

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.03.001

· 论 著 ·

BBI 阻断 LPS 对肠道上皮细胞间紧密连接蛋白的抑制作用

古 俊, 刘金彪, 霍文哲

(武汉大学基础医学院, 湖北 武汉 430071)

[摘要] **目的** 探讨大豆来源的蛋白酶抑制剂(BBI)是否能阻断脂多糖(LPS)对肠道上皮细胞间紧密连接蛋白的下调作用及其机制。**方法** 用CCK8试剂盒检测LPS和BBI对HT-29细胞的毒性作用。用BBI预处理HT-29细胞6h,再用LPS刺激,分别用实时荧光定量PCR和蛋白质印迹法(Western Blot)检测细胞紧密连接蛋白(ZO-1, Occludin)、TLR4及MyDD8的表达;通过Western Blot检测NF- κ B的激活。**结果** LPS 1 000 ng/mL和BBI 1 000 μ g/mL对HT-29细胞均无毒性作用。LPS可显著地上调HT-29细胞TLR4表达,且上调作用具有时间与剂量效应;能明显下调紧密连接蛋白的表达,其下调作用与LPS浓度成正比;能明显激活NF- κ B,且具有剂量效应;LPS对HT-29细胞的这种作用可被BBI显著地抑制。**结论** 通过抑制LPS诱导的肠道上皮细胞TLR4的表达和NF- κ B的活化,BBI能显著地阻断LPS对肠道上皮细胞间紧密连接蛋白的抑制作用。

[关键词] 胰蛋白酶抑制剂; BBI; 肠道上皮细胞; 紧密连接蛋白; TLR4; NF- κ B

[中图分类号] R574 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)03-0185-06

BBI blocks LPS-mediated inhibitory effect on tight junction protein of intestinal epithelial cells

GU Jun, LIU Jin-biao, HUO Wen-zhe (School of Basic Medical Science, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the blocking effect and mechanism of Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor (BBI) on LPS-mediated downregulation for tight junction protein(HT-29 cells) in intestinal epithelial cells(IECs). **Methods** The toxic effect of LPS and BBI on HT-29 cells was detected by CCK8 Kit. HT-29 cells were pretreated by BBI for 6 hours prior to LPS stimulation, the expression of tight junction protein (ZO-1 and Occludin), TLR4, and MyDD8 was detected by the quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) and Western Blot; activation of NF- κ B was measured by Western Blot. **Results** LPS (1 000ng/mL) and BBI (1 000 μ g/mL) showed no cytotoxicity on HT-29 cells. LPS could significantly upregulate the expression of TLR4 in HT-29 cells, the up-regulation had time-dose effect, and could significantly downregulate the expression of tight junction protein, the down-regulation effect was directly proportional to the concentration of LPS, could activate NF- κ B, and had dose effect, effect of LPS on HT-29 cells could be significantly inhibited by BBI. **Conclusion** By inhibiting the expression of TLR4 and activation of NF- κ B in IECs induced by LPS, BBI can significantly block the LPS-mediated inhibitory effect on tight junction protein in intestinal epithelial cells.

[Key words] Bowman-Birk inhibitor; BBI; intestinal epithelial cell; tight junction protein; TLR4; NF- κ B

[Chin J Infect Control, 2018, 17(3):185-190]

肠道是人体最重要和最复杂的器官之一,它不仅为机体各个器官组织提供营养物质,也为微生物

的生存提供必要的空间与营养条件。人类的许多疾病都伴有肠道功能紊乱以及菌群失调症状。因此,

[收稿日期] 2017-07-13

[基金项目] 国家自然科学基金(81271334; 81571962); 国家传染病防治重大科技专项(2012ZX10004501-001-004)

[作者简介] 古俊(1992-),男(汉族),湖北省襄阳市人,硕士研究生,主要从事天然药物抗HIV研究。

[通信作者] 霍文哲 E-mail: wenzheho@whu.edu.cn

肠道的功能表现也是反映机体健康的直接和重要指标之一^[1]。肠道上皮细胞在血液循环和肠道内的外环境间形成一道天然屏障,是阻挡肠道内微生物及其产物进入机体的第一道重要防线,对维持肠道内动态平衡和正常功能至关重要^[2]。肠道上皮细胞能吸收对机体有益的物质,并特异性地排斥病原体等有害物质^[3]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是一种感染性细菌(革兰阴性细菌)的产物,可诱导包括巨噬细胞在内的免疫细胞和非免疫细胞表达大量的炎症因子,引起炎症反应。LPS 诱导产生的炎症因子会损伤肠道上皮屏障,改变屏障的通透性^[4]。肠道内菌群紊乱以及肠道上皮屏障受损会导致 LPS 的移位,进入血液循环,进一步加剧炎症反应。在艾滋病等多种感染性疾病以及肠炎等非感染性疾病中,肠道免疫紊乱及肠道屏障破坏是主要的病理变化^[5]。

