

KLF5 对吉西他滨诱导的肺腺癌细胞凋亡的 促进作用及其机制*

董友志, 廖 勇[△]

四川大学华西第二医院 儿科 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 研究 krüppel-like factor 5 基因(KLF5)的表达对吉西他滨诱导的肺腺癌细胞凋亡的影响及分子机制。方法 在体外培养的肺腺癌细胞 H441 中,分别转染 KLF5 表达质粒和空载体对照质粒培养 68 h 后,加入 100 nmol/L 的凋亡诱导药物吉西他滨处理 4 h,使用细胞计数和流式细胞术方法检测细胞增殖和凋亡; Western blot 检测 KLF5 蛋白的表达,RT-PCR 检测 KLF5 及凋亡相关基因 CD95 和 BAX 的表达;免疫荧光染色比较凋亡相关蛋白 Caspase 3 的表达。结果 Western blot 结果证明 KLF5 转染成功。无吉西他滨诱导情况下,KLF5 高表达对 H441 细胞的凋亡无显著影响,CD95 和 BAX 基因的表达差异无统计学意义;吉西他滨诱导情况下,与对照组相比,KLF5 高表达的 H441 细胞中凋亡细胞比例增加($P < 0.05$),CD95 和 BAX 基因的表达上升($P < 0.05$),Caspase 3 的表达上调。结论 在吉西他滨诱导下,体外 KLF5 高表达促进肺腺癌细胞 H441 的凋亡。其机制可能是通过抑制细胞增殖和修复激活 Caspase 3、CD95 和 BAX 等细胞凋亡通路相关蛋白实现。

【关键词】 KLF5 吉西他滨 凋亡 肺腺癌

Promotive Effect and Its Molecular Mechanism of KLF5 on Gemcitabine-induced Apoptosis in Human Lung Adenocarcinoma Cell Line H441 DONG You-zhi, LIAO Yong[△]. Department of Pediatric, Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: keaanu@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of krüppel-like factor 5 (KLF5) overexpression on gemcitabine (GEME)-induced lung adenocarcinoma cell apoptosis and its molecular mechanisms. **Methods** Lung adenocarcinoma cell line H441 were transfected with KLF5 plasmid or control plasmid. 68 h later, cells were treated with 100 nmol/L GEME for 4 h, then cell number counting and flow cytometry were applied to detect cell proliferation and apoptosis; Western blot were used to analyse the expression level of KLF5, RT-PCR were used to analyse the KLF5 gene, apoptosis-related genes CD95 and BAX; Immunofluorescence staining was performed to detect the expression level of apoptosis-related protein Caspase 3. **Results** The overexpressions of KLF5 protein were detected in cultured lung adenocarcinoma cell line H441 cells when KLF5 plasmids were transfected 68 h. Further flow cytometry, overexpression of KLF5 in H441 cell line affected the biological process of apoptosis significantly. No significant changes of apoptosis and expression level of CD95 and BAX in H441 cells were observed by KLF5 overexpression without GEME treatment ($P > 0.05$). Under GEME induction, the proportion of apoptotic cells and expression level of CD95 and BAX were increased significantly in H441 cells by KLF5 overexpression, compared with that of control ($P < 0.05$); The overexpression of KLF5 restrained the proliferation of H441 cells; Immunofluorescence staining of Caspase 3 was also enhanced after KLF5 overexpression. **Conclusion** Under GEME induction, the overexpression of KLF5 promoted the apoptosis of lung adenocarcinoma cell line H441 *in vitro*, possibly through the inhibition of cell proliferation and repair/activation of apoptosis pathway proteins, such as Caspase 3, CD95 and BAX.

【Key words】 Krüppel-like factor 5 Gemcitabine Apoptosis Lung adenocarcinoma

肺癌已经成为人类最常见的恶性肿瘤,2008 年全球范围内约有 161 万新增肺癌病例和 138 万人死

于肺癌^[1]。化疗是临床常用的癌症治疗手段,如应用吉西他滨(gemcitabine, GEME)^[2],其对于肺癌有较好的疗效,它主要是通过抑制肺癌细胞核糖核苷酸还原酶的活性来破坏细胞的增殖,诱导细胞的凋亡。目前,肺癌的化疗主要根据肿瘤节点转移

* 国家自然科学基金(No. 81322001)资助

[△] 通讯作者, E-mail: keaanu@163.com

(TNM)分期系统进行分期,对不同分期的患者采取不同的化疗措施。现在发现,相同分期的肺癌患者化疗后的存活时间和预后往往存在极大的差异^[3]。因此,研究这些差异存在的原因,对延长肺癌患者化疗后的存活时间和改善肺癌患者的预后显得至关重要。

