

· 基础研究 ·

小鼠紧密连接蛋白 ZO-2 真核表达载体的构建和表达 *

朱冰柯¹ 秦鸿雁² 付伟¹ 梁世倩² 曹秀丽² 韩 骅^{2△} 梁英民^{1△}

(1 第四军医大学唐都医院血液内科 陕西 西安 710038 2 第四军医大学基础部遗传与发育教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:克隆小鼠紧密连接蛋白 ZO-2(zonula occludens protein2)基因构建其真核表达载体,并验证其在 293T 细胞系中的表达,为进一步研究其功能奠定基础。方法:从小鼠淋巴结来源的 cDNA 中分三段分别扩增,通过基因克隆方法获得紧密连接蛋白 ZO-2 基因全长,连接至 pMD-18T 载体中,酶切测序正确后,插入 pEGFP-C2 载体中,构建真核表达载体 pEGFP-C2-ZO2。酶切正确后,瞬时转染入 293T 细胞中,48h 后荧光显微镜观察其绿色荧光 GFP 融合蛋白的表达,并用 Western blot 检测其在转染细胞中的蛋白水平表达。结果:通过酶切鉴定和测序结果证明成功克隆了 ZO-2 基因,western blot 结果表明成功构建了真核表达载体 pEGFP-C2-ZO2。结论:小鼠紧密连接蛋白 ZO-2 基因的获得和真核表达载体 pEGFP-C2-ZO2 的成功构建为下一步研究其生物学功能奠定了基础。

关键词 紧密连接蛋白 ZO-2 293T 细胞 真核表达

中图分类号 Q95-33 Q75 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)11-2001-04

Construction of Eukaryotic Vector of ZO-2 and Expression in 293T Cells*

ZHU Bing-ke¹, QIN Hong-yan², FU Wei¹, LIANG Shi-qian², CAO Xiu-li², HAN Hua^{2△}, LIANG Ying-min^{1△}

(1 Department of Hematology of Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University;

2 Department of Medical Genetics and Development Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT Objective: To clone the mouse tight junction protein ZO-2(zonula occludens protein2) gene, to construct its eukaryotic expression vector and to verify its expression in the 293T cell lines, which will establish the foundation for future research. **Methods:** Three different parts of the tight junction protein ZO-2 gene were clone by polymerase chain reaction (PCR) with the cDNA from mouse lymph node, and to combine all these parts to make the full ZO-2 gene. The amplified fragment was cloned into the pEGFP-C2 vector. The recombinant plasmid was identified and transfected into 293T cells. The expression of ZO-2 protein was verified by fluorescence microscopy and western-blot. **Result:** The gene of full ZO-2 was acquired and the eukaryotic expression vector of pEGFP-C2-ZO2 was constructed. The protein of ZO-2 was successfully expressed. **Conclusion:** Construction of the mZO-2-eukaryotic expression vector will be beneficial to guiding further study of its biological function.

Key words: Zonula occludens protein2; 293T cells; Eukaryotic expression

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)11-2001-04

前言

紧密连接是脊椎动物上皮细胞间及内皮细胞间连接的一种方式,对细胞间隙的封闭起着重要作用。它不仅是细胞间的防御屏障和选择性屏障,同时参与调解细胞的增殖分化和极性形成,此外还可能在上皮细胞或内皮细胞间的黏附信号中起重要作用^[1,2]。ZO-2 是紧密连接蛋白的成员之一,紧密连接蛋白是位于紧密连接的重要膜内蛋白。ZO-2 与 ZO-1、ZO-3 同属于 MAGUK (membrane-associated guanylate kinase-like homologues)家族的成员,它们具有显著的序列同源性,都含有三个 PDZ 结构域、一个 SH3 结构域和一个 GUK 结构域。此外,它们

还包括核定位、核输出信号及一个亮氨酸拉链,这些是其他 MAGUK 家族成员不具有的基序^[3]。它们共同参与构成上皮和内皮细胞间的紧密连接和对上皮极性的维持,经细胞骨架影响细胞的形态和运动及与紧密连接之间的信号传递,而且可能参与紧密连接功能的调节作用^[2]。ZO-2 蛋白在紧密连接部被认为是比较特殊的一员,它通过其 PDZ2 结构域与 ZO-1 相互作用而共同存在于上皮细胞的紧密连接部和非上皮细胞的黏合连接处^[4]。本实验室前期研究发现 ZO-2 与 Notch 途径的重要信号分子 RBP-J 的抑制蛋白 KyoT2 在体外有直接的相互作用^[5],而且研究表明 ZOPs 和胞内的信号传导和转录调节有相关性^[4]。

