

· 技术与方法 ·

pcDNA3.1/Cx43 真核表达质粒的构建及其在人神经胶质瘤 U251 细胞中的稳定过表达

李嘉杰¹, 闻海兵¹, 邹树峰¹, 严 剑¹, 洪 涛^{2△}

(1. 南昌大学医学院研究生院 330000; 2. 南昌大学第一附属医院神经外科 330006)

摘要:目的 建立稳定过表达 pcDNA3.1/连接蛋白 43(Cx43)重组质粒的人神经胶质瘤 U251 细胞系。方法 设计人 Cx43 的引物,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)从低表达 Cx43 的 U251 细胞中扩增出目的片段,双酶切后定向连入 pcDNA3.1 载体,构建 pcDNA3.1/Cx43 真核表达质粒,经酶切、PCR、测序检测构建的正确性。采用脂质体转染法将重组质粒转入 U251 细胞,G418 筛选出稳定转染的细胞系,采用 RT-PCR、Western blot 分别检测稳定转染 pcDNA3.1/Cx43 重组质粒的 U251 细胞中 Cx43 基因、蛋白的表达水平。**结果** 酶切、PCR 及测序表明 pcDNA3.1/Cx43 重组质粒构建成功,筛选获得稳定过表达 Cx43 的 U251 细胞。**结论** 构建了 pcDNA3.1/Cx43 真核表达质粒及稳定过表达 Cx43 的 U251 细胞株,为下一步以 Cx43 为靶标进行人神经胶质瘤的基因治疗研究奠定了实验基础。

关键词:神经胶质瘤;转染;质粒;连接蛋白 43;逆转录聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.09.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)09-0884-04

Construction of eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1/Cx43 and its stable overexpression in U251 human glioma cells

Li Jiajie¹, Wen Haibing¹, Zou Shufeng¹, Yan Jian¹, Hong Tao^{2△}

(1. Graduate School, Medical College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330000, China;

2. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To establish U251 human glioma cell line with stable overexpression of pcDNA3.1/connexin 43 (Cx43) recombinant plasmid. **Methods** Human Cx43 primers were designed. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to amplify targeted fragments from U251 cells with Cx43 low expression, which directly connected to pcDNA3.1 vector after double digestion in order to construct the eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1/Cx43, and it was confirmed by digestion, PCR and sequencing. Lipofection method was adopted to transfer recombinant plasmid into U251 cells, the stable transfected cell line was screened by G418, and RT-PCR, Western blot were used respectively to detect the gene and protein expression level of Cx43 in U251 cells with stable transfection of pcDNA3.1/Cx43 recombinant plasmid. **Results** The results of digestion, PCR and sequencing demonstrated that the pcDNA3.1/Cx43 recombinant plasmid was successfully constructed and stable Cx43-overexpressed U251 cells were obtained by screening. **Conclusion** Eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1/Cx43 and stable Cx43-overexpressed U251 cells are constructed, which lay a experimental foundation for further study on Cx43-targeted gene therapy for human glioma.

Key words: glioma; transfection; plasmids; connexin 43; reverse transcriptase-polymerase chain reaction

缝隙连接蛋白(connexin, Cx)可能与体内肿瘤的发生、发展过程有着密切的联系,Cx43 作为 Cx 家族最常见的一种,其表达量的改变直接影响缝隙连接的功能,导致体内肿瘤的发生。前期体外研究发现,转染 Cx43cDNA 的 C6 细胞缝隙连接功能增强,化疗的旁观者效应明显放大。然而,Cx43 在体内是否也有同样的作用还不得而知,为此本研究通过构建 Cx43 真核表达质粒,并将其转染到人神经胶质瘤 U251 细胞中稳定过表达,从体内观察 Cx43 对脑胶质瘤侵袭性的影响。

