

6-姜烯酚通过调节CDX2/miR-216a-5p轴缓解棕榈酸诱导的Caco-2细胞紧密连接损伤

王文宇,董婧潇,张贺,李宇,李大鹏,李锋*

山东农业大学食品科学与工程学院,山东省高校食品营养与人类健康重点实验室,山东泰安271018

摘要: 棕榈酸(Palmitic acid, PA)会损伤人体肠道上皮细胞紧密连接,导致肠道屏障功能紊乱。我们前研究发现,6-姜烯酚可通过调控miR-216a-5p靶向抑制Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)进而抑制炎症因子,保护肠道细胞免受PA诱导的损伤。然而,6-姜烯酚调控miR-216a-5p表达的具体机制不清楚。本研究采用PA处理人结肠腺癌Caco-2细胞建立肠道紧密连接损伤模型,通过DNA pulldown实验和双荧光素酶报告基因实验,初步确定尾型同源框转录因子2(Caudal-related homeobox transcription factor 2, CDX2)是miR-216a-5p的候选调控因子。通过染色质免疫共沉淀-聚合酶链反应(Chromatin immunoprecipitation followed by polymerase chain reaction, ChIP-PCR)实验和电泳迁移率实验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)实验相结合,证实转录因子CDX2可以与miR-216a-5p启动子相结合并促进其转录。最后评估了转录因子CDX2在促炎因子和紧密连接相关蛋白表达中的作用,证明了CDX2是6-姜烯酚调节miR-216a-5p表达的靶标。本研究首次揭示CDX2是miR-216a-5p的直接转录激活因子,为揭示生姜的健康调节作用和相关功能食品的研究提供了参考和依据。

关键词: 6-姜烯酚; 转录因子; CDX2; miR-216a-5p; 紧密连接

中图分类号: TS201.4

文献标识码: B

文章编号: 1000-2324(2026)01-0023-14

6-Shogaol Alleviates Palmitic Acid-Induced Tight Junction Damage in Caco-2 Cells by Regulating the CDX2/miR-216a-5p Axis

WANG Wen-yu, DONG Jing-xiao, ZHANG He, LI Yu, LI Da-peng, LI Feng*

College of Food Science and Engineering/Shandong Agricultural University, Key Laboratory of Food Nutrition and Health in Universities of Shandong, Tai'an 271018, China

Abstract: Palmitic acid (PA) can damage the tight junction of human intestinal epithelial cells, leading to intestinal barrier dysfunction. Our previous study demonstrates that 6-shogaol can modulate the expression of microRNA miR-216a-5p, leading to the targeted inhibition of the Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway. This, in turn, reduces the production of inflammatory factors and protects intestinal cells from PA-induced damage. However, the specific mechanism by which 6-shogaol regulates miR-216a-5p expression remains unclear. This study establishes a model of intestinal tight junction injury by treating human colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells with PA. Through DNA pulldown assays and dual-luciferase reporter gene experiments, this study preliminarily identifies Caudal-related homeobox transcription factor 2 (CDX2) as a candidate regulator of miR-216a-5p. By combining chromatin immunoprecipitation followed by polymerase chain reaction (ChIP-PCR) and electrophoretic mobility shift assay (EMSA), this study confirms that the transcription factor CDX2 can bind to the miR-216a-5p promoter and promotes its transcription. Finally, this study evaluates the role of transcription factor CDX2 in regulating the expression of pro-inflammatory factors and tight junction-related proteins, proving that CDX2 is the target through which 6-shogaol regulates miR-216a-5p expression. This study is the first to show that CDX2 is a direct transcriptional activator of miR-216a-5p, providing a reference and basis for revealing the health-regulation effects of ginger and related functional food research.

Keywords: 6-shogaol; transcription factor; CDX2; miR-216a-5p; tight junction

紧密连接(Tight junction, TJ)是肠道屏障上皮组织的重要组成部分,主要由跨膜蛋白

Claudin 家庭、Occludin 家庭、胞浆蛋白 ZO 家族等形成,可以控制水和电解质等物质通过细胞间

收稿日期: 2025-03-06

修回日期: 2025-12-28

基金项目: 山东省重点研究发展计划项目(2023TZXD070); 国家自然科学基金面上项目(32372332); 山东省自然科学基金项目(ZR2022MC004)。

第1作者简介: 王文宇(2000-),女,硕士研究生,研究方向:食品营养与人类健康。E-mail: wwy00918@163.com

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail: fengli@sdau.edu.cn

隙,还可以阻止抗原、微生物、过敏原等有害物质入侵肠道细胞^[1,2]。Claudins 和 Occludin 作为膜内在蛋白,是最重要的紧密连接相关蛋白,在维持肠上皮细胞的完整性和功能性中发挥着重要作用^[3]。研究发现,TJ 损伤与肠道粘膜屏障损伤、慢性结肠炎、结直肠癌的发生都有关联系^[4]。因此,维护肠道屏障(包括 TJ)的完整和功能对于保护肠道稳态,预防肠道屏障功能紊乱相关疾病至关重要。

近年来,高脂饮食(HFD)导致的肠道屏障功能障碍已成为代谢性疾病的重要诱因^[5]。棕榈酸(Palmitic acid, PA)作为 HFD 中含量最高的饱和脂肪酸^[6],所以棕榈酸对肠道的影响成为肠道健康研究的热点之一。前期研究发现,PA 可通过激活 TLR4/NF- κ B 信号通路诱导肠道上皮细胞炎症反应,并显著下调紧密连接蛋白(Claudin-1、Occludin、ZO-1)的表达,破坏肠道屏障完整性。因此需要深入研究 PA 诱导的肠道屏障损伤的机制。

尾部相关同源盒 2(CDX2)是尾部相关同源盒转录因子基因家族的成员,是参与编码肠道细胞生长和分化的特异性基因的主要调节因子,在调控参与肠细胞生长、分化和肠道早期胚胎发育的基因方面起着至关重要的作用^[7,8]。有研究发现 CDX2 参与某些肠道炎症性疾病的关键通路^[9],这表明 CDX2 的异常表达与多种肠道疾病(包括肠道疾病和结直肠癌)有关,因此 CDX2 是控制肠道命运的关键转录因子,并且其表达量的高低还可能预示着肠道性疾病等问题的发生^[10-12]。CDX2 作为转录因子会对下游基因的表达调控产生重要影响,是控制细胞增殖和分化的重要通路。

MiRNA 被称为“功能调节分子”,可以调节细胞内的许多生理和病理生理过程^[13]。MiRNA 长 20-25 个核苷酸,通过与靶 mRNA 的 3'非翻译区结合来调节转录后的基因表达,从而导致 RNA 降解或翻译抑制^[14]。以前的研究表明,miRNAs 可以与 TFs 相互作用以调节基因表达^[15]。例如,Salem 等人^[16]证实 miR-590-3p 靶向转录因子 FOXA2 3'UTR 区,降低其表达,抑制结合靶基因 VCAN 的负调控,增加细胞增殖、迁移和侵袭能力。然而,关于肠道中 TFs 和 miRNAs 的调控网络还有待研究。生姜(*Zingiber officinale* Roscoe),是传统的药食兼用植物,现代

药理学研究发现生姜具有抗氧化、抗运动病、止吐、抗糖尿病、防治心血管疾病等多种作用^[17-19]。其中,姜辣素类化合物被认为是生姜中的主要活性成分之一^[20]。6-姜烯酚是生姜中的 6-姜酚在干燥过程中脱氢形成的产物^[21-23],具有比 6-姜酚更强的抗炎和抗肿瘤作用^[24,25]。此外,有研究表明 6-姜烯酚对于神经炎症和认知缺陷也有改善作用^[26,27]。本课题组前期研究发现,6-姜烯酚对高脂导致的人结直肠腺癌 Caco-2 细胞紧密连接损伤具有缓解作用,其作用机制与 6-姜烯酚通过上调 miR-216a-5p 表达进而靶向抑制 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)及下游炎症因子的产生有关^[28]。然而,6-姜烯酚是如何通过调节上游转录因子进而影响 miR-216a-5p 表达的具体机制仍不清楚。

因此,在前期研究的基础上,我们证明了 CDX2 是 6-姜烯酚调节 miR-216a-5p 表达的靶标,评估了转录因子 CDX2 在促炎因子和紧密连接相关蛋白表达中的作用,更深入的阐述了 6-姜烯酚调节 miR-216a-5p 的具体分子机制。研究结果为阐明姜酚类化合物的作用机制及其在肠道中对紧密连接蛋白的保护作用和抗炎机理提供理论基础,也可为进一步明确膳食中的功能成分提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

