

## KLF6在非小细胞肺癌组织中表达的探讨

张成元<sup>1</sup>, 薛岑<sup>2</sup>①, 杨文秀<sup>2</sup>, 薄莉<sup>2</sup>

(1. 贵阳医学院, 贵州 贵阳 550004;

2. 贵阳医学院附属医院病理科, 贵州 贵阳 550004)

**摘要:** **目的** 研究 Kruppel 样因子 6(Kruppel-like factor6, KLF6)蛋白在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中表达情况,探讨其与 NSCLC 临床病理特征的关系。**方法** 收集 NSCLC 标本 92 例为 NSCLC 组,其中鳞癌 48 例、腺癌+腺鳞癌 44 例,正常肺组织 37 例为对照组,通过免疫组化(Envision 法)检测各种组织中 KLF6 蛋白表达情况,分析其与临床病理参数的关系。**结果** KLF6 蛋白在 NSCLC 组中阳性率明显高于正常肺组织组( $P < 0.05$ )。KLF6 蛋白的高表达在不同的性别、年龄、病理分型、临床分期 NSCLC 患者间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),与分化程度、淋巴结转移密切相关( $P < 0.05$ )。**结论** KLF6 基因高表达在 NSCLC 中的发生、发展、淋巴结转移中起到重要作用,其发生机制有待进一步深入研究。

**关键词:** 非小细胞肺癌;免疫组织化学;抑癌基因;KLF6

**中图分类号:** R734.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-5817(2015)01-0023-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.01.008

### Expression of KLF6 in non-small cell lung cancer tissues

Zhang Chengyuan<sup>1</sup>, Xue Cen<sup>2</sup>, Yang Wenxiu<sup>3</sup>, Bo Li<sup>2</sup>

(1. Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate Kruppel-like factor 6 (KLF6) protein expression in non-small cell lung cancer (NSCLC), and to explore its relationship with clinical pathological characteristic of NSCLC.

**Methods** Ninety-two NSCLC specimens were collected as the NSCLC group, 48 of them were squamous cell carcinoma, 44 of them were adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma, 37 cases of normal lung tissues were selected as the control group. An immunohistochemistry (Envision method) was used to detect KLF6 expression in various tissues, their association with clinicopathological index of NSCLC were analyzed. **Results**

Percentage of positive-KLF6 protein carriers in NSCLC group was significantly higher than that in normal lung tissue group ( $P < 0.05$ ). High expression of KLF6 protein was irrelevant with gender, age, pathological type and clinical stage of NSCLC patients ( $P > 0.05$ ), but was closely related to the degree of differentiation, lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The highly expressed KLF6 gene plays an important role in the genesis and development of NSCLC, as well as the lymph node metastasis. The further study of its occurrence mechanism is needed.

**Key words:** non-small cell lung cancer; immunohistochemistry; anti-oncogene; KLF6

原发性支气管肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,全球肺癌的发病率和死亡率均呈上升态势,尤其在经济发展中的国家<sup>[1]</sup>。男性肺癌发病率和死亡率均占有恶性肿瘤的第一位,女性肺癌发病率和死亡率均占第二位。其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌总数的 80%~85%<sup>[2]</sup>,NSCLC 的发生、发展是多因素参与、多基因变异所致的复杂过程,有研究表明既有癌基因的激活,亦有抑癌基因的缺

失或失活。研究发现 Kruppel 样因子 6(Kruppel-like factor 6, KLF6)基因在大多数恶性肿瘤中存在异常表达,但其在肺癌中表达的情况至今少有报道。本研究通过免疫组化技术检测 NSCLC 组织中 KLF6 蛋白的表达情况,分析其与 NSCLC 临床特征的相关性,探讨其与 NSCLC 发生、发展的关系。

#### 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集贵阳医学院附属医院 2010 年 2

① 通讯作者, E-mail: xuecyuan123@163.com

月~2012 年 3 月期间手术切除组织标本 129 例,其中 NSCLC 92 例为 NSCLC 组,正常肺组织 37 例为正常肺组织组,纳入标本均符合 WHO 肺肿瘤组织学分类标准,并由专业病理医师再次明确诊断,其中男性 87 例,女性 42 例,年龄 36~78 岁,平均(57.10±10.68)岁(中位数年龄 57 岁)。所有 NSCLC 病例均按照 2009 年 7 月国际肺癌研究学会(IASLC)公布第 7 版肺癌 TNM 分期系统标准分级:Ⅰa 期 7 例,Ⅰb 期 13 例,Ⅱa 期 18 例,Ⅱb 期 15 例,Ⅲa 期 14 例,Ⅲb 期 12 例,Ⅳ期 13 例。所有患者均未接受过放、化疗和生物学治疗等干预措施。

1.2 试剂 浓缩型兔抗人 KLF6 多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,DAB 显色试剂盒、通用型二步法检测试剂盒购自美国 DAKO 公司(试剂盒 K5007),其它辅助用液及材料均由贵阳医学院附属医院病理科专业技术人员配制。

