DOI:10.16016/j.1000-5404.201509074

脱氧胆酸通过 KLF4 上调 CDX2 的表达促进 Barrett 食管形成

闫 武,张昊翔,沈才飞,夏一菊,王 璞,张亚飞,李婧文,徐 胤,邵顺子,于晓娜,房殿春 (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** 探讨在脱氧胆酸(deoxycholic acid,DCA)诱导 Barrett 食管(Barrett's esophagus,BE)形成中,Krüppel 样锌指转录因子 4(Krüppel-like factor 4,KLF4)与同源异型框转录因子 2(caudal-related homeodomain transcription factor 2,CDX2)的作用。**方法** 采用免疫组化 S-P 法检测 49 例人正常食管组织和 22 例 BE 组织中 KLF4、CDX2 的表达;体外培养 Het-1A 细胞,依据 DCA 处理时间分为 0 h 组(未经 DCA 处理)、4 h 组、8 h 组、12 h 组并进行 DCA 处理。分别设置空白对照组、阴性 siRNA 对照组、阴性 siRNA + DCA 处理 12 h 组、KLF4-siRNA 干扰组、KLF4-siRNA 干扰 + DCA 处理 12 h 组,进行相应处理。设置空白对照组、阴性病毒对照组、阴性病毒 + DCA 处理 12 h 组、KLF4 过表达病毒组,进行相应处理。待上述各实验组处理结束后,运用 Real-time PCR、Western blot 检测各组 KLF4、CDX2、MUC2 mRNA 及蛋白的表达。**结果** 免疫组化检测发现:在 22 例 BE 组织中,KLF4 阳性表达 15 例,阳性率 68.18%,阳性染色主要集中在细胞核;CDX2 阳性表达 16 例,阳性率 72.73%,阳性染色也主要集中在细胞核。与人正常食管鳞状上皮组织比较,BE 组织中 KLF4、CDX2 表达均增高($\chi^2 = 18.642$,$P < 0.05$;$\chi^2 = 23.678$,$P < 0.05$)。Real-time PCR 及 Western blot 检测结果显示:随 DCA 处理时间的增加,Het-1A 细胞 KLF4、CDX2、MUC2 的表达逐渐升高($P < 0.05$);KLF4-siRNA 干扰组及 KLF4-siRNA 干扰 + DCA 处理 12 h 组中,KLF4、CDX2、MUC2 表达均下调,且不再随 DCA 处理的刺激而升高($P < 0.05$);此外,阴性病毒 + DCA 处理 12 h 组及 KLF4 过表达病毒组中,KLF4、CDX2、MUC2 表达均上调,且 KLF4 过表达病毒组 3 个基因蛋白表达上调更为显著($P < 0.05$)。**结论** DCA 通过 KLF4 上调 CDX2,间接引起 BE 标志性分子 MUC2 的表达上调,从而促进正常食管上皮向 BE 转化。

[关键词] Barrett 食管;Het-1A 细胞;脱氧胆酸;Krüppel 样锌指转录因子 4;同源异型框转录因子 2
[中图法分类号] R363.21; R571.02; R977.4 [文献标志码] A

Deoxycholic acid up-regulates CDX2 by KLF4 in development of Barrett's esophagus

Yan Wu, Zhang Haoxiang, Shen Caifei, Xia Yiju, Wang Pu, Zhang Yafei, Li Jingwen, Xu Yin, Shao Shunzi, Yu Xiaona, Fang Dianchun (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the roles of Krüppel-like factor 4 (KLF4) and caudal-related homeodomain transcription factor 2 (CDX2) in the development of Barrett's esophagus (BE) induced by deoxycholic acid (DCA). **Methods** Immunohistochemical SP staining was applied to evaluate the expression levels of KLF4 nd CDX2 in 49 samples of normal esophageal tissues and 22 samples of BE tissues. Human esophagus epithelial cell line Het-1A was treated with DCA for 0, 4, 8 and 12 h. The siRNA of KLF4 was designed and transfected into Het-lA cells. The Het-lA cells were assigned into blank group, negative control-siRNA group, negative control-siRNA + DCA treatment group, KLF4-siRNA group, and KLF4-siRNA + DCA treatment group. The Het-1A cells with KLF4 over-expression were also established by transfection of over-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170356)
[通信作者] 房殿春,E-mail:fangdianchun@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160128.1702.002.html(2015-01-28)

