

树鼩 HGF 全长编码序列的克隆及分子特征分析

李振宇¹, 陈玲霞¹, 尹博文¹, 苗雨润¹, 宋庆凯¹, 代解杰^{1,2}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118;
2. 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118)

【摘要】 目的 获取树鼩肝细胞生长因子的全长编码序列并进行分子特征分析。**方法** 以树鼩肝组织总 RNA 为材料, 通过 RT-PCR 扩增和序列拼接获得树鼩肝细胞生长因子全长编码序列, 进而通过 DNAMAN, Pymol 等生物信息学软件对其序列和分子特征进行分析。**结果** 树鼩 HGF 分子结构在进化中相对保守, 树鼩 HGF 整体结构与人相似。但树鼩 HGF α NK1 区域相比人 HGF 多出一个 α 螺旋, 并且有两个更长的 β 折叠片, 另外, 树鼩在该区域存在一个很强的表面正电荷区域。这些差异可能会对树鼩 HGF 与其受体的作用方式产生影响。**结论** 本实验为明确树鼩 HGF 与其受体的作用方式和树鼩 HGF 的合成与制备奠定了基础。

【关键词】 树鼩; 肝细胞生长因子; 分子克隆; 结构预测

【中图分类号】 Q518.3 Q959.832 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0010-09

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.002

Cloning of full-length coding sequence of tree shrew HGF and prediction of its molecular characteristics

LI Zhen-yu, CHEN Ling-xia, YIN Bo-wen, MIAO Yu-run, SONG Qing-kai, DAI Jie-jie

(1. Center for Tree shrews Germplasm Resource, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China; 2. Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infections Diseases, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To get the full-length HGF, Hepatocyte growth factor, cDNA encoding sequence and predict its molecular characteristics. **Methods** Full-length HGF cDNA encoding sequence is cloned from total RNA in liver tissue of tree shrew by RT-PCR and its molecular characteristics is analyzed compared with other mammals by using biology software such as DNAMAN, Pymol and so forth. **Results** A 2193bp of the full-length HGF cDNA encoding sequence is cloned from total RNA in liver tissue of tree shrew. The analysis of molecular characteristics show that the molecular structure of HGF is relatively conservative in evolution, tree shrew HGF overall structure similar to Homo sapiens. However, compared with the structure and charge surface of NK1 domain of HGF α -chain of human, tree shrew has two longer β -sheet and one more α -helix. Additional, tree shrew had a strong positive charged site in this area, which may have a impact on the bind of HGF to its receptor. **Conclusion** This study provide a theoretical basis for preparation and receptor-binding mechanism studies of tree shrew HGF.

【Key words】 Tree shrew; Hepatocyte growth factor; Molecular cloning; Structural predicting

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01)。

[作者简介] 李振宇(1990-), 男, 硕士, 从事干细胞研究, Email: 923203060@qq.com。

[通讯作者] 代解杰(1961-), 男, 研究员。Email: dj@imbcams.com.cn。

肝细胞生长因子(HGF),又名离散因子,隶属于纤溶酶原相关生长因子家族,是目前已知生物活性最广泛的细胞生长因子之一。最初的研究表明,其能刺激体外培养肝细胞的增值与 DNA 合成。而越来越多的研究表明,其在组织器官损伤修复、形态发生和肿瘤转移过程中发挥重要作用。在肝损伤的情况下,HGF 通过与受损组织中上调的 MET (由原癌基因 *c-met* 编码,为体内与 HGF 亲和力最高的受体)受体结合并激活下游信号转导分子如有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, MTR)通路和信号转导因子和转录激活因子(signals generated and activator of transcription, STAT) 通路,并引起一系列的靶基因的转录上调或抑制,促进肝实质细胞和胆管上皮细胞的增生,从而加速肝脏再生^[1]。而在癌症发生过程中,癌细胞又可以通过长久的过量的表达 MET 受体和自分泌 HGF,增强其增值与侵袭能力^[2]。同时,HGF 还能通过促进血管再生作用^[3]及细胞离散效应进一步促进癌细胞的生长与扩散。

树鼯作为一种小型哺乳类动物,因其分类地位上相比小鼠和大鼠更接近于人,加之易于饲养与广泛分布的特性,目前已经广泛的用于包括自发性乳腺癌^[4],肝癌^[5]等多种人类癌症模型的研究,具有很强的应用潜力。但到目前为止,尚未检索到关于树鼯 HGF 分子克隆的相关研究报道,这影响了树鼯 HGF 的表达制备与其在组织修复和癌症发生中作用的进一步研究与探讨。因此,本研究以获得树鼯 HGF 完整编码序列为目的,同时比较分析其分子特征与差异,为树鼯 HGF 后续的制备和功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 动物

本实验采用的滇缅树鼯来自中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心【SCXK(滇)K2013-0001】,无菌手术操作在中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心动物实验设施中进行【SYXK(滇)K2013-0001】。

1.2 树鼯全长编码序列的序列克隆

根据 Genbank 已经注册登记的人(NM_000601.5),小鼠(NM_001289458.1),大鼠(NM_017017.2)的 HGF 保守序列,设计表一中的六对引

