



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.03.011
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.03.011
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(3):370-374.

· 基础研究 ·

Krüppel 样转录因子 9 在胰腺癌中的表达及其临床意义

张建新¹, 李冉², 吕莉慧³, 孙康¹, 党胜春¹, 毛正发¹

(1. 江苏大学附属医院 普通外科, 江苏 镇江 212001; 2. 江苏大学临床医学院, 江苏 镇江 212013; 3. 南京军区总医院 干部保健科, 江苏 南京 210002)

摘要

目的: 探讨 Krüppel 样转录因子 9 (KLF9) 在胰腺癌中的表达并探讨其与胰腺癌患者临床病理参数、预后的关系。

方法: 收集 200 例配对的胰腺癌组织与癌旁组织标本, 分别用 RT-PCR (28 对)、Western blot (4 对) 和免疫组化 (全部标本) 检测 KLF9 的表达, 分析 KLF9 的表达水平与患者临床病理参数以及生存率的关系。

结果: RT-PCR 结果显示, 在 28 例配对标本中, 21 例 (75%) 胰腺癌组织中 KLF9 mRNA 的表达水平明显低于其癌旁正常胰腺组织。Western blot 结果显示, 与癌旁正常胰腺组织比较, 胰腺癌组织中 KLF9 蛋白表达水平明显下调。免疫组化显示, 在胰腺癌组织中 KLF9 的染色强度明显减弱。与患者临床病理参数关系分析结果显示, KLF9 的表达水平与肿瘤的分化程度 ($P=0.008$) 和血管侵犯 ($P=0.006$) 有关。生存分析显示, KLF9 阳性表达患者 1、2、3 年总生存率明显高于 KLF9 阴性表达患者 (41%、31%、16% vs. 18%、6%、6%)、中位生存时间明显长于 KLF9 阴性表达患者 (21.05 个月 vs. 11.82 个月) (均 $P<0.05$)。

结论: KLF9 在胰腺癌中表达下调, 且可能与不良预后密切相关。

关键词

胰腺肿瘤; Krüppel 样转录因子类; 预后
中图分类号: R735.9

Krüppel-like transcription factor 9 expression in pancreatic cancer and its clinical significance

ZHANG Jianxin¹, LI Ran², LU Lihui³, SUN Kang¹, DANG Shengchun¹, MAO Zhengfa¹

(1. Department of General Surgery, the Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001 China; 2. College of Clinic Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China; 3. Department of Health Care for Senior officers, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of Krüppel-like transcription factor 9 (KLF9) in pancreatic cancer tissue and its association with clinicopathologic features and prognosis of pancreatic cancer patients.

Methods: The specimens of 200 paired pancreatic cancer and adjacent pancreatic tissues were collected. The KLF9 expressions in these specimens were determined by RT-PCR (28 pairs), Western blot (4 pairs),

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81502372); 江苏省自然科学基金 (青年科技人才专项资金) 资助项目 (BK20130475); 江苏省镇江市社会发展科技支撑资助项目 (SH2013032; SH2014035)。

收稿日期: 2016-01-12; **修订日期:** 2016-02-20。

作者简介: 张建新, 江苏大学附属医院主任医师, 主要从事普通外科方面的研究。

通信作者: 毛正发, Email: mzf1984@sina.com

and immunohistochemical staining (all specimens), respectively, and the relations of KLF9 expressions with clinicopathologic features and postoperative survival of the patients were also analyzed.

Results: The results of RT-PCR showed that the KLF9 mRNA expression level in pancreatic cancer tissue was remarkably lower than that in its adjacent pancreatic tissue in 21 of 28 paired specimens (75%). The results of Western blot showed that the KLF9 protein expression was obviously down-regulated in pancreatic cancer tissue compared with its adjacent pancreatic tissue. The results of immunohistochemical staining showed the KLF9 expression intensity was remarkably weaker in pancreatic cancer tissue than that in adjacent pancreatic tissue. The results of analyses of the relationship between KLF9 expression and clinicopathologic variables showed that the KLF9 expression level was significantly related to degree of tumor differentiation ($P=0.008$) and vascular invasion ($P=0.006$). Survival analysis showed that the 1-, 2- and 3-year overall survival rate in patients with positive KLF9 expression was significant higher than that in patients with negative KLF9 expression (41%, 31%, 16% vs. 18%, 6%, 6%), and the median survival time in patients with positive KLF9 expression was significant longer than that in patients with negative KLF9 expression (21.05 months vs. 11.82 months) (all $P<0.05$).

