

牙鲆 *fibrinogen* β 基因的克隆及表达分析*

李 朔¹, 齐 洁¹, 王志刚¹, 范玉顶², 李春梅¹, 刘志鹏¹, 张全启¹

(1. 中国海洋大学海洋生物遗传学与基因资源利用教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

摘 要: 通过 mRNA 差异显示发现一个鳗弧菌刺激后在牙鲆肝脏中表达量显著增加的片段, 结合 RACE 技术得到了该差异片段 1 856 bp 的全长 cDNA, 包含一个 1 479 bp 的开放阅读框, 编码的蛋白质含有 fibrinogen β 的 C 末端签名序列。同源性分析表明其氨基酸序列与鱼类以及哺乳类的 fibrinogen β 都具有高度的相似性, 因此可断定此基因为牙鲆的 *fibrinogen* β 基因 (GenBank 登录号为 EF581895)。RT-PCR 分析表明, 在注射鳗弧菌后, 该基因在肝脏、肾脏、脾脏、腮、肠、心脏中的表达量呈现逐渐增加的趋势。推测其可能在鳗弧菌侵染中, 起到了促进伤口愈合的作用, 或通过和其他细胞因子结合在防御细菌的侵染中发挥免疫调节作用。

关键词: 牙鲆 *Paralichthys olivaceus*; *fibrinogen* β ; 克隆; 组织表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579(2009)06-0089-06

Molecular Cloning and Expression Analysis of *Fibrinogen* β Gene from Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

LI Shuo¹, QI Jie¹, WANG Zhigang¹, FAN Yuding², LI Chunmei¹, LIU Zhipeng¹, ZHANG Quanyi¹

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Gene Resource Exploitation, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Hubei 434000, China)

Abstract: A number of novel genes are identified, which are expressed in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) injected with *Vibrio anguillarum* by differential display. This paper reports the characterization of one of these novel genes, *fibrinogen* β . The full length cDNA is 1 856 bases long and contains an ORF of 1479 bases. Sequence analysis revealed that there was a C-terminal domain signature in the deduced amino acids. Alignment analysis showed that the amino acid sequence had a high identity with that from fishes and mammals. When challenged with *Vibrio anguillarum*, the expression level of flounder *fibrinogen* β in liver, kidney, spleen, gill, intestine and heart tissues increased obviously. These results might indicate that the flounder fibrinogen β may help stop bleeding by helping blood clots formation, or associate with other cytokines and play a critical role in the host immune response.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *fibrinogen* β ; cloning; expression

纤维蛋白原 (fibrinogen, Fg) 是一种由肝脏合成的具有凝血功能的蛋白质, 是纤维蛋白的前体, 存在于脊椎动物血浆和组织中。Fg 是由两个完全相同的单体组成, 每个单体又包含 3 条不同的多肽链 (α 、 β 、 γ), 单体间通过二硫键连接在一起构

成对称性的 Fg 二聚体^[1]。构成单体的 α 、 β 、 γ 多肽链分别由 3 条独立的 mRNA 转录, 其中 α 和 γ 链基因转录方向相同, 而与 β 链相反, β 链 mRNA 的合成被认为是 Fg 形成的限速步骤, 其合成速率影响另两条肽链的合成速率^[2]。

* 收稿日期: 2008-11-20

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2006AA10A404、2006AA10A414); 山东良种工程重大课题资助项目

作者简介: 李朔 (1985 年生), 女, 博士; 通讯作者: 张全启; E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

纤维蛋白原在体内除了参与凝血、止血外,还发挥其他多种功能,它可以和多种细胞结合,在细胞粘附以及炎症反应中起重要作用^[3],其结构改变、位点突变以及基因的多态性等和人类的许多疾病紧密相关^[4-5],Fg 的表达水平常作为诊断许多疾病的重要依据^[6-8]。Fg 功能部位位于其分子内的特定区域,其中一些功能位点已在分子水平上被阐述^[9],而另外一些仍是理论上的推测,而具有明显特征的遗传性异常的 Fg,被认为是验证这些功能部位的重要的工具^[10]。