研究发现 krüppel-like factor 5 (KLF5) 为 Krüppel 转录因子家族一员,具 3 个独立的 C2H2 锌指结构,能够结合 DNA 进行转录调控^[4]。在食道癌细胞系中高表达 *KLF5* 基因会影响食道癌细胞的活力和抑制食道癌细胞的增殖^[5]。在肺癌临床研究发现,化疗后预后好的患者都具有较高的 *KLF5* 表达水平^[3]。但是,肺癌中 *KLF5* 对肺癌细胞增殖和凋亡的影响及相关的分子机制还不清楚。因此,本研究选用肺腺癌细胞系 H441 作为体外研究模型,分别研究 GEME 干预前后,*KLF5* 对肺癌细胞 H441 的增殖和凋亡的影响,初步探讨其可能的分子机制,为肺腺癌的临床个性化治疗、预后提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

哺乳动物细胞贴壁培养孵箱 (Thermo Scientific, 美国);凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国);流式细胞仪 (BD, 美国);含 10% 胎牛血清 (Gibico, 美国) 的 1640 细胞培养基 (HyClone, 美国);Lipo 2000 转染试剂 (Life Technologies, 美国);0.25% 胰酶 (Gibico, 美国);细胞计数仪 (Millipore, 美国);细胞总 RNA 提取试剂 TRIzol Reagent (Life Technologies, 美国);RNA 逆转录试剂盒 (Fermentas, 美国);RNA 浓度、纯度检测仪 NANODROP 2000c (Thermo Scientific, 美国);PCR 反应 Mix (Promega, 美国);荧光显微镜 (Olympus, 日本);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (Millipore, 美国);4,6-联脒-2-苯基吡啶 (DAPI, Vector laboratories, 美国);兔抗人 Caspase 3 抗体 (Cell Signaling, 美国);抗兔免疫荧光二抗 Alex 594 (Invitrogen, 美国);增强化学发光底物 ECL (Millipore, 美国);豚鼠抗人 *KLF5* 抗体 (美国辛辛那提儿童医院 Jeffrey A. Whitsett 教授赠送);兔抗人 GAPDH 抗体 (Santa Cruz, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的复苏、培养和处理 用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基,37 °C、5%CO₂ 条件下在 10 cm

培养皿中将 H441 细胞 (美国辛辛那提儿童医院 Jeffrey A. Whitsett 教授赠送) 进行复苏。当 H441 细胞贴壁率约 90% 时,用 0.25% 胰酶消化细胞并传代培养,传代培养到第 90 代时进行实验。

1.2.2 GEME 干预方法 基于既能激活细胞凋亡信号通路,又不明显影响细胞生长状态的原则和前期预实验结果,本研究使用 100 nmol/L GEME^[6] (PBS 溶解) 处理细胞 4 h^[7]。

1.2.3 细胞分组处理及检测指标 空白对照组:无任何干预或转染的 H441 细胞。GEME 组:单独 GEME 干预的 H441 细胞。CON 组:H441 细胞中转染空载体对照质粒;*KLF5* OE 组:H441 细胞中转染 *KLF5* 表达质粒;CON+GEME 组:H441 细胞中转染空载体对照质粒后用 GEME 干预;*KLF5* OE+GEME 组:H441 细胞中转染 *KLF5* 表达质粒后用 GEME 干预。

KLF5 OE 组及 CON 组:GEME 干预前,6 孔板培养皿中每孔加入 2×10^5 个第 90 代的 H441 细胞进行培养,贴壁率约 70% 时,按说明书用 Lipo 2000 转染 *KLF5* 表达质粒 (*KLF5* OE 组) 和空载体对照质粒 (CON 组),2 μg/孔质粒,培养 72 h 后,检测 GEME 干预前 *KLF5* 蛋白的表达 (Western blot),H441 细胞凋亡水平的变化 (流式细胞术),*KLF5* 及凋亡相关基因 *CD95*^[8]、*BAX*^[9] 的表达变化 (RT-PCR)。

GEME 组:6 孔板培养的 H441 细胞贴壁率为 80% 时,用 100 nmol/L GEME 干预 4 h,最后进行 RT-PCR 实验检测凋亡相关基因 *CD95* 和 *BAX* 的表达变化。

CON+GEME 组及 *KLF5* OE+GEME 组:6 孔板培养的 H441 细胞中加入 *KLF5* 表达质粒 (*KLF5* OE+GEME 组) 或空载体对照质粒 (CON+GEME 组),2 μg/孔,转染 68 h 后,用 100 nmol/L GEME 干预 4 h,最后检测 H441 细胞凋亡水平的变化 (流式细胞术)、H441 细胞增殖水平的变化 (细胞计数)、凋亡蛋白 Caspase 3^[10] 的表达变化 (免疫荧光)、*KLF5* 及凋亡相关基因 *CD95*、*BAX* 的表达变化 (RT-PCR)。