Conclusion: KLF9 expression is decreased in pancreatic cancer, which is closely related to malignant unfavorable prognosis.

Key words Pancreatic Neoplasms; Kruppel-Like Transcription Factors; Prognosis

CLC number: R735.9

胰腺癌是一种常见恶性肿瘤,近年我国的发病率逐渐增加,预后极差^[1-3]。对于胰腺癌患者,目前治愈的唯一方法是手术切除,但是大多数患者确诊时局部已不能手术或已有远处转移,只有20%~30%的患者可以接受手术切除。即使在这部分手术的患者中,5年生存率只有15%~20%^[4-5]。

有研究表明多种基因的改变参与了胰腺癌的发生发展, Krüppel样转录因子9 (Krüppel-like transcription factor 9, KLF9) 即是其中一种重要基因。KLF9是一个重要的核转录因子,在高等哺乳动物和人类的组织中高度保守且广泛表达,如脑、肝、子宫等^[6-8]。越来越多的证据表明, KLF9不但参与许多重要的生物学事件中,如细胞增殖生长^[9]、免疫反应^[10]等,同时其与多种肿瘤的发生和发展密切相关^[11-14]。

但是KLF9在胰腺癌发生过程中的功能及分子机制目前尚不清楚。本研究检测了其在人胰腺癌中的表达并探讨其与临床参数之间的关系,提示其可能参与了胰腺癌的发生发展过程。

1 材料与方法

1.1 材料

KLF9抗体购自美国Santa Cruz公司。收集复旦大学附属中山医院2005—2009年病理诊断为胰

腺癌的手术切除标本例,其中男86例,女64例;年龄35~81岁。距肿瘤3 cm以上正常组织取为对照组织(病理证实非肿瘤组织)。所有患者术前均未行放、化疗。将本组胰腺癌按部位分为胰头颈和胰体尾。胰腺癌组织学类型均为导管腺癌;癌细胞分化为高、中、低,胰腺癌的临床分期根据美国癌症联合委员会(AJCC)的TNM分期为I~IV期。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量PCR (real time PCR, RT-PCR) 使用RT-PCR检测KLF9的表达时,引物序列如下:正向引物5'-ACA GTG GCT GTG GGA AAG TC-3';反向引物5'-TCA CAA AGC GTT GGC CAG CG-3'。 β -actin引物序列如下:正向引物5'-GAT CAT TGC TCC TCC TGA GC-3';反向引物5'-ACT CCT GCT TGC TGA TCC AC-3'。使用20 μ L体积的Light-Cycler-DNA Master SYBR Green I Mix进行扩增反应。反应条件设置如下:95 $^{\circ}$ C 3 min,接下去反应40个循环:94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min。

1.2.2 Western blot法检测 收集培养细胞用冷PBS洗涤2次,于冰上加入含蛋白酶体抑制剂的RIPA蛋白裂解液,裂解,于4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心15 min,取上清液。Bradford法检测蛋白浓度,加入6 \times 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 5 min煮沸变性。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜至PVDF膜,5%

