

Promoter Methylation Alters the UC Risk by Regulating *RAGE* Expression

Yulan Zhou¹, Shouquan Yan², Yueqing Cai², Zhenyan Su², Jiafeng Wang^{2*}

¹Clinical Medicine Research Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong

²Stem Cell Research and Cellular Therapy Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong

Email: Wangjiafeng_gz@163.com

Received: Jan. 2nd, 2019; accepted: Jan. 18th, 2019; published: Jan. 25th, 2019

Abstract

Receptor for advanced glycation end products (*RAGE*) has been shown to play an important role in signal transduction in a variety of inflammation-related diseases. Recently, we found an individual difference of methylation in a CpG-island located in the promoter region of *RAGE* gene. It has been proved that hypermethylation of promoter region may affect the transcription process of genes. Therefore, this study intends to explore the influence of methylation in promoter region of *RAGE* gene on its transcription level and the correlation between methylation and UC risk through a case control study. Studies have found that the methylation level of *RAGE* promoter region is closely related to its transcription level, and the methylation status of *RAGE* promoter region may play an important role in regulating the transcription of *RAGE* genes. Our research opens up a new entry point for further understanding the pathogenesis of UC, and provides a theoretical basis for accurate prediction of personalized UC risk.

Keywords

RAGE, UC, Methylation, Transcription

启动子甲基化通过调节*RAGE*基因表达影响UC风险

周玉兰¹, 闫守泉², 蔡月清², 苏振演², 王家丰^{2*}

¹广东医科大学附属医院临床医学研究中心, 广东 湛江

²广东医科大学附属医院干细胞研发与临床转化中心, 广东 湛江

Email: Wangjiafeng_gz@163.com

*通讯作者。

文章引用: 周玉兰, 闫守泉, 蔡月清, 苏振演, 王家丰. 启动子甲基化通过调节 *RAGE* 基因表达影响 UC 风险[J]. 临床医学进展, 2019, 9(1): 88-95. DOI: [10.12677/acm.2019.91015](https://doi.org/10.12677/acm.2019.91015)

收稿日期：2019年1月2日；录用日期：2019年1月18日；发布日期：2019年1月25日

摘要

末端糖基化终末产物受体基因(*RAGE*)被证实在多种炎症相关疾病中发挥重要的信号传导作用。最近我们在溃疡性结肠炎(UC)组织样本中发现在*RAGE*基因启动子区存在一个富含CpG的区域甲基化存在个体差异现象。启动子区高甲基化可能会影响基因的转录过程,因此本研究拟通过病例对照探索*RAGE*基因启动子区甲基化对其转录水平的影响及其甲基化与UC风险的相关性。研究发现启动子区甲基化程度与转录水平密切相关,该区域可能是调控*RAGE*基因转录的关键部位。我们的研究为进一步理解UC病变机理开辟新的切入点,同时为UC个性化风险精准预测提供理论基础。

关键词

末端糖基化终末产物受体, 溃疡性结肠炎, 甲基化, 转录

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)是炎症性肠病(Inflammatory Bowel Disease, IBD)的一种。目前认为主要的病因是遗传因素以及环境因素导致的肠道免疫反应紊乱的结果[1]。UC患者长期持续的炎症反应被认为有进一步癌变的风险[2] [3]。罹患UC达到20年的患者其结直肠癌的风险增加5%~10%,罹患UC大于30年则该风险增加到10%~30% [4] [5]。