物,该 6 对引物覆盖了树鼯 HGF mRNA 的整个编码区(表一)。

取成年树鼯麻醉后,打开腹腔剪下少量肝小叶组织,后压迫止血缝合。所得组织放入 1.5 mL 离心管,加入 200 μ L Trizol(试剂盒购自大连宝生物)经过组织研磨器后按步骤提取组织总 RNA,并采用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(试剂盒购自大连宝生物)一步法逆转录成 cDNA,并去除基因组 DNA 污染。之后采用上述引物采用 TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version(试剂盒购自大连宝生物)进行普通 PCR,循环参数为:98 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C ~ 57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。用树鼯管家基因 GAPDH 作为阳性对照。PCR 产物交由公司(北京奥科鼎盛生物科技有限公司)经 TA 克隆插入 pMD-19T 载体后,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,提取质粒进行双酶切鉴定,最终进行双向测序。所得结果用 DNAMAN5.0 进行序列拼接得到全长编码序列,拼接时要求序列间碱基重合大于 40 bp,一致性大于 90%。

1.3 分子特征分析

本文所用于参考的核酸及蛋白质序列均来源于 GenBank,以 MEGA5.0, DNAMAN5.0, PyMOL 分别进行核酸序列、氨基酸序列分析及蛋白质三维模型的构建。而蛋白质三级结构的预测,则采用在线程序进行同源构建(<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)和分子表明电荷构建(<https://sourceforge.net/projects/apbs/>),全长 cDNA 的比对则采用 GenBank 的 Blast 进行,并根据已知人全长 HGF mRNA 的相关注释进行结构域分析。

2 结果

2.1 树鼯 HGF 全长编码序列扩增结果

利用树鼯肝组织总 RNA,通过 RT-PCR 获得长度分别为 267 bp(L1 片段),745 bp(L2 片段),759 bp(L3 片段),689 bp(L4 片段),622 bp(L5 片段)的核酸片段。在第一次拼接过程中发现,由于测序数据读取原因,L1 片段与 L2 片段未能重合,故又设计引物,通过 RT-PCR 获得长度为 319 bp(L1-2 片段)的核酸片段。之后通过 DNAMAN6.0 进行序列拼接(图 1),得到总长为 2357 bp 的核酸片段,并通过 MEGA5.0 进行多序列比对,确定了树鼯 HGF 编码序列,树鼯 HGF 开放阅读框长度为 2193 bp,共编码 730 个氨基酸(图 2)。

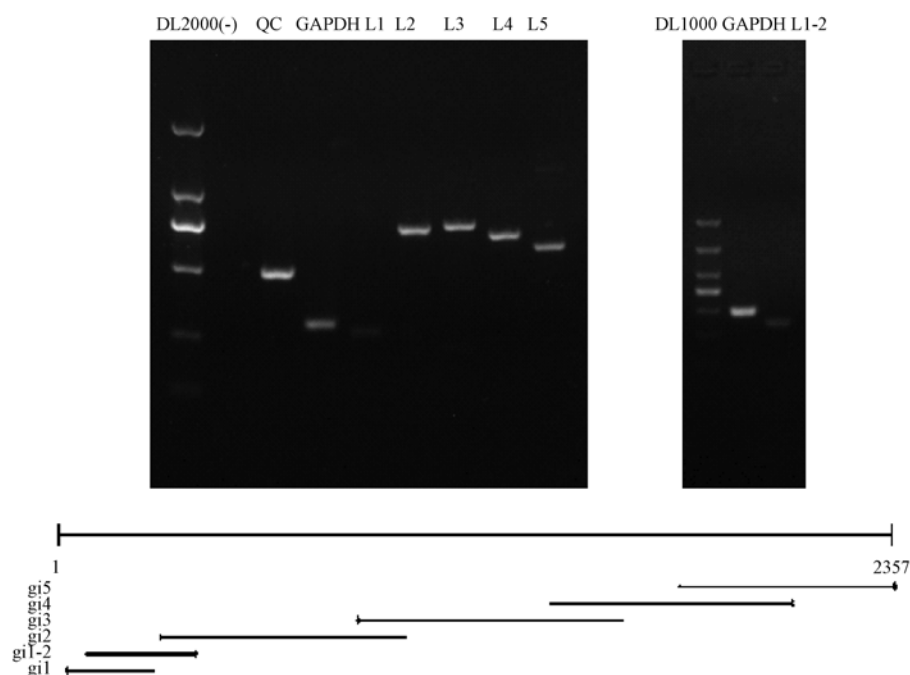
表 1 树鼩 HGF 分子 RT-PCR 引物设计

Tab.1 Primer design of tree shrew HGF

名称 Name	引物序列 Primer sequence	引物位置 Primer location
L1 - F	GCATCTATCTCCTCCAGTG	-42 ~ -23
L2 - F	AGACCAATGTGCCAATAGAT	200 ~ 219
L3 - F	AATTACTGCCGCAATCCTGAT	771 ~ 791
L4 - F	CGGAATCCTGATGATGATGCC	1320 ~ 1340
L5 - F	CGCAAGCAGGTTCTAAATGTG	1680 ~ 1700
L1 - 2 F	CTACGCAGAGGGACAGAA	80 ~ 98
L1 - R	CTATTGGCACATTGGTCTG	195 ~ 216
L2 - R	GTAACCTTCTCCTTGACCTT	919 ~ 939
L3 - R	AACTAACCATCCAGCCTACATT	1509 ~ 1531
L4 - R	TCACATGGTCCTGATCCAATCT	1987 ~ 2009
L5 - R	ACACTCAAGTAGTTGTCGTAGG	2281 ~ 2302
L1 - 2 R	TCCACTTGACATGCTATTGA	301 ~ 321

注:引物位置相对于引物在人 HGF 中的位置,参照起始位点为起始密码子。

Note:The location of primer is based on the location in human HGF,the initiation site is initiation codon.



