

过程中多种凋亡基因发生变异<sup>[19-20]</sup>. p53基因迄今为止发现的与肿瘤发生关系最为密切的基因, 有野生和突变两种构型. 野生型p53的抑癌基因, 并且为有DNA损伤的细胞凋亡过程所必需. p53基因与是否对肿瘤组织的端粒酶存在影响, 各家报道并不一致. 我们认为可能与p53基因下调Bcl-2基因的表达有关. 从本实验的结果可以看出, 在p53基因注射之后, 治疗组动物的Bcl-2蛋白表达强度明显减弱, 并且这种减弱的水平与端粒酶活性的降低具有明显的平行关系. 此外, 我们还发现, 治疗组动物, 端粒酶阴性的肝癌组织也多同时有Bcl-2表达产物强度的下降, 这一方面说明表达与端粒酶活性之间的密切关系, 另一方面也显示端粒酶阳性的肿瘤细胞多处于凋亡抑制状态, 即恶性肿瘤的增生与凋亡都发生了异常. 而野生型p53基因则通过阻断肿瘤细胞永生的关键环节, 即降低端粒酶活性和下调凋亡抑制基因Bcl-2的表达, 这两个方面发挥其抑癌作用.

#### 4 参考文献

- 奚伟红, 倪晓谦, 沈玉琴, 黄琴梅. 胃癌端粒酶活性临床研究. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊8):113
- 朱芮, 肖卫东, 熊永炎, 邹典定, 王莉, 陈新煜. 胃腺癌组织中端粒酶及nm23的表达与预后. 世界华人消化杂志 2000;8:1305-1306
- Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res* 1997;57:326-331
- 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. 胃肠道黏膜下肿瘤端粒酶表达的意义. 华人消化杂志 1998;6:765-767
- 王维, 罗和生, 余保平. 端粒酶与大肠癌. 世界华人消化杂志 2000;8:800-802
- 仇生龙, 黄锦秋, 王裕发, 彭志海. 大肠癌前病变与癌及脱落细胞端粒酶分析. 华人消化杂志 1998;6:992-993
- 贾林, 李瑜元. 结肠灌洗脱落细胞端粒酶活性诊断结肠癌的价值. 华人消化杂志 1998;6:955-957
- 赵东兵, 张伟, 金顺钱, 刘毅, 常邵静, 邵永孚. 大肠癌组织中端粒酶活性的研究. 中华肿瘤杂志 1998;20:199-201
- Wang Q, Wu QM, Li SB. Detection of telomerase activity and cytology in diagnosis of cardiac cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):29
- Zhang FX, Zhang XY, Fan DM, Deng ZY, Yan Y, Wu HP, Fan JJ. Antisense telomerase RNA induced human gastric cancer cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:430-432
- 夏志胜, 朱兆华, 何守搞. 全反式维甲酸和5-Fu对裸鼠胃癌移植瘤生长和端粒酶活性的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:674-677
- 朱兆华, 夏志胜, 何守搞. 全反式维甲酸和5-Fu对胃癌细胞端粒酶活性和细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:669-673
- 许兰涛, 马力. 端粒酶反义寡聚脱氧核苷酸对肝癌细胞影响的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:1065-1066
- 孟志强, 郭伟剑, 于尔辛, 宋明志, 黄雯霞. 健脾理气方药物血清对肝癌细胞端粒酶活性及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2000;8: 879-882
- 李宝杰, 王新红, 曲波. 肝细胞癌变过程中cyclin D<sub>1</sub>的异常表达与端粒酶活性的相关分析及意义. 世界华人消化杂志 2003;11: 1682-1689
- 郭光云, 徐少勇, 邓长生. 酒石酸锶钾诱导人胃癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004;12:520-522
- 廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪. 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:344-346
- Ameisen JC. Programmed cell death(apoptosis)and cell survival regulation: relevance to aids and cancer. *AIDS* 1994;8: 1197-1212
- Sugamura K, Makino M, Shirai H, Kimura O, Maeta M, Itoh H, Kaibara N. Enhanced induction of apoptosis of human gastric carcinoma cells after preoperative treatment with 5-fluorouracil. *Cancer* 1997;79:12-17
- 杨文字, 黄宗海. 自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达. 世界华人消化杂志 2004;12:194-198

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 应用抑制性消减杂交技术筛选 rhALR 调节基因

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 张黎颖

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心 北京市 100039  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队九五科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2004-03-26 接受日期: 2004-08-28

#### 摘要

目的: 筛选与克隆重组人肝再生增强因子激活基因, 了解其在体内的调节功能线索及机制.

