文章编号:1000-5404(2014)18-1867-05

论著

Ascl2转录调控人结肠癌上皮细胞内CDX2基因表达的研究

钟小莉,尚杨杨,潘 琼,李姗姗,刘 韵,叶 钧,宋丽丽,赵晶京,彭志红,汪荣泉 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[摘要] **目的** 探讨Ascl2对人结肠癌上皮细胞中CDX2基因的转录调控作用。**方法** 预测CDX2启动子的转录因子结合位点,构建包含8个不同长度的CDX2近端启动子的荧光素酶报告基因质粒,分别命名为pGL3-CDX2-C1-8;将各质粒分别转染到shRNA-Ascl2/LS174T和shRNA-Ctr/LS174T细胞中,检测细胞中的双荧光素酶活性。采用染色质免疫共沉淀(ChIP)技术,用Ascl2抗体免疫沉淀与CDX2启动子区DNA片段相结合的Ascl2,PCR扩增CDX2启动子的特异性序列。**结果** 转录因子数据库预测到CDX2近端启动子区含多个E-box结合位点和潜在的Nkx-2、GATA-1、CdxA、Sox-5、SRY等顺式作用元件。双酶切及测序结果证实pGL3-CDX2-C1-8重组质粒插入片段序列均正确。重组质粒在shRNA-Ascl2/LS174T细胞中的荧光素酶活性明显高于shRNA-Ctr/LS174T细胞($P<0.01$)。随着CDX2启动子片段的缩短,荧光素酶活性呈升高趋势。ChIP实验证实在CDX2近端启动子存在与Ascl2相结合的片段,在shRNA-Ascl2/LS174T细胞中,Ascl2与CDX2启动子区域中$-841\sim-646$、$-291\sim-134$、$-7\sim+138$片段结合的DNA片段明显少于对照shRNA-Ctr/LS174T细胞。**结论** Ascl2在结肠癌上皮细胞中可能通过与CDX2近端启动子的直接结合而达到转录阻遏CDX2基因表达的目的。

[关键词] Ascl2;CDX2启动子;结肠肿瘤;荧光素酶报告基因
[中图法分类号] R394-33;R394.3;R735.35 [文献标志码] A

Transcriptional regulation of CDX2 gene expression by Ascl2 in colon cancer epithelial cells

Zhong Xiaoli, Shang Yangyang, Pan Qiong, Li Shanshan, Liu Yun, Ye Jun, Song Lili, Zhao Jingjing, Peng Zhihong, Wang Rongquan (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the transcriptional regulation of caudal-related homeodomain transcription factor 2 (CDX2) gene expression by Achaete scute-like 2 (Ascl2) in colon cancer epithelial cells. **Methods** Transcription factor binding sites of CDX2 promoter were predicted. Vector pGL3-Basic was used to construct 8 recombinant plasmids (pGL3-CDX2-C1 to pGL3-CDX2-C8) containing different truncated CDX2 proximal promoters. After transfection of recombinant plasmids into shRNA-Ascl2/LS174T and shRNA-Ctr/LS174T cells, the activity of those luciferase reporters was detected by luciferase reporter assay. We used chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay with an anti-Ascl2 antibody to immunoprecipitate the possible Ascl2-binding DNA fragments within CDX2 proximal promoter. The immunoprecipitates were amplified through PCR using specific CDX2 primers. **Results** Predicted by transcription factor databases, the CDX2 proximal promoter contained the abundant E-box(s) and the probable cis-regulatory elements for Nkx-2, GATA-1, CdxA, Sox-5 and SRY. The inserts within those luciferase reporters were proved to be correct by enzyme digestion and sequencing. These luciferase reporters had higher luciferase activity in shRNA-Ascl2/LS174T cells than in shRNA-Ctr/LS174T cells ($P<0.01$). However, further truncation of the CDX2 promoter resulted in an increased luciferase activity. The specific DNA fragments in CDX2 proximal promoter were detected in the immunoprecipitates by the anti-Ascl2 antibody. The semi-quantitation of specific DNA fragments within -841 to -646, -291 to -134 or -7 to $+138$ of CDX2 proximal promoter showed their significant reduction in shRNA-Ascl2/LS174T cells as compared to shRNA-Ctr/LS174T cells ($P<0.05$). **Conclusion** Ascl2 transcriptionally suppresses CDX2 gene expression by direct binding to its proximal promoter in colon cancer epithelial cells.