采用 mRNA 差异显示技术^[11]分析灭活鳃弧菌刺激前后牙鲆组织中特异表达的 cDNA 片段时,得到一个在鳃弧菌刺激后牙鲆肝脏中表达显著增加的 249 bp 的基因片段,把此片段序列提交到 NCBI 进行比对时,没有发现与之同源的基因,推测可能是由于该片段位于基因的 3' 端非翻译区的原因,结合 RACE 技术得到了该差异片段的 cDNA 全长序列,通过 BLASTP 比对发现其氨基酸序列与大黄鱼、斑马鱼、小鼠、人等的 fibrinogen β 高度同源。随后利用生物信息学软件进行了序列比对和进化分析,并用 RT-PCR 技术对该基因在鳃弧菌刺激前后牙鲆不同组织、不同时间段的表达进行了较为详细的研究,以便进一步了解其在牙鲆鳃弧菌病中所起的作用并对功能做出预测分析。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用健康牙鲆取自海阳市黄海水产公司养殖场,平均体长约 15 cm,体质量约 80 g。在直径为 2 m、水深 1.2 m 的圆形水槽中,充气循环水条件下暂养 1 周,无任何异常后使用。免疫感染实验前 24 h 停止喂食。

感染用鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 为本实验室长期保存的菌株。将鳃弧菌接种于 2216E 琼脂斜面,28 °C 培养 24 h,用灭菌生理盐水振荡洗下,并稀释到 10^9 cfu/mL,加入终体积分数为 0.5% 的甲醛 28 °C 灭活 48 h,作为注射用疫苗。采用腹腔注射的方式,按每 100 g 体质量 0.2 mL 的剂量注入健康牙鲆^[12]。

分别在注射前和注射后 3 h、6 h 和 9 h,各取 6~7 个个体,解剖取其肝脏、肾脏、脾脏、鳃、小肠、心脏、肌肉等,迅速冻存于液氮中,于 -80 °C 保存备用。鱼体各组织总 RNA 提取采用 Trizol (Invitrogen) 一步法提取。分别取 2 μ g 的 RNA 进行反转录反应。cDNA 合成采用随机引物,利用 M-

MLV 反转录酶 (promega) 按照说明书方法进行。合成的 cDNA 冻存于 -20 °C 下备用。

1.2 SMART RACE 扩增

根据 DD-PCR 中已克隆的此差异片段的序列设计 4 条特异引物:用于 3'RACE 扩增的 3'F1 (5'-CTTGCTCTGGACAGACTGAACG-3')、3'F2 (5'-CAAAGTACCTAAACGTGAAGAT-3') 和用于 5'RACE 扩增的 5'R1 (5'-ATGACATCACACAG-GAAATGACAG-3')、5'R2 (5'-CACTCGGT-GTTTTCTCCGTATC-3'),以灭活鳃弧菌处理的牙鲆肝脏的 RNA 为模板,按照 Smart RACE cDNA 合成试剂盒 (Clontech) 说明书进行。将获得的 5'RACE 和 3'RACE 序列连接到 PMD-18T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑菌送上海生工测序。

1.3 序列分析与系统树构建

对测序结果进行分析整理得到该基因全长 cDNA 序列,推测得到其氨基酸序列,登录 NCBI 用 BLASTP 进行同源性检索。信号肽序列用 SignalP 分析。利用 <http://www.predictprotein.org> 在线分析所得序列的结构功能域位点。蛋白质二级结构的预测,采用 DNASTAR Protean 软件提供的模块进行。空间结构预测采用 Swiss-model 软件,模型查看用 Swiss-Pdbviewer 软件。采用 CLUSTAL X 软件进行多种蛋白质氨基酸序列的排列比较,用 MEGA3.0 软件中的邻位相联法方法构建进化树。

1.4 牙鲆 fibrinogen β 的时空表达

应用 RT-PCR 半定量检测方法,以反转录合成的第一链 cDNA 为模板,利用基因特异性引物 FIBF (5'-AAGGGATATTCCTCAATGTGCCACGG-3') 和 FIBR (5'-ATGCTGTTGTTGCCCTCTTTACTGATG-3') 来分析 fibrinogen β 在对照组和实验组牙鲆各组织中的时空表达。选用 18S rRNA 作为内参,内参引物序列为 18SF (5'-TGAGAAACGGCTACCACATCC-3') 和 18SR (5'-CACCAGACTTGCCCTCCAATG-3')。取等体积的 fibrinogen β 和 18S rRNA 扩增产物进行 $w=1\%$ 的琼脂糖电泳检测。