方法: 应用大肠杆菌系统, 表达、纯化重组人肝再生增强

因子蛋白. 刺激 HepG2 细胞, 以溶剂 PH7.8 的磷酸盐缓冲液为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取 mRNA 并逆转录为 cDNA, 经 Rsa I 酶切后, 将实验组 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组 cDNA 进行两次消减杂交及两次抑制性聚合酶链反应(PCR), 将产物与 T/A 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆 PCR 扩增后进行测序及同源性分析.

结果: 成功构建重组人肝再生增强因子激活基因差异表达的 cDNA 消减文库. 文库扩增后得到 30 个阳性克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 200-1000 bp 插入片段. 对插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 结果共获得 19 种编码基因, 包括 15 种已知基因和 4 种未知基因.

**结论:** 筛选到的 cDNA 全长序列, 包括一些与细胞生长调节、肿瘤免疫发生及物质代谢密切相关的蛋白编码基因, 推测了重组人肝再生增强因子在体内可能存在的调控机制的线索, 尚需进一步的实验证明。

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 张黎颖. 应用抑制性消减杂交技术筛选 rhALR 调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2463-2466

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2463.asp>

## 0 引言

近年来对于肝细胞再生的研究主要集中于几种调节因子上, 从胰岛素开始<sup>[1]</sup>, 至今已发现参与调节肝再生的刺激和抑制因子共20多种. 肝再生增强因子是一种多肽调节因子, 具有重要的生物学功能, 与高等生物线粒体的生成、细胞分裂周期调节及肝脏、睾丸等重要脏器发育有关, 最主要的是能特异的刺激肝源细胞的增生<sup>[2-5]</sup>. 对于 ALR 的产生、分泌、体内转运的过程都存有诸多疑问. 因此为了进一步研究该蛋白质的功能, 我们应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 构建 rhALR 激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 筛选相关的靶基因片段, 并应用生物信息学(Bioinformatics)技术获得其基因全长序列, 为研究 rhALR 在体内的调节功能机制提供一定的线索。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存); FuGENE6 转染试剂(Roche), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim).

### 1.2 方法

**1.2.1 重组人肝再生增强因子的制备** 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增人 ALR 的 cDNA 基因片段, 克隆到大肠杆菌表达载体 pBV220 中, 转化大肠杆菌 JM109, 制备工程菌. 发酵后, 分离纯化包涵体, 经过包涵体的变性和复性, 然后利用阴离子交换层析、阳离子交换层析和分子筛等技术, 纯化重组人肝再生增强因子, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测显示, 制备的重组人肝再生增强因子纯度在 98% 以上, 具有促进肝细胞再生的生物学活性。

**1.2.2 细胞刺激及细胞 mRNA 提取** 用 FuGENE6 转染试剂将 rhALR 终浓度为 0.01 g/L 及 pH7.8 的溶剂磷酸盐缓冲液分别刺激 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 24 h 后收获细胞. 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取经 rhALR 及磷酸盐缓冲液刺激的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析。

**1.2.3 双链 cDNA(dscDNA)合成** 用 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 中的试剂, 以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA。

**1.2.4 消减杂交文库的建立** 采用 Clontech 公司的 PCR-

Select™ cDNA Subtraction Kit, 常规 SSH 方法按说明书进行: 经 rhALR 及磷酸盐缓冲液刺激的 HepG2 细胞 cDNA 分别标记为 Tester 和 Driver, 经 *Rsa* I (一种识别 4 碱基序列的内切酶) 消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将 Tester 的 cDNA 分为两份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 然后与过量的 Driver cDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver cDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。

**1.2.5 克隆鉴定分析** 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37℃ 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(200-1 000 bp), 测序(上海博亚公司). 应用生物信息学技术将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性分析。

## 2 结果

**2.1 mRNA 的定性定量分析** 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 经 rhALR 及溶剂磷酸盐缓冲液刺激的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 6.5 μg 和 4.6 μg,  $A_{260}/A_{280}=1.87$ . 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带。

