

occludin 蛋白与人乳腺癌细胞恶性增殖的相关性研究

赵 锐¹ 盛以芸² 朱光能³ 丁淑琴¹ 李友建¹ 夏 俊³

[摘要]目的:探讨 occludin 蛋白的表达与人乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3 恶性增殖之间的关系。方法:四甲基偶氮唑蓝法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞周期,FN 蛋白黏附实验检测细胞黏附力,Transwell 检测细胞迁移,RT-PCR 检测 occludin mRNA 的表达,Western blot、细胞免疫化学技术检测 occludin 蛋白表达。结果:MCF-7 细胞的增殖速度、S 期所占比例、细胞黏附以及细胞迁移均小于 MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$),而 MCF-7 细胞中 occludin mRNA 及蛋白表达水平均高于 MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞 ($P < 0.01$)。结论:occludin 表达与人乳腺癌细胞恶性增殖、黏附及迁移呈一定的相关性。

[关键词] occludin 蛋白;乳腺癌细胞;细胞增殖;细胞周期;黏附;迁移

[中国图书资料分类法分类号] Q 522.5; R 737.9 [文献标识码] A

The relevant research between expression of occludin and the malignancy multiplication in human breast cancer cells

ZHAO Rui¹, SHENG Yi-yun², ZHU Guang-neng³, DING Shu-qin¹, LI You-jian¹, XIA Jun³

(1. Research Center of Clinical Laboratory Science, 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030; 3. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the relationship between the expression of occludin and malignancy multiplication in different human breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and SKBR-3. **Methods:** Cell proliferation was determined by MTT assay. The cell cycle was measured by flow cytometry. The adherence was detected by fibronectin protein. The migration of cells was detected by Transwell. The expression of occludin mRNA was examined by semi-quantitative RT-PCR. Western-blot and immunohistochemistry were used to detect the protein expression of occludin. **Results:** Human breast cancer cell lines MCF-7 cell malignant proliferation. S phase was less than the proportion of human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and SKBR-3 ($P < 0.05 - P < 0.01$). The expressions of occludin mRNA and protein in the human breast cancer cell line MCF-7 were higher than that of human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and SKBR-3 ($P < 0.01$), and the migration and adherence was weaker than that of human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and SKBR-3 ($P < 0.01$). **Conclusions:** The expression of occludin is negatively related with human breast cancer cells malignant proliferation growth, adherence and migration.

[Key words] occludin; breast cancer cells; cell proliferation; cell cycle; adherence; migration

occludin 是第一个发现的定位于紧密连接的跨膜蛋白,相对分子质量为 65 000 ~ 68 000, mRNA 全长 2 379 bp, 基因定位于人类染色体 5q13.1^[1]。occludin 蛋白具有两个胞外环,有两种不同的亚型,但组织分布相似,广泛表达于细胞基侧膜的顶端,曾被认为是紧密连接最可靠的免疫标记蛋白^[2]。研究^[3-6]发现,在子宫内膜癌、胃癌、胰腺癌、原发性肝

癌等肿瘤组织中,occludin 的表达显著下降。occludin 能通过降低细胞间紧密连接功能或影响细胞间信号传导来促进肿瘤的发生、侵袭和转移。本研究探讨不同乳腺癌细胞中 occludin 基因 mRNA 和蛋白表达水平的变化及其与肿瘤细胞恶性增殖之间的关系,以期为进一步研究 occludin 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 细胞株:人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3 由本实验室冻存。(2) 试剂:二甲亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT,上海生工生物工程公司,用 PBS 配制成 0.5 mol/L 浓缩液);RT-PCR 试剂盒(MBI Fermentas

[收稿日期] 2011-03-28

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(kj2007B050)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 临床检验诊断学实验中心 2. 生物化学与分子生物学教研室,安徽 蚌埠 233030; 3. 南昌大学第一附属医院 病理科,江西 南昌 330006