包曼-毕尔克抑制剂(Bowan-Birk inhibitor, BBI)是一种大豆富含的耐酸性蛋白酶抑制剂,具有抗炎功效^[6]。研究表明,BBI 能有效抑制炎症因子表达,对免疫性疾病具有潜在的治疗功效^[7-8]。BBI 还能抑制 LPS 诱导的巨噬细胞炎症因子的表达,减少炎症巨噬细胞造成的神经损伤^[9]。我们的前期研究^[10]显示,BBI 能激活巨噬细胞内天然免疫,抑制人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的感染和复制;BBI 能抑制 LPS 诱导的肠道上皮细胞 NF- κ B 激活,从而抑制炎症因子的表达。大量研究表明,肠道还是 HIV 感染的主要场所。HIV 感染使肠道 CD4⁺ T 细胞丢失,造成肠上皮屏障通透性增加,细菌及其产物如 LPS 进入血液循环,引起全身性免疫激活,这是 HIV 感染进展到艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)的主要原因。因此,抑制或降低 LPS 诱导的免疫激活有助于减缓 HIV 疾病进展。在这项研究中,我们选择既有抗炎作用又能抑制 HIV 的天然产物 BBI,研究 BBI 是否能阻断 LPS 对肠道上皮细胞间紧密连接蛋白的抑制作用,并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 LPS 购于美国 InvivoGen 公司,其效价为 10⁶ EU/mg(endotoxin Unit/mg),用无内毒素的水溶解 LPS(10 μ g/ μ L)后保存于 -80 $^{\circ}$ C;BBI 购于美国 Sigma-Aldrich 公司,其纯度 >90%,用高压灭

菌双蒸水溶解 BBI(10 mg/mL)后保存于 -80 $^{\circ}$ C; Tri-reagent 购于美国 Sigma-Aldrich 公司;SsoAdvancedTM Universal Inhibitor-Tolerant SYBR[®] Green Supermix 购于美国 BIO RAD 公司;CCK8 试剂盒购于美国 MCE 公司。ZO-1 兔单克隆抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司,Occludin 兔单克隆抗体购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,NF- κ B 和 p-NF- κ B 兔单克隆抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 细胞培养 HT-29 细胞(人结肠癌上皮细胞系)购于 ATCC 细胞库。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的细胞培养箱中,用 DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清、1%双抗、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、1%HEPES 缓冲液)培养 HT-29 细胞。

1.3 毒性试验 用 CCK8 试剂盒检测 LPS 和/或 BBI 对 HT-29 细胞的毒性作用。在 96 孔细胞培养板中培养 HT-29 细胞(10⁴ 个/孔),12 h 后用不同浓度的 LPS(0、0.1、1、10、100、1 000 ng/mL)、BBI(0、25、50、100、200、400、600、800、1 000 μ g/mL)或 BBI 预处理后再用 LPS 处理细胞 72 h。在每个培养孔中加入 10 μ L CCK8 溶液,继续培养 4 h 后,用全自动多功能酶标仪(在波长 450 nm 处)检测吸光度值。

1.4 荧光定量 PCR 用 Tri-Reagent 提取细胞 RNA,然后用 NANDROP 超微量分光光度计(Thermo Scientific)检测 RNA 浓度。根据说明书,用逆转录 PCR 试剂盒(Promega, USA)和随机引物(Promega, USA)对 RNA 进行逆转录,37 $^{\circ}$ C 扩增 1 h,95 $^{\circ}$ C 终止反应。实时荧光定量 PCR 用 SYBR Green Supermix 试剂盒。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,95 $^{\circ}$ C 5 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 10 s,40 个循环。实验所使用引物见表 1。Ct 值相对 GAPDH 进行均一化,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 的表达水平。