1 材料与与方法

1.1 细胞、主要试剂与仪器 人神经胶质瘤 U251 细胞由杭州生物技术公司提供。主要试剂:pcDNA3.1 载体、LipofectamineTM-2000、TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,感受态细胞 DH5 α 、TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶、T₄ 连接酶,凝胶回收试剂盒、B 型小提质粒试剂盒及 G418 购自上海天根生化科技有限公司,逆转录试剂盒为美国 Promega 公司产品,兔抗 Cx43 Total 购自美国 Zymed 公司,兔抗 β -actin 为美国 Chemicon 公司产品,羊抗兔第二抗体购自美国 Santa Cruz 公

司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和青链霉素混合液为美国 HyClone 公司产品。主要仪器:倒置相差显微镜(日本 Olympus)、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国 Bio-rad)、紫外分光光度计(美国 Bio-rad)、凝胶成像仪(美国 Bio-rad)。

1.2 pcDNA3.1/Cx43 真核表达质粒的构建

1.2.1 U251 细胞总 RNA 的提取 按 RNeasy Mini Kit(德国 QIAGEN)说明书提取总 RNA。

1.2.2 逆转录 PCR(reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)扩增人 Cx43 基因蛋白编码序列子 根据 GenBank 数据库人 Cx43 基因序列(CR541660),利用 Vector NTI Advance 10 软件自行设计 Cx43 基因的全长引物(上游:5'-GTG CTA GCT TAT GGG TGA CTG GAG CGC C-3';下游:5'-GCG GGT ACC CAG GAT CTC CAG GTC AT-3',分别带有 *Nhe* I 和 *Kpn* I 酶切位点,扩增产物长 1 168 bp)。 β -actin 引物采用上海闪晶分子生物技术研究所的 β -actin 序列(上游:5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3',下游:5'-TTT AAT GTC

ACG CAC GAT TTC-3', 扩增产物长 150 bp)。两对引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。以提取的总 RNA 为模板, 用 ReverTra Ace- α^{TM} Kit(天根生化科技有限公司)反转录合成 cDNA 第一条链。取反转录产物 2 μL , PCR 扩增 Cx43 编码序列, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 33 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶图像仪分析并进行照相。用 DNA 凝胶回收试剂盒(安徽 U-GENE 公司)切胶回收 Cx43 PCR 产物。

1.2.3 pCMV-Cx43cDNA 重组质粒的构建 *Nhe* I 和 *Kpn* I 限制性内切酶对 Cx43 RT-PCR 扩增产物及 pcDNA3.1 质粒进行双酶切, 酶切产物切胶回收后用高效 DNA 连接酶, 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 16 h; 将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细菌, G418 平板筛选。挑取阳性克隆, 摇菌过夜, 提取质粒。将构建的重组质粒命名为 pcDNA3.1/Cx43。

1.2.4 pCMV-Cx43cDNA 重组质粒鉴定 *Nhe* I 和 *Kpn* I 限制性内切酶对重组质粒进行单酶切及双酶切, 并送天根生化科技有限公司(北京)进行测序鉴定。

1.3 pcDNA3.1/Cx43 重组质粒转染 U251 细胞及 G418 筛选稳定转染细胞系

1.3.1 U251 细胞的培养 U251 细胞在含 10% FBS, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95% 湿度、5% CO₂ 的 Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle' medium, DMEM)中常规培养, 每周传代 3 次。

1.3.2 U251 细胞的转染与筛选 将处于对数生长期的 U251 细胞用 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(美国 Gibco 公司)消化后吹打成单细胞悬液, 转染 24 h 前将 4 $\times 10^5$ 个细胞接种至 6 孔板中, 使转染时细胞密度达到 90%~95%。将 LipofectamineTM-2000 10 μL 加入 240 μL 无血清 DMEM 中混匀, 室温放置 5 min; 取 pcDNA3.1/Cx43 重组质粒 4 μg 加入无血清 DMEM 中混匀(总量 250 μL), 将上述 2 种液体混匀制成质粒-脂质体混合物, 室温放置 20 min。用无血清 DMEM 洗涤细胞 3 次, 将质粒-脂质体混合物逐滴滴加至 6 孔板中, 轻轻混匀, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。5 h 后更换为完全培养基(含 10% FBS); 24 h 后按 1:6 传代; 24 h 后, 待细胞贴壁, 换为含 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的完全培养基筛选 3 周, 得到抗性克隆, 用无菌移液器枪头挑取单克隆继续培养 2 周以上, 以获得稳定细胞系。