人结直肠腺癌 Caco-2 细胞购自上海美湾生物科技有限公司;6-姜烯酚(CAS 号:555-66-8,纯度 $\geq 98\%$)购自上海同田生物公司;棕榈酸(产品编号:SYSJ-KJ003,纯度 $\geq 99.5\%$)购自西安鲲创生物公司;二甲基亚砜(DMSO)、青链霉素混合液、0.25%胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)均购自索莱宝公司;DMEM 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购自 Vivacell 公司。

1.2 细胞培养和处理

Caco-2 细胞系在标准细胞培养条件 37 °C、5% CO₂,并在含有 10% FBS 和 1% 青霉素及链霉素的 DMEM 培养基中培养成单层细胞。每隔 1 d 在标准 T25 细胞培养瓶中传代 1 次,当细胞密度达到 80-90%时,使用 0.25%的胰蛋白酶消化细胞约 3 min,然后加入完全培养基重悬于培养瓶

中,并以 1:3 的比例传代。经过 21 d 培养形成分化的成熟肠道单层细胞并表现出肠上皮细胞样特征时即可进行药物处理。将 PA 和 6-姜烯酚分别溶解在 DMSO 中制成储备液,细胞处理前用 DMEM 将储备液稀释至所需浓度。前期课题组通过 MTT 实验确定了 6-姜烯酚(6-shogaol)和棕榈酸(PA)在 Caco-2 细胞中的无毒性效应剂量分别为 2.5 μM 和 400 μM ^[28],因此细胞经过 PA(400 μM)、6-姜烯酚(2.5 μM)和 PA(400 μM)+6-姜烯酚(2.5 μM)三组不同的处理,只在 DMEM 培养基中培养的细胞为对照组,处理 24 h 后进行后续实验。

1.3 RNA 提取和反转录

将细胞种在六孔板中之后,使用 Vazyme(中国南京)的 FastPure Cell RNA Isolation Kit V2 试

剂盒收集细胞裂解液,并根据制造商的方案提取细胞的总 RNA。采用 Evo M-MLV RT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR AG11728 和 miRNA 1st strand cDNA synthesis kit AG11717 进行 RNA 的反转录生成 cDNA 产物。反转录程序为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。cDNA 合成后于 -80 °C 冰箱储存。

1.4 实时荧光定量 PCR 实验

使用 ABI 实时荧光定量 PCR 系统和 SYBR Premix Kit AG11701 或 AG11702 进行 qRT-PCR 实验。GAPDH 作为 mRNA 的内参基因,U6 作为 miRNA 的内参基因。用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 的方法计算和分析基因表达水平。PCR 引物均购自上海生工。表 1 是本研究中使用的 mRNA 和 miRNA 引物。

表 1 qRT-PCR 实验引物序列
Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

基因名称 Gene name	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')
GAPDH	CTCCTCCTGTTTCGACAGTCA	CGACCAAATCCGTTGACTCC
CDX2	AGAAGTGTCCCAGAGCCCTTG	CAGGGACAGAGCCAGACACTG
FOSL2	GAGAGGAACAAGCTGGCTGC	GCTTCTCCTTCTCCTTCTGC
BHLHE40	GGATCTCCTACCCGAACATCTCA	GAGCGAAAGTCCGCTGGATGACTG
SRF	CGCGTGAAGATCAAGATGGAGT	TTCTCTGGTCTGTTGTGGGGT
TCF7L1	GCCACTCCCTCTGCAGCTTTGG	TTTCTGGTTTGGTGGTGAGGGAGA
SOX8	AGAAGGACCACCCCGACTAC	AGCCCTGCTTCAGCCTTGTA
TFAP2C	TCAGTCCCTGGAAGATTGTCG	CCAGTAACGAGGCATTTAAGCA
U6	GGAACGATACAGAGAAGATTAGC	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
miR-216a-5p	CGTAATCTCAGCTGGCAACTGTGA	

1.5 DNA pulldown 实验

将 5 μg 生物素标记的 DNA 和 500 μg 核蛋白混合加入到磁珠中,4 °C 孵育 1 h,离心后收集沉淀。向提取的蛋白质样品中加入反应缓冲液,在 60 °C 孵育 1 h 进行蛋白变性、还原和烷基化。用等体积的超纯水稀释后,按 1:50 的质量比(酶与蛋白质)加入胰蛋白酶,37 °C 震荡孵育过夜进行酶切。随后加入 TFA 终止消化,离心收集上清液并用 SDB 脱盐柱进行脱盐,抽干后 -20 °C 冻存待用。使用质谱仪和串联液相色谱系统收集质谱数据。质谱数据使用 MaxQuant(v1.6.6) 软件进行搜索。搜索结果根据蛋白质和肽段水平的 1% FDR 进行过滤,去除数据库蛋白质、杂质蛋白质和只有一个修饰肽段的蛋白质条目,剩余的鉴定结果用于后续分析^[29]。

1.6 生物信息学分析

利用 JASPAR 数据库对转录因子评分和结合位点预测进行分析(<https://jaspar.genereg.net/>)。

1.7 双荧光素酶报告基因检测

双荧光素酶报告基因载体由武汉科谨生物科技有限公司构建,采用 5' 端逐级截短的方式构建载体^[30]。实验分组分别为: pGL3-basic、pGL3-miR-216a-5p promoter、pCDNA3.1-CDX2、pCDNA3.1-FOSL2。根据 Lipofectamine 2000 转染试剂的说明,共转染 pGL3 和 pRL-TK 质粒,每孔各转染 250 ng 质粒(0.5 μL),转染培养 48 h。转染结束后,弃去培养基,用 PBS 冲洗一遍后加入细胞裂解液 1×Passive Lysis Buffer (PLB)

100 μL , 摇床裂解 15 min。于新的 96 孔板中加入 100 μL 荧光素酶检测底物 LAR II, 随后在每孔中加入 20 μL 裂解后的细胞溶液, 混匀后通过双荧光素酶报告基因测定系统检测不同处理后细胞的荧光素酶活性。检测结束后, 再加入 100 μL 荧光素酶终止液 1 \times Stop & Glo[®] Reagent, 检测肾素荧光素酶活性。

荧光素酶的相对活性=(萤火虫荧光素酶荧光值/肾素荧光素酶荧光值)/pGL3-basic 荧光值。

1.8 染色质免疫沉淀(ChIP)实验

使用 ChIP 检测试剂盒(26157, Thermo Fisher)进行 ChIP 检测。将 Caco-2 细胞接种在 10 cm 的培养皿中, 21 d 后加入质粒转染 48 h, 随后将每个培养皿上的细胞进行交联并裂解。将细胞裂解物在冰上超声处理, 以剪切基因组 DNA, 使 DNA 大部分断裂成 200-1 000 bp 大小。在经过超声处理的样品中加入 5M NaCl, 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 4 h, 以去除蛋白和基因组 DNA 之间的交联。并用 PCR 纯化试剂盒纯化 DNA。取 DNA 纯化试剂盒纯化产物 5 μL , 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察超声处理对于基因组 DNA 的剪切效果。随后对于经过超声处理的样品进行离心, 并收集 1% 的上清液作为 Input 组用于后续检测。剩余样品加入磁珠, 离心后加入抗 CDX2 抗体(#12306, cell signaling)和兔 IgG 抗体(AC005, Abclonal)免疫沉淀等量的上清液。从免疫沉淀产物中分离蛋白质和 DNA, 并用 PCR 纯化试剂盒纯化 DNA。对纯化浓缩后的 CHIP 产物进行 PCR 检测, 分析 miR-216a-5p 启动子的富集情况。

1.9 凝胶迁移实验(EMSA)

使用化学发光电泳迁移率位移测定(EMSA)试剂盒(20148, Thermo Fisher)进行检测。本次实验所用探针序列见表 2, 探针的标记方法参照 EMSA 探针生物素标记试剂盒(碧云天, GS008)。探针标记反应终止后, 上清即为被生物素标记的单链 DNA 探针。随后制备浓度 5.5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 进行蛋白与探针的上样电泳, 然后将聚丙烯酰胺凝胶电泳转移到尼龙膜上, 吸干膜上面的液体, 放入化学发光仪中, 加入配置好的化学发光液, 待反应 1 min 后, 吸尽多余的液体, 进行 ECL 发光检测。