注:QC 为 PCR 试剂盒质控,(-)为阴性对照。

图 1 树鼩 HGF cDNA 扩增和序列拼接结果

Note:QC is quality control of PCR kit,(-) is negative control.

Fig.1 PCR amplification of tree shrews HGF cDNA and result of sequence stitching

2.2 树鼩 HGF 三维分子模型的构建

我们通过 SWISS-MODEL 预测并结合 Pymol 构建得到了树鼩 HGF α 链 NK1 结构域和 β 链 sp 结构域的三维分子模型(图 3,图 4),并通过 APBS 软件得到了树鼩 HGF α 链 NK1 结构域的表明分子电荷模型(图 3)

3 讨论

3.1 树鼩 HGF 核苷酸序列的分析讨论

树鼩全长编码序列与人相似度为 91.97%,共存在 176 个碱基的差异,同时在树鼩 HGF 编码区域 1617 ~ 1622 位多出 6 个碱基,但上述差异并未导致

移码突变。本实验由于采用热启动版本的 Taq 聚合酶,并采用双向测序,有效排除了测序引起的误差。因此,测序所得的树鼩 HGF 分子全长编码序列应该是较为可信的。

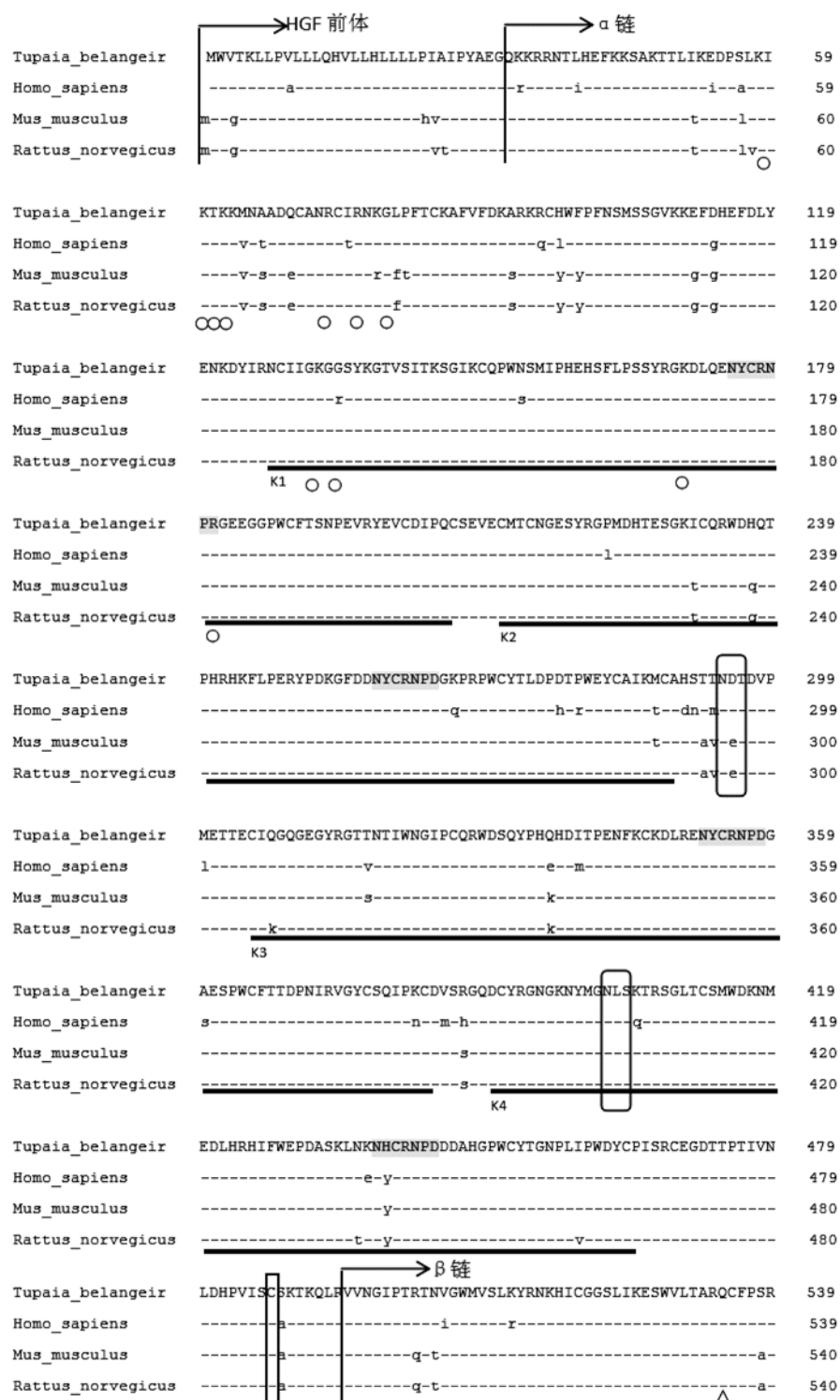
3.2 树鼩 HGF 氨基酸序列的分析讨论

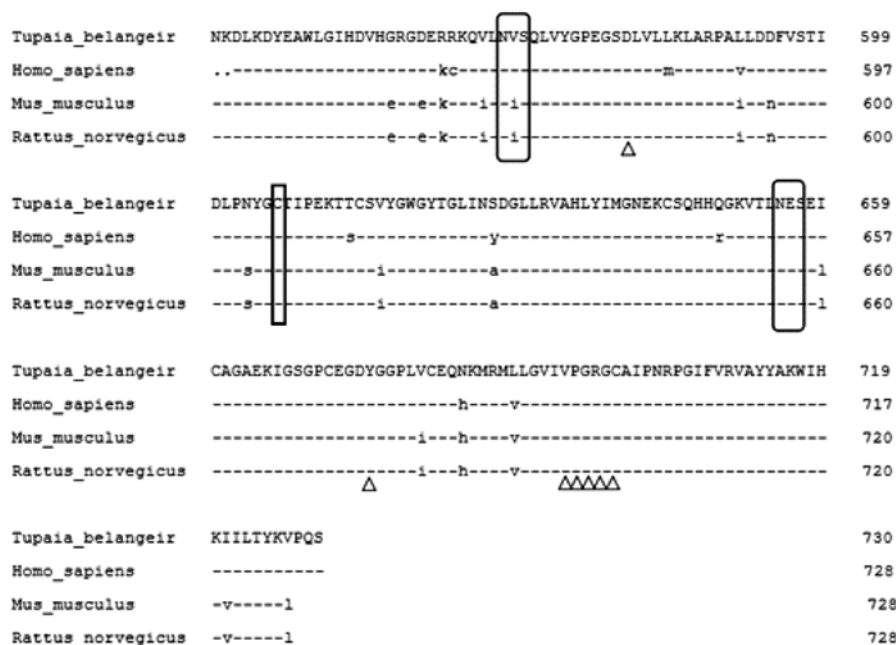
3.2.1 树鼩的 HGF 整体结构分析讨论

树鼩 HGF 分子前体由 730 个氨基酸组成,利用

mega5.0 和 DNAMAN6.0 软件将推导得到的树鼩 HGF 氨基酸序列与人(NP_000592.3),小鼠(NP_001276387.1)

大鼠(NP_058713.1)比对后,氨基酸序列相似度分别为 93.7%,93.16%,93.16%,树鼩 HGF 氨基酸序列与人类相似度更高,但与大小鼠相似度差别不大,这一结果提示 HGF 分子在进化过程中可能相





注:相同的氨基酸位点用-表示,序列缺失部分用.表示,kringle 结构域为下划线部分,其中共同基序用阴影画出,四个潜在的 N-糖基化位点用圆角矩形标出,连接 HGF α 与 β 链的半胱氨酸位点用矩形标出,与硫酸乙酰肝素和肝素结合的位点用○标出, β 链与 MET 受体结合的位点用△标出。

图 2 树鼯HGF 预测氨基酸序列与人,小鼠,大鼠的比对分析