* 基金项目 国家自然科学基金面上项目(81071874) 国家自然科学基金青年基金项目(100354);

陕西省自然科学基金研究计划项目(2010 JQ 4002)

作者简介 朱冰柯(1983-) 女,硕士研究生,主要研究 Notch 信号途径与白血病的关系。E-mail: zhubingke@yahoo.cn

△通讯作者 梁英民 电话:029-84777841 E-mail:Liangym@fmmu.edu.cn

韩骅 电话:029-84774487, E-mail: huahan@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2012-01-05 接受日期 2012-01-30)

Notch 信号是诱导 EMT 发生的主要信号途径,参与调控恶性肿瘤的侵袭和迁移^[6,7]。EMT 即上皮间充质转化(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)是指上皮细胞丧失其表型并获得间充质表型的过程。它的发生是通过抑制编码紧密连接和黏合连接复合物的基因表达,使上皮间的连接复合物裂解和细胞极性丧失,细胞失去彼此间的连接,并突破基底膜屏障进入细胞外基质,从而获得迁移和侵袭能力^[8,9]。EMT 在成体器官恶性肿瘤的发生发展中具有关键的作用。研究发现在许多癌症类型中 ZOPs 是异位和下调的,而且与 EMT 的发生过程密切相关。缺失 ZO-2 和 ZO-1 细胞间的紧密连接则不能形成,既使下调 ZO-2 也会使得 E-cadherin 呈现无极性分布,从而使紧密连接的功能发生改变,而且 E-cadherin 的变化也是 EMT 的一项重要观察指标。同时 ZO-1 从质膜向胞质的异位和功能失调可以诱导 MDCK 细胞发生 EMT,而 ZO-2 与 ZO-1 有着直接的相互作用^[10]。ZO-2 的异位聚集可导致 M2PK 蛋白水平提高, M2PK 是癌细胞中特异性表达的蛋白^[11]。而本课题组前期的研究发现与 ZO-2 相互作用的 Notch 途径抑制蛋白 KyoT2 是位于胞核的蛋白,是否由于与 KyoT2 的相互作用而导致 ZO-2 的异位改变呢?结合以上研究结果,本研究设想 ZO-2 可能通过与 KyoT2 的相互作用而参与了 Notch 介导的 EMT 过程,基于对这一过程可能的功能机制的探索,我们首先克隆构建了小鼠 ZO-2 基因和其真核表达载体,以期为进一步的研究工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠淋巴结 cDNA,真核表达载体 pEGFP-C2,293T 细胞系为本室保存。大肠杆菌 XL-10 为本实验室保存菌种。胰蛋白胨,酵母提取物为 Oxoid 公司产品。细胞培养用 DMEM 购自 GIBCO 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料公司。La Taq 酶, pMD-18T 载体, Solution I 连接酶,限制性内切酶 ClaI, SalI, XhoI, EcoRI 购自 Takara 生物公司, GFP 抗体购自 Stanta 公司。引物合成及序列分析有上海生工生物技术有限公司完成。细胞裂解液 RIPA,蛋白酶抑制剂 PMSF, PVDF 膜购自 Beyotime。

1.2 实验步骤及方法

1.2.1 分子克隆 PCR 扩增小鼠 ZO-2 基因 根据 Gene Bank (登录号: NM_011597)中小鼠 ZO-2 基因的核苷酸序列,对其开放读码框分三段进行扩增。首先设计并合成了三对引物如下所示:第一对:上游引物 F1 5'-ATCGATATGGAGGAGGT-GATATGG-3',下游引物 R1:5'-CTCGAGACTTTTCTAT-TAACTCCGAGC-3';第二对:上游引物 F2:5'-CTCGAG-GAAACTGCAGCTTGTGGTG-3',下游引物 R2 5'-CG-GAATTCACGTTGATTGTGGCTGT-3';第三对:上游引物 F3:5'-GAATTCAGCCAACGATGGCTGGTTTG-3',下游引物 R3:5'-AAGTCGACCTATAACTCCGTGTCTCGGT-3'。以小鼠淋巴结 cDNA 为模板聚合酶链反应扩增 ZO-2 基因,三段的 PCR 反应条件为:95℃热变性 5min 后进行 40 个循环。扩增参数分别

