

## KLF2 调节内皮细胞功能的研究进展

刘铸容 皮光环

**【摘要】** Krüppel 样转录因子 2 (KLF2) 是 Krüppel 转录因子家族的成员之一, 参与细胞分化和组织发育。最近研究表明 KLF2 在调节血管生理功能中起重要作用, 本文主要概括 KLF2 对血管内皮细胞生物活性的调节。

**【关键词】** Krüppel 样转录因子 2; 血管内皮细胞; 转录调节

**Research progress of Krüppel-like transcription factor 2 in endothelial biology** Liu Zhurong, Pi Guanghuan. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Chuanbei Medical College, Nanchong 637000, China

Corresponding author: Pi Guanghuan, Email: piguanghuan@126.com

**【Abstract】** Krüppel-like factor 2 is one of the members of the zinc finger family of transcription factors that has been implicated as playing key roles in regulating cellular differentiation and tissue development. Over the past several years, studies support an important role of this factor in vascular biology. This review summarized the role of Krüppel-like factor 2 in endothelial cell biology.

**【key words】** Krüppel-like factor 2; Endothelium; Transcription

Krüppel 样转录因子是一类转录调节因子, 具有转录激活和(或)转录抑制作用, 参与细胞增殖、分化以及胚胎发育等多种过程, 目前该家族具有 17 名成员, 在哺乳动物中, 按其发现先后分为 1~17<sup>[1]</sup>。Krüppel 样转录因子 2 (Krüppel-like factor 2, KLF2) 是由 Anderson 等<sup>[2]</sup>于 1995 年首次克隆, 由于最初发现在肺组织中高度表达, 被命名为肺转录因子(lung Krüppel-like factor, LKLF)。既往研究发现 KLF2 参与调节胚胎发育、红细胞分化、抑制脂肪细胞的分化以及维持 T 细胞的静息状态<sup>[3]</sup>, 近年来多项研究表明 KLF2 在调节内皮细胞生物活性中起到重要作用, 成为心血管疾病研究的热点。

### 一、KLF2 的结构特征

KLF2 作为 Krüppel 转录因子家族成员之一, 具有 Krüppel 转录因子家族共同的结构特征, 含有 DNA 结合区和转录调控区, DNA 结合区是羧基末端一段高度保守的区域, 内含 3 个串联的锌指结构, 每个锌指结构由两个半胱氨酸和两个组氨酸螯合一个  $Zn^{2+}$  离子组成, 锌指结构可以与 DNA 分子上

的 GC 盒或 CACCC 序列结合, 对与其结合的 DNA 分子起转录调节作用。相对于高度保守的 DNA 结合区域, 不同的家族成员间氨基末端转录调控区域存在明显的差异, 因而具有不同的转录调控功能。位点分析显示在其启动子区域内有一个长约 75 bp 高度保守的序列, 含有肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancing factor 2, MEF2) 的结合位点, 是调节 KLF2 表达的关键位点<sup>[1]</sup>。KLF2 共编码 355 个氨基酸, 第 1~110 位氨基酸为转录激活区, 第 110~267 位氨基酸为自动抑制区域, 自动抑制区域能够结合泛素连接酶 WWP1 (WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1), 导致 KLF2 蛋白的泛素化和降解<sup>[4]</sup>。

### 二、KLF2 在血管发育中的作用

小鼠血管发育大约开始于胚胎第 7 天 (E7.0), 在血管发育过程中, 来源于中胚层的成血管细胞分化为血管内皮细胞, 血管内皮细胞迁移形成原始血管结构, 这一过程称为血管发育 (vasculogenesis), 内皮细胞增殖并出芽形成毛细血管, 称为血管生成 (angiogenesis), 在血管发育和血管生成的过程中内皮细胞分泌可溶性生长因子及成形成素进而募集管周细胞、血管平滑肌细胞及成纤维细胞形成管壁结构, 对血管起稳固作用<sup>[5]</sup>。

