

## 新型肿瘤标志物人 PF4 重组 表达、活性鉴定及单克隆抗体制备\*

王红梅,陈晔洲,田晶晶,刘欢,段生宝,丁少华,蒙青林,李勇

(中国科学院苏州生物医学工程技术研究所,中科院生物医学检验技术重点实验室,江苏苏州 215163)

**摘要:**目的 构建重组表达质粒 pET28a-PF4,诱导表达重组人 PF4(rhPF4),制备 rhPF4 的单克隆抗体。方法 将 pUC-57-PF4 质粒中的 PF4 基因克隆到原核表达质粒 pET28a 上,在 BL21 菌株中诱导表达,对表达的蛋白进行亲和层析纯化和 SDS-PAGE 及 western blotting 鉴定;MTT 法检测 rhPF4 对对数生长期 EA.hy926 细胞的生长抑制作用;以 rhPF4 为免疫原,通过细胞融合技术制备抗 rhPF4 的单克隆抗体。结果 重组质粒在 BL21 菌株中高效表达,rhPF4 占总蛋白的 19%,表达蛋白分子量约 14 KDa,与商品化人 PF4 单抗呈阳性反应;rhPF4 可抑制内皮细胞 EA.hy926 的生长繁殖;建立的杂交瘤细胞株能稳定产生抗 rhPF4 单克隆抗体。结论 建立的 BL21 菌株可高效表达可溶性的 rhPF4,该 rhPF4 能抑制 EA.hy926 的生长繁殖,制备的抗 rhPF4 单克隆抗体可用于新型肿瘤标志物 PF4 的检测试剂的开发。

**关键词:**血小板因子 4;基因表达;活性鉴定;单克隆抗体;肿瘤标志物

中图分类号:R392-33 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)05-012-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.05.005

## Recombination, Expression, Activity Identification and Monoclonal Antibody Preparation of the Human Platelet Factor 4 as a New Cancer Marker

WANG Hong-mei, CHEN Ye-zhou, TIAN Jing-jing,

LIU-huan, DUAN Sheng-bao, DING Shao-hua, MENG Qing-lin, LI Yong

(CAS Key Lab of Bio-Medical Diagnostics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering  
and Technology, Chinese Academy of Sciences, Jiangsu Suzhou 215163, China)

**Abstract:** **Objective** To express recombinant human platelet factor 4 (rhPF4) with biological activity in *E. coli* by constructing a recombinant plasmid pET28a-PF4, and obtain monoclonal antibodies (MAbs) against rhPF4. **Methods** The cDNA of PF4 was amplified from pUC-57-PF4 by PCR, subcloned in the pET28a expression vector and expressed in BL21. The recombinant protein was purified by his Trap HP and identified by SDS-PAGE and western blotting. The MTT test was used to determine whether the rhPF4 suppress the growth of EA.hy926 cells in exponential phase. The purified rhPF4 was used to immunize BALB/c mice for producing MAbs. **Results** The recombinant protein, with a molecular weight of about 14KDa, was expressed in a high expression level, 19% of the total cell protein, and reacted positively with commercial PF4 MAbs. The rhPF4 could suppress the growth of endothelial cell EA.hy926. The hybridoma cell lines could constantly produce MAbs against rhPF4. **Conclusion** rhPF4 can be expressed with high efficiency in BL21 as a soluble protein, and it can suppress the growth of EA.hy926. The MAbs against rhPF4 be applied in the development of diagnostic reagent for new cancer marker PF4.

