

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2016)04-0544-05

具有抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体的制备与鉴定

陈尧¹, 王兴华^{1*}, 何永吉², 潘薇薇², 曹鹏程², 赵峰梅², 张全爱², 赵邑^{2*}¹山西大学生命科学学院, ²山西省生物研究所基因药物室, 山西 太原 030006

[摘要] 目的 制备并鉴定具有抗凝血活性的抗人组织因子(hTF)单克隆抗体(mAb)。方法 以截短型重组 hTF₂₄₃ 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 细胞融合后, 采用间接 ELISA 联合血浆凝血酶原时间(PT)测定方法, 筛选具有抗凝血活性的抗 hTF mAb 的杂交瘤细胞株, 并进行效价测定和特异性鉴定。结果 成功建立 1 株可稳定分泌具有抗凝血活性的抗 hTF mAb 的杂交瘤细胞株, 该 mAb 属于 IgG1 亚型。间接 ELISA 测定腹水效价为 1:200 000, Western blot、PT 测定结果表明, 该 mAb 可特异性结合重组 hTF₂₄₃, 同时与 SW620 结肠癌细胞表面天然 TF 作用, 显著延长血浆凝血酶原时间, 具有良好的抗凝血活性。结论 成功制备了具有抗凝血活性的抗 hTF mAb。

[关键词] 人组织因子; 单克隆抗体; 抗凝血活性; 杂交瘤技术

[中图分类号] R392.11, Q813.2, R973+.2 **[文献标志码]** A

DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.007736

Preparation and characterization of a monoclonal antibody against human tissue factor with anticoagulation activity

CHEN Yao¹, WANG Xinghua^{1*}, HE Yongji², PAN Weiwei², CAO Pengcheng², ZHAO Fengmei², ZHANG Quanai², ZHAO Yi^{2*}

¹School of Life Science, Shanxi University, ²Room for Genetic Pharmacy, Shanxi Institute of Biology, Taiyuan 030006, China

* Corresponding authors, E-mail: xhwang@sxu.edu.cn; zhaoyisws@163.com

[Abstract] **Objective** To prepare and characterize a monoclonal antibody (mAb) against human tissue factor (hTF) with anticoagulation activity. **Methods** BALB/c mice were immunized with truncated recombinant protein (rhTF₂₄₃). Hybridoma cell lines were generated from cell fusion, and screened using indirect ELISA and prothrombin time (PT). After ascites was developed in BALB/c mice, antibody titers were determined using indirect ELISA. Western blotting was performed to study the antibody specificity. Anticoagulant activity of the antibody was detected by PT assay. **Results** A mAb to hTF with excellent anticoagulation activity was identified. Its immunoglobulin subclass belonged to IgG1. Titer of ascites fluid was 1:200 000. Western blotting and PT analysis confirmed the specificity and anticoagulant activity of the antibody. The mAb reacted specifically to both recombinant hTF₂₄₃ and natural TF on SW620 colon cancer cell surface. **Conclusion** A hTF mAb with anticoagulation activity and high specificity has been successfully prepared.

[Key words] human tissue factor; monoclonal antibody; anticoagulation activity; hybridoma technique

人组织因子(human tissue factor, hTF), 又称凝血因子Ⅲ, 是由 263 个氨基酸残基组成的、相对分子质量(M_r)为 47 000 的单链跨膜糖蛋白, 在生理性止血过程中发挥着重要作用。TF 主要由可溶性的氨基端胞外区(aa. 1-219)、疏水性跨膜区(aa. 220-242)和羧基端胞内区(aa. 243-263)三个结构域组成^[1-2], 通过氨基端胞外区与凝血因子Ⅶa(factor Ⅶa, FⅦa)在细胞

表面形成 TF-FⅦa 复合物, 进一步触发凝血级联反应, 最终形成纤维蛋白凝块导致凝血^[3-4]。TF 不仅参与生理性止血过程, 在病理性血栓过程中也同样发挥着重要作用。

血栓性疾病是一类严重威胁人类健康的常见病, 其发病率高居各种疾病之首^[5]。相关抗凝和抗血栓药物的研究工作也已取得较大进展, 其治疗策

收稿日期: 2015-10-27; 接受日期: 2016-02-28

基金项目: 山西省科技攻关项目(20150313006-4, 20140311021-5)

