

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201711035



单环刺螭纤溶酶的季节积累 及初步药效学

龙莎¹, 吕卓伦¹, 李小红², 宋伟杰³, 王立强¹

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;
2. 广州优米健医药科技有限公司, 广东 广州 510000;
3. 中国人民解放军第 211 医院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 研究单环刺螭纤溶酶(UFE)的季节累积规律,并验证 UFE 的药效学. 首先,将不同季节采收的单环刺螭体腔液通过离心、葡聚糖凝胶过滤、阴离子交换层析等工艺进行分离、提纯,获得单一组分. 然后,使用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定 UFE 的相对分子质量,用 Folin-酚试剂法测定其活力. 最后,通过体内、外溶栓实验和大鼠脑中动脉栓塞模型来考察 UFE 的抗凝血和溶血栓作用. 结果表明:从秋季批单环刺螭中分离纯化的 UFE 比活力达到 $194.57 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$,纯化倍数为 17.9 倍,回收率为 16.9%,与春季批、夏季批结果相比有统计学意义. 药效学实验证实:UFE 与尿激酶类似,能明显延长体外凝血时间,有效抑制体内血栓形成;UFE 的活性与季节变化相关,具有季节累积性;UFE 具有显著的抗凝血和溶栓作用,且无溶血毒性.

关键词: 单环刺螭; 单环刺螭纤溶酶; 抗凝血; 溶栓; 季节累积性; 药效学

中图分类号: R 944 文献标志码: A 文章编号: 1000-5013(2018)04-0583-06

Seasonal Accumulation of Monocyclic Thrips Fibrinolytic Enzyme UFE and Preliminary Pharmacodynamic Study of UFE

LONG Sha¹, LÜ Zhuolun¹, LI Xiaohong²,
SONG Weijie³, WANG Liqiang¹

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;
2. Guangzhou Youmijian Pharmaceutical Technology Company Limited, Guangzhou 510000, China;
3. No. 211 Hospital of PLA, Harbin 150080, China)

Abstract: The season cumulative rules of the monocyclic sting fibula plasmin was studied, and the pharmacodynamics of *Urechis unicinctus* fibrinolysin enzymes (UFE) was verified. The mononuclear stinger fluid collected in different seasons was separated and purified by centrifugation, dextrane gel filtration and anion exchange chromatography to obtain single component. And then, the relative molecular weight of UFE was determined by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the activity of UFE was measured by Folin-phenol reagent method, and the anticoagulant effect and thrombolytic effect of UFE was evaluated by *in vivo* and *in vitro* thrombolysis tests and arterial embolism model in rat brain. The results showed that the specific activity of UFE isolated and purified from *Monochamus alternatus* in autumn was $11.672 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$, the purification fold was 17.9 folds, and the recovery rate was 16.9%, which was significantly different from the spring

收稿日期: 2017-12-11

通信作者: 王立强(1970-),男,教授,博士,主要从事药剂学和创新药物研发的研究. E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFE0101700); 福建省自然科学基金资助项目(2015J01342); 华侨大学研究生科研创新基金资助项目(1611316003)

batch and summer batch results. Pharmacodynamics experiments confirmed that UFE was similar to urokinase, which could prolong the clotting time *in vitro* significantly, and inhibit thrombosis *in vivo* effectively. In addition, the content of UFE was related to the seasonal change and had season accumulation. Besides, UFE had a significant anticoagulant and thrombolytic effect with no hemolysis toxicity.

Keywords: *Urechis unicinctus*; *Urechis unicinctus* fibrinolysin enzymes; ant clotting; thrombolytic; seasonal accumulation; pharmacodynamics