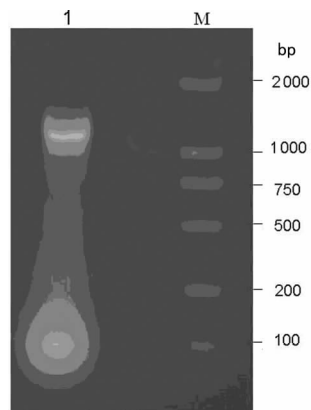
1.4 RT-PCR 检测稳定转染 U251 细胞及未转染 U251 细胞中 Cx43 的基因表达水平 用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 逆转录后行 PCR 检测, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 33 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。同时, 内参 β -actin 以等量的 RNA 为模板, 同时进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 28 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

1.5 Weston blot 检测稳定转染 U251 细胞及未转染 U251 细胞中 Cx43 蛋白的表达水平 用蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白, 取 20 μL 体积上样, 积层胶电泳 15 min, 电压 120 V; 分离胶电泳 45 min, 电压 180 V; 转膜 90 min, 电流 350 mA; 5% 的含吐温-20 的 Tris 缓冲液(Tris-buffered saline with Tween-20, TBST)脱脂奶粉室温下封闭 2 h; 加入兔抗 Cx43 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 然后用 TBST 液洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入第二抗体室温下孵育 4 h, 再用 TBST 液洗涤 3 次, 每次 10 min, 曝光。

2 结 果

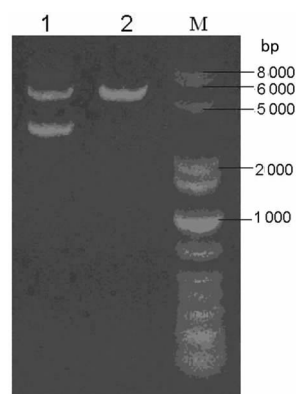
2.1 PCR 扩增获取 Cx43 序列 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离后得到大小约 1 168 bp 的特异性单一条带, 经比对与基因库公布的基因大小相同, 见图 1。

2.2 质粒 pcDNA3.1(+)单酶切鉴定 鉴定结果显示出现大小约 5 400 bp 条带, 与预期相符, 见图 2。



1: Cx43; M: DNA Marker.

图 1 PCR 扩增的 Cx43



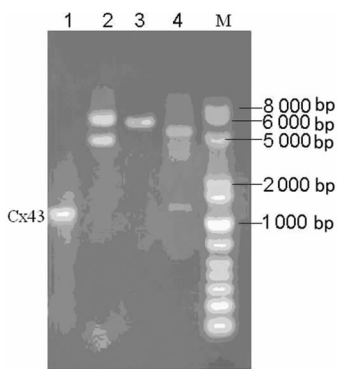
1: 空载质粒 pcDNA3.1(+); 2: 空载质粒 pcDNA3.1(+)*Nhe* I 单酶切; M: DNA Marker.

图 2 质粒 pcDNA3.1(+)的单酶切鉴定

2.3 pcDNA3.1/Cx43 重组质粒的双酶切鉴定 用 *Nhe* I、*Kpn* I 双酶切 pcDNA3.1/Cx43 重组质粒, 经 PCR 鉴定, 单酶切重组质粒大小约 6 000 bp, 而双酶切后出现 1 条大小约 5 000 bp 及 1 条大小约 1 000 bp 条带, 且双酶切后出现的大小约 1 000 bp 条带与重组质粒目的基因 Cx43 的 PCR 结果在同一水平线上, 其大小与基因库所提供的基本符合, 酶切重组质粒酶切结果与预期结果相同, 见图 3。

