

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.17.003

IL-17 在黏附侵袭性大肠杆菌感染小鼠结肠过程中的作用机制研究 *

张海佳¹ 沙素梅¹ 徐斌^{1,2} 王虎¹ 许冰¹ 王国栋¹ 蒋铭佐¹ 聂勇战¹
吴开春¹ 李孟彬^{1Δ}

(1 第四军医大学西京消化病医院 陕西 西安 710032; 2 中国人民解放军第 174 医院 福建 厦门 361000)

摘要 目的:评价 IL-17 在黏附侵袭性大肠杆菌感染小鼠结肠过程中的作用及其可能机制。**方法:**选择野生型及 IL-17 基因敲除的 SPF 级 C57BL/6 小鼠并随机分成 4 组, 分别给予不同的处理:(1) 野生小鼠 + 单纯蒸馏水灌胃处理组;(2) 野生小鼠 + *E.coli* LF82 (1×10^9 CFU/只) 灌胃 10 天处理组;(3) IL-17 敲除小鼠 + 单纯蒸馏水灌胃处理组;(4) IL-17 敲除小鼠 + *E.coli* LF82 灌胃 10 天处理组。从以下 5 个方面评价各组小鼠的炎症反应和 IL-17 水平:(1) 组织病理评分评估炎症反应严重程度;(2) 透射电镜下观察结肠上皮细胞的超微结构;(3) 免疫组织化学检测结肠分泌的 IL-17;(4) PCR 检测小鼠结肠中 IL-17 mRNA 表达;(5) ELISA 检测结肠组织中 IL-17 的含量。**结果:**定植了 *E.coli* LF82 的 IL-17 敲除小鼠肠道炎症程度和超微结构损伤较野生型小鼠更加严重($P < 0.05$)。与未经 *E.coli* LF82 处理组相比,定植了 *E.coli* LF82 的野生小鼠肠道中 IL-17 mRNA 和 IL-17 含量明显升高($P < 0.05$)。**结论:**IL-17 在 *E.coli* LF82 在黏附侵袭结肠黏膜过程中的保护作用, IL-17 是针对 AIEC 菌株 *E.coli* LF82 免疫的重要效应物, 而结肠局部分泌增加的 IL-17 会改善感染的结果。

关键词:炎症性肠病; 大肠杆菌 LF82; 白细胞介素 17

中图分类号:R-33; R574 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)17-3211-05

The Role and Mechanism of IL-17 in the Colon Infected by Adherent Invasive *Escherichia coli* LF82*ZHANG Hai-jia¹, SHA Su-mei¹, XU Bin^{1,2}, WANG Hu¹, XU Bing¹, WANG Guo-dong¹, JIANG Ming-zuo¹, NIE Yong-zhan¹,
WU Kai-chun¹, LI Meng-bin^{1Δ}

(1 Xijing Hospital of Digestive Diseases, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 No. 174 Hospital of People's Liberation Army, Xiamen, Fujian, 361000, China)

ABSTRACT Objective: To assess the role of IL-17 in the colon of mice infected by adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strain *E.coli* LF82. **Methods:** The wild-type (WT) mice and IL-17KO (IL-17 knockout) mice placed in specific pathogen free (SPF) housing were randomly divided into 4 groups: (1) WT mice + distilled water; (2) WT mice + *E. coli* LF82 by oral gavage for 10 days; (3) IL-17KO mice + distilled water; (4) IL-17KO mice + *E.coli* LF82 by oral gavage for 10 days. Four aspects of the treatment response were evaluated in each group: (1) histological score; (2) transmission electron microscope (TEM) to explore the ultrastructure; (3) the secretion of IL-17 detected by immune histochemistry; (4) the relative quantitative analysis of IL-17 in the colon detected by RT-PCR; (5) the quantitative analysis of IL-17F in the colon detected by ELISA. **Results:** Compared with non-treatment group, the expression of IL-17 mRNA and the activity of IL-17 were significantly higher than that in WT mice ($P < 0.05$). After *E. coli* LF82 treatment, compared with WT mice, the histological score and the ultrastructure in IL-17KO mice improved significantly ($P < 0.05$). **Conclusions:** IL-17 protects colonic epithelial integrity in the colon infected by adherent invasive *Escherichia coli* LF82. IL-17 is an important effector of immunity to AIEC strain *E.coli* LF82, suggesting that an increased local production of IL-17 would improve the outcome of infection.