2 结果

2.1 牙鲆 fibrinogen β cDNA 全长序列

采用 DD-PCR 对灭活鳃弧菌刺激前后差异基因的表达进行了研究,共得到 9 个阳性片段。本文研究的是一个在注射组肝脏中得到高表达的片段,其长度为 249 bp,得到了 1 856 bp 的全长 cDNA 序列,包括 1 479 bp 编码区,60 bp 的 5'UTR 和 317 bp 的 3'UTR。3'UTR 区含有脊椎动物典型的加尾信

号 AATAAA 和 28 bp 的 polyA 尾。

2.2 牙鲆 *fibrinogen* β 氨基酸序列分析

所得基因的开放阅读框可编码 492 个氨基酸, 预测的相对分子质量约为 55 720, 等电点为 6.79。BLASTP 程序比对结果表明, 该序列与大黄鱼、斑马鱼等的 *fibrinogen* β 的相似性分别达 81.4% 和 68%, 据此推测, 本研究所得到的基因即为牙鲆的 *fibrinogen* β 基因。

SignalP3.0 的分析结果表明, 在该蛋白的 N 末端包含一个 16 个氨基酸残基组成的信号肽。利用网上服务器对该蛋白的功能域位点进行了预测分析, 结果表明, 该蛋白含有明显的 *fibrinogen* β 的 C-末端签名序列, 同时还含有两个 N-糖基化位点、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点、1 个氨基化位点和 8 个 N-肉豆蔻酰位点 (见图 1)。

```

ACGCGGGGACGAAACAGGAGTGAAGACAGAGCTGGATCAGAGAAACGTCAGGACAGTG 60
ATGAAGACGCTGCTGCTGTTGCTCTGCTGCTGGCGCTCACCTGGGCTCAGGATTTGAT 120
H K T L L L L L C L C L G V T W A Q D F D
TTTGACGAAATATGACTTGGACAGCACCAGCTCGCCAGCAGTGAATGAAAGCGGAGTAAAC 180
F D E Y D L D S T S S P A V N E S G V N
GCCCTAGTCCAGCCCACTCTCGAGGGGCGAGGATGGCTACACCGCACCCTACGCTC 240
A R S H R P L S R G R D G Y T R N R Y V
CABCCTTATCAGCCGTGACAGCAGCAGGATCCGCGCCGCCACACCTCCTCCAGTC 300
Q P P I S R D S S R Y R G R P T P P P V
AGAGGACACAGCTGACAGGAGGAGGCTGACGCTGATCCGGAGGATCTCCACCGCC 360
R G A Q L Q E E E V Q P D A G G C L H A
TCAGAGCATGGGGTTTCTCCCAATGGCTGTATGTCAGACGACGCTGCTGAG 420
S E S H G V L C P N G C D L K T T L L K
CAGAGAGAAACCTCAGACGACTATAAATGACTGAAGCCTCTCCTGGACGATTTGCC 480
O E R N V K T S I N E L K P L V D D L S
AGTCCCTCAACCCCTCTACAACCTACGTCACAGCAGTCTCCACCTCTCTGAGGGAGGA 540
R S S N T I Y N Y V N S H S N S L R E R
CAGAAGTCTGACAGACACCCAGGGTGGGAGTCACTACAGGATCAGTGGAGGAG 600
Q K V V N D N T R V A S Q Y T D Q V E E
CABCACGCTTCTCAGAGACGAGGTCAGTCTGTCTCCCTCCACACTCCGAGTCTCTG 660
Q H A Y I K E T V D T V F P S N I R V L
CAGGGCTCTCCAGAGGTCAGGCTGARGATCCAGAACTGGAAATCCATCCCTGTCC 720
Q G V L D K V R L K I O K L E K S I L S
CAGAGGATTTGTAGAGACCCCTCAGACACACGCTGTCCCACTCTGTGGTGTCTGGC 780
Q R D L C R E P C K T T C P I R V V S G
AAGAGTGTGAGGACTCTACCGTCTGGGAGAGGACTCTCAGATGTACATGATCCAG 840
K E C E D I Y R R G G R D S O H Y H I Q
CCCGACGCTTCTCCACCCGTCACAGGCTTCTCTGTGATCAGTCCGACAGAACGGAGGA 900
P D A F F P P Y K V E C D Q S T Q N G G
TGGCTTCTCATCAGAACAGGCTCGAGCGCAGCTCACTTCGGCCAGCGCTGGAGCAA 960
W L L I Q N R L D G S V N E C R R W D E
TATCGAGTGGATTTGGCAACATCGCCTTCGAGCTGGAAAGGTCACCTGTGAGACTCCA 1020
Y R R G F G N I A F D V G K G H C E T P
GGTGAATATTTGGCTGGGTAAAGACACATCAGTCAAGTACCAACATGGGCCCCAGGAG 1080
G E Y W L G N D H I S Q V T N H G P T E
GTTCTCATTGAGATGACAGACTGGACAGGACAGGTCACCGCCAGTACAGCCAGTTC 1140
V L I E N Q D W T G D K V H A Q Y S Q F
ACCATCCATCAGAGACCTCCAAATACCTGATGGCGGTAATGTTACTCTGGAAACGCT 1200
T I Q S E T S N Y V H A V N G Y S G N A
GGCAACTGTTCCGGAGGCTCCTGACGCTGTTGGTGAAGAACCGCACCATGACCATTA 1260
G N C F L E G S L Q L F G E N R T H T I
CACACGGGATGATGTTACAGCCTACGACAGACAGCAGCAGTGGCTTCCCGGGAT 1320
H N G H H F S T Y D R D N D N W L P G D
CCGTCAAACAGTCTCGAAGGAGGACCGGAGGCGGCTGGTGGTACACCGCTGCCACTCG 1380
P S K Q C S K E D G G G W Y N R C H S
GCCAATCCACCGGCGATACATAGGTGGAGCTACAGAGCAATGGCCAGGAC 1440
A N P N G R Y Y I G G A Y T K O M A K H
GGCACAGATGTTGGCTGCTGGATGACCTGGAAGGGGAGCTGGTATTCCTTARGGCC 1500
G T D D G Y V W H N W K G S N Y S L K A
ATTAGCATGAGATCAGGCGGTTTACCCGCGCAGCTAAACGCTGTCGCGGACGTCATCA 1560
I S H K I R P F Y P A S *
CATGTGACTCACACAAGCAGCAGAGAGGAACTGCTGTAGCTTCTATGTTAACGGACT 1620
CCTTTAAACACAACTTGGCTGACAGAGTGAACGAAAGAAAGAAAGCTTACATCTGAGC 1680
TAAAGACAAACAAACAAACCTGACCTAAACCTGAAGATAACGAGAAACACCGACTGAT 1740
GTTGTCTATCTGTATCTGCTATCTCTGCTGATGATAGTGAAGGAGGACTGCTCA 1800
ACGCTACTCAATAAACTGATGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1852

