

研究报告

Research Report

FGF1a (fibroblast growth factor 1a)基因对镜鲤(Mirror carp)鳞被发育的影响

马龙^{1,2*} 蒋丽^{2*} 王阳阳^{2,3} 程安达^{2,4} 乔志刚¹ 李恒德^{2**}

1 河南师范大学水产学院, 新乡, 453007; 2 中国水产科学研究院生物技术研究中心, 北京, 100141; 3 大连海洋大学生命科学与技术学院, 大连, 116023; 4 上海海洋大学水产与生命学院, 上海, 201306

* 同等贡献作者

** 通讯作者, hengde.li@cafs.ac.cn

摘要 成纤维生长因子 *FGF1a* (fibroblast growth factor 1a) 是一类重要的生长因子, 在细胞的发育过程中起着重要的作用。用实验室镜鲤 EST 数据库设计包含该基因 CDS 全长的特异引物, 得到了 *FGF1a* 基因的全长 CDS。经过克隆测序发现, 镜鲤 *FGF1a* 基因全长的 CDS 包含 444 个碱基, 其编码一个含有 146 个氨基酸的蛋白质, 包含一个受体结合位点。与其它物种序列比对结果表明, 镜鲤 *FGF1a* 蛋白与斑马鱼相似度最高, 而与其亲缘关系较远的人类、老鼠、非洲爪蟾及鸡相似度较低。根据所获得的基因序列设计探针, 利用原位杂交技术发现 *FGF1a* 基因在鱼刚长鳞片的皮肤上表达较高, 说明该基因可能参与鳞被发育; 而同时在尾鳍、背鳍和腹鳍中也有特异的高表达信号, 说明 *FGF1a* 可能也参与鳍条的发育过程。

关键词 *FGF1a* 镜鲤, 鳞被, 原杂技术

Effect of *FGF1a* (fibroblast growth factor 1a) Gene on Mirror Carp Scale Development

Ma Long^{1,2*} Jiang Li^{2*} Wang Yangyang^{2,3} Cheng Anda^{2,4} Qiao Zhigang¹ Li Hengde^{2**}

1 College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang, 453007; 2 The Centre for Applied Aquatic Genomics, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing, 100141; 3 College of Aqua-life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian, 116023; 4 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306

* Equal contribution to the author

** Corresponding author, hengde.li@cafs.ac.cn

DOI: 10.13417/j.gab.033.000082

Abstract Fibroblast growth factor 1a (FGF1a), an important class of growth factor, plays an important role in the process of cell development. The full length CDS of *FGF1a* gene was obtained using the specific primers designed refer to the common carp *FGF1a* EST sequence in our genome dataset. The FGF1a protein of common carp comprised of 146 amino acids, along with a receptor binding site. After sequence alignments among several species, the *FGF1a* from common carp is found to share the highest similarity. However, the similarities among the common carp and the human, mouse, xenopus and chicken are lower. The FGF1a in common carp was found to express specifically in developing scale tissues by RNA *in situ* hybridization, while it was also observed in the tissues of tail and the dorsal or ventral fins. All of these results provide us with the vital roles of *FGF1a* gene in earlier development of scales and fins.

Keywords *FGF1a*, Mirror carp, Scale, *In situ* hybridization

成纤维细胞生长因子 FGF (fibroblast growth factors) 广泛分布于多细胞生物体内, 是一类小型分泌多肽生长因子, 其参与调控细胞增殖、分化、凋亡等过程 (Dorey and Amaya, 2010; Itoh and Ornitz, 2011)。FGF

在个体发育过程中及成体中广泛表达, 在体内和体外都具有生物学活性 (Powers et al., 2000), 体外合成的 FGF 对组织与器官发育、肿瘤细胞发生等方面也有重要作用 (Kwabi-Addo et al., 2004)。另外, FGF 对生