2.4 pcDNA3.1/Cx43 重组质粒测序报告 结果显示与基因库序列一致。序列如下(斜体为 Cx43 cDNA 全序列): AGC AGA GCT CTC TGG CTA CTA GAG AAC CCA CTG CTT ACT GGC TTA TCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCC AAG CTG GCT AGC ATG GGT GAC TGG AGC GCC TTA GGC AAA CTC CTT GAC AAG GTT CAA GCC TAC TCA ACT GCT GGA GGG AAG GTG TGG CTG TCA GTA CTT TTC ATT TTC CGA ATC CTG CTG CTG GGG ACA GCG GTT GAG TCA GCC TGG GGA GAT GAG CAG TCT GCC TTT CGT TGT AAC ACT CAG CAA CCT GGT TGT GAA AAT GTC TGC TAT GAC AAG TCT TTC

CCA ATC TCT CAT GTG CGC TTC TGG GTC CTG CAG
 ATC ATA TTT GTG TCT GTA CCC ACA CTC TTG TAC
 CTG GCT CAT GTG TTC TAT GTG ATG CGA AGG GAA
 GAG AAA CTG AAC AAG AAA GAG GAA GAA CTC AAG
 GTT GCC CAA ACT GAT GGT GTC AAT GTG GAC ATG
 CAC TTG AAG CAG ATT GAG ATA AAG AAG TTC AAG
 TAC GGT ATT GAA GAG CAT GGT AAG GTG AAA ATG
 CGA GGG GGG TTG CTG CGA ACC TAC ATC ATC AGT
 ATC CTC TTC AAG TCT ATC TTT GAG GTG GCC TTC
 TTG CTG ATC CAG TGG TAC ATC TAT GGA TTC AGC
 TTG AGT GCT GTT TAC ACT TGC AAA AGA GAT CCC
 TGC CCA CAT CAG GTG GAC TGT TTC CTC TCT CGC
 CCC ACG GAG AAA ACC ATC TTC ATC ATC TTC ATG
 CTG GTG GTG TCC TTG GTG TCC CTG GCC TTG AAT
 ATC ATT GAA CTC TTC TAT GTT TTC TTC AAG GGC
 GTT AAG GAT CGG GTT AAG GGA AAG AGC GAC CCT
 TAC CAT GCG ACC AGT GGT GCG CTG AGC CCT GTC
 AAA GAC TGT GGG TCT CAA AAA TAT GCT TAT TTC
 AAT GGC TGC TCC TCA CCA ACC GCT CCC CTC TCG
 CCT ATG TCT CCT CCT GGG TAC AAG CTG GTT ACT
 GGC GAC AGA AAC AAT TCT TCT TGC CGC AAT TAC
 AAC AAG CAA GCA AGT GAG CAA AAC TGG GCT AAT
 TAC AGT GCA GAA CAA AAT CGA ATG GGG CAG GCG
 GGA AGC ACC ATC TCT AAC TCC CAT GCA CAG CCT
 TTT GAT TTC CCC GAT GAT AAC CAG AAT TCT AAA
 AAA CTA GCT GCT GGA CAT GAA TTA CAG CCA CTA
 GCC ATT GTG GAC CAG CGA CCT TCA AGC AGA GCC
 AGC AGT CGT GCC AGC AGC AGA CCT CGG CCT GAT
 GAC CTG GAG ATC CTG GGT ACC GAG CTC GGA TCC
 ACT AGT CCA GTG TGG TGG AAT TCT GCA GAT ATC
 CAG CAC AGT GGC GGC CGC TCG AGT CTA GAG
 CCC C.



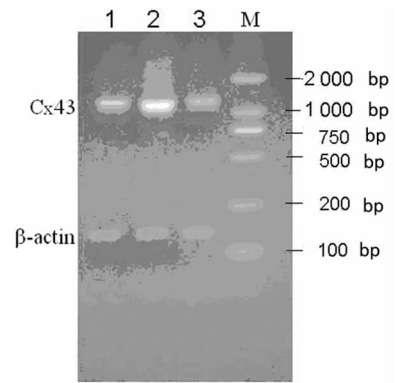
1: 目的基因 Cx43; 2: pcDNA3.1/Cx43 重组质粒; 3: pcDNA3.1/Cx43 重组质粒 *Nhe* I 单酶切; 4: pcDNA3.1/Cx43 重组质粒 *Nhe* I、*Kpn* I 双酶切; M: DNA Marker。

