

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.22.007

CLDN11 在胰腺癌神经浸润动物模型中 mRNA 水平的表达 *

张晓兰^{1#} 杨 鸣^{1#} 张志钢^{2#} 刘 岩³ 路 箬¹ 邢 玲¹ 吴红玉¹
满晓华¹ 金 晶¹ 李兆申¹ 金震东^{1△}

(1 第二军医大学长海医院消化内科 上海 200433; 2 第二军医大学长海医院心血管内科 上海 200433;

3 解放军第 307 医院消化内科 北京 100071)

摘要 目的:神经浸润的发生预示胰腺癌预后不良,疼痛的发生与神经浸润密切相关,癌细胞和神经组织间相互作用、连接及粘附可能参与了神经浸润的发生,Claudins 作为组成紧密连接的主要成份,在多种肿瘤中有所表达,本实验拟通过观察其成员 CLDN11 在体内、体外 mRNA 水平的表达,探讨 CLDN11 在胰腺癌神经浸润发病机制中的作用,为其诊断及治疗新方法的探索提供一定的实验依据。**方法:**通过裸鼠坐骨神经周围注射不同人胰腺癌细胞系的方法建立稳定的胰腺癌神经浸润动物模型,成瘤后检测肿瘤组织中 CLDN11 mRNA 表达水平的差异。同时检测不同人胰腺癌细胞株中 CLDN11 mRNA 的表达水平的差异。**结果:**CLDN11 在神经侵犯发生率低的肿瘤中的表达高于神经侵犯发生率高的肿瘤,在正常胰腺组织中无表达。CLDN11 的 mRNA 水平在 panc-1 细胞株中表达高于 Capan-2 组。**结论:**经本实验研究发现 CLDN11 在 PNI 发生率高的肿瘤组织及高神经浸润能力的细胞株中表达下调,而在 PNI 发生率低的肿瘤组织及神经浸润能力低的细胞株中高表达,可以得出在神经浸润发生中,CLDN11 的表达受到抑制的结论,由此推断如果过表达 CLDN11,有可能阻碍 PNI 的发生及发展;另外,CLDN11 表达的下降也可能预示着 PNI 的发生及进展,因此 CLDN11 表达的下降可作为 PNI 发生的预警信号,也可作为胰腺癌基因治疗的靶点,为提高胰腺癌的早期诊断率、改善胰腺癌的预后提供初步的基础实验依据。

关键词:胰腺癌;神经;细胞粘附**中图分类号:**Q95-3;R735.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)22-4228-05

The Expression of CLDN11 in Animal Model of Pancreatic Cancer with Neural Invasion*

ZHANG Xiao-lan^{1#}, YANG Ming^{1#}, ZHANG Zhi-gang^{2#}, LIU Yan³, LU Zheng¹, XING Ling¹, WU Hong-yu¹, MAN Xiao-hua¹, JIN Jing¹,
LI Zhao-shen¹, JIN Zhen-dong^{1△}

(1 Department of Gastroenterology, 2 Department of Cardiovascular, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China; 3 Department of Gastroenterology, PLA 307 hospital, Beijing, 100071, China)

