

claudin-23 在结直肠癌组织中的表达及其对人结直肠癌细胞生物学行为的影响^{*}

陈薇, 朱肖男, 王瑾, 王一平, 杨锦林[△]

四川大学华西医院 消化内科(成都 610041)

【摘要】目的 了解 claudin-23 在结直肠癌中的表达及其对人结直肠癌细胞株生长、增殖及迁移能力的影响。**方法** 自四川大学华西医院疾病组织标本库选取 6 对结直肠癌组织及相应癌旁正常组织标本, 采用实时荧光定量 PCR 检测组织标本中 claudin-23 基因的表达量。构建稳定过表达 claudin-23 的结直肠癌细胞株, 用实时荧光定量 PCR 及蛋白质印迹验证后, 采用 CCK-8、Transwell 细胞迁移实验检测过表达 claudin-23 对人结直肠癌细胞生长、增殖以及迁移能力的影响。**结果** 在结直肠癌组织中 claudin-23 的表达量较癌旁正常组织中减少($P<0.05$), 过表达 claudin-23 后 HCT15 细胞间的黏附性降低, 细胞呈离散型生长, 并且可促进 HCT15 细胞的生长增殖, 此外, 过表达 claudin-23 可使 RKO 细胞及 HCT15 细胞的迁移能力明显增强。**结论** claudin-23 可显著提高人结直肠癌细胞的迁移能力, 提示 claudin-23 可能与结直肠癌的转移相关。

【关键词】 结直肠癌 claudin-23 紧密连接 细胞迁移 转移

The Expression and Biological Function of claudin-23 in Colorectal Cancer CHEN Wei, ZHU Xiao-nan, WANG Jin, WANG Yi-ping, YANG Jin-lin[△]. Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: mouse-577@163.com

【Abstract】 Objective To determine the expression of claudin-23 in colorectal cancer and paracarcinoma tissues, and its effects on the proliferation and migration of colorectal cancer cells. **Methods** Six pairs of samples of colorectal cancer and corresponding paracarcinoma tissues were collected from the West China Hospital of Sichuan University. Quantitative real time PCR was performed to determine the expression of claudin-23 in the tissue samples. Colorectal cancer cell lines with stable overexpression of claudin-23 were constructed using lentivirus. CCK-8 and migration assays were conducted to identify the effects of claudin-23 on cell proliferation and migration. **Results** The expression of claudin-23 in colorectal cancer tissues decreased compared with their adjacent normal tissues ($P<0.05$). claudin-23 decreased cell adhesion and increased cell proliferation in HCT15 cells. RKO and HCT15 cells with over expressed claudin-23 had increased ability of migration. **Conclusion** claudin-23 facilitates the migration ability of colorectal cancer cells and may participate in the metastasis of colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal cancer claudin-23 Tight junction Cell migration Metastasis

越来越多的研究已证实, 肿瘤的发生和发展与其微环境有着密切的联系。人体器官正常功能的维持依赖于其细胞内外微环境的平衡, 相邻上皮及内皮细胞的紧密连接形成了细胞间的保护屏障, 严格控制细胞之间的物质交换及信号传导, 从而维持细胞的正常功能^[1-2]。claudin 家族作为细胞紧密连接的重要组成部分之一, 对维持上皮细胞的极性及调控细胞内外离子和小分子的转运具有重要的意义, 其表达紊乱与多种疾病的发生都具有一定相关性, 其中也包括结直肠癌^[3-5]。然而, 目前国内外尚

无关于 claudin-23 对结直肠癌细胞生物学行为影响的研究。因此, 本研究着眼于探讨 claudin-23 在结直肠癌及癌旁正常组织中的表达差异, 及其对人结直肠癌细胞株生物学行为的影响, 以期探索 claudin-23 在结直肠癌发生、发展过程中所发挥的作用。

1 材料和方法

1.1 组织标本来源

6 对结直肠癌及相应癌旁正常组织标本来源于四川大学华西医院疾病组织标本库。患者均为华西医院手术患者, 术后病理证实为结直肠癌, 且术前未接受放化疗或其他针对肿瘤的治疗。标本使用已获