脱脂奶粉封闭过夜。一抗4℃孵育过夜，碱性磷酸酶标记的二抗孵育1h，ECL发光试剂盒显影，暗室中X光片曝光成像。

1.2.3 免疫组化检测 胰腺癌组织和正常胰腺组织经10%的福尔马林固定脱水，常规石蜡包埋后，4μm厚的连续石蜡切片。采用ABC法进行免疫组织化学的检测，苏木精复染核。IgG代替KLF9做一抗，检测KLF9的特异性。阳性定位于胰腺癌细胞核，细颗粒状。胰腺癌细胞KLF9表达强度判断：染色阳性细胞<5%为0分，11%~25%为1分，26%~50%为2分，51%~75%为3分，>75%为4分。染色强度淡黄为1分，黄为2分，棕黄为3分。阳性细胞数与染色强度相乘，≤6分为低表达，>6分为高表达。

1.3 统计学处理

实验数据用SPSS 16.0软件对数据进行处理，病理相关性分析采用Pearson检验，以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 胰腺癌、癌旁组织中KLF9 mRNA的表达检测

为了研究KLF9在胰腺癌中的表达情况，首先在28对胰腺癌组织及癌旁正常组织中采用RT-PCR方法分别检测KLF9 mRNA的表达。KLF9的表达水平用KLF9与内参基因 β -actin的比值来表示，以此来修正RNA量不同带来的差异。结果显示，与癌

旁正常胰腺组织相比，胰腺癌组织中KLF9 mRNA的表达明显下调(21/28, 75%) (图1)。

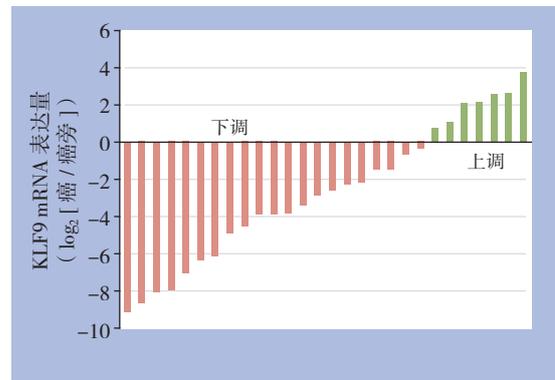


图1 RT-PCR检测28个配对标本中KLF9 mRNA表达
Figure 1 KLF9 mRNA expressions in 28 paired specimens detected by RT-PCR

2.2 胰腺癌、癌旁正常组织中KLF9蛋白的表达检测

为了进一步证实低表达的KLF9的mRNA水平是否伴有蛋白水平的减少，随机选择了4对组织标本进行Western blot检测。结果显示，在配对的胰腺组织中，KLF9的蛋白表达水平与RT-PCR检测出的mRNA水平相平行(图2A)。此外，免疫组化检测(200对胰腺癌组织和配对的正常的胰腺组织)结果显示，与正常胰腺组织相比，胰腺癌组织中KLF9的染色强度明显减弱(图2B)。

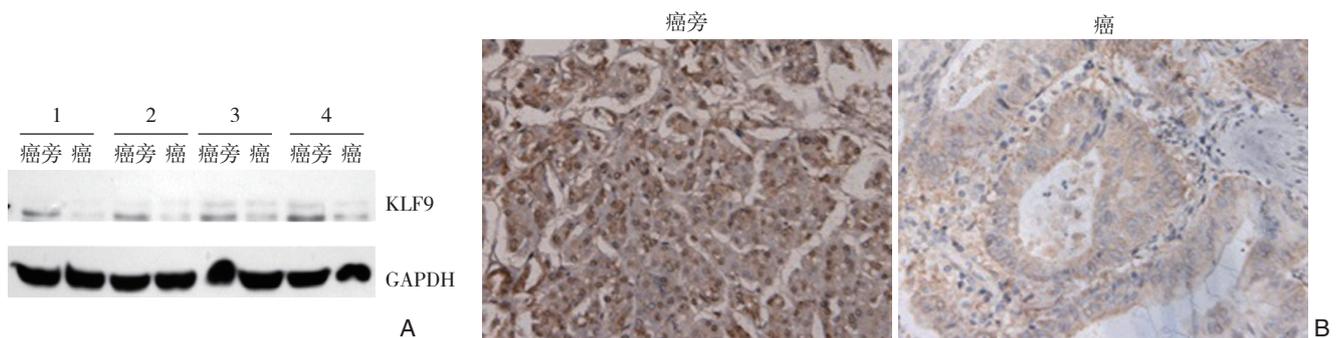


图2 KLF9的蛋白表达水平检测
Figure 2 Measurement of KLF9 protein expression
A: Western blot 检测; B: 免疫组化检测(×200)
A: Western blot analysis; B: Immunohistochemical staining(×200)

