

NRAGE 对肠上皮细胞凋亡的影响*

冯奇^{1,2,3}, 胡远亮², 邹贵军², 张朝军^{2△}

1. 重庆市第三军医大学西南医院 普通外科(重庆 400037); 2. 北京海军总医院 普通外科(北京 100000);
3. 河南省信阳市明港镇 897 医院(信阳 464094)

【摘要】 目的 探讨神经生长因子受体作用黑色素瘤抗原基因同源蛋白(neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog, NRAGE)是否参与肠缺血再灌注(ischemia and reperfusion, I/R)损伤的过程及其对肠上皮细胞凋亡及 occludin 蛋白的影响。**方法** 制备 SD 大鼠小肠 I/R 损伤模型,取肠组织行免疫组化染色,观察 NRAGE 蛋白的表达变化;体外肠上皮永生化细胞株 IEC-6 给予缺氧及复氧后观察细胞 NRAGE 的表达变化;将 NRAGE 过表达慢病毒(Lv-NRAGE 组)、NRAGE 干扰表达慢病毒(sh-NRAGE 组)及对照慢病毒(Lv-control 组)感染 IEC-6 细胞,并设置不加慢病毒的对照组(NC 组),Western blot 及 RT-PCR 观察各组细胞 NRAGE 蛋白及 mRNA 的表达变化,流式细胞术观察各组 IEC-6 细胞的凋亡情况,Western blot 观察感染慢病毒后紧密连接蛋白 occludin 蛋白的表达变化。**结果** I/R 损伤后肠黏膜上皮细胞 NRAGE 表达较 sham 组升高($P < 0.01$);体外 IEC-6 细胞缺氧 6 h 后 NRAGE 蛋白的表达增加($P < 0.01$),NRAGE mRNA 表达升高($P < 0.01$)。感染慢病毒 48 h 后,相比于 Lv-control 组,Lv-NRAGE 组早期凋亡率增加($P < 0.01$),occludin 蛋白表达降低($P < 0.01$),sh-NRAGE 组早期凋亡率降低($P < 0.01$),occludin 蛋白表达增高($P < 0.001$)。**结论** NRAGE 参与了 I/R 损伤过程,并促进肠上皮细胞凋亡,降低 occludin 蛋白的表达。

【关键词】 NRAGE 缺血再灌注损伤 肠上皮细胞 细胞凋亡

Effects of Neurotrophin Receptor-interacting MAGE Homolog on Apoptosis of Intestinal Epithelial Cells FENG Qi^{1,2,3}, HU Yuan-liang², ZOU Gui-jun², ZHANG Chao-jun^{2△}. 1. Department of General Surgery, Xinan Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of General Surgery, General Hospital of Navy, Beijing 100000, China; 3. 897 Hospital, Xinyang 464094, China

△ Corresponding author, E-mail: doctorzhangxq@aliyun.com

【Abstract】 **Objective** To explore whether neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog (NRAGE) is involved in the intestinal ischemia-reperfusion (I/R) and its effect on the apoptosis of intestinal epithelial cells and the expression of occludin protein. **Methods** The level of NRAGE protein after the rat small intestine I/R was detected by immunohistochemical (IHC) *in vivo*. The level of NRAGE protein and mRNA in IEC-6 cells after hypoxia and reoxygenation were tested by Western blot and RT-PCR respectively *in vitro*. The IEC-6 cells were divided into four groups, including NRAGE overexpression by lentivirus infection (Lv-NRAGE group), interference (sh-NRAGE group), lentivirus control (Lv-control group), and normal control group without lentivirus infection (NC group). The apoptosis of IEC-6 cells after infection was analyzed by flow cytometry. The level of the tight junction protein occludin was detected by Western blot. **Results** The expression of NRAGE were highly increased in intestinal mucosa epithelial cells after I/R ($P < 0.01$). The proteins and mRNA levels of NRAGE were increased after 6 h of hypoxia in IEC-6 cells *in vitro*. Compared with the Lv-control group, the early apoptosis rate was raised ($P < 0.01$) and the level of occludin was reduced ($P < 0.01$) in Lv-NRAGE group; while the early apoptosis rate was reduced ($P < 0.01$) and the level of occludin was raised in sh-NRAGE group ($P < 0.001$). **Conclusion** NRAGE may be involved in intestinal I/R and promote the apoptosis and decrease occludin expression of intestinal epithelial cells.

