

KLF4 的结构、功能及其与癌症的关系

赵乔佳杰 黄秉仁 陈 虹 陈 等

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

Krüppel 样因子 (Krüppel-like factor, KLF) 是人类组织中广泛表达的锌指型转录因子, 由 Shields 等^[1]于 1996 年在小鼠中发现, 因其与黑腹果蝇的分节蛋白 Krüppel 的 DNA 结合序列具有同源性故而得名。KLF 蛋白在许多不同的生理活动包括细胞增殖、生长、分化和正常组织稳态的维持中具有重要作用。其中 KLF4 在不同的肿瘤组织中可以通过与不同的靶基因作用, 发挥癌基因或者抑癌基因两种完全相反的功能, 在结肠癌、胃癌、皮肤癌、膀胱癌、肝癌中均发现 KLF4 表达降低, 而在原发性乳腺导管癌、口腔鳞癌中 KLF4 表达升高^[2~4]。虽然在不同肿瘤中研究 KLF4 功能的结果不同, 但都指出 KLF4 在肿瘤的发生与发展中具有重要作用。

一、KLF4 的结构

人类 KLF4 基因定位于染色体 9q31, 是一个位于负链的单拷贝基因, 其编码蛋白含有 513 个氨基酸, 分子质量约为 55kDa。KLF4 蛋白是一个具有特定结合位点的转录因子, 其识别的 DNA 模体为 5'-TGGCTGGCC -3'。该蛋白含有 3 个结构域:①DNA 结合结构域——由 3 个位于羧基端的连续的 C2H2 型锌指结构组成;②核定位序列——有两个独立的核定位序列, 且两个核定位序列都能独立有效地将 KLF4 转移至核内;③转录调节结构域——位于氨基端且包含转录活化和转录抑制结构域。

二、KLF4 的生物学功能

KLFs 因子参与调控胚胎发育、细胞增殖、分化、组织形成等重要生命过程, 并与癌症等多种疾病的发生相关。KLF4 作为该家族的成员, 在以上事件中均起到一定作用。而作为一个核转录因子, KLF4 主要

通过直接激活或抑制下游基因的转录而发挥其生物学功能。

1. 在胚胎发育中的作用: 早期研究已经证实 KLF4 广泛表达于多种组织中, 而最近的研究发现 KLF4 对无脊椎动物以及脊椎动物的胚胎发育都具有重要作用。研究人员通过过表达和敲低 KLF4 在整个胚胎发育过程以及动物极帽中, 发现 KLF4 对胚层的分化以及体轴的形成具有重要作用。通过调节 Nodal 通路中配体基因的转录而增强该通路的活性, KLF4 不仅能够刺激神经外胚层和内胚层的分化, 还能维持神经祖细胞的特性。同时 KLF4 通过诱导使外胚层分化为神经的 Dkk1 基因的转录, 而促进神经外胚层的形成^[5]。

2. 在细胞分化中的作用: 在肠道上皮中, KLF4 限制性表达于黏膜终末分化的上皮细胞中, 促进该细胞的分化^[6]。KLF4 能够调节两个基因的转录, 一个基因编码肠上皮细胞的分化标记——肠内碱性磷酸酶, 另一个是 Lama1 基因, 其编码产物为膜蛋白层粘连蛋白 1 (laminin-1)^[7, 8]。在内皮祖细胞分化为内皮细胞的过程中, KLF4 的表达逐渐增强, 并与成熟内皮功能相关。由于 KLF4 主要在胃肠上皮及皮肤表皮中表达, 而且其表达主要集中在分裂后终末分化的上皮中, 因此 KLF4 在细胞分化过程中具有重要作用。亦有实验证明 KLF4 对杯状细胞的分化有特定作用。Katz 等^[9]在对 KLF4^{-/-} 小鼠的研究中发现, 结肠内的杯状细胞数量明显减少, 形态异常, 并且其细胞特异性标记——MUC2 的水平降低。近年来的研究还发现 KLF4 是个多潜能干细胞因子, 和 PBX1 蛋白有协同作用, 并且在 OCT4 和 SOX2 的辅助作用下, 可以上调 NANOG 基因的启动子活性, 而 NANOG 对干细胞活性的维持具有重要作用。KLF4、POU5F1/OCT4、SOX2 和 MYC/c-Myc 是 4 个多潜能干细胞因子, 也称 Yamanaka 因子, 这些因子联合作用足以促进已分化的细胞成为诱导性多能干细胞。因此 KLF4 作为