1.5 蛋白质印迹法(Western Blot) 在 6 孔板中按 2 \times 10⁶ 个/孔培养 HT-29 细胞。用 RIPA 中强度裂解液(碧云天生物技术公司)提取 LPS 或 BBI 处理过的细胞蛋白,RIPA 中加入蛋白磷酸酶抑制剂(北京普利莱基因技术有限公司)。用 8% SDS-PAGE 胶分离 40 μ g 总蛋白,然后转至 PVDF 膜(Bio Rad 公司),5%脱脂奶粉封闭,再用稀释的 ZO-1 兔单克隆抗体(1:1 000),Occludin 兔单克隆抗体(1:1 000),NF- κ B 及 p-NF- κ B 兔单克隆抗体(ser-536, 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,充分洗涤后用

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers sequences for quantitative real-time PCR

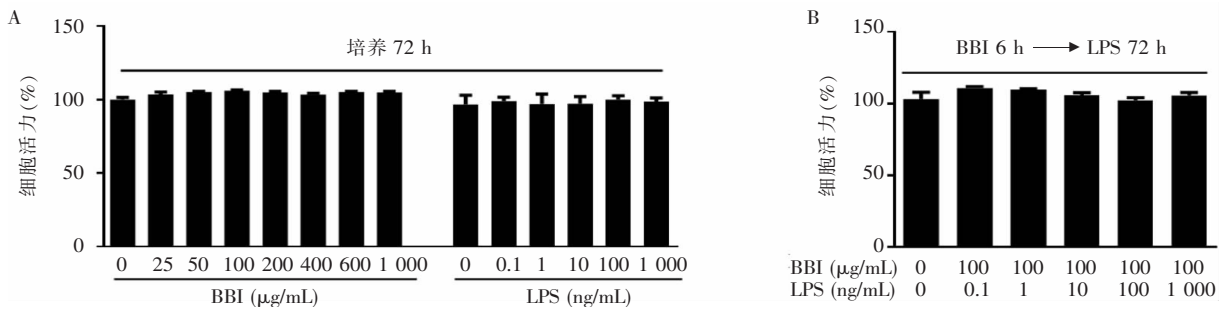
基因名称	正向引物	反向引物
<i>GAPDH</i>	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT
<i>ZO-1</i>	TGTAGCCCATGTTGTAGCAAACC	GAGGACCTGGGAGTAGATGAGGTA
<i>Occludin</i>	TGCCATTACACGGTCTCTCTG	GGTTCTGCCTCATCATTTTCTCTC
<i>TNF-α</i>	TGTAGCCCATGTTGTAGCAAACC	GAGGACCTGGGAGTAGATGAGGTA
<i>IL-1β</i>	CCTGTCCTGCGTGTTGAAAGA	GGGAACTGGGCAGACTCAAA
<i>IL-8</i>	GGCACAAACTTTCAGAGACAG	ACACAGAGCTGCAGAAATCAGG
<i>MCP-1</i>	CATAGCAGCCACCTTCATTCC	TCTGCACTGAGATCTTCTATTGG
<i>TLR4</i>	TGAGCAGTCGTGCTGGTATC	CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC
<i>MyD88</i>	CCGCGTGGCGGAGGAGATGGAC	GCAGATGAAGGCATCGAAACGCTC

辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗孵育 3 h, 洗涤后用增强型化学发光剂 ECL (碧云天生物技术公司) 在化学发光成像仪上显影。用 Image J 图像软件分析条带密度。

2 结果

2.1 BBI 和/或 LPS 对肠道上皮细胞的毒性作用
用 CCK8 试剂盒检测细胞活性, 将未处理的细胞在波长 490 nm 处的吸光度值定为 1.0, 以此计算

处理细胞和未处理细胞的百分比值, 重复 3 次实验, 每次实验的三个复孔取均数 ± 标准差。用不同浓度 LPS 和/或 BBI 处理 HT-29 细胞 72 h, 处理的细胞和未处理细胞的活性相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1A。先用 BBI 预处理细胞 6 h, 再用不同浓度 LPS 处理细胞, 处理的细胞和未处理细胞的活性相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1B。BBI 最大浓度 (1 000 μg/mL) 和 LPS 最大浓度 (1 000 ng/mL), 对细胞均无毒性作用。