^{*} 四川省学术和技术带头人培养支持项目(No. 川人社办发[2016]183-15)资助

[△] 通信作者, E-mail: mouse-577@163.com

得患者知情同意以及四川大学华西医院伦理委员会审批通过。

1.2 主要试剂

claudin-23 抗体购自 Abcam 公司; TRIzol 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Bio-Rad 公司; 青链霉素、胰酶(含 0.25% EDTA)、DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 Cell-Box 公司; CCK-8 购自 Dojindo 公司; Tanswell 小室、matrigel 基质胶购自 Corning 公司。

1.3 细胞培养及稳定株构建

人结直肠癌 RKO、HCT15、HCT116、HT29、SW480、SW620、SW837 细胞株以及人肾上皮 293T 细胞株和 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 慢病毒载体质粒均获赠于四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室。所有细胞株均用含 12% 胎牛血清和 100 U/mL 青链霉素的 DMEM 培养基于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 孵箱中培养。构建稳定细胞株时, 首先用 PCR 合成并扩增 claudin-23 全长序列并进行琼脂糖凝胶电泳, 回收特异性 PCR 产物后进行酶切及连接反应将 claudin-23 基因片段插入 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 慢病毒载体质粒, 进行转化后用试剂盒抽提质粒并用电泳及测序验证后, 将含 claudin-23 基因片段的慢病毒载体质粒及空白载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 用 293T 细胞进行病毒包装, 选取实时荧光定量 PCR 检测结果中 claudin-23 mRNA 表达量最低的两个细胞株行病毒感染, 48 h 后荧光显微镜下观察荧光比例, 进一步进行流式细胞分选, 筛选出表达绿色荧光的细胞, 即获得稳定过表达 claudin-23 的细胞株以及对照细胞株 RKO-GFP 和 HCT15-GFP。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测组织和细胞中 claudin-23 mRNA 的表达

采用 TRIzol 法提取结直肠癌及相应癌旁正常组织或细胞株 RNA, 用 ScanDrop100 超微量核酸测定仪检测 RNA 的纯度及浓度, 以及琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性后将 RNA 反转录为 cDNA。进一步进行荧光定量 PCR, claudin-23 mRNA 上、下游引物序列分别为 5'-CCCGCCATCAAGTAC TACAG-3' 和 5'-AGGACGTCCACCGAGTT-3', 以 GAPDH 为内参, 上、下游引物序列分别为 5'-ACTCCTCCACCTTTGACGC-3' 和 5'-GCTGTAG CCAAATTCGTTGTGTC-3'。实时荧光定量 PCR 反应程序为: 95 °C, 10 s; 95 °C 10 s, 57 °C 20 s, 72 °C

10 s, 共 40 个循环; 72 °C, 60 s。每个样本及基因设置 2 个复孔, 结果取平均值, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的表达量。

1.5 蛋白质印迹(Western blot)检测细胞中的 claudin-23 蛋白

提取 RKO 及 HCT15 稳定细胞株内总蛋白后用 BCA 法检测总蛋白浓度, 分别取等质量蛋白, 加热变性后 SDS-PAGE 电泳分离, 恒流 300 mA 转移至 PVDF 膜, 根据目的蛋白位置进行裁膜, 5% 脱脂牛奶封闭, claudin-23 抗体(稀释比例 1:800)4 °C 孵育过夜, 内参为 β -actin, 次日室温孵育辣根过氧化物标记的二抗(稀释比例 1:10 000)2 h。TBST 洗膜后用化学发光法显色并曝光。

1.6 细胞形态观察

将过表达 claudin-23 的 RKO、HCT15 细胞及空白对照 RKO、HCT15 细胞进行传代, 次日于显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.7 CCK-8 法检测细胞生长

取对数生长期过表达 claudin-23 的 RKO、HCT15 稳定细胞及相应对照细胞, 胰酶充分消化并适当稀释细胞悬液后行细胞计数, 于 96 孔板中每孔加入 100 μ L 细胞悬液(3 000 个细胞)进行培养, 每组设置 5 个复孔, 于第 1、3、5、7 天分别加入 10 μ L CCK-8 试剂, 37 °C 孵育 2 h 后用酶标仪检测光密度值(OD₄₅₀), 绘制细胞生长曲线。

