

其他肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001686

## CLDN1 上调 MMP1 的表达促进食管鳞癌细胞 TE10 侵袭及转移

曾义波, 吴 剑, 李 俊, 张大伟, 任德莲, 戴天阳

(西南医科大学附属医院心胸外科, 泸州 646000)

**【摘要】目的:**研究紧密连接蛋白-1(tight junction protein 1, CLDN1)在食管鳞癌细胞 TE10 中的生物学功能及机制。**方法:**体外构建 CLDN1 过表达病毒,按感染复数(multiplicity of infection, MOI)=20 的比例感染食管鳞癌细胞 TE10。通过蛋白质印迹(Western blot)检测 CLDN1 过表达效果。分别采用细胞增殖及毒性检测试剂(cell counting Kit-8, CCK-8)检测细胞增殖能力,肿瘤细胞迁移及侵袭实验(Transwell)检测细胞迁移及侵袭能力变化。通过基因芯片分析过表达 CLDN1 对 TE10 基因表达谱的影响,分析下游靶基因并通过 Western blot 和回复实验研究 CLDN1 对 MMP1 的表达调控。**结果:**与 NC 组相比,过表达组 TE10 细胞中基质金属蛋白酶 1(matrix metalloproteinase-1, MMP1)蛋白表达为(2.68 ± 0.10),明显升高( $P < 0.05$ );CCK-8 实验结果表明,过表达组细胞在 24、48、72 h 时的吸光度明显高于阴性对照组( $P < 0.05$ );迁移实验结果显示过表达组 TE-10 细胞迁移细胞数明显高于阴性对照组[(54.8 ± 3.4) vs. (24.6 ± 2.1)];侵袭实验结果显示,过表达组 TE-10 细胞侵袭数目高于阴性对照组[(34.5 ± 2.6) vs. (11.5 ± 1.6)]( $P < 0.05$ )。信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)芯片分析发现,过表达 CLDN1 后 TE10 细胞的 MMP1 基因表达明显升高( $P < 0.05$ ),定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)及 Western blot 证实 CLDN1 能够促进 MMP1 的表达;功能回复实验结果显示,干扰 MMP1 能够抑制 CLDN1 对 TE10 细胞的增殖和侵袭转移能力的促进作用。**结论:**CLDN1 可通过上调 MMP1 的表达促进食管鳞癌 TE10 细胞的增殖和侵袭转移,发挥癌基因的功能。

**【关键词】**食管鳞癌;紧密连接蛋白 1;基质金属蛋白酶-1;肿瘤增殖和转移

**【中图分类号】**R73-37;R735.1

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2017-10-11

## CLDN1 promotes the proliferation and metastases of esophageal squamous cell carcinoma by up-regulating MMP1

Zeng Yibo, Wu Jian, Li Jun, Zhang Dawei, Ren Delian, Dai Tianyang

(Department of Cardiothoracic Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the role of CLDN1 on the proliferation and metastases of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell line TE10 and the underlying mechanism. **Methods:** ESCC cell line TE10 was cultured and constructed with stable expression of CLDN1 through lentivirus transfection and screening by 1 μg/mL puro, and then the overexpression of CLDN1 was identified by western blot. Furthermore, the proliferation and metastases of indicated group cells were examined by CCK-8 and Transwell assay respectively. To explore the mechanism underlying, the mRNA microarray was also performed for TE10 with CLDN1 overexpression to screen target gene downstream. At last, the rescue assay was performed to confirm the mechanism. **Results:** Compared with that of negative group, matrix metalloproteinase 1 (MMP1) expression was significantly increased (2.68 ± 0.10) ( $P < 0.05$ ). CCK-8 array revealed that the proliferation of TE10 with Lv-CLDN1 transfected was significantly attenuated [(34.5 ± 2.6) vs. (11.5 ± 1.6)] ( $P < 0.05$ ). Transwell assay confirmed that the cell numbers of TE10 with Lv-CLDN1 transfected penetrated the membrane were obviously more than those of negative control [(54.8 ± 3.4) vs. (24.6 ± 2.1)] ( $P < 0.05$ ). The microarray revealed that MMP1 expression was significant increased in TE10 cells with Lv-CLDN1 transfected and the results was confirmed by qRT-PCR and Western blot. The rescue assay showed that the proliferation and metastases were all inhibited after MMP1 silencing. **Conclusion:** CLDN1 promotes the proliferation and metastases of TE10 cells by up-regulating MMP1.