expression recombinant lentivirus into the cells. Then, the expression levels of KLF4, CDX2 and MUC2 at mRNA and protein levels were detected by real-time PCR and Western blot assay, respectively. **Results** Among the 22 patients with BE, immunohistochemical staining indicated that 15 cases had positive expression of KLF4 (68.18%), which mainly located in the nucleus, and 16 cases had positive expression of CDX2 (72.73%), mainly located in the nucleus too. KLF4 and CDX2 was strongly expressed in the BE tissues, and its level was significantly higher in the BE compared with normal esophageal tissues (*Chi* square = 18.642, $P<0.05$; *Chi* square = 23.678, $P<0.05$). Real-time PCR and Western blot assay revealed that the mRNA and protein levels of KLF4, CDX2 and MUC2 were enhanced in a time-dependent manner in Het-1A cells induced by DCA ($P<0.05$), their levels were significantly suppressed in KLF4-siRNA groups, and could not be enhanced by stimulation of DCA again, but the levels were significantly increased in KLF4-overexpression group. **Conclusion** DCA up-regulates the expression of CDX2 by KLF4, which cause higher expression of MUC2 and thus promote the transformation of normal esophageal epithelia to BE.

[**Key words**] Barett's esophagus; Het-1A cells; deoxycholic acid; Krüppel-like factor 4; caudal-related homeodomain transcription factor 2

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170356). Corresponding author: Fang Dianchun, E-mail: fangdianchun@hotmail.com

Barrett 食管(Barrett's esophagus,BE)是指食管下段鳞状上皮被柱状上皮取代的一种病理现象,是食管腺癌的癌前病变。一般认为 BE 的发生与胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease,GERD)所导致的长期胆酸刺激有关[1]。国外亦有文献报道体外培养的正常食管鳞状上皮细胞经脱氧胆酸(deoxycholic acid,DCA)处理后,表达肠道柱状上皮细胞表型,但其具体分子机制尚未明确[2]。Krüppel 样锌指转录因子 4(Krüppel-like factor 4,KLF4)参与早期胚胎发育,在胃肠道形态发生、肠道黏膜生成以及功能的发挥过程中起重要作用[3-4]。尾型同源异型框转录因子 2(caudal-related homeodomain transcription factor 2,CDX2)属于果蝇尾部相关同源基因家族成员,参与细胞的增殖和分化,在胚胎发育调控中亦非常重要[5]。因此,我们推测 KLF4 和 CDX2 共同参与 BE 的发生和发展。本研究采用免疫组化方法观察 KLF4、CDX2 在不同组织中的表达;使用 Real-time PCR、Western blot 分别检测经过 DCA 处理不同时间、siRNA 干扰及慢病毒过表达 KLF4 后,正常食管鳞状上皮 Het-1A 细胞 KLF4、CDX2 及粘蛋白 2(Mucin2,MUC2)的表达变化,旨在探索 KLF4 与 CDX2 在 BE 发生中的作用及相互关系,为更深入认识 BE 提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 组织与细胞 选取西南医院 2012 年 3 – 12 月的 71 例消化内科门诊患者,其中男性 37 例,女性 34 例,平均年龄 50.94(35 ~ 65)岁。纳入标准:BE 患者的诊断均符合中华医学会消化病学分会 Barrett 食管诊治共识修订的标准。共制作 49 例正常食管组织标本、22 例 Barrett 食管组织标本。病例均有完整的病历资料,并且均经病理检查证实。标本的搜集均获得患者同意并签署知情同意书,通过医院伦理委员会批准。永生化的正常食管鳞状上皮 Het-1A 细胞株购于美国细胞菌种库(ATCC)。