[作者简介] 赵 锐(1982-)男,硕士研究生。

[作者单位] 夏 俊,硕士研究生导师,教授。E-mail: xiajunbmc@126.com

公司); Trizol 试剂(Invitrogen 公司); 鼠抗人 occludin 抗体、纤维连接蛋白(Fibronectin, FN, Human)、 β -actin 抗体(SANTA CRUZ 公司); HRP 标记的山羊抗小鼠的 IgG(北京中杉金桥公司); Western blot 超敏发光液(super ECL plus, 密理博公司); Transwell 小室(Corning 公司); 快速瑞氏-姬姆萨染液(南京建成公司)。(3) 仪器: CO₂ 培养箱(日本科学株式会社); CX-201 超净工作台(蚌埠净化设备厂); FACSCalibur 流式细胞仪(FCM, 美国 BECTON DICKINSON 公司); PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司); Multiskan Ascent 酶标仪(芬兰); 水平垂直电泳槽、电转移装置(美国 BIO-RAD 公司); DDY-1131C 稳流电泳仪(北京六一仪器公司)。

1.2 细胞培养 人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3 接种于含 10% 灭活小牛血清的新鲜高糖 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、饱和湿度为 5% CO₂ 培养箱中培养 2~3 天传代 1 次。所有实验操作均采用对数生长期细胞。

1.3 MTT 检测细胞增殖 接种 2.0×10^3 个细胞于 96 孔板, 含 200 μ l 培养基, 每隔 24 h 每孔加入 10 μ l MTT (5 g/L), 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μ l DMSO, 摇床上常温避光低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 492 nm 波长处测量各孔的吸光度值, 每 24 h 检测 1 次, 连续检测 6 d。每组均设 5 个复孔, 重复 5 次, 取平均吸光度值。

1.4 流式细胞术检测细胞周期 收集各组处于对数生长期的 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞, PBS 洗涤 3 遍, 用预冷的 70% 乙醇 4 °C 固定过夜, 离心弃乙醇, PBS 洗涤 3 遍, 加 50 μ l PBS 重悬细胞, 加 RNase (25 mg/ml) 2 μ l, 37 °C 作用 1 h, 再加 PI (50 μ g/ml) 2 μ l, 混匀, 避光, 冰上放置 30 min, 取 1×10^6 个细胞上流式细胞仪检测。

1.5 FN 蛋白黏附实验检测细胞黏附 Fibronectin 蛋白用 PBS 缓冲液溶解, 按照终浓度为 5 μ g/cm² 包被 24 孔板, 室温孵育 1 h, 吸出多余液体, 去离子水 (ddH₂O) 轻洗 3~5 遍。取各组处于对数生长期细胞, 用无血清 DMEM 培养液制成单细胞悬液, 计数、调整细胞浓度为 1×10^5 /ml, 每孔加细胞悬液 500 μ l, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 1 h。每组细胞 3 个复孔, 重复 3 次。培养结束后, PBS 洗涤 3 遍, 瑞氏-吉姆萨染液染色 5~8 min, ddH₂O 冲洗 3 遍, 自然风干。倒置显微镜下观察, 每孔选取 10 个视野 ($\times 400$) 进行细胞计数, 并照相。

1.6 Transwell 检测细胞迁移 收集 MCF-7、MDA-

MB-231 和 SKBR-3 细胞, 用无血清 DMEM 培养液制成单细胞悬液, 计数、调整细胞浓度为 1×10^5 /ml。Transwell 小室置于 6 孔板内, 上室加入 1.5 ml 单细胞悬液, 下室加入 1.5 ml 含 15% 小牛血清的 DMEM 培养液, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。每组细胞 3 个复孔, 重复 3 次。取出 Transwell 小室, PBS 洗涤 2 遍, 棉拭子轻轻擦去 Polycarbonate 膜上层的细胞, 膜下层细胞用瑞氏-吉姆萨染液染色 5~8 min, ddH₂O 冲洗, 自然风干。将 Transwell 小室置于倒置显微镜下观察, 每个小室选取 10 个视野 ($\times 400$) 进行细胞计数, 并照相。

