

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.19.008

文章编号: 1005-8982(2017)19-0040-05

过表达 KLF4 抑制非小细胞肺癌增殖及 上皮间质转化的作用机制*

刘华松¹, 徐兰兰², 张军¹, 郭家龙¹, 林称意¹, 原野¹, 曾敏¹, 程栋梁¹

[1.湖北省十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院) 胸心大血管外科,湖北 十堰 442099;

2.湖北医药学院护理学院,湖北 十堰 442000]

摘要:目的 探究 KLF4 调控非小细胞肺癌(NSCLC)增殖及上皮间质转化(EMT)发生的作用机制,为 NSCLC 的临床研究提供理论依据。**方法** 收集临床病理资料进行统计学分析,免疫组织化学检测 KLF4 在癌旁及癌组织中的表达,细胞水平检测 KLF4 在癌细胞和正常细胞中的表达差异,过表达 KLF4 检测对肺癌细胞的增殖、侵袭、迁移及 EMT 相关标志物的影响。**结果** KLF4 在癌组织中的表达低于癌旁组织中的表达,并且与患者的临床分期及远处转移密切相关,细胞水平检测也得到了相同的结果,上调 KLF4 的表达抑制了细胞的增殖、侵袭及迁移,同时抑制 EMT 相关的间充质标志物的表达,促进上皮标志物的表达。**结论** 过表达 KLF4 能够抑制 NSCLC 增殖及 EMT 的发生。

关键词: KLF4;非小细胞肺癌;增殖;上皮间质转化

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Mechanisms of KLF4 over-expression in inhibiting proliferation and EMT of NSCLC*

Hua-song Liu¹, Lan-lan Xu², Jun Zhang¹, Jia-long Guo¹, Chen-yi Lin¹,

Ye Yuan¹, Min Zeng¹, Dong-liang Cheng¹

(1. Department of Thoraco-cardio-macrovascular Surgery, Shiyan Taihe Hospital (the Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan, Hubei 442099, China; 2. School of Nursing, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000)

Abstract: **Objective** To explore the effect of KLF4 on proliferation and epithelial mesenchymal transition (EMT) in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** KLF4 expression in 100 samples of surgical resected NSCLC and matched normal tumor-adjacent tissues were measured by immunohistochemical staining. KLF4 expression in WI-38 and NSCLC cell lines was detected by Western blot. The regulatory effect of KLF4 on proliferation, invasion, migration and EMT markers were confirmed by cell counting, Transwell and Western blot, respectively. **Results** KLF4 expression was impaired in the NSCLC tissues. Loss of KLF4 expression was correlated with poor clinicopathological features including tumor stage and distant metastasis, upregulated KLF4 attenuated proliferation, invasion and migration. Meanwhile, the expressions of N-cadherin and vimentin were markedly decreased, but E-cadherin and α -catenin expressions were increased after NSCLC cells were transfected with pMXs-hKLF4. **Conclusions** Our work provides a novel molecular insight into KLF4-directed tumor suppression through regulation of EMT.

Keywords: KLF4; NSCLC; proliferation; EMT

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率及癌症致死率在所有肿瘤中均居第一位^[1]。肺癌按病理类型主要包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),NSCLC 占到 80%以上。NSCLC 患者中只有不到 50%的能够接受以手术为主的治疗方案,绝大多数 NSCLC 患者确诊时多已发展到中晚期,致使 NSCLC 患者的 5 年生存率只有 15%左右,严重影响患者的治疗及预后^[2]。因此,寻找 NSCLC 早期诊断的特异性标志物显得尤为重要。