【Key words】 NRAGE Ischemia-reperfusion injury Intestinal epithelial cells Cell apoptosis

缺血再灌注(ischemia and reperfusion, I/R)损伤是外科实践中最常见的组织器官损伤之一,在脏

器严重感染、创伤、休克等疾病的病理演变过程中起了非常重要的作用,其发生发展过程与诸多病理生理因素相关,如能量代谢障碍、自由基损伤、一氧化氮作用减弱、白细胞黏附与内皮细胞损伤、细胞凋亡等^[1]。细胞凋亡是肠黏膜上皮细胞更新代谢的主要

* 国家自然科学基金面上项目(No. 81370479)资助

△ 通信作者, E-mail: doctorzhangxq@aliyun.com

形式,其与黏膜上皮等细胞增殖之间的动态平衡共同调节肠道正常的生理功能和形态结构,肠 I/R 损伤可造成肠黏膜组织凋亡细胞明显增加,细胞凋亡也是肠 I/R 损伤后肠黏膜上皮细胞死亡的主要模式,破坏肠壁的完整性,引起细菌和内毒素的易位^[2-3],可引发局部及全身炎症反应,促进多器官功能障碍综合征(MODS)的发生发展。因此,对其发生机制进行深入研究,将有助于减少 MODS 的发生,降低死亡率。

神经生长因子受体作用黑色素瘤抗原基因同源蛋白(neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog, NRAGE)是2000年由 SALEHI 等^[4]通过酵母双杂交的方法筛选到的与神经生长因子的低亲和力类受体 p75NTR (p75 neurotrophin receptor)相互作用的蛋白,隶属于黑色素瘤抗原(MAGE)家族,在交感神经前体细胞 p75NTR 诱导的凋亡中发挥关键作用。大部分 MAGE 成员只在肿瘤组织中表达,而在正常组织中不表达。NRAGE 不同于大部分 MAGE 成员,它不编码肿瘤抗原,在发育早期和成年期的许多组织中(如脑、心、肝脏、肾、肌肉、肠)均有表达^[5],它包含一个独特的 WQXPXX 六肽重复区域,推测可能与蛋白相互作用有关^[4]。随着研究的深入,发现 NRAGE 在神经凋亡^[4-8]、细胞周期调控^[5]、细胞间黏附^[9]、抑制黑色素瘤及胰腺癌的转移^[10]、肾分支形态发生^[11]中均发挥重要作用。KENDALL 等^[5]已证实 NRAGE 在肠组织中有表达,但在其中发挥的作用尚不明确。本研究探讨 NRAGE 是否参与肠 I/R 损伤的过程,及其对肠上皮细胞凋亡的影响,以期对肠 I/R 损伤的治疗及预防提供新的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及实验动物 肠上皮永生化细胞株 IEC-6 购自美国模式培养物集存库 ATCC 中心。雄性 SD 大鼠 10 只,6~8 周龄,体质量 200~250 g,购自重庆新桥医院实验动物中心,饲养于 SPF 级环境中。

1.1.2 主要试剂 DMEM 高糖培养基、胎牛血清(Gibco 公司),胰蛋白酶(Invitrogen 公司),BCA 蛋白浓度检测试剂盒(碧云天),重组慢病毒包括 NRAGE 过表达慢病毒(Lv-NRAGE)、NRAGE 干扰表达慢病毒(sh-NRAGE)、对照慢病毒(Lv-control)(威斯腾生物),PrimerScript RT 逆转录试