Key words: Inflammatory bowel disease; *Escherichia coli* LF82; IL-17

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R574 **Document code:**A

Article ID: 1673-6273(2017)17-3211-05

引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease,

CD),是一种可累及全消化道的慢性复发性炎症性疾病,其病因不明,现普遍认为 IBD 由遗传易感个体对肠腔内容物(如细菌、食物)的不恰当免疫反应所致^[1-3]。活动性 IBD 患者血清 IL-17 水平升高^[4],但使用 IL-17 或其受体的单克隆抗体治疗

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81500423, 81370504, 81502082, 81600443)

作者简介:张海佳(1990-),男,硕士研究生,主要研究方向:炎症性肠病的发病机制研究, E-mail: haidao22@126.com

Δ 通讯作者:李孟彬(1969-),男,硕士生导师,副教授,主要研究方向:炎症性肠病的发病机制研究, E-mail: limbin@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-01-04 接受日期:2017-01-26)

IBD 不仅无疗效,反而可能加重 IBD 患者的临床症状。模式动物的研究表明 IL-17 在肠黏膜的免疫调控中可能发挥着不同、甚至截然相反的多重功能。此外,作为一个重要的致病因素,肠道微生物直接或间接地参与了包括 IBD 在内的诸多消化系统疾病的发生发展。其中一类特殊的大肠杆菌--黏附侵袭性大肠杆菌(adherent-invasive *Escherichia coli*, AIEC)是近年来最受关注的 IBD 可能致病菌之一,无论 CD 患者还是 UC 患者,其肠道中 AIEC 的含量均明显高于健康对照^[5]。本研究拟通过模式动物实验探讨 IL-17 在 AIEC 加重的肠道炎症中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

侵袭黏附性大肠杆菌菌株 *E.coli* LF82 由法国克莱蒙费朗第一大学的 Arlette Darfeuille-Michaud 教授馈赠;6-8 周龄,野生型及 IL-17 基因敲除的 SPF 级 C57BL/6 小鼠由南京模式动物中心提供;免疫组化 IL-17 抗体购于美国 Proteintech Group 公司;ELISA 试剂盒购于美国 Millipore 公司;全自动酶标仪(BIO-RAD550)及 Real-time PCR 仪购自美国 bio-rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 细菌培养:在含氨苄青霉素(50 μ g/mL)的 LB 培养基中,挑取 LB 平板中 AIEC 菌株 LF82 单个克隆,置于 37℃ 振荡培养箱,以 220 转/分钟培养约 14 小时,取出摇菌管,吸取 100 μ L,经连续梯度稀释后于分光光度计 OD600 处测定细菌浓度,以 OD600=1 为 1×10^9 mL,计算相应实验所需细菌体积。

1.2.2 动物分组 分笼饲养,平均每笼 6 只。随机分成四组:(1)野生型小鼠+蒸馏水;(2)野生型小鼠+*E.coli* LF82;(3)IL-17 敲除小鼠+蒸馏水;(4)IL-17 敲除小鼠+*E.coli* LF82。

1.2.3 动物处理 AIEC 菌株 *E.coli* LF82 感染小鼠,给予各组小鼠 AIEC 菌株 LF82(1×10^9 CFU/只)灌胃 10 天,空白对照组给予蒸馏水灌胃,目的在于使 AIEC 菌株 *E.coli* LF82 定植在小鼠结肠。10 天后颈椎脱臼处死小鼠,分离结肠,用预冷无菌生理盐水将结肠冲洗干净,分别于结肠末端(距肛门 1 cm)处剪取 0.5 cm 长的结肠,4%甲醛浸泡,石蜡包埋、切片,HE 染色做病理检查,镜下进行组织病理学评分。

1.2.4 HE 染色 标本固定、石蜡包埋、切片及 HE 染色后,由病理科医生采用盲法对病理切片进行评分。依照 Britta Siegmund 等^[6]提出的评分标准。结肠炎的组织学严重程度具体评分标准为:炎症细胞浸润(0-3)和组织损伤(0-3)的组合评分进行。固有层中存在偶发性炎症细胞的评分为 0,固有层中的炎性细胞数量增加为 1,炎症细胞延伸到黏膜下层的为 2,炎性细胞浸润透肠壁为 3。组织损伤方面,无黏膜损伤评分为 0,淋巴上皮损伤评分为 1,表面黏膜侵蚀或局灶性溃疡评分为 2,广泛的黏膜损伤和延伸到肠壁较深的结构为 3。组合的组织学评分范围为 0(无变化)至 6(广泛的细胞浸润和组织损伤)。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测 采用 RT-PCR 的方法,以 GAPDH 为内参,检测结肠组织 IL-17mRNA 的表达。IL-17 基因引物序列 F:5'-GAAGGCCCTCAGACTACCTCAA-3',R:5'-TCATGTG-GTGGTCCAGCTTTC-3'。