多项研究表明<sup>[5-8]</sup>, KLF2 在血管发育过程中具

有重要作用,在血管发育后期促进血管周围细胞和平滑肌细胞迁移募集,形成管壁结构以稳固新生血管。KLF2 基因缺失将导致管壁细胞迁移障碍,不能维持血管完整性。早在小鼠 E8.5 时,在血管内皮细胞中就可检测出 KLF2 的表达,KLF2<sup>-/-</sup>小鼠大约在 E12.5~E14.5 天出现死亡,死亡鼠胎头部、心输出道周围、腹部以及羊膜腔内可见明显出血,光镜显示脐动、静脉中膜明显变薄,出现动脉瘤样扩张,电镜显示管周细胞减少,平滑肌细胞异常呈立方型,血管基质沉积减少,从形态学角度证实了 KLF2 不影响早期血管发育和血管生成,对血管发育后期血管壁完整性的维持具有重要作用。Dekker 等<sup>[9]</sup>通过慢病毒转染使内皮细胞 KLF2 过表达,研究 KLF2 对内皮细胞表达的 1 800 种基因的影响,发现 KLF2 的超表达对内皮细胞表达的 42 种参与血管发育和血管生成的基因无明显转录调节作用,从基因学角度证实了 KLF2 的缺失不影响血管正常发育。

最近研究表明,KLF2 在保持血管屏障功能中具有重要作用。Chiplunkar 等<sup>[8]</sup>研究发现 KLF2 的缺失使血管内皮细胞之间出现裂隙,内皮细胞形态改变,出现更多球形内皮细胞,可能与 KLF2 的缺失引起紧密连接蛋白闭合蛋白(occludin)表达降低和肌球蛋白磷酸化引起的内皮细胞收缩有关。KLF2 通过调节细胞间一种关键的紧密连接蛋白 occludin 和抑制肌球蛋白磷酸化引起的内皮细胞收缩,有效抵抗炎症刺激诱导的内皮间隙的形成及内皮细胞骨架改变,从而保持内皮细胞屏障的完整性<sup>[10]</sup>。

### 三、对血管内皮细胞生理作用的调节

KLF2 受血流切应力诱导,KLF2 过表达或基因缺失研究显示,KLF2 能直接或间接地调节内皮细胞多种功能基因的表达,参与调节炎症、凝血、血管舒缩和血管生成等多种过程<sup>[9]</sup>。

1. KLF2 的抗炎作用:多项研究表明 KLF2 通过抑制多条炎症信号通路发挥抗炎作用,从而抑制炎症细胞活化、促炎细胞因子的表达、内皮细胞的活化和炎症细胞的黏附。(1) KLF2 通过竞争结合核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 转录所需的转录共激活因子(如 p300/CBP, PCAF),抑制炎症关键通路 NF- $\kappa$ B 和转录因子活化蛋白-1 (activator protein 1, AP-1) 的转录活动,进而抑制单核细胞的活化和巨噬细胞的形成,抑制单核细胞炎症因子如白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、肿瘤

坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 等的表达<sup>[11]</sup>。(2) KLF2 抑制激活转录因子 2 的核内活性,从而抑制下游促炎和促凝基因的表达<sup>[12]</sup>。(3) KLF2 通过抑制 AP-1 降低 Sma 和 SMAD-2 的磷酸化和核定位,进而抑制转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 转录依赖的 SMAD-4 和非依赖的 SMAD-7 活化,抑制 TGF- $\beta$  诱导的多种促炎基因的表达<sup>[13]</sup>。(4) KLF2 还能抑制蛋白激酶活化受体-1 (protease-activated receptor 1, PAR-1),抑制凝血酶诱导的 MCP-1、IL-6 和 IL-8 的表达<sup>[14]</sup>。此外 KLF2 还能抑制 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  等促炎因子诱导内皮细胞活化和内皮细胞黏附分子如 E-选择素、血管细胞黏附分子-1、细胞间黏附分子 1 的表达<sup>[4]</sup>,从而抑制炎症细胞黏附。

2. KLF2 的抗凝作用:生理情况下,内皮细胞表达多种因子抑制血小板聚集和血液凝固,如内皮一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 和血栓调节蛋白 (thrombomodulin, TM),形成内皮抗血栓表型。研究表明,KLF2 的过表达促进抗凝基因 eNOS 和 TM 的表达,抑制细胞因子诱导的促凝基因如组织因子 (tissue factor, TF) 和 PAI-1 的表达,此外 KLF2 的过表达能延长血液凝固时间和增加血流量<sup>[15]</sup>,具有重要的抗凝作用。

3. 血管张力调节:内皮细胞 KLF2 能够调节多种血管张力基因的表达,调节血管舒缩功能。内皮细胞内持续的 KLF2 的表达能够抑制血管紧张素转化酶、内皮素-1、肾上腺素等缩血管基因的表达,促进 eNOS 舒血管基因的表达。相反,使用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 特异性地干扰 KLF2 的表达,能促进缩血管基因内皮素-1、肾上腺素的表达,抑制舒血管基因 eNOS 的表达<sup>[16]</sup>。进一步研究发现,KLF2 可直接与 eNOS 启动子结合,促进其表达<sup>[4]</sup>。