剂盒及 QPCR SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa 公司),FITC Annexin-V 凋亡检测试剂盒、碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒(BD 公司),兔抗 NRAGE (Proteintech 公司),兔抗 GAPDH(武汉博士德),兔抗 occludin(Santa Cruz 公司),羊抗兔 IgG(中杉金桥),免疫组化试剂盒(武汉博士德)。

1.2 实验方法

1.2.1 SD 大鼠肠 I/R 损伤模型的制备 参照文献^[12]制作 SD 大鼠肠 I/R 损伤模型,术前禁食 12 h,不禁水,动物按随机数字表法进行分组:肠缺血再灌注组(I/R 组, $n=5$);大鼠麻醉后,腹正中中线进腹,找到并分离小肠系膜动脉根部后,用无创血管夹夹闭,30 min 后松夹,缝合并关闭腹腔,造模成功后 6 h 处死大鼠;假手术组(Sham 组, $n=5$):模型建立时只分离小肠系膜动脉根部,不夹闭肠系膜上动脉,6 h 后处死大鼠。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.2.2 免疫组化染色检测大鼠肠 I/R 损伤后 NRAGE 蛋白表达的变化 处死大鼠后,取 I/R 损伤的小肠组织于预冷的生理盐水中清洗,固定于体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液内,24 h 后常规石蜡包埋,4 μm 厚切片,采用免疫组化试剂盒染色(按试剂盒说明操作,兔抗 NRAGE 稀释倍数 1:200)。评分标准:采用 Allred 评分系统^[13],根据细胞染色的强度和阳性细胞比例进行评分,具体的判断标准如下:无阳性显色计 0 分,浅黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分;阳性染色细胞数占样本细胞数的百分比,0% 为 0 分,1%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,76%~100% 为 4 分。每个视野阳染程度得分与阳染细胞比例得分相乘的值,作为最终得分(0~12 分)。最终得分 ≤ 5 为低表达; ≥ 6 为高表达。结果的判读采用盲法进行,随机选择 5 个视野(400 倍),由 2 名与本实验无关的研究员实施。

1.2.3 缺氧及复氧对 IEC-6 细胞 NRAGE mRNA 和蛋白表达的影响 IEC-6 细胞株复苏培养,然后给予缺氧 6 h 及复氧 1 h,观察 NRAGE mRNA 和蛋白表达的变化。缺氧条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO_2 、体积分数为 1% 的 O_2 培养箱中培养,培养基为无血清 DMEM 高糖培养基,复氧条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO_2 、体积分数为 20% 的 O_2 培养箱中培养。

1.2.4 IEC-6 细胞感染过表达或干扰表达 NRAGE 慢病毒对 NRAGE 表达的影响 IEC-6 细

胞株按 1×10^5 /孔接种于 6 孔板, 37°C 、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中培养 24 h。含有 $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene 的 2 mL 新鲜培养基替换原培养基。将慢病毒分别感染 IEC-6 细胞, 分为 Lv-NRAGE 组、sh-NRAGE 组及 Lv-control 组, 并设置不加慢病毒的对照组。按分组加入慢病毒悬液 (20×10^5 TU), 37°C 、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中培养 4 h, 加入 2 mL 新鲜培养基。继续培养 24 h, 更换新鲜培养基, 继续培养 24 h, 提取细胞总蛋白、总 RNA 分别进行 NRAGE 蛋白和 mRNA 检测。

1.2.5 Western blot 检测 NRAGE 蛋白和紧密连接蛋白 occludin 的表达 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度, SDS-PAGE 凝胶电泳(浓缩层 80 V, 分离层 120 V)、PVDF 膜转胶(电流 210 mA), 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗(NRAGE 抗体稀释倍数 1:5 000, occludin 抗体稀释倍数 1:500), 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后, 荧光二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次后用凝胶成像系统扫描并拍照, 测定各显色条带的灰度值, 以目的条带与 GAPDH 灰度值的比值为目的蛋白的相对含量。