1.7 RT-PCR 检测 occludin mRNA 表达

1.7.1 总 RNA 抽提与 cDNA 链合成 用不含小牛血清的 DMEM 培养液洗涤收集的 MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3 细胞 2 遍, 计数 5×10^6 个细胞, 加入 DEPC 预处理过的 Eppendorf 管, 离心沉淀后加 Trizol 试剂 1 ml, 按操作说明提取总 RNA。紫外分光光度计测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值, 检测纯度和浓度。取约 2 μ g RNA, 按逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA。

1.7.2 PCR 反应及扩增产物分析 occludin 和 GAPDH 引物由上海 Sangon 公司合成, 引物序列及扩增长度见表 1。

表 1 引物序列及扩增产物长度

引物	引物序列	扩增长度(bp)
occludin	上游: 5'-TAG TGT AGG CTA CCC TTA TGG AG-3'	252
	下游: 5'-ATG CCC AGG ATA GCA CTC AC-3'	
GAPDH	上游: 5'-TGG GAA GGT GAA GGT CGG ACT C-3'	375
	下游: 5'-AGC AGA GGG GCC AGA GAT GAT-3'	

25 μ l PCR 反应体系: PCR Mix 12.5 μ l, free Water 8.5 μ l, 上下游引物各 1 μ l, cDNA 2 μ l (20 pmol/L)。occludin 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 53.4 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 扩增 35 个循环后 72 °C 终止平衡 10 min。GAPDH 反应条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 45 s, 63 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环后 72 °C 终止平衡 10 min。PCR 扩增产物分析: 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, Smart view 凝胶成像系统扫描电泳条带, 以特异性扩增产物条带灰度值 (A) 与 GAPDH 条带灰度值 (A) 之比做半定量, 分析人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR-3 中 occludin 基因表达水平。

1.8 免疫细胞化学检测 occludin 蛋白表达 在

6 孔板内放置处理过的盖玻片,人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3 培养于含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 中,37 ℃、饱和湿度 5% CO₂ 温箱孵育 72 h。PBS 洗涤,预冷的丙酮固定细胞 10 min,PBS 洗涤 3 遍。滴加一抗(1:50) 37 ℃孵育 2 h,PBS 洗涤 3 遍。滴加二抗(1:1 500) 37 ℃孵育 30 min,PBS 洗涤 3 遍。DAB 显色,苏木素复染,二甲苯透明。光镜下选取 10 个视野(×400)进行细胞计数,并拍照。

1.9 Western blot 检测 occludin 蛋白表达 收集 4 × 10⁶ 个 MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3 细胞,用预冷的蛋白裂解液裂解细胞,按说明书操作提取总蛋白,取上清液 16 μl 加 4 μl 5 × 上样缓冲液混匀,沸水浴 5 min。SDS-PAGE(5% 浓缩液,10% 分离胶)电泳,70 V 电泳 3 h。电转移条件为 250 mA 湿转 3 h 将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。丽春红

S 染膜、考马斯亮蓝染胶,通过与蛋白 Marker 比较,确定目的条带位置。5% 脱脂奶粉封闭 3 h,一抗(1:500) 4 ℃孵育过夜,充分洗膜,辣根过氧化物酶标记二抗(1:10 000) 37 ℃孵育 2 h,充分洗膜,ECL 显色。结果经 Smart view 成像系统扫描条带,以目的条带灰度值(A)与 β-actin 灰度值(A)之比作半定量,分析 occludin 蛋白表达水平。

1.10 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 MTT 检测细胞增殖 从第 3 天至第 6 天,MCF-7 细胞增殖速度均低于 MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞(*P* < 0.05 ~ *P* < 0.01),而 MDA-MB-231 与 SKBR-3 细胞增殖速度在第 3 天差异无统计学意义(*P* > 0.05),而第 4 ~ 6 天差异有统计学意义(*P* < 0.05)(见表 2)。

表 2 不同人乳腺癌细胞株细胞增殖速度比较(*n_i* = 6; $\bar{x} \pm s$)