**Keywords:** platelet factor 4 (PF4); gene expression; activity identification; monoclonal antibody; cancer markers

血小板因子 4(platelet factor 4, PF4)是血小板分泌趋化性细胞因子 CXC 亚家族,天然活性 PF4 是四聚体糖蛋白结构,单体的分子量为 7.8 KDa<sup>[1]</sup>。PF4 具有中和肝素的活性,是一种抗肝素的凝血因子,作为血小板体内激活的特异指标,是血栓性疾病、血液凝固性增高和血管损伤性疾病的诊断指标之一<sup>[2,3]</sup>。此外,PF4 与多种细胞的生物功能有关,具有趋化因子所共有的调节炎症反应和介导免疫应答的作用,也是一种血管生成的负性调控因子,具有抑制肿瘤血管生长、调节造血干细胞

增殖等功能,所以可在治疗肿瘤和白血病化疗后诱发的骨髓抑制、控制肿瘤的生长转移中发挥有效的作用<sup>[4,5]</sup>,同时 PF4 的含量变化与肿瘤的进展密切相关,因此 PF4 检测有望成为肿瘤诊断及预后判断的一种新方法<sup>[6]</sup>,因此对其进行开发研究将具有很好的科研和临床价值。

天然 PF4 是从人血小板中纯化出来的,价格昂贵、产量少,远不能满足科研和临床的需求。本研究的目的是利用基因工程技术获取有活性的重组人血小板因子 4,为下一步的基础理论研究和临

\* 基金项目:本课题受苏州市科技计划医疗器械与新医药专项(ZXY2012019)资助。

作者简介:王红梅(1981-),女,硕士,助理研究员,主要从事血液免疫学与免疫遗传学研究工作,Tel:15295693728,E-mail:wanghm@sibet.ac.cn。

床应用奠定基础;此外以重组人 PF4 (recombinant human platelet factor 4, rhPF4) 为抗原免疫小鼠, 利用细胞融合技术获得能够产生特异、灵敏的抗人 PF4 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 以期为人 PF4 诊断试剂盒的研发以及深入研究人 PF4 的功能提供物质基础保证。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株及小鼠: 小鼠骨髓瘤细胞株 Sp2/0 来源于军事医学科学院放射与辐射医学研究所免疫室。SMMC7721 和 EA.hy926 细胞(the human umbilical vein cell line) 购自中科院上海细胞库。BALB/c 小鼠 (6 周龄, 雌性) 购自苏州大学动物中心。

1.1.2 试剂和仪器: 根据 NCBI 数据库中的 PF4 基因参考序列(NM-002619.3), 在金唯智生物科技(北京)公司合成 PF4 基因, 装载于 pUC57 载体(pUC-57-PF4, 金唯智提供), pET28a 载体及 NdeI/BamHI 酶均购自 Invitrogen; 蛋白 Marker, DNA Marker 均购自 Thermo Fisher Scientific; 人天然 PF4 及人 PF4 抗体购自 Abcam 公司, IPTG 购自 biosharp, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和 TMB 均购自碧云天。HisTrap HP 纯化柱购于 GE, 其他试剂均为分析纯。蛋白纯化仪(GE AKTA Apurifier), 离心机(Eppendorf Centrifuge 5430R), 凝胶成像仪(BIO-RAD Universal Hood II), 超声破碎仪(SONICS VCX 130), 细胞培养箱(Thermo 3111), 生物安全柜(Thermo 1384), 酶标仪(BioTek Synergy HT)。

### 1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET28a-PF4 表达载体的构建: 根据质粒 pUC57-PF4 序列, 设计一对含 NdeI 和 BamHI 酶切位点的特异性引物, Forward Primer: GGAATTCCATATGGAAGCTGAAGAAGAT, 划线部分为 NdeI 酶切位点; Reverse Primer: CGCGGATCCTCAACTCTCCAAAAG, 划线部分为 BamHI 酶切位点。以 pUC57-PF4 质粒为模板, PCR 扩增 PF4 基因, 在其两端分别引入 NdeI 和 BamHI 酶切位点, 见图 1。PCR 产物经测序验证正确后, 将 PCR 产物和 pET28a 载体分别经 NdeI/BamHI 双酶切, 胶回收并将两个片段用 T4 ligase 连接形成新的质粒载体 pET28a-PF4, 见图 2。

1.2.2 rhPF4 诱导表达、纯化鉴定: 将获得的 pET28a-PF4 载体转入 *E. coli* BL21 菌株, 筛选阳性 pET28a-PF4 重组表达菌株。LB 培养基 (kana, 50  $\mu$ g/ml) 过夜活化培养 pET28a-PF4 重组表达菌株, 至  $A_{600nm} = 0.4 \sim 0.6$ , 再扩大培养 3~5 h