1.8 Transwell 迁移实验

胰酶消化细胞后 1000 r/min, 3 min 离心, 用不含血清的 DMEM 重悬细胞并计数, 于上室(即小室)内加入 200 μ L 细胞悬液(RKO 稳定株 50 万个细胞, HCT15 稳定株 32 万个细胞), 下室(即 24 孔板)内加入 800 μ L 培养基(RKO 稳定株 20% 胎牛血清, HCT15 稳定株 12% 胎牛血清), 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 48 h 后, 用棉签擦去小室内未迁移细胞, 将小室置于甲醇中固定 15 min, 1% 结晶紫染色 15 min, 自来水洗去多余染料, 晾干后显微镜下拍照。

1.9 统计学方法

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 claudin-23 在结直肠癌组织中的表达

实时荧光定量 PCR 检测 6 对结直肠癌及癌旁正常组织中 claudin-23 的表达量, 结果显示 83%

(5/6)的结直肠癌组织中 claudin-23 的表达量较癌旁正常组织降低,另一对癌及癌旁组织中 claudin-23 的表达量相同,统计学分析显示两组 claudin-23 表达量差异有统计学意义(结直肠癌组织 0.58 ± 0.45 , 正常组织: 1.13 ± 0.58 ; $P < 0.05$)。

2.2 claudin-23 过表达稳定细胞株构建

实时荧光定量 PCR 检测结果显示(图 1),细胞株 RKO 和 HCT15 中 claudin-23 mRNA 相对表达量最低,因此选取这两个细胞株构建稳定过表达 claudin-23 细胞株 RKO-claudin-23、HCT15-claudin-23 以及空白对照细胞株 RKO-GFP、HCT15-GFP。结果显示 RKO-claudin-23、HCT15-claudin-23 细胞株中绿色荧光比例约为 90%(图 2),筛选出的表达绿色荧光的 RKO-claudin-23 以及 HCT15-claudin-23 细胞中 claudin-23 的表达较其

空白对照细胞株升高(图 3),均提示过表达稳定株构建成功,可用于后续实验。

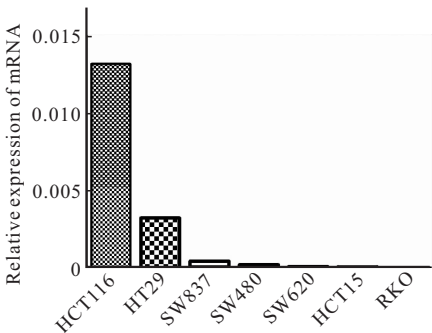


图 1 实时荧光定量 PCR 检测多个人结直肠癌细胞株中 claudin-23 的表达

Fig 1 Detection of the relative expression of claudin-23 mRNA in colorectal cancer cell lines under real-time quantitative PCR