1.1.2 主要试剂 BEBM 培养基购自 Lonza 公司,TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司(15596-026),逆转录、实时荧光定量 PCR 试剂盒购于本 TaKaRa 公司(RR047A、RR820A),引物购于生工公司,全蛋白提取试剂盒购于凯基公司(KGP250),一抗(兔抗人)KLF4、CDX2、MUC2 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,GADPH 多克隆抗体以及二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,化学发光液购于 Thermo scientific 公司,KLF4 过表达慢病毒购于吉凯公司,KLF4 的干扰 siRNA 购于吉玛公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 取材后立即中性福尔马林固定,石蜡包埋,连续切片,染色、封片,采用免疫组化 S-P 法,分别检测正常鳞状上皮组和 BE 组样本各基因的表达。KLF4 的工作浓度为 1∶100,CDX2 的工作浓度为 1∶150,以 PBS 作为阴性对照,用光镜观察结果。阳性标准:在人体组织中,KLF4 阳性颗粒定位于细胞核,CDX2 阳性颗粒定位于细胞核,两者出现棕褐色颗粒为免疫组化阳性。由 2 名病理医师双盲独立阅片,根据每张切片染色强度及阳性细胞数确定表达程度。具体标准:①根据染色强度:无着色为 0 分,黄色为 1 分,

棕黄色为2分,棕褐色为3分。②根据阳性细胞数:<5%为0分,5%~25%为1分,25%~50%为2分,>50%为3分。等级评分:<2分为阴性(-),2~3分为弱阳性(+),3~5分为阳性(++),>5分为强阳性(+++),为便于统计分析,将(+)、(++)、(+++)定义为阳性表达。

1.2.2 细胞培养 采用BEBM培养基常规培养Het-1A细胞。

1.2.3 DCA处理细胞 取生长状态良好的Het-1A细胞接种6孔板,分为4组:DCA处理4、8、12 h组和对照组(0 h组,未加DCA),每组设计3孔,每孔加入2 mL无抗生素的DMEM完全培养基。待新接种的细胞长到80%时,更换新培养基。为了模拟体内胃食管反流对食管上皮细胞的影响,我们向体外培养的细胞中加入200 μL的DCA(200 μmol/L),分别处理4、8、12 h。

1.2.4 KLF4的干扰siRNA转染细胞 以GenBank收录的KLF4基因序列(NM_004235)作为分析序列,分别设计3对不同的siRNA干扰序列(表1)。正常培养Het-1A细胞至密度为70%,筛选实验设5组:正常对照组(未经任何处理)、阴性对照组(转染阴性对照siRNA)、KLF4-siRNA1组和KLF4-siRNA2组和KLF4-siRNA3组。转染操作按转染试剂说明书,分组转染48 h后看荧光确认转染成功,随后提蛋白,应用Western blot检测KLF4蛋白表达的差异。根据Western blot检测结果,选择一种干扰效果最佳的siRNA进行后续正式干扰实验,正式干扰实验设计5组:空白对照组(未加处理)、阴性对照组(转染阴性对照siRNA)、阴性DCA处理组(转染阴性对照siRNA并用DCA处理12 h)、KLF4-siRNA组(转染干扰效果最佳的KLF4-siRNA组),KLF4-siRNA DCA处理组(转染效果最佳的KLF4-siRNA组并用DCA处理12 h),每组设3个副孔,继续培养36 h,并向阴性对照DCA处理组、KLF4-siRNA DCA处理组分别加入200 μL的DCA(200 μmol/L),处理12 h。再用Rea1-time PCR和Western blot检测各基因表达。

表1 KLF4 siRNA序列及阴性对照序列

组别	序列	片段大小(bp)
KLF4-siRNA1序列	正义链:5′-GAAAUUCGCCCGCUCAGAUTT-3′ 反义链:5′-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3′	21
KLF4-siRNA2序列	正义链5′- GACCAGAAUUCCCUUGAAUTT-3′ 反义链: 5′-AUUCAAGGGAAUUCUGGUCTT-3′	21
KLF4-siRNA3序列	正义链:5′-GGUGAGUCUUGGUUCUAAATT-3′ 反义链:5′-UUUAGAACCAAGACUCACCTT-3′	21
阴性对照序列	正义链:5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′ 反义链:5′-UUUAGAACCAAGACUCACCTT-3′	21