如下:95℃变性 30s,第一段 61℃退火 30s,第二段 66℃退火 30s,第三段 63℃退火 30s。72℃延伸 40s。所有循环结束后于 72℃延伸 7min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增的结果。

1.2.2 ZO-2 全长的构建及酶切鉴定 将纯化的 PCR 产物分别连入 pMD-18T Vector 中,第一段分别用 Cla 和 Xho 双酶切和 Hind 单酶切,第二段分别用 EcoR, Xho 双酶切和 BamH, Xho 双酶切,第三段 EcoR, Sal 双酶切和 BamH 单酶切的酶切方案鉴定克隆是否正确。选取正确的克隆送测序,测序鉴定正确后,把测序正确的含第一段目的片段的质粒用 Xho 和 EcoR 双酶切后回收纯化所得片段,同时把含第二段目的片段的质粒用 EcoR 和 Xho 双酶切后回收纯化目的片段,把含第三段目的片段的质粒用 EcoR 单酶切后回收纯化目的片段。把回收后的第二和第三段目的片段分别连入第一段目的片段,得到 pMD-18T-ZO2。经 Xho 和 Nco 双酶切可分别获得 852bp, 1605bp 和 3704bp 的 DNA 片段,与预期的片段大小相符,通过基因测序鉴定正确。

1.2.3 真核表达载体 pEGFP-C2-ZO2 的构建及鉴定 将酶切鉴定过的质粒 pMD-18T-ZO2 选用了 Sal 两个酶切位点将目的片段 ZO-2 切下并纯化产物,空载体 pEGFP-C2 选用 Xho 和 Sal 酶切后回收大片段后,把 ZO-2 连入酶切回收后的 pEGFP-C2 载体中, Solution 连接酶 4℃连接过夜。将连接产物转化至宿主菌 E.coli XL10 中,在含有卡那霉素的 LB 琼脂平板上倒置培养过夜。挑取阳性菌落,提取质粒后,用 Cla 单酶切筛选正确克隆并测序鉴定,正确克隆命名为 pEGFP-C2-ZO2。所涉及的相关实验操作方法参考分子克隆实验指南。

1.2.4 细胞培养及转染 293T 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM, 50mL/L CO₂ 37℃饱和湿度下的孵箱中培养。细胞在转染前,分别以每孔 5×10⁵ 个细胞的密度接种于 6 孔板中,第二天在细胞融合约为 80-90% 时,使用脂质体(lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司)进行转染,随后在相应的时间点收获细胞进行相关试验检测。

1.2.5 真核表达载体 pEGFP-C2-ZO2 的蛋白表达检测 转染 48h 后荧光显微镜下观察 293T 细胞的绿色荧光表达情况观察转染效率, Western Blot 检测构建的 pEGFP-C2-ZO2 的蛋白表达。脂质体转染法转染 293T 细胞,每孔细胞约 5×10⁵ 个细胞,共转 2μg 质粒, 48h 后, RIPA 裂解液裂解细胞,提取蛋白。对提取的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 170mA 转膜 2h,脱脂奶粉封闭 1h 后,用抗 GFP 抗体 4℃孵育过夜, PBST 漂洗 3 遍,用 HRP 标记的兔抗羊抗体室温孵育 1h,加入显影剂,化学发光检测目的蛋白。

2 结果

2.1 ZO-2 基因克隆

将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,分别在 1064bp, 1474bp 和 973bp 得到单一条带,与目的片段大小位置相符(图 1),