1.3 检测方法

1.3.1 Western blot 检测质粒转染后 H441 细胞中 *KLF5* 蛋白的表达 本实验的目的是为了确认 *KLF5* 是否转染成功。取 *KLF5* OE 组和 CON 组细胞,移去 6 孔板中的培养基,并每孔加入 200 μL Loading Buffer 收取 GEME 干预前的细胞蛋白并

转移至 1.5 mL EP 管中 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用(每组 3 个复孔,实验重复 3 次, $n=9$)。

以每孔 20 μL 总蛋白量上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),35 mA,1.5 h。将胶上蛋白经半干转(15 V,30 min)至硝酸纤维素膜(NC)上,NC 膜在含 5% 脱脂奶粉的洗涤液 TBST 中室温封闭 2 h;加一抗(KLF5 抗体 1:5 000,GAPDH 抗体 1:8 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗 3 次,每次 20 min;再加二抗室温孵育 2 h,TBST 洗 3 次,每次 20 min;加适量的 ECL 发光底物反应,经凝胶成像仪成像,图片用 Quantity One 软件分析灰度值。

1.3.2 流式细胞术检测 KLF5 高表达对 GEME 促细胞凋亡的影响 分别取 KLF5 OE 组、CON 组、CON+GEME 组及 KLF5 OE+GEME 组细胞,统计 6 孔板培养皿每孔细胞中凋亡细胞所占比例。0.25%胰酶分别消化收集 6 孔板培养皿中 GEME 干预前和干预后的细胞到 15 mL 离心管, $1\ 000\times g$ 离心 5 min 去上清收集细胞,再每管加 2 mL 预冷 PBS 重悬细胞。 $1\ 000\times g$ 离心 5 min 去上清收集细胞,0.5 mL/管预冷 Binding Buffer 重悬细胞,每管加入 1.25 μL Annexin V-FITC 室温避光孵育 15 min; $1\ 000\times g$ 离心 5 min,去上清收集细胞,0.5 mL/管预冷 Binding Buffer 重悬细胞,每管加入 10 μL Propidium Iodide 混匀(避光),流式细胞仪检测凋亡(所有操作均按照凋亡检测试剂盒说明书进行;每组 3 个复孔,实验重复 3 次, $n=9$)。流式细胞术结果中,Q2 区域为早期凋亡细胞,Q4 区域为晚期凋亡细胞,凋亡细胞所占总细胞的百分比表示细胞凋亡的多少。

1.3.3 细胞计数法检测 KLF5 高表达下 GEME 对 H441 细胞增殖水平的影响 以往的研究^[3]已经表明 KLF5 高表达可促进 H441 细胞的增殖,GEME 可影响肺癌 H441 细胞增殖^[6]。本实验着重分析 KLF5 在 GEME 干预后对 H441 细胞增殖的影响。取 CON+GEME 组及 KLF5 OE+GEME 组细胞,统计 GEME 干预后 6 孔板培养皿中每孔的细胞数量。用 0.25%胰酶分别消化收集 6 孔板培养皿中 GEME 干预后的细胞到 15 mL 离心管, $1\ 000\times g$ 离心 5 min 去上清收集细胞,每管加 2 mL 预冷 PBS 重悬细胞后,用细胞计数仪数每管中的细胞数量(每组 3 个复孔,实验重复 3 次, $n=9$)。

1.3.4 免疫荧光染色检测 KLF5 高表达下 GEME 对凋亡蛋白 Caspase 3^[10]表达的影响 本实验基于流式细胞学检测结果,进一步分析 KLF5 在 GEME

干预后影响细胞凋亡的机制。取 CON+GEME 组及 KLF5 OE+GEME 组细胞:6 孔板培养皿中每孔放入一片直径 1 cm 的圆形无菌玻璃片,再每孔加入 2×10^5 个细胞进行培养,贴壁率约 70%时按照 1.2.1 的细胞处理方法处理细胞,收集 6 孔板培养皿中 GEME 干预后的细胞爬片:取出细胞爬片,预冷 PBS 迅速轻轻清洗一遍,4%(体积分数)甲醛室温固定 30 min,再用预冷 PBS 轻轻清洗一遍(10 min),PBS $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 浸泡保存备用(每组 3 个复孔,实验重复 3 次, $n=9$)。

