

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.20.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 20-0020-08

KLF5 在脱氧胆酸诱导胃黏膜 肠上皮化生中的作用 *

孙杰¹, 付立芳²

(1. 山东医学高等专科学校 中医学教研室 山东 临沂 276000; 2. 山东省临沂市
中医医院 呼吸内科, 山东 临沂 276002)

摘要: **目的** 探究 Krüppel 样因子 5 (KLF5) 是否参与脱氧胆酸 (DCA) 诱导的胃黏膜肠上皮化生及其可能的作用机制。 **方法** 收集正常胃黏膜和肠上皮化生组织, 用不同浓度 DCA (100、200 和 500 $\mu\text{mol/L}$) 处理胃黏膜上皮 GES-1 细胞, Western blot 和实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 KLF5 和 Wnt3a 的表达。将 GES-1 细胞分为空白对照组、DCA 组、阴性对照组及 KLF5 沉默组, 分别用 MTT 法检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, Western blot 和 qRT-PCR 检测 TFF2、VIL1 和 CDX2 的表达。用氯化锂 LiCl (Wnt 通路激活剂) 处理 si-KLF5 转染的细胞, 检测各组细胞中 Wnt3a、 β -catenin 和 CDX2 的表达。 **结果** 与正常胃黏膜相比, 肠上皮化生组织中 KLF5 和 Wnt3a 的表达上升。随着 DCA 浓度增加, GES-1 细胞中 KLF5 和 Wnt3a 的表达逐渐升高。500 $\mu\text{mol/L}$ DCA 处理 GES-1 细胞后, 细胞的增殖能力提高, 凋亡率降低, TFF2、VIL1 和 CDX2 的表达升高, 而 si-KLF5 转染使细胞增殖能力降低, 凋亡率升高, TFF2、VIL1 和 CDX2 的表达降低, 抑制 DCA 对 GES-1 细胞的作用。另外, LiCl 能减弱 DCA 处理后 si-KLF5 转染对细胞中 Wnt3a、 β -catenin 和 CDX2 表达的影响。 **结论** KLF5 可能通过激活 Wnt 通路, 促进 DCA 诱导的胃黏膜肠上皮化生。

关键词: Krüppel-Like Factor 5; 脱氧胆酸; 肠上皮化生; Wnt/ β -catenin

中图分类号: R573

文献标识码: A

KLF5 promotes DCA-induced intestinal metaplasia of gastric mucosa by activating Wnt pathway*

Jie Sun¹, Li-fang Fu²

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Shandong Medical College, Linyi, Shandong 276000,
China; 2. Department of Respiratory Medicine, Chinese Medicine Hospital in Linyi City,
Linyi, Shandong 276002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of Krüppel-like factor 5 (KLF5) in the process of deoxycholic acid (DCA)-induced intestinal metaplasia of gastric mucosa and its potential mechanism. **Methods** The expressions of KLF5 and Wnt3a in GES-1 cells treated with different concentrations of DCA, normal gastric mucosa and intestinal metaplasia tissues were detected by Western blot and RT-PCR. GES-1 cells were divided into blank control group, DCA group, DCA+si-Cont group and DCA+si-KLF5 group. Then the cell proliferation ability and apoptosis were detected by MTT assay and flow cytometry, respectively. The expressions of TFF2, VIL1 and CDX2 were detected by Western blot and RT-PCR. Furthermore, the protein expression levels of Wnt3a, β -catenin and CDX2 in si-KLF5

收稿日期: 2017-11-16

* 基金项目: 山东省教育厅课题 (No: J13LK56); 山东省临沂市科技发展计划项目 (No: 201515053)

transfected GES-1 cells were detected after treatment with LiCl (Wnt activator) by Western blot. **Results** The expression levels of KLF5 and Wnt3a were significantly increased in the intestinal metaplasia tissues compared with the normal gastric mucosa tissues, they were also increased gradually with the increase of DCA concentration in the GES-1 cells. In addition, the increased cell proliferation ability, the decreased cell apoptosis rate and the elevated expressions of TFF2, VIL1 and CDX2 were detected in the GES-1 cells after treatment with 500 $\mu\text{mol/L}$ DCA. However, the cell proliferation was decreased, the cell apoptosis was increased and the expressions of TFF2, VIL1 and CDX2 were downregulated in the GES-1 cells after transfection with si-KLF5, which attenuated the effect of DCA. Furthermore, Wnt activator LiCl attenuated the effect of si-KLF5 on the expressions of Wnt3a, β -catenin and CDX2 in the DCA-induced cells. **Conclusions** KLF5 may promote the DCA-induced intestinal metaplasia of gastric mucosa by activating the Wnt pathway.

