脂糖凝胶电泳监控 PCR 质量，靶基因溶解于点样液中，用 Cartesian 7 500 点样液仪点于硅烷化玻片。点样后玻片进行 2 h 水合，室温干燥 30 min，置于紫外交联仪中交联，再分别用 0.2 % SDS、水及 0.2 %硼氢化钠溶液处理 10 min，晾干备用。

1.6 芯片杂交 探针溶解在 20 μL 5×SSC＋0.2 %×SDS 杂交液中。基因芯片和杂交探针分别置于 95 ℃水浴变性 5 min，玻片于 95 ℃变性 30 s，将探针置于芯片上，盖玻片覆盖，置于杂交舱中，60 ℃杂交过夜。 然后揭开盖玻片，用 SSC 和 SDS 溶液洗涤 10 min，室温晾干。

1.7 杂交结果的检测与分析 用 ScanArray4 000 扫描仪扫描芯片，观察杂交结果，用 GenePix Pro 3.0 软件分析 Cy5 和 Cy3 两种荧光信号的强度和比值。算出所有基因调整后的 Ratio 值 (cy5/cy3＊)。筛选出比值＞2 或＜0.5 的基因作为差异表达的基因。

1.8 统计分析方法 K-Means 聚类分析，用 SPSS10.0 for windows。

2 结 果

2.1 芯片杂交技术验证体系 表达谱芯片上共 8 192 个靶点，包括 8 079 个待研究基因和 113 个控制点。为监控芯片杂交的整个过程，设定了对照系统：空白对照用空白点样液，评价污染情况；阴性对照用植物基因，监控点样间的交叉污染，两次芯片杂交这些点的信号均很低。阳性对照用管家基因，两次芯片杂交这些点在正常组织的信号均很高；定位基因用强表达的管家基因，便于数据图象分析时定位。这些保证了数据的可靠性。

2.2 差异表达基因的确定 差异表达基因通过分析杂交信号强度比值确定。对扫描信号处理 14 d 胎鼠芯片有效基因 7 646 个，均一化系数 0.965 8，筛选得到 287 条基因发生差异表达，其中上调 73 条，下调 214 条。

2.3 差异表达基因分析 用 K-Means 聚类分析方法将差异基因根据比值(Ratio) 对基因表达图谱的相似性进行聚类分析，参照目前对已知基因大多根据细胞周期、转录调控、代谢转化、结构组成等功能分为九类的

表 1 妊娠14 d下调基因聚类分析结果

Table 1 Result of cluster analysis of down-regulated genes of GD14

Cluster	Frequency	GenBank ID	Ratio	Definition of gene or gene segment
2	7	AJ007396	0.159	Mus musculus mRNA for spalt-like zinc finger transcription factor
3	58	AF104033	0.420	Mus musculus MUEL protein mRNA,
		X53929	0.376	Decorin
		M91380	0.385	Follistatin-like
		D17573	0.411	Mouse mRNA for proacrosin-binding protein(sp32),
		D85607	0.413	Mus musculus MEK kinase 4a (MEKK4a) mRNA,
		AB029487	0.376	Mus musculus gene for arylsulfotransferase ST1A4,
		M19256	0.418	Glutathione-S-transferase, alpha 1(Ya)
		X52641	0.392	Mouse mRNA for I-A beta NOD
		M13806	0.432	Mouse keratin (epidermal) type I mRNA, clone pkScc-52,
		AF062484	0.401	Mus musculus SDP8 mRNA,
		AJ242914	0.404	Mouse mRNA for neurotrophin receptor interactingfactor(Zfp110 gene)