殖过程也有重要影响(Cotton et al., 2008)。FGF 启动下游基因的表达,是通过类酪氨酸激酶受体 FGF 以激活下游的信号通路,从而对调节生命活动(Celli et al., 1998; Bertrand et al., 2011)。此外,FGF 还可以与其它信号通路相互作用共同调节发育的不同过程(Emoto et al., 1997; Goldfarb, 2005; Itoh and Ornitz, 2008)。

目前,包括人类(*Homo sapiens*)及小鼠(*Mus musculus*)在内的哺乳动物的 *FGF1-FGF23* 基因已经被成功分离。研究发现,在人类与小鼠共有的 22 个家族成员中,各成员之间氨基酸相似性达到 13%~71% (Itoh and Ornitz, 2004)。最近几年在斑马鱼(*Danio rerio*)中发现了 1 个新的 *FGF* 基因,这使 *FGF* 家族成员增加至 *FGF24* (Draper et al., 2003)。斑马鱼中的 *FGF6*、*FGF10*、*FGF17* 以及 *FGF20* 据研究存在有旁系同源基因(Itoh and Konishi, 2007)。*FGF1a* 是 *FGF* 家族的成员之一,也称为酸性 *FGF* (*acidic FGF*, *aFGF*),它在刺激 DNA 合成、损伤修复、炎症反应等过程中起到重要作用(Bjomsson et al., 1991; Fitzpatrick et al., 1992; Pomtaveetus et al., 2011)。

鲤鱼是世界上分布最为广泛的养殖鱼类,其拥有数量众多的亚种。鲤鱼也是唯一一类有各种天然品种的淡水鱼类。利用这些独特的鲤鱼品种,养殖人员进行过广泛的种间及属间杂交选育,因此池塘养殖的鲤鱼渐成规模,逐渐形成以欧洲、亚洲(主要是中国和印度)为主的养殖区域,因而鲤鱼成为驯化最多、养殖历史最长的鱼类。

在鲤鱼的养殖过程中,鳞片的特征相对比较容易被发现,其中镜鲤只有少许较大的鳞片,而且经常会有部分的皮肤裸露。鳞被的形成是一个复杂的生物学过程,有可能需要多种基因参与,比较不同鳞被模式鲤鱼转录组发现 *FGF1a* 是其中一个差异表达基因,因而选取这个基因来进行下一步的分析,来研究它在鲤鱼的发育过程中是否有影响。研究的重点是在其鳞被发育时期的表达。

1 结果与分析

1.1 *FGF1a* 基因全长 CDS 克隆和序列分析

用 NCBI 中的 ORF Finder 软件预测通过测序得到的 mRNA 序列的开放阅读框,确定其起始及终止密码子的位点,从而得到 CDS 全长序列。得到其 CDS 全长为 444 个碱基。利用 DNASTAR 软件将 CDS 序列翻译成氨基酸序列,得出该基因翻译 146 个

氨基酸。从 GenBank 中搜索到原鸡(*Gallus gallus*; NM_205180.1)、人类(*Homo sapiens*; HF584295.1)、小家鼠(*Mus musculus*; NM_010197.3)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*; FJ428265.1)及斑马鱼(*Danio rerio*; AB194698.1)中该基因序列,利用 DNAMAN 软件与鲤鱼(*Cyprinus carpio*)进行比对。根据鲤鱼和人类、小家鼠、非洲爪蟾及斑马鱼中的 *FGF1a* 基因比对结果显示,鲤鱼与斑马鱼的相似度最高,达到 85.03%,而与其亲缘较远的则相似度比较低,与鸡的相似度则为 45.22%,与人为 49.68%,与鼠为 49.68%,与非洲爪蟾为 44.59%。同时发现在该基因中存在蛋白结合位点(图 1; 其中蛋白受体结合位点为红色框)。

由进化树(图 2)可以看出,鲤鱼(*Cyprinus carpio*)与斑马鱼(*Danio rerio*)之间的同源性为 100%。小家鼠(*Mus musculus*)与褐家鼠(*Rattus norvegicus*)的同源性也非常之高,达到 99%。而人类(*Homo sapiens*)与猕猴(*Macaca mulatta*)的同源性则较低,为 68%,但相对于其它物种二者仍有更近的亲缘关系,所以分为同一支。而牛(*Bos taurus*)与鸡(*Gallus gallus*)之间虽然