A: 用不同浓度 LPS 和/或 BBI 处理 HT-29 细胞 72 h; B: 用 BBI 预处理细胞 6 h, 再用不同浓度 LPS 继续处理 72 h

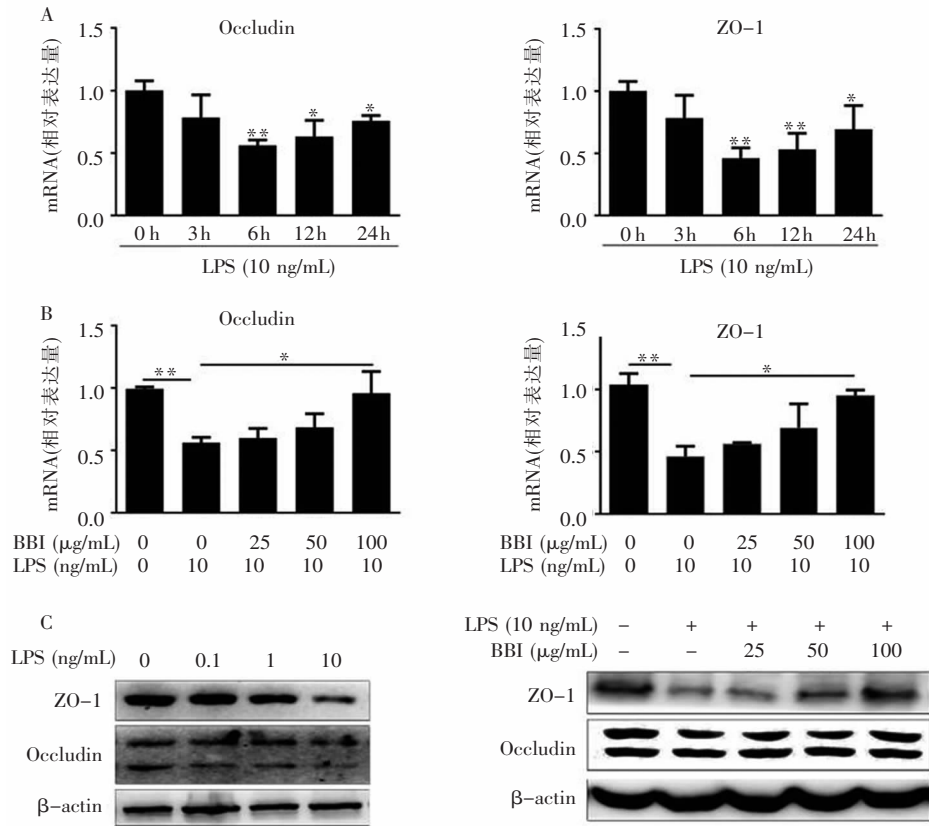
图 1 LPS 和/或 BBI 对 HT-29 细胞的毒性作用

Figure 1 Cytotoxicity effect of LPS and/or BBI on HT-29 cells

2.2 BBI 阻断 LPS 对肠道上皮细胞间紧密连接蛋白的抑制作用 提取细胞 RNA, 实时荧光定量 PCR 检测紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 以及 GAPDH 的 mRNA 水平表达, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 重复 3 次实验, 每次实验的三个复孔取均数 ± 标准差。LPS 可显著地下调 HT-29 细胞间紧密连接蛋白 (ZO-1, Occludin) 在 mRNA 和蛋白水平的表达, 其下调作用与 LPS 浓度成正比。BBI 预处理 6 h 能抑制 LPS 对 HT-29 细胞紧密连接蛋白的下调作用, 且这种抑制效应与 BBI 剂量成正相关。见图 2。