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81272229)

作者单位: 100005 北京, 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生物化学及分子生物学系、国家医学分子生物学重点实验室

通讯作者: 陈等, 副教授, 电子信箱: chendeng2001@hotmail.com

分化细胞重编程为诱导性多能干细胞的重要诱导因子之一,是该领域研究的热点。这些结果表明 KLF4 在细胞的分化中可能担任着重要的角色。

3. 在细胞增殖中的作用: Shields 等^[1]在研究 NIH3T3 细胞时发现,在生长状态良好的细胞中 KLF4 的表达水平很低,但是当细胞生长受到抑制,如血清饥饿,接触抑制及 DNA 损伤时会诱导 KLF4 的表达,但过表达 KLF4 可抑制 DNA 的合成和细胞的生长^[10]。KLF4 通过调节一些与细胞周期调控及分化相关基因的表达而在细胞的增殖调控中发挥重要作用。KLF4 对很多促进转录的调节基因,以及蛋白质和胆固醇的生物合成相关基因具有抑制作用^[11],这与其抗增殖的作用一致。KLF4 是 G₁/S 期和 G₂/M 期检验点所需的重要因子^[12]。DNA 损伤时,KLF4 对 p21^{Cip1/Waf1} 的诱导激活依赖于 p53,是由于 KLF4 基因的启动子区含有 p53 的结合元件。DNA 损伤后 p53 表达的上调导致 KLF4 表达增加,从而使 p21^{Cip1/Waf1} 的表达上调。此外,KLF4 抑制鸟苷酸脱羧酶的表达,而鸟苷酸脱羧酶是合成对细胞增殖有重要作用的聚胺类分子所需要的酶。因此 KLF4 能够激活细胞周期检验点进而阻止异常细胞周期的继续,对调控细胞增殖具有重要作用。

4. 在组织形成中的作用:有研究表明,KLF4 基因缺失的小鼠虽然其皮肤的组织学特征没有明显的变化,但皮肤的通透性显著增高,新生小鼠在很短的时间内脱水死亡,说明 KLF4 蛋白是皮肤屏障的必须成分。亦有研究证明 KLF4 对中枢神经系统组织的再生功能具有重要的调节作用^[13]。通过基因表达谱检测到一些因子在出生后丧失轴突生长能力的视网膜神经节细胞中上调,其中包括 KLF4 基因。若过表达 KLF4 于视网膜神经节细胞中,能够明显抑制神经突增生,而缺少 KLF4 的视网膜神经节细胞在体内外都能提高轴突生长能力。KLF4 在组织形成中发挥作用的机制有待进一步研究。

5. 在炎症中的作用:近年来研究逐渐发现,KLF4 不仅参与机体炎症反应,并且对炎症有重要的调节作用。Kuhn 等^[14]发现,在气管平滑肌细胞的炎性反应中,由于一些炎性细胞因子,如 IL-1 β 、TNF- α 或 IFN- γ 等的刺激,使气管平滑肌细胞中某些 miRNA 表达受到抑制,其中 miR-25 通过转录后调节作用于 KLF4 并提高其表达水平,进而影响某些受 KLF4 调节的依赖血清反应因子的平滑肌细胞特异基因的表达,以及调节自噬细胞的炎性反应。因此 KLF4 在

肺部纤维化、炎性呼吸道疾病等过程中发挥了一定的作用。而且 Mun 等^[15]发现在层流剪切力的刺激下,KLF4 的表达水平升高,进而诱导内皮细胞琥珀酸合酶 1 的表达,而后者能够调节 L-精氨酸生成一氧化氮合成酶 3 而增强一氧化氮的形成,从而维持机体内抗炎微环境。

三、KLF4 与癌症的关系

KLF4 作为一个转录因子,具有双向调节的功能,在不同的细胞内环境下对不同的靶基因的转录可以是激活或者抑制,因此 KLF4 在不同肿瘤发病过程中即可能是抑癌基因也可能是癌基因。

