

• 临床医学 •

文章编号: 1002-0217(2016) 06-0555-04

## 结直肠癌、癌前病变中 KLF6 mRNA 与蛋白表达的研究

吴 鑫<sup>1</sup> 张义胜<sup>1</sup> 赵海远<sup>1</sup> 刘银华<sup>2</sup> 彭俊璐<sup>1</sup>

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 1.胃肠外科三; 2.病理科,安徽 芜湖 241001)

**【摘要】**目的: 检测抑癌基因 KLF6(kruppel-like factor 6) 在结直肠癌、癌前病变(均结直肠高级别上皮内瘤变)及癌旁正常黏膜组织细胞中的表达水平,探讨 KLF6 表达水平在各类型组织中的相互关系及在结直肠癌病程中的作用。方法: 采集弋矶山医院 2014 年 1 月~2015 年 1 月间结直肠手术切除后标本共 88 例,其中癌组织 46 例、癌前病变(结直肠高级别上皮内瘤变)组织 21 例及正常肠管黏膜组织 21 例。以 SP 法进行免疫组化和 Q-PCR 方法检测结直肠癌(结直肠癌组)、结直肠癌癌前病变(癌前病变实验组)及癌旁组织(对照组)中 KLF6 表达水平;并探讨 KLF6 的表达与临床病理参数之间的关系。结果: ①KLF6 在结直肠癌组织、结直肠癌癌前病变组织中的表达水平低于癌旁正常组织( $P<0.05$ ),差异有统计学意义;且 KLF6 表达与浸润情况、分化程度、淋巴结转移、TNM 分期有一定相关性( $P<0.05$ ); KLF6 表达与患者的年龄、性别、肿瘤组织学类型、癌灶大小无明显相关性( $P>0.05$ )。②Q-PCR 实验结果正常组织中 KLF6 基因相对表达量高于结直肠癌癌前组织和结直肠癌组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论: KLF6 基因在结直肠癌及癌前病变中起到了一定的作用,并与肿瘤浸润情况、分化程度、淋巴结转移、TNM 分期有一定相关性。

**【关键词】**结直肠癌; 癌前病变; KLF6 基因**【中图分类号】**R 735.3 **【文献标识码】**A**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2016.06.013

## KLF6 mRNA and protein expression levels in colorectal cancer and precancerous lesions

WU Xin ZHANG Yisheng ZHAO Haiyuan LIU Yinhua PENG Junlu

Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the association and role of Kruppel-like factor 6 (KLF6) gene and protein expression with precancerous lesions and in the development of colorectal cancers via detecting the levels of the gene and protein in the malignant and adjacent tissues. **Methods:** The samples were collected in 88 patients with colorectal cancer treated in our hospital from 2014 through 2015. Of the 88 samples, 46 were from cancer tissues, 21 from precancerous lesions and another 21 from adjacent normal colorectal mucosa. KLF6 mRNA and protein expression levels were detected with immunohistochemistry and quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) in the tissues of colorectal cancer (colorectal cancer group), precancerous lesions (precancerous lesions group) and in tumor-adjacent tissues (control group) and the association of KLF6 expression with clinical pathological parameters were also determined. **Results:** ① KLF6 expression was significantly lower in either of the tissues from colorectal cancer or precancerous lesions than that of tumor-adjacent normal tissues ( $P<0.05$ ), and was somewhat correlated with the extent of tumor infiltration, differentiation, lymph node metastasis and TNM staging ( $P<0.05$ ), yet was not significantly with the patient's age, gender, histological type and tumor size ( $P>0.05$ ); ② Q-PCR indicated that KLF6 gene expression was relatively higher than the level in either tissues from precancerous lesions or from colorectal cancers. The difference was significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** KLF6 gene can be important role in colorectal cancer and precancerous lesions, and is associated to a certain extent with tumor infiltration, differentiation, lymph node metastasis and TNM staging.