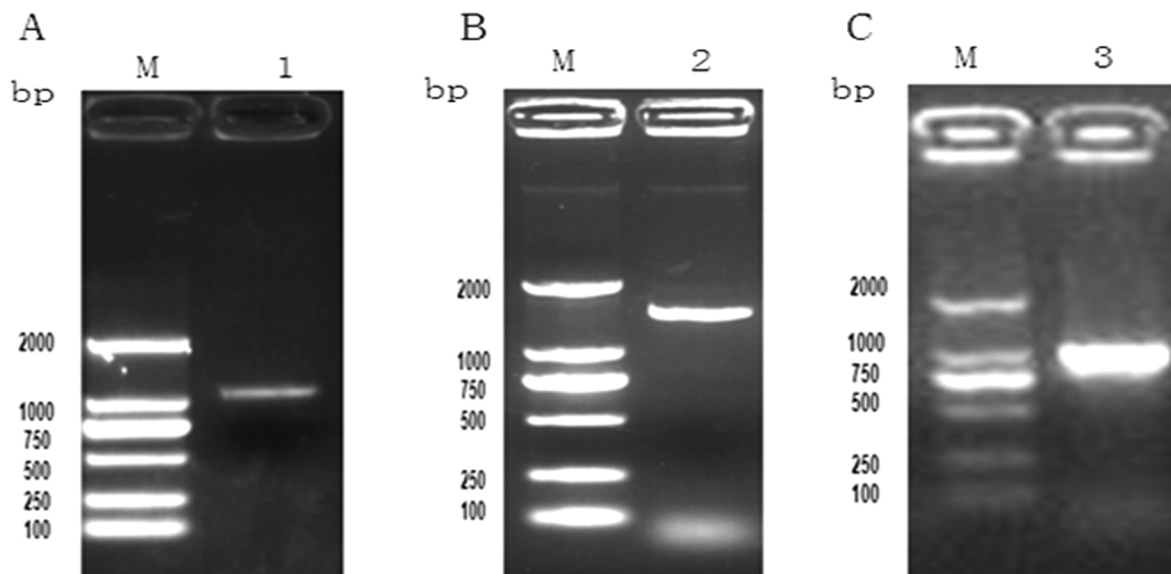


图1 PCR 扩增 ZO-2 三个片段的琼脂糖凝胶电泳图。M 为DNA marker DL2000。A.第一个片段 B.第二个片段 C.第三个片段

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of three PCR products of ZO-2 :M,DNA marker DL2000,A.The first sequence,B.The second sequence,C.The third sequence

将目的片段分别连入 pMD-18T Vector 后,得到的第一个克隆经 *Cla* 和 *Xho* 双酶切和 *Hind* 单酶切可分别获得 1062bp 和 716bp 的 DNA 片段。第二个克隆经 *EcoR* ,*Xho* 双酶切和 *BamH* ,*Xho* 双酶切可分别获得 1504bp 和 1483bp 的 DNA 片段。第三个克隆经 *EcoR* ,*Sal* 双酶切和 *Bam* 单酶切可分别获得 979bp 和 503bp 的 DNA 片段。与预期的片段大小相符(图 2)。

测序结果表明该序列与 Gene Bank 中序列(登录号: NM_011597)完全相符。把测序正确的三个质粒经酶切、回收、连接构建 ZO-2 基因全长得到的 pMD-18T-ZO2,经 *Xho* 和 *Nco* 双酶切可分别获得 852bp,1605bp 和 3704bp 的 DNA 片

段,与预期的片段大小相符(图 3A)。

2.2 ZO2 真核表达载体 pEGFP-C2-ZO2 的酶切鉴定

重组质粒 pEGFP-C2-ZO2 经 *Cla* 单酶切后,可获得约 4735bp 的 DNA 片段,与预期片段大小相符(图 3B)。测序结果表明该序列与 Gene Bank 中序列(登录号: NM_011597)完全相同,且读码框编码正确。

2.3 融合蛋白 pEGFP-C2ZO2 的表达鉴定

用脂质体瞬时转染 293T 细胞 48h 后,在荧光显微镜下观察到绿色荧光蛋白的表达(图 4),收集蛋白,经 Western blot 检测(抗 GFP 抗体)鉴定获得表达正确的 ZO-2 融合蛋白(图 4)。