4. 血管生成:内皮细胞的增殖、迁移和形成管状结构是血管生成的关键环节。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在血管生成中起重要作用,VEGF 通过磷酸化血管内皮细胞生长因子受体 2 (VEGFR2) Y951 和 Y1059 位点促进内皮细胞的增殖和迁移。研究表明 KLF2 与 VEGFR2 启动子结合抑制内皮细胞 VEGFR2 表达,此外 KLF2 强有力地诱导细胞迁移抑制因子信号素-3F 的表达,使内皮细胞迁移速度减慢,抑

制血管生成<sup>[8]</sup>。此外 Boon 等<sup>[4]</sup>研究表明, KLF2 能够抑制低氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 的表达, 抑制 HIF-1 诱导的血管生成。相反, 有研究表明, KLF2 能促进血管生成, Meadows 等<sup>[17]</sup>研究发现, 在胚胎中, KLF2 与转录因子家族 ETS (E-twenty six) 相关基因 (ERG) 协同激活 VEGFR2, 促进血管发育。KLF2 能转录调节 VEGF 诱导的内皮集落形成细胞 (endothelial colony-forming cells, ECFCs) 向内皮细胞分化, VEGF 通过活化腺苷酸活化蛋白激酶, 进而磷酸化组蛋白脱乙酰化酶 5 使 KLF2 表达上调, 促进内皮集落形成细胞向内皮细胞分化、迁移和管状结构形成, 促进血管生成<sup>[18]</sup>。因此对于 KLF2 在血管生成中相矛盾的作用, Boon 等<sup>[4]</sup>认为 KLF2 在血管生成中的不同作用可能与血管发育的阶段或位置不同有关。

5. 调节内皮细胞分泌功能: 韦伯潘力氏小体 (Weibel Palade bodies, WPBs) 是内皮细胞的杆状分泌细胞器, 能够分泌多种细胞因子和趋化因子, 包括血浆血管性血友病因子 (von willebrand factor, VWF)、P-选择素、血管紧张素 2、IL-8、嗜酸性细胞趋化因子 3 和内皮素-1, 参与调节血液凝固、血管炎症、血管生成及血管张力。当内皮细胞受凝血酶刺激使细胞内  $Ca^{2+}$  升高或受肾上腺素刺激使细胞内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 升高时, 大部分 WPBs 与内皮细胞膜融合, 引起 WPBs 内的细胞因子释放到血液循环中, 并将 P-选择素暴露在内皮细胞膜外, cAMP 浓度升高能引起小部分 WPBs 在核周微管组织中心聚集<sup>[19]</sup>。Dekker 等<sup>[9]</sup>研究表明 KLF2 能调节凝血酶诱导的 WPBs 的释放, 对肾上腺素诱导的 WPBs 释放无调节作用, 但能抑制肾上腺素引起的 WPBs 核周聚集。Van Agtmaal 等<sup>[19]</sup>进一步研究发现 KLF2 过表达能改变内皮细胞内 WPBs 数目、大小、分布和分泌成分, 慢病毒转染 KLF2 的内皮细胞在无血流条件下培养 7 d, 使内皮细胞内 KLF2 处于稳定的过表达状态, 观察到平均每个内皮细胞内 WPBs 的数目较未转染内皮细胞增加 4.5 倍, 而 WPBs 的长度平均缩短了 0.4  $\mu\text{m}$ , WPBs 分布较未转染内皮细胞更为均匀。免疫荧光图像显示 KLF2 超表达内皮细胞 WPBs 内, VWF 表达增加, IL-8、P-选择素及 IL-6 表达降低, 而无血管紧张素 2 表达, 进一步研究显示, VWF 表达增加并不是通过增加 WPBs 分泌, 而是通过增

加 WPBs 数目使 VWF 有效储存量增加引起<sup>[19]</sup>。

#### 四、KLF2 表达的调节因子

##### (一) KLF2 表达的抑制因子

1. MiR-92a: 微核糖核酸 (microRNAs, miRNAs) 是一种小的非编码 RNA, 通过与靶基因 mRNA 3'端非编码区结合, 抑制蛋白翻译或促进 mRNA 降解, 从而在转录后水平抑制基因的表达。在人脐静脉内皮细胞 MiR-92a 前体 (pre-92a) 过表达能抑制 KLF2 的表达, 进而抑制 KLF2 相关基因 eNOS 和 TM 的表达。相反使用 MiR-92a 抑制剂 anti-92a 能增加 KLF2、eNOS 和 TM 的表达。此外研究还发现, 在 KLF2 mRNA 3'端非编码区含有 MiR-92a 结合位点<sup>[20]</sup>。