时间(d)	MCF-7	MDA-MB-231	SKBR-3	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> _{组内}
1	0.167 5 ± 0.013 7	0.163 8 ± 0.015 7	0.171 2 ± 0.016 9	0.34	>0.05	0.000 2
2	0.265 5 ± 0.017 7	0.274 0 ± 0.026 3	0.282 1 ± 0.020 7	0.87	>0.05	0.000 5
3	0.336 6 ± 0.024 8	0.426 5 ± 0.036 5**	0.413 8 ± 0.028 7**	15.38	<0.01	0.000 9
4	0.525 3 ± 0.041 9	0.679 6 ± 0.062 0**	0.615 8 ± 0.044 5**△	14.31	<0.01	0.002 9
5	0.734 5 ± 0.061 9	0.908 0 ± 0.068 3**	0.814 7 ± 0.064 8△	10.69	<0.01	0.004 2
6	0.574 1 ± 0.045 9	0.706 2 ± 0.041 8**	0.643 8 ± 0.056 9*△	11.08	<0.01	0.002 4

q 检验:与 MCF-7 比较* *P* < 0.05,** *P* < 0.01;与 MDA-MB-231 比较△*P* < 0.05

2.2 流式细胞术检测细胞周期 结果显示,MCF-7 细胞中 G₁ 期所占比例高于 MDA-MB-231 和 SKBR-3

细胞(*P* < 0.05) 而 G₂、S 期所占比例均低于 MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞(*P* < 0.01)(见图 1、表 3)。

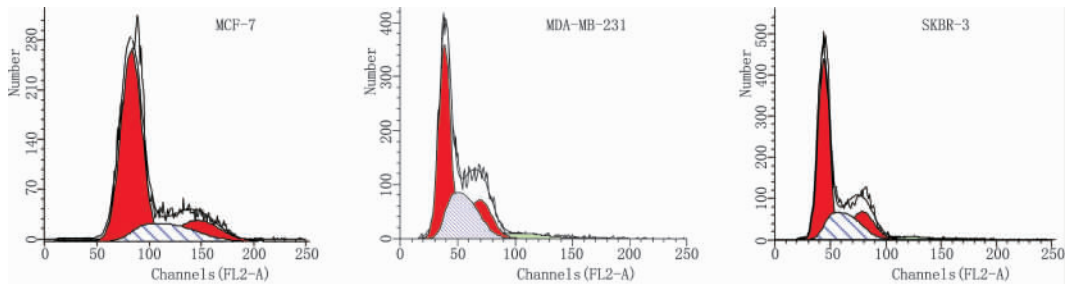


图 1 流式细胞术检测人乳腺癌细胞周期分布

2.3 FN 蛋白黏附实验检测细胞黏附 在 400 倍显微镜下观察、计数并照相,结果显示,MCF-7 的细胞数明显低于 MDA-MB-231 和 SKBR-3(*P* < 0.01) 表明 MCF-7 细胞异质间黏附力较 MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞弱(见图 2、表 4)。

2.4 Transwell 检测细胞迁移 400 倍显微镜下计数,结果显示,MCF-7 细胞通过膜的细胞数显著低于 MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞(*P* < 0.05)(见图 3、

表 5)。

2.5 RT-PCR 检测 occludin mRNA 表达 经 RT-PCR 扩增 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像分析可见 MCF-7 细胞 occludin mRNA 的表达高于 MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞(*P* < 0.01 和 *P* < 0.05);而 MDA-MB-231 与 SKBR-3 细胞之间 mRNA 的表达差异无统计学意义(*P* > 0.05)(见图 4、表 6)。

表3 流式细胞术检测人乳腺癌细胞周期分布 [$n_i = 3; \bar{x} \pm s; \text{百分比}(\%)$]

分组	G ₁	S	G ₂
MCF-7	72.16 ± 5.12	11.01 ± 0.80	12.91 ± 1.49
MDA-MB-231	55.12 ± 4.36*	26.23 ± 2.15**	20.69 ± 1.69**
SKBR-3	60.40 ± 5.12*	26.21 ± 1.75**	15.60 ± 1.38 ^{△△}
<i>F</i>	9.54	70.20	20.13
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	23.916	2.775	2.327

q 检验: 与 MCF-7 比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MDA-MB-231 比较^{△△} $P < 0.01$