Keywords: Krüppel-like factor 5; DCA; intestinal metaplasia; Wnt/ β -catenin

胃癌的发生、发展是一个渐进过程,从正常胃黏膜、肠上皮化生、异型增生向胃癌的发生、发展进程中有多种基因的参与^[1]。含有胆汁酸的胃十二指肠反流引起的胃黏膜慢性炎症,进而发生胃黏膜肠上皮化生^[2]。目前有研究表明,Krüppel样因子5(Krüppel-like factor 5, KLF5)在慢性胃炎和肠上皮化生的表达与正常对照组相比,呈上升趋势^[3-4]。因此,本文通过脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)诱导胃黏膜上皮细胞,探究KLF5是否参与DCA诱导的肠上皮化生的发生及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胃黏膜上皮细胞 GES-1 (中国科学院上海细胞库)。选取山东省临沂市中医医院 2012 ~ 2015 年的 56 例胃黏膜标本,其中 30 例正常胃黏膜,26 例肠上皮化生。本研究经本院医学伦理委员会批准,并与患者签署知情同意书。鼠抗 KLF5、TFF2、VIL1、CDX2、Wnt3a、 β -catenin、多克隆抗体、 β -actin 鼠抗单克隆抗体、羊抗鼠二抗(HRP)购自英国 Abcam 公司,MTT、二甲基亚砜、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 正常胃黏膜和肠上皮化生组织的选取 正常胃黏膜 30 例,其中,男性 13 例,女性 17 例;肠上皮化生 26 例,其中,男性 16 例,女性 10 例。以上组织均置于 -80°C 中保存,用于提取蛋白和 mRNA。

1.2.2 胃黏膜上皮细胞的培养和转染 GES-1 细胞

在含 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养基中培养,置于 37°C 、5% 二氧化碳 CO_2 孵箱中生长。将细胞分为两组,应用 1 mol/L 氯化氢调定培养基 pH 值至 7.2,采用不同浓度(100、200 和 500 $\mu\text{mol/L}$)的 DCA 处理细胞 12 h,置于 37°C 、5% CO_2 孵箱中孵育。空白对照组为不含 DCA 的 RPMI 1640 培养液,继续培养 12 h。

1.2.3 细胞转染 将 GES-1 细胞分为空白对照组、DCA 组、阴性对照组及 KLF5 沉默组。细胞长至 50% ~ 60% 密度时,分别将 KLF5 siRNA 和阴性序列对照按 50 nmol/L 浓度转染 GES-1 细胞,24 h 后更换为不含双抗的 RPMI 1640 培养液,并加入 500 $\mu\text{mol/L}$ DCA 或者溶剂对照(Veh)处理细胞,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中继续培养 24 h,观察细胞感染情况。用 Western blot 检测验证 KLF5 沉默的效率。

1.2.4 MTT 法 MTT 法检测细胞增殖。按分组收集转染 48 h 后的 GES-1 细胞,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗后加入 MTT, 37°C 温育 4 h,加入二甲基亚砜 150 μl /孔,将培养板置于微孔板振荡器上振荡 10 min,使结晶物溶解,用酶标仪在 570 nm 处测吸光度值。

1.2.5 流式细胞术 按分组收集转染 48 h 后的 GES-1 细胞, PBS 清洗,参照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书,在流式细胞仪上检测细胞凋亡。

1.2.6 Western blot 检测 分别取正常胃黏膜、肠上皮化生组织,以及 DCA 处理 GES-1 细胞样品,提取总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜,5% 脱脂奶粉封闭, 4°C 条件下用抗 KLF5、Wnt3a 和 β -actin (均为 1 : 300) 的一抗孵育过夜, PBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次,最后用增强化学发光法

发光液在暗室曝光并压片。将 GES-1 细胞分为空白对照组、DCA 组、阴性对照组及 KLF5 沉默组, 按分组收集转染 48 h 后的 GES-1 细胞, 按照上述方法检测 TFF2、VIL1 和 CDX2 蛋白的表达。将 GES-1 细胞分为空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组、氯化锂 LiCl (Wnt 通路激活剂) 组及 LiCl+KLF5 沉默组, 按分组收集转染 48 h 后的 GES-1 细胞, 按照上述方法检测 Wnt3a、 β -catenin 和 CDX2 蛋白的表达。

1.2.7 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 分别取正常胃黏膜、肠上皮化生组织, 以及 DCA 处理 GES-1 细胞样品。采用 Trizol 法分别提取总 RNA, 并检测其纯度及完整性。按照逆转录试剂盒说明书生成 cDNA, 扩增 cDNA, 基因扩增成功后, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 对 KLF5 和 Wnt3a 的含量进行分析。将 GES-1 细胞分为空白对照组、DCA 组、阴性对照组及 KLF5 沉默组, 按分组收集转染 48 h 后的 GES-1 细胞, 按照上述方法检测 TFF2、VIL1 和 CDX2 mRNA 的表达。将 GES-1 细胞分为空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组、LiCl 组及 LiCl+KLF5 沉默组, 按分组收集转染 48 h 后的 GES-1 细胞, 按照上述方法检测 Wnt3a、 β -catenin 和 CDX2 mRNA 的表达。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或单因素方差分析, 两两比较用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KLF5 和 Wnt3a 在肠上皮化生组织中异常表达

2.1.1 KLF5 和 Wnt3a 蛋白 肠上皮化生组织中 KLF5 和 Wnt3a 蛋白相对表达量分别为 (2.37 ± 0.06) 和 (2.32 ± 0.07); 正常胃黏膜中 KLF5 和 Wnt3a 蛋白相对表达量分别为 (1.02 ± 0.08) 和 (1.00 ± 0.07)。两组 KLF5 和 Wnt3a 蛋白表达水平比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 80.350$ 和 98.002 , 均 $P = 0.000$), 肠上皮化生组织中 KLF5 和 Wnt3a 蛋白表达升高。见图 1。