```

图 1 牙鲆 *fibrinogen* β cDNA 序列以及推测的氨基酸序列
Fig. 1 The full length cDNA and deduced amino acid sequence of Japanese flounder *fibrinogen* β
星号示终止密码子; 阴影示加尾信号和 PolyA 尾; 带阴影的方框示信号肽序列; _____ 示 N-糖基化位点; ===== 示酪氨酸激酶磷酸化位点; 示氨基化位点; - - - - 示 N-肉豆蔻酰位点; □ 示 C 末端签名序列

2.3 牙鲆 *fibrinogen* β 的二级结构和空间结构预测分析

采用 Lasergene protean 软件对二级结构进行预测, 结果表明: 牙鲆 *fibrinogen* β 属 beta 型蛋白。

采用 Swiss-model 软件及 Swiss-Pdb Viewer 对空间结构进行预测, 结果显示预测的空间结构模型与鸡 *fibrinogen* β 的晶体结构模型非常相似 (图 2)。

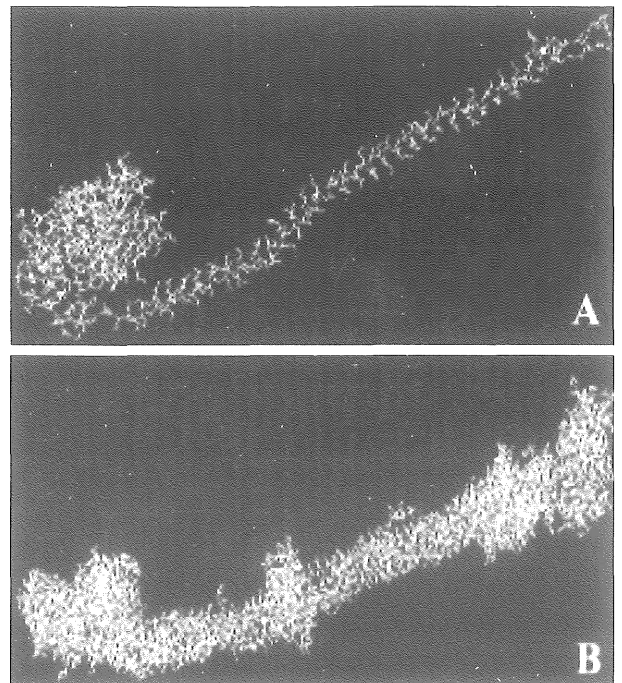


图 2 空间结构预测

Fig. 2 Tertiary structure prediction

A: 牙鲆 *fibrinogen* β 的空间结构;
B: 鸡 *fibrinogen* β 的晶体结构

2.4 牙鲆 *fibrinogen* β 的同源性和系统进化分析

选取了大黄鱼 (ABJ98546)、斑马鱼 (NP_997939)、爪蟾 (AAH94532)、鸡 (Q02020)、狗 (XP_853738)、牛 (XP_587666)、鼠 (NP_862897)、猴 (XP_001091998)、人 (NP_005132) 9 个物种的 *fibrinogen* β 氨基酸序列进行序列比对和系统进化分析。用 CLUSTAL X 比较发现, 牙鲆和大黄鱼的相似性最高, 为 81.4%; 与斑马鱼的相似性次之, 为 68.0%; 与两栖类爪蟾及鸡的相似性分别为: 59.7%、57.7%; 与狗、牛、鼠、猴、人等哺乳动物的相似性大体一致, 相似性均在 52.8% ~ 54.9% 之间。第 230 个氨基酸残基以后, 各物种之间有较高的相似性, 尤其是在 C 末段的信号序列上保守性更强 (图 3)。