1.2.6 免疫组织化学检测 应用标准的三步法(标记的链酶亲和素-生物素法,即 LSAB 法)进行检测 I 抗为 IL-17 特异性单克隆抗体;II 抗为生物素标记山羊抗鼠 IgG 抗体。免疫组化评分的评定标准:以胞浆或胞膜棕黄色颗粒状沉积为阳性。先按阳性细胞比例将无、1%-25%、26%-50%、51%-75%、76%-100% 分别计为 0-4 分;再按染色强度将无、弱、中、强分别计为 0-3 分,其中不着色 0 分,黄色 1 分,棕黄色 2 分,黄褐色 3 分;最后综合两部分得分相乘,总分最高为 12 分,分数越高,阳性越强。

1.2.7 ELISA 检测 称重冷冻的结肠组织,使用冷冻的研钵和研杵在液氮中研磨组织,加入 1 mL 制备的裂解缓冲液/50-100 mg 研磨组织在摇床上在 4℃ 孵育样品 15 min,离心 (10,000 $\times$ g, 4℃, 10 min)以分离结缔组织,脂肪,ECM 等,取上清液测蛋白浓度。

1.3 统计学分析

应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 t 检验或方差分析(AVONA)对各组数据进行比较,当 P<0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠结肠组织病理学

在野生型小鼠中,相比空白对照组,定植了 *E.coli* LF82 的小鼠结肠上皮细胞轻微紊乱和炎性细胞浸润明显。相比野生小鼠,IL-17 敲除鼠定植 *E.coli* LF82 后结肠上皮细胞更紊乱,黏膜上皮细胞脱落,隐窝加深,出现不同程度的上皮增生、黏膜下水肿、炎性细胞浸润也更加明显。由组织学评分结果可知 IL-17 敲除小鼠+*E.coli* LF82 组比野生小鼠+*E.coli* LF82 组评分高,差异有统计学意义(P<0.05),见图 1、图 2。

2.2 小鼠结肠超微结构

透射电镜显示定植 *E.coli* LF82 以后,野生型小鼠肠上皮细胞微绒毛排列有序,而 IL-17 敲除鼠结肠上皮细胞微绒毛大量脱落。进一步研究发现 *E.coli* LF82 能够黏附并侵袭 IL-17 敲除鼠,*E.coli* LF82 不仅损伤结肠上皮细胞微绒毛,还以胞吞的方式侵袭到结肠上皮细胞,而野生小鼠则没有观察到以上现象。本部分研究结果表明 IL-17 能够保护结肠黏膜免于 *E.coli* LF82 的侵袭损伤,见图 3、图 4。

2.3 小鼠结肠组织中 IL-17 表达水平

经 *E.coli* LF82 处理,野生型小鼠结肠免疫因子 IL-17 主要分布于肠道固有层,高倍镜下可见阳性染色主要位于细胞质,呈棕褐色。相比之下,无 *E.coli* LF82 处理组几乎看不到阳性细胞。而 PCR 进一步验证了这一结果,与无 *E.coli* LF82 处理的野生型小鼠相比,经 *E.coli* LF82 处理后的野生型小鼠结肠中 IL-17mRNA 表达水平明显升高(P<0.05),见图 5、图 6 和图 7。

2.4 小鼠结肠组织中 IL-17F 表达水平

与野生型小鼠组相比,野生型小鼠+*E.coli* LF82 组小鼠结肠中 IL-17F 表达水平无差异,*E.coli* LF82 没有引起结肠 IL-17F 水平的升高,表明 IL-17F 对 *E.coli* LF82 无影响。与野生型小鼠+*E.coli* LF82 组相比,IL-17 敲除小鼠+*E.coli* LF82 组小鼠结肠组织中 IL-17F 表达水平也无差异,表明 IL-17 表达水平的升高对 IL-17F 无影响,见图 7。