2.1.2 KLF5 和 Wnt3a mRNA 肠上皮化生组织中 KLF5 和 Wnt3a mRNA 相对表达量分别为 (2.14 ± 0.06) 和 (2.22 ± 0.07); 正常胃黏膜中 KLF5

和 Wnt3a mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.06) 和 (1.00 ± 0.08)。两组 KLF5 和 Wnt3a mRNA 表达水平比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 70.910$ 和 70.817 , 均 $P = 0.000$), 肠上皮化生组织中 KLF5 和 Wnt3a mRNA 表达升高。见图 2。

2.2 DCA 诱导 GES-1 细胞中 KLF5 和 Wnt3a 的表达

2.2.1 KLF5 和 Wnt3a 蛋白 100、200 和 500 μ mol/L DCA 组, 以及空白对照组的 KLF5 蛋白相对表达量分别为 (1.26 ± 0.07)、(1.63 ± 0.06)、(2.47 ± 0.06) 和 (1.00 ± 0.06); 100、200 和 500 μ mol/L DCA 组, 以及空白对照组的 Wnt3a 蛋白相对表达量分别为 (1.20 ± 0.07)、(1.59 ± 0.09)、(2.34 ± 0.08) 和 (1.00 ± 0.07)。各组细胞中 KLF5 和 Wnt3a 蛋白表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 268.043$ 和 143.273 , 均 $P = 0.000$), 随着 DCA 浓度增加, GES-1

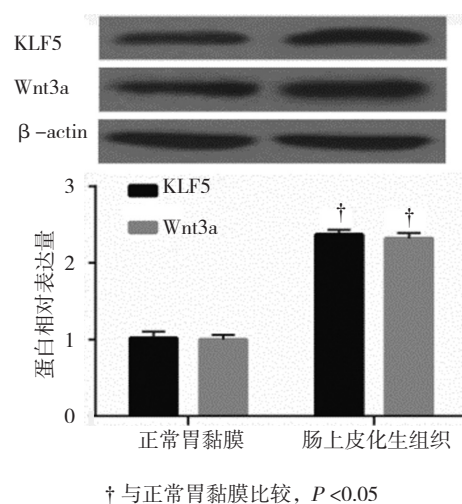


图 1 正常胃黏膜和肠上皮化生组织中 KLF5、Wnt3a 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

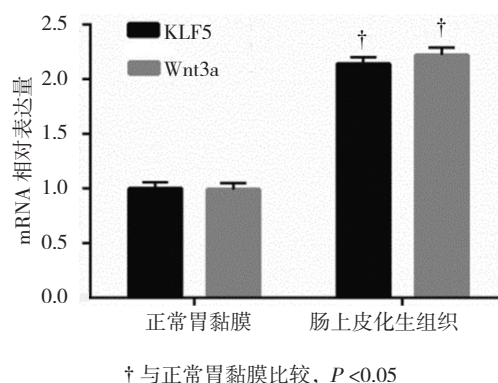
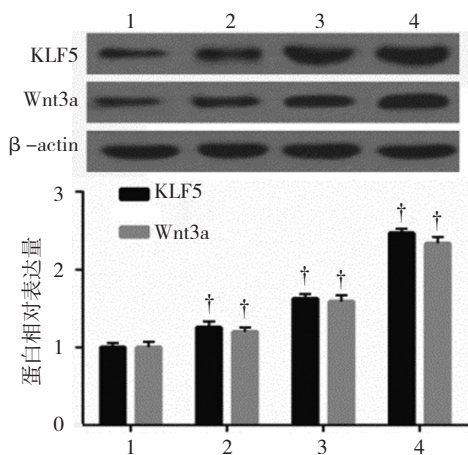


图 2 正常胃黏膜和肠上皮化生组织中 KLF5 和 Wnt3a mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

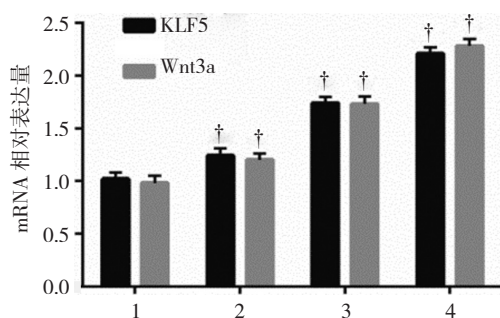
细胞中 KLF5 和 Wnt3a 的表达水平逐渐升高。见图 3。

2.2.2 KLF5 和 Wnt3a mRNA 100、200 和 500 $\mu\text{mol/L}$ DCA 组, 以及空白对照组的 KLF5 mRNA 相对表达量分别为 (1.24 ± 0.08) 、 (1.74 ± 0.06) 、 (2.21 ± 0.06) 和 (1.00 ± 0.05) ; 100、200 和 500 $\mu\text{mol/L}$ DCA 组, 以及空白对照组的 Wnt3a mRNA 相对表达量分别为 (1.20 ± 0.05) 、 (1.73 ± 0.08) 、 (2.28 ± 0.07) 和 (1.00 ± 0.06) 。各组细胞中 KLF5 和 Wnt3a mRNA 表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=179.614$ 和 209.881 , 均 $P=0.000$), KLF5 和 Wnt3a mRNA 表达水平呈剂量依赖效应。KLF5 和 Wnt 通路可能在胃黏膜肠上皮化生中发挥重要作用。见图 4。



