

文章编号 1006-8147(2020)06-0521-05

论 著

重组质粒 pcDNA4-FLAG-GLUT1 构建及蛋白表达

徐子豪, 史小雨, 王倩

(天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津 300070)

摘要 目的: 为探究葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1) 磷酸化水平对红细胞期疟原虫生长发育的影响, 构建必要的分子工具。方法: 以 pcDNATM4/TO/myc-His B 为载体, 构建在 GLUT1 第一个胞外区插入 2×FLAG 标签的重组质粒 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1。将重组质粒转染到 NIH/3T3 细胞中, 利用 Western 印迹和流式细胞术分别检测细胞 FLAG-GLUT1 蛋白总量和细胞表面 FLAG-GLUT1 的表达水平。结果: 酶切鉴定及 DNA 测序表明正确构建重组质粒 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1。通过识别 FLAG 标签, 利用 Western 印迹能够检测到 FLAG-GLUT1 在 NIH/3T3 细胞中的表达, 流式细胞术结果显示, 转染重组质粒的细胞表面可检测到 FLAG-GLUT1 的表达, 阳性群比例为 $(21.46 \pm 2.375)\%$, 明显高于对照组 $(0.01 \pm 0.00)\%$, 差异有统计学意义 ($t=9.035, P<0.01$)。结论: 成功构建重组质粒 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1, 为研究 GLUT1 蛋白磷酸化在疟原虫感染红细胞中的作用提供了必要的工具。

关键词 葡萄糖转运蛋白 1; 蛋白磷酸化; 恶性疟原虫

中图分类号 R382.31

文献标志码 A

Construction of recombinant plasmid pcDNA4-FLAG-GLUT1 and protein expression

XU Zi-hao, SHI Xiao-yu, WANG Qian

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To study the effect of glucose transporter 1 (GLUT1) phosphorylation on the growth of blood-stage *Plasmodium*, and construct a necessary molecular tool. **Methods:** Using pcDNATM4/TO/myc-His B as a vector, the recombinant plasmid pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 was constructed by inserting 2×FLAG tag into the first extracellular domain of GLUT1. The recombinant plasmid was transfected into NIH/3T3 cells. The total amount of FLAG-GLUT1 protein and the level of FLAG-GLUT1 on the cell surface were detected by Western blotting and flow cytometry, respectively. **Results:** The results of restriction enzyme digestion and DNA sequencing showed that the recombinant plasmid pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 was constructed correctly. By recognizing the FLAG tag, the expression of FLAG-GLUT1 in NIH/3T3 cells could be detected by Western blotting. The results of flow cytometry showed that the expression of FLAG-GLUT1 was detected on the cell surface transfected with recombinant plasmid, and the proportion of positive group was $(21.46 \pm 2.375)\%$, which was significantly higher than that of control group $(0.01 \pm 0.00)\%$ ($t=9.035, P<0.01$). **Conclusion:** The recombinant plasmid pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 is successfully constructs which provides a necessary tool for studying the role of GLUT1 phosphorylation in *Plasmodium*-infected red blood cells.

Key words glucose transporter 1; protein phosphorylation; *Plasmodium falciparum*

疟疾是由疟原虫 (*plasmodium*) 感染所引起的寄生虫疾病, 通过雌性按蚊叮咬人体传播, 在全球范围内仍有着较高的发病率和死亡率^[1]。疟原虫在人体的寄生生活主要分为肝细胞期和红细胞期, 其中以红细胞期引起的临床症状最为明显^[2]。红细胞期疟原虫的能量来源主要依靠摄取宿主血液中的葡萄糖进行糖酵解^[3]。葡萄糖依次通过红细胞膜表面葡萄糖转运蛋白 (GLUT) 1、包绕疟原虫的纳虫泡膜 (parasitophorous vacuole membrane, PVM) 和疟原虫质膜上的己糖转运蛋白 (hexose transporter, HT), 最终进入疟原虫体内^[4]。由于无氧糖酵解产生 ATP 效率低下, 疟原虫需要摄取大量葡萄糖以维持正常生长^[5]。