表 2 EMSA 实验探针序列
Table 2 Probe sequences for EMSA

探针名称	原始序列
Probe name	Original sequence
标记探针	GACAACCTTAAGATTAATAAAAAGCTGTCTCAT
冷竞争探针	GACAACCTTAAGATTAATAAAAAGCTGTCTCAT
突变探针	GACAACCTTAAGACGGTCCGTAAGCTGTCTCAT

1.10 细胞转染实验

CDX2 过表达质粒和抑制剂购自武汉科谨生物科技有限公司, 并按照制造商的说明使用 Lipofectamine 2000 进行转染, 将质粒和 Lipofectamine 2000 分别溶于 DMEM 培养基中, 分别静置 10 min。然后轻轻混合, 在室温下静置 20 min, 随后缓慢转染到 Caco2 细胞中。转染后 48 h, 用 PBS 冲洗并加入 400 μM PA 和 2.5 μM 6-姜烯酚。根据实验需要, 收获相应处理的细胞进行后续实验。

1.11 免疫印迹检测

将细胞进行药物处理后, 倒掉培养基, 随后向每孔加入 180 μL 含苯甲基磺酰氟(PMSF)的冰裂解缓冲液, 冰上孵育 20 min, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 14 000 rpm 离心 10 min, 上清液即为细胞裂解物。使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定细胞裂解物的蛋白浓度。蛋白质经 SDS-PAGE 凝胶分离后转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后, 用一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 然后用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h。使用超敏 ECL 化学发光试剂盒蛋白条带显色, 置于凝胶成像仪的暗箱中进行化学发光, 使用 Image J 软件定量蛋白质条带的强度。

1.12 细胞免疫荧光实验

在 6 孔板中滴几滴完全培养基(DMEM), 并将盖玻片置于液滴上压紧, 随后向盖玻片上加入细胞悬液, 放入培养箱中培养 21 d 至完全分化, 再进行分组并加药处理。处理后, 将细胞在 4% 多聚甲醛中性 PBS 中固定 20 min, 并用 0.5% TritonX-100 处理 20 min, 然后用 5% 山羊血清处理 1 h。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用相应的一抗, 即 Claudin-1(1: 1 000, Abcam, ab211737)、Occludin(1: 100, Abcam, ab216327)或 ZO-1(1: 100, Abcam, ab221547)孵育细胞过夜。然后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 并与 Alexa Fluor 488 荧光二抗(1: 300,

Abcam, AB150077)再孵育1 h。在倒置BX-FM荧光显微镜下检查每组样品3个区域的荧光。细胞核用DAPI染色。使用Image J软件确定积分密度。

1.13 细胞跨上皮电阻值测定

将100 μL Caco-2细胞接种在24孔Transwell板中培养21 d, BL侧(下室)加入600 μL 的完全培养基(DMEM)。前7 d每隔1 d更换1次新鲜培养基,随后每天更换1次。分别在第3、7、11、16、21 d用Millicell-ERS-2伏特欧姆表测量TEER值,观察细胞单层的完整性。

1.14 跨膜转运标志物通透性的测定

选择FD-4作为细胞旁标记物,通过测量FD-4透过Caco-2细胞单层的量来测定细胞旁通透性,认为 $\text{Papp} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 是符合细胞单层膜形成的基础值。Caco-2细胞接种在24孔Transwell板中,于第3、7、11、16、21 d进行测量。将100 μL 1 mg/mL的FD-4添加在AP侧,600 μL D-Hanks缓冲液添加在BL侧,将细胞孵育2 h后从BL侧取出200 μL 溶液进行测定,用多功能酶标仪在激发波长480 nm,发射波长520 nm的条件下测定FD-4的荧光强度。表观渗透系数根据之前的研究进行计算^[31]。

1.15 ELISA法检测炎性因子的含量

提前打开制冰机,高速冷冻离心机提前设置为4 $^{\circ}\text{C}$,配制含有1 mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟)的细胞裂解液(裂解液:PMSF=100:1)。用含有苯甲磺酰氟(PMSF)的裂解缓冲液在冰上裂解Caco-2细胞20 min,然后在14 000 rpm和4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心10 min。收集所得上清液,使用朗顿生物科技有限公司的商用ELISA试剂盒定量检测TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的含量。

1.16 数据处理与统计分析

所有数据均采用SPSS 23.0软件进行分析,所有实验至少重复3次,数据以"均数 \pm 标准差(mean \pm SD)"表示,采用单因素方差分析(ANOVA)和邓肯检验来评估不同组间的显著差异, P 值 < 0.05 为差异有统计学意义。与对照组相比,*表示 $P < 0.01$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$,而 ns 表示无显著差异($P > 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 与miR-216a-5p结合的转录因子的鉴定

为揭示miR-216a-5p介导的6-姜烯酚缓解Caco2细胞紧密连接蛋白损伤的作用机制,我们参照Yusuke等方法^[32],进行了体外DNA pulldown实验并进行质谱(MS)采集,以确定与miR-216a-5p结合的转录因子。采用蛋白质组学技术对不同样本中的蛋白质进行了相对定量比较,筛选出差异表达的蛋白质,并进行后续的生物信息学分析(图1A)。如图1B所示,探针长度在2 000 bp左右,符合实验所需探针的理想长度,探针制备的电泳检测结果合格。随后,将生物素标记的探针与Caco2细胞的核提取物孵育,使用链霉亲和素珠进行亲和纯化后,对富集到的蛋白质进行银染色法检测(图1C),对照组和实验组探针富集的蛋白质有不同的条带,符合质谱制备条件,因此探针制备合格。最后用质谱法分析与生物素探针结合不同的蛋白质,如图1D所示,差异蛋白最终检测为157个。根据差异蛋白的定量信息计算不同蛋白之间的差异,依次将差异最小的蛋白归为一类,最终形成树型的蛋白聚类结构。筛选出的所有差异蛋白的层级聚类分析结果如图1E所示。每一列为一个样品,每一行为一个蛋白。

2.2 CDX2是miR-216a-5p的靶标

将DNA pulldown实验筛选出的差异蛋白通过JASPAR数据库进行评估,根据蛋白与miR-216a-5p启动子序列结合的评分,一共筛选得到7个得分在十左右(分数越高预测结果越可靠)且与肠道炎症研究相关的转录因子(表3),预测结果仍需做进一步验证^[33]。对于筛选出的转录因子,qRT-PCR结果显示,CDX2和FOSL2在PA和6-姜烯酚的处理下与miR-216a-5p表现出相似的趋势(图2A)。双荧光素酶报告基因实验表明,CDX2可以与miR-216a-5p启动子序列结合,并促进它转录表达(图2C)。随后用数据库预测可能的结合位点,选择得分最高的三个再次进行双荧光素酶实验,图2B为预测的三个结合位点的示意图,由于Target2与Target3距离相近,因此合并为Target2,从而明确miR-216a-5p启动子与CDX2之间的结合位点。双荧光素酶实验结果