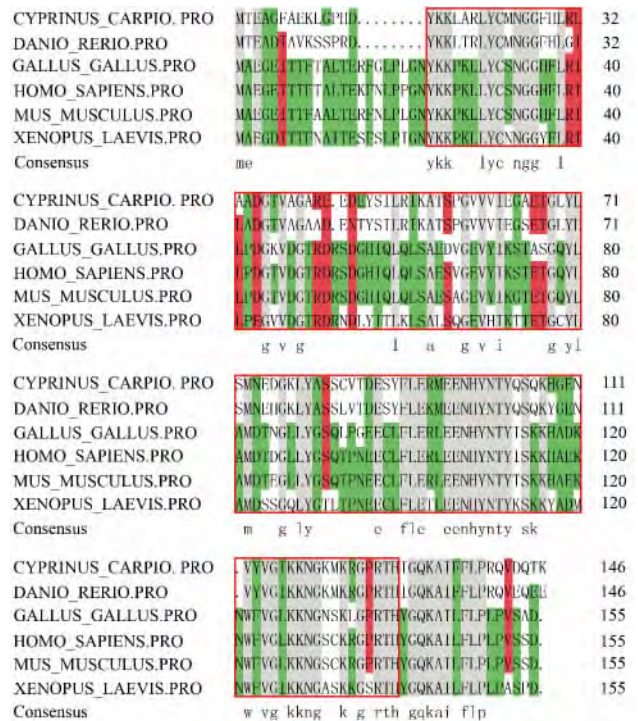


图 1 多种物种该基因进行多重序列比对

注:红色框内是受体结合位点(receptor binding site);灰色区域表示一致性达到 100%;红色区域表示一致性大于 75%;绿色区域表示一致性大于 50%

Figure 1 Multiple sequence alignment among several varieties
Note: The receptor binding site is in red bracket; The grey region means 100% of identity; The red and green regions mean over 75% and 50% the identities, respectively

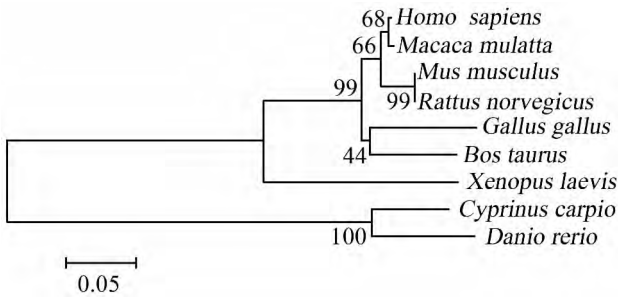


图2 鲤鱼中调取的 *FGFIa* 基因的氨基酸序列和其它物种该基因序列构建进化树

Figure 2 Hylogenetic analysis of carp *FGFIa* with other varieties

亲缘关系较远,只有 44%,但是与其它物种比二者更为相近,所以分为一支。非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)则由于与所有的物种亲缘关系都较远,所以单独分为一支。

1.2 *FGFIa* 的表达

选取两个月大的镜鲤对各个组织进行 RT-PCR 分析表明 *FGFIa* 基因在肾脏、腮、肌肉、肝脏和皮肤中均有表达(图 3),而且在肌肉及皮肤处可能会有不同亚型,但是本文只对最大的进行分析。其中在皮肤中的表达尤为明显,而在心脏及肾脏中的表达则很弱。并且在肌肉和皮肤中还有另一条不同大小但是亮度稍差的条带,但是这里只分析上面的与其它组织大小相同的条带。

利用整体原位杂交技术,检测该基因在皮肤中的表达。结果显示 *FGFIa* 基因在即将生成鳞片的皮肤处表达(图 4B; 图 4C; 图 4D),说明 *FGFIa* 基因在鳞的生成过程中有一定影响。*FGFIa* 基因在镜鲤生成鳞片的皮肤处表达较强,其在皮肤其它部位的表达较弱甚至不表达,结果表明 *FGFIa* 基因参与鳞片的发生及维持。同时其在腹鳍、背鳍和尾鳍中也有特异的高表达信号(图 4A; 图 4B; 图 4C; 图 4D),说