Note: Identical amino acids are indicated by dashes (-), Dots (.) are introduced where the sequence fails. The kringle domains are shown by the underlines and the motifs in it are shadowed. Four putative N-glycosylation sites are circled. The cysteine residues that form a disulfide bond between the α - and β -chains are boxed. The sites in α -chain that bonded by heparan sulfate is marked by ○. The sites in β -chain that combine with MET receptor is marked by △.

Fig. 2 The Alignment and analysis of predicted tree shrews HGF amino acid sequences with their homologues from human, mouse and rat

对保守。如人一样,树鼯 HGF 在转录起始位点只有一个甲硫氨酸,而小鼠和大鼠有两个,另外,在树鼯 HGF 终止密码子与人处于相同位置,但相比大鼠和小鼠在翻译末端多出 3 个氨基酸残基,同时由于树鼯 HGF 在 540 和 541 处相比人多出两个氨基酸残基,导致树鼯 HGF 的总长为 730,这样的结构差异是否会导致 HGF 的功能差异,有待进一步研究和探讨。

同时通过与 GenBank 中人 HGF 的已经注明的结构域比对后发现,两者均由七个部分组成,包括 N 端一个约 32 个氨基酸残基长度的信号肽序列,N-端结构域(n),4 拷贝的 kringle 结构域(k1 - k4), 和一个 C-端结构域(又名 sp,因为该结构域与丝氨酸蛋白酶催化结构域结构相似),同时在 492 位和 493 位(Arg-Val)均存在一个推定的蛋白酶水解位点,裂解部位的结构与组织纤溶酶原激活物(TPA)活化纤溶酶原为纤溶酶的裂解部位的结构一致,提示树鼯成熟 HGF 异质二聚体也是经 TPA 裂解 pre-pro-HGF