[基金项目] 国家自然科学基金(81200268,81201685)
[通信作者] 汪荣泉,电话:(023)68754124,E-mail:rongquanw@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1522.040.html(2014-08-21)

[**Key words**] Ascl2; CDX2 promoter; colon tumor; luciferase reporter gene

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81200268, 81201685). Corresponding author: Wang Rongquan, Tel: 86-23-68754124, E-mail: rongquanw@hotmail.com

尾型同源异型框转录因子2(caudal-related homeodomain transcription factor 2, CDX2)全长22~23 kb,由2个内含子和3个外显子组成,属于果蝇尾部相关同源基因家族成员,位于染色体13q12~q13区[1]。正常情况下,CDX2在回肠段表达水平较高,在胃及以上的上消化道上皮细胞中不表达[2]。有研究证明CDX2与肠道肿瘤的发生密切相关,可以减缓肿瘤的发展、迁移和癌细胞的扩散,对肠道肿瘤发挥抑制作用[3-4]。然而CDX2基因抑制肿瘤发展的主要机制还并不清楚[5]。通过NCBI数据库查找CDX2启动子序列,经冷泉港数据库分析发现CDX2的近端启动子上游(-2 000~1)具有丰富的E-box元件(CANNTG),Ascl2(Achaete scute-like 2)作为控制肠道黏膜隐窝Lgr5(+)干细胞和结肠癌前体细胞的转录因子,是Wnt信号通路的下游靶基因[6]。我们前期研究证实Ascl2的表达抑制导致结肠上皮细胞出现杯状细胞表型的转变[7],已有研究证实Ascl2的同源基因Ascl1能够特异性结合E-box元件[8],我们推测Ascl2可能通过该机制转录调控CDX2的表达,进而影响杯状细胞特异性蛋白MUC2的表达。本实验拟通过构建CDX2荧光素酶报告基因实验和染色质免疫共沉淀(ChIP)实验,探讨Ascl2对人结肠癌上皮细胞中CDX2基因的转录调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

Ascl2干扰质粒和对照质粒转染LS174T细胞筛选获得shRNA-Ascl2/LS174T和shRNA-Ctr/LS174T稳定细胞株,由第三军医大学西南医院全军消化病研究所保种,pGL3-basic质粒、pRL-TK质粒、双荧光素酶活性测定试剂、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、Fugene HD转染试剂盒、化学发光仪(Promega公司),KOD-401高保真酶(Toyobo公司),T_4 DNA连接酶、限制性内切酶*Kpn* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ(Thermo公司),DMEM、胎牛血清(HyClone公司),PCR引物合成、DNA测序(上海生物工程有限公司),PCR仪(Bio-Rad公司),Ascl2多克隆抗体、ChIP试剂盒(Millipore公司),超声破碎仪(宁波新芝生物公司)。

1.2 人CDX2启动子片段的扩增

以人结肠癌细胞株LS174T基因组DNA为模板,在NCBI数据库查找CDX2启动子序列并扩增,通过MEME数据库和TF Search转录因子数据库比对分析,推测可能存在的重要调控元件,设计CDX2启动子的不同缺失片段,合成包含*Kpn* Ⅰ和*Bgl* Ⅱ酶切位点的引物(引物设计如表1所示),通过PCR扩增CDX2启动子区域的缺失片段。PCR反应条件:94 ℃ 2 min;98 ℃ 10 s,55 ℃ 30 s,68 ℃ 30 s/kb,68 ℃ 8 min,30个循环。PCR扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察电泳结果。