Table 1 Continued

		AL049866	0.395	Mus musculus chromosome X contigB; X-linked lymphocyte regulated 5 gene,
		NM-007653	0.414	Mus musculus Cd63 antigen(Cd63),
		NM-011799	0.414	Mus musculus cell division cycle 6 homolog(S.cerevisiae)(Cdc6),
		AF009515	0.415	Mus musculus hematopoietic lineage switch 7(HLS7)
		NM-013785	0.420	Mus musculus inositol hexakisphosphate kinase 6(Itpk6-pending),
		AF049099	0.414	Mus musculus spermatogenesis associated factor(SPAF)mRNA,
		AF096868	0.424	Mus musculus transcytosis associated protein p115 mRNA,
		NM-010322	0.416	Mus musculus glyceronephosphate O-acyltransferase(Gnpat),
		L07924	0.416	Mus musculus guanine nucleotide dissociation stimulatorfor a ras-related GTPase
		NM-011079	0.432	Mus musculus phosphorylase kinase gamma(Phkg),mRNA
4	10	U13921	0.209	Keratin complex 1, acidic, gene 13
		X03491	0.215	Keratin complex 2, basic, gene 4
		AF027865	0.227	Mus musculus Major Histocompatibility Locus class II region
		L34111	0.233	Alpha-L-iduronidase
5	28	NM-008470	0.316	Mus musculus keratin complex 1, acidic, gene 16(Krt1-16),
		AF172994	0.317	Mus musculus serine protease HTRA
		V00722	0.329	Mouse gene for beta-1-globin
		X96737	0.339	M.musculus mRNA for synaptobrevin-like protein
		AB027138	0.343	Mus musculus mRNA for Tektin-t,
		AF068244	0.368	Mus musculus cardiac calsequestrin
		Z33637	0.337	X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) gene homolog
		NM-007688	0.360	Mus musculus cofilin 2, muscle(Cfl2),
		D12645	0.366	Kinesin family member 3a
6	11	NM-010884	0.251	Mus musculus N-myc downstream regulated 1(Ndr1),
		M98454	0.275	Villin
		NM-011778	0.276	Mus musculus coronin, actin binding protein 1B(Coro1b)
		AF027131	0.285	Mucin 3, intestinal
		U44725	0.291	Mast cell growth factor
		AF017639	0.303	Mus musculus carboxypeptidase X2
8	89	Z14249	0.455	Protein kinase, mitogen activated kinase 3
		AF017112	0.472	Mus musculus non-erythrocyte beta spectrin
		U15977	0.478	Mus musculus long chain fatty acyl CoA synthetase mRNA,
		X66032	0.444	M.musculus mRNA for cyclin B2
		AF133903	0.458	Mus musculus domesticus liver bile salt export pump (Spgp) mRNA,
		AF198092	0.464	Mus musculus RP42 mRNA,
		AF056187	0.466	Mus musculus insulin-like growth factor I receptor mRNA,
		Y09878	0.497	M.musculus mRNA for testis-specific protein, DDC8
		NM-009678	0.442	Mus musculus adaptor-related protein complex AP-1, mu 2subunit(Ap1m2)
		X57337	0.446	Procollagen C-proteinase enhancer protein
		NM-009067	0.453	Mus musculus Ral-interacting protein 1(Rip1),
		AF136719	0.490	Mus musculus plakophilin-3(Pkp3)
		L32974	0.500	Mouse interferon-inducible protein homologue,
		NM-010421	0.442	Mus musculus hexosaminidase A(Hexa),
		AB000682	0.462	Mus musculus tsec-2,
		NM-008363	0.444	Mus musculus interleukin 1 receptor-associated kinase(Il1rak),
		X58251	0.462	Procollagen, type I, alpha 2
		M59470	0.493	Cystatin 3
		NM-009197	0.492	Mus musculus solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 2(Slc16a2),
		L39123	0.492	Apolipoprotein D
		AF001980	0.459	Mus musculus beta chemokine
		M28698	0.479	Mus musculus cytokeratin No. 19
		X61431	0.495	M.musculus mRNA for diazepam-binding inhibitor
		M16465	0.497	Calpactin I light chain
		AF038008	0.461	Mus musculus tyrosylprotein sulfotransferase-1 mRNA,
		M96823	0.473	Mouse nucleobindin
		AF127669	0.478	Mus musculus small GTPase(Rab11a)
		AB025406	0.449	Mus musculus mRNA for sid23p,
		U11248	0.465	Mus musculus C57BL/6J ribosomal protein S28 mRNA,
		U73483	0.489	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 2 delta subunit
		D10939	0.497	Protein kinase, mitogen activated kinase 1
		X78987	0.455	M.musculus (BALB/c) Epidermal Growth Factor Receptor mRNA
9	6	M61215	0.175	Mus musculus ferrochelatase
		U39473	0.180	Mus musculus histidyl-tRNA synthetase
		U09416	0.183	Mus musculus retinoid X receptor interacting protein(RIP14-1No.6)