UC最主要的表现特征为慢性非特异性炎症反应。末端糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)是免疫球蛋白细胞表面分子超家族的一员。它是一个多配体的受体蛋白,可以与钙粒蛋白家族成员(例如S100A12和S100B),高迁移率族蛋白B1(HMGB1),末端糖基化终末产物(AGE)以及 β 样淀粉样蛋白(A β)等配体相互识别并引起一系列的细胞内信号传递过程最终传递并放大细胞炎症信号[6] [7]。RAGE被报道与多种炎症相关病变(例如糖尿病,关节炎,神经退行性疾病甚至癌变等)密切相关[8] [9] [10] [11]。通常RAGE主要在肺部表达而在肠道上皮组织中表达量比较低。但是在炎症过程中其表达量在内皮细胞,上皮细胞以及淋巴细胞中均呈现显著上调。动物模型中发现敲除RAGE基因后的小鼠可以来先天性免疫系统保护小鼠抵抗脓毒症。同时给与抗RAGE抗体干预动物模型发现大大减少多菌性脓毒症的盲肠结扎穿刺模型的致死率[8]。近期研究表明在炎症性肠病(IBD)患者的肠道上皮组织中RAGE显著上调表达[12],而且RAGE抗体在小鼠IBD模型中可以显著减弱结肠炎症[13]。总之,这些发现提示RAGE基因可能在调节IBD过程的炎症反应中具有重要的作用,这就使得其成为IBD潜在的风险生物标记。

研究发现DNA的甲基化可能会影响基因的表达和活性,越来越多的研究表明启动子区甲基化与基因表达活性存在反向相互作用机制[14]-[21]。研究发现在人类基因组中高达3%~6%的胞嘧啶存在甲基化现象,甲基化成为影响基因表达的重要因素[21]。目前很多研究表明肿瘤抑制基因启动子区域内CpG岛异常甲基化导致多种肿瘤发生[22] [23]。RUNX3, MINT1和COX-2的启动子甲基化也被证实是UC患者结肠直肠异型增生的生物标志物[24]。

虽然研究证实 *RAGE* 基因与 UC 的炎症反应过程密切相关[12][13]。我们前期实验发现 *RAGE* 基因中的一个多态性位点(G82S)和 UC 风险直接密切相关[25]。但是目前为止, 鲜有研究报道 *RAGE* 基因启动子区甲基化和 UC 风险的相关性。我们最近研究发现在 *RAGE* 基因启动子区存在一个富含 CpG 的区域存在个体甲基化差异现象。本研究拟探索 *RAGE* 基因启动子区甲基化与其转录水平的关系并分析其与 UC 风险的相关性。

2. 材料与方法

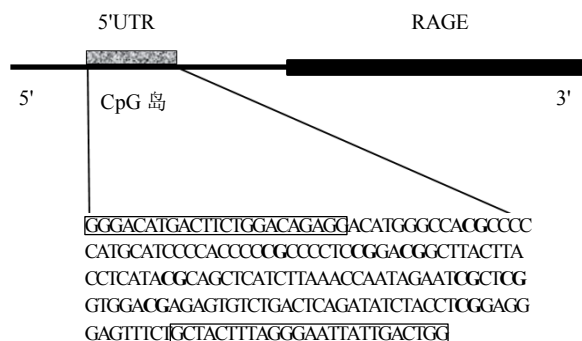
实验样本收集与 DNA 处理

在广东医科大学附属第一医院消化科诊断为 UC 住院病例, 收集通过肠镜检查用活检钳取结肠组织样本共计 60 例(32 例男性, 28 例女性); UC 的诊断标准采用常规的临床、内镜、组织学标准诊断确定为 UC 活动期患者, 同时排除其他炎症性疾病。另外在广东医科大学附属第一医院体检中心收集健康体检人员肠镜检查病例结肠组织样本 60 例(36 例男性, 24 例女性), 健康对照组要求无肠炎症状, 无恶性史, 无 IBD 个人或家族病史。UC 病例与健康对照个体民族相互匹配, 年龄无显著差异。所有参与提供样本的病人全部签署知情同意书, 并且由广东医科大学附属第一医院伦理委员会审批通过。

利用组织 DNA 提取试剂盒(Qiagen 德国)提取结肠组织样本的基因组 DNA。然后根据使用说明利用亚硫酸盐试剂盒(EpiTect Bisulfite Kit, Qiagen, Germany)处理基因组 DNA, 将所有未甲基化的胞嘧啶全部转化为尿嘧啶, 而被甲基化的胞嘧啶将会被保留。