图 3 pcDNA3.1/Cx43 重组质粒的双酶切鉴定

2.5 稳定转染及未转染 U251 细胞中 Cx43 的表达水平 RT-PCR 结果显示未转染及转染空质粒的 U251 细胞中 Cx43 表达较低且无明显差异, 而稳定转染重组质粒的 U251 细胞则高表达 Cx43, 见图 4。

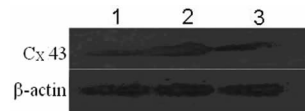
2.6 稳定转染 U251 细胞中 Cx43 蛋白的表达水平 Weston blot 结果显示在过表达的 U251 细胞内 Cx43 蛋白表达水平明

显高于未转染阴性对照组, 见图 5。



M: DNA Marker (bp); 1: 未转染空质粒组的 U251 细胞; 3: 转染空质粒组的 U251 细胞; 2: 稳定转染重组质粒 pcDNA3.1/Cx43 后 U251 细胞。

图 4 稳定转染及未转染 U251 细胞中 Cx43 基因的表达水平



1: 正常组; 2: 过表达组; 3: 阴性对照组。

图 5 稳定转染 U251 细胞中 Cx43 蛋白的表达水平

3 讨 论

缝隙连接蛋白是构成缝隙连接通道的基本单位, 目前在哺乳动物体内发现的缝隙连接蛋白已有 20 余种^[1], 其相对分子质量为 20 000~56 000, 根据其相对分子质量的不同分为 Cx26、Cx43 及 Cx56 等。在不同的组织中缝隙连接蛋白的表达并不相同, 如在肾组织中以 Cx26 的表达为主, 而在脑组织中则以 Cx43 的表达最为广泛^[2-3]。Cx43 是含有 1 146 bp 的 cDNA 开放读码框所编码的含有 382 个氨基酸残基的单肽^[4], Cx43 由核糖体合成后被转运至高尔基体, 最后聚集在细胞膜上形成缝隙连接^[5], 在此过程中 Cx43 修饰状态及表达量的改变都会影响到缝隙连接的功能, 最后导致疾病的发生。

近年来研究发现, Cx43 在维持神经系统正常功能中发挥重要作用, 其表达的改变可能与多种神经系统疾病的发生有关; 有研究提示 Cx43 可能参与蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的发生^[6-7]; 张永明等^[8]研究发现颅脑损伤后 Cx43 的表达上升, 提示其可能参与了颅脑损伤的病理形成过程, 并且可能与继发性脑损伤的加重有关; Garbelli 等^[9]研究表明在难治性癫痫患者的脑组织中 Cx43 的表达升高, 提示 Cx43 表达的改变可能与难治性癫痫的发病有关。有研究提示 Cx43 也参与了其他脑血管疾病的发生与发展过程, 如帕金森病、脑动脉粥样硬化等^[10-11]。

神经胶质瘤来自神经系统支持组织, 属神经外胚叶肿瘤, 占颅内肿瘤的 35.26%~60.96%, 是颅内肿瘤中最常见的一种^[12-13], 其发病机制复杂。人们对其发病机制存在不同看法: Ding 等^[14]发现水通道蛋白 4 (aquaporin 4, AQP4) 在调控神经胶质瘤细胞的迁移和侵袭性方面发挥着重要作用, 认为 AQP4 可能与神经胶质瘤的发展有着密切的联系; Xie 等^[15]发现, 在不同病理类型和分级的神经胶质瘤中结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) mRNA 的表达不同, 在神

神经胶质瘤 I ~ II 级中的表达明显低于在神经胶质瘤 III ~ IV 级中的表达,因此认为 CTGF 可能在神经胶质瘤的发生、发展过程中发挥一定作用。而近年 Caltabiano 等^[16]的研究却发现级别越高的星型神经胶质瘤中 Cx43 的表达越高,可见 Cx43 在神经胶质瘤的发展过程中具有重要的作用。作者希望通过构建重组过表达 Cx43 质粒,将其转移到神经胶质瘤细胞,改变其 Cx43 的表达,为下一步进行神经胶质瘤体内的侵袭性研究奠定实验基础。