**2.2 dscDNA 两端连接效率检测** dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增, 产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定. 结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当, 说明 dscDNA 已与接头高效率连接。

**2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定** 分别取抑制性及非抑制性 PCR 产物 1 μL 为模板, 用看家基因 G3PDH 引物进行 PCR 扩增, 分别在 18, 23, 28, 33 次循环结束时从体系中吸取 5 μL 进行电泳鉴定. 结果显示, 与非抑制性 PCR 产物相比, 抑制性 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 1)。

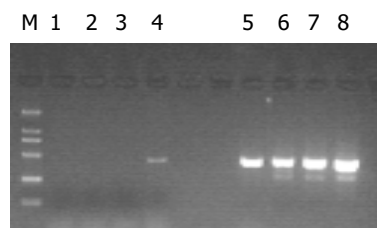


图 1 消减效率分析结果. 1-4. 消减组, 5-8. 未消减组.

**2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆** 杂交产物经两轮 PCR 扩增后, 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌后有较多菌落生长, 以 pGEM-

Teasy载体多克隆位点两端T7/SP6引物进行菌落PCR扩增,结果显示为200–1 000 bp大小不等的插入片段,所获得的克隆中几乎均含有插入片段,这些条带可能代表差异表达的基因片段(图2)。

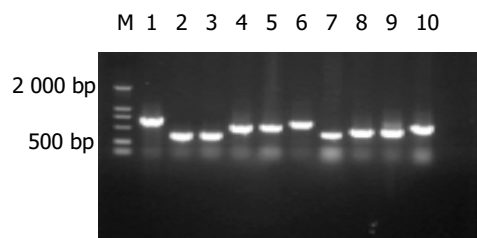


图2 部分克隆菌落PCR鉴定电泳图。

**2.5 cDNA测序与同源性分析初步结果** 随机选择30个克隆测序,与GenBank数据库进行初步比较,发现其中含有4个克隆未检索到任何对应的相似序列,可能代表了某些新基因,进一步的分析和功能鉴定正在进行中。有15个与已知基因的部分序列高度同源(96–100%,表1)。

表1 阳性克隆与GenBank同源序列比较结果

同源蛋白基因	同源菌株	同源性
线粒体	4	99–100%
线粒体膜易位酶	1	100%
肿瘤蛋白翻译调节因子1 (TPT1)	1	100%
酪氨酸磷酸酶IV A	1	97%
核糖体蛋白S21	1	100%
核糖体蛋白L9	1	100%
乳酸脱氢酶	1	100%
硫氧还蛋白	1	96%
载脂蛋白H	1	99%
细胞周期蛋白依赖激酶1,Cdk1	1	99%
XTP5	1	97%
蛋白酶体26S亚基	1	100%
人染色体克隆	4	99–100%

### 3 讨论

人和动物血清中存在着促进肝再生的蛋白质因子,早期的研究中统称为肝刺激物质(HSS)<sup>[6–7]</sup>。研究表明,肝再生增强因子(ALR)是HSS的主要成分<sup>[8]</sup>。关于ALR蛋白的生物学功能,Lisowsky *et al*<sup>[9–10]</sup>首先发现的是scERV1对于细胞的存活以及线粒体的生物学生成过程有关,进一步的研究结果表明scERV1基因对于酵母细胞的细胞周期具有重要的调节功能。Lee *et al*<sup>[11]</sup>的研究发现,酵母细胞的ERV1的编码产物由189个氨基酸残基组成,这种蛋白对于线粒体功能和细胞的存活是必不可少的。这种蛋白具有黄素相关性巯基氧化酶的催化活性,与二硫键的形成有关。ERV1p蛋白氨基末端序列的缺失研究表明,这种蛋白质酶学催化活性位点位于羧基末端的15 kDa的部位。ERV1p羧基末端部分保留了与FAD