甲基化检测

利用甲基化在线预测软件(MethPrimer, PUMCH, China)扫描 *RAGE* 基因的启动子区, 发现一个 CpG 岛(图 1)。



方框内序列表示 BSP 引物, 黑色字体表示 CpG 位点。

Figure 1. CpG island map of *RAGE* gene promoter region

图 1. *RAGE* 基因启动子区 CpG 岛示意图

首先利用亚硫酸氢盐测序法(Bisulfite sequencing PCR, BSP)技术分别在 5 例 UC 样本以及 5 例健康对照样本中检测该 CpG 岛上所有 CpG 位点的甲基化情况, BSP 扩增使用下列引物序列, 正向引物: 5'GGGATATGATTTTTGGATAGAGG3', 反向引物: 5'CCAATCAATAATTCCTAAAATAAC3'。BSP 扩增长度为 189 bp, 产物包含 9 个 CpG 位点。扩增产物经过胶回收纯化之后连接 PMD-20T 质粒载体, 转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞。细菌扩大培养后提取质粒利用 3730XL (ABI, US)测序确定序列信息。

利用甲基化特异性 PCR (Methylation-specific PCR, MSP)验证 BSP 结果并检测所有样本 *RAGE* 基因启动子区的甲基化情况。我们总共使用三对 MSP 引物, 1 对用于扩增甲基化的 DNA 序列(M-RAGE); 1 对用于扩增未甲基化的 DNA 序列(U-RAGE); 最后 1 对引物作为对照扩增未经亚硫酸盐处理过的 DNA 模

板,同时检测亚硫酸盐处理 DNA 模板的效果。所有本研究使用的引物序列信息都列在表 1 中。利用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 MSP 的产物,电泳结果由两位不知晓实验设计的实验人员分别读取电泳条带结果数据,记录相互印证的结果。

Table 1. MSP primer information used in this study

表 1. 本研究使用的 MSP 引物信息

引物	产物长度 size	引物长度(bp) bp	Tm (°C)	“C”s	引物序列
F-N-RAGE	106	25	59	-	CCCCATGCATCCCCACCCCGC
R-N-RAGE		25	57	-	ATCTGAGTCAGACTCTCGTC
F-M-RAGE	112	25	55	15	CGTTTTATGTATTTTATTTTCGT
R-M-RAGE		25	55	4	AATATCTAAATCAAACACTCTCGTC
F-U-RAGE	112	25	52	15	TGTTTTATGTATTTTATTTTGT
R-U-RAGE		25	53	4	AATATCTAAATCAAACACTCTCATC

mRNA 提取与荧光定量 PCR

从结肠组织中提取总 RNA 并利用反转录试剂盒(TaKaRa, Dalian, China)反转录成 cDNA。然后利用荧光定量 PCR (QPCR)检测 *RAGE* 基因的 mRNA 转录水平,使用 *GAPDH* 作为内标。按照以下方式统计 mRNA 转录水平的平均值,实验分组包括启动子甲基化健康对照组,启动子非甲基化健康对照组,启动子甲基化 UC 组和启动子非甲基化 UC 组。统计分析每组间的 mRNA 水平的差异性。

3. 结果与分析

亚硫酸氢盐测序 PCR

利用 MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)在线软件发现 *RAGE* 启动子区包括一个 124 bp 的 CpG 岛,该区域包含 9 个 CpG 位点(图 1)。BSP 引物扩增产物长度为 189 bp,覆盖整个 CpG 岛(图 1)。扩增产物经过胶回收后装载进包含氨苄青霉素抗性的质粒载体并转化感受态细胞,经过青霉素抗性筛选培养挑选单菌落接种于液体培养基培养。富集菌体提取质粒后利用 *ABI 3730XL* 进行 sanger 测序。每个样本选取 5 个克隆测序,测序结果显示健康对照样本扩增区域的甲基化程度明显高于 UC 样本(图 2)。