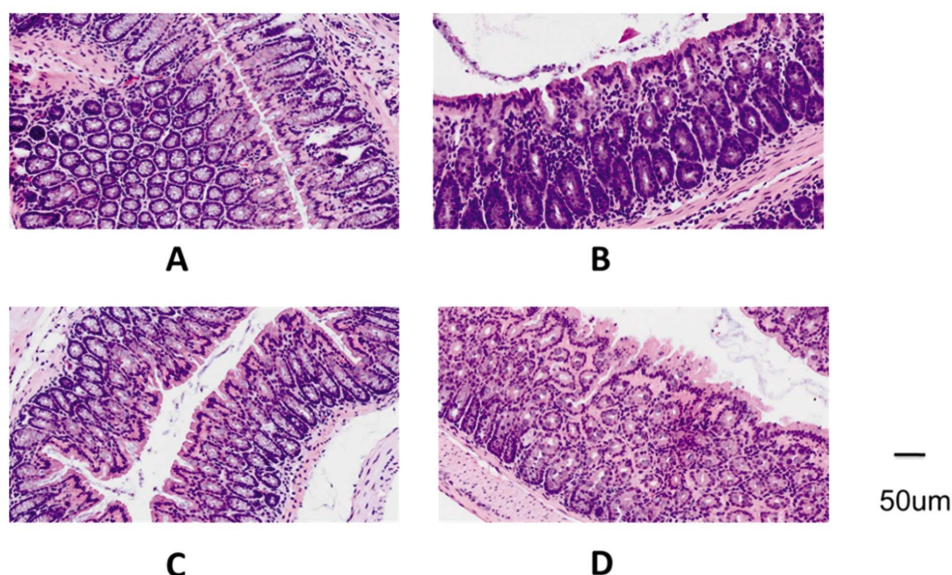


图1 小鼠结肠 HE 染色

Fig.1 HE staining of the mouse colon sections

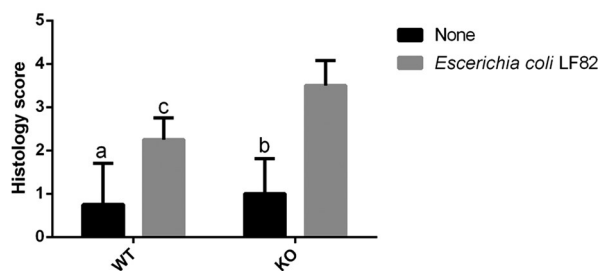
A: WT+ distilled water; B: WT+ *E. coli* LF82; C: IL-17KO+ distilled water; D: IL-17KO+ *E. coli* LF82.

图2 小鼠结肠组织病理评分

Fig.2 The histological scores

Note: Data are expressed as $\pm$ SD, n=6. *P<0.05 vs WT+ *E. coli* LF82;^bP<0.01 vs IL-17KO+ *E. coli* LF82; ^cP<0.05 vs IL-17KO+ *E. coli* LF82.

3 讨论

尽管 IBD 的发病机制尚不明确,但众多研究已证实肠道菌群及免疫是其发病的重要因素。肠道粘膜屏障是肠道对抗病

原菌的第一道防线,肠道菌群失调会导致粘膜屏障受损,引起一系列异常免疫反应,尤其是共生细菌与多种因素相互作用诱导的 T 细胞免疫^[7]。据报道,62%的 CD 患者及 68%的 UC 患者体内均能分离的到具有黏附特性的 *E. coli*,而健康对照体内仅 6%。IBD 患者肠道黏膜下检出的 *E. coli* 具有侵袭特性,其中 CD 患者中检出率为 29%~36%,UC 患者中检出率为 12%~19%,而对照组中仅 3%~9%^[8]。最近一项研究显示小鼠或大鼠肠道定植了黏附侵袭性细菌如鼠类柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodentium*)、肠出血性大肠杆菌(*enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC)O157:H7 和白色念珠菌(*Candida albicans*)会引起肠道 Th17 细胞聚集和 IL-17 分泌,而当细菌失去黏附特性时则不然。Atarashi K^[9]等从人类粪便分离了 20 种可以黏附在小鼠及大鼠肠道上皮的细菌,被黏附的上皮细胞中 NOS2 和 DUOX-A2 表达上调,3 型天然淋巴细胞(3 innate lymphoid cells, ILC3s)和 IgA 应答, Th17 细胞激活。该研究同时选择了另外 17 株梭

