

Krüppel 样转录因子 3 在肺腺癌中表达的意义

朱艳霞^① 朱敬^② 杨贤义^① 肖敏^①

摘要 目的:探讨 Krüppel 样转录因子 3(Krüppel-like factor 3, KLF3)在肺腺癌中的表达及其与临床特征的关系,为探索 KLF3 在肺腺癌中的作用提供依据。**方法:**荧光定量 PCR 及 Western blot 分析 KLF3 的 mRNA 及蛋白在肺腺癌细胞株中的表达。收集 72 例肺腺癌患者的肿瘤组织标本,免疫组织化学法分析 KLF3 在肺腺癌组织中表达并分析 KLF3 表达与患者临床特征的关系。**结果:**KLF3 在肺腺癌细胞株中表达下调。大部分肺腺癌组织中 KLF3 低表达(50/72),其表达主要定位于胞浆及胞核内。KLF3 表达与肺腺癌临床病理分期($P < 0.0001$)及 T 分期($P = 0.004$)、N 分期($P < 0.0001$)、M 分期($P < 0.0001$)明显相关。**结论:**KLF3 可能是一个重要的肺腺癌抑癌基因,并有望成为新的抗肿瘤治疗靶点。

关键词 KLF3 肺腺癌 抑癌基因

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.15.023

Significance of Krüppel-like factor 3 Expression in Lung Adenocarcinoma

Yanxia ZHU¹, Jing ZHU², Xianyi YANG¹, Min XIAO¹

Correspondence to: Yanxia ZHU; E-mail: zyxsy120@163.com

¹Emergency Department Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

²Section of Biology, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

Abstract Objective: To investigate the expression of the Krüppel-like transcription factor 3 (Krüppel-like factor 3, KLF3) in lung adenocarcinoma (LAC) and its clinical features, which provides the basis for exploring the role of KLF3 in LAC. **Methods:** The mRNA and protein expression of KLF3 in LAC cell lines was analyzed by using quantitative polymerase chain reaction and Western blot analysis. A total of 72 LAC specimens from patients who were admitted to the Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, between 2009 and 2011 were selected. Immunohistochemical staining was used for the analysis of KLF3 expression in the specimens, and an analysis of the correlation between KLF3 expression and the clinical features of patients with LAC was conducted. **Results:** KLF3 was down-regulated in the cancer cells and was decreased in a majority of LAC patients (50/72). Moreover, the KLF3 protein was primarily located in the cytoplasm and nucleus. KLF3 expression was found to be significantly correlated with the clinical pathological period ($P < 0.0001$), T stage ($P = 0.004$), N stage ($P < 0.0001$), and M stage ($P < 0.0001$) of LAC patients. **Conclusion:** KLF3 may be an important tumor suppressor gene in LAC and may thereby be a new anti-tumor therapeutic target.

Keywords KLF3; Lung adenocarcinoma; Tumor suppressor gene

Krüppel 样转录因子(Krüppel-like factors, KLFs)是哺乳动物 Sp/KLF (specificity protein/Krüppel-like factor) 锌指蛋白家族的亚家族,其蛋白结构能结合在靶基因的富含 GC 序列的调控元件及 CACCC 盒,调控靶基因的表达^[1]。KLF 家族成员参与调控细胞的多种重要生理过程,包括分化,发育,细胞增殖,凋亡^[2]和参与诱导性多能干细胞的形成^[3]。而且, KLFs 参与调控肿瘤细胞的增殖^[4-5],侵袭和转移^[6-7]。KLF3 的 N 端富含碱性氨基酸残基,因此被称为碱性 Krüppel 样转录因子(basic Krüppel-like factor, BKLF)。Lyng 等^[8]研究发现, KLF3 与宫颈癌缺氧耐受、乏氧代谢及高乳酸分泌相关,表明 KLF3 可能参与肿瘤的代谢过程。而在急性髓细胞样白血病中, KLF3 表达明显降低,表明 KLF3 可能是一个抑癌基因^[9]。Fernan-

dez-Zapico 等^[10]通过研究发现, KLF3 作用于癌基因 KRAS 信号通道,从而抑制肿瘤细胞的生长和转化,并能促进肿瘤细胞的凋亡。然而, KLF3 在非小细胞肺癌中的表达状况和临床意义鲜见报道。因此,本研究旨在分析 KLF3 在肺腺癌中的表达及其与临床特征之间的关系,为寻找新的抗肿瘤基因标志物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料与组织标本