1.2.6 Real time-PCR 检测 NRAGE mRNA 的表达 Trizol 法提取细胞中的总 RNA, 紫外分光光度计测量样品在 260 nm 的光密度, 确定 RNA 质量。取 $1 \mu\text{g}$ RNA 样品用 PrimerScript RT 试剂盒逆转录得到反转录产物 cDNA。引物(由 TaKaRa 公司合成)序列见附表。取 $35 \mu\text{L}$ QPCR SYBR Premix EX Taq II, $5.6 \mu\text{L}$ 引物, $1.4 \mu\text{L}$ ROX, $6 \mu\text{L}$ cDNA, 再加 QH_2O 至 $70 \mu\text{L}$ 得到反应混合物。采用实时荧光定量 PCR 仪行 Real time-PCR 反应, 扩增条件: 95°C 预变性 30 s; 然后 95°C 5 s 变性, 60°C 34 s 延伸, 40 个循环; 最后 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s 做熔解曲线。内参为 β -actin, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算 mRNA 表达的相对变化。

附表 NRAGE 引物序列

Table Gene sequences of NRAGE

Gene	Sequence of primer (5'-3')	Product length
NRAGE	Forward: TCCGCTCTACCATGAGACT	82 bp
	Reverse: GTCCAGTCACGAGGGTCTCT	
β -actin	Forward: ACGGTCAGGTCATCACTATCG	476 bp
	Reverse: GGCATAGAGGTCTTTACGGATG	

1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 $2.5 \text{ g}/\text{L}$ 胰酶消化细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 制成单细胞悬液。取各组 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V/FITC 和 $10 \mu\text{L}$ PI 溶液, 采用流式细胞仪进行分析, 比较

各组细胞早期凋亡率(右下象限)。

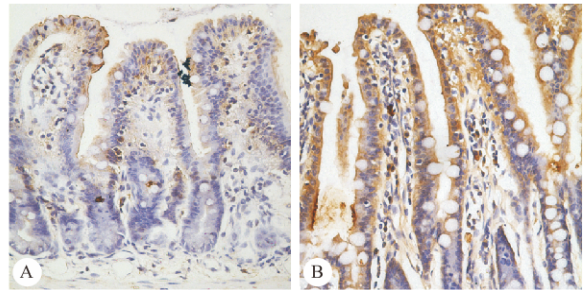
1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间数据比较采用 t 检验, 3 组或 3 组以上数据组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 I/R 损伤对 SD 大鼠肠上皮细胞中 NRAGE 蛋白表达的影响

免疫组化染色结果显示, Sham 组 NRAGE 蛋白主要表达于肠上皮细胞的细胞膜, I/R 组 NRAGE 蛋白在肠上皮细胞膜及细胞质中的表达增多。见图 1。I/R 组大鼠肠上皮细胞 NRAGE 蛋白表达(9.60 ± 2.19) 较 Sham 组(1.20 ± 0.45) 升高($t = -8.400, P = 0.001$), I/R 组免疫组化评分 ≥ 6 , 为高表达。

图 1 NRAGE 蛋白在肠上皮细胞中的表达。Elivision $\times 400$ Fig 1 The level of NRAGE protein expression in the intestinal epithelial cells was detected by IHC. Elivision $\times 400$

A: Sham group; B: I/R group

2.2 缺氧及复氧对 IEC-6 细胞 NRAGE mRNA 及蛋白表达的影响

RT-PCR 检测结果显示, NRAGE mRNA 缺氧 6 h 组相比于对照组升高($P < 0.01$), 给予复氧后降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示, NRAGE 蛋白在 IEC-6 细胞缺氧 6 h 后表达较对照组增多($P < 0.01$), 复氧 1 h 后表达较缺氧 6 h 组下调($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 细胞感染慢病毒后对 NRAGE 蛋白和 mRNA 表达的影响

Western blot 检测结果显示, Lv-control 组与 NC 组比较, NRAGE 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$); 相比于 Lv-control 组, Lv-NRAGE 组 NRAGE 蛋白表达升高($P < 0.001$), sh-NRAGE 组 NRAGE 蛋白表达降低($P < 0.01$)。RT-PCR 检测