**作者简介:**曾义波, Email: xueqin520106@163.com,

研究方向:食管的诊治。

**通信作者:**戴天阳, Email: daitianyang12345@163.com。

**基金项目:**2017 年自贡市重点科技计划资助项目(编号:2017SF03)。

**优先出版:**http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180517.1521.014.html

(2018-05-18)

**【Key words】**esophageal squamous cell carcinoma; tight junction protein 1; matrix metalloproteinase-1; cell proliferation and migration

食管癌(esophageal carcinoma)是临床上常见的消化道恶性肿瘤且预后不良<sup>[1]</sup>。我国是食管癌高发国家,其中,90%以上患者为食管鳞状上皮细胞癌<sup>[2]</sup>。紧密连接蛋白-1(tight junction protein 1,CLDN1)属于紧密连接蛋白家族,是一个4次跨膜的膜蛋白,参与构成上皮细胞间的紧密连接结构,对上皮屏障的维持具有十分重要的作用<sup>[3]</sup>。现有研究表明,CLDN1在肿瘤中存在异常表达和分布,且与肿瘤的增殖、侵袭转移、耐药关系、信号转导密切,如乳腺癌、肝癌、胃癌等<sup>[4-5]</sup>。目前,有文献报道Nm23H1通过上调CLDN1促进食管鳞癌的增殖和侵袭转移,提示CLDN1可能具有癌基因的功能<sup>[6]</sup>。CLDN1在食管鳞癌中的表达和生物学功能均不明确,本项目拟在细胞水平研究CLDN1在食管鳞癌中的生物学功能,探讨其机制,为阐明CLDN1在食管鳞癌中的分子机制提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株及试剂

人食管鳞癌细胞(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)细胞株TE10(中科院上海细胞库);过表达慢病毒Lv-GFP-Puro-CLDN1由汉恒生物公司构建;siR-MMP1序列及siR-negative control由上海汉恒生物公司合成;TRIzol、Lipofectamine 2000(Invtrogen公司),RPM1640(Hyclone)公司,逆转录试剂盒 Reverse Transcription System(成都博瑞克生物有限公司),小鼠抗人GAPDH(Santa Cruz)、兔抗人CLDN1多抗、兔抗人MMP1多抗(Abcam公司),SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(碧云天生物公司),荧光定量PCR试剂(KAPA BIOSYSTEMS),CCK-8试剂盒、Transwell小室(Corning公司)。

### 1.2 细胞转染

收集对数生长期的TE10细胞,按每孔 $2 \times 10^5$ 个的密度种于24孔板,当细胞融合度大于70%时开始转染。根据实验需求,分为2组:过表达组(转染慢病毒Lv-GFP-Puro-CLDN1),阴性对照组(转染慢病毒空载体),按MOI=20的比例往500  $\mu$ L的1640完全培养基中加入过表达慢病毒,在37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>中培养24 h后更换含1  $\mu$ g/mL嘌呤霉素新鲜培养基,继续培养48 h,通过荧光显微镜和Western blot对表达效率进行鉴定。回复实验MMP1 siRNA序列转染:分为阴性对照组(negative control,NC)组(慢病毒空载体+siRNA对照序列),CLDN1过表达对照组(Lv-GFP-Puro-CLDN1+siRNA对照序列),回复组(Lv-GFP-Puro-CLDN1+MMP1 siRNA序列)。简要步骤:取20 pmol/ $\mu$ L的MMP1 siRNA工作液1.5  $\mu$ L, Lipofectamine 2000 1  $\mu$ L分别加入含50  $\mu$ L Opti Memi培养基的EP管中静置5 min,随即混合成1管,室温下静置20 min

后加入培养孔,6 h后更换新鲜10%FBS 1640培养基。在倒置荧光显微镜下(20 $\times$ )观察GFP绿色荧光,收集72 h的各组细胞进行蛋白表达检测及功能实验。