表1 PCR引物序列及长度

启动子	引物序列(5′→3′)	长度(bp)
CDX2-C1	上游:TCTATCGATAGGTACCAGAGCCACGTCTTCAGGTGTCA-CCATCGCCTTC	2 581
	下游:CTTAGATCGCAGATCTGCACGGAGCTAGGGTAC	
CDX2-C2	上游:TCTATCGATAGGTACCGGTCTCCCACCTCTTG	2 098
	下游:CTTAGATCGCAGATCTGCACGGAGCTAGGGTAC	
CDX2-C3	上游:TCTATCGATAGGTACCGATGAAGGCGATGGTGAC	1 810
	下游:CTTAGATCGCAGATCTGCACGGAGCTAGGGTAC	
CDX2-C4	上游:TCTATCGATAGGTACCTCGCCGCAGTGATCCT	1 667
	下游:CTTAGATCGCAGATCTGCACGGAGCTAGGGTAC	
CDX2-C5	上游:TCTATCGATAGGTACCAGTTGCCTTATCATCTCCT	1 367
	下游:CTTAGATCGCAGATCTGCACGGAGCTAGGGTAC	
CDX2-C6	上游:TCTATCGATAGGTACCTAACCACTAGCCTAACTTCT	1 092
	下游:CTTAGATCGCAGATCTGCACGGAGCTAGGGTAC	
CDX2-C7	上游:TCTATCGATAGGTACCACAGGGCGGGAAGGAAT	844
	下游:CTTAGATCGCAGATCTGCACGGAGCTAGGGTAC	
CDX2-C8	上游:TCTATCGATAGGTACCCAACCACTGCTCCTGTCT	689
	下游:CTTAGATCGCAGATCTGCACGGAGCTAGGGTAC	

划线区域分别代表*Kpn* Ⅰ和*Bgl* Ⅱ酶切位点

1.3 荧光素酶报告基因质粒的构建及鉴定

将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,并对目的条带进行胶回收。胶回收产物及pGL3-Basic质粒用内切酶*Kpn* Ⅰ和*Bgl* Ⅱ进行双酶切,T_4 DNA连接酶酶切后的DNA片段与pGL3-Basic质粒得到pGL3-CDX2-C1-8共8个重组载体。转化大肠杆菌DH5α,于含氨苄青霉素的LB培养基中培养,挑选克隆,振荡培养并提取质粒,经*Kpn* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ双酶切鉴定,所构建的重组质粒进行测序鉴定。

1.4 细胞转染及双荧光素酶转录活性测定

将处于对数生长期的shRNA-Ascl2/LS174T和shRNA-Ctr/LS174T细胞经胰酶消化后重悬,用含10%胎牛血清的DMEM培养基将细胞接种于48孔板中,细胞密度约1.5×10^5个/mL,置于37 ℃、5% CO_2孵箱中培养24 h。细胞汇合度约80%时,按照Fugene HD转染试剂盒说明书进行转染,共转染重组质粒和pRL-TK质粒,重组质粒加入0.3 μg,pRL-TK质粒加入量为重组质粒的1/40,Fugene HD转染试剂每孔加入0.6 μL。以pGL3-Basic质粒共转染细胞为阴性对照。转染30 h后,进行双荧光素酶检测:每孔加入50 μL 1×PLA细胞裂解液,收集于EP管中,用Luminometer测定双荧光素酶数值,先每管加入100 μL LAR Ⅱ试剂读数为萤火虫荧光素酶活性值A,再加入100 μL配制的stop&Glo试剂读数为海肾荧光素酶活性值B,A/B比值校正后为最终结果,每个重组质粒设定3个复孔,实验重复3次。