参考文献:

- [1] Liao Y, Day KH, Damon DN, et al. Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (17): 9989-9994.
- [2] Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2): 228-232.
- [3] van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties [J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 51(2): 217-229.
- [4] Yancey SB, John SA, Lal R, et al. The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization, topology, and functional domains [J]. *J Cell Biol*, 1989, 108(6): 2241-2254.
- [5] Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, et al. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1359-1400.
- [6] Wang H, Hong T, Wang H, et al. Altered expression of connexin43 and its possible role in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery [J]. *Neurol Res*, 2009, 31(1): 67-73.
- [7] Hong T, Wang H, Wang Y, et al. Effects of gap junctional blockers on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits [J]. *Neurol Res*, 2009, 31(3): 238-244.
- [8] 张永明, 漆松涛, 黄广龙, 等. 缝隙连接蛋白 Cx43 在爆炸伤兔脑组织中的表达 [J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2010, 6(15): 279-281.
- [9] Garbelli R, Frassoni C, Condorelli DF, et al. Expression of connexin 43 in the human epileptic and drug-resistant cerebral cortex [J]. *Neurology*, 2011, 76(10): 895-902.
- [10] Johnstone SR, Ross J, Rizzo MJ, et al. Oxidized phospholipid species promote in vivo differential cx43 phosphorylation and vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(2): 916-924.
- [11] Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, et al. Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson's disease [J]. *Neuroscience*, 2009, 160(1): 61-68.
- [12] 张纪. 深入开展胶质瘤综合治疗及其基础研究 [J]. *中华神经外科杂志*, 2003, 19(1): 1-2.
- [13] 朱丽丽. 王忠诚院士解读脑胶质瘤 [J]. *抗癌之窗*, 2010(1): 17-18.
- [14] Ding T, Ma Y, Li W, et al. Role of aquaporin-4 in the regulation of migration and invasion of human glioma cells [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(6): 1521-1531.
- [15] Xie D, Yin D, Wang HJ, et al. Levels of expression of CYR61 and CTGF are prognostic for tumor progression and survival of individuals with gliomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(6): 2072-2081.
- [16] Caltabiano R, Torrisi A, Condorelli D, et al. High levels of connexin 43 mRNA in high grade astrocytomas. Study of 32 cases with in situ hybridization [J]. *Acta Histochem*, 2010, 112(6): 529-535.

(收稿日期: 2011-09-28 修回日期: 2011-12-29)

(上接第 883 页)

- [8] Shalev I, Liu H, Kosciak C, et al. Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis [J]. *J Immunol*, 2008, 180(1): 249-260.
- [9] 许丽艳. 转录调控的信息学分析 [M] // 李霞. 生物信息学. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 296-316.
- [10] Knackstedt MK, Zenclussen AC, Hertwig K, et al. Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2003, 49(4): 210-220.
- [11] Hancock WW, Szaba FM, Berggren KN, et al. Intact type 1 immunity and immune-associated coagulative responses in mice lacking IFN gamma-inducible fibrinogen-like protein 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(9): 3005-3010.
- [12] Su K, Chen F, Yan WM, et al. Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin prothrombinase contributes to tumor hypercoagulability via IL-2 and IFN-gamma [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(39): 5980-5989.
- [13] Yuwaraj S, Ding J, Liu M, et al. Genomic characterization, localization, and functional expression of FGL2, the human gene encoding fibroleukin: a novel human procoagulant [J]. *Genomics*, 2001, 71(3): 330-338.
- [14] Han M, Yan W, Guo W, et al. Hepatitis B virus-induced hFGL2 transcription is dependent on c-Ets-2 and MAPK signal pathway [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(47): 32715-32729.
- [15] Ning Q, Lakatoos S, Liu M, et al. Induction of prothrombinase fgl2 by the nucleocapsid protein of virulent mouse hepatitis virus is dependent on host hepatic nuclear factor-4 alpha [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18): 15541-15549.

(收稿日期: 2011-09-23 修回日期: 2011-10-08)