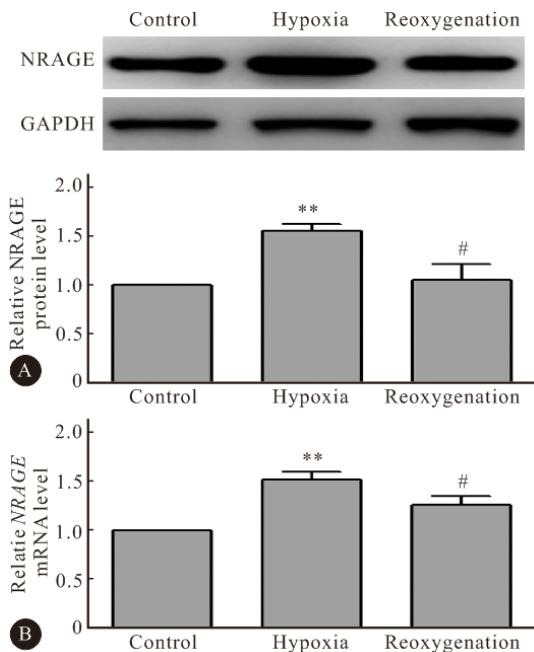


图 2 IEC-6 细胞缺氧 6 h 及缺氧 6 h 后复氧 1 h, Western blot(A)和 RT-PCR(B)检测 NRAGE 蛋白及 mRNA 的表达

Fig 2 IEC-6 cells were placed in hypoxia (1% O₂) for 6 h and then reoxygenation (20% O₂) for 1 h. The levels of NRAGE protein expression (A) and mRNA expression (B) were detected by Western blot and RT-PCR respectively

** $P < 0.01$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. hypoxia group

结果显示, Lv-control 组与 NC 组比较, NRAGE mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 相比于 Lv-control 组, Lv-NRAGE 组 NRAGE mRNA 表达升高 ($P < 0.001$), sh-NRAGE 组 NRAGE mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)。见图 3。提示 IEC-6 细胞成功感染过表达及干扰 NRAGE 表达慢病毒。

2.4 NRAGE 对 IEC-6 细胞凋亡的影响

感染重组慢病毒后 48 h, 流式细胞仪检测发现, Lv-control 组早期凋亡率 (0.0445 ± 0.0024) 与 NC 组早期凋亡率 (0.0441 ± 0.0010) 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 相比于 Lv-control 组, Lv-NRAGE 组细胞早期凋亡率 (0.0672 ± 0.0072) 升高 ($P < 0.01$), sh-NRAGE 组细胞早期凋亡率 (0.0300 ± 0.0069) 降低 ($P < 0.01$)。说明 NRAGE 能增加 IEC-6 细胞的早期凋亡率。

2.5 NRAGE 对紧密连接蛋白 occludin 表达的影响

Western blot 检测结果显示, 感染组细胞培养 48 h 后, 相比于 Lv-control 组 occludin 蛋白的表达, Lv-NRAGE 组细胞 occludin 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), sh-NRAGE 组 occludin 蛋白表达升高 ($P < 0.001$)。见图 4。