1.3 用免疫组织化学方法检测 KLF6 蛋白 采用通用型二步法(Envision 法),脱蜡,梯度酒精水化,pH 9.0 修复液,高压修复,滴加一抗浓缩型兔抗人 KLF6 多克隆抗体,按照预实验工作浓度 1:150;4℃冰箱过

夜,PBS 冲洗、TBS 冲洗,滴加二抗,37℃孵化 25 min,DAB 显色,苏木精对比染色,自来水冲洗,蓝化,切片经梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片,晾干后观察。操作步骤严格按照说明书进行,各步骤注意控制时间及温度,各组均以 PBS 代替一抗作为阴性对照,用已知阳性组织(睾丸组织)作阳性对照。

1.4 染色结果判定标准 KLF6 以细胞质和细胞核染色黄色或棕褐色为阳性细胞标准(见图 1)。以染色强度计分:0 分为无色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;在高倍镜下取 10 个不同视野,按阳性细胞所占的百分比计分:0 分为阴性,1 分为阳性细胞≤10%,2 分为 11%~50%,3 分为 51%~75%,4 分为 >75%,染色强度与阳性细胞百分比的乘积≥3 分为免疫反应阳性,总体评分:≤2 分者为阴性,3~6 分者为弱阳性,>6 分者为强阳性。

1.5 统计学方法 实验学数据采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行分析,计数资料用百分率表示,计数资料的组间比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

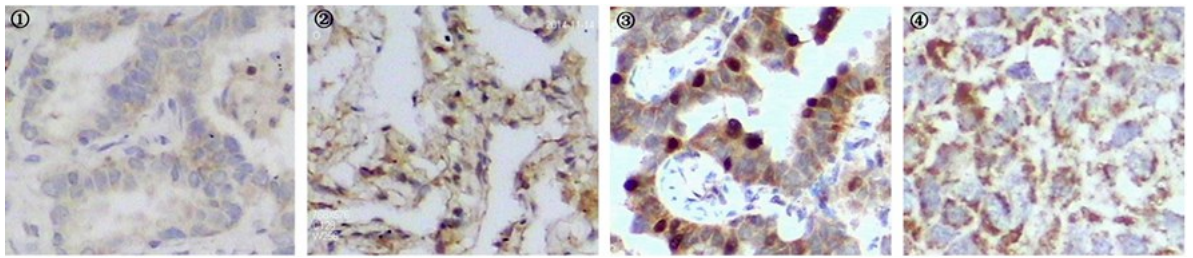


图 1 KLF6 蛋白分别在不同肺组织中的表达,Envision 法,×200

注:图①:肺癌组织阴性对照;图②:正常肺组织阳性;图③:肺腺癌组织阳性;图④:肺鳞癌组织阳性

2 结果

2.1 KLF6 蛋白在 NSCLC、正常肺组织中表达情况

KLF6 蛋白在 NSCLC 中阳性率明显高于正常肺组织( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 KLF6 蛋白在 NSCLC 及正常肺组织中表达 (n,%)

组别	n	KLF6 阴性	KLF6 阳性
NSCLC 组	92	13(14.13)	79(85.87)
正常肺组织组	37	25(67.57)	12(34.43)

注: $\chi^2=36.261, P < 0.01$

2.2 KLF6 蛋白在 NSCLC 的表达与临床病理因素的关系 结果显示,KLF6 蛋白在不同的性别、年龄、病理类型、临床分期的 NSCLC 中表达比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但其表达在肿瘤不同的分化程度、淋巴结转移与否组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),肺癌组织的分化程度越低,KLF6 蛋白表达率越高,有淋巴结转移者显著高于无淋巴结转移者,见表 2。

表 2 NSCLC 中 KLF6 蛋白的表达与临床病理参数的关系 (n,%)

临床病理参数	n	KLF6 阳性	KLF6 阴性	$\chi^2$	P
性别				0.099	0.753
男	67	58(86.57)	9(13.43)		
女	25	21(84.00)	4(16.00)		
年龄(岁)				0.090	0.764
<60	60	52(86.67)	8(13.33)		
>60	32	27(84.38)	5(15.63)		
病理类型				0.220	0.639
鳞癌	48	42(87.50)	6(12.50)		
腺癌+腺鳞癌	44	37(84.09)	7(15.91)		
TNM 分期				0.837	0.360
I+II	53	44(83.02)	9(16.98)		
III+IV	39	35(89.74)	4(10.26)		
分化程度				4.521	0.033
高+中	53	42(79.25)	11(20.75)		
低	39	37(94.87)	2(5.13)		
淋巴结转移				3.883	0.049
无	55	44(80.00)	11(20.00)		
有	37	35(94.60)	2(5.41)		