Krüppel 样因子(krüppel-like factors, KLFs)家族是广泛存在于人类组织中的锌指型转录因子,主要参与到细胞的增殖、分化、周期、胚胎形成等多个生理活动过程中^[3]。目前,KLF 家族中研究最多的是 KLF4 基因,人类 KLF4 基因位于染色体 9q31,其编码的 KLF4 蛋白是能够特异识别并结合 DNA 序列(5'-TGGGTGGGGC-3')的转录因子。作为重要的核转录因子,KLF4 蛋白即能通过调控下游靶基因表达发挥生物学功能,同时也能够结合到自身启动子上激活自身表达,因此,KLF4 是一个双向调节的转录因子^[4]。针对 KLF4 与肿瘤的相关性研究发现,KLF4 在不同的肿瘤中发挥着不同的作用。通过免疫组织化学和实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测等实验验证,发现其在白血病^[5]、皮肤癌^[6]、结肠癌、胃癌、食管癌、膀胱癌、肝癌及宫颈癌^[7]等多个肿瘤组织中均低表达,然而在口腔上皮细胞鳞癌、乳腺癌^[8]以及前列腺癌^[9]中却高表达。相关的临床研究证实 KLF4 的表达异常与肿瘤患者的预后密切相关,成为判断疾病预后的重要指标。CHALEB^[10]等在研究中指出,杂合子缺失及启动子甲基化导致的蛋白活性降低可能是 KLF4 在多个肿瘤组织中表达下调的重要机制。尽管 KLF4 与肿瘤发生发展的机制研究已取得了一定进展,但是有关 KLF4 与 NSCLC 关系的研究却很少^[11]。最新的研究表明,KLF4 在 NSCLC 细胞系中均低表达,并且发现 Numb-KLF4 信号通路在调控 NSCLC 的侵袭转移中发挥着重要的作用,然而,有关 KLF4 参与调控 NSCLC 的上皮间质转化(EMT)的机制仍不清,因此,本研究主要探究 KLF4 调控非小细胞肺癌 EMT 的作用机制。

1 资料与方法

1.1 病例资料

随机选取十堰市太和医院胸心外科 2012 年 9 月-2015 年 9 月收治的 NSCLC 病例 100 例。其中,

男性 63 例,女性 37 例;年龄 45~78 岁,平均 62 岁;其中鳞癌 56 例,腺癌 32 例,其他 12 例。术后病理检测均已证实,术前均未接受化疗和放疗,临床病理资料完整,同时选取相对应的癌旁组织作为对照,本研究所收病例标本已获本院伦理委员会的批准。

1.2 主要试剂

KLF4 兔抗人多克隆抗体(免疫组织化学 1:200 Western blot 1:500 武汉三鹰生物技术有限公司),E-cadherin 兔抗人多克隆抗体(1:500 武汉三鹰生物技术有限公司),N-cadherin 兔抗人多克隆抗体(1:1000 abcam), α -catenin 兔抗人多克隆抗体(1:1000 CST),vimentin 兔抗人多克隆抗体(1:500 abcam),GADPH 兔抗人多克隆抗体(1:1500 北京博奥森生物技术有限公司),山羊抗兔二抗(1:5000-10000,武汉博士德生物工程有限公司),SP 系列检测试剂盒(中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 细胞培养与转染

人 NSCLC(A549,NCI-H460,NCI-H1299,95D)以及人胚胎肺成纤维细胞(WI-38)来源于中国典型培养物保藏中心,用含 10%胎牛血清(excellbio 南美)RPMI-1640 培养基(Hyclone USA)培养 NCI-H1299,其他细胞用 10%胎牛血清 DMEM 高糖培养基培养,细胞均培养于 37℃、含 5%二氧化碳 CO₂ 的培养箱,PMXs-hKLF4 过表达质粒购于 addgene(货号 17219),按照 lipofectamine 2000 转染手册的步骤进行转染

1.4 免疫组织化学法

所有组织均经过了甲醛固定和石蜡包埋处理后,制备成厚度约为 5 μ m 的切片,采用 SP 免疫组织化学 2 步法进行后续处理,制成的切片经二甲苯脱蜡以及不同浓度的酒精脱水处理,后续进行微波抗原修复,再滴加 3%双氧水 H₂O₂ 孵育 10 min,PBS 冲洗,10%山羊血清室温封闭 30 min,接着进行湿盒孵育 KLF4 抗体(1:200)4℃过夜,第 2 天 PBS 冲洗,切片进行生物素标记的山羊抗兔二抗室温孵育 30 min,PBS 冲洗,最后 DAB 显色,显微镜下观察,自来水冲洗,苏木素复染,酒精脱水,树胶封片。每张切片随机选择 400 倍下不重复视野 5 个,按阳性细胞百分比评分: $\geq 30\%$ 表达阳性。