作者简介: 陈尧(1989-), 女, 山西临汾人, 硕士研究生

Tel: 18135111190; E-mail: cyy273@163.com

* 通讯作者, 王兴华, E-mail: xhwang@sxu.edu.cn; 赵邑, E-mail: zhaoyisws@163.com

略主要是通过抑制凝血途径的各个凝血因子来实现抗凝、抗血栓作用^[6-7]。然而由于抗凝效果欠佳及特异性较差使得出血和再狭窄等风险依然存在^[8]。TF作为外源凝血途径的启动蛋白,可通过“瀑布式”的凝血级联反应导致凝血,因此成为病理性血栓抗凝抑制剂的主要靶点。单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)具有高效、低毒和靶向性强的特点,以TF为靶点的mAb研制是当前血栓抗凝抑制剂的主要研究方向。国内外虽已有TF mAb的相关研究报道,但多数抗体不具备抗凝活性,或者抗凝活性稳定性和特异性较差,不具备临床开发前景^[9-10]。

本研究以具有完全凝血活性的截短型重组hTF₂₄₃(由跨膜部分和胞外部分共243个氨基酸组成)^[11-12]为抗原,利用经典杂交瘤技术,采用间接ELISA联合血浆凝血酶原时间测定(prothrombintime, PT)的方法,筛选具有良好抗凝血生物活性的mAb,为以TF为靶点的抗凝机制的研究和药物的开发奠定基础^[13-14]。

1 材料和方法

1.1 材料

重组工程菌phoA-TF₂₄₃/MM294及截短型重组hTF₂₄₃由山西省生物研究所基因药物室制备并保存;PT测定试剂、正常质控血浆购自上海太阳生物技术有限公司;Quick Antibody-Mouse 5W免疫佐剂购自北京康碧泉生物技术公司;PEG1500购自Roche公司;次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶脱氧核苷(hypoxanthine-aminopterin-thymidine, HAT)添加物、次黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷(hypoxanthine-thymidine, HT)添加物、青链霉素、胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠添加物(insulin-transferrin-sodium selenite supplement, ITS)、L-谷氨酰胺购自Sigma公司;DMEM/F12培养基购自Hyclone公司;胎牛血清购自Life Science公司;抗体亚型鉴定试剂盒购自洛阳佰奥通实验材料中心;PVDF膜购自Bio-Rad公司;辣根过氧化物酶(horseradishperoxidase, HRP)标记山羊抗小鼠IgG和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)标记的山羊抗小鼠IgG购自GeneTex公司;邻苯二胺(O-phenylenediamine, OPD)和四唑硝基蓝/5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐(nitrobluetetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, NBT/BICP)显色剂购自Amresco公司;健康雌性BALB/c小鼠购自北京维通利华实验技术有限公司;次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(hypoxanthine guanine turn phosphoribosyltransferases enzyme, HGRPT)缺陷型小鼠骨髓瘤细胞株Sp2/0购自中国典型培养物保藏中心,融合前经8-氮鸟嘌呤筛选2周;SW620结肠癌细胞株购自中科院上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫 重组hTF₂₄₃与等体积的Quick Antibody-Mouse 5W水溶性免疫佐剂充分混合后,于小鼠后腿小腿肌肉

注射免疫,每只小鼠注射100 μL,免疫剂量为30 μg hTF₂₄₃/只。3周后进行2次免疫,方法、剂量同上。5周后,采微量尾血进行间接ELISA检测。当血清滴度达到要求后融合前3d进行腹腔注射冲击免疫,免疫量0.5 mL,60 μg hTF₂₄₃/只。融合前小鼠眼眶取血,分离血清作为阳性对照。