ABSTRACT Objective: Perineural invasion (PNI) indicates poor prognosis of pancreatic cancer, the presence of pain in pancreatic cancer is associated with PNI. Interactions, connection and adhesion between cancer cells and nerve tissue may be involved in perineural invasion occurred. Claudins contribute to formation of tight junctions, has been found to be altered in several cancers. By observing CLDN11 mRNA expression levels *in vitro* and *in vivo*, to explore the role of CLDN11 in pathogenesis of pancreatic cancer with perineural invasion, to provide some experimental basis to earlier diagnosis and explore new treatment. **Methods:** Established an animal model of neural invasion of pancreatic cancer by using different human pancreatic cancer cells injected around the sciatic nerve of Nude mice. Detecting the different expression levels of CLDN11 mRNA in different tumor tissues and Human pancreatic cancer cell lines. **Results:** The expression of CLDN11 mRNA in the low incidence of PNI tumors was higher than that of in the high incidence of PNI tumors, no expression in normal pancreatic tissue. The expression of CLDN11 mRNA in Capan-2 was lower than that of in panc-1. **Conclusion:** CLDN11 expression was low in highly PNI tumors and cell lines compared with low invasive ones. The high expression in low incidence of PNI tumor tissue and low infiltration capacity of cell lines. Come to a conclusion that the expression of CLDN11 was inhibited in PNI. These data suggest that over expression of CLDN11 might obstruct the occurrence and development of PNI. Additionally, Decreased expression of CLDN11 may also indicate the occurrence and progress of PNI. Dropped CLDN11 expression may be as an early warning signal of PNI, it also can be used as target for gene therapy of pancreatic cancer. Our experiments provide a preliminary basis for improving the early diagnosis and prognosis of pancreatic cancer.

Key words: Pancreatic cancer; Neural; Cell adhesion**Chinese Library Classification:** Q95-3; R735.9 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)22-4228-05

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81272667)

并列第一作者

作者简介: 张晓兰(1978-), 女, 博士研究生, 主要研究方向: 胰腺癌发病机制的研究, E-mail: zhangxlfj@163.com;

杨鸣(1984-), 女, 博士研究生, 主要研究方向: 胰腺癌发病机制及代谢组学的研究, E-mail: guoguo_y911@163.com;

张志钢(1977-), 男, 博士研究生, 主要研究方向: 心脏疾病, E-mail: zhangzgjf@163.com

△ 通讯作者: 金震东, 主任医师, 教授, 电话: 021-31106625, E-mail: zhendjin@126.com

(收稿日期: 2014-03-02 接受日期: 2014-03-30)

前言

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是预后差、早期诊断率低的恶性肿瘤之一,大多胰腺癌患者确诊时已存在局灶转移或肿瘤扩散,从而失去手术机会^[1]。即使部分患者经影像学检查未见明显转移,有手术指征,但在手术过程中可见亚临床转移。因此,在根治性胰腺切除术后复发很常见,且经胰腺切除术后患者长期生存率仅 10-20%^[2]。神经侵犯(Perineural invasion, PNI)是 PDAC 的主要特征之一, PNI 是肿瘤细胞侵犯周围神经的过程,也是肿瘤扩散和疼痛发生的途径之一。存在 PNI 的 PDAC 患者在无病生存期(disease-free survival, DFS)和总生存期(overall survival, OS)显著短于无 PNI 的患者,在多因素分析中,对于 DFS 和 OS 来说 PNI 是一个独立预后因素。PNI 在 PDAC 病情进展和预后的判断中起重要作用^[3]。但肿瘤细胞如何侵犯胰腺神经及如何沿着胰腺内神经扩散的具体机制仍不明确。

CLDN11 这一基因编码蛋白为 claudin 家族中的成员之一。claudin 家族成员在多种正常和肿瘤组织中均有表达,且其表达具有高度组织特异性^[4]。Claudins 是完整的膜蛋白,为组成紧密连接的主要成份^[5,6]。紧密连接是内皮和上皮细胞间隙的物理屏障,可阻止溶质和水自由通过细胞间隙;并在保持细胞极性和信号传导中起关键作用^[4]。CLDN11 编码蛋白是中枢神经系统髓鞘的主要成分,同时对于调节少突神经胶质细胞的增殖和迁移起重要作用。这一蛋白是人血-睾屏障(blood-testis barrier, BTB)紧密连接蛋白^[7], BTB 的破坏与这一基因功能紊乱相关^[7]。近年来,部分研究证实 claudin 蛋白在多种肿瘤中表达异常^[8,9],目前仍无 CLDN11 在胰腺癌中表达情况的报道,因此,本实验拟建立胰腺癌神经浸润动物模型,通过 RT-PCR 技术检测 CLDN11 在神经浸润动物模型中 mRNA 表达的差异,并通过该技术检测 CLDN11 在不同胰腺癌细胞株中 mRNA 表达的差异,观察 CLDN11 在体内及体外不同层面中的表达,初步探讨 CLDN11 在胰腺癌 PNI 发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