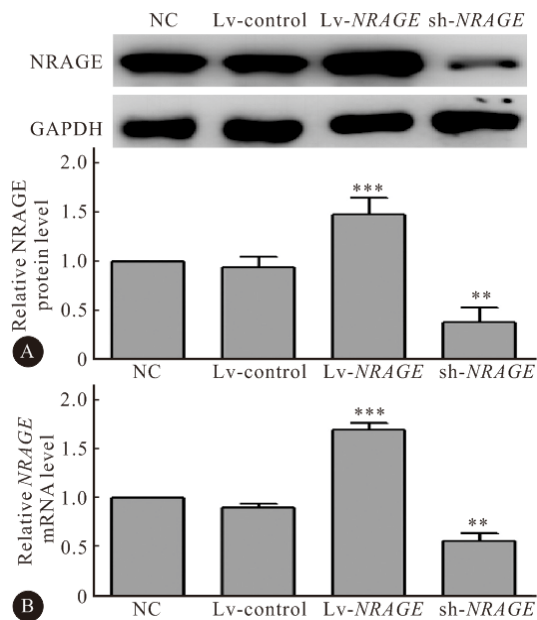


图 3 IEC-6 细胞感染慢病毒 48 h 后 NRAGE 蛋白(A)和 mRNA(B) 的表达

Fig 3 Expressions of NRAGE protein (A) and mRNA (B) 48 h post-infection

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. Lv-control group

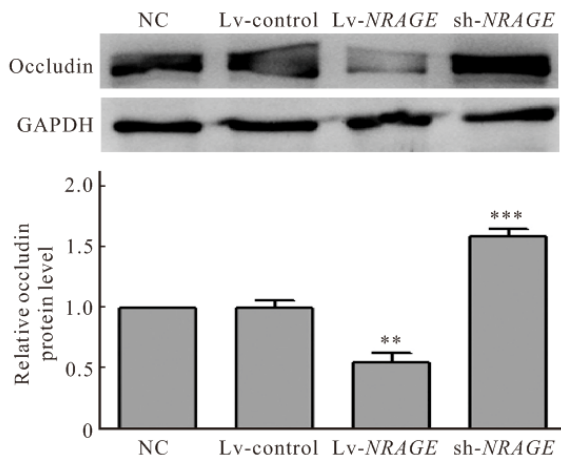


图 4 感染慢病毒 48 h 后 occludin 蛋白表达

Fig 4 Expression of occludin protein 48 h post-infection

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. Lv-control group

3 讨论

肠 I/R 损伤是多因素参与、连续发展的过程, I/R 组织发生细胞凋亡也是一个多因素的过程, 对其机制进行深入研究将对肠 I/R 损伤的防治有重要的理论意义和现实意义。NRAGE 作为 MAGE 家族的新成员, 在成年期的很多组织都有表达, 先前对 NRAGE 的研究集中在神经系统^[4-8]、肿瘤^[10,14-15]等, 而其和肠 I/R 所致的肠黏膜屏障损伤之间的关

系罕有研究。本实验中,我们通过 SD 大鼠肠 I/R 损伤模型,发现肠 I/R 损伤后,大鼠肠黏膜上皮细胞中 NRAGE 蛋白呈高表达,与 Sham 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且在细胞质中表达升高。体外实验中,我们得到了相似的结果,给予 IEC-6 细胞缺氧处理后, NRAGE 的表达较对照组升高,复氧后 NRAGE 的表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 NRAGE 参与了肠 I/R 损伤的过程,且可能通过影响肠上皮细胞而发挥作用。IKEDA 等^[3]研究发现细胞凋亡是肠 I/R 损伤后肠黏膜上皮细胞死亡的主要模式,为探讨 NRAGE 是否影响肠上皮细胞的凋亡,本研究通过慢病毒感染技术在 IEC-6 细胞株中进行 NRAGE 过表达及干扰, Western blot 及 RT-PCR 验证感染成功后,流式细胞术检测 IEC-6 细胞凋亡,结果提示感染 48 h 后 NRAGE 过表达组 IEC-6 细胞早期凋亡率增加,干扰组 IEC-6 细胞早期凋亡率降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),证实 NRAGE 可促进 IEC-6 细胞的凋亡。此外,我们还检测了感染 48 h 后紧密连接蛋白 occludin 的表达,发现过表达 NRAGE 后 occludin 蛋白表达降低,而干扰 NRAGE 后 occludin 蛋白表达升高。occludin 蛋白是肠上皮细胞紧密连接中重要的结构蛋白之一,参与紧密连接形成的信号调节^[16]。NRAGE 可降低其表达,表明 NRAGE 可能通过降低 occludin 蛋白从而破坏肠黏膜屏障。上述实验说明在肠 I/R 损伤中, NRAGE 表达增多,而 NRAGE 可能通过促进肠上皮细胞的凋亡及降低紧密连接蛋白 occludin 表达水平导致肠黏膜屏障功能障碍,从而破坏肠壁的完整性,引起细菌和内毒素的易位。但其中的机制还不明确, MATLUK 等^[17]研究发现在 293HEK 细胞和 P19 中, NRAGE 可促进 BMP4 非经典信号通路中 NF- κ B 的激活,本实验室前期研究发现肠 I/R 损伤中 BMP2/4 可通过激活 NF- κ B 信号通路介导的炎症因子 TNF α 及 IL-6 的表达以及降低紧密连接蛋白 occludin 的表达导致肠黏膜功能损伤^[12],是否在肠 I/R 损伤中, NRAGE 也通过激活 NF- κ B 导致肠黏膜屏障功能损伤,以及是否是 BMP 非经典信号通路的组成部分,还有待进一步研究。