GLUT1 在人体内广泛存在, 是红细胞和血-脑屏障中最主要的 GLUT。有研究报道, 对正常红细胞和感染恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*, *P. falciparum*) 的红细胞进行磷酸化蛋白质组学分析, 发现感染红细胞表面 GLUT1 的磷酸化状态发生改变^[6]; 在伯氏疟原虫 (*Plasmodium berghei*, *P. berghei*) 感染的肝细胞阶段, 肝细胞会上调细胞表面 GLUT1 的表达量和转运效率以增加葡萄糖的摄取^[7]; 而在人类遗传疾病 GLUT1 缺陷综合征中, GLUT1 磷酸化状态的改变也会影响葡萄糖的正常吸收^[8]。可见, GLUT1 的磷酸化水平对其在细胞表面的表达量及葡萄糖转运效率至关重要。

GLUT1 的磷酸化既可能引发胞浆内的 GLUT1 囊泡转位到细胞膜, 又可能调控细胞表面 GLUT1 的葡萄糖转运效率。而红细胞缺乏囊泡转运机制, 只能

基金项目 天津市教科科研计划项目 (2018KJ085)

作者简介 徐子豪 (1996-), 男, 硕士在读, 研究方向: 免疫学; 通信作者: 王倩, E-mail: wangq@tmu.edu.cn。

通过调节 GLUT1 转运葡萄糖的速率来调节葡萄糖的摄取^[8]。为了探究感染红细胞 GLUT1 磷酸化状态对葡萄糖吸收的影响,本实验室前期已经对正常和感染恶性疟原虫的红细胞膜蛋白进行质谱分析,找到一些与疟原虫感染相关的 GLUT1 特异性磷酸化位点。由于红细胞无法进行基因转染,为了研究这些位点的磷酸化状态在疟原虫感染红细胞中的作用,本研究首先拟在其他细胞中检测这些位点的磷酸化对细胞表面 GLUT1 表达量和转运葡萄糖效率的影响。为了尽量降低内源性 GLUT1 对检测的影响,选择低表达 GLUT1 的小鼠胚胎成纤维细胞系 NIH/3T3 进行细胞表面 GLUT1 表达水平的定量检测。GLUT1 为 12 次跨膜蛋白,直接用抗体检测 GLUT1 的细胞外结构域灵敏度较低^[9],且其 N 端和 C 端均朝向细胞质内。因此,为了更为准确地检测细胞表面 GLUT1 的表达水平,本研究首先通过分子克隆的方法,在人 GLUT1 第一个胞外区中插入 2×FLAG 序列,以 pcDNATM4/TO/myc-His B 为载体,构建 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1,并将其导入 NIH/3T3 细胞中,利用抗 FLAG 抗体,即可定量检测细胞表面 GLUT1 的表达水平,为后续探究疟原虫感染红细胞 GLUT1 磷酸化位点的功能提供了必要的分子工具。

1 材料与方法

1.1 材料 细胞系、质粒和菌株小鼠胚胎成纤维细胞系 NIH/3T3 于本实验室保存,哺乳动物细胞表达载体 pcDNATM4/TO/myc-His B 由南开大学生命科学院胡俊杰课题组提供,感受态细胞 Mach1-T1 购自北京博迈德基因技术有限公司。

1.2 主要试剂 限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 购自美国 NEB 公司,In-Fusion[®] HD Cloning 试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司,质粒小提试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自全式金生物技术有限公司,质粒中提试剂盒购自 Qiagen 公司;DMEM 培养基、LipofectaminTM 2000 试剂盒购自美

国 Invitrogen 公司,胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;用于流式的 anti-DYKDDDDK,山羊抗兔 IgG (PE-conjugated)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,用于 Western 印迹的 anti-FLAG 抗体购自美国 Sigma 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 目的基因片段 GLUT1-I、GLUT1-II 和 GLUT1-III 的获取 以人类 GLUT1 基因编码区(1~1 479 bp)为模板,在 GLUT1 的第一个胞外区序列中,即在第 55 位氨基酸和第 56 位氨基酸之间插入 2 个连续的 FLAG 标签。首先进行分段 PCR,分别扩增片段 GLUT1-I (G I, 1~165 bp)和 GLUT1-I' (G I', 166~1 479 bp),并在 G I 的上、下游分别引入 *Hind* III 酶切位点和 2×FLAG 序列,G I' 的上、下游分别引入部分 1×FLAG 序列和 *Bam*H I 酶切位点。以 G I' 为模板进一步扩增出片段 GLUT1-II (G II, 166~541 bp)和 GLUT1-III (G III, 517~1 479 bp)(PCR 引物见表 1)。PCR 反应条件:预变性 98 ℃ 5 min,以 98 ℃ 30 s,55 ℃ 20 s,68 ℃ 1 min,循环 35 次,68 ℃ 终延伸 5 min,4℃终止反应。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离鉴定,切胶回收。