1.1.1 实验动物及分组 4-5 周龄 BALB/c 裸小鼠 50 只,随机化分为 Capan-2 注射组、panc-1 注射组、SW1990 注射组,每组裸鼠各 15 只,正常对照组 5 只,体重约 18-22 克,购自上海中科院莱克动物中心,于第二军医大学动物实验中心 SPF 级屏障系统饲养。饲养条件:室温 26-28℃,相对湿度 40%-60%,动物饲养箱置于层流架中,饮用水、饲料及垫料均经严格消毒,定期更换,专人管理。入室适应性喂养 1 周后开始实验。

1.1.2 细胞培养 人胰腺癌细胞株 Capan-2、panc-1 及 SW1990 均购自美国 ATCC,按照 ATCC 推荐的培养条件培养、传代,细胞均孵育在 5% CO₂ 浓度的 37℃ 恒温温箱内。待细胞增殖量达约 106 时中止培养,用胰酶消化细胞,收集于 1.5 ml EP 管中备用。

1.1.3 造模方法 各胰腺癌细胞注射组将 BALB/c 裸小鼠称重后用 1%戊巴比妥按照 40 mg/kg 浓度腹腔注射麻醉,待麻醉完全后,消毒裸鼠右下肢,在裸鼠右下肢股骨头下约 1-2 mm 处沿

股骨干走行切开约 3-4 mm 小切口,钝性沿肌肉走行轻轻剥离肌肉,找寻并暴露坐骨神经,在坐骨神经周围分别注射约 10⁶ 人胰腺癌细胞,后缝合切口,动态观察成瘤情况、成瘤时间。对照组不做任何处理,自由进食、水。成瘤至最长径约 0.8 cm 时取瘤,肿瘤组织一分为二,一部分置于 4%多聚甲醛中充分固定,后常规石蜡包埋,行 HE 染色,观察是否存在 PNI;另一部分置于冻存管中液氮速冻后转 -80℃ 冰箱冻存备用。

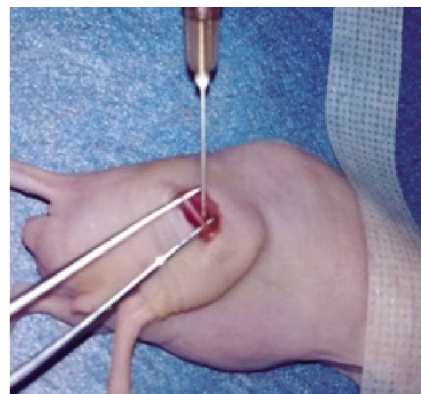


图 1 造模示意图

Fig. 1 Schematic diagram of Modeling

1.2 肿瘤组织 RNA 的提取

- 1) 从液氮中取出胰腺肿瘤组织,加入 1 mL Trizol,匀浆;
- 2) 将匀浆液放入离心管中,冰上放置 5 min, 4℃、12000 rpm,离心 10 min,取上清,转移至新的离心管中;
- 3) 加入 200 ul 氯仿,剧烈震荡,混匀 30 s, 4℃、12000 rpm,离心 10 min,将上清小心转移到无菌 RNase-free 1.5 ml 离心管中;
- 4) 加入与上清等体积的异丙醇,颠倒混匀,冰上放置 30 min, 4℃、12000 rpm,离心 10 min,弃上清;
- 5) 沉淀中加入 75%乙醇 1 ml, 4℃、12000 rpm,离心 10 min,小心弃上清,放置超净台快速晾干;
- 6) 加入 50-100 ul DEPC-H₂O 溶解沉淀,紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度;
- 7) 将 RNA 分管存放, -80℃ 冰箱保存备用。