至  $A_{600nm}$  值达 0.6。加入 IPTG 诱导(终浓度 0.8 mmol/L), 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 培养 4 h, 收集菌体, SDS-PAGE 分析目的蛋白表达情况。

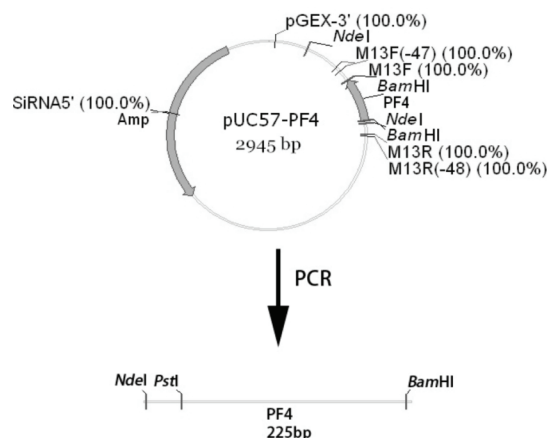


图1 pUC57-PF4 质粒示意图

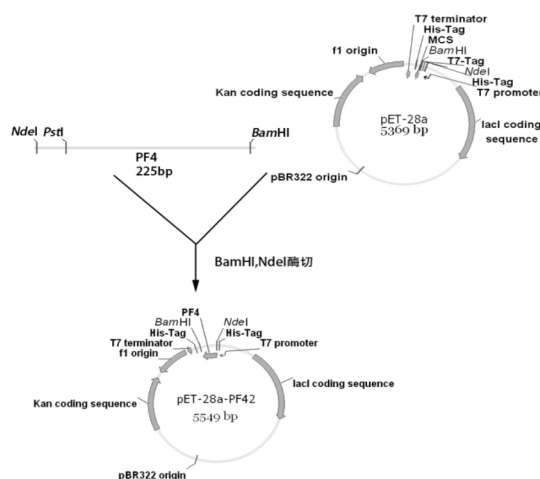


图2 PF4 重组表达载体构建示意图

诱导表达的 His-PF4 重组蛋白用 His 标签经 HisTrap HP 柱层析纯化。具体步骤: 7 500 r/min 离心 15 min 收集菌体沉淀, 沉淀用 Binding buffer A (20 mmol/L sodium phosphate, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole, pH7.4) 洗涤一次。用原菌液 1/10 体积的 Binding buffer A 溶解沉淀制成菌悬液, 超声破碎 (30W, 30 min), 至菌液透亮, 14 000 r/min 离心 10min, 收集上清。层析柱先用 Binding buffer A 以 0.5 ml/min 速度平衡 6 柱体积, 将蛋白上清以 0.5 ml/min 速度上样, 收集滤出液; 蛋白与层析柱结合 2 h, 用 Binding buffer A 洗脱部分杂蛋白, 收集滤出液; 然后用 Elution buffer (20 mmol/L sodium phosphate, 0.5 mol/L NaCl, 500 mmol/L imidazole, pH7.4) 按 0.5 ml/min 的速度洗脱, 收集洗脱峰。

SDS-PAGE 蛋白凝胶和 Western blot 试验初步鉴定纯化的 rhPF4 蛋白。具体的 western 方法: 蛋白样品经 SDS-PAGE 分析, 通过半干转印法, 将蛋白转印到 PVDF 膜上, 抗 His 的单克隆抗体作为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 最后利用 HRP 化学发光底物对膜进行曝光显影。