取出 PBS $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 浸泡保存的细胞爬片,加入 PBST 处理 15 min,4% 驴血清室温封闭处理 2 h,加 Caspase 3 一抗(1:200) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;第 2 d PBS 洗涤后(3 次,每次 10 min),加入荧光二抗(1:200)和 DAPI(1:1 000)室温避光共同孵育 2 h,PBS 避光洗涤(3 次,每次 10 min),mounting medium 封片。荧光显微镜观察并拍照。分布在细胞质的红色荧光,即为凋亡细胞的 Caspase 3 染色,荧光点的强弱和数量代表凋亡发生的程度;蓝色荧光代表细胞核的 DAPI 染色。

1.3.5 RT-PCR 检测 KLF5 高表达下 GEME 对 CD95 和 BAX 表达的影响 由于 CD95^[8] 和 BAX^[9] 是最经典的细胞凋亡标志物,CD95 和 BAX 的表达变化,可直接反映细胞凋亡水平的变化。为此,我们检测了 GEME 干预前和干预后 KLF5 表达量的高低对 CD95 和 BAX 表达的影响。

相关基因的 PCR 引物由生工公司(中国,上海)合成,引物序列、退火温度、产物长度等信息参见表 1。移去 6 孔板培养皿中的培养基,每孔加入 1 mL TRIzol 裂解并收集 GEME 干预前和干预后的细胞到 1.5 mL EP 管,按照 Trizol 说明书分别提取细胞 RNA,用 NANODROP 2000c 检测 RNA 纯度和浓度(每组 3 个复管,实验重复 3 次, $n=9$)。

按照逆转录反应试剂盒说明书,以 1 μg RNA 为模板逆转录获得 cDNA。25 μL PCR 反应体系包括:1 μL cDNA 模板、引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、Mix 12.5 μL 和无菌双蒸水 9.5 μL 。PCR 反应产物经琼脂糖凝胶(10 g/L)电泳后,用凝胶成像系统拍照,图片用 Quantity One 软件进行积分光度(IOD)值分析。以各目的基因条带与 GAPDH 的 IOD 比值计算各基因(KLF5、CD95 和 BAX)相对表达量。

1.4 统计学方法

数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组内数据采用方差

表 1 半定量 PCR 相关引物信息
Table 1 Primer sequences of RT-PCR

	Primer sequence	Annealing temperature	Length of product
CD95	5'-TTGCTGCCATCTGGTAGTGTG-3'	58 °C	75 bp
	5'-TGGTGCAGTGAATGCTCGAAG-3'	58 °C	155 bp
BAX	5'-CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG-3'	56 °C	136 bp
	5'-CCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3'		
KLF5	5'-CCC TTG CAC ATA CAC AATGC-3'	56 °C	121 bp
	5'-GGATGG AGGTGGGGTTAA AT-3'		
GAPDH	5'-TGCCAAATATGATGACATCAAGAA-3'	56 °C	121 bp
	5'-GGAGTGGGTGTCGTGTTG-3'		

分析,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 检测 KLF5 表达

Western blot 检测发现 *KLF5* OE 组的 *KLF5* 蛋白表达水平 (2.25 ± 0.22) 高于 CON 组 (0.03 ± 0.01) ($P < 0.05$), 说明 *KLF5* 质粒转染成功, 在肺腺癌细胞 H441 中呈现出高表达。见图 1。

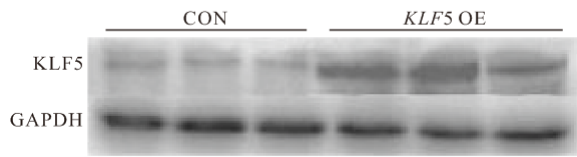


图 1 肺腺癌细胞 H441 中 KLF5 蛋白的高表达

Fig 1 The overexpression of KLF5 in adenocarcinoma cells H441

CON: Control, H441 cells were transfected with empty plasmids as control; *KLF5* OE: *KLF5* overexpression, H441 cells were transfected with *KLF5* plasmids

2.2 KLF5 高表达下 GEME 对 H441 细胞凋亡和增殖的影响

流式细胞术结果显示: GEME 干预前, CON 组和 *KLF5* OE 组凋亡细胞所占比例分别为 $2.71\% \pm 0.42\%$ 和 $2.67\% \pm 0.56\%$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 即 *KLF5* 表达质粒的转染不影响细胞凋亡。*KLF5* 高表达的 *KLF5* OE+GEME 组中凋亡细胞所占比例 ($21.23\% \pm 1.57\%$) 高于 CON+GEME 组 ($13.64\% \pm 1.42\%$) 和 *KLF5* OE 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), *KLF5* 高表达下 GEME 促进细胞凋亡。结果见图 2。