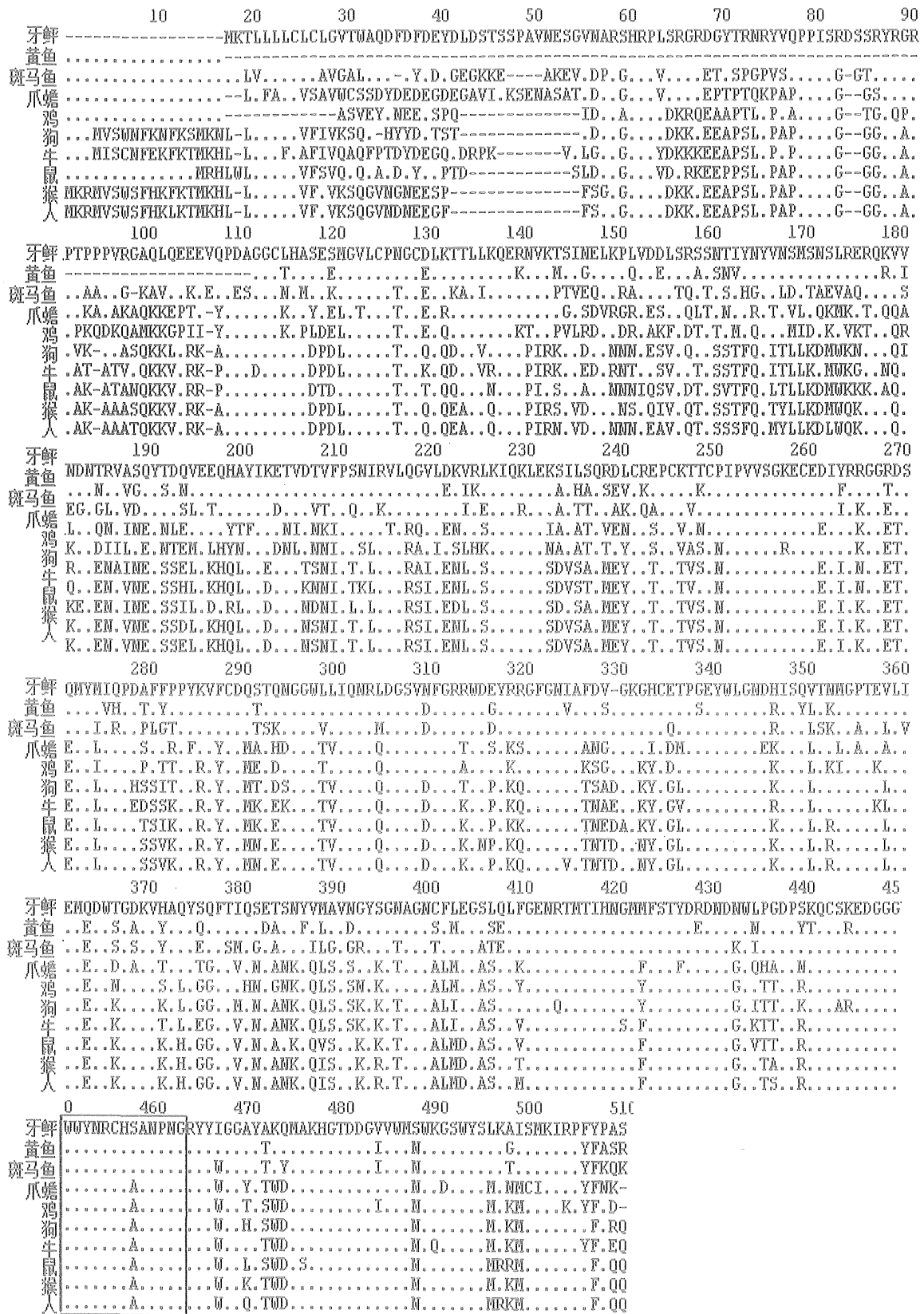


图 3 牙鲆 fibrinogen β 的氨基酸序列与已知的其它物种序列的比较

Fig. 3 Amino acid alignment of flounder fibrinogen β and other known fibrinogen β amino sequences

相同的氨基酸用.....标示, ----表示序列比对时产生的间隙, 方框示 C-末端信号序列

基于 MEGA3 的邻位相联法构建的分子进化树也反应了同一趋势, 所比较的不同物种在进化树中的位置很好地反应了它们的系统进化关系 (图 4)。

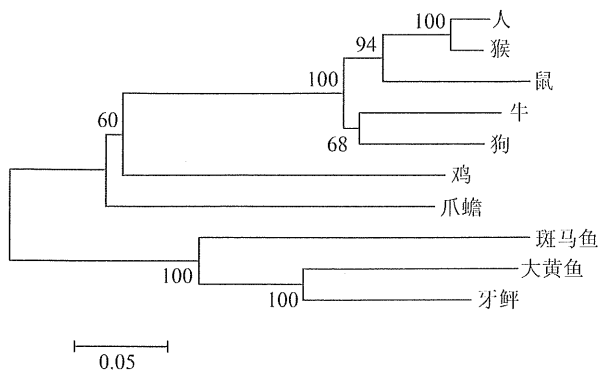


图 4 牙鲆和其它动物 *fibrinogen* β 氨基酸序列的系统进化树构建

Fig. 4 Construction a cladogram of amino acid sequence of flounder *fibrinogen* β and other species

2.5 牙鲆 *fibrinogen* β 的组织表达分析

应用 RT-PCR 方法, 以 18S rRNA 为内参来平衡