1.2.2 细胞融合与筛选、克隆 将免疫小鼠脾细胞与生长状态良好的Sp2/0细胞1:10混合,在PEG1500作用下融合。离心后用含200 mL/L胎牛血清、1 mL/L ITS和4 mmol/L L-谷氨酰胺的HT筛选培养基重悬,接种于96孔板中,37℃、80 mL/L CO₂培养。7~10 d后用HAT筛选培养基,14 d后换用DMEM/F12培养基培养。采用间接ELISA筛选杂交瘤细胞。选取96孔酶标板,以碳酸盐缓冲液(0.5 mol/L Na₂CO₃/NaHCO₃, pH9.6)包被重组hTF₂₄₃(10 μg/mL、100 μL/孔),1:5000稀释HRP标记山羊抗小鼠作为二抗,以OPD作为显色底物,经H₂SO₄终止反应后测定492 nm处的吸光度(A₄₉₂)值。免疫小鼠血清1:1000稀释作为阳性对照,免疫前正常小鼠血清1:1000稀释作为阴性对照。采用有限稀释法进行亚克隆筛选,至100%杂交瘤细胞上清液连续3次检测均呈阳性时为建株标准。将生长状态良好的阳性杂交瘤细胞株,使用无血清培养基DMEM/F12培养2~3 d后,收集培养上清,按照抗体亚型鉴定试剂盒说明书进行抗体亚型鉴定。

1.2.3 mAb抗凝血活性的筛选 生长状态良好的杂交瘤细胞株,使用无血清培养基DMEM/F12培养2~3 d后,收集培养上清。参照文献[15]的方法略加改良测定细胞上清的抗凝血活性:在凝血酶原检测试剂中,加入杂交瘤细胞培养上清,37℃孵育1 h后,测定正常人混合血浆的PT值。以Sp2/0细胞无血清培养上清为阴性对照。每孔细胞上清重复检测3次。

1.2.4 mAb腹水制备及纯化 选择14周龄、雌性BALB/c小鼠,接种前1周以液体石蜡为致敏剂,0.5 mL/只腹腔注射致敏。待杂交瘤细胞生长至对数期计数收集,利用无血清培养基调整细胞数后接种,10~12 d后小鼠腹部明显隆起,离心收集腹水上清。用间接ELISA测定腹水效价,采用蛋白A亲和层析纯化腹水^[16-17]。

1.2.5 Western blot法鉴定mAb 纯化的抗体样品经120 g/L SDS-PAGE分析纯度,Western blot法鉴定其特异性。重组hTF₂₄₃蛋白纯化样品、经低磷诱导的phoA-TF₂₄₃/MM294工程菌全菌样品,经120 g/L SDS-PAGE后电转至PVDF膜,50 g/L脱脂奶粉封闭过夜;加制备的mAb(1:2000),4℃孵育过夜;PBST洗膜5 min×3次,加AP标记的山羊抗小鼠IgG(1:5000),室温孵育2 h;PBST洗膜5 min×3次,用BCIP/NBT显色试剂盒避光显色并拍照。

1.2.6 mAb抗凝血活性的测定 按照PT方法检测mAb抗凝血活性。10 μL不同剂量梯度的mAb分别与100 μL PT试剂,37℃孵育1 h后,取40 μL正常人混合质控血浆测定其PT值。以PBS为阴性对照。每个样品重复检测3次。

1.2.7 mAb与SW620结肠癌细胞表面天然TF的作用

将处于对数期、生长状态良好的SW620用胰蛋白酶消化、计数后、收集细胞。将细胞重悬于200 μL PBS中,倍比稀释细胞至不同细胞数量。按照常规PT测定方法,用

100 μ L 细胞液替代 PT 试剂中 TF 成分, 测定不同细胞数量下正常人质控血浆的 PT 值。

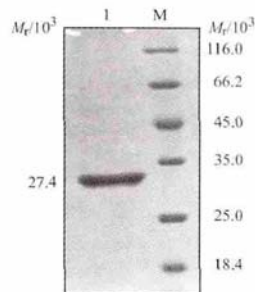
将不同剂量梯度的抗 hTF mAb 与一定数量的 SW620 细胞混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 按照常规 PT 测定方法, 测定正常人质控血浆的凝血时间, 检测其对 SW620 细胞表面 TF 凝血活性的影响。

1.2.8 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据分析采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组 hTF₂₄₃ 抗原的鉴定

重组 hTF₂₄₃ 蛋白纯化样品经 SDS-PAGE 分析, 结果显示在相对分子质量 (M_r) 27 400 处有明显的条带 (图 1), 与截短型重组 hTF₂₄₃ 的理论分子量大小基本一致, 且蛋白纯度较高。



1: 重组 hTF₂₄₃ 纯化样品; M: 蛋白质 M_r marker.