### 1.3 Western blot 检测蛋白表达

转染72 h后,分别收集各组细胞,加入预冷的PBS漂洗2次,加入含1%PMSF的RIPA裂解液,4  $^{\circ}$ C裂解30 min,12 000 g/min离心10 min,取上清并加入5 $\times$ SDS上样缓冲液,沸水浴10 min上样。60 V恒压30 min,100 V恒压1 h行SDS-Page电泳;100 V恒压1 h冰浴电转至PVDF膜,50 g/L脱脂牛奶室温封闭1 h,加入适当浓度一抗(CLDN1 1:1 000, MMP1 1:1 000,GAPDH 1:5 000),4  $^{\circ}$ C摇床孵育过夜。次日用PBST漂洗15 min $\times$ 3次,加入HRP标记的二抗(羊抗兔1:3 000)室温孵育1 h,PBST漂洗15 min $\times$ 3次,ECL发光液显影曝光,以目的蛋白与GAPDH灰度值作为目的蛋白相对表达量,并按公式计算抑制率。抑制率=(1-干扰MMP1蛋白相对表达量/空白组MMP1蛋白相对表达量) $\times$ 100%。

### 1.4 实时定量PCR检测MMP1基因的表达

按每 $1 \times 10^6$ 个细胞加入1 mL Trizol的比例,室温充分裂解各组细胞5 min。酚氯仿法抽取细胞总RNA,通过凝胶电泳和分光光度计检测RNA条带的完整性和RNA纯度,取总RNA 1  $\mu$ g进行逆转录反应,模板cDNA于-20  $^{\circ}$ C冰箱保存。qRT-PCR反应体系如下:10  $\mu$ L qRT-PCR-Mix,0.5  $\mu$ L MMP1上游引物,序列:5'-gat gga tcc caa gcc ata tat gga cgt tcc-3',0.5  $\mu$ L MMP1下游引物,序列:5'-ttg gaa ttc cgg act tca tct ctg tc gg-3',2  $\mu$ L的cDNA和7  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应程序为:预变性:95  $^{\circ}$ C,10 min;40个循环:95  $^{\circ}$ C,1 min;60  $^{\circ}$ C,30 s。

### 1.5 CCK-8检测TE10细胞的增殖活性

转染后48 h,收集各组细胞,按每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞密度接种至96孔板,在24、48、72 h时加入含20  $\mu$ L CCK-8反应液。于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养1 h后,然后用酶标仪测波长490 nm处的吸光度(A<sub>490nm</sub>)。

### 1.6 Transwell实验检测细胞的迁移和侵袭能力

采用Corning孔径为8  $\mu$ m的24孔小室,上室分别加入各组细胞 $1 \times 10^5$ 个,200  $\mu$ L无血清RPMI1640培养基,下室加入500  $\mu$ L含10%FBS的RPMI1640培养基。24 h后取出小室,擦拭去上室的细胞。4%甲醛室温固定10 min,吉姆萨染色后显微镜下观察,200倍光镜下随机取5个视野拍照,计算穿膜细胞数目,评定细胞迁移能力。侵袭实验步骤:从-20  $^{\circ}$ C取出Matrigel放置于4  $^{\circ}$ C冰箱过夜融化,用RPMI1640无血清培养基将原液按1:1稀释后,取100  $\mu$ L均匀涂抹于上室,放于37  $^{\circ}$ C、60 min待其凝固成胶,枪头4  $^{\circ}$ C预冷,所有操作在冰上进行。其余步骤同细胞迁移实验。24 h后观察结果。