1.3 人胰腺癌细胞株 RNA 的提取

1) 选取人胰腺癌细胞株 Capan-2、panc-1 及 SW1990,按照 ATCC 推荐的培养条件培养、传代,细胞均孵育在 5% CO₂ 浓度的 37℃ 恒温温箱内。待细胞增殖量达约 5×10⁶ 时中止培养,用胰酶消化细胞,收集于 1.5 mL EP 管中备用。

2) 在收集好的各组人胰腺癌细胞中加入 1 mL Trizol,反复吹打使细胞完全散开混匀;

3) 加入适当体积的氯仿(Trizol:氯仿=5:1),振荡混匀 30 s 后, 4℃、12000 rpm,离心 10 min,将上清小心转移到无菌 RNase-free 1.5 mL 离心管中;

其后各步骤与组织提取 RNA 相同。

1.4 RNA 的鉴定及逆转录合成 cDNA

1) 使用 NanoDropND-1000 分光光度计及配套软件,用 DEPC-H₂O 调零后,将样本取 1 ul 加在测样台上进行测量,记录 OD260/OD280 值及 RNA 浓度。

2) 按照反转录试剂盒说明书(Takara 公司)进行,反应条

件:37℃ 15 min,85℃ 5 sec,终止反应,-20℃冻存备用。

1.5 Real-time RT-PCR 检测肿瘤组织及胰腺癌细胞株中 CLDN11 mRNA 的表达

基因引物序列使用 Primer Premier 5.0 设计,由美国 invitrogen 公司合成。

表 1 Real-time RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of RT-PCR

Gene name	Primer sequences
CLDN11	5,-CGGTGTGGCTAAGTACAGGC-3, 5,-CGCAGTGTAGTAGAAACGGTTTT-3,
GAPDH	5,-AGCCACATCGCTCAGACAC-3, 5,-GCCCAATACGACCAAATCC-3,

表 2 反应体系(Takara 试剂盒)

Table 2 Reaction System(Takara Kit)

Reagents	Amount
SYBR Premix Ex Taq(2×)	10ul
PCR Forward Primer(10uM)	0.4ul
PCR Reverse Primer(10uM)	0.4ul
ROX Reference Dye II (50×)	0.4ul
cDNA	2ul
RNase Free dH2O	6.8ul

反应条件如下:

Stage1:预变性

Reps:1

95℃:30 s

Stage 2:PCR 反应

Reps:40

95℃:5 s

60℃:34 s

Dissociation Stage

记录目的基因和 GAPDH 的 Ct 值,计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ 模型组} - \Delta C_t \text{ 对照组}$, $\Delta C_t = C_t \text{ 目的基因} - C_t \text{ GAPDH}$ 。

观察不同胰腺癌细胞株中 CLDN11 mRNA 的表达,实验重复 5 次,选取软件计算出的 RQ 值做最后统计用。

1.6 统计方法

计量资料先进行正态分布及方差齐性检测,如即正态分布,又方差齐性的计量资料用单因素 ANOVA 进行多组间比较,统计用软件为 SPSS17.0 版本, $P < 0.05$ 时组间差异为具有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌动物模型的鉴定

2.1.1 实验动物的一般情况 PNI 动物模型各组动物大部分成瘤,无死亡,成瘤裸鼠体重明显下降,活动度下降,甚至呈现恶液质,且成瘤侧肢体肿胀,可见结节状膨隆,活动受限,呈现跛行。对照组裸鼠体重有所增长。

2.1.2 造模病理鉴定 待最终成瘤时,予 1%戊巴比妥钠按照 40 mg/kg 麻醉裸鼠,部分肿瘤与表皮可有部分粘连,但可顺利

分离,剥离表皮后暴露肿瘤,观察到大部分肿瘤呈现类球状,部分呈不规则形状,包绕股骨干,侵及肌肉,沿股骨干剥离、切下肿瘤,部分实验组可见肿瘤包绕坐骨神经,部分实验组肿瘤外可见坐骨神经,予冰 PBS 冲洗,将取下的肿瘤组织一分为二,一部分放入冻存管中置 -80℃ 冰箱冻存备用,另一部分置入 4% 多聚甲醛中充分固定,待固定 48 小时后按照常规操作程序行石蜡包埋后行 HE 染色,观察 PNI 发生率。如图所示:HE 染色可见肿瘤组织包绕神经,部分肿瘤细胞侵及神经束膜,造模成功。