**【Key words】** colorectal cancer; precancerous lesions; KLF6

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的恶性肿瘤之一,具有发病率高、致死率高及预后不良等特点,严重威胁人类的生命和健康<sup>[1]</sup>。因此,不断

探索与结直肠癌的发生、发展及预后相关的机制,并从中发现与之相对应的分子标志物对结直肠癌早期诊断、不同的治疗方案制定及判断其预后具有重要

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金项目(WK2013F21)

收稿日期: 2016-03-16

作者简介: 吴鑫(1976-)男,主治医师,硕士,(电话)13905535321,(电子信箱)wuxin28577@sohu.com;

张义胜,男,主任医师,硕士生导师,(电子信箱)huhzhao@163.com,通信作者。

临床意义<sup>[2]</sup>。

随着肿瘤因子机制的深入研究,相关因子的定位及识别已成为结直肠癌研究的热点。Gloor 描述一只苍蝇因为 KLF6 突变造成了严重的身体畸形,并将之命名为 Krüppel,意思是“残废”<sup>[3]</sup>。KLF6 (kruppel-like factor 6) 是其中一员,同时也是新近发现的抑癌基因,KLF6 的缺失、突变极容易导致许多肿瘤的发生、发展<sup>[4]</sup>。国内外对 KLF6 基因的研究多集中在前列腺癌<sup>[5]</sup>、肝癌<sup>[6]</sup>及胃癌<sup>[7]</sup>中,鲜有结直肠癌研究的相关报道。研究 KLF6 基因与结直肠癌的发生、发展及预后的关系具有深刻的意义<sup>[8]</sup>。本研究应用 Q-PCR 及免疫组化方法检测结直肠癌及癌前病变中 KLF6 基因与蛋白的表达情况,探讨 KLF6 基因对于结直肠癌发生、发展及肿瘤浸润的影响及其相互关系。

### 1 资料与方法

1.1 标本采集 收集弋矶山医院普外科 2014 年 1 月~2015 年 1 月间结直肠手术后切除的离体标本 88 例,其中结直肠癌组 46 例,结直肠癌前病变组(均结直肠高级别上皮内瘤变) 21 例及正常癌旁肠管黏膜组织(距癌灶边缘 5 cm 以上) 21 例为对照组。结直肠癌组患者平均年龄(55±4.96)岁,其中>55 岁 20 例,≤55 岁 26 例。男性 24 例,女性 22 例。离体后标本分为两部分,其中约 0.5 g 离体后 1 h 内放入-80℃冰箱中保存,余下手术切除标本大部送至病理科,4%甲醛固定,石蜡常规包埋备用,HE 染色以确定结直肠癌组织学类型、TNM 分期等。其中中高分化腺癌 14 例、低分化腺癌 32 例;30 例标本有多处淋巴结转移,16 例无淋巴结转移;TNM 分期 I 期 3 例、II 期共 18 例,III 期 16 例、IV 期共 9 例;所有取材的标本均来自手术切除治疗后,且患者术前均未接受放疗和化疗。

### 1.2 材料与与方法

1.2.1 材料 Triazol 细胞裂解液购自 Life Technologies 公司,逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司,引物由上海生工生物技术公司合成,鼠抗人 KLF6 多克隆抗体来自武汉博士德生物技术有限公司,免疫组化试剂盒来自北京中衫生物技术公司;KLF6 上游引物序列 5'-CCTGTAAGAAGCGGCATAGC-3',下游引物序列 5'-TCAACCCAACCATTTAGCATTTC-3',扩增片段 137 bp,内参 β-actin 上游引物序列 5'-TGACGTG-GACATCCGCAAAG-3',下游序列 5'-CTGGAAGGTG-GACAGCGAGG-3',扩增片段 207 bp。