2.3 BBI 对 LPS 诱导的肠道上皮细胞 TLR4 表达

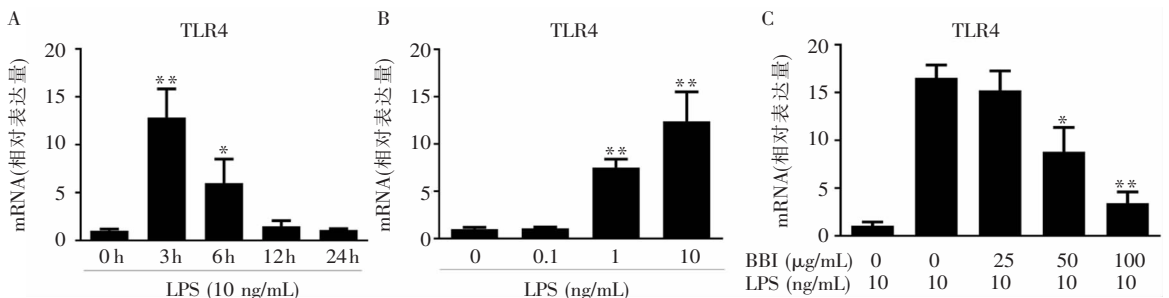
的影响 提取细胞总 RNA, 实时荧光定量 PCR 检测细胞 TLR4 以及 GAPDH 在 mRNA 水平的表达, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 重复 3 次实验, 每次实验的三个复孔取均数 ± 标准差。LPS 能显著上调 HT-29 细胞 TLR4 受体的表达, 且上调作用具有时间和剂量效应。LPS 处理 HT-29 细胞 3 h 时对 TLR4 mRNA 水平的上调作用最明显, 见图 3A。在 10 ng/mL 浓度时, LPS 对 TLR4 的诱导作用最强, 见图 3B。BBI 预处理 HT-29 细胞 6 h 可明显抑制 LPS 对 TLR4 的上调作用, 而且 BBI 的这种抑制作用具有剂量效应, 见图 3C。



A: 按不同时间(0、3、6、12、24 h)用 LPS(10 ng/mL)处理 HT-29 细胞,检测 LPS 对 ZO-1 和 Occludin 表达的影响;B:用不同浓度 BBI 预处理细胞 6 h,再用 LPS 处理 6 h,检测 BBI 对 LPS 的阻断作用;C:用不同浓度 LPS 处理 HT-29 细胞 24 h;或用不同浓度 BBI 预处理细胞 6 h,再用 LPS 处理 24 h;Western Blot 检测细胞 ZO-1、Occludin 以及内参 β -actin 蛋白水平表达; * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$

图 2 BBI 阻断 LPS 对 HT-29 细胞紧密连接蛋白的抑制作用

Figure 2 BBI blocks LPS-mediated inhibitory effect on tight junction protein in HT-29 cells



A: 按不同时间点(0、3、6、12、24 h)用 LPS(10 ng/mL)处理 HT-29 细胞;B:用不同浓度的 LPS 处理 HT-29 细胞;C:用不同浓度 BBI 预处理细胞 6 h,再用 LPS(10 ng/mL)处理 3 h; * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$

图 3 BBI 阻断 LPS 对 TLR4 的作用

Figure 3 BBI blocks LPS-mediated effect on TLR4

2.4 BBI 对肠道上皮细胞炎症因子、TLR4 及 MyD88 表达的影响 用 BBI(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 HT-29 细胞,提取细胞 RNA,用实时荧光定量 PCR 检测细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、MCP-1、TLR4、MyD88 以及 GAPDH 的 mRNA 表达,数据采用

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算,重复 3 次实验,每次实验的三个复孔取均数 \pm 标准差。高浓度 BBI(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 HT-29 细胞对炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、MCP-1)、TLR4 以及 MyD88 的表达无明显作用。BBI 处理时间长短(3、6、12、24 h)对上皮细胞炎症因子表

达也无影响($P>0.05$)。见图 4。

2.5 BBI 对 LPS 诱导的肠道上皮细胞 NF- κ B 活化的影响 用含蛋白磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞蛋白,Western Blot 检测细胞磷酸化的 NF- κ B。LPS 能显著地促进 HT-29 细胞内 NF- κ B 的磷

酸化,这种促 NF- κ B 磷酸化的作用具有剂量效应。BBI 对 NF- κ B 的磷酸化无影响,而 BBI 预处理 HT-29 细胞 6 h 能明显阻断 LPS 对 NF- κ B 的磷酸化的促进作用。见图 5。