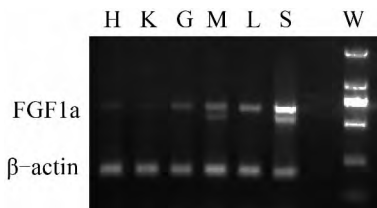


图3 *FGFIa* 基因在镜鲤不同组织中的表达

注: H: 心脏; K: 肾; G: 鳃; M: 肌肉; L: 肝; S: 皮肤; W: 对照(水)

Figure 3 Expression of *FGFIa* gene in different tissues of mirror carp

Note: H: Heart; K: Kidney; G: Gill; M: Muscle; L: Liver; S: Skin; W: Control (water)

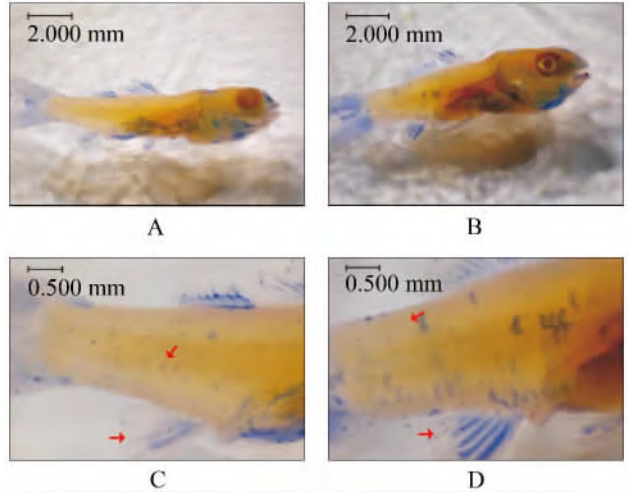


图4 原位杂交检测 *FGFIa* 基因在鲤鱼皮肤中的表达

注: A, B: *FGFIa* 基因在建鲤中的表达,其中 B 是对 A 中尾部阳性信号的扩大; C, D: *FGFIa* 基因在镜鲤中的表达,其中 D 是对 C 鳞片阳性信号的扩大; 阳性信号分别用红色箭头标注

Figure 4 Expression of *FGFIa* gene in skin of common carp by in situ hybridization

Note: A, B: Expression of *FGFIa* gene in Jian carp, where B is the expansion of the tail positive signals in A; C, D: Expression of *FGFIa* gene in mirror carp, where D is the expansion of the tail positive signals in C; The red arrows are the scale sites

明 *FGFIa* 可能也参与鳍条的发育过程。

2 讨论

从皮肤中调取 *FGFIa* 基因,通过克隆测序得出其全长 CDS,通过应用生物软件 DNAMAN 对镜鲤和斑马鱼该基因编码蛋白全长做简单的生物信息学分析,可以看出两者有很高的相似性,两者之间的相似性高达 85.03%,可以看出两者之间属于同一基因家族,但是由于不同物种,所以还是有部分差异的。而通过更多不同物种之间 CDS 的比较,相似性高达 79.82%,说明这条基因还是相对保守的。

在镜鲤的 *FGFIa* 基因编码的氨基酸序列中发现了受体结合位点,说明该蛋白应是和相依的受体相结合后才发挥其生物学功能的。据研究在细胞表面的肝素类蛋白多糖先与 *FGFIa* 分子结合,使得后者处在与 FGF 受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)相作用的活性状态,使得 *FGFIa* 激活酪氨酸激酶受体。之后在 FGFR 始动信号的传递过程中,先发生受体的二聚化与自身的磷酸化反应,而 FGFR 寡聚化是受体激活的前提(Shi et al., 1993)。而在细胞表面受体识别 *FGFIa* 时,细胞中的 Ca^{2+} 的水平也