1.5 细胞计数

接种相同细胞到 24 孔板,设置阴性对照组和实验组,实验组转染 KLF4 过表达质粒,24、48、72 及 96 h 后分别在显微镜下统计各个时间点的细胞数,

绘制生长曲线图。

1.6 Western blot 实验

收集转染过表达质粒 48 h 后的细胞, 利用含 PMSF 的 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 蛋白定量, 将变性蛋白进行垂直凝胶电泳 2 h 之后, 接着湿法转膜, 再 5% 脱脂奶粉对 PVDF 膜进行室温封闭处理 1 h, 封闭完的膜进行一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 进行二抗室温孵育 1 h, TBST 再次清洗 3 次, 化学发光成像系统暗室曝光蛋白拍照。

1.7 迁移与侵袭

利用包埋基质胶或不包埋基质胶的 Transwell 小室检测细胞迁移与侵袭能力, 消化转染 48 h 后的细胞, 用不含血清的培养基重悬, 取 200 μ l (2×10^4 个细胞) 的单细胞悬液种植在 Transwell 小室的上室, 下室加入 600 μ l 含 10% 的胎牛血清的培养基, 37℃ 培养箱孵育 24 h 后, 棉签擦拭掉 Transwell 上室膜细胞, 接着 4% 甲醛室温固定 10 min, 0.05% 结晶紫染色 10 min, 最后, 显微镜 200 倍下每个小室随机观察 5 个视野计数并拍照。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, KLF4 与临床病理特征关系的分析采用 χ^2 检验, 随机成对计量资料采取 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KLF4 在非小细胞肺癌组织中的表达

KLF4 主要表达在细胞核, 少部分表达在细胞浆, 阳性染色呈棕黄色颗粒, 阴性则无色。KLF4 在肺癌组织中的阳性表达率为 23.35%, 而在对应的癌旁组织的阳性表达率高达 86.14% ($t=3.485$, $P=0.034$)。见图 1。

2.2 KLF4 蛋白表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

免疫组织化学法检测 100 例 NSCLC 组织中

KLF4 的阳性表达率为 64%, KLF4 在非小细胞肺癌中的表达与患者所处的临床分期、是否远处转移密切相关, 而与患者的性别、年龄、病理类型、肿瘤大小等无关。临床分期等级越高, KLF4 的表达越少 ($P < 0.05$); 远处转移患者 KLF4 的阳性表达 (23.07%) 低于非远处转移者 (52.45%), 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

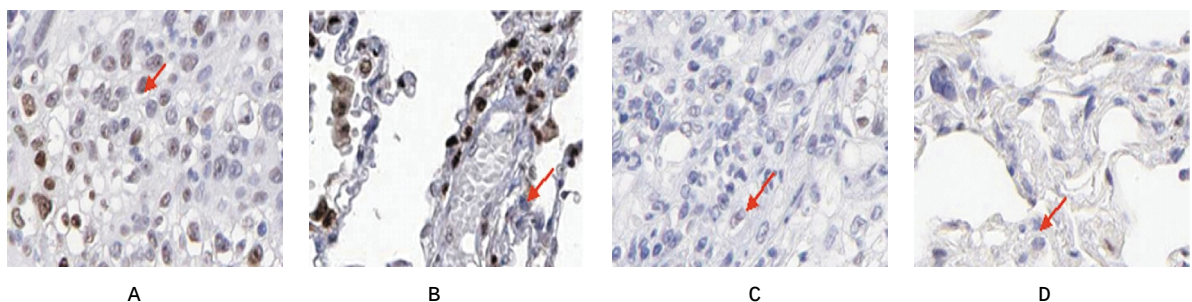
2.3 KLF4 蛋白在 NSCLC 细胞系中的表达

Western blot 检测结果显示, KLF4 在非小细胞肺癌细胞系中的表达均低于 WI-38 中的表达, Image J 软件灰度分析蛋白表达情况, 差异具有统计学