1.2.5 过表KLF4病毒转染细胞 转染前24 h将Het-1A细胞接种至24孔板上,当细胞密度至30%~50%时,按感染复数(MOI)分别为5、10、30、50加入LV-KLF4重组慢病毒,为提高转染效率每孔加入8 μg/mL的polybrene提高转染效率,置于5% CO_2的37 ℃孵箱中孵育,12 h后换液,继续培养2 d,用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况。根据不同MOI值所对应细胞的荧光表达强度估算慢病毒感染效率,确定最佳MOI值为10,依据此MOI正式转染细胞,48 h后传代并加入1 μg/mL嘌呤霉素筛选。通过镜下观察细胞内绿色荧光蛋白表达情况,初步判断筛选结果,并通过Western blot验证经过筛选的Het-1A细胞是否稳定表达KLF4蛋白。利用稳定表达KLF4的细胞进行后续实验,实验设计4组:空白对照组(未加处理)、阴性对照组(转染阴性对照病毒)、阴性DCA处理组(转染阴性对照病毒并用DCA处理12 h)、阳性组(转染LV-KLF4重组慢病毒),每组设3个副孔。待细胞长到50%时,更换新培养基,然后按MOI为10、向阴性对照组、阴性对照DCA处理组、阳性组中加入对应病毒和8 μg/mL的转染增强液polybrene,12 h后换液,继续培养24 h,并向阴性对照DCA处理组加入200 μL的DCA(200 μmol/L),处理12 h。再用Rea1-time PCR和Western blot检测各基因表达。

1.2.6 Rea1-time PCR检测各组细胞KLF4、CDX2的mRNA表达 使用TRIzol试剂提取各实验组细胞的总RNA,并利用紫外分光光度计检测其纯度和浓度,按照逆转录试剂盒所列步骤,将RNA逆转录成cDNA,每组样本设3个副孔,按照Rea1-time PCR检测试剂盒SYBR Green法说明书加样并进行测定,PCR仪器条件设定如下:95 ℃ 预变性1 min 30 s;95 ℃变性5 s,57 ℃退火30 s,扩增40个循环。各基因引物信息见表2。

表2 各基因的引物序列和扩增片段大小

基因	引物序列	扩增片段长度(bp)
KLF4	上游5′-GGAGAGAGACCGAGGAGTTCA-3′ 下游5′-ACGACGAAGAGGAGGCTGAC-3′	126
CDX2	上游5′-GGAACCTGTGCG AGTGGATG-3′ 下游5′-CGGATGGTGATGTAGCGACTGTA-3′	115
MUC2	上游5′-GCTGCTATGTCGAGGACACC-3′ 下游5′-GGGAGGAGTTGGTACACACG-3′	115
GAPDH	上游5′-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3′ 下游5′-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3′	132

1.2.7 Western blot检测细胞KLF4、CDX2等蛋白表达 各组实验结束后,常规方法提取总蛋白,测浓度、上样、跑胶、转膜和封闭,依次加入CDX2和KLF4

一抗(稀释倍数均为 1∶1 000),GAPDH 一抗(稀释倍数为 1∶1 500),4 ℃孵育过夜。TBST 漂洗 3 次后,加入对应辣根过氧化物偶联的二抗(稀释倍数1∶5 000),孵育 2 h 后,再用 TBST 漂洗 3 次,应用化学荧光法检测目的蛋白表达强度。采用 Image Lab 软件分析图像。