图 1 SDS-PAGE 分析重组 hTF₂₄₃ 蛋白纯化样品

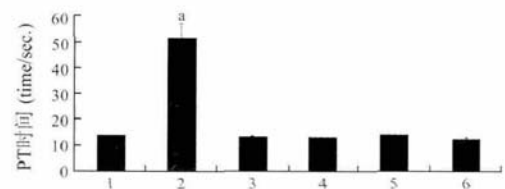
2.2 抗 TF mAb 杂交瘤细胞株的筛选及 mAb 亚型测定

将生长状态良好的 Sp2/0 细胞与免疫后的小鼠脾细胞融合后, 待细胞长至孔底 1/2 以上时, 进行 3 次筛选, 多次亚克隆后最终获得 5 株能稳定分泌抗人重组组织因子的 mAb 分别命名为: mAb-TF-1、mAb-TF-2、mAb-TF-3、mAb-TF-4、mAb-TF-5。

按照抗体亚型鉴定试剂盒操作步骤, 采用夹心 ELISA 检测杂交瘤细胞株的无血清培养基上清, 结果证明 mAb-TF-1、mAb-TF-4 抗体亚型为 IgG2b, mAb-TF-2、mAb-TF-3 和 mAb-TF-5 抗体亚型为 IgG1。

2.3 mAb 抗凝血活性的筛选

PT 检测结果显示, mAb-TF-2 杂交瘤细胞经无血清培养基培养 3 d 后, 与 PBS 对照组相比 PT 值显著延长, PT 值达 51.7 s, 延长率为 327%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而其他 4 株杂交瘤细胞培养上清的 PT 值与 PBS 对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。经过 PT 检测, 最终筛选出 1 株具有抗凝活性的单克隆抗体 mAb-TF-2 (图 2)。

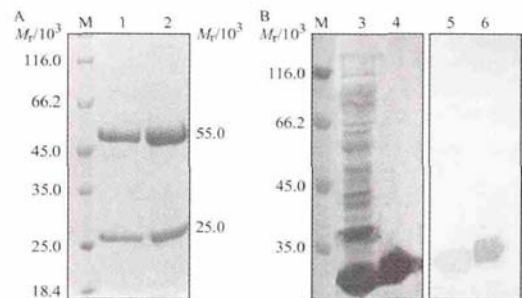


1: mAb-TF-1; 2: mAb-TF-2; 3: mAb-TF-3; 4: mAb-TF-4; 5: mAb-TF-5; 6: PBS 对照组. ^a $P < 0.05$ vs 6.

图 2 mAb PT 凝血活性的筛选

2.4 腹水的制备和纯化

在腹水制备过程中, 不同细胞接种量对抗 hTF mAb 抗体腹水产量效价影响较大。过高的接种量极易造成小鼠凝血紊乱导致死亡或急速形成实体瘤两种极端反应, 导致制备腹水失败。经过多次实验确定: 将接种量控制在 2.5×10^5 个/只时可实现抗 hTF mAb 的腹水制备。腹水经蛋白 A 亲和层析柱纯化后, 得到纯度较高的抗 hTF mAb; 经 Western blot 法鉴定, 该抗体能特异性识别重组 hTF₂₄₃ (图 3)。



A: SDS-PAGE 鉴定 mAb 纯化情况; B: Western blot 法分析 mAb 特异性. M: 蛋白质 M_r marker; 1、2: 腹水纯化样品; 3、5: M294/phoA/TF₂₄₃ 诱导表达; 4、6: 重组 hTF₂₄₃ 纯化样品.

图 3 SDS-PAGE 分析及 Western blot 法鉴定 mAb

2.5 抗 TF mAb 抗凝血活性的测定

将纯化后的 mAb-TF-2 用 PBS 稀释至不同剂量梯度, 测定 PT 值。实验结果表明, 在一定剂量范围内, 抗体含量与 PT 值呈剂量依赖性, 随着抗体剂量的增大, PT 值延长 (图 4), 其中, PBS 替代 mAb-TF-2 抗体时血浆凝血酶原时间为 11.8 s, 在 mAb 剂量为 1.4 mg/mL 时, PT 值为 166.13 s, 延长率达到 1306%。