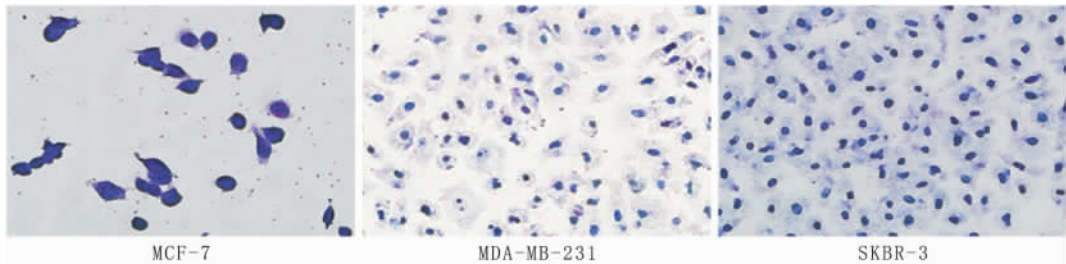


图2 FN蛋白黏附实验检测不同人乳腺癌细胞株细胞黏附

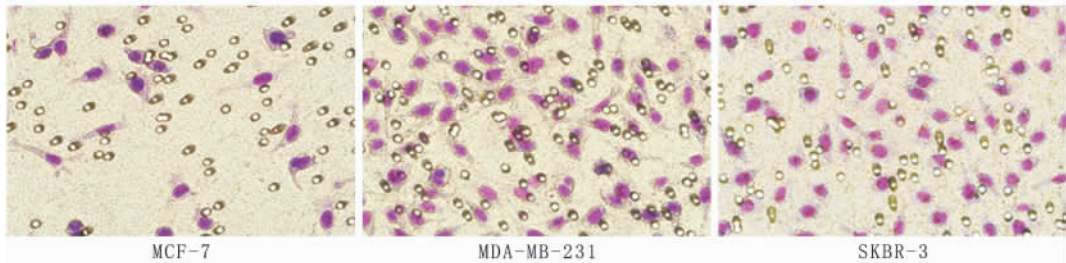


图3 Transwell检测不同人乳腺癌细胞株的迁移

表4 FN蛋白黏附实验检测不同人乳腺癌细胞株细胞黏附($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	细胞数	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> 组内
MCF-7	30 ± 8			
MDA-MB-231	112 ± 15**	27.43	<0.01	216.667
SKBR-3	101 ± 19**			

q 检验: 与 MCF-7 比较** $P < 0.01$

表5 不同人乳腺癌细胞株细胞迁移比较($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	细胞数	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> 组内
MCF-7	72 ± 15			
MDA-MB-231	131 ± 30	5.14	<0.05	567.000
SKBR-3	119 ± 24			

3 讨论

恶性增殖和转移是恶性肿瘤的特征之一,细胞间的相互连接既是维持组织结构稳定的基本条件,也是调节细胞运动和发挥功能的重要因素之一,对

2.6 细胞免疫化学染色检测 occludin 蛋白表达结果显示 MCF-7 细胞胞质内有更深的棕色颗粒信号,可见 occludin 在 MCF-7 细胞中的蛋白表达高于 MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞(见图5)。

2.7 Western-blot 检测 occludin 蛋白表达水平 Smart view 分析结果显示, MCF-7 细胞中 occludin 蛋白表达均高于 MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞($P < 0.01$); 而 MDA-MB-231 与 SKBR-3 细胞之间 occludin 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)(见图6表7)。