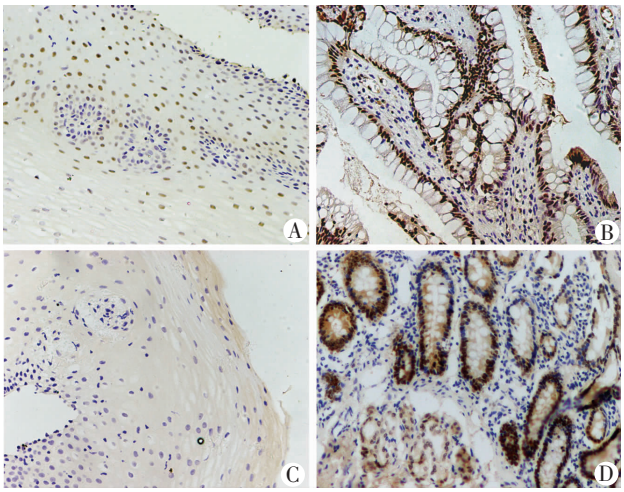
1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析,构成比之间的比较采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　CDX2、KLF4 在正常食管和 BE 组织中的表达

49 例正常食管组织中,KLF4 阴性表达 41 例,阳性 8 例,阳性率 16.33%,阳性染色主要集中在胞核;CDX2 阴性表达 42 例,阳性 7 例,阳性率 14.29%,阳性染色也主要集中在胞核。22 例 BE 组织中,KLF4 阴性表达 7 例,阳性 15 例,阳性率 68.18%,阳性染色主要集中在胞核;CDX2 阴性表达 6 例,阳性 16 例,阳性率 72.73%,阳性染色也主要集中在胞核。BE 组织中 KLF4 和 CDX2 的阳性率均高于正常食管组织(χ^2 = 18.642,P < 0.05;χ^2 = 23.678,P < 0.05;图 1)。

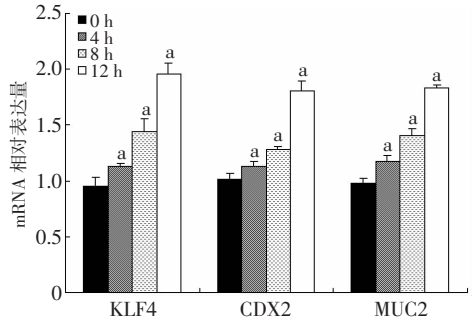


A:KLF4 在正常食管组织中的表达;B:KLF4 在 BE 组织中的表达;C:CDX2 在正常食管组织中的表达;D:CDX2 在 BE 组织中的表达

图 1　免疫组织化学检测 KLF4 和 CDX2 在不同组织中的表达和分布(S-P ×400)

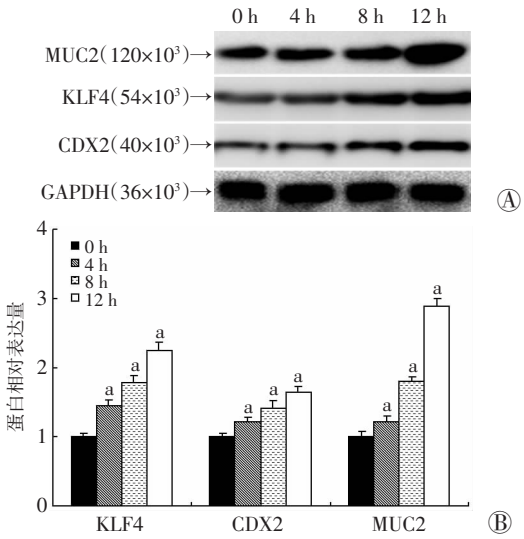
2.2　DCA 处理 Het-1A 细胞促进 KLF4、CDX2、MUC2 表达上调