2.6 抗 TF mAb 与结肠癌细胞表面天然 TF 的作用

SW620 结肠癌细胞是高表达 TF 细胞株, 其表面天然 TF 具有一定的凝血活性。按照常规 PT 测定方法, 用 100 μ L 不同数量的细胞替代 PT 试剂中 TF 成分, 测定不同细胞数量下正常人质控血浆的凝血时间。实验结果显示, 随着 SW620 细胞数量的增加, PT 值在显著降低; 当 SW620 细胞量达 1.5×10^7 时,

其 PT 值与常规 PT 检测方法测定值相当(图5)。

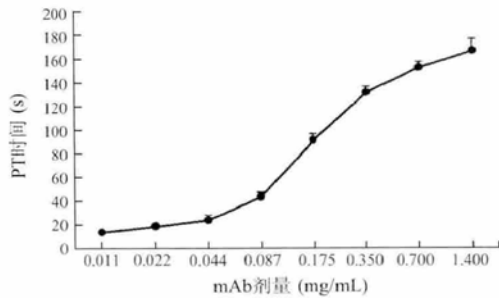


图4 mAb 抗凝血活性的 PT 测定

选择 1.5×10^7 个 SW620 细胞替代 PT 检测试剂中 TF 成分, 加入不同剂量梯度的 mAb 后测定 PT 值, 分析 mAb-TF-2 对 SW620 结肠癌细胞表面 TF 的凝血活性影响。实验结果显示, 随着 mAb-TF-2 剂量的增加, PT 检测值逐渐延长, 说明该抗体可以特异性结合天然 TF 从而表现出一定的抗凝血特性(图6)。

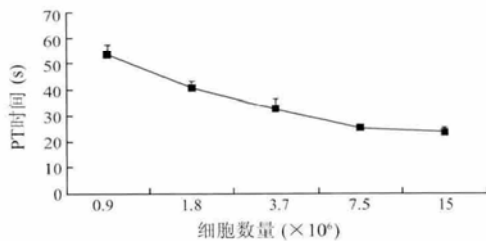


图5 SW620 不同细胞数量 PT 凝血时间测定

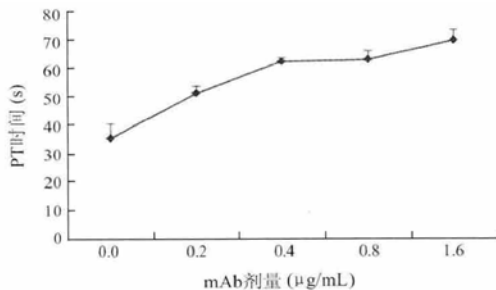


图6 mAb-TF-2 对 SW620 细胞表面 TF 凝血活性的抑制作用

3 讨论

血栓的形成过程主要与 TF 依赖的凝血级联反应中凝血酶的形成相关^[18-19], 同时发现在手术治疗时也可能再引发 TF 依赖性血栓的形成^[20-21]。因此, 通过研究一种抑制 TF 活性的 mAb, 从而能选择性干预凝血机制物理或病理性激活, 成为目前国内外的研究热点^[22-24]。本研究旨在筛选出一株能够分泌具有高抗凝活性的抗 TF mAb 细胞株, 为以 TF 为靶点的抗凝药物的开发及其凝血机制研究奠定基础。

本研究首先选择具有全部凝血活性的可溶性截短型重组 hTF₂₄₃ 作为免疫抗原。该重组蛋白高级结

构更接近于天然 TF, 并且具有全部的凝血活性, 为筛选具有特定抑制凝血活性的 mAb 提供了可能。其次, 在杂交瘤细胞株筛选的过程中, 我们选择了常规间接 ELISA 联合 PT 检测方法筛选具有抗凝血活性 mAb, 大大提高了获得具有抗凝血活性的抗 hTF mAb 的筛选概率, 较大程度的降低了假阳性率和工作量。第三, 在腹水生产过程中, 我们对 TF mAb 生产程序进行了优化, 提高了腹水生产量。第四, 常规 PT 检测方法通常是在 37℃, 有 Ca²⁺ 存在时, 凝血活酶与血浆中的蛋白反应, 激活 VIIa 因子, 进而形成纤维蛋白, 记录血浆凝固时间。在 PT 测定试剂中最主要的活性成分是凝血活酶即 TF 脂化物。本研究将高表达 TF 的 SW620 细胞替代 PT 试剂中 TF 脂化物测定血浆凝血酶原时间, 测定结果比较稳定, 具有明显的凝血活性。研究中将 mAb-TF-2 加入到含 SW620 细胞的 PT 试剂中测定 PT 值发现, 该抗体表现出明显的抗凝血活性。说明该抗体可与 SW620 细胞表面的天然 TF 作用, 进而影响血浆凝血酶原时间的测定。在后续实验中我们会对此现象进行进一步证明。