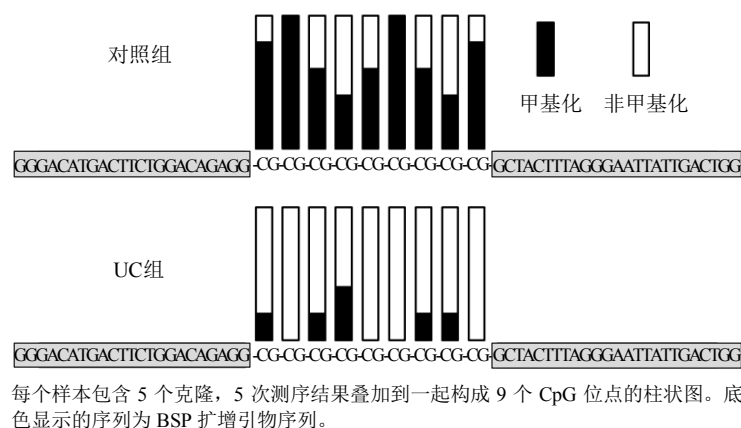


Figure 2. Detection of methylation in *RAGE* promoter region by BSP

图 2. BSP 检测 *RAGE* 启动子区甲基化情况

甲基化特异性的 PCR

利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测甲基化特异性 PCR 引物扩增产物。N-RAGE 引物扩增非亚硫酸盐处理的 DNA 模板后 PCR 产物能够在凝胶上呈现清晰的阳性条带(图 3(a)); N-RAGE 引物扩增亚硫酸盐处理的 DNA 模板的产物在凝胶上则没有明显的条带出现(图 3(c))。这证明亚硫酸盐处理 DNA 比较彻底,非甲基化胞嘧啶已经被转化成尿嘧啶导致 N-RAGE 引物不能有效扩增。

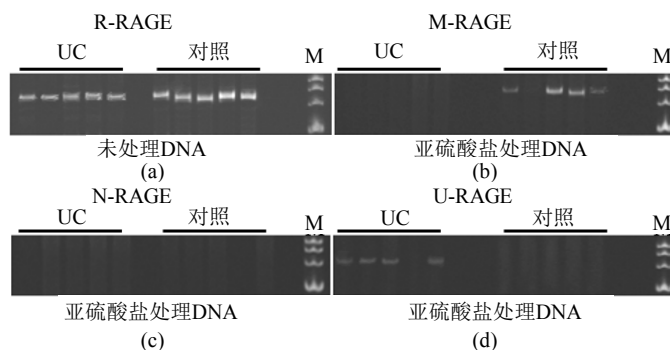


Figure 3. Detection of RAGE promoter region products by PAGE in MSP amplification

图 3. PAGE 检测 MSP 扩增 RAGE 基因启动子区产物结果

同样利用 PAGE 检测 M-RAGE 引物扩增亚硫酸盐处理过的 DNA 模板后 PCR 产物,发现多数对照样本在凝胶上出现明显条带而 UC 患者样本基本没有明显条带(图 3(b));反之, PAGE 检测 U-RAGE 引物扩增亚硫酸盐处理过的 DNA 模板后 PCR 产物, UC 患者样本中出现清晰的扩增条带,而对照样本则没有明显条带出现(图 3(d))。统计所有样本的甲基化情况并分析与 UC 风险的相关性,结果如表 2 所示。