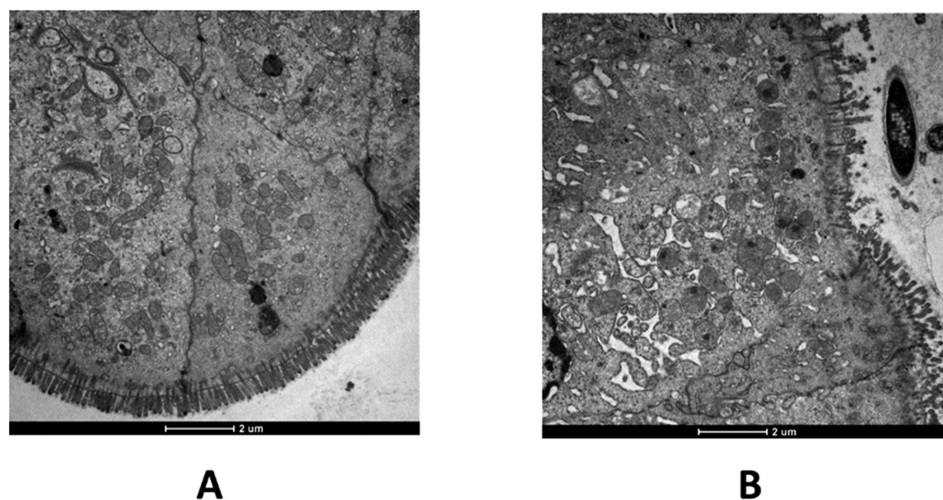


图3 小鼠结肠上皮细胞微绒毛电镜检测

Fig.3 TEM images of microvilli of epithelial surfaces in the colon colonized *E. coli* LF82A: WT+ *E. coli* LF82; B: IL-17KO+ *E. coli* LF82.

状芽孢杆菌作为对照,结果显示这些细菌不能黏附在上皮细胞表面,也无法激活 Th17 细胞,说明黏附对于 Th17 细胞的激活和 IL-17 的分泌是必须的^[9-11]。

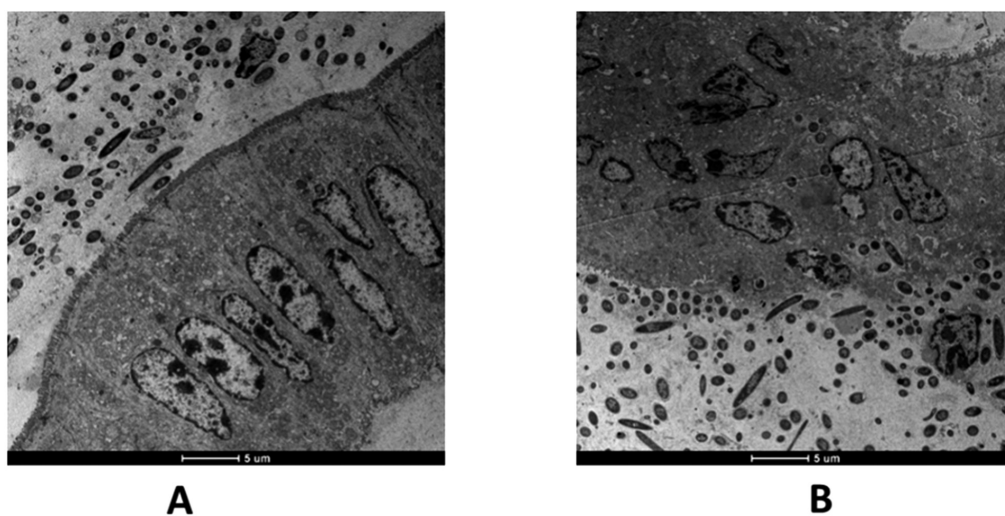


图 4 定植 *E. coli* LF82 的小鼠结肠电镜检测
Fig.4 TEM images of *E. coli* LF82 colonized in the colon epithelial surfaces
A: WT+ *E. coli* LF82; B: IL-17KO+ *E. coli* LF82