1.3.2 重组质粒 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 的构建 通过 overlap PCR 将 G I 和 G II 连接得到片段 G I + II (607 bp,引物为 F231 和 R382),利用 In-Fusion 无缝克隆的方法将片段 G I + II、G III 与经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切后的 pcDNATM4/TO/myc-His B 质粒连接(反应条件为 50℃,30 min)。将连接产物转化至感受态细胞 Mach1-T1 中,在含氨苄的 LB 固体培养基上密集涂布后于 37℃恒温培养箱倒置培养 12~14 h,次日挑取单克隆于 LB 液体培养基中摇菌扩增后提取质粒。酶切鉴定及 DNA 测序确认 2×FLAG 序列成功插入 GLUT1 第一个胞外区,得到重组质粒 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1。大量制备重组质粒用于细胞转染。

表 1 构建重组质粒引物序列

Tab 1 Construction of primer sequences of vector

目的片段	引物名称	引物序列(5' → 3')
GLUT1-I	F231	GCGTTTAAACTTAAGCTTATGGAGCCCAAGCAGCAAG
	R231	CTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGCTCTCCCCATAGCGGTG
GLUT1-I'	F1338	GATAAGATCCTGCCCACCACG
	R1338	CACTGGACTAGTGGATCCTCACACTTGGAATCAGC
GLUT1-II	F382	GATAAGATCCTGCCCACCACG
	R382	CCATGATGGACTCCAGGCCGAACAC
GLUT1-III	F981	GTGTTCCGGCTGGACTCCATCATGG
	R981	CACTGGACTAGTGGATCCTCACAC

注:下划线部分表示酶切位点,粗体部分表示引入的 FLAG 序列;GLUT1:葡萄糖转运蛋白 1

1.3.3 细胞的培养与转染 小鼠胚胎成纤维细胞系 NIH/3T3 在含 10%FBS 的 DMEM 培养基中培养,置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱。当细胞融合度达到 70%~90%时,根据 Lipofectamin™ 2000 试剂说明书,以 OpitMEM™ 培养液分别稀释质粒与转染试剂,将两者混匀后转染细胞,4~6 h 后更换培养基。实验组转染 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 质粒,对照组转染 pcDNA4 空载质粒。

1.3.4 蛋白质印迹法检测细胞内 FLAG-GLUT1 的表达 转染后 24 h 收集细胞,提取总蛋白,加入还原性上样缓冲液后进行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE);凝胶分离后通过湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上(100 V, 2 h);5%脱脂牛奶室温封闭 1 h;FLAG 抗体(1:1 000 稀释)和内参 β-actin 抗体(1:4 000 稀释)4℃孵育过夜;次日以 1×PBST 洗膜 3 遍;辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠第二抗体(1:4 000 稀释)室温孵育 1 h;1×PBST 漂洗 3 遍;采用化学发光法显色并曝光。

1.3.5 流式细胞术检测细胞表面 FLAG-GLUT1 表达 细胞转染后 24 h 使用细胞刮刀将细胞解离,制成单细胞悬液;加入 CD16/32 抗体(1:200 稀释)4℃封闭 15 min;再加入 anti-DYKDDDDK 抗体(1:1 000 稀释)4℃孵育 1 h;1×PBS 洗涤后加入 PE 耦联的山羊抗兔 IgG(1:250 稀释)4℃孵育 30 min;PBS 洗涤后过滤上机检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 重组质粒的构建 为了检测细胞表面 GLUT1 表达量,在 GLUT1 第一个胞外区 Ser55 和 Ile56 之间插入 2×FLAG 序列,从而可以利用 anti-DYKDDDDK 抗体经流式细胞术检测细胞表面的 GLUT1 表达量。本实验选用 pcDNA™4/TO/myc-His B 质粒,含有真核基因 CMV 强启动子,转染细胞后可大量表达目标蛋白。