### 3 讨论

KLF6 又称锌指转录因子 9(zinc finger factor 9, ZP9), 是一种普遍表达的核转录调控因子。它是一种抑制细胞生长、促进凋亡、参与细胞衰老调控的抑癌基因<sup>[3]</sup>。许多 KLF 家族的成员被证明与肿瘤的发生、发展有关, 如在结肠癌中存在 KLF4 的下调, 在乳腺癌中存在 KLF5 和 KLF10 的下调<sup>[4]</sup>。近年来相关研究表明, KLF6 基因在肺癌、前列腺癌、结肠癌及胶质瘤中有不同程度的突变和缺失, 在肿瘤组织中 KLF6 的表达水平降低与基因杂合性缺失有关。有研究表明, KLF6 基因有抑制细胞生长的作用, 它可能是一种具有广泛抑制肿瘤发生与发展作用的基因。Narla G 等<sup>[5]</sup>在前列腺癌中发现 KLF6 可通过不依赖 p53 的方式直接激活 p21<sup>CIP1/WAF1</sup> 基因启动子来抑制细胞生长。而在肝癌和结肠癌细胞中, KLF6 通过抑制细胞周期蛋白 D(cyclin D)1/细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)4 的激活影响 Rh 通路, 同样导致肿瘤细胞生长被抑制<sup>[6]</sup>。

在肺癌研究中, KLF6 被报道可通过激活下游基因 DAPK2 来诱导肺癌细胞凋亡。KLF6 的抑癌作用与一系列相关的肿瘤通路有关, 野生型 KLF6 能以 p53 非依赖方式上调 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的表达而抑制细胞增殖, 通过非 p53 依赖途径上调 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, 通过阻止 Rb 基因的磷酸化而调节转录因子 E2F 的活性, 将细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub>/S 期, 抑制细胞增殖<sup>[7-9]</sup>。但肿瘤来源的 KLF6 变异体则失去了此功能, 从而导致肿瘤发生的风险增加。本实验研究发现转录因子 KLF6 蛋白在 NSCLC 中表达率为 85.87%, 与正常肺组织比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明 KLF6 基因参与了 NSCLC 的发生、发展过程。KLF6 基因在 NSCLC 组织中的高表达可能是在 NSCLC 发病初期出现了机体的代偿作用, 这与 Cho 等<sup>[10]</sup>、冯洁等<sup>[11]</sup>、朱海龙等<sup>[12]</sup>分别在结肠癌、肝细胞癌中检测到 KLF6 蛋白表达的报道一致。这种高表达可能是 KLF6 在肿瘤形成过程中被激活而发生的代偿作用, 也可能是基因突变导致抑癌基因 KLF6 上调 p21 的功能下降, 从而使抑制肿瘤生长的能力降低, 导致在正常肺组织中无表达或低表达。

本研究显示, NSCLC 中 KLF6 蛋白表达与年龄、性别、临床分期、病理类型等因素的关联性很小, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 肺癌组织的分化程度越低, KLF6 蛋白表达率越高, 且有淋巴结转移者显著高于无淋巴结转移者, 这为判断预后、指导治疗提供了参考依据。

综上所述, 本实验从抑癌基因 KLF6 的蛋白表达

角度进行研究, 认为 KLF6 蛋白的高表达对肿瘤的生物行为有着重要的作用, KLF6 参与了 NSCLC 发生、发展的过程, 为我们进一步研究 NSCLC 发生机制及治疗新路径提供了方向, 奠定了一定基础。

#### 参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Wakelee H, Kernstine K, Vokes E, et al. Cooperative Group Research Efforts in Lung Cancer 2008: Focus on Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. Clinical lung cancer, 2008, 9(6): 346-351.
- [3] Koivisto PA, Hyytinen ER, Matikainen M, et al. Kruppel-like factor 6 germ-line mutations are infrequent in Finnish hereditary prostate cancer[J]. The Journal of urology, 2004, 172(2): 506-507.
- [4] Ito G, Uchiyama M, Kondo M, et al. Kruppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer research, 2004, 64(11): 3838-3843.
- [5] Narla G, Ilea KE, Reeves HL, et al. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer[J]. Science, 2001, 294(5551): 2563-2566.
- [6] Benzeno S, Narla G, Allina J, et al. Cyclin-dependent kinase inhibition by the KLF6 tumor suppressor protein through interaction with cyclin D1[J]. Cancer research, 2004, 64(11): 3885-3891.
- [7] Sangodkar J, Shi J, DiFeo A, et al. Functional role of the KLF6 tumour suppressor gene in gastric cancer[J]. European Journal of Cancer, 2009, 45(4): 666-676.
- [8] DiFeo A, Martignetti JA, Narla G. The role of KLF6 and its splice variants in cancer therapy[J]. Drug Resist Updat, 2009, 12(1-2): 1-7.
- [9] Agell L, Hernández S, de Muga S, et al. KLF6 and Tp53 mutations are a rare event in prostate cancer: distinguishing between Taq polymerase artifacts and true mutations[J]. Modern Pathology, 2008, 21(12): 1470-1478.
- [10] Cho YG, Choi BJ, Song JW, et al. Aberrant expression of kruppel-like factor 6 protein in colorectal cancers[J]. World Journal of Gastroenterology, 2006, 12(14): 2250-2253.
- [11] 冯洁, 汤正好, 臧国庆, 等. KLF6、Sp1 蛋白在肝癌、肝硬化组织中的表达及意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(2): 148-151.
- [12] 朱海龙, 袁卫平, 岳惠芬, 等. KLF6 蛋白在肝细胞癌组织中的表达及其意义[J]. 重庆医学, 2013, 42(1): 33-36.

收稿日期: 2014-11-25