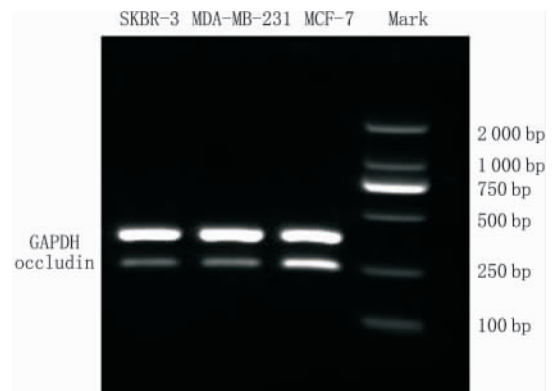


图4 RT-PCR检测不同人乳腺癌细胞中occludin mRNA表达

表6 RT-PCR 检测不同人乳腺癌细胞中 occludin mRNA 表达($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	occludin /GAPDH(%)	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> 组内
MCF-7	40.51 ± 4.24			
MDA-MB-231	27.69 ± 2.93**	12.30	<0.01	14.322
SKBR-3	26.83 ± 4.05*			

q 检验: 与 MCF-7 比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

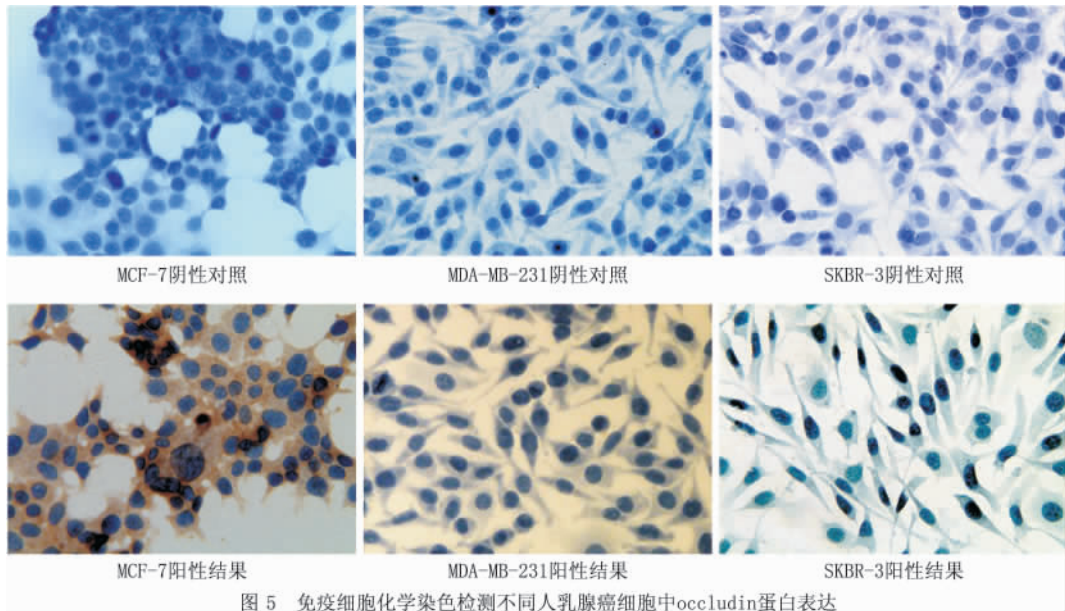


图 5 免疫细胞化学染色检测不同人乳腺癌细胞中occludin蛋白表达

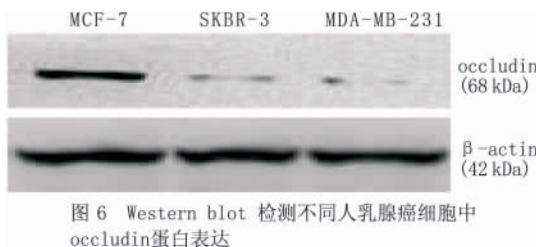


图 6 Western blot 检测不同人乳腺癌细胞中 occludin 蛋白表达

表 7 Western blot 检测不同人乳腺癌细胞中 occludin 蛋白表达 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	occludin / β -actin (%)	F	P	MS _{组内}
MCF-7	38.37 \pm 3.18			
MDA-MB-231	13.45 \pm 1.34 **	128.179	<0.01	4.323
SKBR-3	16.51 \pm 1.03 **			