明显提高,甚至会出现环乙酰胺(Mohammadi et al., 1992)。

得到 *FGF1a* 基因全长之后,为了验证该基因在不同组织中表达的差异性,所以取了同一条鱼的不同组织(心,肝,肾,鳃,皮肤及肌肉)来做 RT-PCR,最终得到的结果显示该基因在皮肤中的表达量最高,而在心脏及肾脏中则较弱,因此可以预测该基因与鱼类皮肤的附属物——鳞被的发育有着一定的关系。而从 RT-PCR 的图中可以看到在皮肤及肌肉中还具有另一条不同大小的条带,可推测该基因具有不同的亚型。

原位杂交结果显示 *FGF1a* 基因表达较高的部位是将要产生鳞片的皮肤处,而在其它部位则是很弱的表达或者几乎不表达,说明 *FGF1a* 基因在鳞的形成过程中产生了一定的作用;其次,发现在皮肤中 *FGF1a* 基因的表达有强弱之分。在刚产生鳞片的部位 *FGF1a* 基因的表达明显高于还未生长鳞片的部位,所以可以证明该基因是对鳞片的产生有影响,而对鳞片发育完成之后的维持没有作用。另外,发现 *FGF1a* 基因在鲤鱼的鳍条硬骨部分也有比较明显的信号,可推测该基因在维持骨骼的方面也有一定的作用。

3 材料与方法

3.1 材料

提取 RNA 的镜鲤样品(50 天龄)和用于做原位杂交的幼鱼(50 天龄)分别取自无锡市淡水研究中心和中国水产科学研究院松浦实验基地。使用 Trizol 法提取新鲜的镜鲤皮肤组织的 RNA (林玲等, 2009), 试剂为 Trizol Reagent (Invitrogen)。反转录试剂盒用的是 First Stand cDNA Synthesis Kit (ToYoBo)。

3.2 方法

3.2.1 *FGF1a* 基因的调取

根据 NCBI 中斑马鱼该基因的序列从中国水产

科学研究院自有基因库中调取 *FGF1a* 基因片段,选取相似度在 70% 以上的序列并截取出来,使用 DNASTAR 软件拼接得到 contig。

3.2.2 *FGF1a* 基因 CDS 全长的克隆

取 100 mg 鳞片下的皮肤组织,用 Trizol 法提取 RNA 将 RNA 的浓度调节为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 使用琼脂糖凝胶电泳的方法检测所提 RNA 的完整性。利用试剂盒(东洋纺)将 RNA 反转录为第一链 cDNA。

根据之前拼接得到的 contig 设计两对包含目的片段 CDS 部分的上下游引物,见表 1。

进行 PCR 扩增的模板为通过反转录所得到的镜鲤的第一链 cDNA。反应体系: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

PCR 产物通过凝胶电泳后用试剂盒(TIANGEN, DNA 纯化回收试剂盒)回收目的片段,并连接到 PMG-19 中,然后转化 trans10 感受态细胞,对重组质粒进行鉴定后测序(诺赛公司)。把两段测序结果利用 DNASTar 工具拼接得到 *FGF1a* 基因 CDS 区域。

利用 RT-PCR 在鲤鱼各组织(心,肝,肾,鳃,皮肤和肌肉)中进行扩增,以检测在各组织中的表达。

3.2.3 生物信息分析

通过 NCBI 预测测序得到的 mRNA 序列的开放阅读框,得到其起始及终止密码子位点,确定其 CDS 全长序列。从 NCBI 网站下载的不同分类地位的其它物种 *FGF1a* 基因的氨基酸序列与测序得到的 *FGF1a* 氨基酸序列一起利用 DNAMAN 和 DNASTAR 进行分析。

3.2.4 通过原位杂交技术检测 *FGF1a* 基因在镜鲤皮肤中的表达

3.2.4.1 制备反义 RNA 探针

反义探针的制备参照 Li 等(1998)的实验方法。

(1) PCR 引物设计: 根据得到的镜鲤的基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 扩增引物设计前要将整条基因的 CDS 序列在 NCBI 上进行 Blast,找出 CDS 全长的特异区域,利用特异区域进