2.3 KLF9的表达与胰腺癌临床病理参数之间的关系

分析免疫组化KLF9的表达水平与患者临床参数之间的关系，结果表明，KLF9的表达水平与肿瘤的分化程度和血管侵犯有关($P<0.05$)，但是

与患者性别、年龄、肿瘤位置、TNM分期、神经侵犯及淋巴结转移无关($P>0.05$) (表1)。

2.4 KLF9的表达与胰腺癌患者术后生存间的关系

术后111例患者获随访，随访时间16~60个月。Kaplan-Meier生存曲线显示KLF9阳性患者1、2、

3年总生存率分别为41%、31%、16%，中位生存期21.05个月；KLF9阴性患者1、2、3年总生存率分别为18%、6%、6%，中位生存期11.82个月。两组患者总生存率的比较，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图3)。

表1 KLF9表达水平与临床病理参数之间的关系 [n (%)]
Table 1 Relations of KLF9 expression level with clinicopathologic variables [n (%)]

临床参数	n	KLF9		P
		高表达	低表达	
性别				
男	86	31 (36.0)	55 (64.0)	0.832
女	64	22 (34.4)	42 (65.6)	
年龄(年)				
< 60	72	28 (38.9)	44 (61.1)	0.381
≥ 60	78	25 (32.1)	53 (67.9)	
肿瘤部位				
头颈	111	40 (36.0)	71 (64.0)	0.761
体尾	39	13 (33.3)	26 (66.7)	
分化程度				
高	5	5 (100.0)	0 (0)	0.008
中	96	33 (34.4)	63 (65.6)	
低	49	15 (30.6)	34 (69.4)	
TNM分期				
I+II	89	32 (36.0)	57 (64.0)	0.847
III+IV	61	21 (34.4)	40 (65.6)	
神经侵犯				
无	38	15 (39.5)	23 (60.5)	0.537
有	112	38 (33.9)	74 (66.1)	
血管侵犯				
无	133	52 (39.1)	81 (60.9)	0.006
有	17	1 (5.9)	16 (94.1)	
淋巴结转移				
无	90	32 (35.6)	58 (64.4)	0.994
有	60	21 (35.0)	39 (65.0)	

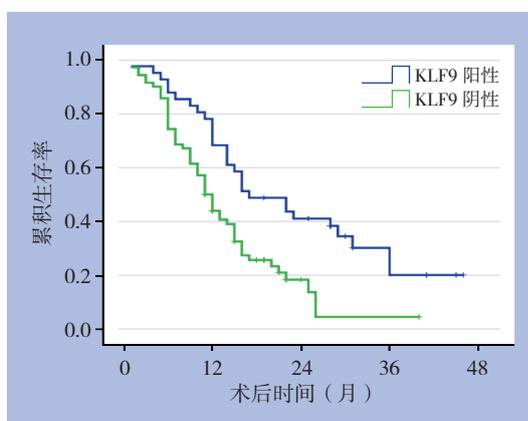


图3 KLF9阳性与阴性患者生存曲线比较

Figure 3 Comparison of the survival curves between patients with positive and negative KLF9 expression