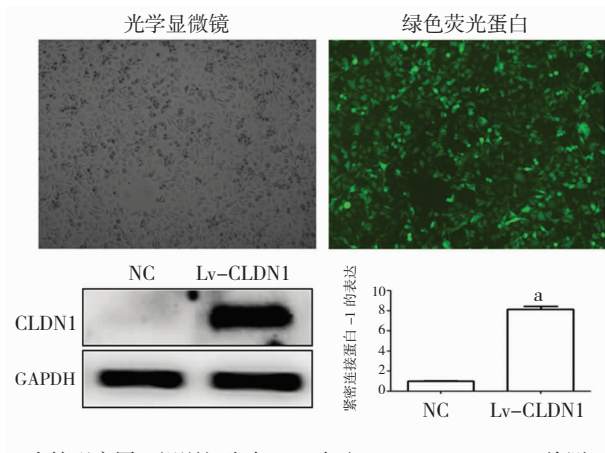
### 1.7 统计学处理

采用SPSS 11.0统计软件处理,各组实验数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组数据间采用成组t检验;两组以上数据比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 过表达 CLDN1 的 TE10 细胞的筛选和鉴定

转染 Lv-GFP-Puro-CLDN1 慢病毒载体 48 h 后,通过荧光显微镜对 GFP 表达进行观察,结果显示:视野下 TE10 细胞均匀发出绿色荧光,其阳性细胞数在 90%以上;Western blot 结果显示,与 NC 组相比,CLDN1 过表达组 CLDN1 蛋白表达( $8.14 \pm 0.72$ )明显升高( $t=22.950, P=0.00$ ),表明过表达 CLDN1 的 TE10 细胞构建成功,可以开展后续功能实验,如图 1 所示。



光镜观察同一视野细胞内 GFP 表达,100 ×;Western blot 检测 CLDN-1 过表达水平, a:  $P < 0.05, n = 3$

图 1 CLDN-1 稳定过表达的食管鳞癌 TE-10 细胞筛选和鉴定  
Fig.1 Screening and identification of TE-10 cells with stable expression of CLDN-1 in esophageal squamous cell carcinoma

### 2.2 CCK-8 检测 TE-10 细胞增殖能力结果

CCK-8 实验结果显示,CLDN1 过表达组 TE10 细胞在 48、72 h 时的吸光度值分别为( $0.71 \pm 0.012$ )和( $1.10 \pm 0.05$ ),而对照组细胞在 48、72 h 时的吸光度值分别为( $0.48 \pm 0.03$ )和( $0.76 \pm 0.03$ )。CLDN1 过表达组 TE10 细胞的吸光值明显高于对照组细胞,差异有统计学意义(48 h:  $t=5.529, P=0.000$ , 72 h:  $t=7.829, P=0.000$ )。这一结果表明,过表达 CLDN1 能够促进 TE10 细胞的增殖活性,如图 2 所示。

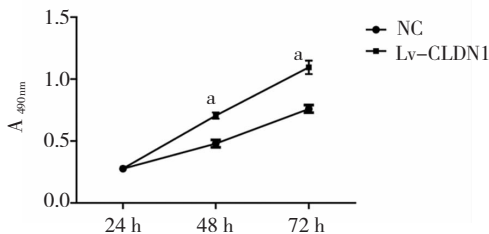
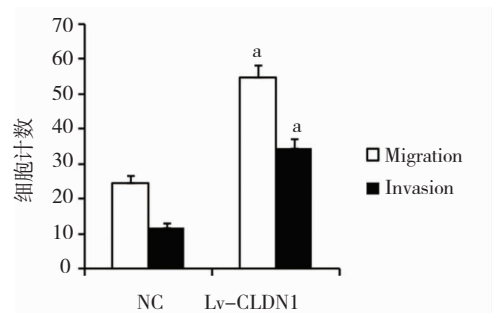
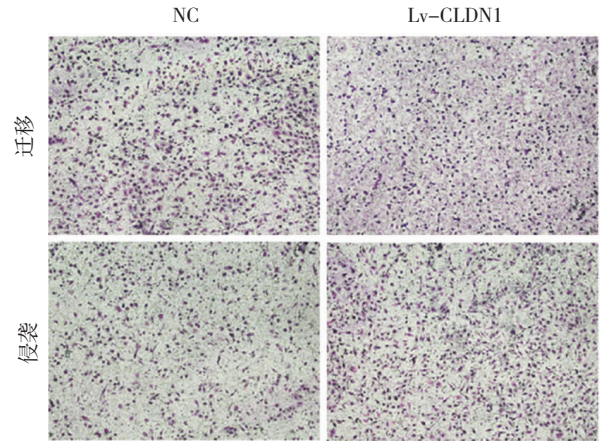