细胞计数结果显示: GEME 干预后 *KLF5* OE+GEME 组细胞数量为 $(5.31 \pm 0.09) \times 10^5$ / 孔, CON+GEME 组细胞数量为 $(5.71 \pm 0.19) \times 10^5$ / 孔, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), *KLF5* 高表达下, GEME 干预的 H441 细胞的增殖减慢。

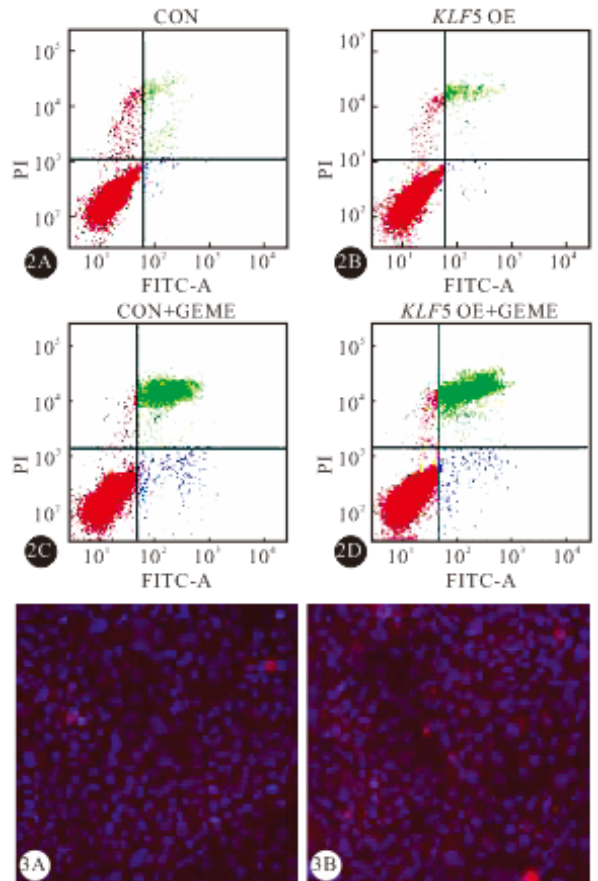


图 2 GEME 诱导下, *KLF5* 高表达对 H441 细胞凋亡的影响的流式细胞图 图 3 *KLF5* 高表达对 H441 细胞凋亡蛋白 Caspase 3 表达的影响。免疫荧光染色 $\times 100$

Fig 2 The effects of *KLF5* overexpression on apoptosis in H441 cells (flow cytometry results) Fig 3 The effect of *KLF5* overexpression on expression of Caspase 3 in H441 cells. Immunofluorescence staining $\times 100$

2A: H441 cells were transfected with empty plasmids; 2B: H441 were cells transfected with *KLF5* plasmids; 2C, 3A: H441 cells were transfected with empty plasmids and treated with GEME; 2D, 3B: H441 cells were transfected with *KLF5* plasmids and treated with GEME

2.3 KLF5 高表达对肺腺癌细胞 H441 中凋亡蛋白 Caspase 3 表达的影响

见图 3。细胞爬片免疫荧光染色结果显示: 在

GEME 干预后,与 CON + GEME 组相比, *KLF5* OE + GEME 组 Caspase 3 的表达增加(图 3 中红色小点)。表明 *KLF5* 促进了 H441 细胞中凋亡相关蛋白 Caspase 3 的表达。

2.4 KLF5 高表达对 H441 细胞凋亡相关基因表达的影响

2.4.1 单独 GEME 干预对凋亡相关基因 *BAX* 和 *CD95* 的表达水平的影响 见表 2,图 4。RT-PCR 结果显示,与空白对照组相比,GEME 组凋亡相关基因 *BAX* 和 *CD95* 的表达水平上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明单独 GEME 干预可上调 H441 细胞中 *BAX* 和 *CD95* 水平。

2.4.2 GEME 干预前 *KLF5* 表达对 *BAX* 和 *CD95* 表达的影响 见表 2,图 4。GEME 干预前, *CD95*

和 *BAX* 在 CON 组和 *KLF5* OE 组表达量无明显区别,差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明 *KLF5* 表达水平不影响 *BAX* 和 *CD95* 的表达。

2.4.3 GEME 干预后 *KLF5* 表达对 *BAX* 和 *CD95* 表达的影响 结果见表 2,图 4。GEME 干预后,与 CON + GEME 组相比, *KLF5* OE + GEME 组 *CD95* 和 *BAX* 的表达上升,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明转染质粒后 GEME 对细胞凋亡的影响增强。与 GEME 组比较,CON + GEME 组的 *CD95* 和 *BAX* 表达未增加 ($P > 0.05$), *KLF5* OE + GEME 组的增加差异有统计学意义($P < 0.05$),说明转染质粒本身对 GEME 促进凋亡结果无影响,是 *KLF5* 高表达促进了 GEME 对凋亡相关基因的上调。