3 讨论

胰腺癌的恶性程度高，预后极差，存活率极低，其发生发展与多种癌基因过度表达以及肿瘤抑制基因失活密切相关。KLF9属于KLFs转录因子家族成员之一^[15]，在肿瘤中研究发现，KLFs的作用是条件依赖性^[16]，对于肿瘤其具有肿瘤抑制作用和原癌基因的作用^[17-18]。最近有研究^[19]表明在食管中KLF9的表达下调并其可以与TCF4结合抑制 β -catenin/TCF信号通路，从而发挥肿瘤抑制作用；在结直肠癌中，与正常组织相比，KLF9转录及蛋白水平明显下调^[20]；在子宫内膜癌中，与II~IV期的肿瘤相比，正常组织及I期肿瘤中，KLF9的表达也明显下调。在这些肿瘤中，过表达KLF9后，检测到了肌动蛋白骨架蛋白的调节因子下游分子的抑制^[21]。然而KLF9在胰腺癌中的表达罕有研究。

本研究通过RT-PCR法分别检测28例胰腺癌组织及配对癌旁组织中KLF9 mRNA水平，与结肠癌中检测结果相似，与正常胰腺组织相比，胰腺癌组织中KLF9 mRNA的表达水平明显下调(21/28)。提示KLF9可能参与了胰腺癌的发生发展。随后在Western blot法检测4例胰腺癌组织及配对癌旁组织，结果发现，与正常对照胰腺组织相比，胰腺癌组织中KLF9蛋白表达水平明显下降。进一步用免疫组化法检测发现，胰腺癌组织基因片(含200对胰腺癌组织和配对的正常的胰腺组织)免疫组织化学显示，KLF9在胰腺癌组织中的染色强度明显减弱。该研究结果表明无论在基因还是蛋白水平上，KLF9与胰腺癌的发生均有关。结肠癌中研究结果显示KLF9表达与结直肠癌患者临床病理参数(肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移、肿瘤部位)无关(均 $P > 0.05$)。我们免疫组化统计分析结果显示KLF9的表达水平与肿瘤的分化程度和血管侵犯有关(均 $P < 0.05$)，但是与患者性别、年龄、肿瘤位置、TNM分期、神经侵犯及淋巴结转移无关(均 $P > 0.05$)。本研究分析了胰十二指肠切除术后的患者KLF9的表达情况与患者预后的关系。结果显示标本中KLF9阳性表达的患者的生存率明显高于KLF9阴性表达的患者($P < 0.05$)。