不同模板的 cDNA 浓度, 对 *fibrinogen* β 在处理前以及鳗弧菌处理后的 3 个时间段 (3 h、6 h、9 h)、7 种组织 (肝脏、肾脏、脾脏、鳃、小肠、心脏、肌肉) 中的基因表达特点进行了分析。结果表明: 牙鲆 *fibrinogen* β 在未经鳗弧菌刺激的对照组中, 只在肝脏和肾脏中有表达, 其他组织中无表达; 在鳗弧菌处理后肝脏中始终有大量表达, 而且由于表达量过大, 当采用与其它组织相同的扩增循环数 (图 5: A, 36cycles) 时, 在肝脏中的扩增达到了平台期, 不能较准确地看出表达量的变化。在降低循环数至 24 (图 5: H) 时, 可以清晰看到在注射后的 3 h、6 h、9 h 三个时间段, 随着时间的延长肝脏中的表达量逐渐增加。在鳗弧菌处理后, 肾脏中也始终有表达, 但在注射后 6 h 时间段时表达量达到最高, 而在处理 9 h 后, 其表达量开始下降。注射鳗弧菌 6 h 后, 该基因在脾脏、心脏中大量表达, 在肠中开始微量表达; 但在注射鳗弧菌 9 h 后, 脾脏的表达量开始下降, 而在心脏中其表达量继续上升, 此时, 在鳃组织中开始出现大量表达。在肌肉中始终没见到表达 (见图 5)。