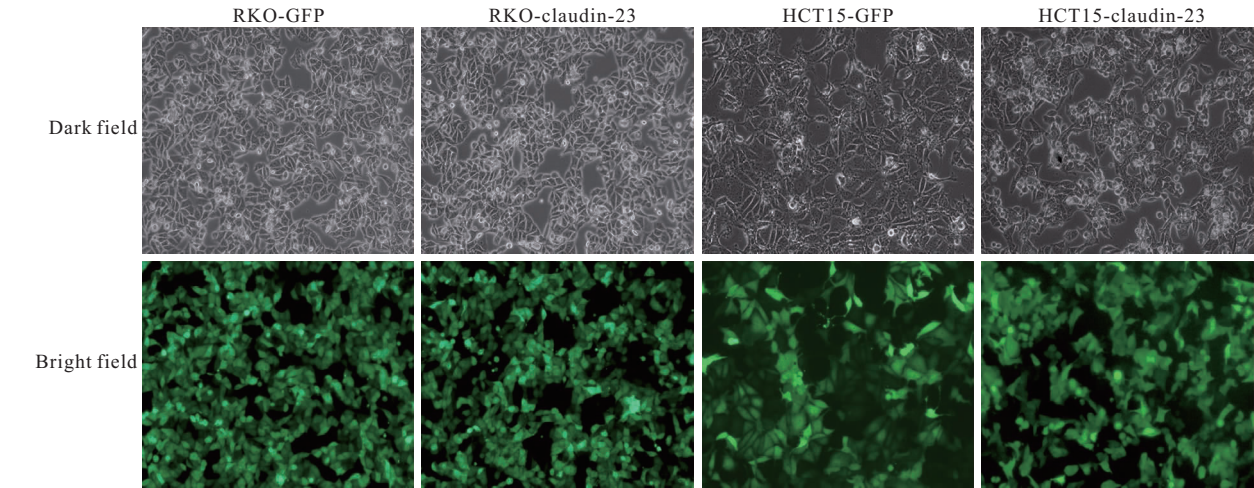


图 2 绿色荧光显微镜观察慢病毒感染细胞株内绿色荧光表达情况。×100

Fig 2 Expression of green fluorescence in lentiviral infected cells observed by green fluorescence microscopy. ×100

2.3 claudin-23 过表达对结直肠癌细胞形态的影响

通过观察细胞形态可以发现 HCT15-GFP 细胞同母细胞一样,呈片状生长,而HCT15-claudin-23细胞间的黏附减少,呈现出单个、离散型生长趋势(图 4),提示细胞的迁移、侵袭能力可能发生一定改变。然而,RKO-claudin-23 细胞株的形态未发生明显变化。

2.4 claudin-23 对细胞生长增殖的影响

CCK-8 实验结果(图 5)显示 HCT15-claudin-23 细胞在生长至第 3 天时,其 OD₄₅₀ 稍高于对照组,至第 5、7 天时,高于对照组细胞 ($P < 0.05$),表明 claudin-23 可能促进了 HCT15 细胞的生长增殖。而在RKO细胞中,过表达组细胞和对照组细胞的

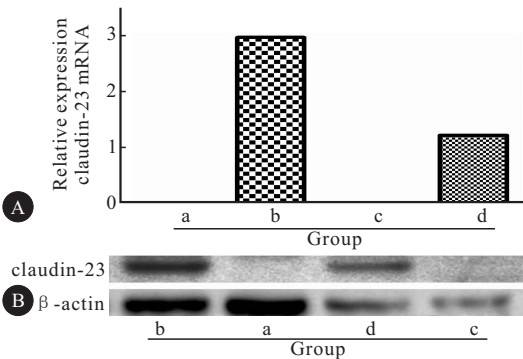


图 3 细胞株内 claudin-23 mRNA(A)和蛋白(B)表达量
Fig 3 Expressions of claudin-23 mRNA (A) and protein (B) in cell lines

a: RKO-GFP; b: RKO-claudin-23; c: HCT15-GFP; d: HCT15-claudin-23

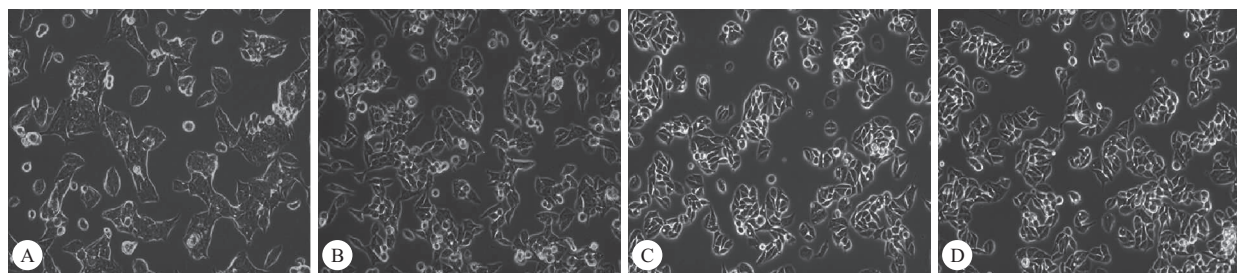


图 4 claudin-23 对 HCT15 及 RKO 各组细胞形态的影响。×100

Fig 4 Effects of claudin-23 on cell morphology of HCT15 and RKO cells. ×100

A: HCT15-GFP group; B: HCT15-claudin-23 group; C: RKO-GFP group; D: RKO-claudin-23 group