单环刺螠个体肥硕,体壁肌养分丰富,是我国北方黄海、渤海沿岸潮下带浅水区底栖生物的常见物种^[1-2],科学家从其内脏中分离出了螠速激肽 I-VIII、血凝素、腺苷酸酶等蛋白活性物质^[3-7]. Wang 等^[8]在 2006 年第一次从单环刺螠体腔液和内脏混合物中分离纯化出了一种纤溶酶组分. 中国海洋大学生物活性物质实验室相继从单环刺螠中分离出一系列纤溶酶组分,并进行了其活性、药效学等的研究,证实 UFE 具有良好的溶栓活性及生物安全性^[9]. 现有关于单环刺螠纤溶酶(UFE)的基础研究及药效学的研究比较凌乱,缺乏系统性. Vrijmoed 等^[10]曾报道季节动态变化会影响海洋真菌中胞外漆酶的活性,而关于 UFE 受季节变化的影响尚无报道. 在一年 4 季的季节更迭之中,春生、夏长、秋收、冬藏的交替是一个连续的循环变更过程,在这一过程中,机体的生命活动随着季节的节律性变化也会发生复杂的内源性变化. 本文选择春分、夏至、秋分作为 3 个季节的典范^[11],通过多指标综合分析环境变化影响下单环刺螠体内纤溶酶的积累规律.

1 实验部分

1.1 实验材料

1) 实验动物. 单环刺螠(螠虫动物门、螠纲、无管螠目、刺螠科、刺螠属,山东青岛黄岛海域)540 只,清洁级,体质量(40±10) g;新西兰白兔 10 只,清洁级,体质量(2±0.5) kg(福建省厦门大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(闽)2013-0007);昆明小鼠,无特定病原体(SPF)级,6~8 周龄,体质量(20±2) g,雌雄各半(福建省厦门大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(闽)2013-0006);SD 大鼠,SPF 级,体质量(200±20) g,雌雄各半(福建省厦门大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(闽)2013-0006).

2) 试剂. Q-Sepharose Fast Flow, Sephadex G-75, Sephadex G-50(上海源叶生物);牛纤维蛋白原、牛凝血酶(高活力,大于 33.34 tzkat·mg⁻¹)(美国 Sigma 公司);尿激酶(833.5 μkat·mg⁻¹,上海碧云天生物试剂);N,N'-甲叉双丙烯酰胺(北京克拉玛依试剂厂);琼脂糖,分析纯(德国 Serva 公司);超低相对分子质量标准蛋白(3.4~100.0 ku,北京普朗塞生物科技公司);其他试剂均为国产分析纯.

3) 仪器. Rayto 2100c 型酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);Cvoay MiniP4 型电泳仪(北京六一仪器厂);Akta 自动液相分析仪(上海通用电器医疗集团).

1.2 UFE 季节累计规律

1.2.1 单环刺螠分组及干预方法 分别选择春分、夏至、秋分前后 3 天采收样品,各季节购买的单环刺螠的采购日期分别为 20170319 批、20170320 批、20170321 批;20170620 批、20170621 批、20170622 批;20170922 批,20170923 批、20170924 批,每批分 6 组,每组 10 只. 购买的单环刺螠分别在当时环境下海水养殖 24 h,于次日中午 12 点获取体腔液,-80℃冻存 24 h 后使用.

1.2.2 UFE 的提取纯化 分别取不同批次单环刺螠体腔液于 4℃条件融化,3 900 r·min⁻¹离心 60 min,收集上清液,通过质量分数为 90%,50%的两个硫酸铵溶液进行透析除盐实验. 上清经 0.45 μm 微孔滤膜处理后,上样 Sephadex G-75 凝胶柱以双蒸水洗脱,收集凝胶柱最上层的淡黄色条带组分,-80℃冷冻干燥,获得粗酶制品. 将冻干产物用 0.02 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液溶解后,上样 Q-Sepharose 离子交换柱以 0.3 mol·L⁻¹ NaCl 及 0.02 mol·L⁻¹ Tris-HCl 的缓冲液梯度洗脱,流速控制为 1 mL·min⁻¹,分部收集洗脱液,装入 3500D 型透析袋,以双蒸水为外相去离子后,冷冻干燥. 冻干产物用双蒸水溶解后,2%的柱体积上样 Sephadex G-50 凝胶柱以双蒸水洗脱,流速控制同上,收集流出组分. 采用二喹啉甲酸(BCA)法进行穿透组分光密度(D)值的测定,冷冻干燥得纯化酶制品.

1.2.3 UFE 活力的测定 参考文献[8]方法,以酪蛋白为底物,采用 Folin-酚试剂法测定酶活力.酶活力单位定义为:在 37℃,pH=7.8 条件下,每分钟水解出相当于 1 μg 酪氨酸的酶量(1 个酶活力单位).标准曲线公式: $Y=102.65 X-0.214 3$, $R^2=0.999 8$.酶比活力是在特定条件下,单位质量蛋白质所具有的酶活力单位数.比活力为每毫克蛋白质所具有的酶活力单位数,一般用 $\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白质表示.