Table 2. Analysis of correlation between RAGE promoter methylation and UC

表 2. RAGE 启动子甲基化与 UC 相关性分析

	对照(%)	UC (%)	OR (95% CI)	P
M+	35	19	-	-
	64.8%	35.2%		
M-	23	41	0.305 (0.143~0.649)	0.003
	35.9%	64.1%		

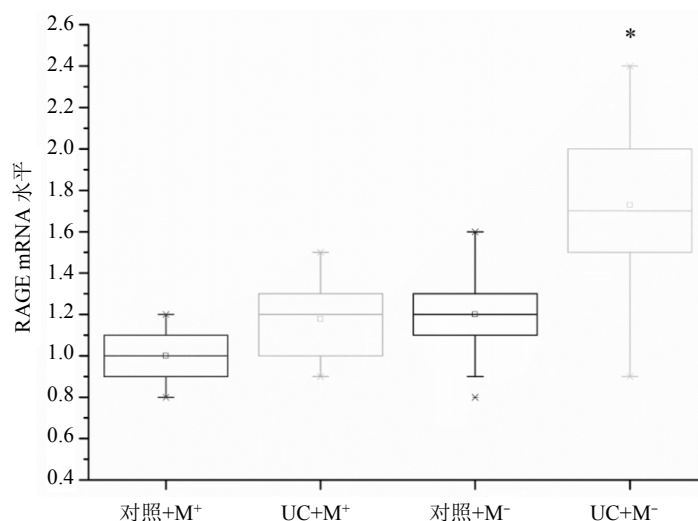
M+表示 MSP 检测启动子区有甲基化, M-表示 MSP 检测启动子区无甲基化。

RAGE 基因转录水平

利用 QPCR 检测 RAGE 基因 mRNA 水平,分析数据发现启动子区非甲基化个体的平均 mRNA 转录水平高于甲基化个体。尤其是在 UC 患者群体中,启动子区非甲基化个体 RAGE 基因的 mRNA 水平显著高于其他各组($p < 0.001$) (图 4)。

4. 分析与讨论

越来越多的研究发现 DNA 甲基化和 UC 发病具有密切相关性[26] [27]。Lin 等人于 2012 年报道在 B 细胞中发现 11 个 IBD 相关的 CpG 位点, 14 个 CD 特异性相关的 CpG 位点以及 24 个 UC 特异性相关的 CpG 位点。这些位点分布于多个与免疫炎症相关的基因上[16]。虽然众多研究表明 RAGE 基因在免疫和炎症反应过程具有重要作用,但是鲜有文献报道 RAGE 基因甲基化与 UC 风险的关系。



M⁺表示启动子区有甲基化, M⁻表示启动子区非甲基化, RAGE 基因的 mRNA 水平以非甲基化对照组平均水平为标准, *表示显著差异($p < 0.05$)。

Figure 4. RAGE gene mRNA level in different groups

图 4. 不同分组中 RAGE 基因 mRNA 水平

Hudson 等人报道位于 RAGE 基因启动子区的多态性位点-374A/T (rs1800624)可引起 3 倍的转录活性[28]。Däbritz 也报道 RAGE 基因启动子区 rs1800624 多态性位点促进其转录并影响 CD 的发展[29]。Wang 等人也发现 rs1800624 位点与 CD 风险密切相关[30]。然而, 我们之前在中国人群中研究 RAGE 多态性位点与 UC 风险, 数据表明编码区的多态性位点 G82S 与中国人群 UC 风险密切相关, 但是启动子区的两个多态性位点与 UC 风险没有显著相关性[25]; 因此我们认为可能存在另外的因素影响 RAGE 的转录过程。大多数研究发现启动子区甲基化可能会抑制基因的转录水平, 本研究发现健康对照人群中 RAGE 基因启动子区甲基化比例显著高于 UC 患者。同时, 启动子区甲基化个体的 RAGE 基因平均 mRNA 转录水平显著低于非甲基化个体的平均 mRNA 转录水平。这说明我们发现的 RAGE 基因启动子区 CpG 岛的甲基化水平可能影响其转录过程, 从而影响 RAGE 介导的炎症反应最终影响 UC 风险。

本研究利用 MSP 检测 RAGE 基因启动子区甲基化情况, PAGE 凝胶上出现清晰的电泳条带则判定为阳性结果, 没有电泳条带判定为阴性结果。该方法虽然简洁但因为 PAGE 的分辨率等问题存在一定的局限性; 采用更精确的甲基化检测方法(例如焦磷酸测序等)可能会获得更加精确的数据结果。此外我们采用的样本量比较小并且全部样本均来自中国南方人群, 种群组成单一, 不排除有地域性环境因素影响结果。因此, 本研究的结论需要更多不同种族群体的更多样本的验证。此外, 本研究虽然发现 RAGE 基因启动子区甲基化与其转录调控密切相关, 但不能确定启动子区多态性位点是不是同时参与 RAGE 基因转录调控过程。因此非常有必要在更多种族更大群体中同时研究 RAGE 基因启动子区多态性位点与甲基化对其转录过程的调控作用。