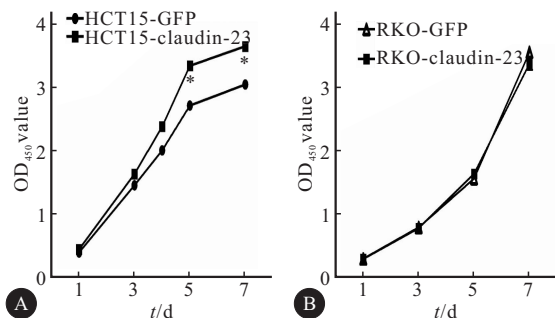


图 5 claudin-23 过表达对 HCT15 细胞和 RKO 细胞生长增殖的影响

Fig 5 Effects of claudin-23 on the growth and proliferation of HCT15 and RKO cells

* $P < 0.05$, vs. HCT15-GFP

OD450 无明显差异,提示 claudin-23 对 RKO 细胞的生长增殖无明显影响。

2.5 claudin-23 对结直肠癌细胞迁移能力的影响

Transwell 迁移实验结果(图 6)显示 RKO-claudin-23 细胞及 HCT15-claudin-23 细胞穿过小室的数量均较对照组增多[(1 300.05 ± 70.95) vs. (765.00 ± 25.95); (2 325.00 ± 299.55) vs. (1 030.05 ± 99.90); P 均 < 0.05], 提示

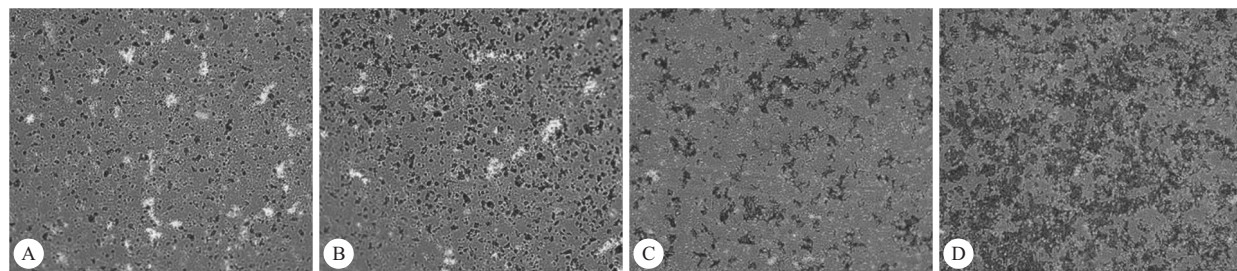


图 6 Transwell 迁移实验检测 claudin-23 对 RKO 和 HCT15 细胞迁移能力的影响。×40

Fig 6 Effects of claudin-23 on the migration ability of RKO and HCT15 cells detected by transwell migration assay. ×40

A: RKO-GFP group; B: RKO-claudin-23 group; C: HCT15-GFP group; D: HCT15-claudin-23 group

claudin-23 可显著增强结直肠癌细胞的迁移能力。

3 讨论

claudin 家族是相对分子质量为 (20 ~ 27) × 10³、含 4 个跨膜结构域的蛋白,是细胞间紧密连接的结构性及功能性组成成分,在维持细胞的排列、黏附以及细胞间的物质转运方面发挥着重要作用^[3-4]。自 1998 年报道第一个 claudin 蛋白以来目前已发现有 27 个 claudin 家族成员^[6-7]。随着对 claudin 蛋白家族研究的深入,研究者们发现 claudin 蛋白的异常表达不仅与特应性皮炎^[8-9]、炎症性肠病^[10-11]等黏膜屏障功能受损疾病密切相关,而且在肿瘤的发生发展中也发挥着重要作用。例如 claudin-2 可促进乳腺癌肝转移;claudin-1 可通过 ERK 信号通路促进肝癌的上皮间质转化;在乳腺癌中 claudin-7 表达缺失,并且与预后不良相关;claudin-11 可能接受 microRNA-421 的调控进而促进胃癌细胞株的增殖及转移;claudin-18 可与 ERK 信号通路之间形成正反馈通路促进胆管癌的发生及发展^[12-16]。