1.2.4 UFE 组分相对分子质量的测定 依照参考文献[6],采用 SDS-PAGE(质量分数为 5% 浓缩胶,质量分数为 12% 分离胶)凝胶,以低相对分子质量标准蛋白(3.4~100.0 ku)为标准,测定纯化组分的相对分子质量.

1.3 UFE 初步药效学验证实验

1.3.1 体外药效学实验 实验设置质量分数为 0.9% 生理盐水为阴性对照组,尿激酶为阳性对照组,UFE 为实验组,质量浓度设置分别为 0.700,0.350,0.175 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.取灭菌试管 15 支分别加入酶液 1.0 mL,新西兰兔肌注异氟烷,待完全麻醉后心脏取血,新鲜血液立即以每支 1.0 mL 加入灭菌试管,震荡混匀后 37℃ 恒温水浴中静置 3 h,每组设置 3 个平行组.3 h 后将栓块取出,用质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液洗净,滤纸吸去多余水分,观察拍照,各自称量.

1.3.2 体外溶栓实验 实验设质量分数为 0.9% 生理盐水为阴性对照组,尿激酶为阳性对照组,UFE 为实验组,质量浓度设置分别为 0.700,0.070 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.新西兰兔耳缘静脉取血,新鲜血液立即以每支 1.0 mL 加入灭菌试管,静置 2 h 至血液凝固,各管对应加入待测溶液 1.0 mL.于 37℃ 恒温振摇,观察各试管栓块的大小、颜色变化,每组设置 3 个组.18 h 后将栓块取出,用质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液洗净,滤纸吸去多余水分,观察拍照,各自称量.

1.3.3 体内药效学实验抗凝实验 将小鼠以 8 只为一组随机分为 5 组.以小鼠体液约 1.5 mL 计算 UFE 剂量,用质量分数为 0.9% 注射用生理盐水将 UFE 冻干粉配制成为高剂量组(5.250 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中剂量组(2.625 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、低剂量组(1.313 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).向小鼠尾静脉注入实验组溶液(以每 10 g 体质量注入 0.1 mL 溶液),给药 20 min 后,摘小鼠眼球.凝血时间以用玻片法测定,无间断取血滴于载玻片,用干燥毛细管拨动玻片上的血滴,记录出现血凝丝时的时间.

1.3.4 大鼠脑中动脉栓塞模型实验 取 SD 大鼠 24 只,随机分成 4 组(生理盐水组、10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 尿激酶给药组、10 和 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ UFE 给药组),腹腔注射 10% 水合氯醛(液料比为 0.4 mL : 100 g)麻醉大鼠后,分离右侧颈外动脉,以肝素生理盐水溶液 833.5 mkat 浸湿一根 6 cm 的 4 号手术线后,插入其中.90 min 后,拔出栓线,从大鼠尾静脉分别注射各受试溶液.24 h 后,对大鼠神经功能缺失体征评分.评分后麻醉大鼠,取脑,做 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色.

1.3.5 溶血与凝聚实验 取健康白兔血液,加入 10 倍质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液,1 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15min,除去上清液.用质量分数为 0.9% NaCl 溶液洗涤沉淀的红细胞清洗至上清液澄清透明.将洗涤后的红细胞用质量分数为 0.9% NaCl 溶液配制成为质量分数为 2% 的混悬溶液;将 UFE 用质量分数为 0.9% NaCl 溶液制成 0.1,0.5,1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的酶溶液.取洁净玻璃试管 12 支,编号 1,1' 号为 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品管,2,2' 号为 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品管,3,3' 号为 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品管,4,4' 号为阴性对照管,5,5' 号为阳性对照管,6,6' 号为供试品对照管.其中 1,2,3,4,5,6 号为 a 组,其余为 b 组.实验试剂配置表,如表 1 所示.混匀后,在(37±0.5)℃ 的恒温箱中温育 3 h,观察有无溶血现象.