综上所述,本研究证实了 NRAGE 蛋白参与了肠 I/R 损伤的过程,并且可能通过促进肠上皮细胞的凋亡及降低紧密连接蛋白 occludin 表达水平导致肠黏膜屏障功能的损伤。NRAGE 可能在肠 I/R 损伤中发挥着关键的作用,深入研究 NRAGE 蛋白在

I/R 损伤中的作用及机制可能为肠黏膜屏障功能损伤的修复提供新的治疗靶点。但就目前研究来看,只是揭露了 NRAGE 参与肠 I/R 损伤的部分机制,尚有许多问题亟待解决,一是 NRAGE 在肠 I/R 损伤中发挥作用的具体机制还需进一步研究,二是 NRAGE 在肠 I/R 损伤中的作用还需行体内实验进一步证实。

参 考 文 献

- [1] CERQUEIRA NF, HUSSNI CA, YOSHIDA WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras*, 2005, 20(4): 336-343.
- [2] HOTCHKISS RS, SCHMIEG RE, SWANSON PE, *et al.* Rapid onset of intestinal epithelial and lymphocyte apoptotic cell death in patients with trauma and shock. *Crit Care Med*, 2000, 28(9): 3207-3217.
- [3] IKEDA H, SUZUKI Y, SUZUKI M, *et al.* Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut*, 1998, 42(4): 530-537.
- [4] SALEHI AH, ROUX PP, KUBU CJ, *et al.* NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron*, 2000, 27(2): 279-288.
- [5] KENDALL SE, GOLDHAWK DE, KUBU C, *et al.* Expression analysis of a novel p75(NTR) signaling protein, which regulates cell cycle progression and apoptosis. *Mech Develop*, 2002, 117(1/2): 187-200.
- [6] BRAGASON BT, PALSDOTTIR A. Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neuronal apoptosis. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 29(2): 232-244.
- [7] DI CERTO MG, CORBI N, BRUNO T, *et al.* NRAGE associates with the anti-apoptotic factor Che-1 and regulates its degradation to induce cell death. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 11): 1852-1858.
- [8] BERTRAND MJ, KENCHAPPA RS, ANDRIEU D, *et al.* NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis *in vivo*. *Cell Death Differ*, 2008, 15(12): 1921-1929.
- [9] XUE B, WEN C, SHI Y, *et al.* Human NRAGE disrupts E-cadherin/beta-catenin regulated homotypic cell-cell adhesion. *Biochem Bioph Res Co*, 2005, 336(1): 247-251.
- [10] CHU CS, XUE B, TU C, *et al.* NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett*, 2007, 250(2): 268-275.
- [11] NIKOPOULOS GN, MARTINS JF, ADAMS TL, *et al.* NRAGE: a potential rheostat during branching morphogenesis. *Mech Develop*, 2009, 126(5/6): 337-349.
- [12] CHEN K, XIE W, LUO B, *et al.* Intestinal mucosal barrier is injured by BMP2/4 via activation of NF- κ B signals after ischemic reperfusion. *Mediat Inflamm*, 2014, 2014: 1-11 [2016-10-15]. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/901530>. doi: 10.1155/2014/901530. (下转第 565 页)