1: 空白对照组; 2: 100 $\mu\text{mol/L}$ DCA 组; 3: 200 $\mu\text{mol/L}$ DCA 组; 4: 500 $\mu\text{mol/L}$ DCA 组。† 与正常胃黏膜比较, $P < 0.05$

图 3 不同浓度 DCA 对 GES-1 细胞中 KLF5 和 Wnt3a 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)



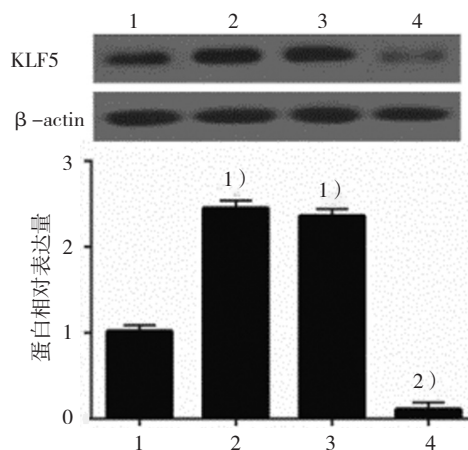
1: 空白对照组; 2: 100 $\mu\text{mol/L}$ DCA 组; 3: 200 $\mu\text{mol/L}$ DCA 组; 4: 500 $\mu\text{mol/L}$ DCA 组。† 与正常胃黏膜比较, $P < 0.05$

图 4 不同浓度 DCA 对 GES-1 细胞中 KLF5 和 Wnt3a mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 KLF5 沉默抑制 DCA 诱导的 GES-1 细胞增殖并促进凋亡

2.3.1 KLF5 蛋白

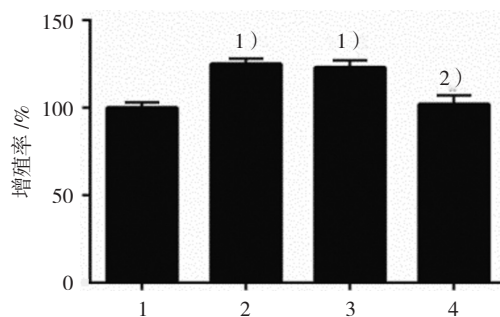
空白对照组、KLF5 沉默组的 KLF5 蛋白相对表达量分别为 (1.00 ± 0.06) 、 (2.45 ± 0.08) 、 (2.36 ± 0.06) 和 (0.11 ± 0.06) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=822.422$, $P=0.000$), si-KLF5 转染后, 细胞中 KLF5 蛋白表达降低。见图 5。



1: 空白对照组; 2: DCA 组; 3: 阴性对照组; 4: KLF5 沉默组。1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与阴性对照组比较, $P < 0.05$

图 5 各组 GES-1 细胞中 KLF5 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

2.3.2 增殖率 空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组 GES-1 细胞增殖率分别为 $(100.00 \pm 3.46)\%$ 、 $(125.00 \pm 3.60)\%$ 、 $(123.00 \pm 3.60)\%$ 和 $(102.00 \pm 4.58)\%$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=36.136$, $P=0.000$), DCA 促进 GES-1 细胞增殖, 而将 KLF5 沉默后, DCA 的促增殖作用被抑制。见图 6。



1: 空白对照组; 2: DCA 组; 3: 阴性对照组; 4: KLF5 沉默组。1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与阴性对照组比较, $P < 0.05$

图 6 各组 GES-1 细胞增殖率比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.3.3 凋亡率 空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组 GES-1 细胞凋亡率分别为 $(18.70 \pm 0.72)\%$ 、 $(10.30 \pm 0.70)\%$ 、 $(9.80 \pm 0.79)\%$ 和 $(17.80 \pm 0.79)\%$, 经方差分析, 差异有统计学意义