在 mRNA 和蛋白水平,KLF4、CDX2、MUC2 表达均随 DCA 处理时间的增加而升高,且较对照组差异具有统计学意义(P < 0.05,图 2、3)。



a:P < 0.05,与 0 h(对照组)比较

图 2　Real-time PCR 检测 DCA 处理 Het-1A 细胞各时间点 KLF4、CDX2、MUC2 mRNA 的表达



A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:P < 0.05,与 0 h(对照组)比较

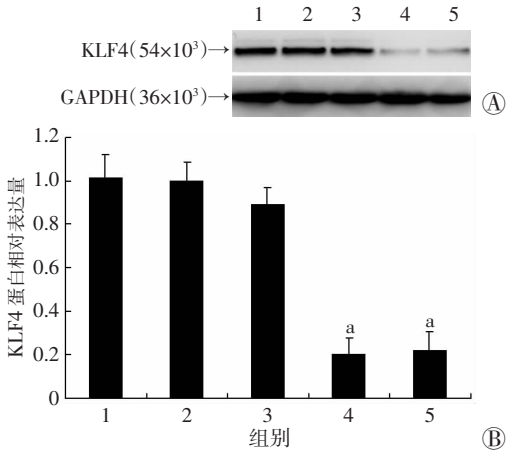
图 3　Western blot 检测 DCA 处理 Het-1A 细胞各时间点 KLF4、CDX2、MUC2 蛋白质的表达

2.3　干扰 KLF4 对 CDX2 和 MUC2 表达的影响

2.3.1　Western blot 筛选 KLF4 的最佳干扰片段

转染 48 h 后,Western blot 检测结果显示:KLF4-siRNA2 组对 KLF4 的干扰效果最佳,空白对照组和阴性对照组之间差异无统计学意义(图 4)。根据筛选实验结果,选择 KLF4-siRNA2 干扰 KLF4 基因的表达,进行后续正式干扰实验。

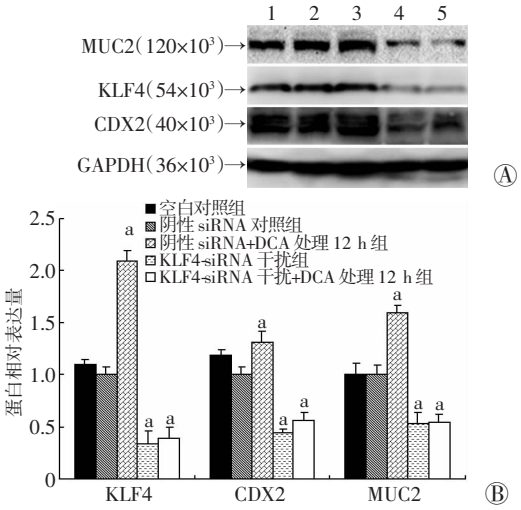
2.3.2　Western blot 检测干扰 KLF4 对 CDX2 和 MUC2 蛋白的表达　　将干扰效果最明显的 KLF4-siRNA2(后表述为 KLF4-siRNA)转染 Het-1A 细胞,48 h 后行 Western blot 检测,结果显示:KLF4-siRNA 干扰组及 KLF4-siRNA 干扰 + DCA 处理 12 h 组中,KLF4、CDX2、MUC2 表达均下调,且不再随 DCA 处理的刺激而升高,较阴性 siRNA 对照组差异均具有统计学意义(P < 0.05,图 5)。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:KLF4-siRNA1 组;4:KLF4-siRNA2 组;5:KLF4-siRNA3 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与阴性对照组比较

图 4 Western blot 检测干扰 KLF4 对 CDX2 和 MUC2 表达的影响



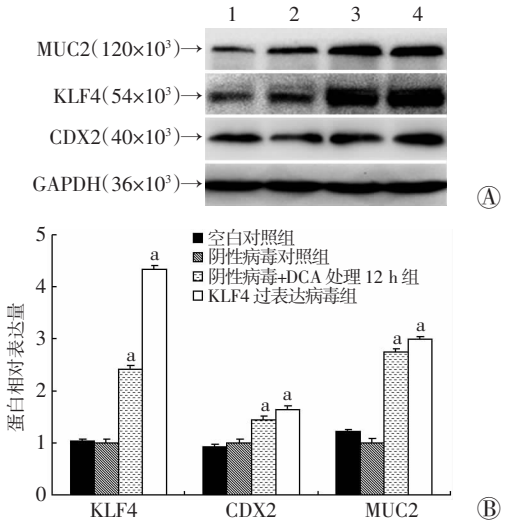
1:空白对照组;2:阴性 siRNA 对照组;3:阴性 siRNA + DCA 处理 12 h 组;4:KLF4-siRNA 干扰组;5:KLF4-siRNA 干扰 + DCA 处理 12 h 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与阴性 siRNA 对照组比较