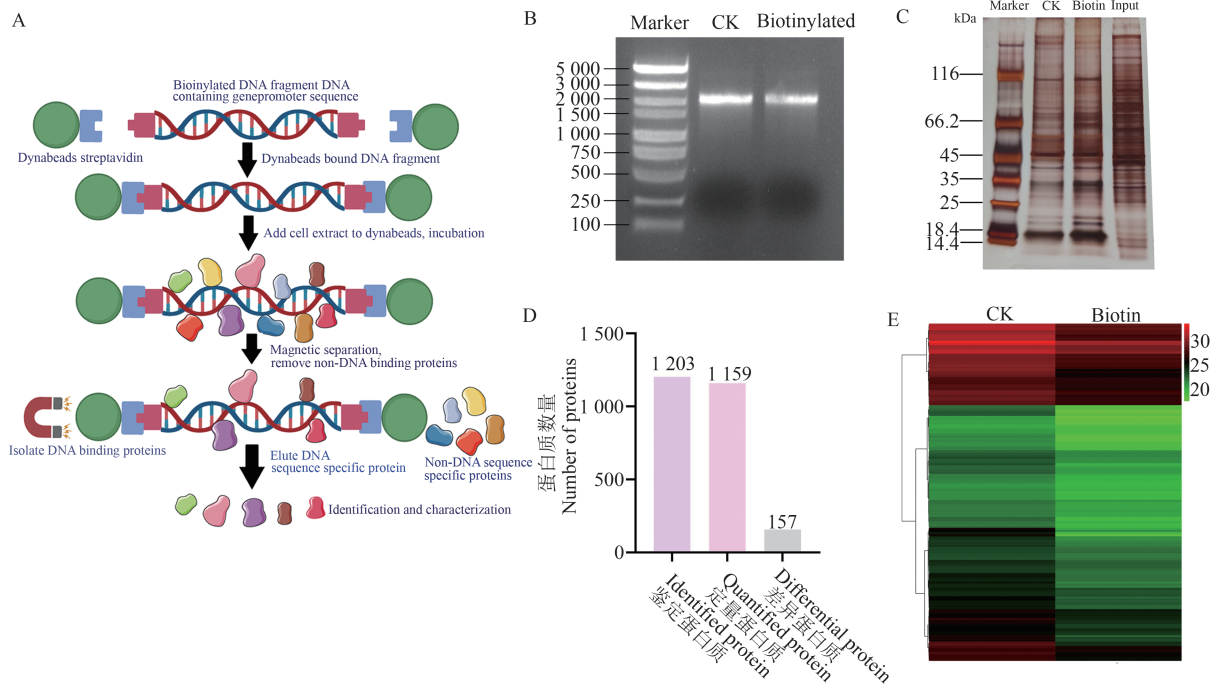


图 1 (A) 鉴定与 miR-216a-5p 结合的转录因子的工作流程示意图; (B) 探针的电泳凝胶图; (C) 蛋白银染色凝胶图; (D) 差异蛋白概览; (E) 差异蛋白聚类热图

Fig. 1 (A) Schematic diagram of the workflow for identifying transcription factors bound to miR-216a-5p; (B) Electrophoretic gel plot of the probe; (C) Silver-stained gel image; (D) Overview of differential proteins; (E) Differential protein clustering heat map

表 3 最终筛选出的差异蛋白
Table 3 Final identified differential proteins

名称 Name	预测分数 Score	开始位点 Start	结束位点 End	预测序列 Predicted sequence
CDX2	14.870 333	1 801	1 811	ATGTCATAAAA
TFAP2C	12.457 242	1 947	1 955	ACCTGAGGC
TCF7L1	15.529 654 5	1 658	1 669	AAACATCAAAGC
BHLHE40	11.009 176	1 957	1 966	GCCACGTGCC
SRF	13.747 984	974	991	AGGTGCCAAAAAGGGAG
FOSL2	9.452 135	618	629	TTGTGCCTCATA
SOX8	12.061 374	540	549	AGAACAATAT

表明, CDX2 与 miR-216a-5p 的 Target1 结合显著增加了 CDX2 报告基因的活性, ($P < 0.01$, 图 2D)。综上所述, 结合 DNA pulldown、qRT-PCR 和双荧光素酶检测, 我们发现 CDX2 是 miR-216a-5p 的直接靶标。

2.3 CDX2 与 miR-216a-5p 启动子结合

在初步确认了转录因子 CDX2 与 miR-215a-6p 启动子序列的结合位点之后, 通过体内 ChIP-PCR 实验与体外 EMSA 实验结合来验证 CDX2

与 miR-215a-6p 启动子序列的直接结合。在 ChIP 实验中, 将收集的 Caco2 细胞通过超声断裂染色质 (图 3B), 细胞在不同超声波条件处理后基因组电泳检测。经过免疫沉淀和 DNA 纯化后, 根据预测的靶位点设计检测引物, 分别设计了含有 CDX2 特异性结合位点序列和不含 CDX2 特异性结合位点序列的引物, 其中三对引物分别为为 PRO-1F/PRO-1R (绿色区域)、PRO-2F/PRO-2R (方框区域) 和 PRO-3F/PRO-3R (红色区域) (图 3A)。最后进行 PCR 扩增目的基因序

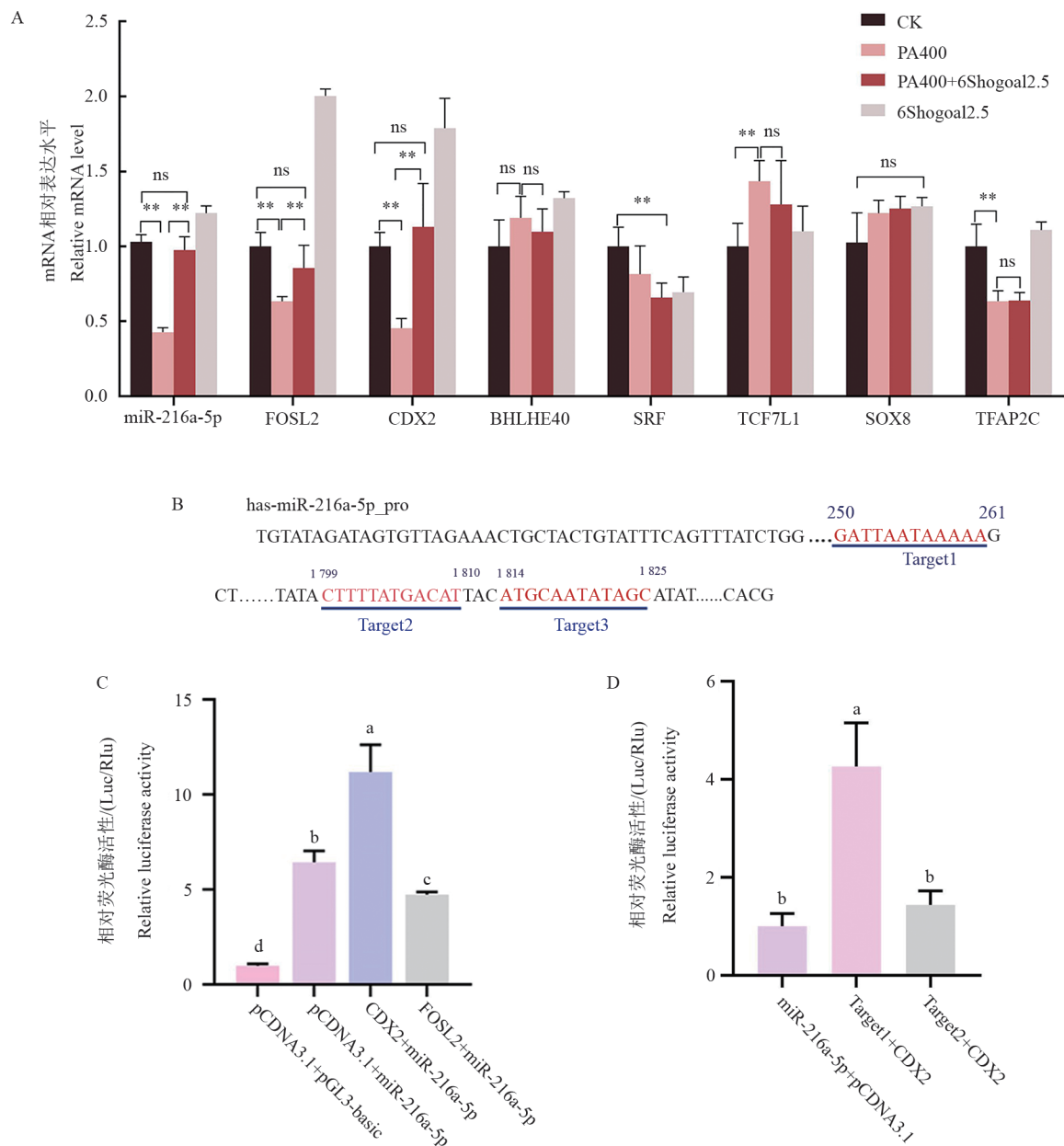


图 2(A) 转录因子与 miR-216a-5p 的 qRT-PCR 结果;(B)数据库预测结合位点示意图;(C)CDX2 与 FOSL2 的双荧光素酶实验结果;(D)CDX2 与结合位点结合结果
Fig. 2 (A) qRT-PCR results of transcription factors associated with miR-216a-5p; (B) Schematic diagram of binding sites predicted by database; (C) Dual-luciferase assay results of CDX2 and FOSL2; (D) Results of CDX2 binding to target sites

列,结果如图 3C 所示,阴性对照 IgG 实验组都无法扩增出目的条带,而 CDX2 抗体 IP 实验组中 PRO-2F/PRO-2R 可以正常扩增条带,而无特异性位点的引物则没有出现条带,定量检测结果如图 3D 所示,CDX2 可以与 miR-215a-6p 启动子序列在体内直接结合。EMSA 实验再次证实 CDX2 与 miR-215a-6p 启动子序列的体外直接结合(图 3F),没有核蛋白的对照组未见条带出现