义($F=119.419, P=0.000$), DCA 抑制 GES-1 细胞凋亡, 而 KLF5 沉默后, DCA 的抑制凋亡作用被抑制。DCA

可能通过 KLF5 影响 GES-1 细胞的增殖和凋亡。见图 7、8。

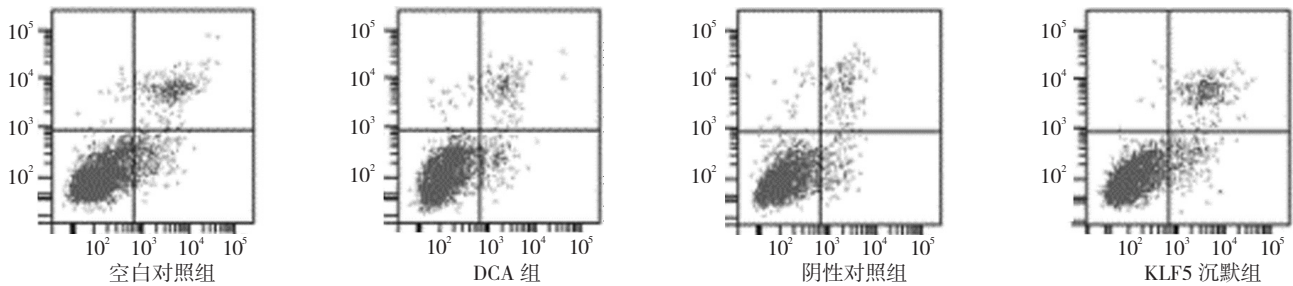
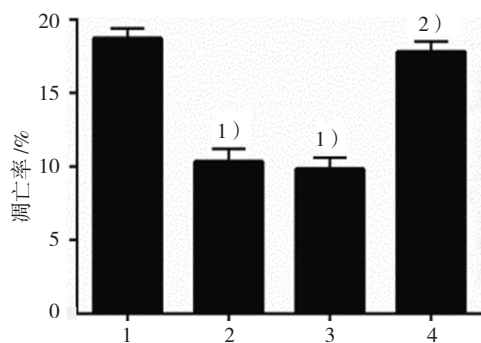


图 7 各组 GES-1 细胞凋亡情况



1: 空白对照组; 2: DCA 组; 3: 阴性对照组; 4: KLF5 沉默组。

1) 与空白对照组比较, $P<0.05$; 2) 与阴性对照组比较, $P<0.05$

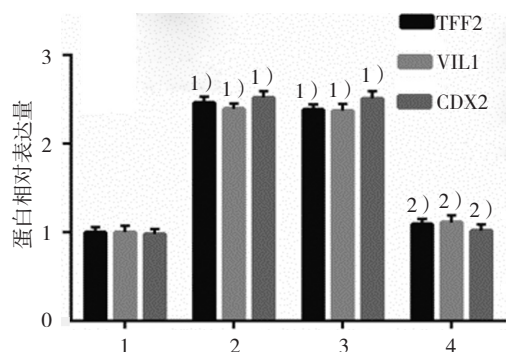
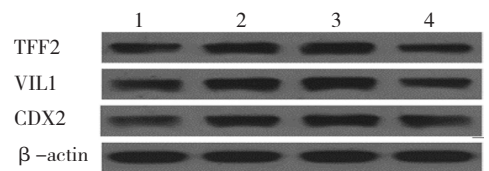
图 8 各组 GES-1 细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.4 KLF5 沉默抑制 DCA 诱导的 GES-1 细胞肠上皮化生

2.4.1 TFF2、VIL1 和 CDX2 蛋白 空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组的 TFF2 蛋白相对表达量分别为 (1.00 ± 0.05)、(2.46 ± 0.08)、(2.38 ± 0.09) 和 (1.09 ± 0.08), 经方差分析, 差异有统计学意义($F=301.250, P=0.000$); 空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组的 VIL1 蛋白相对表达量分别为 (1.00 ± 0.05)、(2.39 ± 0.09)、(2.37 ± 0.07) 和 (1.11 ± 0.05), 经方差分析, 差异有统计学意义($F=385.109, P=0.000$); 空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组的 CDX2 蛋白相对表达量分别为 (1.00 ± 0.06)、(2.52 ± 0.08)、(2.51 ± 0.09) 和 (1.02 ± 0.05), 经方差分析, 差异有统计学意义($F=413.707, P=0.000$)。DCA 升高 TFF2、VIL1 和 CDX2 蛋白表达水平, 而 KLF5 沉默后 DCA 的作用被抑制。见图 9。

2.4.2 TFF2、VIL1 和 CDX2 mRNA 空白对照组、

DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组的 TFF2 mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.05)、(2.35 ± 0.05)、(2.37 ± 0.06) 和 (1.11 ± 0.08), 经方差分析, 差异有统计学意义($F=418.568, P=0.000$); 空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组的 VIL1 mRNA 相对表达量分别为 (1.02 ± 0.03)、(2.32 ± 0.05)、(2.29 ± 0.05) 和 (1.10 ± 0.07), 经方差分析, 差异有统计学意义($F=531.171, P=0.000$); 空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组的 CDX2 mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.04)、(2.41 ± 0.08)、(2.43 ± 0.05) 和 (1.05 ± 0.08), 经方差分析, 差异有统计学意义

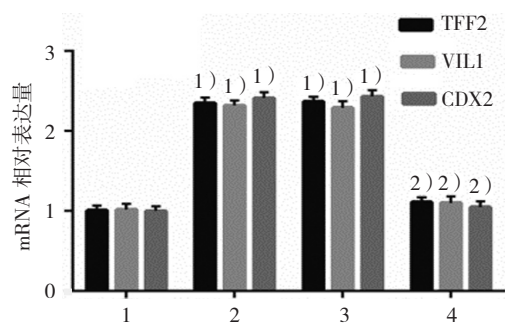


1: 空白对照组; 2: DCA 组; 3: 阴性对照组; 4: KLF5 沉默组。

1) 与空白对照组比较, $P<0.05$; 2) 与 DCA 组比较, $P<0.05$

图 9 各组 GES-1 细胞中 TFF2、VIL1 和 CDX2 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