结合和催化二硫键形成的能力,但不能象完整蛋白那样形成二聚体形式。这种蛋白的羧基末端具有CXXC结构域,从酵母到人的同源基因中都有这段保守结构。因此ERV1p代表了酵母细胞中具有FAD结合功能的第一种巯基氧化酶,并首次证实其与线粒体的形成有关。酵母细胞scERV1基因的编码产物与其线粒体的发生、细胞生存和细胞周期的调节有密切的联系。哺乳动物细胞中的同源基因是肝再生增强因子,与肝再生、精子细胞形成过程有关。此外,肝再生增强因子与干扰素 $\gamma$ 的调节关系密切。外源性ALR可以通过诱导转录因子和翻译相关因子的表达调节线粒体的功能,或者通过抑制NK细胞的细胞毒性。Polimeno *et al*<sup>[12]</sup>的研究结果表明,ALR对于干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )基因表达有影响。IFN $\gamma$ 由激活的NK细胞所产生,对于线粒体转录因子A的表达具有显著的调控作用。外源性ALR对于NK细胞IFN $\gamma$ 的表达具有显著的下调作用,70%肝切除动物模型如果施以外源性IFN $\gamma$ ,则可以抑制线粒体转录因子A的表达活性,同时抑制肝再生的过程。这一结果表明ALR是通过生长因子和免疫因子调节的双重调节机制,影响肝再生的过程。另外,肝再生增强因子与自然杀伤细胞活性调节有关。Tanigawa *et al*<sup>[13]</sup>的研究结果表明,肝脏中的NK细胞对再生的肝细胞的细胞毒作用可能是爆发性肝炎不能进行有效的肝再生的重要机制。ALR就是通过抑制肝脏内NK细胞的细胞毒活性,来实现促进肝再生的。对于各种类型的急性肝脏疾病肝脏的ALR mRNA、血清中ALR蛋白以及外周血NK细胞毒活性进行检测,以阐明肝再生不力与肝内NK细胞活性之间的关系。结果表明,肝脏内ALR mRNA的表达水平显著提高,血清中ALR水平与肝内ALR mRNA表达水平呈正相关。在急性肝损伤期,血清中ALR水平与NK细胞活性呈显著负相关的关系。ALR由肝脏产生,在肝脏损伤时释放。研究结果表明,肝脏产生的ALR通过抑制肝内NK细胞的细胞毒活性,促进肝再生。总之,ALR基因家族从酵母这种低级的真核细胞到哺乳动物都是高度保守的,甚至在一些双链DNA病毒的基因组中也存在ALR的同源基因序列。不同生物种属的ALR都有重要的生物学功能,与高等生物的线粒体的生成、细胞分裂周期调节以及肝脏、睾丸等重要脏器的发育有关<sup>[14]</sup>。最重要的生物学功能就是促进肝脏的再生。

抑制性消减杂交方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术,能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因,可以在较短的时间内获得较理想的实验结果。我们将rhALR刺激肝母细胞瘤细胞系HepG2,并以加入PH7.8磷酸盐缓冲液的不同细胞系作为对照,以这2种细胞系提取的mRNA为起始材料,应用SSH方法成功地构建了rhALR激活相关基因差异表达的cDNA消减文库,随机挑选30个克隆测序分析,结果主要包括2种类型,第一种是已知基因的序列,共15个克隆,与GenBank中数据高度同源(96–100%)。这些克隆中,我

们筛选到的有细胞周期蛋白依赖激酶 1(cyclin-dependent kinase 1, Cdk1), 细胞的复制由细胞周期蛋白依赖激酶(Cdks)调控, Cdks 通过调控蛋白底物的磷酸化而实现对细胞周期的控制<sup>[15]</sup>. 细胞周期蛋白B1-Cdk1复合物是有丝分裂起始的关键, 研究发现, B1-Cdk1复合物首先在细胞质中起作用, 中心体通过对细胞周期蛋白 B1 的整合, 进而引发有丝分裂<sup>[16]</sup>. 线粒体、乳酸脱氢酶、蛋白酶体、酪氨酸磷酸酶在体内物质及能量代谢中起重要作用. 载脂蛋白 H 与脂类代谢、血液凝固密切相关, 载脂蛋白 H 基因的多态性与高血压以及脑出血的发病机制相关<sup>[17]</sup>. 线粒体中含硫氧还蛋白和相关的黄素酶, 硫氧还蛋白是二硫化蛋白, NADP 及硫氧还蛋白, 在细胞器中与 NADPH 相连<sup>[18]</sup>, 在氧化还原反应中起重要作用. 线粒体膜易位酶与蛋白质进入线粒体密切相关, 蛋白质进入线粒体必须经过两个易位接触位点, 包括与线粒体外膜易位酶(translocase of the outer membrane, TOM)形成复合物, 以及与线粒体内膜易位酶(translocase of the inner membrane, TIM)形成复合物<sup>[19]</sup>. 肿瘤蛋白翻译调节因子 1(TPT1)是一种高度保守, 在大部分真核生物中可以表达的基因, 其功能与细胞的生长发育相关<sup>[20]</sup>. 近来有研究认为抑制其表达可以使肿瘤的恶性程度逆转, 其表达的增高可能与肿瘤的发生相关. 核糖体蛋白为细胞内结构蛋白. 在已知的 15 个克隆中, 4 个是编码线粒体的基因片段.