2. P53: 研究表明, P53 能够抑制 KLF2 的表达, 促进凝血和损害血管舒缩功能, 从而引起内皮功能障碍。如 P53 的过表达抑制内皮细胞 eNOS 和 TM 表达降低, 而 PAI-1 和内皮素-1 表达升高, 相反, P53 的降表达能使内皮细胞 eNOS 和 TM 表达升高, 而 PAI-1 和 ET-1 表达降低。其作用机制可能是通过与 KLF2 启动子区域的 P53 结合抑制序列特异性的结合, 引起组蛋白 3 脱乙酰化, 进而抑制 KLF2 的表达, 调节 KLF2 相关基因的表达<sup>[21]</sup>。

3. 细胞因子: 细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  能抑制内皮细胞 KLF2 的表达<sup>[22]</sup>, 进一步研究显示 TNF- $\alpha$  可能通过核转录因子 NF- $\kappa$ B (主要是 P56) 和组蛋白去乙酰化酶 4 相互作用抑制了 MEF2, 从而影响 KLF2 的启动<sup>[4]</sup>。

##### (二) KLF2 表达的促进因子

1. 血流切应力 (shear stress): 血液在血管中流动分层流和涡流。血液流动时对内皮细胞产生作用力, 包括层流切应力、脉动切应力和振荡切应力。

血流切应力是诱导生理情况下血管内皮细胞 KLF2 表达的唯一因素<sup>[23]</sup>, 不同的血管部位, 内皮细胞所承受的血流切应力不同, KLF2 的表达不同。在血流紊乱的血管分支和弯曲处, 内皮细胞主要受低/振荡切应力的影响, 内皮细胞 KLF2 低表达。相反, 在血管直段, 血流为层流, 内皮细胞主要受层流切应力作用, 内皮细胞 KLF2 高表达。此外管壁不同层次, KLF2 的表达不同, 血管内膜 KLF2 表达高于血管外膜表达<sup>[16,24]</sup>。

层流切应力是诱导 KLF2 表达最强的血流切应力, 生理状态下血流产生的层流切应力为 5~36  $\text{dyne/cm}^2$ 。当层流切应力在 5  $\text{dyne/cm}^2$  以下时,

KLF2 的表达水平相当于静态培养内皮细胞的表达水平, 当层流切应力  $> 5 \text{ dyne/cm}^2$  时 KLF2 的表达水平可以出现 5~36 倍的升高, 并且 KLF2 表达与层流切应力的大小几乎呈线性关系<sup>[16]</sup>。

血流切应力通过多种机制调节 KLF2 的表达。层流切应力通过磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-Kinase, PI3K) 依赖的染色质重建信号通路调节内皮细胞 KLF2 的表达, 抑制 PI3K 能有效抑制 KLF2 表达<sup>[25]</sup>, 此外层流切应力还可以通过腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 依赖 MEK5/ERK5/MEF2 通路诱导内皮细胞 KLF2 的表达<sup>[20]</sup>。最近, 有研究<sup>[24]</sup>发现血流切应力通过组蛋白脱乙酰化作用调节 KLF2 的表达, 振荡切应力能上调内皮细胞组蛋白脱乙酰化酶-5/7 并促进其核聚集, 引起 MEF2 脱乙酰化, 抑制 KLF2 的表达, 而脉动切应力能诱导内皮细胞组蛋白脱乙酰化酶-5/7 磷酸化依赖的核输出, 促进 KLF2 的表达。

2. MEF2: 研究表明在 KLF2 启动子内存在高度保守的区域, 在这个区域中存在 MEF2 转录因子的结合位点, 在内皮细胞 KLF2 的表达中起重要作用<sup>[21]</sup>, 多项研究显示 MEF2 是调节 KLF2 表达的关键位点<sup>[20,24]</sup>。

综上所述, KLF2 通过多种途径调节内皮细胞的生理功能, 使内皮细胞处于功能静止状态, 具有血管保护功能, 是心血管疾病的研究热点。最近研究发现在动脉粥样硬化、糖尿病及缺血性脑卒中等多种血管性疾病中, KLF2 的表达下降, 采用某种途径增加 KLF2 的表达将有利于血管性疾病的治疗。