1.5 ChIP实验

将shRNA-Ascl2/LS174T和shRNA-Ctr/LS174T细胞培养至融合时,用PBS清洗3次,加入1%甲醛固定,37 ℃静置10 min。加入甘氨酸终止固定,混匀后室温放置5 min。用PBS清洗3次,加入预冷的PBS(含蛋白酶抑制剂),刮取细胞至EP管中,4 ℃ 800×*g*离心5 min后收集细胞。加入0.5 mL Cell

Lysis Buffer(含蛋白酶抑制剂)重悬浮细胞,冰上孵育 15 min,剧烈涡旋,4 ℃ 800 × *g* 离心 5 min。弃上清,加入 0.5 mL Nuclear Lysis Buffer 重悬细胞。超声破碎(25% 功率,4.5 s 脉冲,重复 14 次)得到平均大小在 200 ~ 1 000 bp 之间的 DNA 片段。将超声破碎液在 4 ℃ 2 000 × *g* 离心 5 min;上清转移到新的 EP 管,作为待沉淀的 DNA 片段,分别加 Ascl2 抗体、H3 抗体(阳性对照)、IgG 抗体(阴性对照)进行处理,各取 10% 作为 Input,再分别加入 Protein A 磁珠混匀;4 ℃孵育 12 h 后收集 Protein/DNA 复合物,分别在低盐、高盐、LiCi、TE 缓冲液中洗涤复合物;再 62 ℃孵育 2 h,离心收集上清后用胶回收试剂盒纯化 DNA,根据 CDX2 启动子区域 E-box 结合位点和 Motif 富集区设计引物(引物设计见表 2),PCR 扩增检测 Ascl2 蛋白在 CDX2 基因启动子区域的富集情况。

表 2 ChIP 引物序列及扩增区域

引物	序列(5′→3′)	扩增区域
CDX2-E1	上游:GGCTAGTTCTGATCGCTTTC	−1 555 ~ −1 375
	下游:TGTCACCATCGCCTTC	
	下游:TGTCACCATCGCCTTC	
CDX2-E2	上游:GCTGGTTGTCACCTGTAAAA	−1 514 ~ −1 318
	下游:CACTCCTGGAGACCTGC	
CDX2-E3	上游:TACCTAGGTAAGCATTAGCA	−841 ~ −646
	下游:GGCATGTGGTAGAAGTTAG	
CDX2-E4	下游:CAGCCCCAAACAACT	−605 ~ −448
	下游:CAGCCCCAAACAACT	
CDX2-E5	上游:TTCCCTGCAAATGCATAAAC	−291 ~ −134
	下游:AGCTTCCTCCTTCCAACC	
CDX2-E6	上游:TCGACGTCTCCAACCATT	−7 ~ +138
	下游:CCTCCTTCCCACTAGGCT	

1.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 人 CDX2 启动子区功能分析

为了明确人 CDX2 启动子区域潜在的转录因子结合位点,我们应用 TF Search 1.3 和冷泉港数据库对人 CDX2 启动子区的潜在结合位点进行预测。结果显示,人 CDX2 启动子区域(−2 164 ~ +417)含有 8 个 E-box 基序(CANNTG),可能是 Ascl2 转录因子的潜在结合位点。同时,该区域含多个潜在转录因子结合的保守序列,这些转录因子主要包括 Nkx-2、GATA-1、CdxA、Sox-5 和 SRY(图 1)。