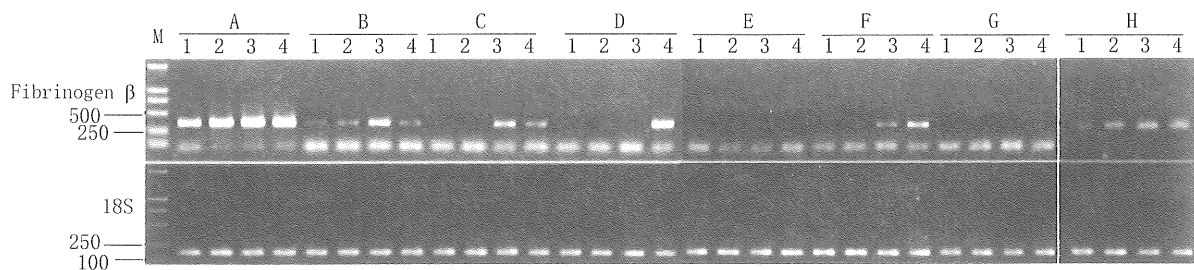


图 5 *fibrinogen* β 在牙鲆各组织中的表达分析

Fig. 5 RT-PCR analysis of *fibrinogen* β expression in various tissues of Japanese flounder

M: DL2000; 1: 对照组样品; 2-4: 处理组 3 h、6 h、9 h 样品

A-G 分别是肝脏、肾脏、脾脏、鳃、小肠、心脏、肌肉 7 种组织 (36cycles); H 为肝脏 (24cycles)

3 讨论

有关 *fibrinogen* β 基因在鱼类中的克隆, GenBank 中仅搜到了斑马鱼和大黄鱼 *Larimichthys crocea* 的相关序列。斑马鱼的 *fibrinogen* β (NP_997939) 是在构建其基因组图谱时得到, 并没有详细分析^[13]。大黄鱼的 *fibrinogen* β 是其研究人员用副溶血弧菌刺激大黄鱼寻找差异表达基因时得到的, 仅是登录 GenBank (ABJ98546), 但相关文章尚未发表。本研究先是通过 mRNA 差异显示获得了一个鳗弧菌刺激后在牙鲆肝脏中表达量显著增加的片段, 然后通过 RACE 技术获得该差异片段的全长

cDNA, 并经比对确定该基因为牙鲆的 *fibrinogen* β 基因。

半定量结果表明, 牙鲆 *fibrinogen* β 在对照组的肝脏和肾脏中有表达, 而在脾脏、心脏、鳃和肠中不表达, 但鳗弧菌注射后, 基因在肝脏和肾脏中表达量明显上升, 在脾脏、鳃和肠组织中出现不同程度的表达。由于脾脏是鱼类的主要免疫器官, 而肠和鳃是属于粘膜样淋巴组织, 它们连同它们分泌的粘液都与外界相连, 是预防病菌入侵的第一道防线, 和溶菌酶、补体等非特异性的保护物质一道组成抵御病原微生物感染的有效防线在鱼类体液和细胞免疫中的作用^[14]。我们推测, 鳗弧菌的注入, 刺

激了牙鲆脾脏、鳃和肠中免疫反应和抗病相关基因的表达, fibrinogen β 通过和其他细胞的结合, 和其他抗病因子一起发挥了抵抗病原菌侵袭的免疫调节作用。

已有的研究表明, 激活的血小板可以和 fibrinogen β 链的第 15 - 42 氨基酸残基以及 fibrinogen γ 链末端的第 400 - 411 氨基酸残基结合, 起到凝血的作用^[15-16]; fibrinogen β C 末端的保守序列与细胞的粘附、转移有关, 可以促进病理条件下的伤口愈合^[17], 它可以吸附不同的细胞如纤维原细胞、平滑肌细胞、内皮细胞等, 聚集到伤口处, 起到凝血、愈合伤口的作用; 同时也发现肿瘤病人里的纤维蛋白原也可以调节细胞进入肿瘤并对血管的再生起重要作用^[18-19]。由此我们推测, 牙鲆 fibrinogen β 在鳃弧菌感染中可能起到了凝血和促进伤口愈合的作用, 但这些推测还需要进一步的研究和验证。

参考文献:

- [1] YEE V C, PRATT K P, COTE H C, et al. Crystal structure of a 30 kD C-terminal fragment from the gamma chain of human fibrinogen [J]. *Structure*, 1997, 5: 125 - 138.
- [2] THOMAS AE, GREEN FR, KELLEHER CR, et al. Variation in the promoter region of the beta fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers [J]. *Thromb Haemost*, 1991, 65 (5): 487 - 490.
- [3] WEISEL J W. Fibrinogen and fibrin [J]. *Advances in Protein Chemistry*, 2005, 70: 247 - 299.
- [4] 于会艳, 秦斌, 龚涛, 等. 中国人群 β - 纤维蛋白原 - 455G/A 基因多态与缺血性卒中发病风险的 Meta 分析 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(24): 30 - 33.
YU Huiyan, QIN Bin, GONG Tao, et al. Meta-analysis of beta-fibrinogen gene - 455G/A polymorphism and the risks for ischemic stroke in Chinese population [J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2006, 10(24): 30 - 33.
- [5] WONG L, MAN Y, LEUNG R, et al. Interleukin - 6 gene - 573G > C promoter polymorphism is associated with plasma fibrinogen level and hypertension in Hong Kong Chinese [J]. *American Journal of Hypertension*, 2005, 18(5): A186 - A186.
- [6] 杜于茜, 陈晓锋, 卢瑛等. 静脉血栓栓塞症与脂蛋白 (α) - 纤维蛋白原浓度的关系 [J]. *临床内科杂志*, 2006, 11(23): 787.
DU Yuqian, CHEN Xiaofeng, LU Ying, et al. Study on the relationship of vein thrombosis and lipoprotein (α) - fibrinogen concentration [J]. *Journal of Clinical Internal Medicine*. 2006, 11(23): 787.
- [7] 陈锡辉, 吴旋, 黄彬. 中耳积液中纤维蛋白原含量与分泌性中耳炎疗效的关系 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2006, 41(8): 566 - 569.
- [8] CHEN Xihui, WU Xuan, HUANG Bin. Relationship between the content of fibrinogen in middle ear effusion and the effect of treatment on secretory otitis media [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2006, 41(8): 566 - 569.
- [9] MANOCHA S, RUSSELL J, SUTHERLAND A, et al. Fibrinogen-beta gene haplotype is associated with mortality in sepsis [J]. *Journal of Infection*, 2007, 54: 572 - 577.
- [10] FURLAN M. Structure and function of normal fibrinogen [J]. *Curr Probl Clin Biochem*, 1984, 14: 38 - 64.
- [11] 松田道生. 遗传性异常纤维蛋白原的结构和功能关系 [J]. *中华血液学志*, 1997, 18(9): 495 - 498.
MATSUDA Michio. Relationship between the structure and function of inherited dysfibrinogenemia [J]. *Chinese Journal of Hematology*, 1997, 18(9): 495 - 498.
- [12] LIANG P, PARDEE A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257: 987 - 991.
- [13] 朱开玲, 陈吉祥, 李筠等. 鳃弧菌灭活疫苗对海水养殖大菱鲆的免疫预防研究 [J]. *高技术通讯*, 2004 (2): 76 - 80.
ZHU Kailing, CHEN Jixiang, LI Yun, et al. Study on the Vaccination against *V. anguillarum* in Farmed Marine Turbot [J]. *Chinese High Technology Letters*, 2004(2): 76 - 80.
- [14] WOODS IC, KELLY PD, CHU F, et al. A comparative map of the zebrafish genome [J]. *Genome Res*, 2000, 10 (12): 1903 - 14.
- [15] DALMO R A, INGEBRIGTSEN K, BOGWALD J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES) [J]. *Fish Diseases*, 1997, 20 (4): 241 - 273.
- [16] CHERESH D A, BERLINER S A, VICENTE V, et al. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells [J]. *Cell*, 1989, 58(5): 945 - 953.
- [17] FARRELL D H, THIAGARAJAN P, CHUNG D W, et al. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(22): 10729 - 10732.
- [18] GORODETSKY R, VEXLER A, SHAMIR M, et al. New cell attachment peptide sequences from conserved epitopes in the carboxy termini of fibrinogen [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 287(1): 116 - 129.
- [19] BARDOS H, MOLNAR P, CSECSEI G, et al. Fibrin deposition in primary and metastatic human brain tumours [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1996, 7(5): 536 - 548.
- [20] BARDOS H, JUHASZ A, REPASSY G, et al. Fibrin deposition in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx [J]. *Thromb Haemost*, 1998, 80(5): 767 - 772.