续表 1

表 2 妊娠14 d上调基因聚类分析结果

Table 2 Result of cluster analysis of up-regulated genes of GD14

Cluster	Frequency	GenBank ID	Ratio	Definition of gene or gene segment
1	27	Y17851	2.028	Mus musculus mRNA for ganglioside-induced differentiation associated protein 2
		U70494	2.013	Mus musculus histone H2A.Z(H2A.Z) mRNA,
		M84147	2.020	Mouse alcohol dehydrogenase-B2(Adh-2)
		AF011644	2.026	Mus musculus oral tumor suppressor homolog(Doc-1)
		X74145	2.030	M.musculus mRNA for protein kinase crk4
		NM-013784	2.008	Mus musculus phosphatidylinositol glycan, classN(Pign),
		AB004048	2.009	Neuronatin
		AB006181	2.027	Mus musculus mRNA for nuclear factor YC,
		NM-008638	2.084	Mus musculus methylenetetrahydrofolate dehydrogenase(NAD + dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase(Mthfd2),
2	1	D86214	2.919	Mus musculus mRNA for Ca2 + dependent activator protein for secretion,
3	5	U93583	2.480	RAD51 associated protein 1
		AB029397	2.528	Mus musculus mazr mRNA for transcription factorMAZR,
		NM-011524	2.542	Mus musculus transforming, acidic coiled-coil containingprotein 3(Tacc3), mRNA
		X52129	2.553	Mouse testis-specific mRNA pBs6.2
		L06444	2.587	Growth differentiation factor 9
4	17	J05186	2.310	Mouse protein disulfide isomerase-related protein(ERp72) mRNA, complete cds
		D12618	2.336	Mouse mRNA for nucleosome assembly protein-1,
		AF076192	2.362	Mus musculus protein phosphatase type 2A catalytic subunit alpha isoform mRNA,
		M22531	2.244	Mouse complement C1q B chain mRNA,
9	18	X62154	2.154	Mini chromosome maintenance deficient(S.cerevisiae)
		AF108215	2.141	Mus musculus 5'-AMP-activated protein kinase beta subunit
		NM-009278	2.157	Mus musculus Sjogren syndrome antigen B(Ssb),
		AB039275	2.162	Mus musculus GK27 mRNA for glandular kallikrein27,
		M17327	2.196	Mouse endogenous murine leukemia virus modifiedpolytropic provirus DNA,
		U47737	2.207	Mus musculus thymic shared antigen-1(TSA-1)

方法将差异基因聚为九类,为排除各基因表达基数的影响,在聚类前,对各基因表达的杂交信号强度比值进行标准化转换,聚类分析结果经方差分析类间差别均有统计意义($P < 0.001$),见表 1,2。(篇幅所限,未知功能基因未列表中。)