目前研究较多的与结直肠癌相关的 claudin 蛋白成员包括 claudin-1、3、4、7,其中 claudin-1 在结直

肠癌中发挥着促癌因子样作用^[17-28], claudin-4 则表现为抑癌因子样作用^[19-20], 而 claudin-3 及 claudin-7 对结直肠癌的影响则具有一定的争议^[21-27]。由于人类 claudin-23 基因序列在 2003 年才首次被 KATO 等^[28]报道, 因此目前关于 claudin-23 与结直肠癌的研究极少。

本研究发现 claudin-23 在结直肠癌组织中的表达较正常组织降低, 这与既往研究结果^[29-31]一致。claudin-23 在结直肠癌中的表达降低可能是受到组蛋白甲基化酶 EZH2 的调控, EZH2 可使 claudin-23 基因启动子高度甲基化, 进而抑制其表达^[31]。

然而, 通过构建过表达 claudin-23 的稳定细胞株, 我们发现过表达 claudin-23 可明显提高人结直肠癌细胞株 RKO 和 HCT15 的迁移能力, 表现出促癌因子样作用。同时, claudin-23 可使 HCT15 细胞之间的连接减少, 呈现出离散型生长, 提示 claudin-23 可明显提高细胞的侵袭能力, 与肿瘤的转移具有一定的相关性。同样, 在胰腺癌中 claudin-23 在高侵袭性细胞株中的表达较弱侵袭性细胞高, 并且可促进弱侵袭性细胞由团状、岛状生长转变为离散型生长^[32]。LU 等^[33]发现 claudin-23 与胃癌患者血管癌栓的形成密切相关, 且其表达越高, 胃癌患者的 TNM 分期越晚, 预后越差。这些研究都表明 claudin-23 在恶性肿瘤中发挥着促进肿瘤转移的作用。然而 claudin-23 对结直肠癌细胞生长增殖的影响可能有限, 我们仅在 HCT15 细胞中观察到过表达 claudin-23 促进了细胞的生长增殖, 而在 RKO 细胞中实验组和对照组细胞未见到明显差异。

claudin-23 在结直肠癌组织中的表达量降低, 然而又对人结直肠癌细胞的恶性生物学行为具有促进作用, 提示 claudin-23 在结直肠癌的发生和转移过程中可能发挥着不同的作用。BUJKO 等^[30]发现在结直肠腺瘤及腺癌组织中 claudin-23 的表达均较正常肠黏膜中的表达量明显减少, 提示 claudin-23 可能在结直肠癌发生的早期即开始发挥作用, 作为维持细胞间极性及肠黏膜屏障的重要结构蛋白, claudin-23 表达紊乱促进了结直肠癌的发生。此外, 与正常肠黏膜相比, claudin-23 在腺瘤及腺癌中均下调, 虽然无明显的统计学差异, 但仍可看出 claudin-23 的表达在癌组织中较腺瘤组织中增高, 另外, 该研究纳入的结直肠癌患者中仅有 26.9% 伴有淋巴结转移, 其他患者均无淋巴结或远处转移, 若扩大样本量或增加伴转移的结直肠癌患者例数, 腺

瘤及腺癌中 claudin-23 的表达可能会出现更显著的差异。因此, 我们认为随着肿瘤的进展, 在其他相关分子的共同作用下 claudin-23 逐渐表现为促进结直肠癌转移的作用。