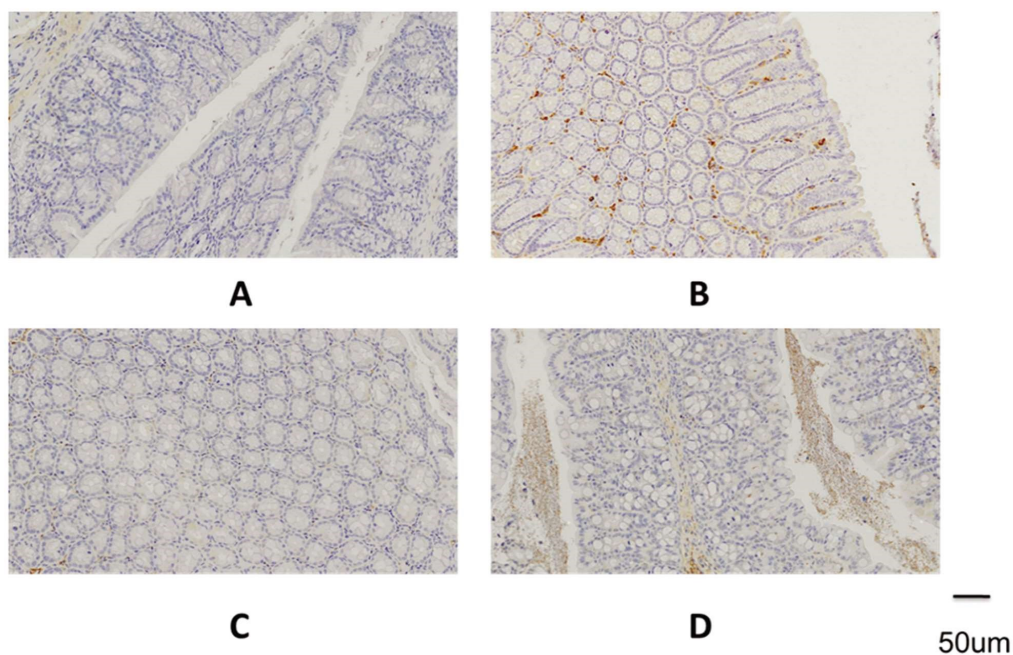


图 5 免疫组化检测小鼠结肠 IL-17 表达
Fig.5 IL-17 detection of the mouse colon sections
A: WT+ distilled water; B: WT+ *E. coli* LF82; C: IL-17KO+ distilled water; D: IL-17KO+ *E. coli* LF82

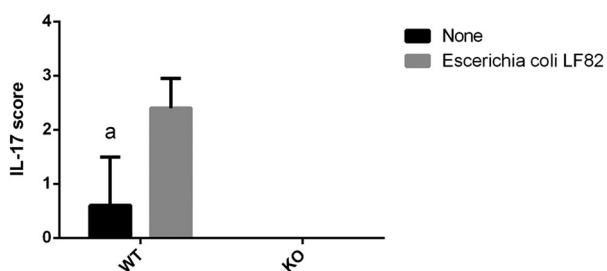


图 6 小鼠结肠 IL-17 免疫组化评分

Fig.6 The immunoreactive score of IL-17 in colon tissues

Note: Data are expressed as $\pm$ SD, n=6. aP<0.01 vs WT+ *E. coli* LF82.

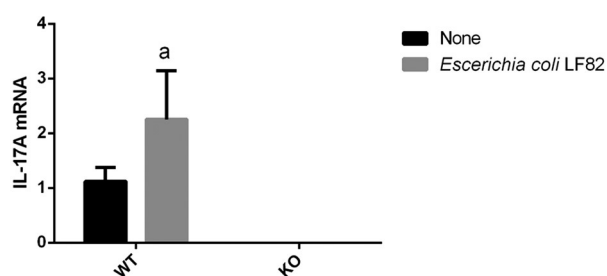


图 7 PCR 检测小鼠结肠 IL-17mRNA 表达

Fig.7 The expression of IL-17 mRNA in colon tissues

Note: Data are expressed as $\pm$ SD, n=6. aP<0.05 vs WT+ *E. coli* LF82.

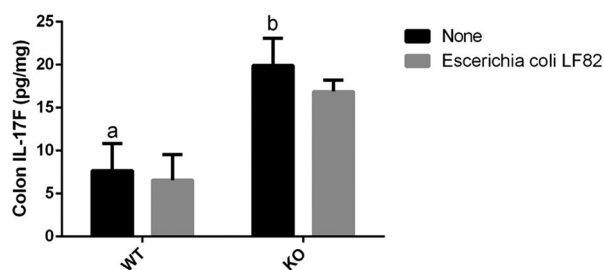


图8 ELISA检测小鼠结肠组织IL-17F的表达

Fig.8 The expression of IL-17F in colon tissues

Note: Data are expressed as $\pm$ SD, $n=6$. aP>0.05 vs WT+ *E.coli* LF82; bP>0.05 vs IL-17KO+ *E.coli* LF82; cP>0.05 vs IL-17KO+ *E.coli* LF82.

在临床患者体内, Fujino 等^[12]首次报道了活动性 IBD 炎症部位肠黏膜的 IL-17 阳性细胞及血清中 IL-17 明显多于缓解期患者, 而局部缺血性肠疾病、感染性肠炎及健康对照肠道均未发现 IL-17 阳性细胞。病例对照研究的^[13]结果还显示 IBD 的发生发展与 IL-17A 基因多态性相关, 且 IBD 患者外周血单个核细胞的 IL-17A 基因启动子区甲基化程度与 mRNA 水平呈负相关。对我国人群的复制研究也发现我国 IBD 患者的易感性与 IL-17F 及 IL-17A 相关并且 IL-17F 的基因突变与某些临床表现有关^[14], 上述研究证实 IBD 与炎症部 IL-17A/IL-17F 表达水平的升高有关系。为了进一步阐明 IL-17 在 IBD 发生发展中究竟是起致病作用还是保护作用, 研究者开始探讨阻断 IL-17 的方法来治疗 IBD。IL-17A 相关中和抗体 secukinumab(anti-IL17A-AIN457)和 brodalumab(anti-IL-17RA-AMG827)相关临床试验的开展就是其中的例子。然而, 这些试验结果显示 secukinumab 不仅无疗效, 反而可能加重 IBD 患者的临床症状, 且其中部分患者出现了皮肤黏膜的念珠菌感染^[15]。