由湖北医药学院附属太和医院 2009 年 6 月至 2011 年 6 月间经病理活检确诊肺腺癌患者 72 例,年龄 41 ~ 87 岁,平均(52.3±7.3)岁。收集并保存其石蜡包埋的肺腺癌组织标本。为了解 KLF3 在正常肺组织中的表达情况,对 5 例肺部良性病变组织进行

作者单位:①湖北医药学院附属太和医院急诊科(湖北省十堰市 442000);②湖北医药学院生物学教研室

通信作者:朱艳霞 zyxsy120@163.com

KLF3蛋白表达分析。所有标本的获取均经患者知情同意并获得医院伦理委员会批准。对72例肺腺癌患者的临床资料作了具体分析(表1)。

表1 72例肺腺癌患者临床病理特征

Table 1 Clinicopathologic characteristics of 72 patients with lung adenocarcinoma

临床特征	例数(%)	
年龄(岁)	≤65	48(66.7)
	>65	24(33.3)
性别	男	39(54.2)
	女	33(45.8)
肺腺癌临床分期	I	15(20.8)
	II	27(37.5)
	III	23(31.9)
	IV	7(9.7)
T分期	T1	17(23.6)
	T2	23(31.9)
	T3	30(41.7)
	T4	2(2.8)
N分期	N0	24(33.3)
	N1	20(27.8)
	N2	19(26.4)
	N3	9(12.5)
M分期	M0	51(70.8)
	M1	21(29.2)
分化程度	低	29(40.3)
	中	17(23.6)
	高	26(36.1)
吸烟	是	48(66.7)
	否	24(33.3)
KLF3表达	低表达	50(69.4)
	高表达	22(30.5)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌细胞株 A549, SPC-A-1, NCI-H1975 及正常支气管上皮细胞株 NHBE 购自上海生命科学院细胞库。均以含 10% 胎牛血清(Gibco)及青链霉素双抗(Sigma)的 DMEM 培养基(Gibco)培养,并置于 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱孵育。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测 肺腺癌细胞株及正常对照细胞株的总 RNA 提取用 Trizol 并按操作进行。取 A260/A280=1.8~2.0 的 mRNA 进行逆转录合成 cDNA(RT 试剂盒购自 TAKARA)。用 primer 6.0 软件设计 KLF3 引物并由上海生工合成,上游引物:5'-TCAAAGGAAGCGGAGGATAC-3',下游引物:5'-CAAGATGGTCAGAACGGGAG-3',产物大小为 248 bp。以 β-actin 为内参,上

游引物:5'-TCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG-3',下游引物:5'-ACTGCTGTCACCTTCACCGTTCC-3',产物大小为 205 bp。用 SYBR Green 法以 ABI7900 进行定量 PCR 检测,用 2^{-ΔΔCT} 法计算肿瘤细胞中 KLF3 mRNA 表达比正常支气管上皮细胞中表达改变的倍数。

1.2.3 Western blot 检测 肿瘤细胞及正常支气管上皮细胞的蛋白提取^[11],通过 12% 的 SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白,然后转膜于 PVDF 膜上(Milipore)。5% 的脱脂牛奶封闭非特异性结合位点,分别以山羊抗-KLF3 抗体(1:100)购自 Abcam 公司,山羊抗-GAPDH(北京博奥深)孵育转有蛋白的 PVDF 膜,4℃ 过夜。含 0.1% TBST 室温洗膜 3 次,每次 5 min。用 HRP 交联的兔抗羊二抗(1:3 000)购自北京博奥深,室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次后显色液显色,放入胶片曝光显影成像并保存以备分析。