(lane 1),CDX2 蛋白与实验所用的探针之间有相互作用(lane 3);未标记的探针作为特异性竞争探针,随着未标记探针加入量的增大,结合条带逐渐减弱(lane 4-5),进一步证明蛋白与探针之间是特异性结合;突变的探针加入量的增加并不能改变结合条带(lane 6-7)。这些实验结果表明,CDX2 可以在体外特异性结合 miR-215a-6p 启动子序列。

A TGTATAGATAGTGTAGAAACAGCTTACTCCTTGATACTTTGCTACTGTATTTTCAGTTTATCTGGCCTGTGGACT
 ATCTATCCACATTAATATAGCTTTGTTGCCAAAAACAACCTTTGTATCAGTTTCTTCCTTTTTCTTTTTAAATGCC
 ATCACAGCAACCCACTAAGGTAGGCAAGGCAGAAACGTATATGCTTTTGCTTCCATTGAGAGCCACCTCCCTG
 TGCAGTTGTGACATGACAACTTAAGATTAATAAAAAGCTGTCTCATCTCCACATCAGCATATGATGTTCCCA
 TTATGATCTTTTCTTAATGTTTCTAGCAGAGGGAAGAAGAACTACATACTCCTGTCACTTCTCTATGGTAACTT
 TTCACTATTAACCTTCTAGAGA GAAAGGAAAATCAAATATAAGATTAAGAGAAAAGAAAAACTGAACGTCA
 TTCATGTTGCTCTGAGAAGCCCTGTTTTTTGATTAAGATAAAATCTGCTTATTTTAAATCCTGAGCAATTTGACTC
 CAGAAAATAAACTTAGAACAATATTTAAAAAGTTAAATCCTAATGATGAGACATTCCTTATTTTACAAAAGTAGCT
 TTGTACTTAGGAGTCCATATGAGGCACAAGATTATATTCAATTGTTCTTTC

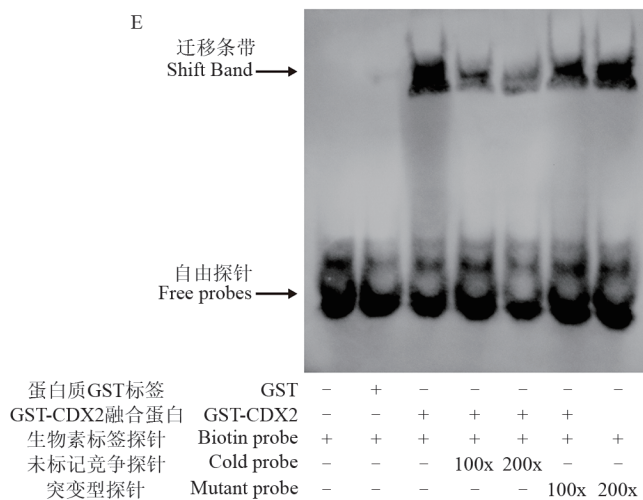
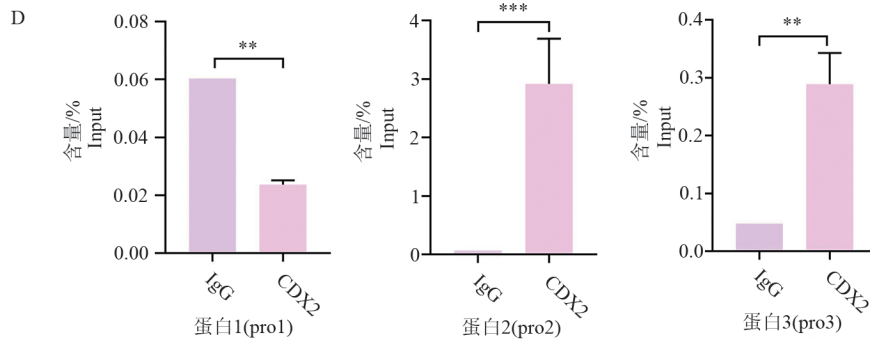
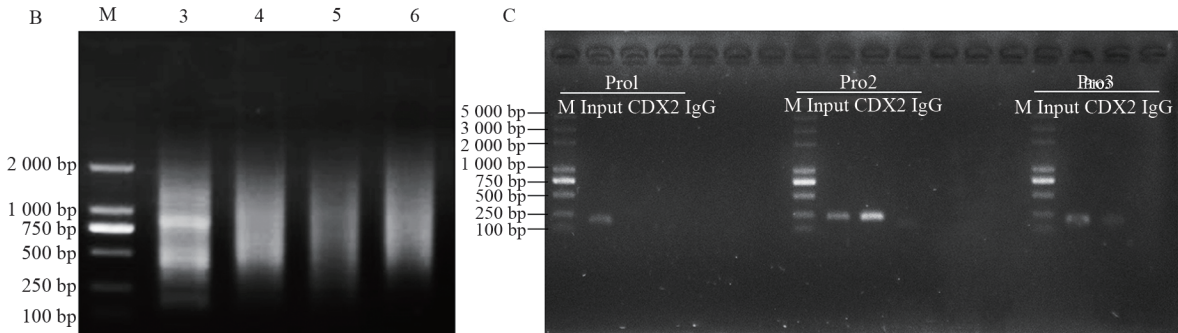


图 3 (A) 引物设计示意; (B) 细胞 DNA 片段电泳结果; (C) ChIP-PCR 结果; (D) ChIP 富集图; (E) EMSA 结果
 Fig. 3 (A) Schematic diagram of primer design; (B) Electrophoresis results of cellular DNA fragments; (C) ChIP-PCR results; (D) ChIP enrichment plots; (E) EMSA results

注: ns 表示在 $P < 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 处无显著差异。

Note: ns indicates no significant difference at $P < 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.4 CDX2介导6-姜烯酚对Caco-2细胞炎症的保护作用

通过qRT-PCR测定了IL-6, IL-1 β , TNF- α 的mRNA表达水平,验证CDX2是否介导6-姜烯酚对Caco-2细胞炎症的保护作用。(图4A-C)。siControl阴性对照组与CK组无显著性差异($P>0.05$),CDX2的沉默组IL-1 β ($P<0.001$)、IL-6($P<0.01$)和TNF- α ($P<0.01$)的含量均明显高于6-姜烯酚处理组,分别增加了61.22%、27.62%和

37.09%。这3种炎症因子使6-姜烯酚在炎症中无法起到保护效果。接下来通过ELISA实验测定了促炎因子IL-6, IL-1 β , TNF- α 的含量,发现促炎因子IL-6, IL-1 β , TNF- α 含量与mRNA表达水平趋势相似,如图4D-E所示,siControl阴性对照组与CK组无显著性差异($P>0.05$),CDX2的沉默组IL-1 β ($P<0.001$)、IL-6($P<0.001$)和TNF- α ($P<0.001$)的含量均明显高于6-姜烯酚处理组,分别增加了87.10%、41.70%和14.30%。说明CDX2的沉默会抑制6-姜烯酚的保护效果。