- of heart failure. *J Card Fail*,2002,8(3):149-154.
- [3] MUKOYAMA M, NAKAO K, SALTO Y, *et al.* Human brain natriuretic peptide, a novel cardiac hormone. *Lancet*,1990,335(8692):801-802.
- [4] GUSTAFSSON F, STEENSGAARD HF, BADSKHAER J, *et al.* Diagnostic and prognostic performance of N-terminal ProBNP in primary care patients with suspected heart failure. *J Card Fail*,2005,11(5):15-20.
- [5] ZAPHIRIOU A, ROBBS S, MURRAY-THOMAS T, *et al.* The diagnostic accuracy of plasma BNP and NTproBNP in patients referred from primary care with suspected heart failure: results of the UK natriuretic peptides study. *Eur J Heart Fail*,2005,7(4):537-541.
- [6] LAINCHBURY JG, TROUGHTON RW, STRANGMAN KM, *et al.* N-terminal Pro-B-type natriuretic peptide-guided treatment for chronic heart failure: results from the BATTLESCARRED (NT-proBNP-Assisted Treatment To Lessen Serial Cardiac Readmission and death) trial. *J Am Coll Cardiol*,2009,55(1):53-60.
- [7] NT-proBNP临床应用中国专家共识小组. NT-proBNP 临床应用中国专家共识. *中国心血管病研究*,2011,9(6):401-408.
- [8] JANUZZI JL, Jr, CAMARGO CA, ANWARUDDIN S, *et al.* The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in Emergency Department (PRIDE) study. *Am J Cardiol*,2005,95(8):948-954.
- [9] JANUZZI JL, VAN KIMMENADE R, LAINCHBURY J, *et al.* NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients. *Eur Heart J*,2006,27(3):330-337.
- [10] 宋康兴, 卢才义. 脑利钠肽在神经内分泌系统和心肌重构中的作用. *中国全科医学*,2009,12(7):614-615.
- [11] 刘红, 汪芳, 黄一玲, 等. 健康人群血清 NT-proBNP 浓度水平评估. *中国实验诊断学*,2007,11(3):287-289.
- [12] CORTÉS R, PORTOLÉS M, ROSELLÓ-LLETÍ E, *et al.* Impact of glomerular filtration rate on urinary BNP and NT-proBNP levels in heart failure. *Peptides*,2012,33(2):354-358.
- [13] TAKASE H, DOHI Y. Kidney function crucially affects B-type natriuretic peptide (BNP), N-terminal pro BNP and their relationship. *Eur J Clin Invest*,2014,44(3):303-308.
- [14] DEFILIPPI C, VAN KIMMENADE RR, PINTO YM. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide testing in renal disease. *Am J Cardiol*,2008,101(3):82-88.
- [15] 中华医学会心血管病分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南. *中华心血管病杂志*,2014,42(2):98-122.

(2016-11-14 收稿, 2017-03-10 修回)

编辑 余琳

(上接第 560 页)

- [13] HARVEY JM, CLARK GM, OSBORNE CK, *et al.* Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*,1999,17(5):1474-1481.
- [14] YANG Q, OU C, LIU M, *et al.* NRAGE promotes cell proliferation by stabilizing PCNA in a ubiquitin-proteasome pathway in esophageal carcinomas. *Carcinogenesis*,2014,35(7):1643-1651.
- [15] DU Q, ZHANG Y, TIAN XX, *et al.* MAGE-D1 inhibits proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells. *Oncol Rep*,2009,22(3):659-665.
- [16] AL-SADI R, KHATIB K, GUO S, *et al.* Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastr L*,2011,300(6):G1054-G1064.
- [17] MATLUK N, ROCHIRA JA, KARACZYN A, *et al.* A role for NRAGE in NF-kappaB activation through the non-canonical BMP pathway. *BMC Biol*,2010,8:7[2016-10-15]. <http://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-8-7>. doi: 10.1186/1741-7007-8-7.

(2016-11-08 收稿, 2017-03-27 修回)

编辑 沈进