在模式动物的研究方面, 研究表明 IL-17 在肠黏膜的免疫调控中可能发挥着不同、甚至截然相反的多种功能。有研究^[16]显示 IL-17A^{-/-}小鼠经 DSS(dextran sulfate sodium)造模后炎症反应比野生型更轻。然而也有研究显示^[17]降低了血液及结肠组织的 IL-17 可减轻 DSS 诱导的小鼠的炎症。Ogawa 等^[18]在 DSS 诱导的结肠炎小鼠中应用 IL-17 中和抗体, 发现阻断 IL-17 可加重结肠炎症, 同时增加效应性 T 细胞、粒细胞和单核细胞的浸润, 增加肠黏膜炎症细胞因子(包括 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ)的 mRNA 表达水平, 说明 IL-17 可能起抑制肠道炎症的作用。后来, O'Connor 等^[19]也发现了 IL-17 对实验性结肠炎动物的保护作用。

在本研究中, 我们发现经 *E.coli* LF82 处理后, 野生型小鼠结肠组织炎症活动, 并伴随小鼠结肠中 IL-17 升高, 表明 *E.coli* LF82 会对小鼠结肠造成损伤, 但 IL-17 在其中的作用和机制并不清楚。接下来, 我们在野生型小鼠和 IL-17 敲除小鼠中同时应用 *E.coli* LF82 处理, 结果发现 IL-17 基因敲除小鼠炎症更重, 进一步的电镜结果表明 *E.coli* LF82 不仅损伤结肠上皮细胞微绒毛, 还可以胞吞的方式侵袭到结肠上皮细胞, 而野生小鼠中则无以上现象。以上结果表明 IL-17 能够保护小鼠结肠黏膜免于 *E.coli* LF82 的侵袭损伤。

IL-17A 和 IL-17F 都属于 IL-17 家族, 而且 IL-17A 和 IL-17F 结合相同的受体 IL-17RA。IL-17 可通过促细胞分裂剂

激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路诱导 IL-6 和 IL-8 的产生, 并以此将中性粒细胞募集至炎症部位。但当单独使用 IL-17A 或 IL-17F 用于 IL-6 和 IL-8 的表达和产生时, 单独的 IL-17F 具有有限的作用或无作用^[20]。有研究显示 IL-17A 和 IL-17F 能够帮助宿主对抗某些病原菌, 比如在大肠杆菌引起的乳腺炎中 IL-17A 与 IL-17F 联合与宿主病原菌互动^[21]。而我们发现在 *E.coli* LF82 的感染小鼠结肠的过程中, 只有 IL-17 升高并保护结肠黏膜, IL-17F 并无作用。这写结果表明虽然 IL-17 与 IL-17F 作用于相同的受体, 但 IL-17 激活了与 IL-17F 不同的信号通路和细胞因子参与保护肠黏膜的过程。

总之, 本研究采用黏附侵袭性大肠杆菌 *E.coli* LF82 成功诱导小鼠感染模型, 证实了 IL-17 在 *E.coli* LF82 在黏附侵袭结肠粘膜过程中的保护作用。肠道微生物的组成差异可能通过 IL-17 影响 IBD 发生发展。在 IBD 病人中检出率高的 *E.coli* LF82 在 IL-17 缺乏的情况下, 会侵袭损伤结肠粘膜。*E.coli* LF82 并不影响 IL-17F 的分泌, 说明虽然 IL-17F 与 IL-17 结合与相同的受体, 但可能激活了不同的信号通路, 值得进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Huang Y, Chen Z. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(6): 2490-2497
- [2] Pedersen G. Development, validation and implementation of an in vitro model for the study of metabolic and immune function in normal and inflamed human colonic epithelium [J]. Dan Med J, 2015, 62 (1): B4973
- [3] Geremia A, Biancheri P, Allan P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(1): 3-10
- [4] Siakavellas S I, Bamias G. Role of the IL-23/IL-17 axis in Crohn's disease[J]. Discov Med, 2012, 14(77): 253-262
- [5] Conte M P, Longhi C, Marazzato M, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features[J]. BMC Res Notes, 2014, 7: 748
- [6] Siegmund B, Lehr H A, Fantuzzi G. Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice [J]. Gastroenterology, 2002, 122 (7): 2011-2025
- [7] Lawrance I C. Microbiota and management of inflammatory bowel disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(7): 1137-1140
- [8] Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease[J]. Gastroenterology, 2004, 127(2): 412-421
- [9] Atarashi K, Tanoue T, Ando M, et al. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells [J]. Cell, 2015, 163(2): 367-380
- [10] Pedicord V A, Mucida D. "A Sledgehammer Breaks Glass but Forges Steel": Bacteria Adhesion Shapes Gut Immunity [J]. Cell, 2015, 163 (2): 273-274
- [11] Sano T, Huang W, Hall J A, et al. An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to Promote Local Effector Th17 Responses[J]. Cell, 2015, 163(2): 381-393
- [12] Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease[J]. Gut, 2003, 52(1): 65-70