1.4 统计学分析

采用单因素方差分析,使用 SPSS 软件对数据进行统计学处理,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 LSD 法作两两对比,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 实验结果与分析

2.1 UFE 季节累积考察结果

2.1.1 UFE 纯化结果 取每个季节的 3 批样品数据平均值,其中,春、夏、秋季批分别标记为第 1,2,3 批,所得体内蛋白及纤溶酶活性结果,如表 2 所示($n=6$).由表 2 可知:在样品预处理条件相同的情况

表 1 实验试剂配置表

Tab. 1 Experimental reagent configuration table

配液	试管号					
	1,1'	2,2'	3,3'	4,4'	5,5'	6,6'
V(红细胞悬液)/mL	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0
V(NaCl)/mL	2.2	2.2	2.2	2.5	0	4.7
V(纯化水)/mL	0	0	0	0	2.5	0
V(供试品溶液)/mL	0.3	0.3	0.3	0	0	0.3

下,对比不同季节批次样品,第 3 批 UFE 的比活力、回收率,以及纯化倍数差异均具有统计学意义($P<0.01$),其中,第 3 批活性最高,第 1 批最低;在由春分到秋分的季节变化中,UFE 活性呈升高趋势.表 2 中:* 表示 $P<0.05$; * * 表示 $P<0.01$.

表 2 不同季节单环刺蝥活性对比结果

Tab. 2 Results of fibrinolytic enzyme activity in different seasons

批次	$m(\text{总蛋白})/\text{mg}$	总活力/ $\text{nkatal} \cdot \text{mL}^{-1}$	比活力/ $\text{nkatal} \cdot \text{mg}^{-1}$	回收率/%	纯化倍数
1	15.2 ± 1.0	1 369.21	90.07	11.5 ± 0.9	10.6 ± 1.9
2	15.4 ± 0.4	1 777.82	115.32	13.2 ± 0.3	14.5 ± 1.9
3	13.0 ± 0.6	2 529.67	194.57^{**}	$16.9 \pm 0.5^{*}$	$17.9 \pm 2.9^{*}$

2.1.2 SDS-PAGE 分子量测试结果 BCA 法测定第 20170923 批目标产物 D 值的结果,如图 1 所示.由图 1 可知:峰为单一洗脱峰.洗脱峰冻干产物 SDS-PAGE 电泳条带,如图 2 所示.由图 2 可知:组分相对分子质量在 11 ku 左右;参考文献[6],文中方法分离纯化所得目标蛋白为单环刺蝥纤溶酶系列同工酶中的 UFE IV.

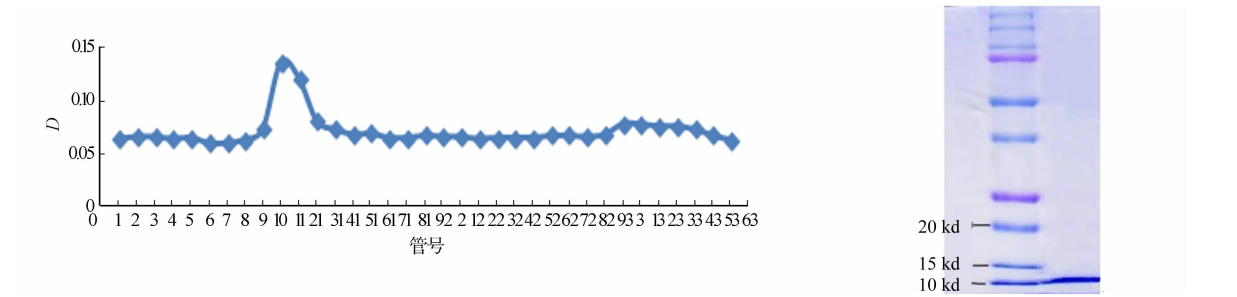


图 1 第 20170923 批目标产物 Sephadex G-50 分子筛层析图谱

Fig. 1 Sephadex G-50 molecular sieve chromatography of target product 20170923

图 2 第 220170923 批目标产物电泳结果图

Fig. 2 Electrophoresis results of target product 220170923

2.2 体内外抗凝及溶栓实验结果

2.2.1 体外抗凝与溶栓效果 3 h 后抗凝实验血栓称量结果,如图 3 所示.图 3 中:a 为尿激酶组;b 为单环刺蝥纤溶酶组;c 为生理盐水组.由图 3 可知:不同质量浓度下 UFE 给药组较阴性对照组抗凝效果的差异均具有统计学意义($P<0.01$);与阳性对照组相比,UFE 抗凝效果差异不具有统计学意义($P>0.05$),质量浓度为 $0.700 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,UFE 抗凝效果低于尿激酶;在低质量浓度 $0.350 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 $0.175 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下,UFE 抗凝效果高于尿激酶.