1.2.3 rhPF4 活性鉴定: EA. hy926 (人脐静脉内皮细胞系) 是来源于人脐静脉内皮的原始细胞与抗硫鸟嘌呤 A549 细胞在 PEG 作用下融合, 并通过 HAT 筛选的单克隆细胞株, 能分泌 F-Ⅷ相关抗原, 具有与内皮细胞相似分化功能, 如血管再生、自体平衡、血压、炎症等。根据报道, PF4 可以调节内皮细胞的周期和 DNA 的合成, 从而抑制内皮细胞的增殖、迁移、抑制血管的生成<sup>[7]</sup>。通过观察 rh-PF4 处理后 EA. hy926 细胞的生长情况, 同时用 SMMC7721 (人肝癌细胞) 作为对照细胞, 鉴定 PF4 的活性。SMMC7721 和 EA. hy926 细胞在 96 孔板中培养, 处于对数生长期, 且细胞生长到约铺满孔底 60% 时, 分别加入 rhPF4 浓度梯度 64 ng/μl, 32 ng/μl, 16 ng/μl 的 rhPF4, PBS 做空白对照, 100 μl/孔。培养 3 天后, MTT 试验测试细胞活力。

MTT 试验时, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml, 用 pH7.4 的 PBS 配制) 20 μl。37℃ 培养 4 h 后终止培养, 小心吸尽孔内的上清液。每孔中加入 150 μl DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 用酶联免疫检测仪测定 490 nm 处的吸光度。

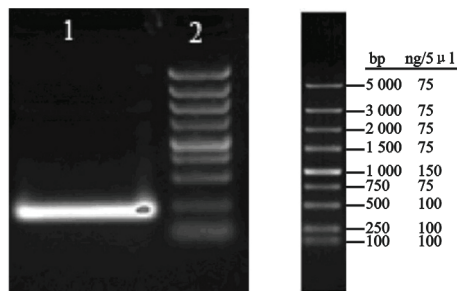
1.2.4 抗 rhPF4 单克隆抗体的制备及鉴定: 以获得的 rhPF4 蛋白免疫 4~6 周龄的 BALB/c 小鼠。参考李勇等<sup>[8]</sup>的方法进行融合, 将免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的鼠 SP2/0 细胞融合, 融合 5 天后换新的 HAT 培养基, 10 天后改用 HT 培养基培养。当融合细胞生长至覆盖 10%~30% 孔时, 用间接 ELISA 方法检测培养上清中是否含有抗 rhPF4 的特异性抗体。筛选抗原为 rhPF4, 挑取强阳性反应的杂交瘤细胞, 用有限稀释法连续克隆 3 次, 得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞经扩大培养后, 分别用于腹腔积液制备和液氮冻存, 用 Western blot 方法分析抗体的特异度, 并测定单抗腹腔积液的效价。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pET28a-PF4 的构建

2.1.1 PF4 基因的扩增: 见图 3 所示, PCR 片段大小与预期产物大小符合。PCR 产物经测序验证正确后, 与 pET28a 载体分别经 NdeI/BamHI 双酶切后连接。将连接产物转化入 *E. coli* DH5α, 涂板, 挑取单克隆, 进行菌液 PCR, 将菌液 PCR 为阳

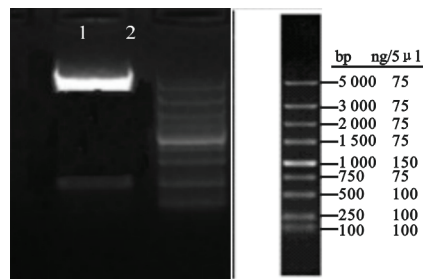
性的菌斑扩培, 抽提质粒, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。



泳道 1: PCR 产物条带; 泳道 2: DNA Marker DS5000 条带。

图 3 PF4 基因的 PCR 产物

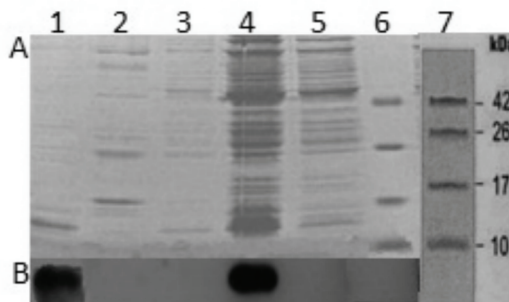
2.1.2 pET28a-PF4 重组子的构建及转化表达: pET28a-PF4 重组质粒经 NdeI/BamHI 酶切鉴定, 见图 4, 质粒酶切条带大小符合预期。质粒经测序验证 PF4 基因正确插入原核表达载体, 未发生碱基突变。