图 2 CCK-8 实验分析 CLDN-1 对 TE-10 细胞增殖的影响  
Fig.2 effects of CLDN-1 on proliferation of TE-10 cells analyzed by Cell Counting Kit-8 assay

### 2.3 Transwell 实验结果

迁移实验结果显示,CLDN1 过表达组的穿膜细胞( $54.8 \pm 3.4$ )明显高于对照组( $24.6 \pm 2.1$ ),差异有统计学意义( $t=9.038, P=0.008$ );侵袭实验结果显示,CLDN1 过表达组的穿膜细胞数( $34.5 \pm 2.6$ )明显高于对照组( $11.5 \pm 1.6$ ),差异有统计学意义( $t=8.325, P=0.001$ )。上述结果说明,上调 CLDN1 的表达促进 TE10 细胞的迁移侵袭能力,如图 3 所示。

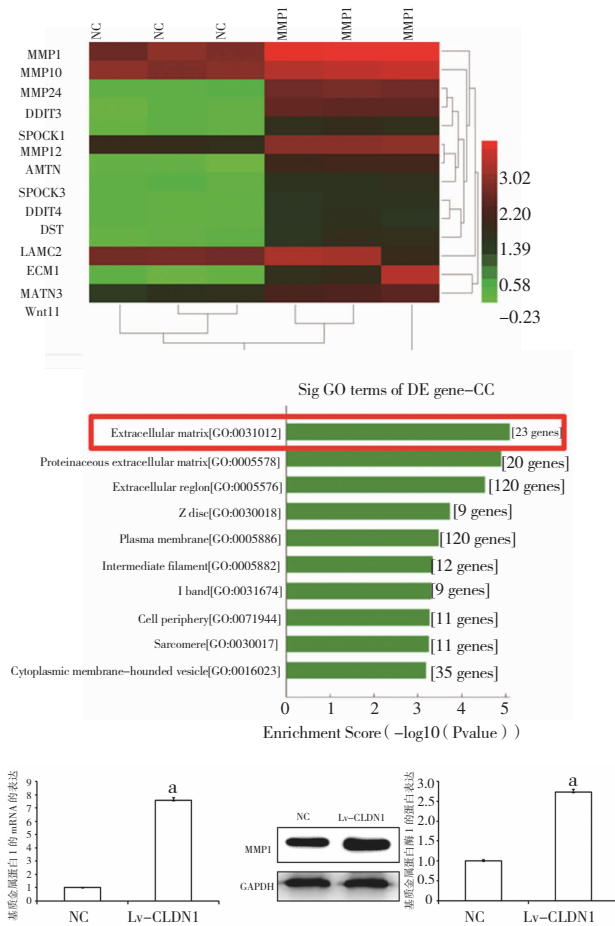


Transwell 实验检测 TE-10 迁移和侵袭能力 (100 ×);统计结果显示过表达 CLDN-1 组的穿膜细胞明显多于对照组, a:  $P < 0.05, n = 3$

图 3 上调 CLDN-1 促进食管鳞癌细胞 TE-10 的侵袭及转移  
Fig.3 upregulation of CLDN-1 promotes invasion and metastasis of TE-10 in esophageal squamous carcinoma cells

### 2.4 CLDN1 上调 TE10 细胞的 MMP1 表达

为了进一步研究 CLDN1 促进 TE10 细胞增殖和转移的机制,通过 mRNA 芯片技术分析了 CLDN1 过表达组 TE10 细胞和相应对照组的 mRNA 表达谱改变,生物信息学分析显示,其中 MMP1 基因相对表达水平达到 10.25 倍,明显上调( $P < 0.05$ );通过定量 PCR 和 Western blot 技术,证实 CLDN1 过表达组细胞中 MMP1 的 mRNA 和蛋白表达水平分别升高了( $7.57 \pm 0.25$ )倍和( $2.68 \pm 0.10$ )倍,差异有统计学意义 mRNA:  $t=59.930, P=0.000$ ;蛋白质:  $t=35.570, P=0.000$ );这一结果表明,CLDN1 能够促进 TE10 中 MMP1 基因表达,如图 4 所示。