综上所述, 本研究成功制备了具有良好抗凝血活性的抗 hTF mAb, 将利用此 mAb, 对组织因子的生物功能进行更深入的研究^[25-26]。

参考文献:

- [1] Scarpati E M, Wen D, Broze GJ Jr, et al. Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene [J]. *Biochemistry*, 1987, 26 (17): 5234 - 5238.
- [2] Morrissey J H, Fakhrai H, Edginton T S. Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation cascade [J]. *Cell*, 1987, 50 (1): 129 - 135.
- [3] Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (6): 1015 - 1022.
- [4] Butenas S, Mann K G. Active tissue factor in blood? [J]. *Nat Med*, 2004, 10 (11): 1155 - 1156.
- [5] Smith S A. Antithrombotic therapy [J]. *Top Companion Anim Med*, 2012, 27 (2): 88 - 94.
- [6] Senchenkova E Y, Russell J, Esmo C T, et al. Roles of coagulation and fibrinolysis in angiotensin II-enhanced microvascular thrombosis [J]. *Microcirculation*, 2014, 21 (5): 401 - 407.
- [7] Stokol T, Daddona J, Deleonardis C, et al. Generation and characterization of a monoclonal antibody against canine tissue factor [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2015, 167 (3/4): 178 - 184.
- [8] Mega J, Carreras E T. Antithrombotic therapy: triple therapy or triple threat? [J/OL]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 2012: 547 - 552. doi: 10.1182/asheducation - 2012. 1. 547.
- [9] He X, Han B, Mura M, et al. Anti-human tissue factor antibody ameliorated intestinal ischemia reperfusion-induced acute lung injury in human tissue factor knock-in mice [J/OL]. *PLoS One*, 2008,

- 3 (1) : e1527. doi: 10.1371/journal.pone.0001527.
- [10] Danchin N, Puymirat E, Schiele F. Antithrombotic therapy for stable coronary artery disease: the difficult quest for the holy balance [J/OL]. *Eur Heart J*, 2016, 37(4) : 409–411.
- [11] 赵邑, 齐延红, 潘薇薇, 等. 可溶性人重组组织因子(rhTF₂₄₃)分泌型表达载体的构建和表达 [J]. *生物技术*, 2007, 17(3) : 15–17.
- [12] Butenas S. Tissue factor structure and function [J/OL]. *Scientifica (Cairo)*, 2012, 2012: 964862. doi: 10.6064/2012/964862. Epub 2012 Dec 26.
- [13] Kim H, Kim Y, Lee H K. Influence of preanalytical variables on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen [J]. *Clin Lab*, 2015, 61(9) : 1337–1340.
- [14] 王同显, 杨志夏. 正确理解凝血机制与凝血试验的临床意义 [J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(12) : 1364–1366.
- [15] Nqo C V, Picha K, McCabe F, et al. CNTO 859, a humanized anti-tissue factor monoclonal antibody, is a potent inhibitor of breast cancer metastasis and tumor growth in xenograft models [J]. *Int J Cancer*. 2007, 120(6) : 1261–1267.
- [16] 赵峰梅, 齐延红, 何永吉, 等. 一种利用 HCIC 快速纯化抗 rhTF₂₄₃ 单克隆抗体方法的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(6) : 548–551.
- [17] Grodzki A C, Berenstein E. Introduction to the purification of antibodies [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 588 : 11–13.
- [18] Heelan B. Purification of monoclonal antibodies using protein A/G [J]. *Methods Mol Med*, 2000, 40 : 281–288.
- [19] Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis [J]. *Circ Res*, 2011, 108(10) : 1284–1297.
- [20] Mooberry M J, Key N S. Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis [J]. *Cytometry A*, 2016, 89(2) : 111–122.
- [21] Hedner U, Ezban M. Tissue factor and factor VIIa as therapeutic targets in disorders of hemostasis [J]. *Annu Rev Med*, 2008, 59 : 29–41.
- [22] Steffel J, Luscher T F, Tanner F C. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications [J]. *Circulation*, 2006, 113(5) : 722–731.
- [23] Gajsiewicz J M, Morrissey J H. Structure-function relationship of the interaction between tissue factor and factor VIIa [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2015, 41(7) : 682–690.
- [24] Shirk R A, Vlasuk G P. Inhibitors of factor VIIa/tissue factor [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(9) : 1895–1900.
- [25] Lima L G, Monteiro R Q. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression [J/OL]. *Biosci Rep*, 2013, 33(5) : e00064. doi: 10.1042/BSR20130057.
- [26] Han X, Guo B, Li Y, et al. Tissue factor in tumor microenvironment: a systematic review [J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7 : 54. doi: 10.1186/s13045-014-0054-8.