表 1 KLF4 蛋白的表达与临床病理的相关性 例

病理特征	KLF4 表达		χ^2 值	P 值
	阴性	阳性		
性别				
男性($n=63$)	24	39	0.324	0.569
女性($n=37$)	12	25		
年龄				
≥ 60 岁($n=57$)	33	24	0.809	0.368
<60 岁($n=43$)	21	22		
分期				
I ($n=68$)	35	33	6.537	0.038 [†]
II ($n=21$)	16	5		
III ($n=11$)	9	2		
病理分型				
SQCC($n=32$)	20	12	4.080	0.130
ADC($n=50$)	24	26		
OTHERS($n=18$)	6	12		
体积				
$\geq 5\text{ cm}^3$ ($n=35$)	29	6	0.275	0.600
$<5\text{ cm}^3$ ($n=65$)	51	14		
远处转移				
是($n=39$)	30	9	8.490	0.004 [†]
否($n=61$)	29	32		

注: [†] $P < 0.05$



A: 肺癌组织阳性表达; B: 肺癌组织阴性表达; C: 癌旁组织阳性表达; D: 癌旁组织阴性表达

图 1 KLF4 蛋白在肺癌及癌旁组织中的表达 (SP $\times 400$)

意义($t=2.189, P=0.037, n=3$)。见图 2。

2.4 过表达 KLF4 抑制 NSCLC 细胞的增殖

转染 KLF4 的过表达质粒后,A549($t=4.763, P=0.004$)和 H1299($t=1.368, P=0.006$)的细胞增殖能力受到抑制。见图 3。

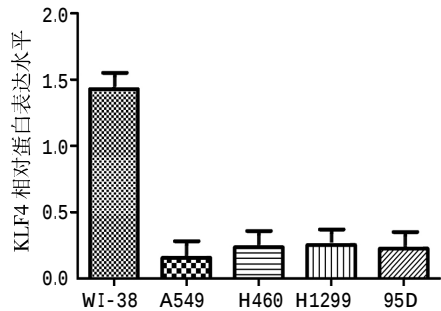


图 2 KLF4 蛋白在正常肺细胞以及 NSCLC 细胞系中的表达水平

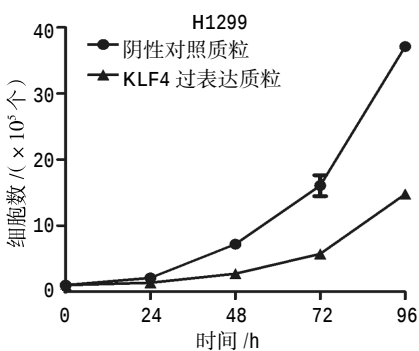
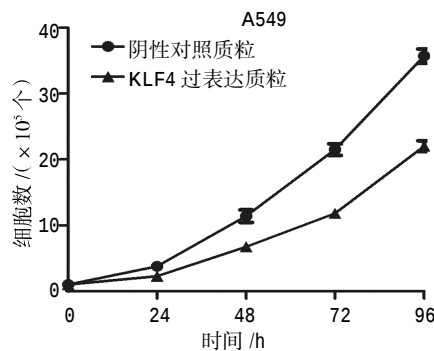