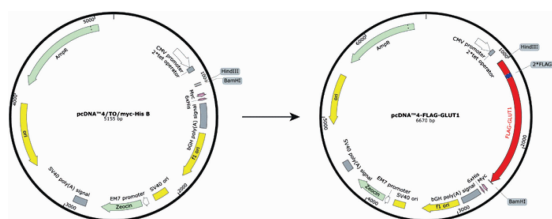
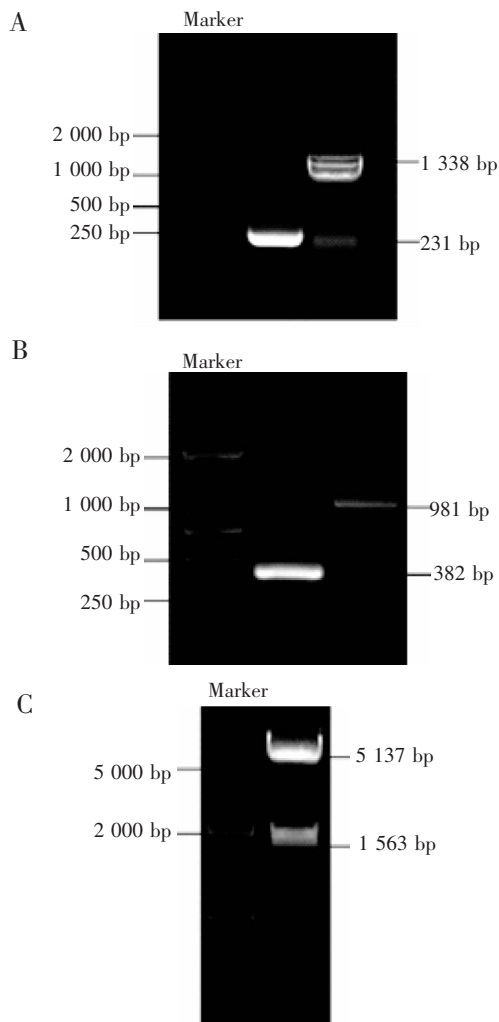


图1 pcDNA™4/TO/myc-His B(左)与 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 质粒图谱(右)

Fig 1 Plasmid profiles of pcDNA™4/TO/myc-His B(left) and pcDNA4-2×FLAG-GLUT1(right)

由于需要在 GLUT1 蛋白内部插入 2×FLAG 序列,首先扩增出 G I 和 G I' 片段(图 2A),在 G I 末端引入 2×FLAG 序列。鉴于 G I 和 G I' 片段大小差距较大,不易直接通过 overlap PCR 进行连接。因此,进一步以 G I' 为模板分别扩增 G II 和 G III 两个小片段(图 2B)。经 overlap PCR 连接片段 G I 和 G II,利用 In-Fusion 无缝克隆技术将片段 G I + II 和 G III 同时插入线性化的质粒 pcDNA4,即得到重组质粒 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1。重组质粒经 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切鉴定插入片段大小正确(图 2C),DNA 测序无误。



注:A:目的片段 G I 和 G I' 的获取;B:目的片段 G II 和 G III 的获取;C:重组质粒 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 双酶切鉴定

图2 重组质粒 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 的构建及鉴定

Fig 2 Construction and identification of plasmid pcDNA4-2×FLAG-GLUT1

2.2 转染后 NIH/3T3 细胞 FLAG-GLUT1 的表达 NIH/3T3 细胞经 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 转染后,检测细胞内转入的 GLUT1 的表达水平。用 anti-FLAG 抗体检测细胞中 FLAG-GLUT1 的总表达量,以 β-actin 作为内参。与转染空载质粒相比,在 40~50 kD

间有一条特异性条带(图3箭头处),大小与 GLUT1 蛋白分子量符合,提示 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 被导入 NIH/3T3 细胞后 FLAG-GLUT1 表达正常。