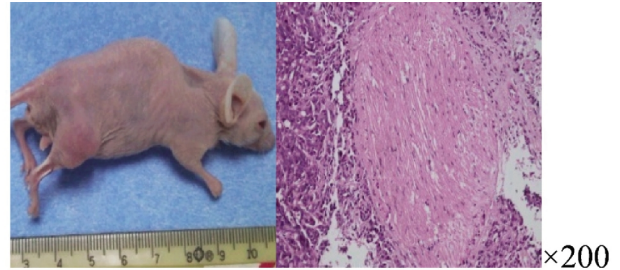


图 2 PNI 示意图

Fig. 2 Schematic diagram of PNI Modeling

2.1.3 造模成功率 根据 HE 染色所示,观察到 PNI 发生,各实验组间造模成功率的对比如下表所示:

表 3 各组 PNI 造模成功率的比较

Table 3 The success rate of PNI modeling in different groups

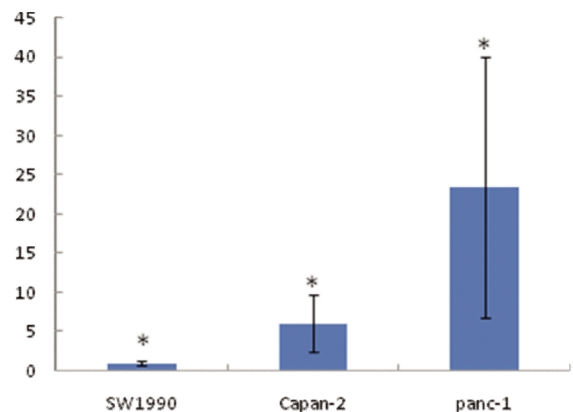
	Control	Capan-2 group	Panc-1 group	SW1990 group
Success rate of modeling	0	87.5%	33.3%	50%

可见 Capan-2 组 PNI 发生率较高,panc-1 组 PNI 发生率最低。

2.2 CLDN11 在造模成功肿瘤组织中 mRNA 的表达

根据 HE 染色选取存在 PNI 发生的每组肿瘤组织各 5 个进一步行 RT-PCR,与正常对照组裸鼠胰腺组织对比,观察 CLDN11 在 PNI 动物模型肿瘤组织中 mRNA 表达水平的不同。

结果显示,panc-1 组肿瘤组织中 CLDN11 的 mRNA 表达水平显著高于 Capan-2 及 SW1990 组($P < 0.05$),Capan-2 组高于 SW1990 组($P < 0.05$),正常胰腺组织无 CLDN11 mRNA 的表达。