5. 结论

我们第一次在中国人群中发现 RAGE 启动子区一个 CpG 岛甲基化水平与其转录水平密切相关, 并可能成为临床 UC 风险检测的生物标志物, 为 UC 风险的诊断治疗提供更多的理论依据。

基金项目

本研究受到以下项目资助: 国家自然科学基金(81600445), 广东省医学科研基金(No. A2016522), 广

东医科大学科研基金(Z2014006, M2017009), 广东医科大学附属医院博士基金(528B20150012)。

参考文献

- [1] Cho, J.H. (2008) The Genetics and Immunopathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Nature Reviews Immunology*, **8**, 458-466. <https://doi.org/10.1038/nri2340>
- [2] Gyde, S.N., Prior, P., Allan, R.N., *et al.* (1988) Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis: A Cohort Study of Primary Referrals from Three Centres. *Gut*, **29**, 206-217. <https://doi.org/10.1136/gut.29.2.206>
- [3] Isbell, G. and Levin, B. (1988) Ulcerative Colitis and Colon Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, **17**, 773-791.
- [4] Ekblom, A., Helmick, C., Zack, M., *et al.* (1990) Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer. A Population-Based Study. *The New England Journal of Medicine*, **323**, 1228-1233. <https://doi.org/10.1056/NEJM199011013231802>
- [5] Pia, A., Rainer, P., Michael, G., *et al.* (2002) Epigenetic Control of the E-Cadherin Gene (CDH1) by CpG Methylation in Colectomy Samples of Patients with Ulcerative Colitis. *Genes Chromosomes & Cancer*, **35**, 121-126. <https://doi.org/10.1002/gcc.10101>
- [6] Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., *et al.* (1999) RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis: A Central Cell Surface Receptor for S100/Calgranulin Polypeptides. *Cell*, **97**, 889-901. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80801-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80801-6)
- [7] Sparvero, L.J., Asafu-Adjei, D., Rui, K., *et al.* (2009) RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE Ligands, and Their Role in Cancer and Inflammation. *Journal of Translational Medicine*, **7**, 17. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-17>
- [8] Lutterloh, E.C., Opal, S.M., Pittman, D.D., *et al.* (2007) Inhibition of the RAGE Products Increases Survival in Experimental Models of Severe Sepsis and Systemic Infection. *Critical Care*, **11**, R122. <https://doi.org/10.1186/cc6184>
- [9] van Zoelen, M.A., Schmidt, A.M., Florquin, S., *et al.* (2009) Receptor for Advanced Glycation End Products Facilitates Host Defense during *Escherichia coli*-Induced Abdominal Sepsis in Mice. *The Journal of Infectious Diseases*, **200**, 765-773. <https://doi.org/10.1086/604730>
- [10] Chavakis, T., Bierhaus, A., Al-Fakhri, N., *et al.* (2003) The Pattern Recognition Receptor (RAGE) Is a Counterreceptor for Leukocyte Integrins: A Novel Pathway for Inflammatory Cell Recruitment. *Journal of Experimental Medicine*, **198**, 1507-1515. <https://doi.org/10.1084/jem.20030800>
- [11] Shi, F.Y., Ramasamy, R. and Schmidt, A.M. (2009) Receptor for AGE (RAGE) & Its Ligands—Cast into Leading Roles in Diabetes & the Inflammatory Response. *Journal of Molecular Medicine*, **87**, 235-247. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0439-2>
- [12] Zen, K., Chen, C.X., Chen, Y.T., *et al.* (2007) Receptor for Advanced Glycation Endproducts Mediates Neutrophil Migration across Intestinal Epithelium. *Journal of Immunology*, **178**, 2483-2490. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2483>
- [13] Geetha, S., Jonamani, N., Bernd, W., *et al.* (2010) Carboxylated N-Glycans on RAGE Promote S100A12 Binding and Signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, **110**, 645-659. <https://doi.org/10.1002/jcb.22575>
- [14] Jones, P.A. and Laird, P.W. (1999) Cancer-Epigenetics Comes of Age. *Nature Genetics*, **21**, 163. <https://doi.org/10.1038/5947>
- [15] Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., *et al.* (2007) Promoter Hypomethylation of Protease-Activated Receptor 2 Associated with Carcinogenesis in the Stomach. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, **22**, 943-948. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04847.x>
- [16] Lin, Z., Hegarty, J.P., Yu, W., *et al.* (2012) Identification of Disease-Associated DNA Methylation in B Cells from Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Patients. *Digestive Diseases & Sciences*, **57**, 3145-3153. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2288-z>
- [17] Saito, S., Kato, J., Hiraoka, S., *et al.* (2011) DNA Methylation of Colon Mucosa in Ulcerative Colitis Patients: Correlation with Inflammatory Status. *Inflammatory Bowel Diseases*, **17**, 1955-1965. <https://doi.org/10.1002/ibd.21573>
- [18] Herman, J.G. and Baylin, S.B. (2003) Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, **349**, 2042-2054. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>
- [19] Feinberg, A.P. and Tycko, B. (2004) The History of Cancer Epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, **4**, 143-153. <https://doi.org/10.1038/nrc1279>
- [20] Gunnar, E. and Nils, W. (2004) Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy. *Nature*, **429**, 457-463. <https://doi.org/10.1038/nature02625>
- [21] Esteller, M. (2005) Aberrant DNA Methylation as a Cancer-Inducing Mechanism. *Annual Review of Pharmacology &*