泳道 1: pET28a-PF4 酶切后条带; 泳道 2: DNA Marker DS5000 条带。

图 4 pET-28a-PF4 质粒

2.2 rhPF4 表达纯化及鉴定 pET28a-PF4 表达质粒转化入 *E. coli* BL21 中, IPTG 诱导表达, 收集菌液, SDS-PAGE 检测表达蛋白情况, 见图 5。



A. 16 g/dl SDS-PAGE 电泳图; B. 蛋白与抗 His 标签蛋白单克隆抗体的 western blotting 印迹; 1. Elution buffer 洗脱峰; 2. Binding buffer A 洗脱滤出液; 3. 蛋白上样滤出液; 4. pET28a-PF4-BL21 菌液 IPTG 诱导未纯化蛋白上清; 5. pET28a-PF4-BL21 菌液未诱导蛋白上清; 6. 蛋白 Marker; 7. 蛋白 Marker 电泳条带大小示意图。

图 5 rhPF4 的 16 g/dl SDS-PAGE(A) 和 Western blot(B)

对蛋白产物进行 16 g/dl SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染色, 可见 Elution buffer 洗脱峰有一明显表达条带约 14 KDa (单体), 扫描结果显示, 该特异条带占总蛋白的 19%。Western blot 分析, 用抗 His 标签蛋白的单克隆抗体对融合蛋白进行结合反应, 结果显示仅在 Elution buffer 洗脱峰和



pET28a-PF4-BL21 菌液 IPTG 诱导未纯化蛋白上清与融合表达的蛋白有特异性反应,说明 PF4 在大肠埃希氏菌 BL21 中融合表达,并成功进行纯化。