(下转第 3205 页)

- [10] Mano H. The EML4-ALK oncogene: targeting an essential growth driver in human cancer [J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2015, 91(5): 193-201
- [11] Koivunen J P, Mermel C, Zejnullahu K, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13): 4275-4283
- [12] Bayliss R, Choi J, Fennell D A, et al. Molecular mechanisms that underpin EML4-ALK driven cancers and their response to targeted drugs[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences Cmls*, 2016, 73(6): 1-16
- [13] Atay S, Godwin A K. Tumor-derived exosomes: A message delivery system for tumor progression [J]. *Commun Integr Biol*, 2014, 7(1): e28231
- [14] Kumar D, Gupta D, Shankar S, et al. Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells Possible implications for biomarker and treatment of cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 6 (5): 3280-3291
- [15] Rak J. Extracellular vesicles - biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2013, 4: 21
- [16] Yang J, Wei F, Schafer C, et al. Detection of tumor cell-specific mRNA and protein in exosome-like microvesicles from blood and saliva[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e110641
- [17] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(4): 431-437
- [18] Melo S A, Luecke L B, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 523 (7559): 177-182
- [19] Melo S A, Sugimoto H, O'Connell J T, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 707-721
- [20] Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2013, 119(6): 1159-1167
- [21] Liu T, Zhang X, Gao S, et al. Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016
- [22] Yamamoto H, Watanabe Y, Oikawa R, et al. BARHL2 Methylation Using Gastric Wash DNA or Gastric Juice Exosomal DNA is a Useful Marker For Early Detection of Gastric Cancer in an H. pylori-Independent Manner[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2016, 7(7): e184
- [23] Jin Y, Chen K, Wang Z, et al. DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16 (1): 753
- [24] Fukuyoshi Y, Inoue H, Kita Y, et al. EML4-ALK fusion transcript is not found in gastrointestinal and breast cancers[J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(9): 1536-1539
- [25] Teixido C, Karachaliou N, Peg V, et al. Concordance of IHC, FISH and RT-PCR for EML4-ALK rearrangements[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2014, 3(2): 70-74
- [26] Zhang Y G, Jin M L, Li L, et al. Evaluation of ALK rearrangement in Chinese non-small cell lung cancer using FISH, immunohistochemistry, and real-time quantitative RT-PCR on paraffin-embedded tissues[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64821

(上接第 3215 页)

- [13] Kim S W, Kim E S, Moon C M, et al. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease[J]. *Gut*, 2011, 60(11): 1527-1536
- [14] Zhang X, Yu P, Wang Y, et al. Genetic polymorphisms of interleukin 17A and interleukin 17F and their association with inflammatory bowel disease in a Chinese Han population[J]. *Inflamm Res*, 2013, 62 (8): 743-750
- [15] Hueber W, Sands B E, Lewitzky S, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial[J]. *Gut*, 2012, 61(12): 1693-1700
- [16] Ito R, Kita M, Shin-Ya M, et al. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(1): 12-16
- [17] Huang X, Zhang X, Fei X, et al. Effects of *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant on Th17 cell and IL-17A in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis mice [J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2015, 40(12): 1320-1326
- [18] Ogawa A, Andoh A, Araki Y, et al. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. *Clin Immunol*, 2004, 110(1): 55-62
- [19] O'Connor W J, Kamanaka M, Booth C J, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(6): 603-609
- [20] Benedetti G, Bonaventura P, Lavocat F, et al. IL-17A and TNF-alpha Increase the Expression of the Antiapoptotic Adhesion Molecule Amigo-2 in Arthritis Synoviocytes[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 254
- [21] Roussel P, Cunha P, Porcherie A, et al. Investigating the contribution of IL-17A and IL-17F to the host response during *Escherichia coli* mastitis[J]. *Vet Res*, 2015, 46: 56