($F=452.901$, $P=0.000$)。DCA 升高 TFF2、VIL1 和 CDX2 mRNA 表达水平,而 KLF5 沉默后 DCA 的作用被抑制。DCA 可能通过 KLF5 诱导胃黏膜肠上皮化生。见图 10。



1: 空白对照组; 2: DCA 组; 3: 阴性对照组; 4: KLF5 沉默组。

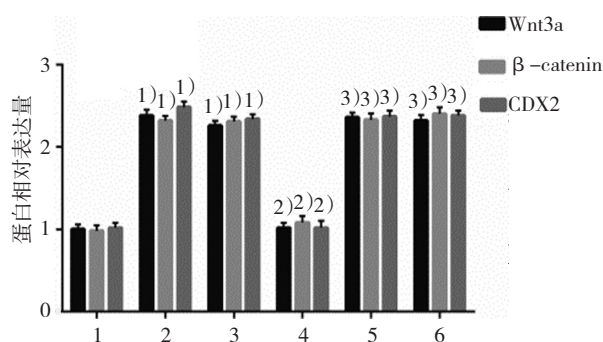
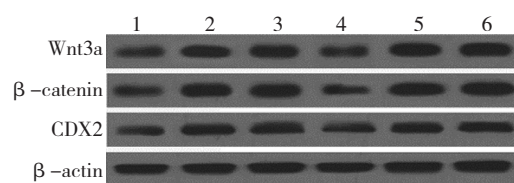
1) 与空白对照组比较, $P<0.05$; 2) 与 DCA 组比较, $P<0.05$

图 10 各组 GES-1 细胞中 TFF2、VIL1 和 CDX2 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.5 KLF5 促进 DCA 诱导的 GES-1 细胞肠上皮化生

2.5.1 Wnt3a、 β -catenin 和 CDX2 蛋白 空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组、LiCl 组及 LiCl+KLF5 沉默组的 Wnt3a 蛋白相对表达量分别为 (1.01 ± 0.06)、(2.38 ± 0.06)、(2.26 ± 0.05)、(1.02 ± 0.05)、(2.36 ± 0.08) 和 (2.32 ± 0.08)，经方差分析，差异有统计学意义 ($F=320.400$, $P=0.000$)；空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组、LiCl 组及 LiCl+KLF5 沉默组的 β -catenin 蛋白相对表达量分别为 (0.98 ± 0.06)、(2.32 ± 0.07)、(2.31 ± 0.07)、(1.08 ± 0.07)、(2.33 ± 0.08) 和 (2.40 ± 0.07)，经方差分析，差异有统计学意义 ($F=266.022$, $P=0.000$)；空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组、LiCl 组及 LiCl+KLF5 沉默组的 CDX2 蛋白相对表达量分别为 (1.02 ± 0.06)、(2.48 ± 0.06)、(2.34 ± 0.08)、(1.02 ± 0.08)、(2.37 ± 0.05) 和 (2.38 ± 0.06)，经方差分析，差异有统计学意义 ($F=312.093$, $P=0.000$)。DCA 激活 Wnt 通路 Wnt3a、 β -catenin，以及肠上皮化生标志蛋白 CDX2 蛋白的表达，将 KLF5 沉默后，Wnt 通路蛋白和肠上皮化生标志蛋白表达下降，而 Wnt 激活剂则使抵消了 si-KLF5 的作用，激活 Wnt 通路并升高 CDX2 的表达。见图 11。

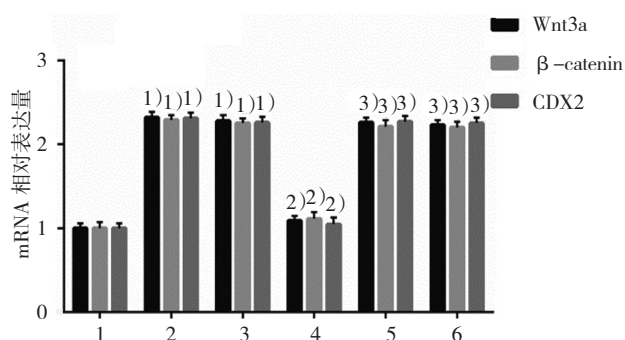
2.5.2 Wnt3a、 β -catenin 和 CDX2 mRNA



1: 空白对照组; 2: DCA 组; 3: 阴性对照组; 4: KLF5 沉默组; 5: LiCl 组; 6: LiCl+KLF5 沉默组。1) 与空白对照组比较, $P<0.05$; 2) 与 DCA 组比较, $P<0.05$; 3) 与 KLF5 沉默组比较, $P<0.05$