表 1 实验中所用引物

Table 1 Primers used in all experiments

名称 Name	序列 Sequence	Tm 值 Tm value	GC %
PF1.Forward 5'-3'	CGCAGCTTCAGCATTATCAC	57.80	50.0
PR1.Reverse 5'-3'	CCACCTGTCGAGGGAGAAAG	61.90	60.0
PF2.Forward 5'-3'	GCTTCAGCATTATCACCCGT	57.80	50.0
PR2.Reverse 5'-3'	GAGGGAGAAAGAAGATCGCC	59.85	55.0

行设计,长度 300~800 bp 左右即可。

(2)提取总 RNA,并进行电泳鉴定。30 枚去膜镜鲤胚胎,用 TRIZOL 法提取总 RNA。

(3)反转 cDNA 并进行 PCR 进行目的片段扩增。

(4)将目的片段克隆入 PEZ-T 载体并进行转化涂板培养。

(5)抽提质粒,电泳定性定量。

(6)根据测序方向,进行单酶切,纯化,进行双酶切,电泳鉴定。

(7)探针合成及纯化:根据 6 中的方向,用限制性内切酶,线性化质粒(10 μ g)。以线性质粒为模版,于体外合成地高辛标记 RNA 探针。将纯化后的 RNA probe 稀释到 HBY⁺中,用于整体原位杂交。

3.2.4.2 原位杂交所用鱼的饲养和前期处理

孵化取自松浦实验基地的人工授精的镜鲤和建鲤卵,使用草履虫作为开口饵料,然后逐步使用卤虫无节幼体和鲤鱼颗粒饲料饲养镜鲤幼鱼,直到 50 d 左右,即刚开始产生鳞片。各取几条刚长鳞片的镜鲤及建鲤幼鱼,放置于冰上致死,然后固定于 4%的多聚甲醛中,4 $^{\circ}$ C 过夜,第二天过渡到无水甲醇中脱水,存放在 -20 $^{\circ}$ C 过夜。

3.2.4.3 整体原位杂交的操作步骤

原位杂交技术参照 Li 等(1998)叙述的方法。

第一天,将幼鱼从甲醇中过渡到 PBST (NaCl, KCl, NaH₂PO₄, K₂HPO₄, DEPC 水,以及千分之一的 tween)溶液中,然后置换为 HYB⁻溶液, HYB⁺溶液预杂交。最后置换成加入探针的 HYB⁺溶液,60 $^{\circ}$ C 杂交过夜。

第二天,回收探针,将回收的探针放在 -20 $^{\circ}$ C 保存。然后依次置换为 50%甲酰胺 /2 X SSCT, 2 X SSCT, 0.2 X SSCT (standard saline citrate tween), MABT, 封闭液 1 h 后按 1:3 000 比例在封闭液加入抗地高辛抗体(含耦联碱性磷酸酶) (anti-digoxigenin-AP fab fragments), 放置于 4 $^{\circ}$ C 过夜。

第三天,用 MABT 清洗 3 次,每次 1 h。使用染色缓冲液(staining buffer)平衡 2 次,每次 5 min。加入含 5 mmol/L 左旋咪唑的显色液 BM Purple AP Substrate, 放置于避光处室温显色。每隔 1 h 查看一次显色情况。当显色完全后,用 PBST 洗 3 次,每次 5 min,最后置换为 90%的甘油进行拍照,4 $^{\circ}$ C 保存。

作者贡献

蒋丽参与实验指导以及提供实验条件;马龙负责实验设计调整、具体实施,以及论文撰写;乔志

刚为实验设计指导;程安达负责克隆序列审核;王阳阳负责实验数据辅助分析;李恒德负责实验指导与论文排版。

致谢

本研究所用实验材料受到无锡淡水研究中心俞菊华研究员、黑龙江水产研究所张晓锋和曹顶臣副研究员的帮助,原位杂交实验技术受到中科院动物所王强研究员的帮助,在此一并表示感谢。