* 组间比较 $P < 0.05$, $n=5$, $\bar{x} \pm S$

* Comparison between groups $P < 0.05$, $n=5$, $\bar{x} \pm S$

图 3 CLDN11 mRNA 在各组瘤组织内的表达

Fig. 3 The expression of CLDN11 mRNA in each group tumors

2.3 CLDN11 在不同人胰腺癌细胞株中 mRNA 的表达

选择造模所用相应的人胰腺癌细胞株,对比不同细胞株中 CLDN11 的 mRNA 表达水平的差异。

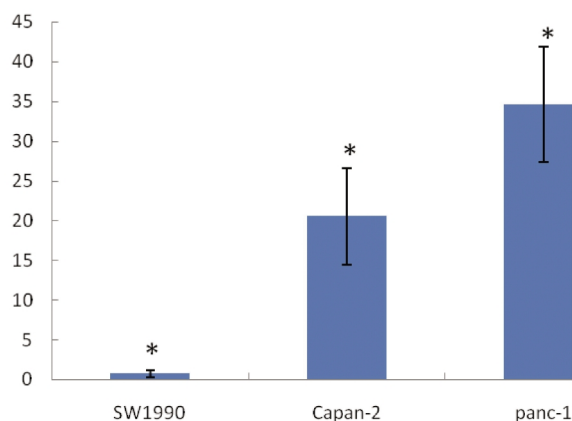


图 4 CLDN11 mRNA 在各细胞株中的表达

Fig. 4 The expression of CLDN11 mRNA in different cell lines

* 组间比较 $P < 0.05, n = 5, \bar{x} \pm S$

* Comparison between groups $P < 0.05, n = 5, \bar{x} \pm S$

结果显示, Panc-1 细胞中 CLDN11 的 mRNA 表达水平显著高于 Capan-2 及 SW1990 细胞 ($P < 0.05$), Capan-2 细胞高于 SW1990 组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

胰腺癌是一种具有高死亡率的疾病,在美国,胰腺癌在因癌症导致死亡疾病中位居前五位^[8]。神经浸润是肿瘤特有的扩散方式,也是胰腺癌的显著特征之一,其发生率为 50-100 %^[9],但其具体发病机制目前仍未明确。有研究认为交感神经去甲肾上腺素通过 β -AR/PKA/STAT3 信号通路在 PNI 的发生和进展中起到关键的调节作用^[10]。另有报道称 P53 和 Ki67 在胰腺癌神经浸润中起重要作用^[9]。PNI 的发生除了预示着胰腺癌患者较差的预后外,也是导致腹痛的主要原因,从而导致患者生存质量下降,有研究显示 P 物质在促进胰腺癌转移和 PNI 进展中起到重要作用^[11]。神经营养因子在 PNI 的发生中也起到一定作用,胰腺癌细胞可产生神经营养因子 NRTN,这些因子可增强胰腺癌细胞的生物学特性,通过 GFR α -2 受体可触发神经可塑性的改变、PNI 和影响痛觉^[12]。PNI 的发生在癌细胞和神经间细胞粘附的作用目前研究甚少。

多年前,细胞和肿瘤学家认为良、恶性细胞迁移的机制包括细胞粘附和细胞骨架动力学的改变^[13],然而,现在肿瘤细胞的侵袭被认为是异质和适应的过程,事实上,正是在多样的结构改变、分子及甚至相反的微环境下的细胞粘附、骨架动力学及机械传导的可塑性,延续了细胞的迁移和扩散^[14]。肿瘤的侵袭是一个循环的过程,即细胞形状改变、形态不对称及细胞体的易位。根据细胞类型及组织环境,细胞能通过两种主要途径迁移:细胞-细胞间连接缺失或细胞间粘附仍保留。因此,细胞粘附在 PNI 的发生、发展中起到一定的作用,但具体机制仍待发掘。

在毗邻的上皮细胞间通过特有的顶端结构将细胞间的空间分隔为顶部和基底部,这一结构就叫紧密连接^[15],紧密连接

是由众多细胞周围的蛋白复合物组成,通过双脂质层延伸,从而在毗邻的细胞间形成网状网络^[16]。多种蛋白专门位于紧密连接处,这些蛋白可调节肌动蛋白结果、细胞-细胞间粘附和组织的渗透性。Claudins 决定了穿过紧密连接小分子的渗透性,在不同的上皮表达不同的 claudins 连接物,提示由 claudins 编码的连接物可能决定了紧密连接的大小和离子特异性^[16]。