图 5 Western blot 检测干扰 KLF4 后 KLF4、CDX2、MUC2 蛋白的表达

2.4 过表达 KLF4 对 CDX2 和 MUC2 表达的影响

将 KLF4 过表达病毒转染 Het-1A 细胞,48 h 后行 Western blot 检测,结果显示:阴性病毒 + DCA 处理 12 h 组及 KLF4 过表达病毒组中,KLF4、CDX2、MUC2 表达均上调,且 KLF4 过表达病毒组 3 个基因蛋白质表达上调更为显著,较阴性病毒对照组差异均具有统计学意义($P<0.05$,图 6)。



1:空白对照组;2:阴性病毒对照组;3:阴性病毒 + DCA 处理 12 h 组;4:KLF4 过表达病毒组

A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与阴性病毒对照组比较

图 6 Western blot 检测过表达 KLF4 后 KLF4、CDX2、MUC2 蛋白的表达

3 讨论

生理状况下,人正常食管被覆复层鳞状上皮,但 BE 患者的食管下端则不同程度被柱状上皮取代,而 BE 又是食管腺癌公认的癌前病变,故近年来成为研究的热点。一般认为 BE 是正常食管鳞状上皮在含有胆酸的反流物持续作用下,为适应环境而化生为耐酸性较强的柱状上皮。在此过程中,胆酸既是 BE 形成的重要始动因素,也是 BE 进展的主要原因[6]。但胆酸导致这一病理改变的具体机制依然不明。KLF4 是一种在人类多种组织(包括食管)中广泛表达的锌指转录因子,在早期胚胎发育、胃肠道形态发生以及功能的发挥和正常组织稳态的维持中都具有重要作用[7-9]。近年来,国外学者发现将 KLF4 等转录因子导入小鼠体细胞,能获得诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells,iPSCs),这颠覆了人们既往对于干细胞的传统认识[10]。我们前期的研究也表明 KLF4 在 BE 的形成过程中起重要作用[11]。我们据此推测:人正常食管鳞状上皮到 BE 的转变过程中,也可能存在类似于 KLF4 等转录因子诱导 iPSCs 的作用。为此,我们用免疫组化技术检测对比了正常食管鳞状上皮组织与 Barrett 食管组织中 KLF4 表达差异。结果发现,与人正常食管鳞状上皮组织相比,Barrett 食管组织中 KLF4 表达显著增高。这提示在 BE 形成过程中,可能的确存在 KLF4 的作用。

另一方面,CDX2 参与肿瘤抑制、胚胎发育调控、

肠柱状上皮表型表达及形态发生等重要生命活动[12]。既往研究发现 CDX2 可特异性结合于杯状细胞特异性蛋白 MUC2 基因的启动子 MUC2-WT 顺式作用元件,激活 MUC2 的转录[13],而 MUC2 正是食管鳞状上皮转变为 BE 的标志性分子之一[14-15]。本研究免疫组化的结果也证实:Barrett 食管组织中 CDX2 表达比人正常食管鳞状上皮组织显著增高。这提示在 BE 形成过程中,也存在 CDX2 的作用。于是,我们进一步推测:含有胆酸的反流物可能是通过提高 KLF4 的表达,进而提高 CDX2 表达,最终导致 BE 标志性分子 MUC2 的表达增加。

为此,我们在体外培养了永生化的人食管鳞状上皮 Het-1A 细胞,并用 DCA 处理不同时间。实验结果发现,随 DCA 处理时间的增加,Het-1A 细胞 KLF4、CDX2、MUC2 的表达均显著升高,这与我们的推测相符。后续,我们又利用 KLF4 的干扰 siRNA 转染细胞,下调 KLF4 的表达。实验结果发现:随 KLF4 的下调,Het-1A 细胞 CDX2 和 MUC2 的表达均显著下降,且不能被 DCA 刺激再次升高,这再次佐证了胆酸对食管的影响是通过 KLF4 实现的。最后,为了进一步明确 KLF4 与 CDX2、MUC2 的这种调控关系,我们用 KLF4 过表达病毒上调 KLF4 的表达,结果发现:随 KLF4 的上调,Het-1A 细胞 CDX2 和 MUC2 的表达均显著上调,这进一步证明含有胆酸的反流物的确是通过提高 KLF4 的表达,进而提高了 CDX2 表达,并最终通过引起 BE 标志性分子 MUC2 的表达增加来促进 BE 形成的。