图 3 过表达 KLF4 抑制 NSCLC 细胞的增殖能力

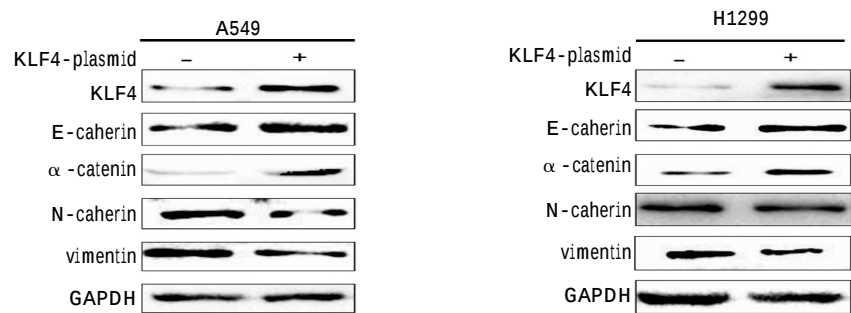


图 4 过表达 KLF4 对 NSCLC EMT 标志物的影响

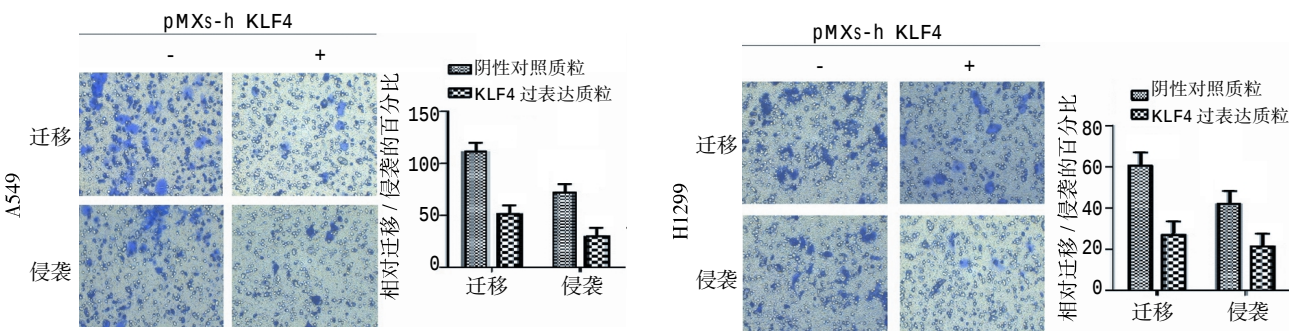


图 5 KLF4 抑制 NSCLC 细胞的迁移与侵袭

2.5 过表达 KLF4 蛋白对 EMT 相关标志物的影响

A549 细胞和 H1299 细胞分别转染 pMXs-hKLF4 过表达质粒后,提取蛋白进行 Western blot 检测,发现过表达 KLF4 后 2 种细胞的上皮标志物 E-cadherin、 α -catenin 表达均升高,而间皮标志物 N-cadherin、vimentin 的表达下调 (见图 4),说明过表达 KLF4 能够抑制 NSCLC 细胞 EMT 的发生。

2.6 过表达 KLF4 蛋白对 NSCLC 细胞迁移和侵袭的影响

瞬转 KLF4 过表达质粒的细胞进行 Transwell 实验,发现过表达 KLF4 的 A549 细胞 ($t=5.763, P=0.024; t=2.489, P=0.015, n=3$)和 H1299 细胞 ($t=1.463, P=0.033; t=3.398, P=0.0107, n=3$)迁移及侵袭能力均受到明显抑制。见图 5。

3 讨论

KLF4 是重要的核转录因子,在参与调控癌细胞的增殖、分化、周期等方面发挥着重要的作用。目前的研究已经证实,KLF4 在组织中的表达失调与多种肿瘤的发生发展密切相关,鉴于 KLF4 作为双向调控因子,在肿瘤中既发挥抑癌作用,也发挥促癌作用,因此对于 KLF4 在肿瘤的具体作用机制仍存在诸多疑问。关于 KLF4 在 NSCLC 中的作用机制的研究,虽已有少量文献报道,但是 KLF4 调控 NSCLC 及 EMT 的發生的研究却很少,EMT 是肿瘤恶性转变的一个重要的标志,EMT 的發生与肿瘤的增殖、侵袭及转移密切相关。NEHA 等^[12]在其研究中指出 KLF4 是 EMT 的关键调节因子;此外,有关肾纤维化的研究报道了 KLF4 能够通过抑制 EMT 来延缓肾纤维化的发生^[13],同时 Dnmt1 甲基化 KLF4 的启动子促进 EMT 的發生;ZHOU 等^[14]在其乳腺癌的研究也做了类似的研究;有文献报道 KLF4 抑制 SPARC 的表达来抑制肺癌细胞的侵袭转移;最新的研究表明,KLF4 能够抑制 K-Ras 诱导的小鼠肺癌的形成,组蛋白乙酰化可能抑制 KLF4 的表达^[15]。