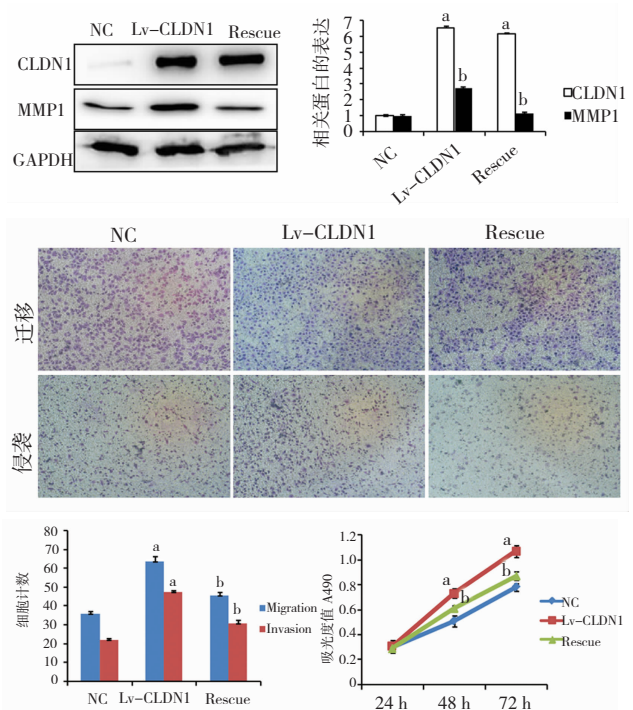
热图分析显示 MMP-1 基因表达明显升高;GO 注释分析表明过表达 CLDN-1 上调 Extracellular matrix 家族基因表达;实时定量 PCR 实验发现 CLDN-1 过表达组 TE-10 细胞 MMP-1 表达上调 a: P < 0.05; Western blot 实验证实 CLDN-1 上调了 MMP-1 蛋白水平, a: P < 0.05

图 4 CLDN-1 上调 TE-10 细胞 MMP-1 基因的表达

Fig.4 CLDN-1 up-regulates the expression of MMP-1 gene in TE-10 cells

2.5 CLDN1 通过上调 MMP1 表达促进 TE-10 细胞增殖和转移

为了进一步明确 CLDN1 是否通过上调 MMP1 表达发挥其生物学功能,研究了 MMP1 对 CLDN1 的回复作用,即在过表达 CLDN1 的基础上,干扰 MMP1 的表达,称为回复组,并通过 CCK-8 和 Transwell 检测其增殖和侵袭转移能力的变化,结果表明,与对照组相比,回复组和 CLDN1 过表达组细胞在 24、48、72 h 的 A<sub>490nm</sub> 值明显升高(P<0.05),而与 CLDN1 过表达组相比,回复组细胞的 A<sub>490nm</sub> 值明显降低(P<0.05);这一结果表明,干扰 MMP1 的表达能够抑制 CLDN1 对 TE10 细胞增殖的促进作用。Transwell 结果显示,回复组和 CLDN1 过表达组细胞的迁移和侵袭细胞数目均高于对照组细胞 (P<0.05),而回复组的迁移和侵袭细胞数则明显低于 CLDN1 过表达组 (P<0.05),表明干扰 MMP1 表达抑制了 CLDN1 对 TE10 细胞侵袭转移能力的促进作用。上述结果表明,CLDN1 通过上调 MMP1 表达促进 TE10 细胞的增殖和转移,如图 5 所示。



Western blot 检测各组细胞 CLDN-1 和 MMP-1 蛋白表达, a: P < 0.05, b: P < 0.05, 与阴性对照组相比;Traswell 实验表明 MMP-1 能够抑制 CLDN-1 对 TE1-0 细胞迁移和侵袭的促进 (100 ×), a: P < 0.05, 与阴性组相比, b: P < 0.05, 与 Lv-CLDN-1 组相比; CCK-8 实验表明干扰 MMP-1 后, CLDN-1 过表达组细胞的增殖能力明显减弱, a: P < 0.05, 与阴性组相比, b: P < 0.05, 与 Lv-CLDN-1 组相比, n=3