由于聚类的每一类中都有功能未知基因,而根据每类中的已知功能基因也尚不能作出准确的推断,故聚类分析结果的合理性有待进一步研究。

3 讨 论

3.1 取材方案的确定 肢体发育中,骨骼是肢体表现肢体发育的主要组织者[3]。发育过程主要在 12~14 d 期间进行,但大部分的骨化点要延到 15~16 d 开始。第 11~12 d 时,肢芽内先出现轮廓模糊的间充质细胞密集;第 13~14 d 时密集的间充质已形成肢体骨的软骨雏形,从外形上看,肢体末端为指趾部呈条索状的蒲扇样,畸形开始显现,畸形肢体的发生率左前肢最高[4],我们采用 GD14 取左前肢组织采样,筛选肢体异常发育相关基因。

3.2 脊椎动物肢体发育有关分子机制 肢体发育包括骨骼、血管、神经以及肌肉的形成,在形成过程中细胞之间发生识别、通讯,细胞中发生信号的转导,细胞内涉及参与调控细胞增殖、分化和凋亡的基因的有序表达。

在本实验中筛选出的致畸相关基因中其功能涉及多方面。14 d 差异表达基因中,与细胞周期有关的基因如:下调基因第 2 类中 AJ007396, Mus musculus mRNA for spalt-like zinc finger transcription factor,编码与肛门、肾、肢体发育有关的转录因子[5],第三类中 NM-011799, Mus musculus cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae) (Cdc6)[6], 编码细胞分裂周期磷酸化酶激酶 Cdc6,其表达依赖转录因子 E2F,E2F 转录因子是多细胞生物生长的必要的控制者,控制多种基因表达,产物涉及 DNA 复制和细胞增殖。X53929, Decorin; 编码一种核心蛋白聚糖,与胶原和生长因子相互作用,在个体发生、组织重塑和癌症发生中起作用[7],在胚胎发育中表达逐渐增高,可能在上皮、中胚层相互作用中起作用。这些提示肢体畸形发生可能和这些基因表达下调有关。第五类中 NM-008470, Mus musculus keratin complex 1, acidic, gene 16(Krt1-16),编码角蛋白,主要在皮肤、毛发中表达[8]。NM-007688,Mus musculus cofilin 2, muscle (Cfl2),编码肌动蛋白结合蛋白[9]。D12645,Kinesin family member 3a, 编码参与轴突物质转运的中枢神经系统驱动蛋白[10]。这些结构蛋白基因表达下调可能导致了畸形肢体的发生。与物质转运和信号转导有关的基因如: AJ242914, Mouse mRNA for neurotrophin receptor interactingfactor(Zfp110 gene),编码神经营养因子受体作用因子,参与细胞凋亡,传导死亡信号[11]; X96737,

M.musculus mRNA for synaptobrevin-like protein，编码小泡样蛋白（一种衔接蛋白）；L07924 Mus musculus guanine nucleotide dissociation stimulatorfor a ras-related GTPase，编码与多种细胞过程中信号有关的编码 Ras 相关 GTP 酶（鸟嘌呤解离刺激物）[12]。提示这些基因表达抑制参与肢体异常发育。还有其他如 AL049866 Mus musculus chromosome X contig B X-linked lymphocyte regulated 5 gene，性连锁基因，编码与 X 染色体连锁的淋巴细胞调控 5 基因（锌指蛋白 275 和锌指蛋白 92）；AF049099，Mus musculus spermatogenesis associated factor (SPAF)，编码生精相关因子，这一方面提示这些基因可能和肢体发育有关，而其下调也可能参与肢体异常发育。有些疾病肢体异常发育也常常伴随生殖系统发育异常，提示他们发育过程的联系可能和这些基因有关。在表达上调基因中发现有参与 DNA 修复的基因：X62154，Mini chromosome maintenance deficient（S. cerevisiae）[13] 这提示致畸过程中有 DNA 损伤，而实验用的致畸物 MNNG 具有致突变性，这一方面说明结果的可靠性，另一方面则说明致畸作用中有 DNA 损伤。这两个基因与 MNNG 诱导的异常发育有关，其可能起致畸保护作用。对于这些基因还需要进一步运用 Northern blot 法或 Western blot 法进行验证并进一步运用反义核酸技术或基因敲除技术研究其对畸形肢体发生的影响。本研究结果中还有很多功能未知的相关基因，有待今后关注。在本实验中总体上下调基因占多数（75 %，214/287），这与肢体畸形类型为短肢、短指（趾）、少指（趾）是相一致的。