### 2.3 rhPF4 活性鉴定

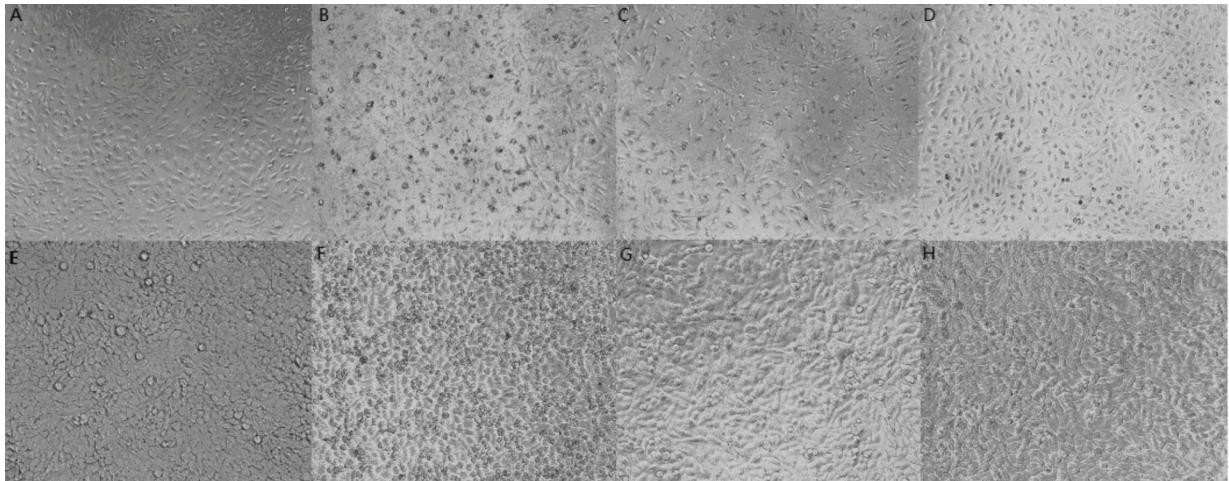


图6 rhPF4 对 EA.hy926 及 SMMC7721 生长抑制情况

2.3.2 MTT 实验结果:见图7。MTT 实验结果可见 rhPF4 处理会抑制 EA.hy926 生长,但对 SMMC7721 无影响。因此 rhPF4 在体外对血管内皮细胞生长具有抑制作用。

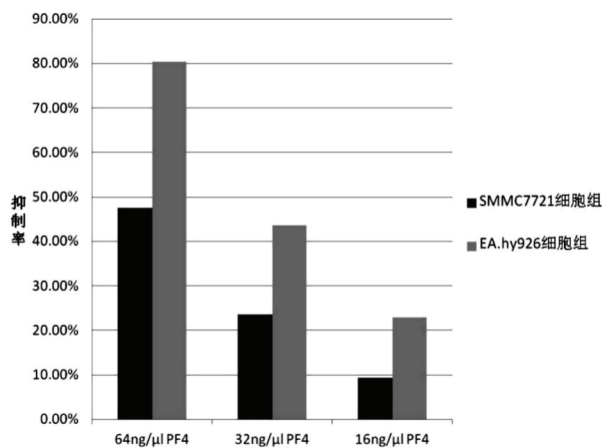
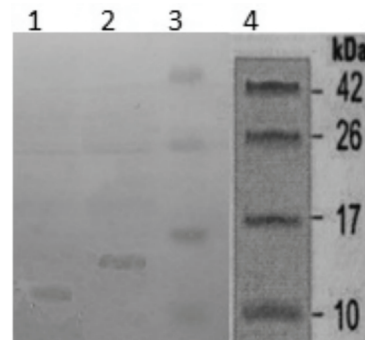


图7 MTT 法检验 rhPF4 对 EA.hy926 及 SMMC7721 细胞生长抑制情况

### 2.4 抗 rhPF4 单克隆抗体的制备及鉴定

2.4.1 rhPF4 单克隆抗体细胞株建立及抗体特异性鉴定: BALB/c 小鼠经纯化的重组蛋白免疫4次后,取其脾细胞和 Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞按 5:1 的比例在 50 g/dl PEG 作用下融合,通过筛选和 3 次克隆后获得 1 株杂交瘤细胞,该杂交瘤细胞能分泌与 rhPF4 发生特异性反应的单抗,进一步验证与天然的 PF4 也有特异性反应,见图8。此株细胞经 6 个月以上体外传代和多次冻存复苏后均能稳定传代并分泌抗体。

2.3.1 细胞形态观察:见图6。图中的细胞形态观察可以看到 rhPF4 处理后,EA.hy926 生长及增殖受到抑制,而且 rhPF4 处理的浓度越高,生长状态越差,但 rhPF4 处理对 SMMC7721 细胞的生长并无影响。



泳道 1:天然人 PF4;泳道 2:rhPF4;泳道 3:蛋白 Marker。

图8 rhPF4 单抗的 western blotting

2.4.2 抗 rhPF4 单克隆抗腹腔积液抗体制备及效价测定:腹腔注射杂交瘤细胞的 BALB/c 小鼠约 7~10 天后腹腔膨大,采集腹腔积液并纯化,测得 IgG 含量为 11.32 mg/ml,纯化后的抗体效价为  $1:10^6$ 。

3 讨论 至今,对于 PF4 的作用机制仍知之甚少,PF4 单体的 C-末端含有肝素结合位点,对 PF4 的整个活动起关键作用,但未确定任何一种 PF4 的细胞表面受体<sup>[9,10]</sup>。当前的研究多集中于 PF4 的结构/功能关系方面:①作为一种血小板分泌的活性蛋白,PF4 可用做血小板体内激活的指标。②PF4 降低了正常骨髓造血干细胞对放、化疗的敏感性,抑制其凋亡,而对肿瘤细胞却无此作用,因此 PF4 可用做肿瘤化疗时骨髓细胞的保护剂<sup>[11,12]</sup>。③治疗血管源性疾病,作为血管生成抑制因子其具有抑制内皮细胞增生及血管生成的活性,可以用于治疗糖尿病性视网膜病变、青光眼等疾病<sup>[13]</sup>。④