后形成的 α 链与 β 链构成^[6]。同时连接 α 链与 β 链的半胱氨酸残基位置和推定的 4 个糖基化位点在四个物种中都处于同一位置。通过以上结果推断,树鼯 HGF 基本结构应与人 HGF 分子相似。

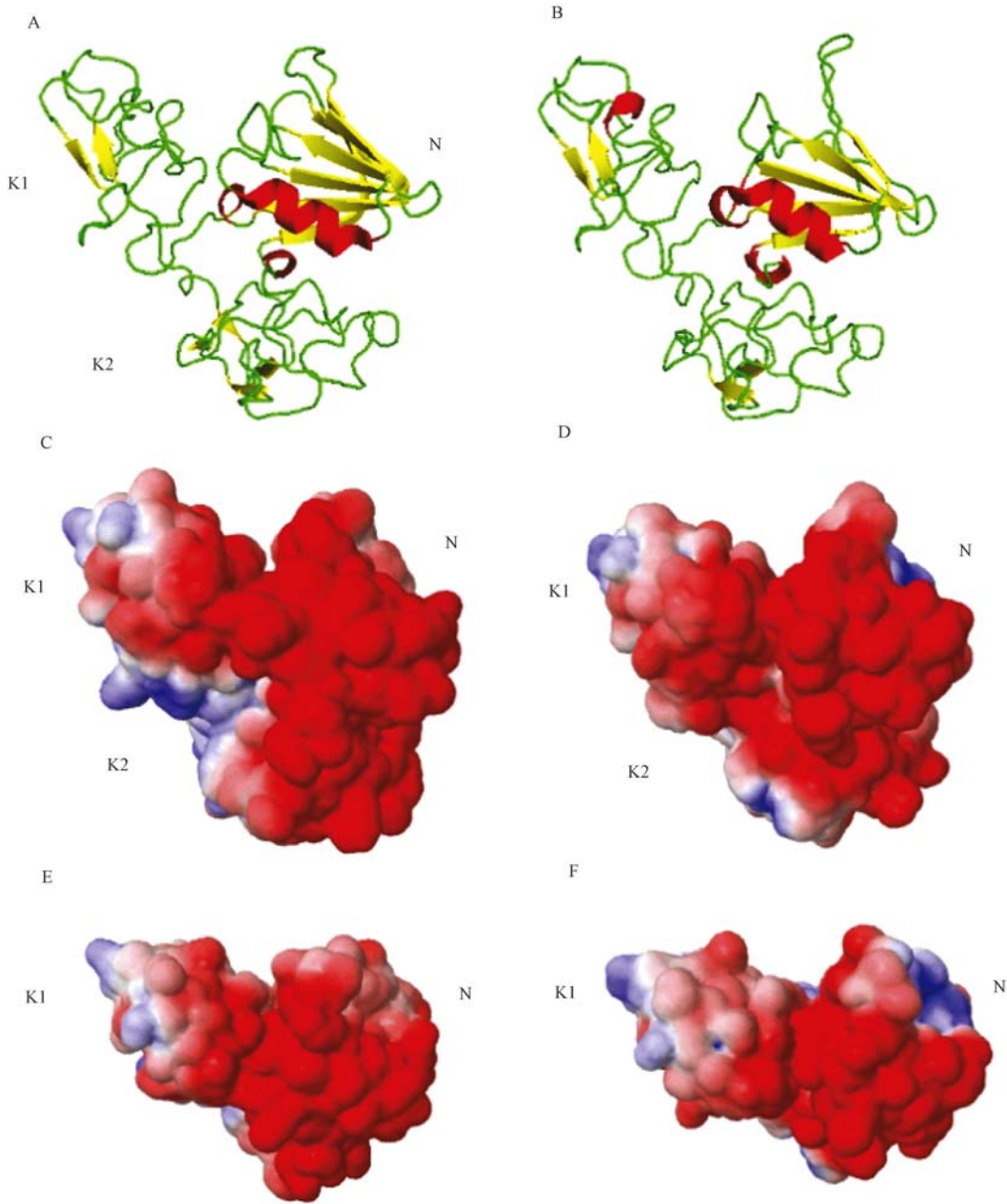
3.2.2 树鼯 HGF α 链的结构分析讨论

人的 HGF α 链主要有 5 个结构域,分子量大小为 69×10^3 ^[7] 分别是一个与纤溶酶原激活肽(plasminogen activation peptide)相关的 N 端结构域与 4 个相连的 kringle 结构域(K1 - 4),其中 kringle 域含有三个大的环区,环区内经由 3 组二硫键和大量的分子内氢键加以稳定,同时圈区间含有小的反向平行的 β 片,且结构域中特定位置含有 Asn-Tyr-Arg-Pro-Asp 特征结构。目前这一结构域已经在整个血液凝固和纤维蛋白溶解蛋白质中被发现,被认为在介导分子间相互作用和蛋白酶水解活性调节中起重要作用^[8]。在完整的人 HGF 中, α 链的 N 端发卡状结构域和 K1 结构域(NK1)与其受体 MET 紧密结合,已经能够激活 MET 受体的下游活性,因此