改变人类某些 CLAUDIN 基因与皮肤、肾脏和耳朵疾病相关^[17,18], Claudin 家族成员即为已证实多种人类肿瘤中被异常调节,并参与了肿瘤的发病^[19,20]。本实验结果显示, CLDN11 在正常胰腺组织中未检测到 mRNA 水平的表达,而在瘤体组织中可检测到 CLDN11 的表达,说明 CLDN11 参与了胰腺癌的发生及进展。在体外实验中,与具有低神经侵犯能力的人胰腺癌细胞株 panc-1 相比,具有高神经侵犯能力的人胰腺癌细胞株 Capan-2 中 CLDN11 mRNA 的表达呈现下降趋势;说明在 PNI 进展过程中 CLDN11 表达是下调的,或者说是受抑制的。有研究显示下调 CLDN11 的表达,通过增加细胞的运动和侵袭性促进胃癌的形成^[21]。推断在 PNI 发生中 CLDN11 的下调也同样可以增加胰腺癌细胞的迁移及侵袭能力,促进 PNI 的发生及发展。本实验在体内动物模型 PNI 发生率高的实验组与 PNI 发生率低的实验组相比,其 CLDN11 mRNA 的表达也同样呈现下降趋势,推断 CLDN11 对于胰腺癌的进展可能起到抑制作用,起到阻碍病情发展的作用。

可以推断出, CLDN11 在胰腺癌 PNI 的发生及发展中发挥一定作用。CLDN11 其编码蛋白作为中枢神经系统髓鞘的主要成分,在神经浸润发生中其表达受到抑制,可能增加了神经鞘膜的通透性,减弱了神经鞘膜对癌细胞侵入的抵抗能力,从而促进了神经浸润的发生; CLDN11 作为紧密连接的主要成员,也可能通过加强癌细胞间紧密连接的形成,降低了细胞的迁移及侵袭能力,因此 CLDN11 下调时细胞的迁移及侵袭能力增强,正如本实验中观察到在神经浸润发生率高的肿瘤中 CLDN11 的表达下降,但其具体作用机制仍待进一步验证。因此, CLDN11 的下降预示着胰腺癌病情的进展,可以作为胰腺癌 PNI 发生的预警因子,也可作为胰腺癌基因治疗的靶点,本实验为提高胰腺癌的早期诊断率、改善胰腺癌的预后提供初步的基础实验依据。

参考文献(References)

- [1] Greer JB, Brand RE. New developments in pancreatic cancer [J]. Current gastroenterology reports, 2011,13(2):131-139
- [2] Hernandez JM, Morton CA, Al-Saadi S, et al. The natural history of resected pancreatic cancer without adjuvant chemotherapy [J]. The American surgeon, 2010,76(5):480-485
- [3] Chatterjee D, Katz MH, Rashid A, et al. Perineural and Intraneural Invasion in Posttherapy Pancreaticoduodenectomy Specimens Predicts Poor Prognosis in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma [J]. The American Journal of Surgical Pathology, 2012,36(3):409-417
- [4] Morin PJ. Claudin Proteins in Human Cancer: Promising New Targets for Diagnosis and Therapy [J]. Cancer Research, 2005,65(21):9603-9606
- [5] Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, et al. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis [J]. The Journal of cell biology, 1999,145(3):579-588
- [6] Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, et al. Clostridium perfringens Entero-