抗肿瘤新药:PF4 可与肝素联合用药,抑制肿瘤血管的生成阻碍瘤细胞的生长,可以用于治疗实体瘤。PF4 作为新发现的抑制血管生成的因子,直接作用于增生的毛细血管内皮细胞<sup>[14]</sup>。⑤中和肝素,有效减少肝素副作用的发生率。PF4 及其相关肽段有着各异的生物学活性<sup>[15]</sup>,进一步研究其在调节造血、抑制肿瘤等方面的功能,对于阐明造血机制、治疗肿瘤无疑具有重要意义<sup>[16,17]</sup>,在基础研究和临床应用中有重要的理论价值。此外,在肝素诱导的血小板减少症(heparin-induced thrombocytopenia, HIT)中,肝素和 PF4 形成复合物暴露新的 PF4 抗原决定簇,形成免疫原,刺激机体产生针对肝素/PF4 复合物的抗体,才会导致 HIT 的发生,PF4/肝素复合物是 HIT 抗体诊断试剂盒的抗原<sup>[18]</sup>,PF4 独特的生物学活性,使其在多种疾病治疗方面具有重要的临床应用前景。

鉴于肿瘤患者 PF4 表达水平的改变与肿瘤的类型及进展程度具有相关性,故 PF4 检测可为肿瘤的诊断、鉴别诊断、肿瘤分期及预后评估提供重要的信息<sup>[4,6,19,20]</sup>。PF4 作为一个新鉴定出的肿瘤相关分子标志物,其在肿瘤发生的调控机制还有待于深入研究,同时建立更加简单、快捷、灵敏的临床检测方法也是亟待解决的问题<sup>[21]</sup>。

有研究表明,通过基因工程技术, rhPF4 具有和天然 PF4 相似活性,可用于临床诊治<sup>[22,23]</sup>,因此本研究进行了 rhPF4 的表达纯化、活性鉴定及其单克隆抗体制备。实验诱导表达的 6His-PF4 在 SDS-PAGE 电泳凝胶显色中,表观分子量比计算分子量偏大,但对克隆表达的基因进行测序比对,结果同设计一致,对诱导表达的蛋白进行纯化、活性鉴定,证明表达的条带确实是预期的,且从人血小板提纯的 PF4 在 SDS-PAGE 分析中分子量大小也比实际要偏大,可能是蛋白表达时翻译后修饰以及氨基酸的组成等影响了表观分子量,但并不影响其活性。

本研究构建的 pET28a-PF4 原核表达载体,能够保证融合蛋白较高的表达水平,融合蛋白中的 6×His 标签较小,对目的蛋白的结构和功能活性影响较小,且易于纯化。实验获得的融合蛋白以可溶形式存在,充分保持了蛋白的活性,为进一步对 PF4 的结构和功能的研究奠定了基础,利于加快 PF4 的临床应用研究。此外,以获得的 PF4 融合蛋白为抗原,制备获得抗人 PF4 的特异性单克隆抗体,接下来还需对所制备的抗 PF4 单克隆抗体进行全面深入的鉴定和验证,从而为新型肿瘤标志物 PF4 诊断试剂盒的开发及临床应用提供了物质和技术支撑。