NK1 结构域被认为是 HGF 分子中最重要的与受体结合的活性区域之一^[9]。但在具体的活性位点上,虽然目前多数研究显示 HGF 主要通过 NK1 结构域与 MET 受体的 SEMA 结构域结合^[10],但也有研究表明其还可以与 MET 受体的 IPT 结构域结

合^[11],研究之间存在较大的争议,故 HGF α 链上与 MET 受体结合的活性位点尚不明确。

同时我们在通过 SWISS 在线预测软件对树鼩 HGF α 链进行同源构建的过程中发现,现有的晶体衍射模型只覆盖了 HGF α 链的 N 端结构域和 K1-2



注:左、右分别为人和树鼩的蛋白三维模型构建;A、B 和 C、D、E、F 分别为
飘带图和表明绝对电荷分布图(负电荷显示红色,正电荷为蓝色)。

图 3 人和树鼩 HGF α 链 NK2 结构域蛋白三维结构构建与表明电荷比较

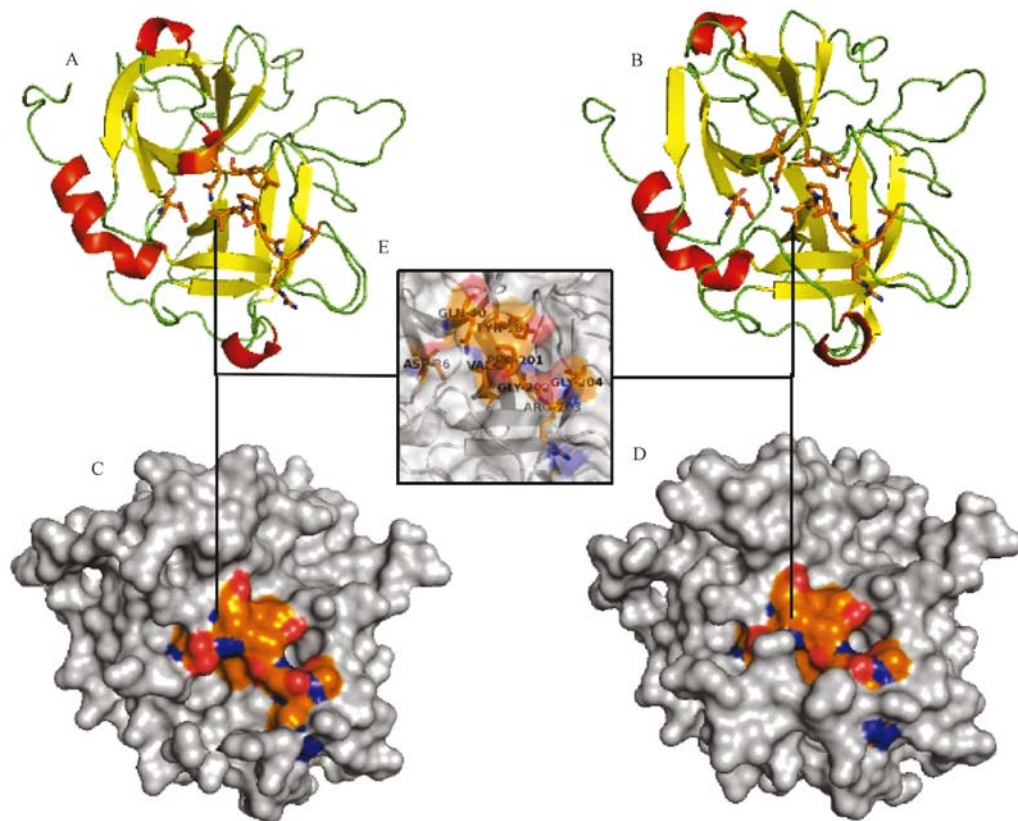
Note: Modeled structures and surface charge of human(left) and tree shrews(right) NK2 domain of HGF α - chain. Shown on A, B and C, D, E, F are surface views and surface charges, respectively. Show in red are negative charges and in blue are positive charges.

Fig.3 Modeling of three-dimensional structures and surface charge of the NK2 domain of human and tree shrews HGF α - chain

结构域(NK2),故我们基于同源构建的树鼩 HGF α 链也只显示了 NK2 结构域,而有研究表明 HGF α 链的 K3-4 区域与 MET 结合能力较差,可能更重要作用在于为 HGF β 链 sp 结构域与 MET 受体的结合提供合适的空间构像^[12],这可能是 K3-4 区域缺失的原因之一。因此我们通过 Pymol 和 APBS 在线预测分别对树鼩 HGF NK2 结构域三维空间结构和分子表面电荷进行了分析,结果显示(图3),树鼩 HGF K1 结构域氨基酸序列在人,大鼠,小鼠中高度一致,相似性分别达到 97.5%,100%,100%,且空间结构和分子表面电荷分布基本一致,同时 K1-K4 区均存在一个高度保守的 NYCRNPD 基序,该基序是否与受体的激活和结合有关,有待进一步研究。虽然 N 端结构域均由间隔分布的 3 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠片以 α - β - β - α - β - β - α 的排序构成,但在第一个