表 2 GEME 干预前后 *KLF5* 对 H441 细胞中 *BAX* 和 *CD95* 表达的影响

Table 2 The relative expression of *BAX* and *CD95* in H441 cells while *KLF5* overexpression under GEME treatment or not

Group	The relative expression of <i>KLF5</i>	The relative expression of <i>CD95</i>	The relative expression of <i>BAX</i>
Blank		0.48 ± 0.04	0.56 ± 0.02
GEME		0.70 ± 0.05*	0.80 ± 0.03*
CON	0.80 ± 0.01	0.62 ± 0.04	0.50 ± 0.04
<i>KLF5</i> OE	1.22 ± 0.05	0.65 ± 0.03	0.53 ± 0.03
CON + GEME	0.64 ± 0.05	0.81 ± 0.03*·▲	0.75 ± 0.04*·▲
<i>KLF5</i> OE + GEME	1.41 ± 0.01	1.38 ± 0.02*·#·△·★·▲	1.31 ± 0.02*·#·△·★·▲

Blank; Blank control, H441 cells were treated with PBS as control; GEME; H441 cells were treated with GEME; CON; Empty plasmid control, H441 cells were treated with empty plasmids as control; *KLF5* OE; H441 cells were treated with *KLF5* plasmids; CON + GEME; H441 cells were treated with empty plasmids and GEME; *KLF5* OE + GEME; H441 cells were treated *KLF5* plasmids and GEME. * $P < 0.05$, vs. blank group; # $P < 0.05$, vs. GEME group; ▲ $P < 0.05$, vs. CON group; △ $P < 0.05$, vs. *KLF5* OE group; ★ $P < 0.05$, vs. CON + GEME group

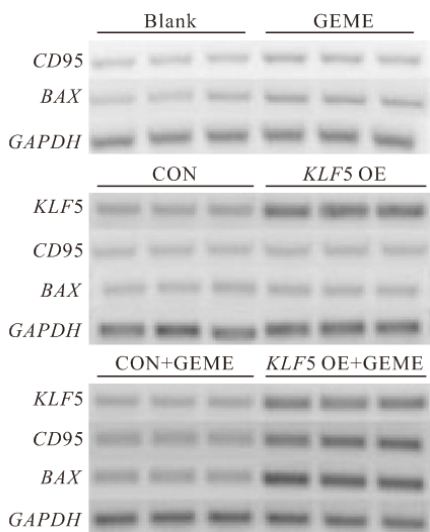


图 4 *KLF5* 高表达对 H441 细胞凋亡相关基因表达的影响

Fig 4 The effects of *KLF5* overexpression on expression of apoptosis related genes in H441 cells

Blank, GEME, CON, *KLF5* OE, CON + GEME, *KLF5* OE + GEME denote the same as table 2

3 讨论

研究肺癌细胞增殖和凋亡的分子生物学机制对肺癌的治疗有着重要的作用。作为发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1],肺癌的发生主要是由肺部细胞增殖、凋亡的失控导致。化疗是肺癌治疗的主要手段之一,化疗药物主要是通过抑制肺癌细胞的增殖和促进肺癌细胞的凋亡两种方式杀死肺癌细胞。肺癌细胞凋亡主要包括胞内(*BAX* 形成同聚二聚体导致线粒体细胞色素 C 的释放和形成凋亡小体,激活 Caspase 蛋白家族实现细胞凋亡^[11])和胞外(通过死亡受体,使 *CD95* 形成死亡诱导信号复合物,激活 Caspase 蛋白家族实现细胞凋亡^[12])两个信号途径。

GEME 是临床常用化疗药物,可通过抑制细胞核糖核苷酸还原酶的活性从而破坏细胞 DNA 的复制和细胞的增殖,最终导致细胞的凋亡,尤其是对非小细胞肺癌有较好的疗效^[13],因此,本实验未再重

复检测 GME 对 H441 细胞凋亡的影响。但对同一 TNM 临床分期的肺腺癌患者, GME 的化疗效果存在较大的差异, 这也是肺癌化疗亟待解决的难题。我们前期进行的生物信息学分析结果显示, KLF5 高表达影响了肺腺癌细胞 H441 的增殖、凋亡等生物学进程。本实验中我们采取了一系列细胞生物学实验, 进一步探索 KLF5 高表达情况下, 化疗药物 GME 干预对肺腺癌细胞 H441 的增殖和凋亡的影响。