本研究发现,KLF4 在肺癌组织中的表达低于癌旁组织,并且 KLF4 的表达与患者的临床分期、远处转移密切相关;在 NSCLC 细胞系中的表达也低于正常的肺细胞,过表达 KLF4 抑制 NSCLC 细胞的侵袭与迁移,同时,KLF4 的过表达抑制了 EMT 的發生,因此,推测 KLF4 在调控 NSCLC 增殖及 EMT 的發生过程中发挥着重要的作用,可能成为 NSCLC 临床早期诊断的特异性标志物。KLF4 在非小细胞肺癌中的研究较少,其机制有待深入研究。该论文收集了 100 例 NSCLC 进行统计学分析,同时通过免疫组织化学分析过表达 KLF4,发现 KLF4 与细胞的增殖、侵袭及迁移有关,并得出过表达 KLF4 能够抑制 NSCLC 增殖及 EMT 的發生这一结论。该结论有较好的实验证据支持,具有一定的理论和临床指导意义。

参 考 文 献:

- [1] DIRECTOR A J D S, MANAGER R S, EPIDEMIOLOGIST J X, et al. Cancer statistics, 2010[J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2010, 60(5): 277-300.
- [2] HARUBUMI K, YUKITO I, MORIO O, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung[J]. *New England Journal of Medicine*, 2004, 350(17): 1713-1721.
- [3] SHIELDS J M, CHRISTY R J, YANG V W. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(33): 20009-20017.
- [4] QIBING Z, YUAN H, QIMIN Z, et al. Role for Kruppel-like factor 4 in determining the outcome of p53 response to DNA damage[J]. *Cancer Research*, 2009, 69(21): 8284-8292.
- [5] HUANG Y, CHEN J, LU C, et al. HDAC1 and Klf4 interplay critically regulates human myeloid leukemia cell proliferation[J]. *Cell Death & Disease*, 2014, 5(5): e1491.
- [6] JUAN L, HAI Z, FANG Y, et al. Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(6): 1239-1246.
- [7] YANG W T, LIU S Y, ZHENG P S. Expression of KLF4 in cervical carcinoma and its significance[J]. *Journal of Xi-an Jiao-tong University*, 2010, 6(31): 22.
- [8] YU F, LI J, CHEN H, et al. Kruppel-like factor 4(KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion[J]. *Oncogene*, 2011, 30(18): 2161-2172.
- [9] MAGNEN C L, BUBENDORF L, RUIZ C, et al. Klf4 transcription factor is expressed in the cytoplasm of prostate cancer cells[J]. *European Journal of Cancer*, 2013, 49(4): 955-963.
- [10] GHALEB A, MCCONNELL B B, YANG V W. Intestine-specific deletion of the krüppel-like factor 4 (klf4) gene protects mice from dextran sulfate sodium (dss)induced colitis[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(5): S84-85.
- [11] HU W, HOFSTETTER W L, LI H, et al. Putative Tumor-Suppressive Function of Krüppel-Like Factor 4 in Primary Lung Carcinoma [J]. *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2009, 15(18): 5688-5695.
- [12] NEHA T, NATHALIE M S, PHIL A, et al. Klf4 is a transcriptional regulator of genes critical for EMT, including Jnk1 (Mapk8)[M]. *Tin ore resources of Asia and Australia.. United Nations*, 1964: e57329.
- [13] XIAO X, TANG W, YUAN Q, et al. Epigenetic repression of Krüppel-like factor 4 through Dnmt1 contributes to EMT in renal fibrosis [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015, 35(6): 1596-1602.
- [14] ZHOU Y, HOFSTETTER W L, YONG H, et al. KLF4 inhibition of lung cancer cell invasion by suppression of SPARC expression[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2010, 9(7): 507-513.
- [15] YU T, CHEN X, ZHANG W, et al. KLF4 regulates adult lung tumor-initiating cells and represses K-Ras-mediated lung cancer[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2015, 23(2): 207-215.

(张西倩 编辑)