和第五个 β 折叠片长度上不同,这导致了树鼩在到 52 位和 108 位到 116 位氨基酸残基的空间构象上存在差异。而在 K1 结构域,由于树鼩与小鼠和大鼠氨基酸残基序列完全一致,导致树鼩 247-251 位氨基酸残基在构象上存在与小鼠和大鼠相同的 α 螺旋,而这一结构在人 K1 结构域不存在。同时比较 N 端结构域的分子表面电荷后发现,树鼩 95 位和 97 位分别为精氨酸和组氨酸,带正电荷,而这两个残基恰好暴露于分子表面,导致该区域带上了较强的正电荷,而人 95 位和 97 位为谷氨酰胺和亮氨酸,带中性质电荷。因此,在以上位点的电荷和空间构象差异可能影响了树鼩 HGF 同其它分子的结合,例如,我们在实验中发现,人 HGF 分子对树鼩肝细胞的生长促进作用不明显。

同时,HGF α 链还能不依赖 β 链单独与 MET



注:左、右分别为人和树鼩 HGF β 链的三维结构模型构建,A、B 和 C、D 分别为
 飘带图和溶剂可及表面图(橙色部分为活性位点区域),E 显示了活性位点与溶剂可及表面的相对位置。

图 4 人和树鼩 HGF β 链 sp 结构域的三维模型构建和溶剂可及表面比较

Note: Modeled structures and solvent-accessible surface of human(left) and tree shrews(right)

HGF β chains. Shown on A, B and C, D are surface view and solvent-accessible surface
 (the orange part is activation sites) respectively, Figure E show the relative location of activation
 sites and solvent-accessible surface.

Fig. 4 Modeling of three-dimensional structures and solvent-accessible surface of sp domain of
 human and tree shrews HGF β -chain

受体结合,因此除了完整的 HGF 异二聚体外,HGF 在体内还存在两中剪切突变体,分别是 NK1(仅包含 N 端结构域与 K1 结构域),NK2(仅包含 N 端结构域与 K1-2 结构域)^[13],在功能上,单独的 NK1 和 NK2 剪切体表现为 MET 受体拮抗剂^[14-15],而在受体细胞表面存在游离硫酸乙酰肝素,肝素存在的情况下,NK1 还能以二聚体或四聚体的形式同完整 HGF 分子一样起到 MET 受体激动剂的作用^[16]。因此我们比较了文献已经报道的硫酸乙酰肝素,肝素与 HGF N 端与 K1 结构域的结合位点后,发现树鼩除一个位点与人有差异之外,其余位点氨基酸序列完全一致,因此推测树鼩可能也存在相应的剪切突变体多聚形式,有研究表明,对 NK1 中 K1 结构域中的硫酸乙酰肝素结合位点进行突变后,NK1 与 MET 受体结合程度更高,因此推测树鼩 NK1 剪切体与 MET 受体的结合程度更高。

3.2.3 树鼩 HGF β 链的结构分析讨论

人 HGF 的 β 链为一个完整的结构域,分子量大小为 34×10^3 ,因与糜蛋白酶样丝氨酸蛋白酶(chymotrypsin-like serine proteases)家族蛋白酶的蛋白酶结构域高度相似,又被称为 sp 结构域(sp domain),因此同其它纤溶酶原(plasminogen)和丝氨酸蛋白酶原一样,树鼩的 β 链只有在单链的 HGF 前体分子经水解成双链并结合形成异二聚体后才具有活性,且其与 MET 受体的结合依赖于 α 链与 MET 受体的结合^[17]。虽然其与 MET 受体的结合能力差于 α 链的 NK1 区域,但如果 MET 受体缺失了 HGF β 链的结合,其下游信号通路的级联反应的强度会显著降低^[18],因此 HGF β 链与 MET 受体的结合是 HGF 发挥其完整生物学活性所必须的。而目前,人 HGF β 链与 MET 受体结合的具体位点已经通过 X 晶体衍射模型得到^[18]。

因此我们通过 Swiss-model 对树鼩 HGF β 链进行预测,并用 Pymol 对其三维结构和溶剂可及表面(solvent-accessible surface)进行建模比较,结果显示(图四):树鼩 HGF β 链类丝氨酸蛋白酶区域的相应活性位点与人一致,均为 Gln534, Asp578, Tyr673,因此树鼩 HGF β 链依然不具有丝氨酸蛋白酶活性。同时,树鼩 HGF β 链与 MET 受体结合位点与人完全一致,位点位置均为 Gln534, Asp578, Tyr673, Val692-Pro693-Gly694-Arg695-Gly696,在三维空间构型和溶剂可及表面基本一致,均存在一个凹槽。在人体内,HGF β 链通过该凹槽中的上述活性位点

与 MET 受体 SEMA 结构域结合,从而参与 MET 受体活性的激活^[19]。因此我们推测树鼩 β 链与 MET 受体的结合方式与人类似。

综上,我们通过 RT-PCR 扩增获得树鼩 HGF 全长编码序列,并对其分子结构进行比较分析。结果表明:HGF 分子结构在进化中相对保守,树鼩 HGF 整体结构与人相似。但树鼩 HGF α NK1 区域局部空间构型和分子表面电荷存在较大差异。而这些差异为进一步明确树鼩 HGF 与其受体的作用方式提供了参考,并有利于树鼩 HGF 的合成与制备。