1.2.4 免疫组织化学分析 免疫组织化学采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(S-P)法检测肺腺癌组织中 KLF3 的表达,按 S-P 及 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥)说明进行操作。山羊抗人多克隆抗体 KLF3 购自 Abcam 公司,抗 KLF3 工作浓度为 1:100。组织切片经 DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,封片后进行分析。由两位病理科医师分析病理切片 KLF3 表达强度,评分标准如下:0 分(无染色),1 分(浅黄色),2 分(黄棕色),3 分(棕色),4 分(黑色)。其中以 0~1 分为低表达或无表达,以 2~4 分为高表达。

1.3 统计学分析

以 SPSS 16.0 统计软件进行数据统计分析,以均数±标准差表示 KLF3 在肿瘤细胞和正常细胞中 mRNA 水平表达的差异, Mann-Whitney U 检验分析 KLF12 蛋白表达与临床特征之间的关系。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

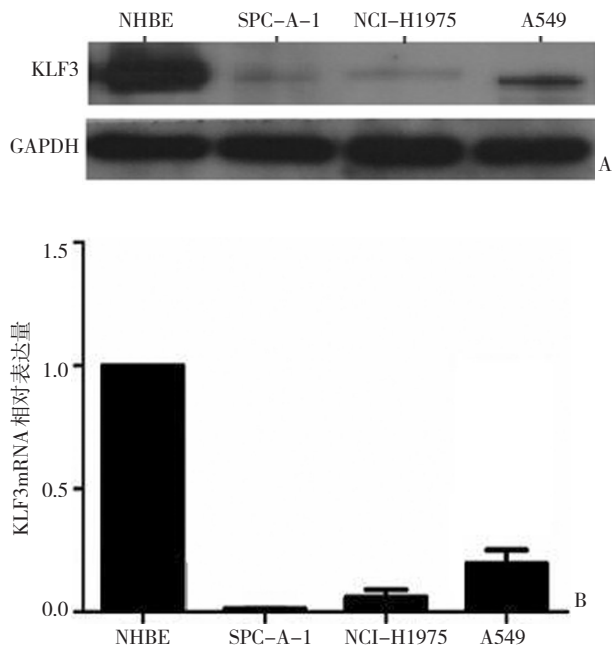
2 结果

2.1 KLF3 在肿瘤细胞和正常细胞中表达的差异

荧光定量 PCR 显示, KLF3 mRNA 与正常支气管上皮细胞株相比明显下降, NHBE 细胞株中 KLF3 比 SPC-A-1 表达增高达 58 倍(图 1A)。Western blot 检测表明,肺腺癌细胞中 KLF3 蛋白水平的表达相对于 NHBE 细胞株中 KLF3 明显下降(图 1B)。

2.2 KLF3 在肺癌组织中表达的变化

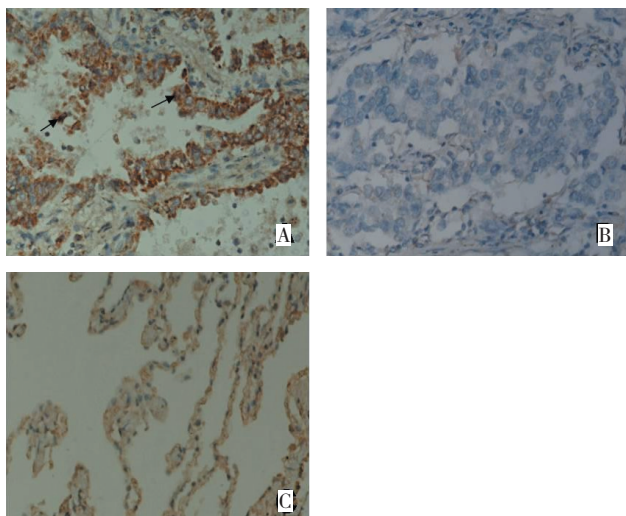
免疫组织化学显示, KLF3 在 5 例正常肺组织中均表达(5/5),大部分表达于肺间质中。而在 72 例肺腺癌患者肿瘤组织标本中,50 例表达阴性或者低表达,占 69.4%;而高表达仅为 22 例,占 30.6%, KLF3 表达以肿瘤细胞胞浆和胞核为主(图 2)。