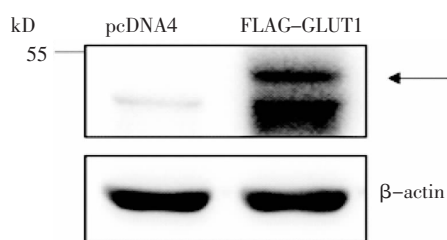


图3 Western 印迹检测 NIH/3T3 细胞转染后 FLAG-GLUT1 蛋白的表达量

Fig 3 Detection of the amount of FLAG-GLUT1 in NIH/3T3 cells by Western blotting

2.3 NIH/3T3 细胞表面 GLUT1 的定量检测 NIH/3T3 细胞经 pcDNA4-FLAG-GLUT1 转染后,用 anti-DYKDDDDK 抗体识别细胞表面 FLAG 标记的 GLUT1 的表达情况。流式检测结果显示,转染重组质粒的细胞表面可检测到 FLAG-GLUT1 的表达,阳性群比例为 $(21.46 \pm 2.375)\%$,明显高于对照组 $(0.01 \pm 0.00)\%$,差异有统计学意义 $(t=9.035, P<0.01)$ (图4),提示可以通过 FLAG 抗体检测细胞表面 FLAG-GLUT1 的表达量的变化。

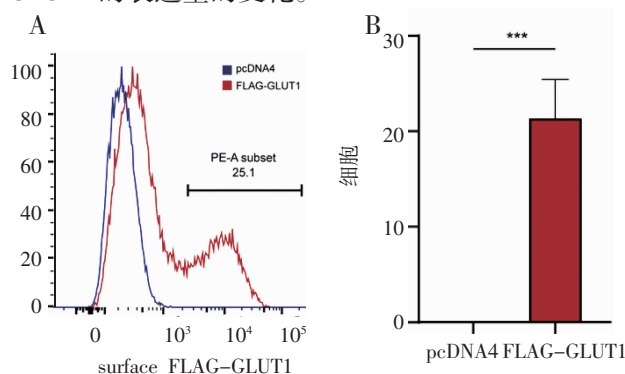


图4 流式细胞术检测细胞表面 FLAG-GLUT1 的表达

Fig 4 Detection of FLAG-GLUT1 expression on cell surface by flow cytometry

3 讨论

疟原虫在人体细胞内寄生需要摄取大量的葡萄糖供能,以维持其生长发育。在疟原虫感染的红细胞期,葡萄糖主要以无氧糖酵解的方式提供能量。目前已建立了恶性疟原虫葡萄糖代谢相关的酶动力学模型,为潜在的药物治疗靶标研究提供了工具^[10]。有研究报道,疟原虫质膜上的己糖转运蛋白也可能成为潜在的药物治疗靶标,通过限制葡萄糖的摄取抑制疟原虫的生长发育^[14,11-12]。

葡萄糖是各种生物最基本的能量来源,主要通过细胞膜上的 GLUTs 被细胞吸收,其中以 GLUT1、2、

3、4 的生理功能最为重要, GLUT1 因发现最早而得名。GLUTs 属于主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS),具有典型的折叠模式,由 12 个跨膜螺旋组成 N 端和 C 端两个结构域,各包含了一对重复的反向结构^[13]。GLUT1 的失活突变会影响葡萄糖转运活性,导致癫痫、大脑萎缩和发育迟缓等一系列症状,称为 GLUT1 缺陷综合征。通过比较捕获到的 GLUT1 和木糖转运蛋白 XyIE 的晶体结构发现, GLUT1 转运机制可能是通过胞内区 4 个 α 螺旋组成的结构域 (intracellular helical bundle, ICH) 与 C 端的相互作用介导的^[14]。在 GLUT1 缺陷综合征已经发现的突变位点中,可能主要通过影响 ICH 与 C 端的相互作用从而影响葡萄糖转运。当细胞内 ATP 充足时, ATP 与 GLUT1 结合,引起 GLUT1 的 loop6-7 和 C 端的相互作用,进而抑制其对葡萄糖的吸收^[15]。有研究表明, GLUT1 的 Ser226 位点的磷酸化可通过上调细胞表面 GLUT1 的表达量和 GLUT1 的活性,增加葡萄糖的吸收^[8]。在肌肉组织中, GLUT1 的 Ser490 位点的磷酸化也通过相似的机制增加葡萄糖的吸收^[16]。上述位点的磷酸化可能改变了 GLUT1 内部的空间结构,影响 N 端和 C 端的相互作用,从而影响葡萄糖的吸收速率。因此,通过对正常和感染恶性疟原虫的红细胞膜蛋白进行质谱分析,筛选出可能的与疟原虫感染的特异性磷酸化位点,从而进一步分析其功能。