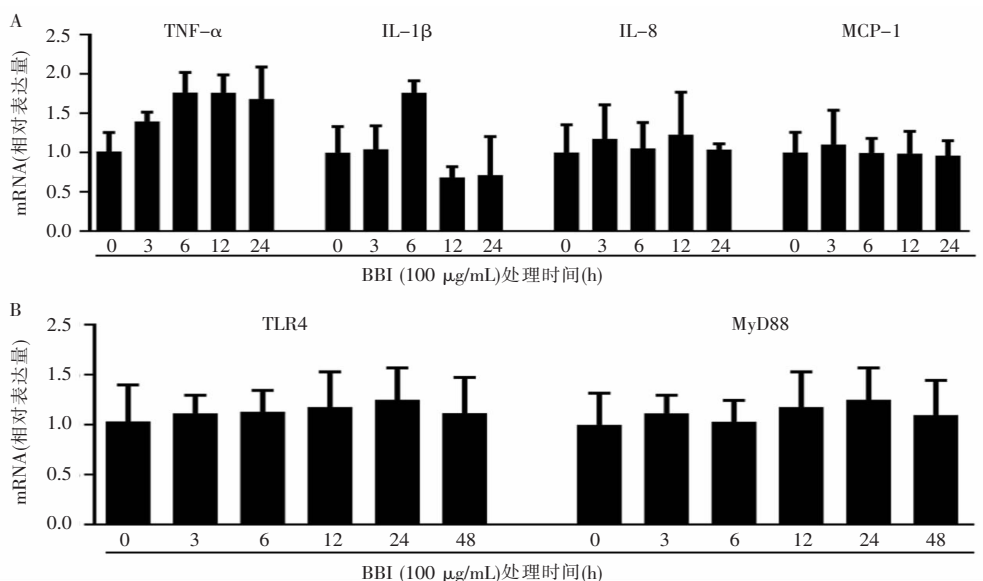
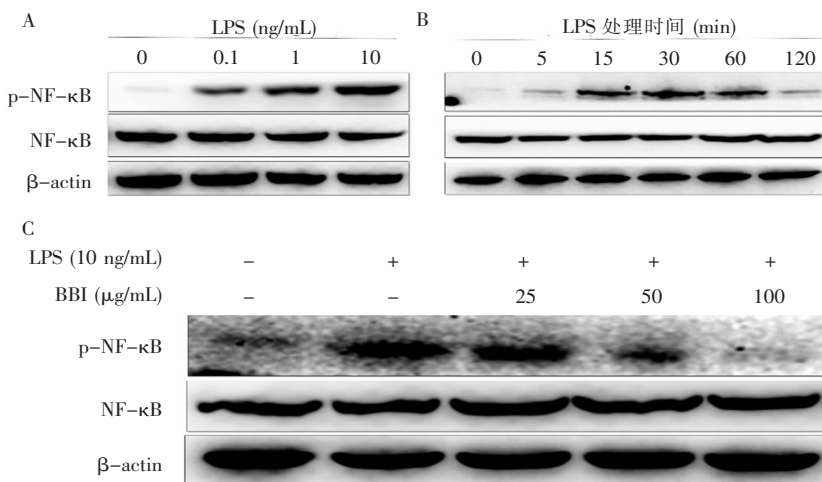


图 4 BBI 对 HT-29 细胞表达炎症因子、TLR4 和 MyD88 的影响

Figure 4 Effect of BBI on inflammatory cytokines, TLR4, and MyD88 expression



A: 用不同浓度 LPS 处理 HT-29 细胞 30 min; B: 用 LPS(10 ng/mL)处理 HT-29 细胞后,按不同时间点(0、5、15、30、60、120 min)检测细胞 NF- κ B; C: 用不同浓度 BBI 预处理细胞 6 h 后再用 LPS(10 ng/mL)处理 HT-29 细胞 30 min

图 5 BBI 对 LPS 诱导肠道上皮细胞 NF- κ B 的磷酸化的影响

Figure 5 Effect of BBI on LPS - mediated phosphorylation of NF- κ B in the intestinal epithelial cells

3 讨论

肠道上皮细胞是肠道屏障的重要组成部分,

肠道屏障对保护肠道不受病原微生物入侵至关重要,以肠道上皮屏障的通透性作为疾病防治靶标越来越受到重视^[11-12]。研究表明,细菌内毒素 LPS 能通过 TLR4 受体募集 MyDD8,激活 NF- κ B,诱导肠