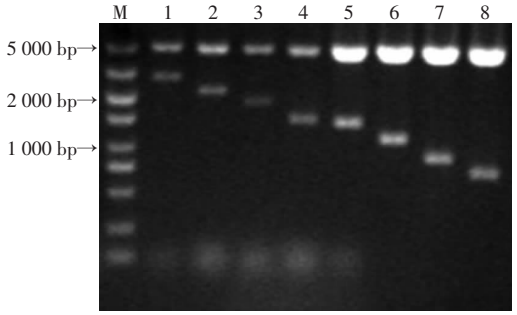
2.2 CDX2 启动子及缺失片段荧光素酶报告基因的构建与鉴定

根据 CDX2 启动子区域中 E-box 基序的位置,确定 CDX2 启动子及缺失片段的扩增区域,并通过 PCR 从 LS174T 细胞中扩增出相应片段,紫外灯下观察电泳结果,发现 PCR 扩增产物与预期片段大小一致,且无非特异性扩增条带。PCR 扩增产物经 *Kpn* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ双酶切,克隆到同样双酶切的 pGL3-Basic 载体中,经 *Kpn* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ双酶切鉴定,得到与预期长度一致的插入片段(图 2),表明 CDX2 启动子及缺失片段已插入 pGL3-basic 上游的多克隆位点中。将重组质粒送上海生物工程有限公司测序,经 NCBI Blast 比对后发现 CDX2 启动子序列与目的序列一致,说明 CDX2 启动子区域及缺失片段的荧光素酶报告基因构建成功。



加黑部分代表能与相应转录因子结合的区域

图 1 人 CDX2 启动子区域主要转录因子结合位点预测



M:DL 5 000 DNA 标准;1 ~ 8:重组质粒 pGL3-CDX2-C1 ~ 8 的酶切片段

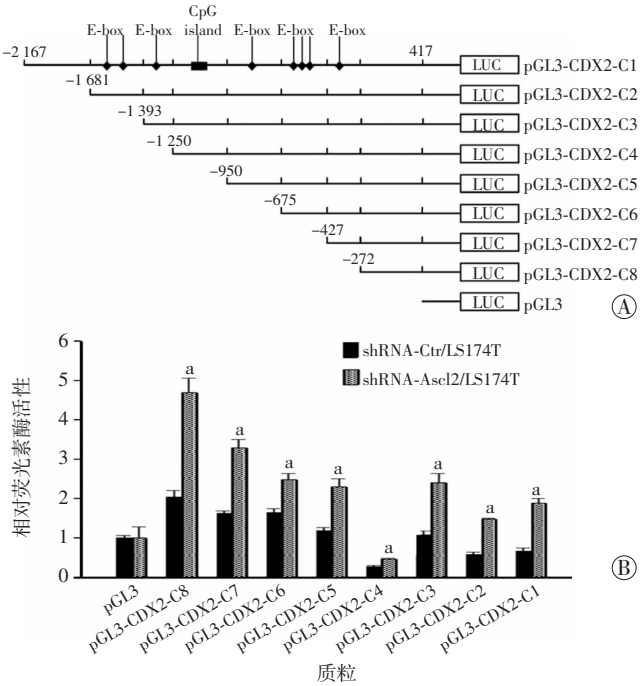
图 2 重组质粒的酶切鉴定结果

2.3 荧光素酶报告基因转录活性

将重组质粒及 pRL-TK 质粒共转染 shRNA-Ascl2/LS174T 和 shRNA-Ctr/LS174T 细胞,以 pGL3-Basic 转染细胞为阴性对照细胞,30 h 后进行荧光素酶活性检测(图 3)。pGL3-CDX2-C1 ~ 8 在 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞中的活性均明显高于 shRNA-Ctr/LS174T 细胞($P < 0.01$)。随着 CDX2 启动子片段的缩短,pGL3-CDX2-C5 ~ 8 在 2 种细胞中的活性均呈升高趋势,其中,pGL3-CDX2-C8 在 2 种细胞中的活性最高,提示 Ascl2 可能转录抑制 CDX2 基因的表达。