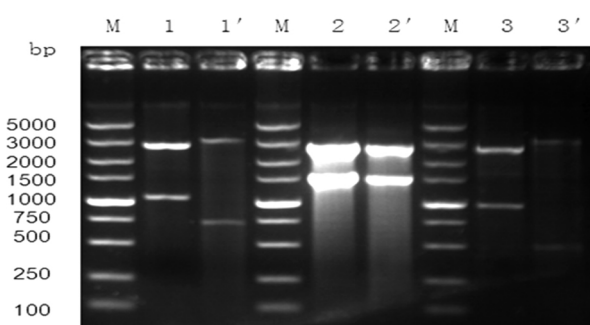


图2 三个分段克隆 pMD18T-ZO2(1,2,3)酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳图。1.*Cla* 和 *Xho* 双酶切结果(1')。 *Hind* 单酶切结果 2. *EcoR* 和 *Xho* 双酶切结果 2'。 *BamH* 和 *Xho* 双酶切结果 3. *EcoR* 和 *Sal* 双酶切结果 3'。 *Bam* 单酶切结果:M为 DNA Marker DL5000

Fig.2 Restriction enzyme digestion of three vectors, pMD18T-ZO2(1,2,3). 1.Double enzyme digestion with *Cla* and *Xho* (1').Enzyme digestion with *Hind* 2. Double enzyme digestion with *EcoR* and *Xho* (2').

Double enzyme digestion with *BamH* and *Xho* 3. Double enzyme digestion with *EcoR* and *Sal* (3'). Enzyme digestion with *BamH* :M, DNA Marker DL5000

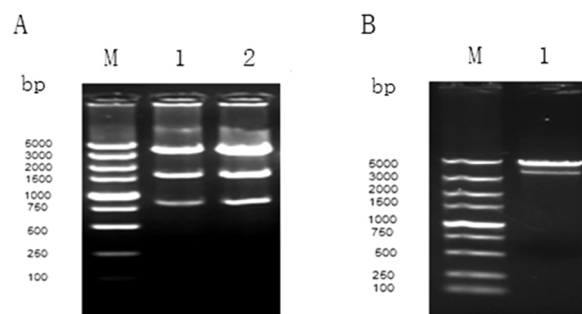


图3A 全长克隆 pMD-18T-ZO2 酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳图。 *Xho* 和 *Nco* 双酶切结果 3B.载体 pEGFP-C2-ZO-2 酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳图。 *Cla* 单酶切结果 :M 为 DNA Marker ,1-2 道为不同克隆酶切结果

Fig.3 A Restriction enzyme digestion of the vector pMD-18T-ZO2,3B Restriction enzyme digestion of the vector pEGFP-C2-ZO2:M,DNA Marker,Line 1-2 is the results of different clones

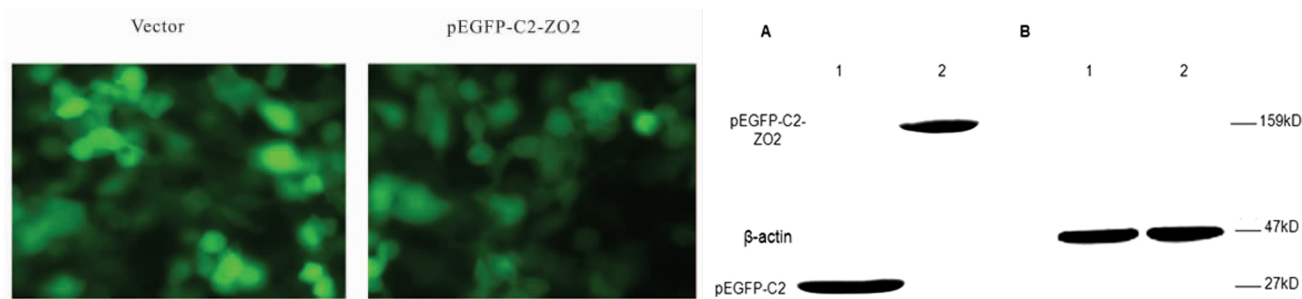


图4 转染后 293T 细胞的荧光显微镜观察及 Western blot 检测蛋白表达结果。A.1 为空载体组 2 为融合蛋白组。B.1 和 2 为β-actin 对照

Fig.4 293T cells were transfected with the pEGFP-C2 and pEGFP-C2-ZO2, and then were examined by fluorescence microscope after immunocytochemistry staining and by western blot for the protein expression.