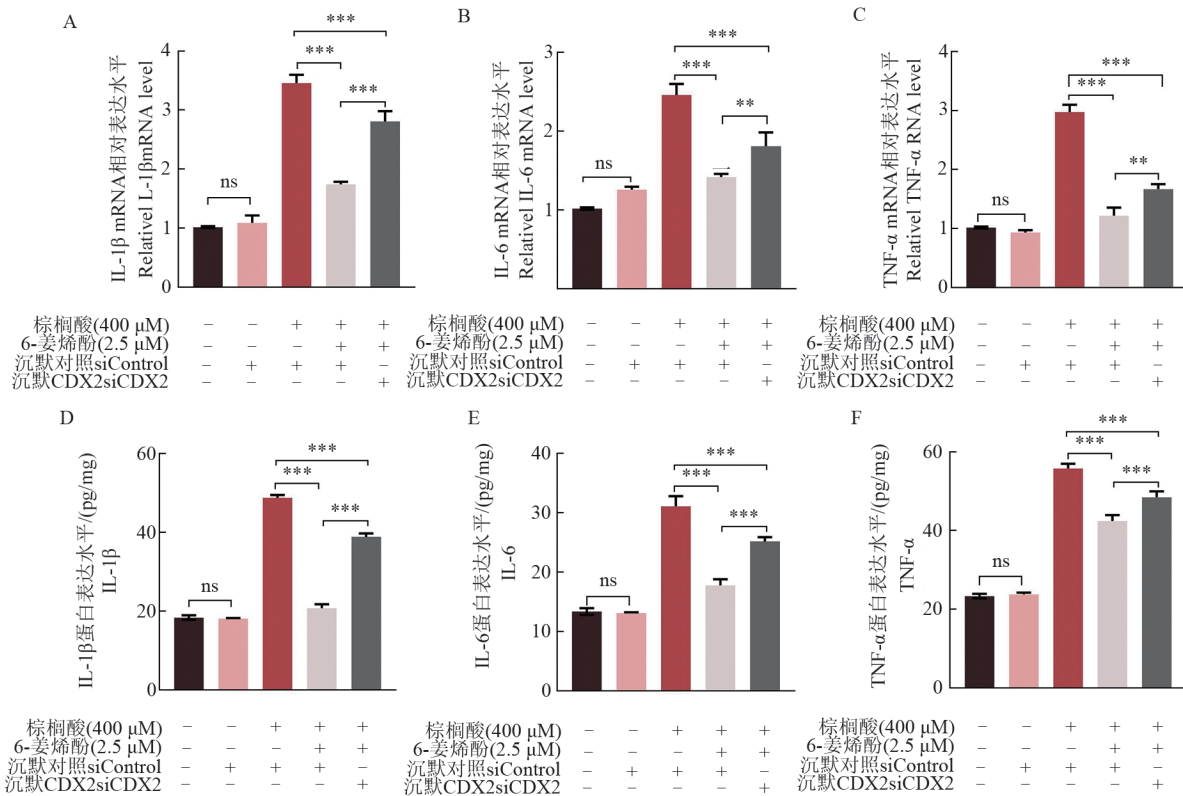


图4 CDX2对促炎细胞因子的影响:(A) IL-6 mRNA水平;(B) IL-1 β mRNA水平;(C) TNF- α mRNA水平;(D) IL-6蛋白水平;(E) IL-1 β 蛋白水平;(F)TNF- α 蛋白水平

Fig. 4 Effect of CDX2 on pro-inflammatory cytokines: (A) IL-6 mRNA level; (B) IL-1 β mRNA level; (C) TNF- α mRNA level; (D) IL-6 protein level; (E) IL-1 β protein level; (F) TNF- α protein level

注:ns表示 $P>0.05$,差异无统计学意义; * $P<0.05$,差异显著; ** $P<0.01$,差异极显著; *** $P<0.001$,差异极其显著。

Note: ns indicates $P>0.05$, the difference is not statistically significant; * $P<0.05$, the difference is significant; ** $P<0.01$, the difference is highly significant; *** $P<0.001$, the difference is extremely significant.

2.5 CDX2介导6-姜烯酚对Caco-2细胞TJ损伤的保护作用

通过蛋白质免疫印迹和细胞免疫荧光实验进一步探究CDX2在保护紧密连接蛋白中的作用,用siCDX2转染Caco-2细胞,测定TEER、FD-4通量和TJs的变化。与6-姜烯酚和PA联合治

疗组相比,CDX2抑制剂显著降低TEER值($P<0.001$),增加FD-4通量(图5A-D),并抑制了细胞中Claudin-1, Occludin和ZO-1蛋白的表达(图6A-D)。为了更直观地观察CDX2对TJ蛋白表达情况的影响,又通过细胞免疫荧光实验观察了Claudin-1、Occludin、ZO-1蛋白的定位和分布。

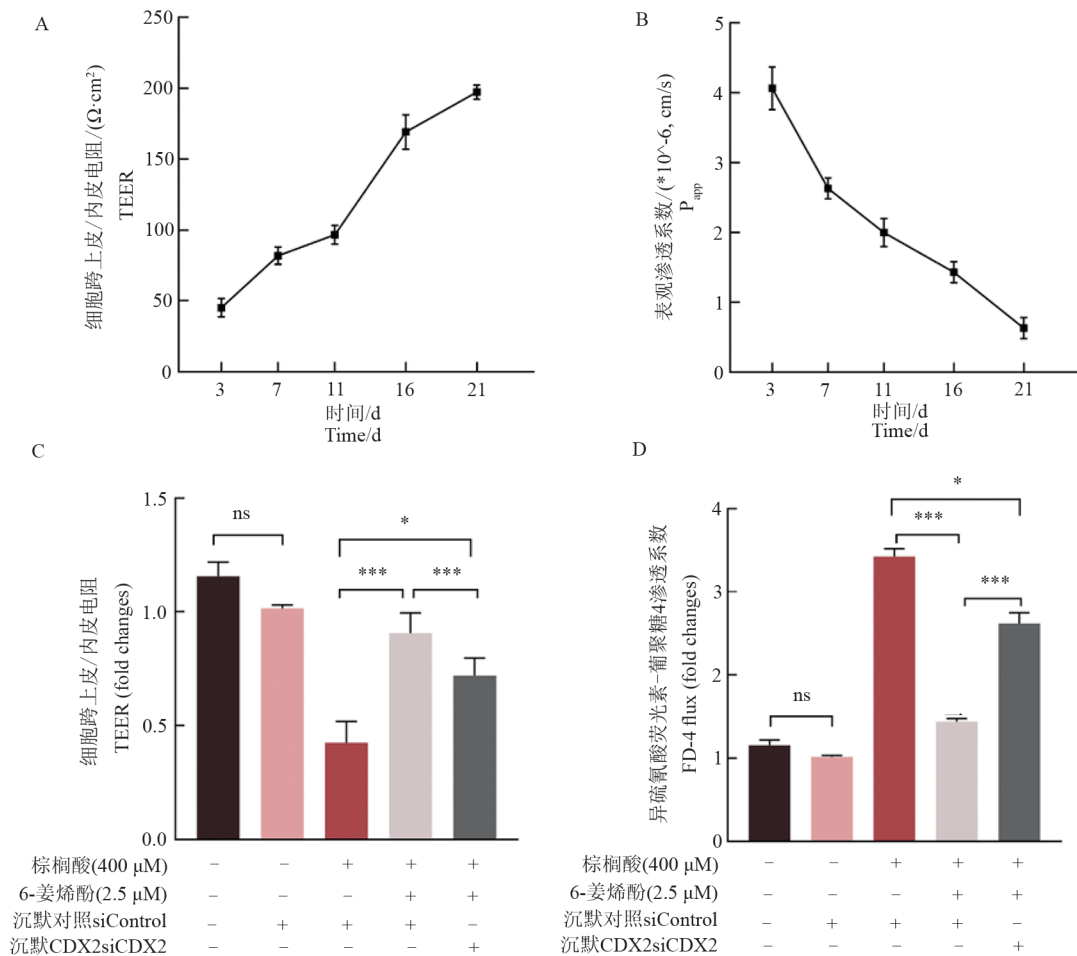


图 5 (A)Caco-2 细胞建模过程中的跨上皮电阻(TEER)变化;(B)Caco-2 细胞建模过程中的 FD-4 通量变化;(C)CDX2 对 Caco-2 单层细胞中 TEER 的影响;(D)CDX2 对 Caco-2 单层细胞中 FD-4 通量的影响

Fig. 5 (A) Changes in transepithelial electrical resistance (TEER) during Caco-2 cell modeling; (B) FD-4 flux changes during Caco-2 cell modeling; (C) Effect of CDX2 on TEER in Caco-2 monolayers; (D) Effect of CDX2 on FD-4 flux in Caco-2 monolayers

注:ns 表示在 $P < 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 处无显著差异。

Note: ns indicates no significant difference at $P < 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

如图 6E-H 所示,与蛋白免疫印迹实验结果相一致,siControl 阴性对照组与 CK 组无显著性差异,当加入 siCDX2 后,可以明显看出的 Claudin-1 ($P < 0.001$)、Occludin ($P < 0.001$)、ZO-1 ($P < 0.001$) 蛋白的红色荧光强度相比 6-姜烯酚和 PA 联合治疗组处理组有所减弱,分别降低了 34.87%, 29.47% 和 32.42%。因此,通过细胞免疫荧光实验辅助证明 miR-216a-5p 介导 6-shogaol 对 PA 诱导的 TJ 蛋白损伤的修复作用。

3 讨论

维持肠道上皮细胞紧密连接的完整性和功

能对于保持肠道稳态至关重要,通过保护肠道屏障功能可以有效预防和干预肠道屏障功能紊乱相关的疾病。大量证据表明,肠道紧密连接损伤与肠道炎症密切相关^[34,35]。之前的研究也发现,PA 可以通过不同机制诱导炎症反应,影响肠道上皮细胞的完整性和通透性^[36],降低紧密连接相关蛋白的表达^[37]。前期研究中确定 6-姜烯酚的无毒性效应剂量为 0-2.5 μM,棕榈酸的无毒性效应剂量为 0-400 μM,因此我们在实验中选择 400 μM PA 建立无毒性剂量下的 TJ 蛋白损伤模型,用 2.5 μM 6-shogaol 进行干预^[28]。