## 参考文献:

- [1] Eisman R, Surrey S, Ramachandran B, et al. Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt[J]. Blood, 1990, 76(2): 336-344.
- [2] Kaplan KL, Owen J. Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indicators of platelet activation in vivo[J]. Blood, 1981, 57(2): 119-202.
- [3] Pumphrey CW, Dawes J. Plasma beta-thromboglobulin as a measure of platelet activity. Effect of risk factors and findings in ischemic heart disease and after acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 1982, 50(6): 1258-1261.
- [4] Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2011, 22(1): 1-18.
- [5] Wang Z, Huang H. Platelet factor-4 (CXCL4/PF-4): An angiostatic chemokine for cancer therapy [J]. Cancer Letters, 2013, 331(2): 147-153.
- [6] Cervi D, Yip TT, Bhattacharya N, et al. Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth[J]. Blood, 2008, 111(3): 1201-1207.
- [7] 房明浩. 血小板第 4 因子的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 1999, 7(4): 253-256.  
Fang MH. The progress of research on platelet factor 4 [J]. Journal of Experimental Hematology, 1999, 7(4): 253-256.
- [8] 李勇, 马学严. 实用血液免疫学血型理论和实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 282-311.  
Li Y, Ma XY. The utility of blood immunology: blood type theory and experiment technology [M]. Beijing: Science Press, 2006: 282-311.
- [9] Lecomte-Raclet L, Alemany M, Sequeira-Le Grand A, et al. New insights into the negative regulation of hematopoiesis by chemokine platelet factor 4 and related peptides[J]. Blood, 1998, 91(8): 2772-2780.
- [10] 宋俊玲, 刘海云, 杨岚. PF4 与造血及肿瘤关系的研究进展[J]. 医学信息, 2002, 15(4): 242-244.  
Song JL, Liu HY, Yang L. The research progress of PF4 in Hematopoiesis and cancer [J]. Medical Information, 2002, 15(4): 242-244.
- [11] 顾宏涛, 杨岚, 田琼, 等. WR-2721, PF4 对于全身照射条件下小鼠造血系统保护作用的比较[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(21): 2006-2008.  
Gu HT, Yang L, Tian Q, et al. Comparison of hematopoietic protective effect of WR-2721 and PF4 from total body irradiation in mice [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2003, 24(21): 2006-2008.
- [12] 黄科, 黄绍良, 潘景轩, 等. MIP-1α 和血小板第 4 因子对造血干细胞化疗药物损伤的保护作用[J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(7): 355-358.

(下转 21 页)

- Huang K, Huang SL, Pan JX, et al. Protection of hematopoietic stem cells by MIP-1 $\alpha$  and PF4 against the cytotoxicity of chemotherapeutic[J]. Chin J Hematol, 2000, 21(7): 355-358.
- [13] Abu El-Asrar AM, Mohammad G, Nawaz MI, et al. The Chemokine platelet factor-4 variant (PF-4var)/CXCL4L1 inhibits diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(3): 1956-1964.
- [14] Gupta SK, Hassel T, Singh JP. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(7): 7799-7803.
- [15] Li XK, Jiang LJ, Wang Y, et al. Inhibition of angiogenesis by a novel small peptide consisting of the active fragments of platelet factor-4 and vasostatin[J]. Cancer Letters, 2007, 256(1): 29-32.
- [16] Sandset PM. CXCL4-platelet factor 4, heparin-induced thrombocytopenia and cancer[J]. Thrombosis Research, 2012, 129(Suppl 1): S97-S100.
- [17] Kowalska MA, Rauova L, Poncz M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis[J]. Thrombosis Research, 2010, 125(4): 292-296.
- [18] 王红梅, 田晶晶, 段生宝, 等. 肝素诱导血小板减少症抗体的酶联免疫吸附检测方法研究[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(6): 65-68.
- Wang HM, Tian JJ, Duan SB, et al. Application of ELISA in detecting heparin-induced thrombocytopenia antibodies[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(6): 65-68.
- [19] Pilatova K, Greplova K, Demlova R, et al. Role of platelet chemokines, PF-4 and CTAP-III, in cancer biology[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2013(6): 42.
- [20] Peterson JE, Zurakowski D, Italiano JE, et al. VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients[J]. Angiogenesis, 2012, 15(2): 265-273.
- [21] 康虹阳, 邵会媛, 张 伶. 血小板第 4 因子的抗肿瘤发生机制及其生物学检测[J]. 生命的化学, 2010, 30(2): 318-321.
- Kang HY, Shao HY, Zhang L. The tumor regulating mechanism and the detection of PF4[J]. Chemistry of Life, 2010, 30(2): 318-321.
- [22] Maione TE, Gray GS, Petro J, et al. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides[J]. Science, 1990, 247(4938): 77-79.
- [23] Lippi G, Favaloro EJ. Recombinant platelet factor 4: A therapeutic, anti-neoplastic chimera [J]. Semin Thromb Hemost, 2010, 36(5): 558-569.