3 讨论

肿瘤的侵袭与转移是癌症治疗中的最大障碍,因此目前研究主要集中在其发生发展机制,以寻求治疗癌症的突破点。EMT 作为肿瘤转移与迁徙的重要参与者,使细胞间的连接与肿瘤的发生产生了新的联系。EMT 过程中紧密连接出现了功能障碍,细胞与细胞之间的粘附分子和细胞的极性丧失,细胞的迁移和侵袭能力增强。正常细胞间的紧密连接结构由三种膜整合蛋白和其内侧的胞浆蛋白组成,在 EMT 过程中,位于紧密连接的蛋白分子有不同程度的下调缺失和异位。ZO-2 隶属紧密连接部的胞浆蛋白,是紧密连接复合体中的一个关键调节蛋白,ZO-2 的在细胞内定位变化可能参与调控细胞间分离及侵袭转移^[12]。许多研究表明,ZO-2 在许多肿瘤细胞中不正常的失活,它是一个候选肿瘤抑制蛋白,ZO-2 的下调可使紧密连接部的防护功能下调^[13]。这均表明 ZO-2 在 EMT 的发生中具有相关性。那么它是如何参与 EMT 的发生而在肿瘤的发生发展中起作用?基于这方面具体机制的研究较少。ZO-1 与 EMT 的发生直接相关,而 ZO-1 和 ZO-2 具有高度的序列同源性,其编码的氨基酸序列的同源性可达 51%。ZO-2 是通过与 ZO-1 的相互作用而被发现的,它们以复合物的方式定位于紧密连接的胞浆侧,共同参与组成基因表达和细胞功能的信号传导通路^[14]。ZO-1 参与的 TGF-β 诱导 EMT 过程中,可以明显观察到 Notch 配体 Jagged1 和 Notch 靶基因 Hey1 的表达的变化,同时使 Notch 失活则可阻断 TGF-β 诱导的 EMT^[15,16]。而 ZO-2 可以与 Notch 途径的相关分子 Kyo-T2 相结合,综合以上研究我们推断 ZO-2 可能通过 KyoT2 参与了 TGF-β 和 Notch 介导的 EMT 过程。对这一过程的研究将进一步阐明 Notch 调控 EMT 发生过程的机制,为恶性肿瘤中新的治疗靶点奠定理论基础。

小鼠 ZO-2 的分子量为 160kDa,其开放读码框共编码 1167 个氨基酸,分子量为 132kDa^[17]。本实验通过对全长 ZO-2 基因编码区序列的克隆,所得的 DNA 序列与 Gene Bank 所给序列完全相符。通过生物分子克隆技术成功构建了带绿色荧光蛋白 GFP 的真核表达载体,并在真核细胞水平成功表达了带有绿色荧光的 ZO-2 融合蛋白。此融合蛋白使得不仅可以直观的观察蛋白在细胞组织水平的表达量,而且可通过绿色荧光观察其在细胞中的功能定位和蛋白的相互作用,为以后对其在 ENT 发生过程中的功能和分子机制的深入研究奠定了良好的基础。

参考文献(Reference)

[1] Anderson JM, Stevenson BR, Jesaitis LA, et al. Characterization of

ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells [J]. J Cell Biol,1988,106 (4): 1141-1149

[2] Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunction strands in tight junction[J]. Nat Rev Mol Cell Bio,2001,2(4):285-293

[3] Itoh M, Furuse M, Morita K, et al. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins[J]. J Cell Biol,1999,147(6):1351-1363

[4] Itoh M, Morita K, Tsukita S. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin[J]. J Biol Chem, 1999,274(9):5981-5986

[5] 黄红艳,李荣,孙强. LIM 蛋白 KyoT2 与人类紧密连接蛋白 2 的相互作用[J].Acta Genetica Sinica, 2002,29(11):953-958
Huang Hong-yan, Li Rong, Sun Qiang. LIM Protein KyoT2 In-teracts with Human Tight Junction Protein ZO-2 [J]. Acta Genetica Sinica, 2002,29(11):953-958

[6] Wang Z, Li Y, Kong D, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway [J]. Cancer Res, 2009,69(6):2400-2407

[7] Sahlgren C, Gustafsson M, Jin S, et al. Notch signaling mediates hypoxia-induce tumor cell migration and invasion [J]. PNAS,2008,105 (17):6392-6397

[8] Kalluri R, Neilson E G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis[J]. J.Clin.Invest,2003,112:1776-1784

[9] Burns W, Thomas M. The molecular mediators of type 2 epithelial to mesenchymal transition(EMT) and their role in renal pathophysiology [J]. Expert Rev Mol Med,2010,12: 17-23