近年来,使用天然活性成分替代临床药物已

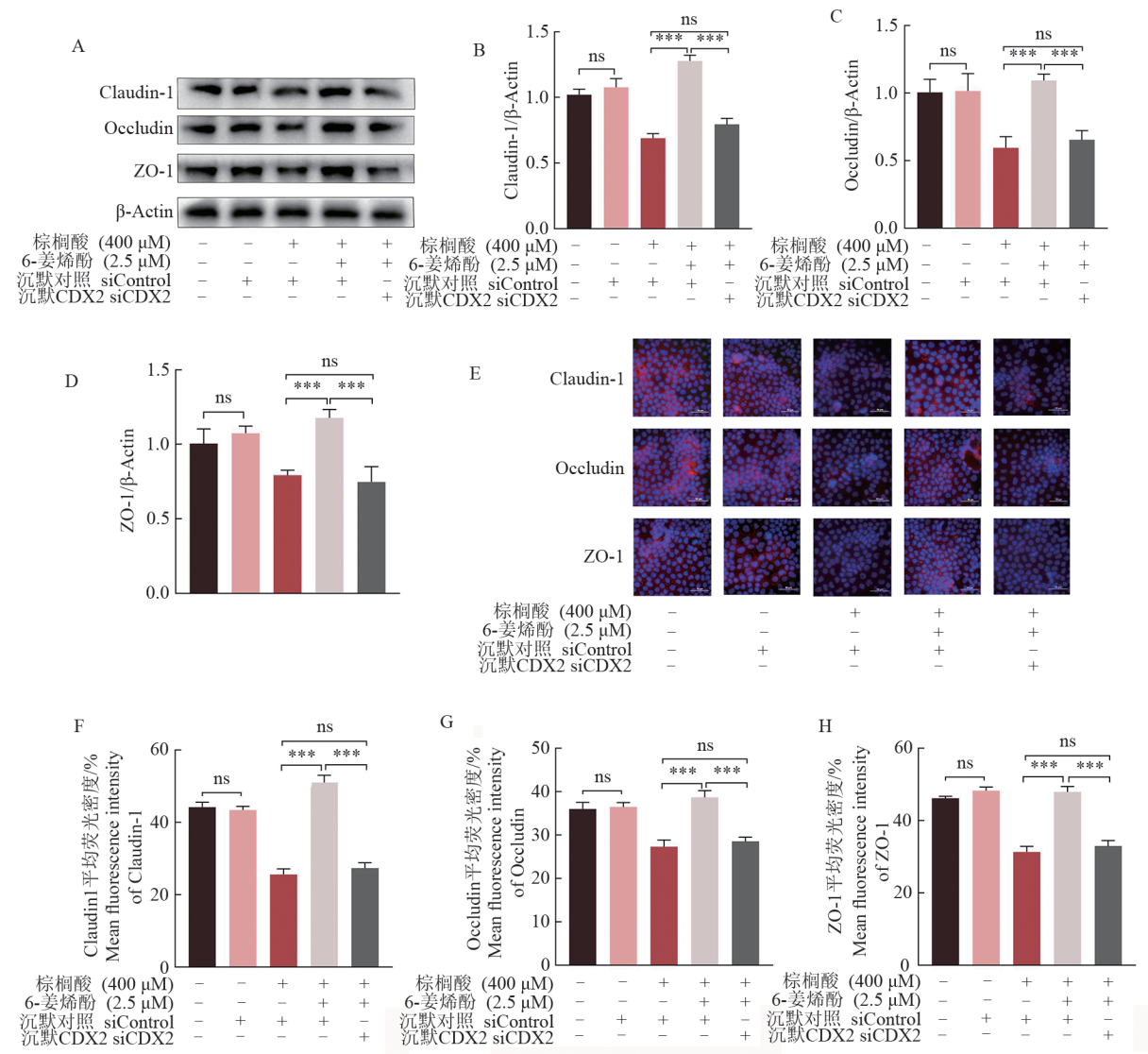


图 6 (A-D) CDX2 对 Caco-2 细胞中 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 蛋白表达的影响。(E-H) CDX2 对 Caco-2 细胞中 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 蛋白分布和表达的影响

Fig. 6 (A-D) Effect of CDX2 on Claudin-1, Occludin, and ZO-1 protein expression in Caco-2 cells; (E-H) Effect of CDX2 on the distribution and expression of Claudin-1, Occludin and ZO-1 proteins in Caco-2 cells

注: ns 表示在 $P < 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 处无显著差异。
 Note: ns indicates no significant difference at $P < 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

经成为改善人类健康的有效策略。肠道作为消化和吸收的主要器官,与食物密切接触^[38],因此服用膳食是一种行之有效的调节肠道健康的方法。研究表明,在姜酚衍生的酚类化合物中,6-姜烯酚具有最强的抗炎活性^[39, 40]。欧阳等人发现 6-姜烯酚通过 miR-216a-5p/TLR4/NF-κB 轴调节 TJ 相关蛋白的表达,从而减轻 PA 诱导的 Caco-2 细胞紧密连接损伤和肠屏障功能障碍^[28]。然而,6-姜烯酚如何调节 miR-216a-5p 表达的具体机制仍不清楚。基于此,我们筛选了与 miR-

216a-5p 启动子结合的转录因子 CDX2 并进行了验证,发现它可以促进 miR-216a-5p 的转录表达;并进一步验证了沉默 CDX2 对 Caco2 细胞紧密连接蛋白和促炎因子产生的影响。

越来越多的证据表明,CDX2 与肠道疾病有关^[41, 42]。作为一种肠道特异性转录因子,CDX2 在调节与肠道细胞增殖和分化相关的基因表达方面发挥着关键作用,并且对隐窝和绒毛的发育至关重要^[43]。此外,CDX2 还被发现是炎症细胞因子的下游靶标,其在发炎组织中的表达降

低^[44, 45]。总之,这些研究表明 CDX2 可能是肠道紧密连接的关键参与者。在本研究中,DNA pulldown 实验和 qRT-PCR 实验结果表明 PA 处理会降低 CDX2 的表达,而 6-姜烯酚处理则会提高其水平,其趋势与 miR-216a-5p 相似,表明 miR-216a-5p 和 CDX2 之间可能存在结合。随后,免疫印迹分析实验表明 PA 调了 TJ 蛋白(如 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1)的表达,而 6-姜烯酚处理则上调了这些蛋白的表达。然而,CDX2 沉默后,6-姜烯酚的这种保护作用又会受到抑制,这与前人发现的 CDX2 通过直接结合 Claudin-1 启动子调控其转录^[46]以及影响 ZO-1 表达水平^[47]的结论相吻合。这表明 CDX2 可能是 6-姜烯酚对 miR-216a-5p 调控作用中的关键调节因子。在肠道通透性和免疫荧光中观察到的结果,进一步证实了沉默 CDX2 会削弱 6-姜烯酚缓解 PA 诱导的 TJ 损伤的能力,这与前期课题组实验中抑制 miR-216a-5p 表达的结果一致^[28],基于此,我们认为 6-姜烯酚通过提高 CDX2 的表达水平调控 miR-216a-5p,从而发挥对肠道紧密连接的保护作用。研究首次证实,6-姜烯酚通过激活 CDX2 促进 miR-216a-5p 的转录,拓展了天然产物功能研究的理论框架。此外,CDX2 作为肠道特异性转录因子,其表达受 PA 抑制而被 6-姜烯酚恢复,提示 CDX2 可能是肠道屏障保护的核心靶点,丰富了 CDX2 的调控网络。

4 结论

6-姜烯酚可以上调 CDX2 的表达,进而促进 miR-216a-5p 的转录,增强其对 PA 诱导的 Caco-2 细胞炎症和紧密连接损伤的保护作用。此外,我们还确定了 CDX2 在 miR-216a-5p 启动子上的结合位点(-GATTAATAAAAA),证实了 CDX2 可以直接与 miR-216a-5p 启动子结合。这些发现为了解 6-姜烯酚缓解炎症性肠病的机制提供了新视角。