道上皮细胞表达包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 在内的大量炎性因子,导致肠道上皮细胞通透性增加,屏障损伤^[13-14],导致肠道内微生物及其产物移位,进入血液循环,引起全身性免疫激活^[15-16]。由于 HIV 感染的主要靶细胞是 CD4⁺ T 细胞,免疫激活成为 HIV 感染进展主要促进因素。因此,维持肠道完整性至关重要。肠道上皮细胞通过紧密连接蛋白维持上皮屏障的稳定^[17]。Occludin 是第一个被发现的细胞间紧密连接蛋白,表达于所有上皮细胞,在上皮屏障细胞结构和功能中均发挥重要作用^[18]。ZO-1 是细胞间带状紧密连接蛋白,是上皮细胞结构和功能的主要标志^[19-20]。本研究显示,LPS 处理肠道上皮细胞能明显地降低紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达。此外,LPS 还能诱导肠道上皮细胞表达 TLR4,有利于 LPS 发挥功效。LPS 能激活肠道上皮细胞 NF- κ B,促进炎症因子表达。然而,BBI 预处理能阻断 LPS 对细胞间紧密连接蛋白的抑制作用,BBI 还能抑制 LPS 诱导的 TLR4 表达和 NF- κ B 活化。这些结果为 BBI 对 LPS 的抑制作用提供了合理的解释。

LPS 诱导产生的炎性因子是导致肠道屏障损伤及免疫激活的主要因素。机体免疫激活及肠道 LPS 移位促进 HIV-1 疾病进展。新近研究显示,LPS 增加肠道上皮细胞通透性,损伤肠道屏障。由于紧密连接蛋白(ZO-1,Occludin)是形成细胞间空隙、控制肠道内物质进入体内的重要蛋白,抑制其表达会造成肠上皮屏障通透性增加,细菌及其产物如 LPS 进入血液循环,进一步加剧炎症反应,使 HIV 有更多靶细胞。因此,本研究结果表明,BBI 能保护肠道上皮细胞不受 LPS 介导的炎性损伤,有利于降低和减缓 HIV 感染的进展。

[参 考 文 献]

[1] John LJ, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barriers in intestinal inflammation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(5): 1255 - 1270.

[2] Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity[J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(6): 256 - 264.

[3] Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 141-153.

[4] Bein A, Zilbershtein A, Golosovsky M, et al. LPS Induces hyper-permeability of intestinal epithelial cells[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(2): 381 - 390.

[5] Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis[J]. *J Allergy Clin Im-*

munol, 2009, 124(1): 3 - 20.

[6] Safavi F, Rostami A. Role of serine proteases in inflammation; Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases[J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 93(3): 428 - 433.

[7] Gran B, Tabibzadeh N, Martin A, et al. The protease inhibitor, Bowman-Birk Inhibitor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis; a potential oral therapy for multiple sclerosis[J]. *Mul Scler*, 2006, 12(6): 688 - 697.

[8] Touil T, Ciric B, Ventura E, et al. Bowman-Birk inhibitor suppresses autoimmune inflammation and neuronal loss in a mouse model of multiple sclerosis[J]. *J Neurol Sci*, 2008, 271(1-2): 191 - 202.

[9] Li JL, Ye L, Cook R, et al. Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor inhibits neurotoxicity of LPS-activated macrophages [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 15 - 24.

[10] Miyatake H, Sanjoh A, Murakami T, et al. Molecular mechanism of HIV-1 Vpr for binding to importin- α [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(13): 2744 - 2757.

[11] Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability-a new target for disease prevention and therapy[J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14: 189 - 214.

[12] Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(1): 9 - 21.

[13] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5): 353 - 364.

[14] Guo S, Nighot M, Al-Sadi R, et al. Lipopolysaccharide regulation of intestinal tight junction permeability is mediated by TLR4 signal transduction pathway activation of FAK and MyD88[J]. *J Immunol*, 2015, 195(10): 4999 - 5010.

[15] Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, et al. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286(3): G367 - G376.

[16] Al-Sadi R, Ye D, Said HM, et al. IL-1 beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF-kappaB pathway[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(5): 2310 - 2322.

[17] Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases[J]. *Intest Res*, 2015, 13(1): 11 - 18.

[18] Cummins PM. Occludin: one protein, many forms[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(2): 242 - 250.

[19] Rodgers LS, Beam MT, Anderson JM, et al. Epithelial barrier assembly requires coordinated activity of multiple domains of the tight junction protein ZO-1[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(7): 1565 - 1575.

[20] Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, et al. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton[J]. *J Bio Chem*, 1998, 273(45): 29745 - 29753.