[10] Manuela R, Thomas M, Walter H. The PDZ domain of Zonula Occludens-1 Induce an Epithelial to Mesenchymal Transition of Madin-Darby Canine Kidney Cells [J]. JBC,2000,275 (13): 9492-9500

[11] Traweger A, Lehner C, Farkas A. Nuclear Zonula occludens-2 alters gene expression and junctional stability in epithelial and endothelial cells[J]. Differentiation,2008,76(1):99-106

[12] Sabath E, Negro H, Beaudry S, et al. Galpha12 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly[J]. J Cell Sci,2008,121(Pt 6):814-824

[13] Metais J Y, Navarro C, Santoni M J, et al. hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells [J]. FEBS Lett,2005,579 (17):3725-3730

(下转第 2016 页)

态性。在国内学者研究中发现,CD患者及健康对照组中均未发现与西方白人CD发病相关的rs11209026存在多态性^[13],而国外报道与CD发病可能相关的rs1004819,rs7517847,rs2201841,在中国CD患者-健康对照组中没有发现在基因型和等位基因型频率上有显著性差异^[14,15]。

本研究通过进行CD患者中IL-23R的rs11465779位点多态性分析,并未发现与中国南方汉族人群CD发病的有相关性。但需要扩大研究人群,提高样本量进行进一步分析,寻找中国人群中的与CD相关的遗传易感基因。

参考文献(References)

- [1] Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3: 521-533
- [2] Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease [J]. Gut, 2008, 57: 1682-1689
- [3] Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene[J]. Science, 2006, 314:1461-1483
- [4] Dubinsky MC, Wang D, Picomell Y, et al. Western Regional Research Alliance for Pediatric IBD.IL-23 receptor(IL-23R)gene protects against pediatric Crohn's disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2007,13(5): 511-515
- [5] Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease [J]. N Engl J Med, 2009,361:2066-2078
- [6] Liu ZJ, Yadav PK, Su JL, et al. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15:5784-5788
- [7] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation [J]. Immunity, 2004,21(4):467-476
- [8] Parham C, Chirica M, Timans J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R[J]. J Immunol, 2002, 168:5699-5708
- [9] Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, et al. IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis [J]. J Exp Med, 2006,203:2485-2494
- [10] Amre DK, Mack D, Israel D, et al. Association between genetic variants in the IL-23R gene and early-onset Crohn's disease: results from a case-control and family-based study among Canadian children [J]. Am J Gastroenterol, 2008,103:615-620
- [11] Taylor KD, Targan SR, Mei L, et al. IL23R haplotype provide a large population attributable risk for Crohn's disease [J]. Inflamm Bowel Dis,2008,14:1185-1191
- [12] Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, et al. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients[J]. J Hum Genet, 2007,2(7):575-583
- [13] 冯赞, 吴恺, 郑萍. 溶质载体 22A4 和 5 基因多态性与中国汉族人群克罗恩病的关联分析[J]. 中华消化杂志, 2009(1): 42-45
Feng Yun, Wu Kai, Zheng Ping. Association of polymorphisms of solute carrier family 22 member 4/5 genes with Crohn's disease in Chinese Han nationality[J]. Chinese Journal of Digestion, 2009(1): 42-45
- [14] Yun Feng, Ping Zheng, Kai Wu, et al. SLC22A4 and SLC22A5 gene polymorphisms and Crohn's disease in Chinese Han population [J]. J Dig Dis,2009,10(3):181-187
- [15] 卢战军, 郑萍. 肉毒碱/有机阳离子转运体基因多态性与克罗恩病相关性的研究[J]. 胃肠病学, 2008,(1):61-63
Lu Zhan-jun, Zheng Ping. Development of Relationship between Carnitine/Organic Cation Transporter Gene Polymorphism and Crohn's Disease[J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2008,(1):61-63
- [16] Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, et al. Integration of TGF- β /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition[J]. EMBO J,2004,23(5):1155-1165
- [17] Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1[J]. Cell Biology And Toxicology,1991,88:3460-3464

(上接第 2004 页)

- [14] Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, et al. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins[J]. J Biomed Biotechnol,2010,2010: 402593
- [15] G H, Si L, Ag L. Distinct mechanisms of TGF- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis [J]. J Clin Invest,2005,115(7):1714-1723