综上所述,我们受小鼠体细胞经细胞重编程得到 iPSCs 的过程启发,通过实验证明了胆酸通过 KLF4 上调 CDX2 表达,引起 BE 标志性分子 MUC2 的表达上调,最终促进 BE 形成。这为更深入认识 BE 的发病机制提供了新的线索和思路,也为其进一步临床治疗提供了实验依据。下一步可围绕动物模型的验证和转录调控机制进行更深入的研究。

参考文献:

[1] Thomas S J, Almers L, Schneider J, *et al*. Ghrelin and Leptin Have a Complex Relationship with Risk of Barrett's Esophagus[J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(1): 70-79. DOI: 10.1007/s10620-015-3867-6

[2] Burke Z D, Tosh D. Barrett's metaplasia as a paradigm for understanding the development of cancer[J]. Curr Opin Genet Dev, 2012, 22(5): 494-499. DOI:10.1016/j.gde.2012.08.001

[3] Yu T, Chen X, Zhang W, *et al*. Regulation of the potential marker for intestinal cells, Bmi1, by β-catenin and the zinc finger protein KLF4: implications for colon cancer[J]. J Biol Chem, 2012, 287(6): 3760-3768. DOI: 10.1074/jbc.m111.316349

[4] Lee H Y, Ahn J B, Rha S Y, *et al*. High KLF4 level in normal tissue predicts poor survival in colorectal cancer patients [J]. World J Surg Oncol, 2014, 12: 232. DOI:10.1186/1477-7819-12-232

[5] Boudreau F, Rivard N, Gendron F P, *et al*. CDX2: a transcription factor with multiple tasks for epithelial cells of the digestive tract[J]. Med Sci (Paris), 2007, 23(1): 7-8. DOI:10.1051/medsci/20072317

[6] Nehra D, Howell P, Williams C P, *et al*. Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity [J]. Gut, 1999, 44(5): 598-602.

[7] Shields J M, Christy R J, Yang V W. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest[J]. J Biol Chem, 1996, 271(33): 20009-20017.

[8] Katz J P, Perreault N, Goldstein B G, *et al*. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon[J]. Development, 2002, 129(11): 2619-2628.

[9] Ton-That H, Kaestner K H, Shields J M, *et al*. Expression of the gut-enriched Krüppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis[J]. FEBS Lett, 1997, 419(2/3): 239-243.

[10] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024

[11] 李婧文, 徐胤, 夏一菊, 等. KLF4 与 Notch1 在脱氧胆酸诱导 Barrett 食管形成过程的作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(9): 878-882.

[12] Li C M, Gocheva V, Oudin M J, *et al*. Foxa2 and Cdx2 cooperate with Nkx2-1 to inhibit lung adenocarcinoma metastasis[J]. Genes Dev, 2015, 29(17): 1850-1862. DOI: 10.1101/gad.267393.115

[13] Yamamoto H, Bai Y Q, Yuasa Y. Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 300(4): 813-818. DOI:10.1016/s0006-291x(02)02935-2

[14] Gulmann C, Shaqaqi O A, Grace A, *et al*. Cytokeratin 7/20 and MUC1, 2, 5AC, and 6 expression patterns in Barrett's esophagus and intestinal metaplasia of the stomach: intestinal metaplasia of the cardia is related to Barrett's esophagus[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2004, 12(2): 142-147.

[15] Glickman J N, Shahsafaei A, Odze R D. Mucin core peptide expression can help differentiate Barrett's esophagus from intestinal metaplasia of the stomach[J]. Am J Surg Pathol, 2003, 27(10): 1357-1365.

(**收稿**:2015-09-14;**修回**:2015-10-30)

(编辑 王 红)