溶栓 18 h 时称量血栓结果,如图 4 所示.由图 4 可知:在不同质量浓度下,UFE 给药组较阴性对照组溶栓效果差异具有统计学意义($P<0.01$);与阳性对照组相比,当 UFE 为 $0.070 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,溶栓效果差异不具统计学意义($P>0.05$);当质量浓度为 $0.700 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,溶栓效果略低于尿激酶.

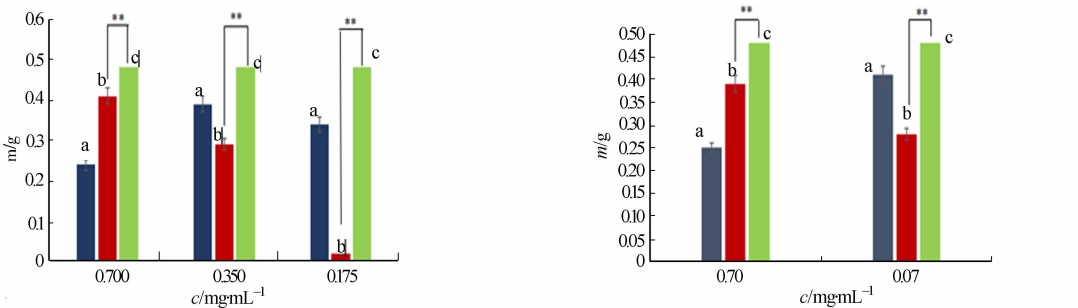


图 3 体外抗凝实验结果

Fig. 3 In vitro anticoagulation test results

图 4 体外溶栓结果

Fig. 4 In vitro thrombolysis experimental results

2.2.2 体内抗凝与溶栓效果 小鼠体内血液凝固时间,如图 5 所示.图 5 中:UK 为尿激酶.由图 5 可知:UK 高剂量组与生理盐水组存在差异,具有统计学意义($P<0.01$);高剂量的 UFE 可明显延长凝血时间.大鼠脑中动脉栓塞模型实验结果,如图 6,7 所示.由图 6,7 可知:与生理盐水组和尿激酶组相比,UFE 高剂量组对大鼠脑中动脉栓塞症状缓解作用差异具有统计学意义($P<0.01$),且高剂量组与低剂

量组存在较好的量效关系。

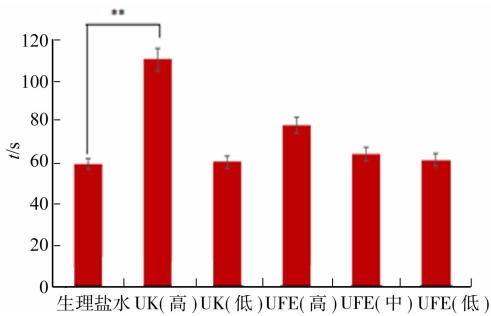


图 5 小鼠体内
抗凝实验结果

Fig. 5 Anticoagulation test
results in mice

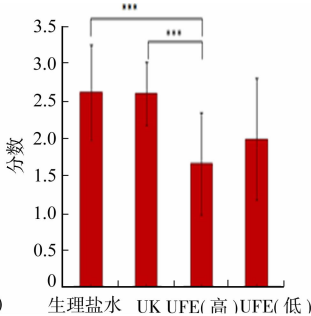


图 6 UFE 对大鼠
神经功能的影响

Fig. 6 Effect of UFE on
neurological function in rats

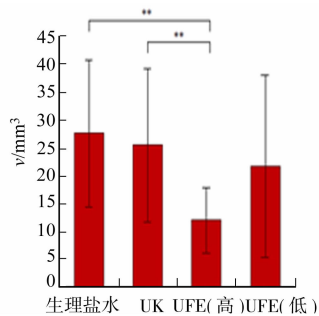
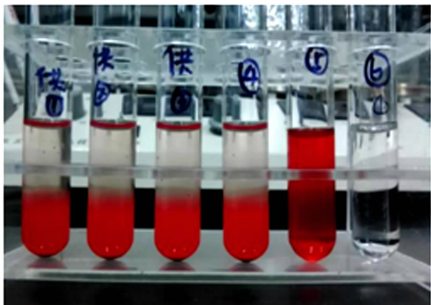