(上接第 543 页)

- [9] Saplacan R M, Mircea P A, Balacescu L, et al. microRNAs as non-invasive screening biomarkers of colorectal cancer [J]. *Clujul Med*, 2015, 88(4) : 453–456.
- [10] Liu F, Xiong Y, Zhao Y, et al. Identification of aberrant microRNA expression pattern in pediatric gliomas by microarray [J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8(158) : 1–10.
- [11] Zhao J J, Yang J, Lin J, et al. Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis [J]. *Childs Nerv Syst*, 2009, 25(1) : 13–20.
- [12] Chen X D, Zhao G Q, Wang F Q, et al. Upregulation of miR-513b inhibits cell proliferation, migration, and promotes apoptosis by targeting high mobility group box 3 protein in gastric cancer [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(11) : 11081–11089.
- [13] Wang H, Li Z, Sun Y, et al. Relationship between high-mobility group box 1 overexpression in ovarian cancer tissue and serum: a meta-analysis [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8 : 3523–3531.
- [14] Lee H J, Kim J Y, Song I H, et al. High mobility group B1 and N1 (HMGB1 and HMGN1) are associated with tumor-infiltrating lymphocytes in HER2-positive breast cancers [J]. *Virchows Arch*, 2015, 467(6) : 701–709.
- [15] Chen J, Xi B, Zhao Y, et al. High-mobility group protein B1 (HMGB1) is a novel biomarker for human ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 126(1) : 109–117.
- [16] Wang X, Xiang L, Li H, et al. The role of HMGB1 signaling pathway in the development and progression of hepatocellular carcinoma: A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9) : 22527–22540.
- [17] Moser B, Janik S, Schiefer A I, et al. Expression of RAGE and HMGB1 in thymic epithelial tumors, thymic hyperplasia and regular thymic morphology [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(4) : e94118. doi: 10.1371/journal.pone.0094118. eCollection 2014.
- [18] David S, Meltzer S J. Stomach-Genetic and epigenetic alterations of preneoplastic and neoplastic lesions [J]. *Cancer Biomark*, 2010, 9(1/2/3/4/5/6) : 493–507.
- [19] Gao J, Zou Z, Gao J, et al. Increased expression of HMGB3: a novel independent prognostic marker of worse outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Exp Pathol*, 2015, 8(1) : 345–352.
- [20] Li M, Cai Y, Zhao H, et al. Overexpression of HMGB3 protein promotes cell proliferation, migration and is associated with poor prognosis in urinary bladder cancer patients [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(6) : 4785–4792.
- [21] Nagaraju G P, Madanraj A S, Aliya S, et al. microRNAs as biomarkers and prospective therapeutic targets in colon and pancreatic cancers [J]. *Tumour Biol*, 2015 Nov 4. [Epub ahead of print].
- [22] Bai R, Weng C, Dong H, et al. microRNA-409-3p suppresses colorectal cancer invasion and metastasis partly by targeting GAB1 expression [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(10) : 2310–2322.
- [23] Reeves R. High mobility group (HMG) proteins: Modulators of chromatin structure and DNA repair in mammalian cells [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2015, 11(36) : 122–136.
- [24] Elgamal O A, Park J K, Gusev Y, et al. Tumor suppressive function of miR-205 in breast cancer is linked to HMGB3 regulation [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(10) : e76402. doi: 10.1371/journal.pone.0076402. eCollection 2013.
- [25] Gong A Y, Zhou R, Hu G, et al. microRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes [J]. *J Immunol*, 2009, 182(3) : 1325–1333.