- Toxicology*, **45**, 629-656. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095832>
- [22] Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., *et al.* (1998) Alterations in DNA Methylation: A Fundamental Aspect of Neoplasia. *Advances in Cancer Research*, **72**, 141-196. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60702-2](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60702-2)
- [23] Kanai, Y. (2010) Genome-Wide DNA Methylation Profiles in Precancerous Conditions and Cancers. *Cancer Science*, **101**, 36-45. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01383.x>
- [24] Garritypark, M.M., Loftus, E.V.J., Sandborn, W.J., *et al.* (2010) Methylation Status of Genes in Non-Neoplastic Mucosa from Patients with Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer. *American Journal of Gastroenterology*, **105**, 1610-1619. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.22>
- [25] Wang, J., Zeng, J., Wang, H., *et al.* (2016) Genetic Polymorphisms of RAGE and Risk of Ulcerative Colitis in a Chinese Population. *Immunology Letters*, **170**, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.09.003>
- [26] Tahara, T., Shibata, T., Nakamura, M., *et al.* (2009) Effect of MDR1 Gene Promoter Methylation in Patients with Ulcerative Colitis. *International Journal of Molecular Medicine*, **23**, 521-527. <https://doi.org/10.3892/ijmm.00000160>
- [27] Tahara, T., Shibata, T., Nakamura, M., *et al.* (2009) Promoter Methylation of Protease-Activated Receptor (PAR2) Is Associated with Severe Clinical Phenotypes of Ulcerative Colitis (UC). *Clinical and Experimental Medicine*, **9**, 125-130. <https://doi.org/10.1007/s10238-008-0025-x>
- [28] Hudson, B.I., Stickland, M.H., Futers, T.S., *et al.* (2001) Effects of Novel Polymorphisms in the RAGE Gene on Transcriptional Regulation and Their Association with Diabetic Retinopathy. *Diabetes*, **50**, 1505-1511. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.6.1505>
- [29] Däbritz, J., Friedrichs, F., Weinhage, T., *et al.* (2011) The Functional-374T/A Polymorphism of the Receptor for Advanced Glycation End Products May Modulate Crohn's Disease. *Gastroenterology*, **300**, G823-G832.
- [30] Wang, Z.T., Hu, J.J., Fan, R., *et al.* (2014) RAGE Gene Three Polymorphisms with Crohn's Disease Susceptibility in Chinese Han Population. *World Journal of Gastroenterology*, **20**, 2397. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i9.2397>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8712, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org