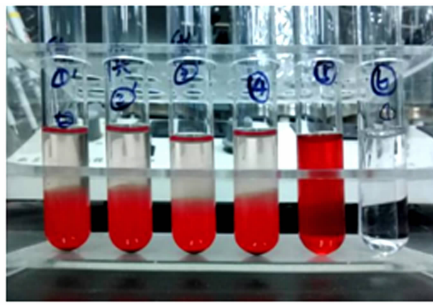
图 7 UFE 对大鼠
脑梗死体积的影响

Fig. 7 Effect of UFE on
infarct volume in rats

2.2.3 溶血实验结果 3 h 后溶血实验结果,如图 8 所示.由图 8 可知:两组供试品管与阴性对照管中,红细胞下沉,上清液无色澄明,轻轻晃动供试品管与阴性对照管,红细胞分散,重新形成混悬液,说明无红细胞凝聚发生;阴性对照管中无溶血和凝聚发生,阳性对照中有溶血发生,两组供试品管在 3 h 内均不发生溶血和凝聚,判断为 UFE 溶血实验符合规定。



(a) 1,2,3,4,5,6 号试管



(b) 1',2',3',4',5',6'号试管

图 8 温育 3 h 后溶血实验结果

Fig. 8 Hemolysis results after 3 h incubation

3 讨论

抑制血栓形成一般有 3 条主要途径:1) 抑制凝血因子发挥作用;2) 抑制血小板的聚集、粘附、释放功能;3) 促进纤溶系统对不溶性或难溶性纤维蛋白原或纤维蛋白的失活或降解.体内外试验证明单环刺螈纤溶酶具有纤维蛋白溶解活性,可直接降解纤维蛋白和纤维蛋白原,还能明显延长血液凝固时间,产生抗凝血作用^[12-13],而 UFE 对血小板的功能是否有影响目前尚不清楚,有待于进一步探讨。

目前临床上使用的溶栓药物主要是链激酶、尿激酶、组织型纤溶酶原激活物等.它们的药效机制是将无活性的纤溶酶原激活为纤溶酶,继而水解血栓中的纤维蛋白而发挥其溶栓作用^[14-15],溶栓途径单一,作用间接且见效慢. UFE 与其他纤溶酶不同,它通过多种分子途径发挥作用,且不存在无活性的酶原形式,不活化纤维蛋白原,且对凝血因子无水解作用。

目前,国内外对于单环刺螈的研究主要集中在对体内生物肽的分析及蛋白重组的研究等方面,而关于季节变化对 UFE 等蛋白酶的影响未见报道.实验通过对 3 个季节间提取的总蛋白和 UFE 的各指标进行差异性分析,得到不同季节实验数据.秋分组最高,春分组最低,且秋分组较其他组均升高,揭示单环刺螈内脏的功能活动与季节变化之间存在着密切的内在联系,故推测造成这一结果的原因可能与激素水平调节^[16]有关.近来大量动物实验证明,季节变化能影响大鼠肺脏组织中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素和 IFN- γ 等细胞因子的活性,改变机体的正常平衡状态。

基于以上研究报道,后续将继续探究凝血因子、白细胞介素等细胞因子的季节变化规律.由于条件

所限,研究仅对与季节变化引起的直观数据进行了统计分析,未考虑单环刺螠自身生长周期对 UFE 季节累积的影响.同时,在 UFE 提纯过程中,实验前期摸索出的 UFE 的分离纯化工艺在一定程度上优于现有工艺,但其缺点是无法对 UFE 同工酶进行区分,无法判断 UFE 同工酶间的季节累积规律是否相同,这些问题有待于更深入的研究.