本研究构建的 pcDNA4-2×FLAG-GLUT1 重组质粒,在 GLUT1 第一个胞外区中间插入 2×FLAG 序列,转染细胞后,可通过 FLAG 抗体检测细胞表面 GLUT1 表达水平的变化。与常规的直接用 GLUT1 抗体检测细胞表面 GLUT1 的表达相比,具有更高的灵敏度。由于无法对红细胞进行基因转染,在后续的研究中,拟在低表达 GLUT1 的 NIH/3T3 细胞中对质谱筛选出的候选位点进行模拟磷酸化和去磷酸化点突变,通过检测细胞表面 FLAG-GLUT1 表达水平的变化,首先明确特定位点磷酸化状态是否与 GLUT1 囊泡转位相关;继而在体外将纯化蛋白 FLAG-GLUT1,并重组至脂质体中,借助 ^3H 标记的 2-脱氧-D-葡萄糖检测其转运葡萄糖的速率,鉴定这些磷酸化位点对 GLUT1 活性和表达量的影响,从而推测 GLUT1 的磷酸化在疟原虫感染的红细胞发挥的潜在功能。

综上所述, GLUT1 对于疟原虫在红细胞期的生长发育十分重要,本研究不仅为检测 GLUT1 在细胞膜上的表达水平提供了有力的工具,更有助于后续进一步研究 GLUT1 磷酸化在疟原虫感染过程中的作用。

参考文献:

- [1] World Health organization. World malaria report 2019[R]. Geneva: World Health organization, 2019
- [2] Tuteja R. Malaria—an overview[J]. FEBS J, 2007, 274(18):4670
- [3] Vander Jagt D L, Hunsaker L A, Campos N M, et al. D-lactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1990, 42(2):277
- [4] Joet T, Eckstein-Ludwig U, Morin C, et al. Validation of the hexose transporter of *Plasmodium falciparum* as a novel drug target [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(13):7476
- [5] Itani S, Torii M, Ishino T. D-Glucose concentration is the key factor facilitating liver stage maturation of plasmodium[J]. Parasitol Int, 2014, 63(4):584
- [6] Bouyer G, Reininger L, Ramdani G, et al. *Plasmodium falciparum* infection induces dynamic changes in the erythrocyte phospho-proteome[J]. Blood Cells Mol Dis, 2016, 100(58):35
- [7] Meireles P, Sales-Dias J, Andrade C M, et al. GLUT1-mediated glucose uptake plays a crucial role during *Plasmodium hepatic* infection[J]. Cell Microbiol, 2017, 19(2):e12646
- [8] Lee E E, Ma J, Sacharidou A, et al. A protein kinase C phosphorylation motif in GLUT1 affects glucose transport and is mutated in GLUT1 deficiency syndrome[J]. Mol Cell, 2015, 58(5):845
- [9] Zhao Y X, Wieman H L, Jacobs S R, et al. Mechanisms and methods in glucose metabolism and cell death[J]. Methods Enzymol, 2008, 442(22):439
- [10] Penkler G, Du Toit F, Adams W, et al. Construction and validation of a detailed kinetic model of glycolysis in *Plasmodium falciparum*[J]. FEBS J, 2015, 282(8):1481
- [11] Slavic K, Krishna S, Derbyshire E T, et al. Plasmodial sugar transporters as anti-malarial drug targets and comparisons with other protozoa[J]. Malar J, 2011, 10(1):165
- [12] Slavic K, Delves M J, Prudêncio M, et al. Use of a selective inhibitor to define the chemotherapeutic potential of the plasmodial hexose transporter in different stages of the parasite's life cycle[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6):2824
- [13] Shi Y G. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters[J]. Annu Rev Biophys, 2013, 42(1):51
- [14] Deng D, Xu C, Sun P, et al. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1[J]. Nature, 2014, 510(753):121
- [15] Blo dgett D M, De Zutter J K, Levine K B, et al. Structural basis of GLUT1 inhibition by cytoplasmic ATP[J]. J Gen Physiol, 2007, 130(2):157
- [16] Andrisse S, Patel G D, Chen J E, et al. ATM and GLUT1-S490 phosphorylation regulate GLUT1 mediated transport in skeletal muscle[J]. PLoS One, 2013, 8(6):e66027