通过对上述 rhALR 激活相关基因差异表达文库部分基因的分析, 我们发现 rhALR 在细胞内表达后, 与线粒体合成关系密切, 部分涉及细胞生长周期调节、物质和能量代谢、肿瘤发生等方面的基因表达增加, 提示 rhALR 对体内的多个系统可能有影响. 我们只是对 rhALR 对人细胞激活相关基因进行了初步的筛选分析, 为研究 rhALR 在体内的致病机制提供了新的线索. 有关激活基因的具体作用方式, 仍需要进一步的实验来证实.

#### 4 参考文献

- Kogut KKA, Nifong LW, Witt MJ, Krusch DA. Hepatic insulin extraction after major hepatectomy. *Surgery* 1998;123:415-420
- Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, Ihara I, Sakai H, Seki T, Shimonishi M, Porter KA, Starzl TE. Cloning and sequence analysis of the rat augments of liver regeneration (ALR) gene expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:3076
- Lisowsky T, Weinstat-Saslow DL, Barton N, Reeders ST, Schneider MC. A new human gene located in the PKD1 region of chromosome 16 is a functional homologue to ERV1 of yeast. *Genomics* 1995;29:690-697
- 杨晓明, 谢玲, 吴祖泽, 贺福初. 肝部分切除后肝再生增强因子信使核糖核酸(mRNA)表达增加. *生理学报* 1997;49:599-601
- 成军, 陈菊梅. 肝再生增强因子研究进展. *国外医学病毒学分册* 2000;7:123-127
- Francavilla A, Hagiya M, Porter KA, Polimeno L, Ihara I, Starzl TE. Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* 1994;20:747-757
- 成军, 陈菊梅. 肝再生增强因子研究进展. *肝脏* 1999;4:117-118
- Francavilla A, Vujanovic NL, Polimeno L, Azzarone A, Iacobellis A, Deleo A, Hagiya M, Whiteside TL, Starzl TE. The in vivo effect of hepatotrophic factors augmenters of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions. *Hepatology* 1997;25:411-415
- Lisowsky T. Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* 1992;232:58-64
- Lisowsky T. ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 1994;26:15-20
- Lee J, Hofhaus G, Lisowsky T. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulphydryl oxidase. *FEBS Lett* 2000; 477:62-66
- Polimeno L, Margiotta M, Marangi L, Lisowsky T, Azzarone A, Ierardi E, Frassanito MA, Francavilla R, Francavilla A. A Molecular mechanisms of augmenters of liver regeneration as immunoregulator: its effect on interferon-gamma expression in rat liver. *Dig Liver Dis* 2000;32:217-225
- Tanigawa K, Sakaida I, Masuhara M, Hagiya M, Okita K. Augmenters of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases. *J Gastroenterol* 2000;35:112-119
- Polimeno L, Lisowsky T, Francavilla A. From yeast to man--from mitochondria to liver regeneration: a new essential gene family. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:494-500
- Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 2003;425:859-864
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 2003;5:143-148
- Xia J, Yang QD, Yang QM, Xu HW, Liu YH, Zhang L, Zhou YH, Wu ZG, Cao GF. Apolipoprotein H Gene Polymorphisms and Risk of Primary Cerebral Hemorrhage in a Chinese Population. *Cerebrovasc Dis* 2004;17:197-203
- Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP, Manieri W, Schurmann P, Droux M, Buchanan BB. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2642-2647
- Chacinska A, Rehling P, Guiard B, Frazier AE, Schulze-Specking A, Pfanner N, Voos W, Meisinger C. Mitochondrial translocation contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex. *EMBO J* 2003;22:5370-5381
- Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, Cra-ven CJ. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol* 2001; 8:701-704