本次流式细胞术实验结果发现, KLF5 表达本身对肺腺癌细胞 H441 的凋亡无影响, 但 KLF5 高表达的存在却加剧了 GME 对细胞减缓增殖和促进凋亡的效果。已有的研究发现, 食道癌细胞系 TE2 中, KLF5 的表达会促进 TE2 细胞的失巢凋亡, 从而减少 TE2 细胞的生存能力^[14]。而在小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3 中, KLF5 会促进癌基因 *H-Ras*、*MAPK* 的转化, 从而诱发肿瘤的发生^[15]。肿瘤的发生通常是由于细胞凋亡的缺陷所致。因此, 消灭肿瘤细胞最理想的方法是修复肿瘤细胞的自我凋亡系统, 让肿瘤自我凋亡。而细胞凋亡的发生, 必须具备两个因素: ①引起细胞凋亡的始作俑者, 如 DNA 损伤、癌基因的激活、外界诱导剂的存在(如 GME)等; ②完善细胞凋亡的执行系统, 如 BAX、CD95、Caspase 家族等相关的信号通路等。作为细胞的转录调控因子之一, KLF5 主要在细胞核中调控细胞各种生物学反应。结合本实验的研究发现, 我们推测 KLF5 可能在转录水平上修复了 H441 细胞的凋亡信号通路 CD95 和 BAX(因素 2), 使 H441 细胞在凋亡诱导剂 GME(因素 1)的刺激下, 更容易发生凋亡。

但是, 在人膀胱癌细胞系 TSU-Pr1 中, KLF5 会调控 cyclin D1、cyclin B 和 Cdc2 等的转录表达, 促进 TSU-Pr1 细胞的增殖, 增加 TSU-Pr1 细胞在重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠中的成瘤潜力^[15,16]。根据这些研究报道, 可以发现 KLF5 的复杂细胞生物学功能与细胞的遗传背景密切相关。

我们进一步研究 KLF5 高表达促进 GME 诱导的细胞凋亡的机制发现, GME 干预后, KLF5 促进了肺腺癌细胞 H441 中凋亡相关蛋白 Caspase 3 的表达。Caspase 3 是细胞凋亡的执行人, Caspase 3 的表达暗示细胞的凋亡已经发生^[17]。

我们通过 RT-PCR 实验发现, KLF5 高表达促进了 GME 对凋亡相关基因 CD95 和 BAX 转录表达的上调。由于 CD95 和 BAX 分别是细胞凋亡胞

外信号通路和胞内信号通路中的关键基因^[11,12], 可知 KLF5 激活了肺癌细胞 H441 的两条凋亡信号通路。有研究发现, 在相同分期的肺癌患者中, 化疗效果好的患者, 其肿瘤组织中 KLF5 的表达高于化疗效果差的患者^[3]。本次实验首次从分子生物学水平上解释了这一现象, 为临床上肺癌的放化疗提供了实验依据, 同时也对药物研发有着指导意义。但是, 由于肺癌的类型较多, 加之肺中存在各种类型的组织细胞, 因而肺癌中包含了各种各样的癌细胞, 而本实验只在 H441 这一种肺癌细胞中研究了 KLF5 与凋亡的关系, 对 KLF5 与肺癌细胞凋亡关系的研究只是冰山一角, 要弄清 KLF5 与肺癌细胞凋亡的关系, 还需要大量的工作。而在分子生物学水平上, KLF5 通过何种途径对 CD95 和 BAX 进行转录调控, 他们中间是否还有其它物质的参与, 即 KLF5 具体如何影响肺癌细胞 H441 的增殖和凋亡仍需要进一步深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011;61(2):69-90.
- 2 Patrikidou A1, Sinapi I, Regnault H, *et al.* Gemcitabine and oxaliplatin chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after failure of anti-angiogenic therapies. *Invest New Drugs*, 2014;32(5):1028-1035.
- 3 Meyer SE, Hasenstein JR, Baktula A, *et al.* Krüppel-like factor 5 is not required for K-RasG12 d lung tumorigenesis, but represses ABCG2 expression and is associated with better disease-specific survival. *Am J Pathol*, 2010; 177(3): 1503-1513.
- 4 Bieker JJ. Krüppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem*, 2001;276(37):34355-34358.
- 5 Chen C, Bhalala HV, Qiao H, *et al.* A possible tumor suppressor role of the KLF5 transcription factor in human breast cancer. *Oncogene*, 2002;21(43):6567-6572.
- 6 Samakoglu S, Deevi DS, Li H, *et al.* Preclinical rationale for combining an EGFR antibody with cisplatin/gemcitabine for the treatment of NSCLC. *Cancer Genomics Proteomics*, 2012; 9(2):77-92.
- 7 Wang F, Liu X, Yang P, *et al.* Loss of TACSTD2 contributed to squamous cell carcinoma progression through attenuating TAp63-dependent apoptosis. *Cell Death Dis*, 2014;5:e1133.
- 8 Schickel R, Park SM, Murmann AE, *et al.* miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol Cell*, 2010;38(6):908-915.
- 9 Tanaka R, Ishiyama T, Uchihara T, *et al.* Expression of the Bax inhibitor-1 gene in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*, 2006;106(3):648-653.
- 10 Ho YT, Lu CC, Yang JS, *et al.* Berberine induced apoptosis