参考文献

- Bertrand S., Camasses A., Somorjai I., Belgacem M.R., Chabrol O., Escande M.L., Pontarotti P., and Escriva H., 2011, Amphioxus FGF signaling predicts the acquisition of vertebrate morphological traits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(22): 9160-9165
- Bjomsson T.D., Dryjski M., Tluczek J., Mennie R., Ronan J., Mellin T.N., and Thomas K.A., 1991, Acidic fibroblast growth factor promotes vascular repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(19): 8651-8655
- Celli G., LaRochelle W.J., Mackem S., Sharp R., and Merlino G., 1998, Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multiorgan induction and patterning, *EMBO J.*, 17(6): 1642-1655
- Cotton L.M., O'Bryan M.K., and Hinton B.T., 2008, Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction, *Endocrine Reviews*, 29(2): 193-216
- Dorey K., and Amaya E., 2010, FGF signalling: Diverse roles during early vertebrate embryogenesis, *Development*, 137(22): 3731-3742
- Draper B.W., Stock D.W., and Kimmel C.B., 2003, Zebrafish fgf24 functions with fgf8 to promote posterior mesodermal development, *Development*, 130(19): 4639-4654
- Emoto H., Tagashira S., Mattei M.G., Yamasaki M., Hashimoto G., Katsumata T., Negoro T., Nakatsuka M., Bimbaum D., Coulier F., and Itoh N., 1997, Structure and expression of human fibroblast growth factor-10, *J. Biol. Chem.*, 272(37): 23191-23194
- Fitzpatrick L.R., Jakubowska A., Martin G.E., Davis M., Jaye M. C., and Dionne C.A., 1992, Acidic fibroblast growth factor accelerates the healing of acetic-acid-induced gastric ulcers in rats, *Digestion*, 53(1-2): 17-27
- Goldfarb M., 2005, Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(2): 215-220

-
- Itoh N., and Konishi M., 2007, The zebrafish fgf family, *Zebrafish*, 4(3): 179-186
- Itoh N., and Ornitz D.M., 2004, Evolution of the *Fgf* and *Fgfr* gene families, *Trends in Genetics: TIG*, 20(11): 563-569
- Itoh N., and Ornitz D.M., 2008, Functional evolutionary history of the mouse *Fgf* gene family, *Dev. Dyn.*, 237(1): 18-27
- Itoh N., and Ornitz D.M., 2011, Fibroblast growth factors: From molecular evolution to roles in development, metabolism and disease, *J. Biochem.*, 149(2): 121-130
- Kwabi-Addo B., Ozen M., and Ittmann M., 2004, The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer, *Endocrine-Related Cancer*, 11(4): 709-724
- Li S.H., Guo S.D., and Sun F., 1998, Expression pattern of a $\beta 2$ tubulin gene in zebrafish embryos identified by whole mount *in situ* hybridization, *Chinese Science Bulletin*, 22: 1894-1898
- Lin L., Yang Y.L., He H.F., and Wang S.H., 2009, Comparison and analysis in RNA extracting, *Wuyi Kexue (Wuyi Science Journal)*, 25: 97-100 (林玲, 杨燕凌, 何海福, 汪世华, 2009, 总 RNA 提取方法的比较与分析, *武夷科学*, 25: 97-100)
- Mohammadi M., Dionne C.A., Li W., Li N., Spivak T., Honegger A.M., Jaye M., and Schlessinger J., 1992, Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis, *Nature*, 358(6388): 681-684
- Pomtaveetus T., Otsuka-Tanaka Y., Basson M.A., Moon A.M., Sharpe P.T., and Ohazama A., 2011, Expression of fibroblast growth factors (Fgfs) in murine tooth development, *J. Anat.*, 218(5): 534-543
- Powers C.J., McLeskey S.W., and Wellstein A., 2000, Fibroblast growth factors, their receptors and signaling, *Endocr. Relat. Cancer*, 7(3): 165-197
- Shi E., Kan M., Xu J., Wang F., Hou J., and McKeehan W.L., 1993, Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerization of combinatorial splice variants, *Mol. Cell Biol.*, 13(7): 3907-3918