图 5 CLDN-1 通过上调 MMP-1 表达发挥生物学功能

Fig.5 CLDN-1 plays a biological role by upregulating the expression of MMP-1

3 讨论

鳞状上皮细胞癌是我国食管癌的主要病理类型,由于其早期症状隐匿,多数患者确诊时已处于中晚期,预后较差,5 年生存率仅为 20%左右<sup>[7]</sup>。肿瘤复发和转移是制约食管鳞癌患者临床治疗效果的主要因素<sup>[8]</sup>。紧密连接蛋白在肿瘤增殖、转移、耐药及凋亡等过程中发挥重要作用,其机制尚不明确。本研究中,探讨了紧密连接蛋白 CLDN1 在食管鳞癌中的生物学功能及机制,发现 CLDN1 通过上调 MMP1 基因的表达促进食管鳞癌细胞 TE10 的增殖和侵袭转移。

食管鳞癌细胞脱离原发灶是肿瘤复发和转移的关键步骤,并伴随着上皮屏障结构的破坏,这一现象提示紧密连接蛋白与食管鳞癌复发和转移有关<sup>[9]</sup>。CLDN 蛋白是构成紧密连接结构的重要组成蛋白,截至目前,已经有 24 个家族成员被鉴定。大量研究证实,CLDN 蛋白表达和功能异常与肿瘤的发

生发展密切相关。CLDN6 通过调控 CLDN1 表达促进胃腺癌的远处转移<sup>[10]</sup>; CLDN3 和 CLDN4 可以通过调控 Cu<sup>2+</sup>离子转运蛋白 CTR1 影响卵巢肿瘤细胞对顺铂的耐药性<sup>[11]</sup>。作为 CLDN1 家族成员之一, CLDN1 被证实与肿瘤的恶性表型调控关系密切。例如,在胃癌中,患者 CLDN1 表达越高,预后越差,且 CLDN1 通过抑制胃癌细胞失巢凋亡促进其增殖和转移<sup>[12]</sup>; CLDN1 通过上调 ULK1 依赖的自噬活性,从而促进非小细胞肺癌的耐药性<sup>[13]</sup>。本研究中,发现稳定上调 CLDN1 在食管鳞癌细胞 TE10 中的表达后,细胞的体外增殖能力和转移能力明显增强,表现为 CLDN1 过表达组细胞在 CCK-8 实验中各时间点 A<sub>490 nm</sub> 值和 Transwell 实验中穿膜细胞数均明显高于对照组,提示 CLDN1 在食管鳞癌中发挥着促癌基因的作用。

为了研究 CLDN1 促进 TE10 细胞增殖和转移的机制,本研究对转染组细胞进行了 mRNA 表达谱芯片的检测,结果发现上调 CLDN1 的表达明显促进基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs)基因的表达。现有研究表明,MMPs 是与肿瘤侵袭转移关系最密切的一类基质水解酶,主要通过降解细胞外基质,调控肿瘤血管生成等途径促进肿瘤细胞侵袭转移,是肿瘤治疗的重要靶点<sup>[14-15]</sup>。本研究中,发现 CLDN1 调控了 23 个 MMPs 家族基因的表达,如 MMP1、MMP12、MMP10 等。通过对表达倍数最高的 MMP1 进行鉴定,发现 CLDN1 在体外明显促进 MMP1 的表达水平。现有研究发现,MMP2、MMP9、MMP13、MMP21 在食管鳞癌中上调,且促进其增殖和转移<sup>[16]</sup>,而 MMP1 在食管鳞癌中的作用尚不明确。查阅现有文献,表明 MMP1 与肿瘤的进展具有较密切的关系,如:MMP1 转录受到转录因子 slug 激活,从而促进乳腺癌细胞的耐药性<sup>[16]</sup>; MMP1 基因启动子的多态性与非小细胞肺癌、口腔鳞癌、乳腺癌的侵袭转移关系密切<sup>[17-18]</sup>。本研究在过表达 CLDN1 的基础上,干扰 TE10 细胞中 MMP1 的表达,发现下调 MMP1 的表达后,CLDN1 过表达组细胞的增殖和转移受到明显的抑制,其 A<sub>490 nm</sub> 值和穿膜细胞数均低于过表达组。这一结果表明,CLDN1 通过上调 TE10 细胞中 MMP1 表达发挥生物学功能。同时,课题组也注意到干扰 MMP1 并未完全回复 CLDN1 对食管鳞癌细胞 TE10 的促进作用,其 A<sub>490 nm</sub> 值和穿膜细胞数均高于对照组,表明 CLDN1 的促癌作用还存在其他机制。