参考文献:

- [1] Malgorzata B, Garratt AN, Torsten W, *et al.* Met provides essential signals for liver regeneration[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(29):10608-13.
- [2] Renzo M F D, Olivero M, Katsaros D, *et al.* Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer[J]. International Journal of Cancer, 1994, 58(5):658-62.
- [3] Jiang WG, Hiscox SE, Parr C, *et al.* Antagonistic effect of NK4, a novel hepatocyte growth factor variant, on in vitro angiogenesis of human vascular endothelial cells[J]. Clin Cancer Res. 1999 5(11):3695-703.
- [4] Xia H J, Wang C Y, Zhang H L, *et al.* Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*)[J]. Zoological Research, 2012, 33(1):55-59.
- [5] Park US, Su JJ, Ban KC, *et al.* Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1[J]. Gene, 2000, 251(1):73-80.
- [6] Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA[J]. American Journal of Pathology, 1993, 143(3):949-958.
- [7] Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1989, 163(2):967-973.
- [8] Patthy L, Trexler M, Váli Z, *et al.* Kringles: modules specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases[J]. Febs Letters, 1984, 171(1):131-136.
- [9] Lokker NA, Godowski PJ. Generation and characterization of a competitive antagonist of human hepatocyte growth factor, HGF/NK1[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(268):17145-17150.
- [10] Ermanno G, Sara S, Petoukhov MV, *et al.* Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(11):4046-4051.

- [11] Cristina B, Addolorata A, Maria G, *et al.* A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(30):21267–21277.
- [12] Holmes O, Pillozzi S, Deakin JA, *et al.* Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 367(2):395–408.
- [13] W David T, Jennifer DH, Ermanno G, *et al.* Structural basis for agonism and antagonism of hepatocyte growth factor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(30):13264–13269.
- [14] Youles M, Holmes OM, Nessen M, *et al.* Engineering the NK1 fragment of hepatocyte growth factor/scatter factor as a MET receptor antagonist[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377(3):616–622.
- [15] Chan AM, Rubin JS, Bottaro DP, *et al.* Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript [J]. *Science*, 1991, 254(5036):1382–1385.
- [16] Lietha D, Chirgadze DY, Mulloy B, *et al.* Crystal structures of NK1 – heparin complexes reveal the basis for NK1 activity and enable engineering of potent agonists of the MET receptor[J]. *Embo Journal*, 2001, 20(20):5543–5555.
- [17] Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, *et al.* Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor[J]. *Embo Journal*, 1992, 11(11):4825–4833.
- [18] Daniel K, Xiaoyi Y, Mark P, *et al.* Structural and functional basis of the serine protease-like hepatocyte growth factor beta-chain in Met binding and signaling [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(38):39915–39924.
- [19] Enrique DL, Srinivasan N, Sowdhamini R, *et al.* Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP) [J]. *Protein Science*, 1994, 3(12):2378–2394.

[修回日期]2016-03-30

(下接第 80 页)

理检查结果显示其脾脏红髓髓窦高度扩张并充满大量红细胞,髓质内含铁血黄素沉积明显。本次研究可见,除虫脒对大鼠血液系统可造成明显损害。

参考文献:

- [1] 刘刚. 除虫脒原药产品登记企业达到 14 家. 农化市场十日讯, 2013, (19):38–38.
- [2] Cornell University. Pesticide Management Education Program PMEP [DB/OL]. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dienochlor-glyphosate/diflubenzuron-ext.html>, 1993–9.
- [3] 刘英华, 张静姝, 邸金茹, 等. 三聚氰胺对大鼠的亚慢性毒性研究[J]. *环境与健康杂志*, 2010, 27(5):422–425.
- [4] 李本长, 邓磊, 周宁, 等. 噻唑膦原药对大鼠的亚慢性毒性作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, (6):49–53.
- [5] 张妍, 朱莎, 高宇, 等. 农药暴露与儿童急性白血病关系的病例-对照研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(1):41–46.
- [6] Gronowicz G, Swift H, Steck T L. Maturation of the reticulocyte in vitro[J]. *Journal of Cell Science*, 1984, 71(1):177–197.
- [7] 李津婴. 溶血性贫血的诊断与实验室检查[J]. *继续医学教育*, 2006, 20(4):66–71.
- [8] 卢焕兴, 余艳云. 血液细胞学参数在贫血诊断中的应用[J]. *现代预防医学*, 2005, 32(6):698–700.
- [9] Salama A. Drug-induced immune hemolytic anemia. [J]. *Expert opinion on drug safety*, 2009, 8:73–79.
- [10] Garratty, G. Immune hemolytic anemia caused by drugs [J]. *Expert opinion on drug safety*, 2012, 11(4):63–67.
- [11] 李晓晶, 陈旭岩, 汪波, 等. 药物导致溶血性贫血 18 例分析[J]. *中华内科杂志*, 2007, 46(2):146–147.
- [12] 付蓉. 后天获得性溶血性贫血[J]. *中国实用内科杂志*, 2009, (7):596–599.

[修回日期]2016-02-01