参考文献

- [1] Günzel D, Yu A S. Claudins and the modulation of tight junction permeability [J]. *Physiological Reviews*, 2013,93(2):525-569.
- [2] Ishimoto H, Oshima T, Sei H, et al. Claudin-2 expression is upregulated in the ileum of diarrhea predominant irritable bowel syndrome patients [J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2017, 60(2):146-150.
- [3] Yang W, Guo Y, Lu J, et al. Differential gene expression of tight-junction proteins and their correlation with PRSS8 and prognosis in colorectal cancer [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2021, 39 (15_suppl):e15548.
- [4] Wang K, Ding Y, Xu C, et al. Cldn-7 deficiency promotes experimental colitis and associated carcinogenesis by regulating intestinal epithelial integrity [J]. *OncoImmunology*, 2021, 10(1):1923910.
- [5] Jiang S, Miao Z. High-fat diet induces intestinal mucosal barrier dysfunction in ulcerative colitis: emerging mechanisms and dietary intervention perspective [J]. *American Journal of Translational Research*, 2023, 5(2):653-677.
- [6] Opie L H, Walfish P G. Plasma free fatty acid concentrations in obesity [J]. *The New England Journal of Medicine*, 1963, 268:757-760.
- [7] Bonhomme C, Duluc I, Martin E, et al. The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development [J]. *Gut*, 2003, 52(10):1465-1471.
- [8] Saad R S, Ghorab Z, Khalifa M A, et al. CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations [J]. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2011, 3(11):159-166.
- [9] Zhu H T, Luo J, Peng Y, et al. Nitazoxanide protects against experimental ulcerative colitis through improving intestinal barrier and inhibiting inflammation [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2024, 395:111013.
- [10] Funakoshi S, Kong J, Crissey M A, et al. Intestine-specific transcription factor Cdx2 induces E-cadherin function by enhancing the trafficking of E-cadherin to the cell membrane [J]. *American Journal of Physiology*, 2010, 299(5):G1054-67.
- [11] Boyd M, Hansen M, Jensen T G, et al. Genome-wide analysis of CDX2 binding in intestinal epithelial cells (Caco-2) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(33):25115-25125.
- [12] Mukohyama J, Koizumi M, Yamashita K, et al. Knockdown of CDX2 induces microRNA-221 up-regulation in human colon cancer cells [J]. *Anticancer Research*, 2024, 44(8):3553-3556.
- [13] Taucher V, Mangge H, Haybaeck J. Non-coding RNAs in pancreatic cancer: challenges and opportunities for clinical application [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2016, 39(4):295-318.

- [14] Liu A M, Poon R T, Luk J M. MicroRNA-375 targets Hippo-signaling effector YAP in liver cancer and inhibits tumor properties [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 394(3):623-627.
- [15] Chandra Mangalhara K, Manvati S, Saini S K, et al. ERK2-ZEB1-miR-101-1 axis contributes to epithelial-mesenchymal transition and cell migration in cancer [J]. *Cancer Letters*, 2017, 391:59-73.
- [16] Salem M, O'Brien J A, Bernaudo S, et al. miR-590-3p promotes ovarian cancer growth and metastasis via a novel FOXA2-versican pathway [J]. *Cancer Research*, 2018, 78(15):4175-4190.
- [17] Piché M E, Tchernof A, Després J P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases [J]. *Circulation Research*, 2020, 126(11):1477-1500.
- [18] Tanaka K, Arita M, Sakurai H, et al. Analysis of chemical properties of edible and medicinal ginger by metabolomics approach [J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015(1):671058.
- [19] Prasad S, Tyagi A K. Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer [J]. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, 2015(1):142979.
- [20] Kamaruddin M S H, Chong G H, Mohd Daud N, et al. Bioactivities and green advanced extraction technologies of ginger oleoresin extracts: A review [J]. *Food Research International*, 2023, 164:112283.
- [21] Schwertner H A, Rios D C. High-performance liquid chromatographic analysis of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol in ginger-containing dietary supplements, spices, teas, and beverages [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 856(1-2):41-47.
- [22] Foudah A I, Shakeel F, Yusufoglu H S, et al. Simultaneous determination of 6-shogaol and 6-gingerol in various ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts and commercial formulations using a green RP-HPTLC-Densitometry method [J]. *Foods*, 2020, 9(8):1136.
- [23] Kou X, Li X, Rahman M R, et al. Efficient dehydration of 6-gingerol to 6-shogaol catalyzed by an acidic ionic liquid under ultrasound irradiation [J]. *Food Chemistry*, 2017, 215:193-199.
- [24] Han Q, Yuan Q, Meng X, et al. 6-Shogaol attenuates LPS-induced inflammation in BV2 microglia cells by activating PPAR- γ [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26):42001-42006.
- [25] Wu H, Hsieh M-C, Lo C-Y, et al. 6-Shogaol is more effective than 6-gingerol and curcumin in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion in mice [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(9):1296-1306.
- [26] Pan M-H, Hsieh M-C, Hsu P-C, et al. 6-Shogaol suppressed lipopolysaccharide-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2008, 52(12):1467-1477.
- [27] Moon M, Kim H G, Choi J G, et al. Corrigendum to "6-Shogaol, an active constituent of ginger, attenuates neuroinflammation and cognitive deficits in animal models of dementia" [BBRC 449 (2014) 8-13] [J]. *Biochem and Biophys Research Communication*, 2020, 521(2):545.
- [28] Ouyang F, Li B, Wang Y, et al. Attenuation of palmitic acid-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by 6-shogaol in Caco-2 cells: the role of MiR-216a-5p/TLR4/NF- κ B axis [J]. *Metabolites*, 2022, 12(11): 1028.
- [29] Sui H, Imamichi T. A DNA pull-down assay with diversity forms of competitor for detecting or evaluating Protein-DNA interactions [M]. *SIMOE-COSTA M. DNA-Protein Interactions: Methods and Protocols*. New York, NY; Springer US. 2023: 1-10.
- [30] Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, et al. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3 [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6006.
- [31] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991, 175(3): 880-885.
- [32] Kawashima Y, Watanabe E, Umeyama T, et al. Optimization of data-independent acquisition mass spectrometry for deep and highly sensitive proteomic analysis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(23):5932.
- [33] Fornes O, Castro-Mondragon J A, Khan A, et al. JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1):D87- D92.
- [34] Cani P D, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced

- inflammation in High-Fat Diet-Induced obesity and diabetes in mice [J]. *Diabetes*, 2008, 57(6):1470-1481.
- [35] Gulhane M, Murray L, Lourie R, et al. High fat diets induce colonic epithelial cell stress and inflammation that is reversed by IL-22 [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1):28990.
- [36] Gori M, Altomare A, Cocca S, et al. Palmitic acid affects intestinal epithelial barrier integrity and permeability in vitro [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(5): 417.
- [37] Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, et al. Mechanism of IL-1 β -Induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability [J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 180(8):5653-5661.
- [38] Fan H, Wu J, Yang K, et al. Dietary regulation of intestinal stem cells in health and disease [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2023, 74(7):730-745.
- [39] Luettig J, Rosenthal R, Lee I-F M, et al. The ginger component 6-shogaol prevents TNF- α -induced barrier loss via inhibition of PI3K/Akt and NF- κ B signaling [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, 60(12): 2576-2586.
- [40] Suzuki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions [J]. *Animal Science Journal*, 2020, 91(1):e13357.
- [41] Coskun M. The role of CDX2 in inflammatory bowel disease [J]. *Dan Med J*, 2014, 61(3):B4820.
- [42] Ilie-Petrov A C, Cristian D A, Grama F A, et al. Evaluation of the immunohistochemical scoring system of CDX2 expression as a prognostic biomarker in colon cancer [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2024, 14(10):1023.
- [43] 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]. *Developmental Cell*, 2010, 19(5):713-726.
- [44] Calon A, Gross I, Lhermitte B, et al. Different effects of the Cdx1 and Cdx2 homeobox genes in a murine model of intestinal inflammation [J]. *Gut*, 2007, 56(12):1688-1695.
- [45] Verzi M P, Shin H, San Roman A K, et al. Intestinal master transcription factor CDX2 controls chromatin access for partner transcription factor binding [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2013, 33(2):281-292.
- [46] Bhat A A, Sharma A, Pope J, et al. Caudal homeobox protein Cdx-2 cooperates with Wnt pathway to regulate claudin-1 expression in colon cancer cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e37174.
- [47] Zhu H T, Luo J, Peng Y, et al. Nitazoxanide protects against experimental ulcerative colitis through improving intestinal barrier and inhibiting inflammation [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 395:111013.