参考文献:

- [1] 初金鑫,蔡文娣,韩宝芹,等.单环刺螠纤溶酶 UFE-1 的性质和溶栓活性[J].天然产物研究与开发,2010,22(4):661-664. DOI:10.3969/j.issn.1001-6880.2010.04.028.
- [2] TIAN Zhou,LI Bo,GUO Liwei, *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme, PSLTro01, from a medicinal animal *Porcellio scaber* Latreille[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2015,80:536-546. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.06.046.
- [3] 韩宝芹,杜芳,毕庆庆,等.单环刺螠纤溶酶Ⅲ基因克隆及原核表达[J].中国海洋大学学报,2014,44(3):44-49.
- [4] 孙雪燕,宋鸿旭,任宇豪,等.单环刺螠纤溶酶 ufeⅡ基因的原核表达及活性研究[J].中国科技论文,2016,11(24):2797-2815.
- [5] BARRON HV,RUNDLE A C,GORE J M,*et al.* Intracranial hemorrhage rates and effect of immediate beta-blocker use in patients with acute myocardial infarction treated with tissue plasminogen activator: Participants in the national registry of myocardial infarction[J]. Am J Cardiol,2000,85(3):294. DOI:10.1016/S0002-9149(99)00735-3.
- [6] 初金鑫,蔡文娣,韩宝芹,等.单环刺螠纤溶酶 UFE-Ⅱ的分离纯化及其酶学性质[J].中国生物制品学杂志,2010,23(7):34-37. DOI:10.13200/j.ijb.2010.07.53.chujx.003.
- [7] OURIEL K. Current status of thrombolysis for peripheral arterialoc clusive disease[J]. Annals of Vascular Surgery,2002,16(6):797-804.
- [8] WANG Dianliang,LIU Wanshun,HAN Baoqin,*et al.* Study on anticoagulant and thrombolytic effects of a novelmarine fibrinolytic enzyme *in vitro*[J]. Chin J Marine Drug,2006,25(4):37-42.
- [9] BI Qingqing,HAN Baoqin,FENG Yilin,*et al.* Antithrombotic effects of a newly purified fibrinolytic protease from *Urechis unicinctus*[J]. Thrombosis Research,2013,132(2):135-144. DOI:10.1016/j.thromres.2013.07.001.
- [10] VRIJMOED L,WU Yirui,LUO Zhuhua,*et al.* Purification and characterization of an extracellular laccase from the anthracene degrading fungus *Fusarium solani* MAS2[J]. Bioresource Technology,2014,101(24):9772-9777. DOI:10.1016/j.biortech.2010.07.091.
- [11] 闫翠环,王亚利,王鑫国,等.大鼠血浆代谢标记物季节变化的动态研究[J].中国中西医结合杂志,2017,37(10):1248-1253. DOI:10.7661/j.cjim.20170828.207.
- [12] LIU Xiaolong,ZHANG Zhifeng,MA Xiaoyu,*et al.* Sulfide exposure results in enhanced sqr transcription through upregulating the expression and activation of HSF1 in echiuran worm *Urechis unicinctus*[J]. Aquatic Toxicology,2016(170):229-239. DOI:10.1016/j.aquatox.2015.11.021.
- [13] GOLOMBEKA A,TOBERGTEA S,STRUCK T H. Elucidating the phylogenetic position of gnathostomulida and first mitochondrial genomes of gnathostomulida, gastrotricha and polycladida (platyhelminthes)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2015(86):49-63. DOI:10.1016/j.ympev.2015.02.013.
- [14] RYUA B M,KIM M J,HIMAYAC S W,*et al.* Statistical optimization of high temperature/pressure and ultra-wave assisted lysis of *Urechis unicinctus* for the isolation of active peptide which enhance the erectile function *in vitro* [J]. Process Biochemistry,2014,49(1):148-153. DOI:10.1016/j.procbio.2013.09.019.
- [15] ZHANG Zhifeng,ZHANG Litao,LIU Xiaolong,*et al.* Transcriptome characteristic of echiuran worm *urechis unicinctus* exposed to sulfide by digital gene expression analysis[J]. New Biotechnology,2014,31(2):204. DOI:10.1016/j.nbt.2014.05.974.
- [16] SHI Xiaoli,SHAO Mingyu,ZHANG Litao,*et al.* Screening of genes related to sulfide metabolism in *Urechis unicinctus* (Echiura, Urechidae) using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray analysis[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics,2012,7(3):244-259. DOI:10.1016/j.cbd.2012.04.001.