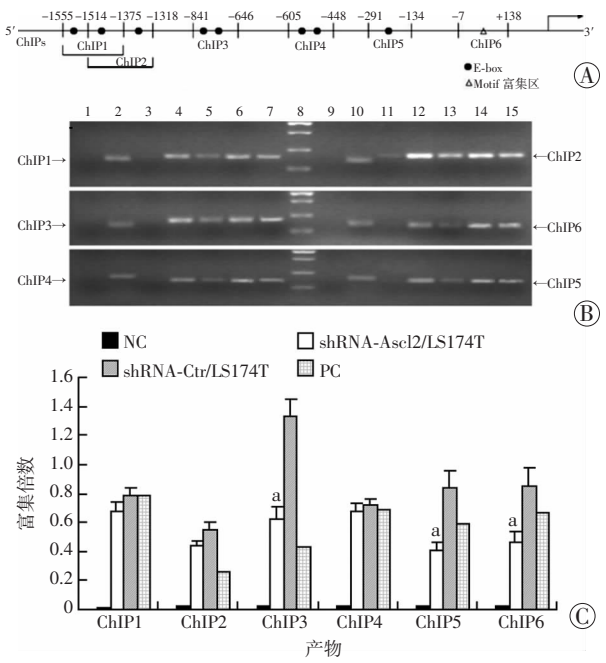
2.4 ChIP 分析结果

为了确定 Ascl2 是否通过与 CDX2 启动子直接结合转录调控 CDX2 基因表达,我们采用 ChIP 实验进行验证。阳性对照条带清晰明亮,而阴性对照条带极弱甚至没有,空白对照无产物,说明 ChIP 实验操作可信。以 Ascl2 抗体免疫共沉淀的染色质片段纯化的 DNA 为模板,PCR 扩增 CDX2 启动子区域的 6 个不同片段(图 4A)。结果显示模板中均可扩增出相应 DNA 片段,其中在 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞中,Ascl2 与 CDX2 启动子区域中 −841 ~ −646、−291 ~ −134、−7 ~ +138 片段的结合明显少于 shRNA-Ctr/LS174T 细胞($P < 0.05$,图 4B、C)。



A:pGL3-CDX2-C1-8 重组质粒示意图;B:重组质粒的相对荧光素酶活性 pGL3:pGL3-Basic 阴性对照质粒;a:$P<0.01$,与 shRNA-Ctr/LS174T 比较

图3 重组质粒的荧光素酶测定结果



A:ChIP 产物 PCR 扩增区域示意图;B:ChIP 产物 PCR 反应结果 1、9:空白对照(水);2、10:阳性对照(抗组蛋白3抗体免疫沉淀的DNA);3、11:阴性对照(羊抗人 IgG 抗体免疫沉淀的 DNA);4、12:内参 DNA(shRNA-Ascl2/LS174T 细胞中的 DNA);5、13:鼠抗人 Ascl2 抗体免疫沉淀的 DNA(shRNA-Ascl2/LS174T 细胞中的 DNA);6、14:内参 DNA(shRNA-Ctr/LS174T 细胞中的 DNA);7、15:鼠抗人 Ascl2 抗体免疫沉淀的 DNA(shRNA-Ctr/LS174T 细胞中的 DNA);8:DL 1000 DNA 标准;C:ChIP 产物 qPCR 结果 NC:IgG 抗体沉淀的 DNA;shRNA-Ascl2 和 shRNA-Ctr:Ascl2 抗体沉淀的 DNA;PC:乙酰化组蛋白 H3 抗体沉淀的 DNA a:$P<0.05$,与 shRNA-Ctr/LS174T 比较

图4 染色质免疫共沉淀分析结果

3 讨论

在世界范围内,结肠癌的发病率处于恶性肿瘤的第3位,仅次于胃癌和食管癌,在我国的发病率也呈逐年升高趋势,严重危害人类的健康[9-10]。目前结肠癌主要采用手术和化疗方式治疗,但效果欠佳,因此寻找一种新的、有效的治疗方法已经迫在眉睫。