3.3　基因芯片信息的利用　基因芯片将人类和模式生物的难以想象的生物学信息进行集成化处理，使人类可以在分子水平上探索健康和疾病、正常和异常的奥秘[1]。

生物信息中，数据挖掘是研究的一个重点[14]，其目标是将生物检测数据转化为能够直观理解的生物信息，进而将信息升华为生物学知识。在基因表达研究中，有一个基本假设，即基因在何时、何地表达的信息携带了关于基因功能的信息。所以基因表达数据分析重要内容是对基因表达图谱的相似性分析，即聚类分析。这是目前运用最多的一种表达数据分析方法。将每一个基因的表达强度按照相似程度进行归类。我们用 K-Means 聚类方法对差异基因的 Ratio 值进行聚类。参照目前基因功能大多分九类而聚为九类。由于每一类中大多的基因功能未知，而且有些已知基因功能的了解也有限，所以尚不能对每一类基因的功能进行归纳。随着我们对基因的表达认识、基因数据库的不断完善、数据处理技术的不断提高，基因芯片将为我们提供更多的信息。

参考文献：

[1] 杨胜利．生物芯片未来发展趋势及对策 [J]．第二军医大学学报，2000,21(9)：801.

[2] Schena M，Shalon D，Heller R，*et al*. Parallel human genome analysis: microarry -based expression monitoring of 1 000 genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(20): 10 614－10 619.

[3] Hinchliffe JR, Johnson DR. The development of the vertebrate limb [J]. *Dev Biol*, 1999, 180: 566－570.

[4] 陈蓉芳．MNNG 致小鼠肢体异常发育差异表达基因的筛选和鉴定[J]．癌变·畸变·突变，2001，13(4)：274－275.

[5] Kohlhase J, Aitmann M, Archangelo L, *et al*. Genomic cloning, chromosomal mapping, and expression analysis of msal-2 [J]. *Mamm Genome*, 2000, 11(1): 64－68.

[6] Okumura M, Kung C, Wong S, *et al*. Definition of family of coronin-related proteins conserved between humans and mice: close genetic linkage between coronin-2 and CD45-associated protein [J]. *DNA Cell Biol*, 1998, 17(9): 779－787.

[7] Scholzen T, Solursh M, Suzuki S, *et al*. The murine decorin. Complete cDNA cloning, genomic organization, chromosomal assignment, and expression during organogenesis and tissue diffrentiation [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(45): 28 270－28 281.

[8] Porter RM, Hutcheson AM, Rugg EL cDNA cloning, expression, and assembly characteristics of monse keratin 16[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(48): 32 265－32 272.

[9] Ono S, Minami N, Abe H, *et al*. Characterization of a novel cofilin isoform that is predominantly expressed in mammalian skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(21): 15 280－15 286.

[10] Aizawa H, Sekine Y, Takemura R, *et al*. Kinesin family in murine central nervous system [J]. *J Cell Biol*, 1992, 119(5): 1 287－1 296.

[11] Casademunt E, Carter BD, Benzel I, *et al*. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75 (NTR) and participates in programmed cell death[J]. *EMBO J*, 1999, 18(21): 6 050－6 061.

[12] Albright CF, Giddings BW, Liu J, *et al*. Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a Ras-related GTPase [J]. *EMBO J*, 1993, 12(1): 339－347.

[13] Hu B, Burkhart R, Schulte D. The P1 family: a new class of nuclear mammalian proteins related to the yeast Mcm replication proteins [J]. *Nucleic Acid Res*, 1993, 21(23): 5 289－5 293.

[14] 赵国屏．生物信息学 [M]．第 1 版．北京：科学出版社，2002. 138－147.