图 11 Wnt 激动剂对 si-KLF5 调节 GES-1 细胞中 Wnt3a、 β -catenin 和 CDX2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组、LiCl 组及 LiCl+KLF5 沉默组的 Wnt3a mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.06)、(2.32 ± 0.07)、(2.28 ± 0.06)、(1.09 ± 0.06)、(2.26 ± 0.06) 和 (2.23 ± 0.06)，经方差分析，差异有统计学意义 ($F=310.259$, $P=0.000$)；空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组、LiCl 组及 LiCl+KLF5 沉默组的 β -catenin mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.05)、(2.29 ± 0.06)、(2.25 ± 0.08)、(1.11 ± 0.09)、(2.21 ± 0.08) 和 (2.20 ± 0.08)，经方差分析，差异有统计学意义 ($F=190.732$, $P=0.000$)；空白对照组、DCA 组、阴性对照组、KLF5 沉默组、LiCl 组及 LiCl+KLF5 沉默组的 CDX2 mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.03)、(2.31 ± 0.06)、(2.26 ± 0.06)、(1.05 ± 0.04)、(2.27 ± 0.06) 和 (2.25 ± 0.06)，经方差分析，差异有统计学意义 ($F=400.107$, $P=0.000$)。DCA 激活 Wnt 通路 Wnt3a、 β -catenin，以及 CDX2 mRNA 的表达，将 KLF5 沉默后，Wnt3a、 β -catenin 和 CDX2 mRNA 表达下降，而 Wnt 激活剂则使抵消了 si-KLF5 的作用，激活 Wnt 通路并升高 CDX2 mRNA 的表达。KLF5 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进 DCA 诱导的胃黏膜肠上皮化生。见图 12。



1: 空白对照组; 2: DCA 组; 3: 阴性对照组; 4: KLF5 沉默组; 5: LiCl 组; 6: LiCl+KLF5 沉默组。1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 DCA 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 KLF5 沉默组比较, $P < 0.05$

图 12 Wnt 激动剂对 si-KLF5 调节 GES-1 细胞中 Wnt3a、β-catenin 和 CDX2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

我国是胃癌高发国家, 每年新发病例占全世界发病人数的绝大多数。决定胃癌患者预后的关键在于早期发现、诊断和治疗。慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生及异型增生是重要的胃黏膜癌前病变^[5-6]。因此, 胃黏膜肠上皮化生发病机制的研究, 可为胃黏膜异型增生甚至癌变的治疗提供新思路。

Krüppel 样基因家族 (Krüppel like factor, KLFs) 为哺乳类动物的转录调节因子, 属于锌指蛋白转录因子家族。其中 KLF5 又称为 BTEB2 和 IKLF, 属于 KLF 家族^[7]。KLF5 在不同组织不同层次中有广泛的表达。作为一个基本的转录因子, KLF5 在细胞周期调控、细胞凋亡、迁移和分化中发挥必不可少的作用。另外, KLF 家族成员 KLF2、KLF4、KLF5 及 KLF8 均证实作为致癌因子, 促进各种癌症的发生、发展^[8-10]。有研究证明, KLF5 协同其他转录因子促进胃癌的发展^[11], 而其在癌前病变中的作用并无相关报道。有研究表明, DCA 可以诱导食管癌的癌前病变^[2]。因此, 本文用 DCA 诱导胃黏膜细胞, 观察 KLF5 沉默对胃黏膜肠上皮化生的作用。本实验结果证明, 与正常胃黏膜相比, KLF5 在肠上皮化生中的表达升高, 提示 KLF5 可能在胃黏膜肠上皮化生中发挥重要作用。进一步实验结果表明, 与正常胃黏膜上皮细胞相比, DCA 诱导胃黏膜肠上皮化生细胞模型中 KLF5 的表达升高。

细胞增殖和凋亡是保持机体平衡和修复损伤的重要因素。胃黏膜上皮细胞更新非常迅速, 研究认为肠上皮化生的发生是细胞异常增生逐渐积聚的结

果^[12]。有研究表明, 抑制 KLF5 能够减轻口腔黏膜癌前病变^[13]。KLF5 能够促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 从而促进癌症的发展^[14]。本实验结果表明, DCA 促进 GES-1 细胞的增殖, 并抑制凋亡, 而 KLF5 沉默后抑制 DCA 对细胞增殖、凋亡的影响。

同源异形盒基因 CDX2 是一种肠上皮特异性转录因子, 可控制肠上皮细胞的分化和成熟, 在肠上皮化生黏膜中呈高表达^[15]。三叶因子家族 (trefoil factor family, TFF) 是胃肠道黏液细胞分泌的具有 ≥ 1 个三叶结构域的小分子蛋白质多肽, 主要功能是保护黏膜、促进损伤黏膜修复。研究发现, 在 TFF2 缺陷小鼠模型实验中, 小鼠的胃黏膜增生降低, 提示 TFF2 可能有刺激胃黏膜增殖的作用, 增加胃癌发生的危险性^[16]。绒毛蛋白 (Villin, VIL) 是一种重要的细胞支架蛋白, 在刷状缘上皮细胞分化过程中发挥重要作用。近年来研究表明, VIL1 是肠上皮细胞分化和转移性肠腺癌的标记物, 可以辅助明确转移性肿瘤的来源^[17]。因此, TFF2、VIL1 和 CDX2 作为肠上皮化生的标志蛋白, 在肠上皮化生过程中发挥重要作用。越来越多的研究表明, Wnt 信号通路除参与调控发育过程外, 在癌症的发展中也发挥重要作用。Wnt 途径激活后, 相关的细胞周期和凋亡相关基因、生长因子和黏附分子等开始转录, 参与癌症的发生、发展^[18]。有研究表明, KLF5 敲除的小鼠中 Wnt 通路被抑制, 肠上皮稳态被破坏^[19]。本实验结果表明, KLF5 沉默抑制 DCA 对 TFF2、VIL1 和 CDX2 的上调作用; 另外, 在 Wnt 通路干预后, si-KLF5 的作用又被抑制, 表明 KLF5 可能通过 Wnt/β-catenin 通路促进 DCA 诱导的肠上皮化生。