CDX2 基因是一种肿瘤抑制基因,以螺旋-环-螺旋的方式与 DNA 的相应区域结合,调节 DNA 的表达[11],主要表达在胃肠道上皮及其来源的肿瘤组织,具有较高的特异性,能够作为结直肠肿瘤病理诊断的特异性标记物在临床上应用[12]。CDX2 的下调促进肿瘤细胞的增殖,从而促进结肠癌的发生、发展,导致患者预后不良[13]。有研究表明,在 CDX2 下调表达的结肠癌细胞系中插入 CDX2 基因能够提高结肠癌细胞对凋亡的敏感性,加速凋亡并抑制生长[14]。同时,CDX2 可以参与肠上皮细胞的自我更新和分化。在肠上皮化生过程中,CDX2 对大部分的肠道组织分化和发展具有调节作用[15],可与肠上皮标志物 MUC2 启动子结合并显著促进其表达[16-17]。而 MUC2 高度表达及其杯状细胞在胃黏膜的出现是肠上皮化生的主要特征[6]。因此,CDX2 与肠上皮化生具有密切的相关性。

Ascl2 是正常成体肠道干细胞的重要标志物,可以表达在胎盘以及肠道隐窝基底的 Lgr5 阳性的隐窝基底柱状细胞,即 CBC 细胞,可控制 CBC 细胞干性[18]。有研究表明,结肠癌干细胞可能起源于正常结肠隐窝 CBC 细胞[19]。而异常分化的胃肠道干细胞仍然可以按正常细胞的迁移模式产生胃肠道黏膜的组成细胞,形成一种混合型肠上皮化生[20]。本课题组前期研究发现,结肠癌细胞系 LS174T 经 Ascl2 干扰后,肠上皮标志物 MUC2 出现明显的上调并出现杯状细胞表型[7]。综上所述,我们推断 Ascl2 和 CDX2 均与肠上皮化生存在一定的关系。

为了探讨 Ascl2 对 CDX2 启动子的转录调控作用,本研究通过预测 CDX2 启动子区域潜在的转录因子结合位点,发现该启动子区域含多个 E-box 基序。我们根据 E-box 基序的位置,构建包含 CDX2 启动子区域及缺失片段的荧光素酶报告基因质粒,并通过双荧光素酶实验测定这些重组质粒在 shRNA-Ascl2/LS174T 和 shRNA-Ctr/LS174T 细胞中的荧光素酶活性。本研究结果显示:重组质粒在 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞中的荧光素酶活性更高,随着 CDX2 启动子(-950 ~ +417)片段的缩短,相应的重组质粒在这

些细胞中的荧光素酶活性呈升高趋势,表明 LS174T 细胞经 Ascl2 干扰后,CDX2 的转录活性增强,且 CDX2 的转录活性与 CDX2 启动子片段的长度密切相关。这提示 Ascl2 转录抑制 CDX2 基因的表达。

为了明确 Ascl2 对 CDX2 启动子的转录调控作用是否与 E-box 基序有关,本研究以 Ascl2 抗体免疫共沉淀含有不同 E-box 基序的 DNA 片段,经过 PCR 扩增出 CDX2 启动子区域中含 E-box 基序的 5 个 DNA 片段和含 Motif 富集区的 1 个 DNA 片段,证实 Ascl2 与 CDX2 启动子区域的 6 个 DNA 片段均可以结合。Ascl2 与 CDX2 启动子 -841 ~ -646、-291 ~ -134 片段的结合在两种细胞中具有显著差异,可能是与 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞中转录因子 Ascl2 的表达受到抑制后,Ascl2 与 CDX2 启动子片段的结合减少有关。Ascl2 与 Motif 富集区(-7 ~ +138)也可以结合,该作用是否参与 CDX2 的转录调控还有待进一步研究。上述结果提示,Ascl2 可能通过与 CDX2 启动子的 E-box 基序直接结合转录抑制 CDX2 基因的表达。

我们预测到人 CDX2 启动子区域含有 8 个 E-box 基序,Ascl2 能够与之结合并发挥转录调控作用的到底是哪个或哪些位点?这还在积极研究中。

综上所述,我们通过研究 Ascl2 对 CDX2 之间的关系,发现 Ascl2 可以转录调控 CDX2 基因的表达,揭示了肠上皮化生新的分子机制,为肠上皮化生这一癌前病变的防治开拓一种不同的思路和新的作用靶点,并可能将为胃肠道肿瘤的治疗提供新的理论依据。

参考文献:

[1] Verzi M P, Shin H, He H H, *et al*. Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2[J]. Dev Cell, 2010, 19(5): 713-726.