综上所述,本研究认为 CLDN1 能够通过上调 MMP1 表达促进食管鳞癌细胞 TE10 的增殖和侵

袭转移,发挥促癌基因的功能,是潜在的食管鳞癌治疗靶点。

## 参 考 文 献

- [1] 吴 剑,戴天阳,张 敏,等. MACC1 在人食管鳞癌中的表达及对侵袭的影响[J]. 第三军医大学学报,2014,36(21):2196-2200.
- [2] 吴 剑,张 敏,戴天阳,等. siRNA 干扰 MACC1 基因对食管癌细胞 TE-1 的生物学影响[J]. 第三军医大学学报,2014,36(5):442-445.
- [3] Zhang WN, Li W, Wang XL, et al. CLDN1 expression in cervical cancer cells is related to tumor invasion and metastasis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52):87449-87461.
- [4] Eftang LL, Esbensen Y, Tannæs TM, et al. Up-regulation of CLDN1 in gastric cancer is correlated with reduced survival[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:586.
- [5] Zhao X, Zou Y, Gu Q, et al. Lentiviral vector mediated claudin1 silencing inhibits epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. *Viruses*, 2015, 7(6):2965-2979.
- [6] Kuo KT, Chen CL, Chou TY, et al. Nm23H1 mediates tumor invasion in esophageal squamous cell carcinoma by regulation of CLDN1 through the AKT signaling[J]. *Oncogenesis*, 2016, 5(7):e239.
- [7] 卢 红,王建军,周 芳. 食管鳞癌组织中磷酸化表皮生长因子受体和 Akt 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报(医学版),2015,50(1):5-8.
- [8] 刘 磊,周 珍,邝 刚,等. 食管鳞癌中 DACT2 基因表达及甲基化状态研究[J]. 中国肿瘤,2017,26(4):302-307.
- [9] 徐 胤,王 璞,沈才飞,等. 食管鳞癌及癌前病变组织中紧密连接蛋白 claudin3 和 4 的表达及临床病理意义[J]. 第三军医大学学报,2014,36(9):873-877.
- [10] Torres-Martínez AC, Gallardo-Vera JF, Lara-Holguin AN, et al. Claudin-6 enhances cell invasiveness through claudin-1 in AGS human adenocarcinoma gastric cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 350(1):226-235.
- [11] Shang X, Lin X, Manorek G, et al. Claudin-3 and claudin-4 regulate sensitivity to cisplatin by controlling expression of the copper and cisplatin influx transporter CTR1[J]. *Mol Pharmacol*, 2013, 83(1):85-94.
- [12] Huang J, Li J, Qu Y, et al. The expression of claudin 1 correlates with  $\beta$ -catenin and is a prognostic factor of poor outcome in gastric cancer[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(4):1293-1301.
- [13] Zhao Z, Li J, Jiang Y, et al. CLDN1 increases drug resistance of non-small cell lung cancer by activating autophagy via up-regulation of ULK1 phosphorylation[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23:2906-2916.
- [14] 马 鹏,冯 俊,彭 涛. 基质金属蛋白酶-7 在鼻咽癌中的表达及其与肿瘤侵袭转移的相关性研究[J]. 西部医学,2017,29(6):769-772.
- [15] 赵岭岭,吴春平,李景光. 骨桥蛋白和基质金属蛋白酶-3、10 在结肠癌组织中的表达及意义[J]. 临床和实验医学杂志,2017,16(3):240-243.
- [16] 袁继宝,庞 瑶,熊海科,等. MMP-2、TIMP-2 在食管鳞状细胞癌的表达与临床意义[J]. 蚌埠医学院学报,2017,42(3):297-301.

(责任编辑:张辉洁)