1. KLF4 作为抑癌基因:KLF4 最初被鉴定为肠道上皮细胞中的生长阻滞相关基因,当其异位表达时能够抑制 DNA 的合成^[1]。在 RKO 结肠癌细胞中诱导表达 KLF4 能够增加 p21^{Cip1/Waf1} 的表达并抑制 G₁/S 细胞周期的进行^[16]。在经放射或者甲磺酸甲酯处理的 DNA 损伤细胞培养模型中,KLF4 被 p53 激活转录,随后通过激活 p21^{Cip1/Waf1} 的转录来控制 G₁/S 以及 G₂/M 细胞周期检验点的通过^[17~19]。同时在 HCT116 结肠癌细胞系中,经 γ 射线照射后需要 KLF4 来阻止中心体扩增,若 KLF4 缺失可能促使染色体不稳定。Yu 等^[20]的研究发现,在结肠癌细胞中,多梳蛋白抑制复合物组分——Bmi1 的表达水平分别受到 Wnt/ β -联蛋白(catelin)信号通路和 KLF4 蛋白的调节。Bmi1 蛋白通过调节组蛋白的泛素化引发染色质重塑及基因沉默。然而在结肠癌细胞中 KLF4 能够作为转录抑制因子直接降低 Bmi1 的表达,同时抑制组蛋白 H2A 的泛素化水平,而这是 KLF4 的一个新功能,这一功能在癌症发生中的重要性还有待深入研究。很多研究结果都证实 KLF4 在肠道上皮的作用是一个肿瘤抑制基因。

Li 等^[21]人通过研究证实 KLF4 对皮肤癌细胞的增殖、迁移和黏附能力具有抑制作用。检测发现在大部分鳞状细胞癌及基底细胞癌组织中,KLF4 的表达降低甚至缺失。同时通过药物刺激 KLF4^{+/+} 和可诱导的 KLF4^{-/-} 敲除的小鼠模型发现,KLF4 的缺失不仅增加了小鼠皮肤癌的患癌率,还提高了癌症的多样性。由此证明在皮肤癌中,KLF4 可能是一个抑癌基因。

近几年的研究发现,与正常组织比较,KLF4 蛋白在原发性肝癌组织中明显降低甚至缺失,同时在检测几种肝癌细胞系时发现,大多数原发性肝癌细胞系中 KLF4 的表达水平显著降低,且 KLF4 缺失的原发性

肝癌患者生存时间亦降低,提示 KLF4 在肝癌中很大程度上作为抑癌基因存在,甚至可以作为肝癌的预后指标。已有报道指出具有生物学活性的维生素 D₃ 通过与其核受体即维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)的结合而发挥抗增殖、抑制血管生成、抗炎、免疫调节以及促凋亡等作用,且在一些癌症中维生素 D₃ 具有抗肿瘤的作用^[22],维生素 D 缺乏或者 VDR 表达失调对肿瘤的形成与发展具有重要作用。进一步的实验证明在肝癌细胞系中 KLF4 能够直接促进 VDR 的转录,但由于 KLF4 启动子高甲基化而表达异常降低,导致 VDR 基因转录活性降低,进而降低细胞对维生素 D₃ 抗增殖效应的敏感度,致使肿瘤的增殖和迁移等能力增强。外源过表达 KLF4 后,能够提升细胞在体外发生间充质-上皮细胞转化的能力,进而抑制细胞的迁移、侵袭和增殖能力。裸鼠移植瘤实验表明,恢复 KLF4 表达能够明显抑制肿瘤的生长速度及转移能力,这一机制可以作为治疗肝癌的新靶点^[23]。另有研究发现 KLF4 在肝癌细胞中能够间接结合到 Slug 基因的启动子上并抑制其转录,而 Slug 基因是一个与上皮细胞-间充质转化相关的重要转录因子,因此在前列腺癌中 KLF4 能够抑制细胞的间充质-上皮细胞转化,进而抑制前列腺癌细胞的转移。对肝癌细胞的形态学研究发现,KLF4 能够抑制肝癌细胞的间充质细胞表型及间充质细胞标记分子 N-cadherin 和 Vimentin 的表达,而促进其上皮细胞表型。其分子机制是 KLF4 通过结合其他转录抑制因子共同抑制 Slug 的转录来调节细胞的间充质-上皮细胞转化进程,进而抑制肝癌细胞的迁移和侵袭能力并发挥其抑癌作用^[24]。以上研究表明在肝癌细胞中 KLF4 能够通过调节不同靶基因的转录影响肝癌的发生和发展,作为肝癌中一个新型抑癌基因,KLF4 的分子机制有待更深入的研究。