(2020-06-19 收稿)

(上接第 520 页)

- [2] Yu C Y, Niu X L, Du Y R, et al. IL-17A promotes fatty acid uptake through the IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 axis to fuel ovarian cancer growth in an adipocyte-rich microenvironment[J]. Cancer Immunol Immunother, 2020, 69(1):115
- [3] Monteleone I, Pallone F, Monteleone G. Th17-related cytokines: new players in the control of chronic intestinal inflammation[J]. BMC Med, 2011, 9:122
- [4] Xing X, Yang J, Yang X, et al. IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(12):e85032
- [5] Numasaki M, Tsukamoto H, Tomioka Y, et al. A heterodimeric cytokine, consisting of IL-17A and IL-17F, promotes migration and capillary-like tube formation of human vascular endothelial cells[J]. Tohoku J Exp Med, 2016, 240(1):47
- [6] Li S S, Li C K, Tang M Y, et al. Modeling ovarian cancer multicellular spheroid behavior in a dynamic 3D peritoneal microdevice[J]. J Vis Exp, 2017, (120):27
- [7] Chen Z J, Zhang Z, Xie B B, et al. Clinical significance of up-regulated lncRNA NEAT1 in prognosis of ovarian cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(16):3373
- [8] Beltran E G, Denisenko T V, Zhivotovsky B, et al. Tudor staphylococcal nuclease: biochemistry and functions[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(11):1739
- [9] Liang H, Yu T, Han Y, et al. LncRNA PTAR promotes EMT and invasion-metastasis in serous ovarian cancer by competitively binding miR-101-3p to regulate ZEB1 expression[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1):119
- [10] Azais H, Mordon S, Collinet P. Intraperitoneal photodynamic therapy for peritoneal metastasis of epithelial ovarian cancer. Limits and future prospects[J]. Gynecol Obstet Fertil Senol, 2017, 45(4):249
- [11] Ladanyi A, Mukherjee A, Kenny H A, et al. Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis[J]. Oncogene, 2018, 37(17):2285
- [12] Nakamura K, Sawada K, Kinose Y, et al. Exosomes promote ovarian cancer cell invasion through transfer of CD44 to peritoneal mesothelial cells[J]. Mol Cancer Res, 2017, 15(1):78
- [13] Sugauchi F, Orito E, Kato H. The complete nucleotide sequences of serotype 'O' and 'A' Indian vaccine strains of foot-and-mouth disease virus[J]. Arch Virol, 2011, 156(11):2117
- [14] Jayakumar A, Bothwell ALM. Functional diversity of myeloid-derived suppressor cells: the multitasking hydra of cancer[J]. J Immunol, 2019, 203(5):1095
- [15] Chen Y, Zhong M, Yuan G, et al. Interleukin-17 induces angiogenesis *in vitro* via CXCL8 and CCL2 in retinal pigment epithelium[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3):4627
- [16] Ohman A W, Hasan N, Dinulescu D M. Advances in tumor screening, imaging, and avatar technologies for high-grade serous ovarian cancer[J]. Front Oncol, 2014, 4:322
- [17] Worzfeld T, Pogge E, Huber M, et al. The unique molecular and cellular microenvironment of ovarian cancer[J]. Front Oncol, 2017, 7:24
- [18] Nieman K M, Kenny H A, Penicka C V, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth[J]. Nat Med, 2011, 17(11):1498

(2020-06-16 收稿)