本研究显示KLF9在胰腺癌中处于低表达状态，其是否参与胰腺癌的抑制机制尚不清楚，还需要大量的实验研究进行验证，然而KLF9在胰腺癌

中的低表达为胰腺癌的抑制机制提供了新的思路。

参考文献

- [1] 李洪波, 刘崇忠. 胰头十二指肠切除术联合替吉奥治疗胰腺癌的临床观察[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(9):1232-1236.
Li HB, Liu CZ. Clinical observation of pancreaticoduodenectomy combined with tegafur/gimeracil/oteracil (S-1) adjuvant chemotherapy for pancreatic cancer[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(9):1232-1236.
- [2] 刘博, 戚诚, 刘学臣, 等. AFAP-1L2对胰腺癌细胞侵袭及转移的影响及机制[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(9):1257-1262.
Liu B, Qi C, Liu XC, et al. Influence of AFAP-1L2 on invasion and metastasis of pancreatic cancer cells and the mechanism[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(9):1257-1262.
- [3] 宁振, 谭广, 巩鹏, 等. 胰腺癌分子病理学研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(9):1253-1257.
Ning Z, Tan G, Gong P, et al. Progression on molecular pathology of pancreatic cancer[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(9):1253-1257.
- [4] 王飞通, 周兵, 刘小云, 等. 吉西他滨诱导胰腺癌细胞ABCG2表达其化疗耐药的关系研究[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(3):324-328.
Relationship between ABCG2 expression induction and chemoresistance of gemcitabine in pancreatic cancer cells[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(3):324-328.
- [5] DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(4):252-271.
- [6] Heard ME, Simmons CD, Simmen FA, et al. Krüppel-like factor 9 deficiency in uterine endometrial cells promotes ectopic lesion establishment associated with activated notch and hedgehog signaling in a mouse model of endometriosis[J]. Endocrinology, 2014, 155(4):1532-1546.
- [7] Ohguchi H, Tanaka T, Uchida A, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α contributes to thyroid hormone homeostasis by cooperatively regulating the type 1 iodothyronine deiodinase gene with GATA4 and Krüppel-like transcription factor 9[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(12):3917-3931.
- [8] Ying M, Sang Y, Li Y, et al. Krüppel-Like Family of Transcription Factor 9, a Differentiation-Associated Transcription Factor, Suppresses Notch1 Signaling and Inhibits Glioblastoma-Initiating Stem Cells[J]. Stem Cells, 2011(1):20-31.
- [9] Pabona JM, Velarde MC, Zeng Z, et al. Nuclear receptor co-regulator Krüppel-like factor 9 and prohibitin 2 expression in estrogen-induced epithelial cell proliferation in the mouse uterus[J]. J Endocrinol, 2009, 200(1):63-73.
- [10] Pabona JM, Simmen FA, Nikiforov MA, et al. Krüppel-like factor 9 and progesterone receptor coregulation of decidualizing endometrial stromal cells: implications for the pathogenesis of endometriosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(3):E376-392.
- [11] Fu DZ, Cheng Y, He H, et al. The fate of Krüppel-like factor 9-positive hepatic carcinoma cells may be determined by the programmed cell death protein 5[J]. Int J Oncol, 2014, 44(1):153-160.
- [12] Shen P, Sun J, Xu G, et al. KLF9, a transcription factor induced in flutamide-caused cell apoptosis, inhibits AKT activation and suppresses tumor growth of prostate cancer cells[J]. Prostate, 2014, 74(9):946-958.
- [13] Huang Y, Ju B, Tian J, et al. Ovarian cancer stem cell-specific gene expression profiling and targeted drug prescreening[J]. Oncol Rep, 2014, 31(3):1235-1248.
- [14] Ying M, Tilghman J, Wei Y, et al. Krüppel-like factor-9 (KLF9) inhibits glioblastoma stemness through global transcription repression and integrin α 6 inhibition[J]. J Biol Chem, 2014, 289(47):32742-32756.
- [15] Bieker JJ. Krüppel-like factors: three fingers in many pies[J]. J Biol Chem, 2001, 276(37):34355-34358.
- [16] 张能, 王子卫. Wnt/ β -catenin 通路与KLF4在胃肠道肿瘤中的作用及其机制[J]. 中国普通外科杂志, 2011, 20(10):1109-1112.
Zhang N, Wang ZW. The role of Wnt/ β catenin pathway and KLF4 on gastrointestinal tumors and its mechanism[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2011, 20(10):1109-1112.
- [17] Yori JL, Johnson E, Zhou G, et al. Krüppel-like Factor 4 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition through Regulation of E-cadherin Gene Expression[J]. J Biol Chem, 2010, 285(22):16854-16863.
- [18] Yori JL, Seachrist DD, Emhonta J, et al. Krüppel-like factor 4 inhibits tumorigenic progression and metastasis in a mouse model of breast cancer[J]. Neoplasia, 2011, 13(7):601-610.
- [19] Qiao F, Yao F, Chen L, et al. Krüppel-like factor 9 was down-regulated in esophageal squamous cell carcinoma and negatively regulated beta-catenin/TCF signaling[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(3):280-291.
- [20] Kang L, LüB, Xu J, et al. Downregulation of Krüppel-like factor 9 in human colorectal cancer[J]. Pathol Int, 2008, 58(6):334-338.
- [21] Simmen FA, Su Y, Xiao R, et al. The Krüppel-like factor 9 (KLF9) network in HEC-1-A endometrial carcinoma cells suggests the carcinogenic potential of dys-regulated KLF9 expression[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2008, 6(1):41.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 张建新, 李冉, 吕莉慧, 等. Krüppel样转录因子9在胰腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(3):370-374. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.03.011

Cite this article as: Zhang JX, Li R, Lu LH, et al. Krüppel-like transcription factor 9 expression in pancreatic cancer and its clinical significance[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(3):370-374. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.03.011