也有最新的研究发现,肺癌细胞系中几乎检测不到 KLF4 基因的表达,说明其在肺癌中亦可能发挥抑癌作用。具有转移和侵袭能力是癌细胞的一个特征,实验证明 Numb 基因在肺癌中高表达并抑制 KLF4 的活性,并进一步抑制了由 KLF4 调节的靶基因的表达。若恢复 KLF4 在肺癌细胞中的表达,不仅能够抑制肿瘤细胞的运动能力,还能减少肺癌祖细胞样细胞的数量^[25]。由此可见 Numb-KLF4 信号通路很可能是一个新型的肺癌发生机制。以上证据都充分证明 KLF4 作为抑癌基因并在某些肿瘤中表达降低。

2. KLF4 作为癌基因:很早就有实验证实 KLF4

作为一个癌基因在肿瘤形成中发挥作用。研究人员在 E1A 大鼠肾上皮永生化细胞中检测能够诱导化生的因子时发现 KLF4。KLF4 转化的大鼠肾上皮细胞异种移植到小鼠体内能够形成肿瘤。其次,70% 以上的人类乳腺癌组织中均检测到 KLF4 的过表达。KLF4 的过表达在乳腺导管原位癌阶段十分明显并出现于乳腺癌的早期阶段。最新的一项研究发现,KLF4 在乳腺癌中的高表达及其癌基因的功能可能受到雌激素信号通路的影响,因其首先降低了 VHL 蛋白的水平,而该蛋白能够促进对 KLF4 的泛素化降解,从而稳定并累积 KLF4,随后 KLF4 能够与雌激素受体及其反应元件形成复合物,进而调节靶基因的表达,最终影响细胞增殖及凋亡,并促发肿瘤的形成^[26]。

同时有研究发现, KLF4 的一种剪接体 KLF4α,其与 KLF4 完全定位于核内不同,而是定位于细胞质,并且在前列腺癌细胞中其表达水平明显升高,提示其可能作为一个癌基因在前列腺癌的形成与预后中发挥重要作用^[27]。虽然还不清楚 KLF4 在不同细胞微环境中具有抑癌或促癌作用差异的机制,但是其作为一个具有双向调节作用的转录因子,并广泛参与多种癌症的形成,说明 KLF4 是肿瘤中具有多种功能的重要因子之一。

四、展望

KLF4 蛋白的结构具有高度保守性,其结构决定 KLF4 是一个双向调节的转录因子。KLF4 亦可结合自身的启动子并激活自身表达。在正常的生理活动中,KLF4 参与维持干细胞的全能性,调控细胞增殖,促进正常组织的形成。在肿瘤形成和发展过程中,对于不同的肿瘤具有不同的功能,如在结肠癌、皮肤癌、肺癌等肿瘤中,KLF4 发挥抑癌基因作用,而在乳腺癌、前列腺癌中可能作为癌基因。已有的实验结果表明与正常肝细胞相比,在肝癌细胞中 KLF4 表达明显下降,而过表达 KLF4 能够抑制肝癌细胞的增殖和转移能力,因此在肝癌中 KLF4 更可能是抑癌基因,其低表达与肝癌的发生、发展密切相关,有可能作为肝癌早期诊断的一个候选基因,并对肝癌靶向治疗提供一种新途径。

参考文献

- Christy RJ. Identification and characterization of a gene encoding a Gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest [J]. Biol Chem, 1996, 271(33): 20009-20017
- Chen HY, Lin YM, Chung HC, et al. miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors

- DAPK and KLF4[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(14) : 3631 – 3641
- 3 Yang Y, Goldstein BG, Chao HH, et al. KLF4 and KLF5 regulate proliferation, apoptosis and invasion in esophageal cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(11) : 1216 – 1221
- 4 Foster KW, Frost AR, McKie – Bell P, et al. Increase of GKLF messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(22) : 6488 – 6495
- 5 Cao Q, Zhang X, Lu L, et al. Klf4 is required for germ – layer differentiation and body axis patterning during *Xenopus* embryogenesis[J]. *Development*, 2012, 139(21) : 3950 – 3961
- 6 McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, et al. The diverse functions of Kruppel – like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology[J]. *Bioessays*, 2007, 29(6) : 549 – 557
- 7 Hinnebusch BF, Siddique A, Henderson JW, et al. Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut – enriched Kruppel – like factor[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286(1) : G23 – 30
- 8 Piccinni SA, Bolcato – Bellemin AL, Klein A, et al. Kruppel – like factors regulate the Lama1 gene encoding the laminin alphal chain [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10) : 9103 – 9114
- 9 Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, et al. The zinc – finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon[J]. *Development*, 2002, 129(11) : 2619 – 2628
- 10 Yet SF, Human EZF, a Kruppel – like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression Domains[J]. *Biol Chem*, 1998, 273 (2) : 1026 – 1031
- 11 Whitney EM, Ghaleb AM, Chen X, et al. Transcriptional profiling of the cell cycle checkpoint gene krüppel – like factor 4 reveals a global inhibitory function in macromolecular biosynthesis[J]. *Gene Expr*, 2006, 13:85 – 96
- 12 Rowland BD, Bernards R, Peepo DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context – dependent oncogene[J]. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(11) : 1074 – 1082
- 13 Moore DL, Blackmore MG, Hu Y, et al. KLF family members regulate intrinsic axon regeneration ability [J]. *Science*, 2009, 326 (5950) : 298 – 301
- 14 Kuhn AR, Schlauch K, Lao R, et al. MicroRNA expression in human airway smooth muscle cells: role of miR – 25 in regulation of airway smooth muscle phenotype[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42 (4) : 506 – 513
- 15 Mun GI, Boo YC. A regulatory role of Kruppel – like factor 4 in endothelial argininosuccinate synthetase 1 expression in response to laminar shear stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420 (2) : 450 – 455
- 16 Chen X, Johns DC, Geiman DE, et al. Kruppel – like factor 4 (gut – enriched Kruppel – like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (32) : 30423 – 30428
- 17 Yoon HS, Chen X, Yang VW. Kruppel – like factor 4 mediates p53 – dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(4) : 2101 – 2105
- 18 Yoon HS, Ghaleb AM, Nandan MO, et al. Krüppel – like factor 4 prevents centrosome amplification following gamma – irradiation – induced DNA damage[J]. *Oncogene*, 2003, 24(25) : 4017 – 4025
- 19 Zhang W, Geiman DE, Shields JM, et al. The gut – enriched Kruppel – like factor (Kruppel – like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(24) : 18391 – 18398
- 20 Yu T, Chen X, Zhang W, et al. Regulation of the potential marker for intestinal cells, Bmi1, by beta – catenin and the zinc finger protein KLF4: implications for colon cancer[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(6) : 3760 – 3768
- 21 Li J, Zheng H, Yu F, 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
- 22 Evans PM, Chen X, Zhang W, et al. KLF4 interacts with beta – catenin/TCF4 and blocks p300/CBP recruitment by beta – catenin [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(2) : 372 – 381
- 23 Li Q, Gao Y, Jia Z, et al. Dysregulated Kruppel – like factor 4 and vitamin D receptor signaling contribute to progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(3) : 799 – 810 e791 – e792
- 24 Lin ZS, Chu HC, Yen YC, et al. Kruppel – like factor 4, a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cells reverts epithelial mesenchymal transition by suppressing slug expression [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8) : e43593
- 25 Vaira V, Favarsani A, Martin NM, et al. Regulation of lung cancer metastasis by Klf4 – Numb – like signaling[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8) : 2695 – 2705
- 26 Hu D, Zhou Z, Davidson NE, et al. Novel insight into KLF4 proteolytic regulation in estrogen receptor signaling and breast carcinogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(17) : 13584 – 13597
- 27 Le Magnen C, Bubendorf L, Ruiz C, et al. Klf4 transcription factor is expressed in the cytoplasm of prostate cancer cells[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(4) : 955 – 963

(收稿日期:2013-11-08)

(修回日期:2013-11-26)