#### 参 考 文 献

- [1] Atkins GB, Jain MK. Role of Krüppel-like transcription factors in endothelial biology[J]. *Circ Res*, 2007, 100(12): 1686-1695.
- [2] Anderson KP, Kern CB, Crable SC, et al. Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Krüppel-like factor: identification of a new multigene family[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(11): 5957-5965.
- [3] 熊倩. Sp1/Krüppel 样因子的研究进展[J]. *遗传*, 2010, 32(6): 531-538.
- [4] Nayak L, Lin Z, Jain MK. "Go with the flow": how Krüppel-like factor 2 regulates the vasoprotective effects of shear stress[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(5): 1449-1461.
- [5] Kuo CT, Veselits ML, Barton KP, et al. The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(22): 2996-3006.
- [6] Lee JS, Yu Q, Shin JT, et al. Klf2 is an essential regulator of vascular hemodynamic forces *in vivo*[J]. *Dev Cell*, 2006, 11(6): 845-857.
- [7] Wu J, Bohanan CS, Neumann JC, et al. KLF2 transcription factor modulates blood vessel maturation through smooth muscle cell migration[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(7): 3942-3950.
- [8] Chiplunkar AR, Curtis BC, Eades GL, et al. The Krüppel-like factor 2 and Krüppel-like factor 4 genes interact to maintain endothelial integrity in mouse embryonic vasculogenesis[J]. *BMC Dev Biol*, 2013, 13(1): 40.
- [9] Dekker RJ, Boon RA, Rondaj MG, et al. KLF2 provokes a gene expression pattern that establishes functional quiescent differentiation of the endothelium[J]. *Blood*, 2006, 107(11): 4354-4363.
- [10] Lin Z, Natesan V, Shi H, et al. Kruppel-like factor 2 regulates endothelial barrier function[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(10): 1952-1959.
- [11] Das H, Kumar A, Lin Z, et al. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(17): 6653-6658.
- [12] Fledderus JO, van Thienen JV. Prolonged shear stress and KLF2 suppress constitutive proinflammatory transcription through inhibition of ATF2[J]. *Blood*, 2007, 109(10): 4249-4257.
- [13] Boon RA, Fledderus JO, Volger OL, et al. KLF2 suppresses TGF-beta signaling in endothelium through induction of Smad7 and inhibition of AP-1[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(3): 532-539.
- [14] Lin Z, Hamik A, Jain R, et al. Kruppel-like factor 2 inhibits protease activated receptor-1 expression and thrombin-mediated endothelial activation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(5): 1185-1189.
- [15] Lin Z, Kumar A, SenBanerjee S, et al. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function[J]. *Circ Res*, 2005, 96(5): e48-57.
- [16] Dekker RJ, van Thienen JV, Rohlena J, et al. Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes[J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(2): 609-618.
- [17] Meadows SM, Salanga MC, Krieg PA. Kruppel-like factor 2 cooperates with the ETS family protein ERG to activate Flk1 expression during vascular development[J]. *Development*, 2009, 136(7): 1115-1125.
- [18] Song Y, Li X, Wang D, et al. Transcription factor Krüppel-like factor 2 plays a vital role in endothelial colony forming cells differentiation[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(3): 514-524.
- [19] van Agtmaal EL, Bierings R, Dragt BS, et al. The shear stress-induced transcription factor KLF2 affects dynamics and angiopoietin-2 content of Weibel-Palade bodies[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38399.
- [20] Wu W, Xiao H, Laguna-Fernandez A, et al. Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a[J]. *Circulation*, 2011, 124(5): 633-641.
- [21] Kumar A, Kim CS, Hoffman TA, et al. p53 impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-Like Factor 2[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(1): 133-141.
- [22] Fang Y, Davies PF. Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(4): 979-987.
- [23] Dekker RJ, van Soest S, Fontijn RD, et al. Prolonged fluid shear

stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2)[J]. Blood, 2002, 100(5): 1689-1698.

[24] Lee DY, Lee CI, Lin TE, et al. Role of histone deacetylases in transcription factor regulation and cell cycle modulation in endothelial cells in response to disturbed flow[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(6): 1967-1972.

[25] Huddleson JP, Ahmad N, Srinivasan S, et al. Induction of KLF2 by fluid shear stress requires a novel promoter element activated by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent chromatin-remodeling pathway[J]. J Biol Chem, 2005, 280(24): 23371-23379.

(收稿日期: 2014-01-17)

(本文编辑: 戚红丹)

刘铸容, 皮光环. KLF2 调节内皮细胞功能的研究进展 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (9): 1734-1738.