[2] van-de-Ven C, Bialecka M, Neijts R, *et al*. Concerted involvement of Cdx/Hox genes and Wnt signaling in morphogenesis of the caudal neural tube and cloacal derivatives from the posterior growth zone[J]. Development, 2011, 138(16): 3451-3462.

[3] Stringer E J, Duluc I, Saandi T, *et al*. Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm[J]. Development, 2012, 139(3): 465-474.

[4] Li M K, Folpe A L. CDX-2, a new marker for adenocarcinoma of gastrointestinal origin[J]. Adv Anat Pathol, 2004, 11(2): 101-105.

[5] Barros R, da-Costa L T, Pinto-de-Sousa J, *et al*. CDX2 autoregulation in human intestinal metaplasia of the stomach: impact on the stability of the phenotype[J]. Gut, 2011, 60(3): 290-298.

[6] Umar S. Intestinal stem cells[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2010, 12(5): 340-348.

[7] 李晓桓, 朱蓉, 田音, 等. 干扰结肠癌上皮细胞 Ascl2 的表达致其向杯状细胞表型分化[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(19): 1936-1939.

[8] Johnson J E, Birren S J, Saito T, *et al*. DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(8): 3596-3600.

[9] 赖少清, 鞠凤环, 王贵齐, 等. 2004~2008年704例大肠癌临床流行特征[J]. 中国肿瘤, 2010, 19(2): 111-113.

[10] Millan A, Huerta S. Apoptosis-inducing factor and colon cancer[J]. J Surg Res, 2009, 151(1): 163-170.

[11] Davies M, Arumugam P J, Shah V I, *et al*. The clinical significance of lymph node micrometastasis in stage Ⅰ and stage Ⅱ colorectal cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2008, 10(3): 175-179.

[12] Zheng J, Sun X, Wang W, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1alpha modulates the down-regulation of the homeodomain protein CDX2 in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2010, 24(1): 97-104.

[13] 邹英鹰, 姚楠, 王芳, 等. CDX2和COX2在人大肠肿瘤中的表达特点及与转移的关系[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(1): 19-23, 27.

[14] Coskun M, Troelsen J T, Nielsen O H. The role of CDX2 in intestinal homeostasis and inflammation[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(3): 283-289.

[15] Blache P, Van-De-Wetering M, Duluc I, *et al*. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes[J]. J Cell Biol, 2004, 166(1): 37-47.

[16] Khor T S, Alfaro E E, Ooi E M, *et al*. Divergent expression of MUC5AC, MUC6, MUC2, CD10, and CDX-2 in dysplasia and intramucosal adenocarcinomas with intestinal and foveolar morphology: is this evidence of distinct gastric and intestinal pathways to carcinogenesis in Barrett Esophagus?[J]. Am J Surg Pathol, 2012, 36(3): 331-342.

[17] McIntire M G, Soucy G, Vaughan T L, *et al*. MUC2 is a highly specific marker of goblet cell metaplasia in the distal esophagus and gastroesophageal junction[J]. Am J Surg Pathol, 2011, 35(7): 1007-1013.

[18] Zhu L, Gibson P, Currle D S, *et al*. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation[J]. Nature, 2009, 457(7229): 603-607.

[19] Hoffmann W. Stem cells, self-renewal and cancer of the gastric epithelium[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(35): 5975-5983.

[20] Voon D C, Wang H, Koo J K, *et al*. Runx3 protects gastric epithelial cells against epithelial-mesenchymal transition-induced cellular plasticity and tumorigenicity[J]. Stem Cells, 2012, 30(10): 2088-2099.

(收稿:2014-03-21;修回:2014-05-26)

(编辑 王 红)