A: Western blot 分析 KLF3 蛋白在肺腺癌细胞株和正常支气管上皮细胞株中表达的差异; B: 荧光定量 PCR 分析 KLF3 mRNA 在上述细胞中表达的差异

图1 KLF3 在肺腺癌细胞 SPC-A-1, NCI-H1975, A549 及正常支气管上皮细胞株 NHBE 中的表达

Figure 1 Expression of KLF3 in LAC cell lines (SPC-A-1, NCI-H1975 and A549) and in a normal human bronchial epithelial cell line



A: 为肺腺癌中 KLF3 高表达 (×400), 箭头表示 KLF3 主要定位表达与胞核和胞浆; B: KLF3 在肺腺癌中低表达 (×400); C: KLF3 在正常肺组织中为组成性表达 (×400)

图2 KLF3 在肺腺癌组织及正常肺组织中的表达

Figure 2 The expression of KLF3 protein in lung adenocarcinoma and normal lung tissues

2.3 KLF3 在肺癌中表达与临床特征的关系

通过 Mann-Whitney U 检验分析发现, KLF3 表达与肺腺癌患者临床病理分期中的 T、N 和 M 分期明显相关, 表明 KLF3 可能调抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭转移(表2)。

表2 KLF3 表达与患者临床特征相关性分析

Table 2 Correlation between KLF3 expression and clinicopathologic characteristics of patients with LAC

临床特征	KLF3 表达		P
	低表达(例)	高表达(例)	
年龄(岁)	≤65	33	0.857 0
	>65	17	
性别	男	36	0.941 0
	女	24	
吸烟	是	31	0.209 0
	否	19	
临床病理分期	I	4	<0.000 1
	II	19	
	III	20	
	IV	7	
T分期	T1	7	0.004 0
	T2	18	
	T3	25	
	T4	2	
分化程度	低分化	19	0.130 0
	中分化	12	
	高分化	24	
N分期	N0	8	<0.000 1
	N1~3	42	
M分期	M0	33	<0.000 1
	M1	17	

3 讨论

KLF3 最初是从人类造血组织中克隆出来的 KLF1 同系物, 都含有 3 个 C2H2 锌指蛋白结构。由于其 C 端含有大量的碱性氨基酸, 因此称其为碱性 Krüppel 样转录因子 (basic Krüppel-like factor, BKLF)。KLF3 能够募集转录共抑制因子 C 端结合蛋白 (C-terminal binding protein, CtBP), 使其结合在靶基因的启动子区, 从而抑制靶基因的转录^[11]。此外, KLF3 抑制靶基因的表达还与其蛋白发生类泛素化修饰有关^[12]。近年来, 对 KLF3 功能的研究主要集中在其调控红细胞的生成、淋巴细胞的生成及脂肪的形成等^[13-15]。对于其在肿瘤中的研究报道甚少。近年来, 肺腺癌发病率呈上升趋势且其预后较差^[16], 主要原因是肺腺癌细胞的恶性增殖, 早期发生侵袭和转移。由于 KLF 家族广泛参与肿瘤细胞生长和转移的调控过程, 研究 KLF3 在肺腺癌中的作用, 能为肺腺癌的防治提供新的理论依据。

本研究发现, 在肺腺癌细胞株中, KLF3 mRNA 和蛋白表达水平明显降低, 其 mRNA 比正常细胞表达下降达 58 倍。表明 KLF3 在肺腺癌细胞中表达明显被抑制, 与 Humbert 等^[9]报道一致。说明 KLF3 在肺腺