- toxin Fragment Removes Specific Claudins from Tight Junction Strands Evidence for Direct Involvement of Claudins in Tight Junction Barrier[J]. The Journal of cell biology, 1999,147(1):195-204
- [7] Chiba K, Yamaguchi K, Ando M, et al. Expression pattern of testicular claudin-11 in infertile men[J]. Urology, 2012,80(5):1161 e1113-1167
- [8] Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer[J]. Gastroenterology, 2013,144(6):1252-1261
- [9] Wang P-H, Song N, Shi L-B, et al. The relationship between multiple clinicopathological features and nerve invasion in pancreatic cancer [J]. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, 2013,12 (5): 546-551
- [10] Guo K, Ma Q, Li J, et al. Interaction of the sympathetic nerve with pancreatic cancer cells promotes perineural invasion through the activation of STAT3 signaling[J]. Molecular cancer therapeutics, 2013,12 (3):264-273
- [11] Li X, Ma G, Ma Q, et al. Neurotransmitter substance P mediates pancreatic cancer perineural invasion via NK-1R in cancer cells [J]. Molecular Cancer Research, 2013,11(3):294-302
- [12] Wang K, Demir IE, D Haese JG, et al. The neurotrophic factor neur-urin contributes toward an aggressive cancer cell phenotype, neuropathic pain and neuronal plasticity in pancreatic cancer[J]. Carcinogenesis, 2014,35(1):103-113
- [13] Sanz-Moreno V, Marshall CJ. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration[J]. Current opinion in cell biology, 2010,22(5):690-696
- [14] Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model[J]. The Journal of cell biology, 2010,188(1):11-19
- [15] Cereijido M, Contreras RG, Flores-Benitez D, et al. New diseases derived or associated with the tight junction [J]. Archives of medical research, 2007,38(5):465-478
- [16] Gupta I, Ryan A. Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease [J]. Clinical genetics, 2010,77(4):314-325
- [17] Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption [J]. Science, 1999,285(5424):103-106
- [18] De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis [J]. Journal of allergy and clinical immunology, 2011,127(3):773-786. e777
- [19] Kulka J, Szász AM, Németh Z, et al. Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas [J]. Pathology & Oncology Research, 2009,15(1):59-64
- [20] Németh Z, Szász AM, Tátrai P, et al. Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers [J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2009,57(2):113-121
- [21] Kashanchi F, Agarwal R, Mori Y, et al. Silencing of Claudin-11 Is Associated with Increased Invasiveness of Gastric Cancer Cells [J]. PLoS ONE, 2009,4(11):e8002

(上接第 4218 页)

- [11] Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide [J]. Circulation, 2008, 117(18):2351-2360
- [12] Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, et al. GY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(1):103-113
- [13] Lee ZW, Zhou J, Chen CS, et al. The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo [J]. PLoS One, 2011, 6(6):e21077
- [14] Liu Z, Han Y, Li L, et al. The hydrogen sulfide donor, GY4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E (-/-) mice [J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(8):1795-1809
- [15] Luce JM. Pathogenesis and management of septic shock [J]. Chest, 1987, 91(6):883-888
- [16] Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock [J]. Crit Care Clin, 2000, 16(2):289-317
- [17] Piantadosi CA, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome [J]. Ann Intern Med, 2004, 141(6):460-470
- [18] Kabir K, Gelinas JP, Chen M, et al. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury [J]. Shock, 2002, 17(4): 300-303
- [19] Zhou CF, Tang XQ. Hydrogen sulfide and nervous system regulation [J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(21):3576-3582
- [20] Liu YH, Lu M, Hu LF, et al. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system[J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 17(1):141-185
- [21] Zeng J, Lin X, Fan H, et al. Hydrogen sulfide attenuates the inflammatory response in a mouse burn injury model [J]. Mol Med Rep, 2013, 8(4):1204-1208
- [22] Jin HF, Du JB. Effect of endogenous hydrogen sulfide on the pulmonary circulation and pathogenesis of pulmonary hypertension [J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2011, 49(12):905-906, 907
- [23] Pircher J, Fochler F, Czermak T, et al. Hydrogen sulfide-releasing aspirin derivative ACS14 exerts strong antithrombotic effects in vitro and *in vivo* [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(12):2884-2891
- [24] Grambow E, Mueller-Graf F, Delyagina E, et al. Effect of the hydrogen sulfide donor GY4137 on platelet activation and microvascular thrombus formation in mice [J]. Platelets 2013, Epub Ahead of Print
- [25] Yu F, Zhao J, Tang CS, et al. Effect of synthesized GY4137, a slowly releasing hydrogen sulfide donor, on cell viability and distribution of hydrogen sulfide in mice [J]. Journal of Peking University, 2010, 42(5):493-497
- [26] Robinson H, Wray S. A new slow releasing, H₂S generating compound, GY4137 relaxes spontaneous and oxytocin-stimulated contractions of human and rat pregnant myometrium [J]. PLoS One, 2012, 7(9):e46278