总之, 本研究通过检测结直肠癌组织标本中 claudin-23 的表达, 发现 claudin-23 在癌组织中的表达减少, 提示其参与了结直肠癌的发生。通过进一步构建过表达 claudin-23 的稳定细胞株, 探究了 claudin-23 对人结直肠癌细胞株生物学特性的影响, 发现 claudin-23 可显著增强细胞的迁移能力, 提示 claudin-23 与结直肠癌的转移具有密切关系。因此, 我们认为 claudin-23 有可能成为判断结直肠癌转移的新型肿瘤标志物, 帮助临床医生对结直肠癌患者进行临床分期及预测预后。然而, 由于本研究中结直肠癌组织样本量较少, 未能明确 claudin-23 在预测结直肠癌转移及预后作用中的能力, 因此需要更多的大样本研究进行进一步阐述。此外, 关于 claudin-23 是如何影响人结直肠癌细胞株的生物学特性的问题我们尚不清楚, 因此, 相关的机制仍需要进一步的深入研究, 以期找到抑制结直肠癌转移的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] SCHNEEBERGER EE, LYNCH RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(6): C1213-C1228.
- [2] GONZALEZ-MARISCAL L, BETANZOS A, NAVA P, *et al*. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003, 81(1): 1-44.
- [3] VAN ITALLIE CM, ANDERSON JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68: 403-429 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404>.
- [4] KRAUSE G, WINKLER L, MUELLER SL, *et al*. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778(3): 631-645 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2007.10.018>.
- [5] DE OLIVEIRA SS, DE OLIVEIRA IM, DE SOUZA W, *et al*. Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett*, 2005, 579(27): 6179-6185 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.091>.
- [6] FURUSE M, FUJITA K, HIIRAGI T, *et al*. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 1998, 141(7): 1539-1550.
- [7] MINETA K, YAMAMOTO Y, YAMAZAKI Y, *et al*. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 2011, 585(4): 606-612 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.028>.
- [8] KUO IH, CARPENTER-MENDINI A, YOSHIDA T, *et al*. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function; implications for atopic dermatitis and skin