癌中可能是一个抑癌基因。通过对72例肺腺癌组织表明免疫组织化学染色分析发现,KLF3蛋白在肺腺癌组织中低表达或无表达者占69.4%,而高表达患者占30.6%。显示在肺腺癌组织中,KLF3表达被抑制,原因有待于深入研究。然而,KLF3在正常肺组织中均有表达,表明其可能为组成性表达,但多数肺腺癌患者中低表达,显示其可能作为抑癌基因起着作用。进一步分析KLF3表达与患者临床特征的关系发现,KLF3表达与患者临床病理分期,TNM分期明显相关。研究表明,肿瘤T分期主要反映肿瘤体积的大小,而N分期和M分期,主要反映肿瘤细胞侵袭和转移能力。因此,本研究显示,KLF3表达与肿瘤增殖、侵袭和转移均相关,进一步证实了KLF3在肺腺癌中是一个重要的抑癌基因。此外,研究中还发现,在发生淋巴结转移和远处转移的肺腺癌患者的组织标本中,KLF3在肿瘤细胞中的表达定位与未发生者无明显差异,均定位与胞浆和胞核。说明KLF3在肿瘤细胞中的表达定位与肿瘤细胞的恶性生物学行为无明显关系。

总之,研究发现KLF3在肺腺癌中可能是一个重要的抑癌基因,而且与肿瘤的增殖、侵袭和转移相关。提示KLF3可能作为肺腺癌患者预后标志物和新的抗肿瘤治疗的分子靶点。

参考文献

- Jane van V, Linda AC, Kate GRQ, et al. Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors[J]. *Genomics*, 2006, 87(4): 474-482.
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and Krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2001, 188(2): 143-160.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- Wang X, Lu H, Urvalek AM, et al. KLF8 promotes human breast cancer cell invasion and metastasis by transcriptional activation of MMP9[J]. *Oncogene*, 2011, 30(16): 1901-1911.
- 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.
- Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp- and Krüppel-like transcription factors[J]. *Genome Biol*, 2003, 4(2): 206.
- Lomberk G, Urrutia R. The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins[J]. *Biochem J*, 2005, 392(1): 1-11.
- Lyng H, Brøvig RS, Svendsrud DH, et al. Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer[J]. *BMC Genomics*, 2006, 20(7): 268.
- Humbert M, Halter V, Shan D, et al. Deregulated expression of Kruppel-like factors in acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Res*, 2011, 35(7): 909-913.
- Fernandez-Zapico ME, Lomberk GA, Tsuji S, et al. A functional family-wide screening of SP/KLF proteins identifies a subset of suppressors of KRAS-mediated cell growth[J]. *Biochem J*, 2011, 435(2): 529-537.
- Turner J, Crossley M. Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators[J]. *EMBO J*, 1998, 17(17): 5129-5140.
- Perdomo J, Verger A, Turner J, et al. Role for SUMO modification in facilitating transcriptional repression by BKLF[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(4): 1549-1559.
- Kirberg J, Gschwendner C, Dangy JP, et al. Proviral integration of an Abelson-murine leukemia virus deregulates BKLf expression in the hypermutating pre-B cell line 18-81[J]. *Mol Immunol*, 2005, 42(10): 1235-1242.
- Funnell AP, Maloney CA, Thompson LJ, et al. Erythroid Kruppel-like factor directly activates the basic Kruppel-like factor gene in erythroid cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(7): 2777-2790.
- Sue N, Jack BH, Eaton SA, et al. Targeted disruption of the basic Kruppel-like factor gene (Klf3) reveals a role in adipogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(12): 3967-3978.
- Julian R, Molina MD, Ping Y, et al. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship[J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(5): 584-594.

(2012-05-03 收稿)

(2012-06-29 修回)

(本文编辑:贾树明)