q 检验: 与 MCF-7 比较 ** $P < 0.01$

细胞的增殖、分化有重要影响。所以,细胞连接机制已成为肿瘤细胞侵袭转移乃至整个细胞生物学研究的热点之一。近年来,随着连接相关分子的发现,以及在众多恶性肿瘤中的异常表达,使其成为越来越多学者关注的热点。肿瘤细胞的侵袭和转移,首先必须从原发癌灶脱离出来,穿过细胞间隙进入血管或淋巴管,随血液或淋巴液的循环形成远端转移。细胞之间的连接结构和功能的改变使恶性肿瘤细胞易于脱离原发组织,造成肿瘤细胞的扩散和远端转移,对人体形成严重危害。研究^[7]发现,occludin 可促进紧密连接(TJS)中选择性离子通道的形成,其机制还不甚清楚。在狗肾传代细胞中高表达的occludin 能降低离子的通透性,增加非带电分子甘露醇的跨膜流动。进一步研究^[8]显示,occludin 可

能是 GTPases 信号传导通路的初始受体,磷酸化的 occludin 可调节 TJS 的渗透性,而与细胞骨架蛋白的活动无关,其具体机制尚不清楚。在 L 型纤维原细胞中重新表达 occludin,能增强紧密连接的屏障功能,在纤维原细胞中过度表达 occludin,能增加非 Ca^{2+} 依赖的黏附作用,表明 occludin 具有调节细胞粘附的功能^[9]。在 Pa4-Raf1 细胞株中,Raf1 抑制 occludin mRNA 的转录,使 occludin 的表达降低,细胞极性丧失,重新表达 occludin 可恢复细胞的极性,表明 occludin 对维持细胞极性发挥重要作用^[10]。在多数肿瘤的发生和发展过程中,occludin 的表达降低或丧失,提示 occludin 与肿瘤的发生、发展和转移密切相关。

Tobioka 等^[3]研究发现,occludin 的表达随着子宫内膜癌的分级升高而进行性降低,同时,随着癌细胞向子宫肌层的浸润和淋巴结转移,occludin 的表达也显著降低。Yin 等^[4]采用原位杂交方法对 42 例胃癌组织标本进行 occludin mRNA 检测,结果表明 occludin mRNA 的表达与肿瘤的分化相关,同时可能与胃癌进行性多重耐药相关。Osanai 等^[5]在对胰腺癌侵袭转移的机制研究中发现,occludin 通过调节 MEK/ERK 信号通路抑制胰腺癌细胞的解离分散,从而抑制癌细胞的扩散。Notch 是一种已知的调节细胞寿命的信号系统,该信号通路的激活可降低 occludin 的表达,增强细胞的迁移能力^[11]。Nakatsukasa 等^[12]的研究发现肿瘤相关钙信号转换基因 2 的下调可降低 occludin 的表达,从而改变紧

密连接的功能。

本研究对 3 株人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR-3 中 occludin mRNA 和蛋白表达以及细胞增殖、黏附、迁移和细胞周期分布进行了检测分析。结果显示 MCF-7 细胞中 occludin mRNA、蛋白含量高于 MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞;免疫细胞化学染色结果显示高表达 occludin 蛋白的 MCF-7 细胞呈抱团生长 细胞间黏附力强,细胞不容易离散,而相对低表达 occludin 的 MDA-MB-231、SKBR-3 细胞则相反;MTT、细胞黏附及迁移实验表明,MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞增殖速度高于 MCF-7 细胞,细胞的迁移力和对 FN 蛋白的黏附力均比 MCF-7 强。由此可推测 occludin 蛋白的低表达与人乳腺癌细胞的恶性增殖、黏附和迁移呈负相关。本课题将进一步构建 occludin 基因真核表达载体转染人乳腺癌细胞 观察转染 occludin 对肿瘤细胞增殖、凋亡、黏附和迁移能力的影响,进一步研究 occludin 蛋白对肿瘤细胞增殖、黏附、迁移、凋亡的作用及其可能机制。

[参 考 文 献]