- barrier repair. *J Invest Dermatol*, 2013, 133 (4): 988-998 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.437>.
- [9] BATISTA DI, PEREZ L, ORFALI RL, *et al.* Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2015, 29 (6): 1091-1095 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.1111/jdv.12753>.
 - [10] TANAKA H, TAKECHI M, KIYONARI H, *et al.* Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice. *Gut*, 2015, 64(10):1529-1538 [2017-07-22]. <http://gut.bmj.com/content/64/10/1529.long>. doi:10.1136/gutjnl-2014-308419.
 - [11] SCHMITZ H, BARMEYER C, FROMM ML, *et al.* Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1999, 116(2):301-309.
 - [12] TABARIÈS S, DUPUY F, DONG Z, *et al.* Claudin-2 promotes breast cancer liver metastasis by facilitating tumor cell interactions with hepatocytes. *Mol Cell Biol*, 2012, 32 (15): 2979-2991 [2017-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3434516/>. doi:10.1128/MCB.00299-12.
 - [13] SUH Y, YOON CH, KIM RK, *et al.* Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. *Oncogene*, 2013, 32 (41): 4873-4882 [2017-07-22]. <https://www.nature.com/articles/onc2012505>. doi:10.1038/onc.2012.505.
 - [14] KOMINSKY SL, ARGANI P, KORZ D, *et al.* Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*, 2003, 22(13):2021-2033.
 - [15] YANG P, ZHANG M, LIU X, *et al.* MicroRNA-421 promotes the proliferation and metastasis of gastric cancer cells by targeting claudin-11. *Exp Ther Med*, 2017, 14 (3): 2625-2632 [2017-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5609270/>. doi:10.3892/etm.2017.4798.
 - [16] TAKASAWA K, TAKASAWA A, OSANAI M, *et al.* Claudin-18 coupled with EGFR/ERK signaling contributes to the malignant potentials of bile duct cancer. *Cancer Lett*, 2017, 403: 66-73 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.033>.
 - [17] POPE JL, AHMAD R, BHAT AA, *et al.* Claudin-1 overexpression in intestinal epithelial cells enhances susceptibility to adenomatous polyposis coli-mediated colon tumorigenesis. *Mol Cancer*, 2014, 13: 167 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-167>.
 - [18] BHAT AA, AHMAD R, UPPADA SB, *et al.* Claudin-1 promotes TNF- α -induced epithelial-mesenchymal transition and migration in colorectal adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res*, 2016, 349 (1): 119-127 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.10.005>.
 - [19] UEDA J, SEMBA S, CHIBA H, *et al.* Heterogeneous expression of claudin-4 in human colorectal cancer; decreased claudin-4 expression at the invasive front correlates cancer invasion and metastasis. *Pathobiology*, 2007, 74(1):32-41.
 - [20] SÜREN D, YILDIRIM M, KAYA V, *et al.* Loss of tight junction proteins (Claudin 1, 4, and 7) correlates with aggressive behavior in colorectal carcinoma. *Med Sci Monit*, 2014, 20: 1255-1262 [2017-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4113573/>.
 - [21] 李婧宜, 谢芳, 徐晓平, 等. Claudin-3 在结直肠癌中的表达及意义. *南方医科大学学报*, 2017, 37(1):63-67.
 - [22] AHMAD R, KUMAR B, CHEN Z, *et al.* Loss of claudin-3 expression induces IL6/gp130/Stat3 signaling to promote colon cancer malignancy by hyperactivating Wnt/ β -catenin signaling. *Oncogene*, 2017, 36 (47): 6592-6604 [2017-07-22]. <https://www.nature.com/articles/onc2017259>. doi:10.1038/onc.2017.259.
 - [23] DE SOUZA WF, FORTUNATO-MIRANDA N, ROBBS BK, *et al.* Claudin-3 overexpression increases the malignant potential of colorectal cancer cells; roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as modulators of EGFR signaling. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74994 [2017-07-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3777902/>. doi:10.1371/journal.pone.0074994.
 - [24] WANG Y, SUN T, SUN H, *et al.* SCF/C-Kit/JNK/AP-1 signaling pathway promotes claudin-3 expression in colonic epithelium and colorectal carcinoma. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (4): E765 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.3390/ijms18040765>.
 - [25] OSHIMA T, KUNISAKI C, YOSHIHARA K, *et al.* Reduced expression of the claudin-7 gene correlates with venous invasion and liver metastasis in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 2008, 19(4):953-959.
 - [26] BHAT AA, POPE JL, SMITH JJ, *et al.* Claudin-7 expression induces mesenchymal to epithelial transformation (MET) to inhibit colon tumorigenesis. *Oncogene*, 2015, 34 (35): 4570-4580 [2017-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4804637/>. doi:10.1038/onc.2014.385.
 - [27] PHILIP R, HEILER S, MU W, *et al.* Claudin-7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer. *Oncotarget*, 2015, 6(4):2046-2063.
 - [28] KATO H, KATO H. CLDN23 gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, is a novel member of CLAUDIN gene family. *Int J Mol Med*, 2003, 11(6):683-689.
 - [29] PITULE P, VYCITAL O, BRUHA J, *et al.* Differential expression and prognostic role of selected genes in colorectal cancer patients. *Anticancer Res*, 2013, 33(11):4855-4865.
 - [30] BUJKO M, KOBER P, MIKULA M, *et al.* Expression changes of cell-cell adhesion-related genes in colorectal tumors. *Oncol Lett*, 2015, 9 (6): 2463-2470 [2017-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4473523/>. doi:10.3892/ol.2015.3107.
 - [31] MARYAN N, STATKIEWICZ M, MIKULA M, *et al.* Regulation of the expression of claudin 23 by the enhancer of zeste 2 polycomb group protein in colorectal cancer. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (1): 728-736 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3378>.
 - [32] WANG W, TAN X, ZHOU L, *et al.* Involvement of the expression and redistribution of claudin-23 in pancreatic cancer cell dissociation. *Mol Med Rep*, 2010, 3 (5): 845-850 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.3892/mmr.2010.334>.
 - [33] LU Y, JING J, SUN L, *et al.* Expression of claudin-11,-23 in different gastric tissues and its relationship with the risk and prognosis of gastric cancer. *PLoS One*, 2017, 12 (3): e0174476 [2017-11-27]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0174476>.

(2017-09-25 收稿, 2017-12-07 修回)

编辑 汤洁