综上所述, 本文通过 DCA 诱导胃黏膜上皮细胞, 发现 KLF5 沉默明显抑制 DCA 诱导的胃黏膜上皮细胞肠上皮化生, 表明 KLF5 可能促进 DCA 诱导的肠上皮化生, 其机制可能是通过激活 Wnt/β-catenin 通路来实现的。本研究指出 KLF5 参与 DCA 诱导的胃黏膜肠上皮化生的发生, 为预防胃癌提供新的靶点。

参考文献:

- [1] 高泽立, 张成, 盛飞英, 等. 胃黏膜肠上皮化生、胃上皮内瘤变与胃癌的组织发生 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19: 1981-1984.
- [2] LI S, CHEN X, ZHOU L, et al. Farnesoid X receptor signal is involved in deoxycholic acid-induced intestinal metaplasia of normal human gastric epithelial cells [J]. Oncol Rep, 2015, 34(5): 2674-2682.
- [3] NOTO J M, KHIZANISHVILI T, CHATURVEDI R, et al.

- Helicobacter pylori promotes the expression of Kruppel-like factor 5, a mediator of carcinogenesis, in vitro and in vivo[J]. PLoS One, 2013, 8(1): DOI: 10.1371/journal.pone.0054344.
- [4] FUJII Y, YOSHIHASHI K, SUZUKI H, et al. CDX1 confers intestinal phenotype on gastric epithelial cells via induction of stemness-associated reprogramming factors SALL4 and KLF5[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(50): 20584-20589.
- [5] LIU L, CAO L, GONG B, et al. Novel biomarkers for the identification and targeted therapy of gastric cancer[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 9(9): 1217-1226.
- [6] LIU L, YANG X. Implication of reprimo and hMLH1 gene methylation in early diagnosis of gastric carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11): 14977-14982.
- [7] FARRUGIA M K, VANDERBILT D B, SALKENI M A, et al. Kruppel-like pluripotency factors as modulators of cancer cell therapeutic responses[J]. Cancer Res, 2016, 76(7): 1677-1682.
- [8] SHIBATA M, CHIBA T, MATSUOKA T, et al. Kruppel-like factors 4 and 5 expression and their involvement in differentiation of oral carcinomas[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(4): 3701-3709.
- [9] ZOU K, LU X, YE K, et al. Kruppel-like factor 2 promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma through up-regulation of c-myc[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(1): 20-26.
- [10] YAN Q, ZHANG W, WU Y, et al. KLF8 promotes tumorigenesis, invasion and metastasis of colorectal cancer cells by transcriptional activation of FHL2[J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 25402-25417.
- [11] CHIA N Y, DENG N, DAS K, et al. Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development[J]. Gut, 2015, 64(5): 707-719.
- [12] SUE S, SHIBATA W, KAMETA E, et al. Intestine-specific homeobox (ISX) induces intestinal metaplasia and cell proliferation to contribute to gastric carcinogenesis[J]. J Gastroenterol, 2016, 1-12.
- [13] SHI W, YANG J, LI S, et al. Potential involvement of miR-375 in the premalignant progression of oral squamous cell carcinoma mediated via transcription factor KLF5[J]. Oncotarget, 2015, 6(37): 40172-40185.
- [14] JIA L, ZHOU Z, LIANG H, et al. KLF5 promotes breast cancer proliferation, migration and invasion in part by upregulating the transcription of TNFAIP2[J]. Oncogene, 2016, 35(16): 2040-2051.
- [15] 王旭光, 张忠, 孙丽萍, 等. 同源异形盒基因 CDX2 的表达与胃黏膜肠上皮化生类型的关系 [J]. 世界华人消化杂志, 2009 (1): 86-89.
- [16] FARRELL J J, TAUPIN D, KOH T J, et al. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury[J]. J Clin Invest, 2002, 109(2): 193-204.
- [17] ZAVROS Y, EATON K A, KANG W, et al. Chronic gastritis in the hypochlorhydric gastrin-deficient mouse progresses to adenocarcinoma[J]. Oncogene, 2005, 24(14): 2354-2366.
- [18] 李康, 旦增. Wnt/ β -catenin 信号与胃癌防治研究进展 [J]. 南方医科大学学报, 2014 (12): 1852-1856.
- [19] MCCONNELL B B, KIM S S, YU K, et al. Kruppel-like factor 5 is important for maintenance of crypt architecture and barrier function in mouse intestine[J]. Gastroenterology, 2011, 141(4): 1302-1313.

(童颖丹 编辑)