- via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. *Anticancer Res*, 2009;29(10):4063-4070.
- 11 Fiandalo MV, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol*, 2012;34(3):165-175.
- 12 Hughes MA, Harper N, Butterworth M, *et al.* Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival. *Mol Cell*, 2009;35(3):265-279.
- 13 Moscetti L, Nelli F, Padalino D, *et al.* Gemcitabine and cisplatin in the treatment of elderly patients with advanced non-small cell lung cancer: impact of comorbidities on safety and efficacy outcome. *J Chemother*, 2005;17(6):685-692.
- 14 Yang Y, Goldstein BG, Chao HH, *et al.* KLF4 and KLF5 regulate proliferation, apoptosis and invasion in esophageal cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 2005;4(11):1216-1221.
- 15 Nandan MO, Yoon HS, Zhao W, *et al.* Krüppel-like factor 5 mediates the transforming activity of oncogenic H-Ras. *Oncogene*, 2004;23(19):3404-3413.
- 16 Nandan MO, Chanchevalap S, Dalton WB, *et al.* Krüppel-like factor 5 promotes mitosis by activating the cyclin B1/Cdc2 complex during oncogenic Ras-mediated transformation. *FEBS Lett*, 2005;579(21):4757-4762.
- 17 Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, *et al.* Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*, 2013;14:32. doi: 10.1186/1471-2121-14-32.

(2014 - 06 - 28 收稿, 2014 - 10 - 13 修回)

编辑 吕 熙

(上接第 34 页)

- 7 Jou CJ, Farber JP, Qin C, *et al.* Afferent pathways for cardiac-somatic motor reflexes in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001;281(6):R2096- R 2102.
- 8 Liu XH, Qin C, Du JQ, *et al.* Diabetic rats show reduced cardiac-somatic reflex evoked by intrapericardial capsaicin. *Eur J Pharmacol*, 2011;651 (1-3):83-88.
- 9 Lewis JW, Baldrighi G, Akil H. A possible interface between autonomic function and pain control: opioid analgesia and the nucleus tractus solitarius. *Brain Res*, 1987;424(1):65-70.
- 10 Randich A, Roose MG, Gebhart GF. Characterization of antinociception produced by glutamate microinjection in the nucleus tractus solitarius and the nucleus reticularis ventralis. *J Neurosci*, 1988;8(12):75-84.
- 11 孔令恒, 孙 娜, 朱娟霞等. 脊髓 NMDA 受体和 NK1 受体在大鼠心脏伤害性感受信息传递中的作用. *四川大学学报(医学版)*, 2013;44(5):722-726.
- 12 Sun N, Liu XH, Du JQ, *et al.* Rostroventral medulla-mediated biphasic modulation of the rat cardiosomatic motor reflex. *Neuroscience*, 2011;185(4):174-182.
- 13 邢 准, 孟凌新, 姚 鹏等. 不同剂量纳洛酮对大鼠鞘内吗啡镇痛效果的影响. *中国疼痛学杂志*, 2008;14(1):55-56.
- 14 姚 鹏, 孟凌新, 崔健君等. 小剂量纳洛酮对术后吗啡静脉镇痛效果及血浆阿片肽浓度的影响. *中华麻醉学杂志*, 2004;24(7):497-500.
- 15 Ueda H, Fukushima N, Kitao T, *et al.* Low doses of naloxone produce analgesia in the mouse brain by blocking presynaptic autoinhibition of enkephalin release. *Neuroscience Lett*, 1986; 65(3):247-252.
- 16 Crain SM, Shen KF. Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine's analgesic potency and attenuate opioid tolerance / dependence liability. *Pain*, 2000;84 (2-3): 121-131.
- 17 Lesscher HM, Bailey A, Burbach JP, *et al.* Receptor selective changes in micro, delta and kappa opioid receptors after chronic naltrexone treatment in mice. *Eur J Neurosci*, 2003; 17(5): 1006-1012.

(2014 - 05 - 16 收稿, 2014 - 09 - 18 修回)

编辑 沈 进