- [1] Umeda K ,Ikenouchi J ,Katahira-Tayama S *et al.* ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation[J]. *Cell* 2006 ,126: 741 - 754.
- [2] Tsukita S ,Furuse M. Occludin and claudins in tightjunction strands: leading or supporting players? [J]. *Trends Cell Biol* , 1999 9: 268 - 273.
- [3] Tobioka H ,Isomura H. Occludin expression decreases with the progression of human endometrial carcinoma [J]. *Hum Pathol* , 2004 35(2) : 159 - 164.
- [4] Yin F ,Qiao T ,Shi Y *et al.* In situ hybridization of tight junction molecule occludin mRNA in gastric cancer [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2002 24(6) : 557 - 560.
- [5] Osanai M ,Murata M ,Nishikiori N ,*et al.* Occludin-mediated premature senescence is a fail-safe mechanism against tumorigenesis in breast carcinoma cells[J]. *Cancer Sci* 2007 98 (7) : 1027 - 1034.
- [6] Orbán E ,Szabó E ,Lotz G *et al.* Different expression of occludin and ZO-1 in primary and metastatic liver tumors [J]. *Pathol Oncol Res* 2008 ,14(3) : 299 - 306.
- [7] Balda MS ,Whitney JA ,Flores C *et al.* Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apicalbasolateral intramembrane diVusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein [J]. *J Cell Biol* ,1996 ,134: 1031 - 1049.
- [8] Hirase T ,Kawashima S ,Wong EY ,*et al.* Regulation of tight junctionpermeability and occludin phosphorylation by Rho- α 160ROCKdependent and -independent mechanisms [J]. *J Biol Chem* 2001 276: 10423 - 10431.
- [9] Van Itallie CM ,Anderson JM. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts [J]. *J Cell Sci* ,1997 ,110(Pt 9) : 1113 - 1121.
- [10] Wang Z ,Wade P ,Mandell KJ *et al.* Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-Wnger transcription factor slug [J]. *Oncogene* 2007 26: 1222 - 1230.
- [11] Aoyagi-Ikeda K ,Maeno T ,Matsui H ,*et al.* Notch Induces Myofibroblast Differentiation of Alveolar Epithelial Cells via TGF- β /Smad3 Pathway [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010.
- [12] Nakatsukasa M ,Kawasaki S ,Yamasaki K *et al.* Tumor-associated calcium signal transducer 2 is required for the proper subcellular localization of claudin 1 and 7: implications in the pathogenesis of gelatinous drop-like corneal dystrophy [J]. *Am J Pathol* ,2010 , 177(3) : 1344 - 1355.

(本文编辑 姚仁斌)

(上接第 924 页)

- [9] Benveniste M ,Dingledine R. Limiting stroke-induced damage by targeting an acid channel [J]. *N Engl J Med* 2005 352(1) : 85 - 86.
- [10] 唐黎黎 杨云周 傅佳 等. 柚皮素对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. *安徽医科大学学报* ,2006 ,41(4) : 430 - 432.
- [11] Sun AY ,Chen YM. Ethano-induced cell death by lipid peroxidation in PC12 cells [J]. *Neurochem Res* ,1997 22(10) : 1187 - 1192.
- [12] 郑云华 李值. 白藜芦醇对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *实用药物与临床* 2009 ,12(3) : 162 - 163.
- [13] Olsen GM ,Scheel-Kruger J ,Moller A ,*et al.* Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion [J]. *Behav Neurosci* ,1994 ,108(4) : 681 - 690.
- [14] Dobrydneva Y ,Williams RL ,Morris GZ ,*et al.* Dietary phytoestrogens and their synthetic structural analogues as calcium channel blockers in human platelets [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002 40(3) : 399 - 401.
- [15] Ma HJ ,Cao YK ,Liu YX *et al.* Microinjection of resveratrol into rostral ventrolateral medulla decreases sympathetic vasomotor tone through nitric oxide and intracellular Ca²⁺ in anesthetized male rats [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2008 29(8) : 906 - 912.

(本文编辑 姚仁斌)