1.2.2 免疫组织化学 SP 法 切片常规脱蜡,梯度

酒精脱水后,3%过氧化氢灭活内源性生物素酶,滴加一抗,4℃冰箱内过夜孵育,滴加二抗,DAB 显色,苏木精衬染,脱水,透明,中性树脂封固。以 PBS 代替一抗作阴性对照。用已知阳性片作阳性对照。KLF6 以细胞核、质、膜出现棕黄色细颗粒为阳性表达。根据肿瘤细胞染色强度并结合阳性细胞数来综合判读阳性,通过用免疫组化半定量积分法来计数阳性细胞,其中每张切片随机选择 3 个倍数×400 的高倍视野计数,每个视野以 50 个细胞为计数标准。先按染色强度打分:不着色为 0 分,颜色淡黄色为 1 分,棕色为 2 分,深棕色为 3 分;阳性细胞数<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,>50%为 3 分;两种评分相乘得分:0 分为阴性(-),1 分为弱阳性(弱+),2 分以上为阳性(+),同时以弱阳性和阳性表达同为阳性表达。

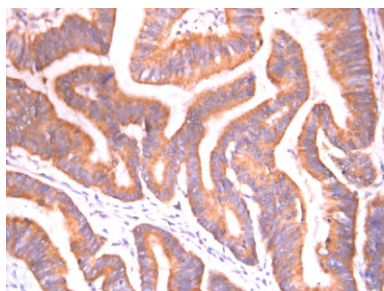
1.2.3 Q-PCR 取 21 例结直肠癌组织以及 21 例癌前病变组为实验组,21 例癌旁正常组织为对照组,分别检测 KLF6 基因及内参 β-actin 的表达量。采用 Triazol 试剂盒分别提取结直肠癌及癌旁正常组织中总 RNA,检测其完整性、纯度及浓度,后逆转录,Q-PCR。KLF6 及 β-actin 的循环条件为 95℃预变性 30 s,95℃变性 15 s,60℃退火 30 s,40 个循环。基因的相对表达量用比较 CT 值计算,计算公式:  $F = 2^{-\Delta\Delta CT}$ ,  $\Delta\Delta CT$  值 = (胃癌组目的基因 CT 值 - 胃癌组内参基因 CT 值) - (癌旁组目的基因 CT 值 - 癌旁组内参基因 CT 值)。

1.3 统计方法 实验数据采用 SPSS 18.0 统计分析软件处理。KLF6 表达与临床病理参数之间的关系采用卡方检验。Q-PCR 数据采用  $\Delta\Delta Ct$  方法计算基因的相对表达量,数据经 GraphPad 软件处理后以柱状图表示。

## 2 结果

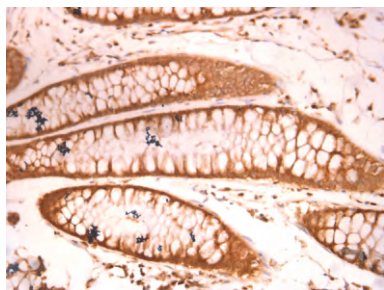
### 2.1 免疫组化实验结果

2.1.1 KLF6 蛋白在结直肠癌细胞、癌前病变细胞和癌旁正常细胞中的表达 KLF6 蛋白表达定位于细胞核、细胞质、细胞膜中,结直肠癌组织中 KLF6 表达呈阴性,如图 1 所示;结直肠癌癌旁正常肠管组织中 KLF6 表达呈强阳性,如图 2 所示;结直肠癌癌前病变组织中 KLF6 表达呈弱阳性,如图 3 所示。结果显示:KLF6 蛋白在癌旁组织组、癌前病变组和结直肠癌组 3 组总体间表达的差异具有统计学意义 ( $\chi^2 = 11.799, P = 0.003$ )。见表 1。



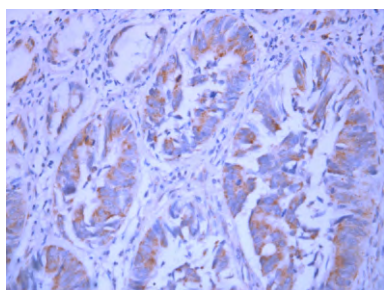
定位于细胞核、质、膜, ×400。

图1 KLF6在结直肠癌细胞中表达呈阴性



定位于细胞核、质、膜, ×400。

图2 KLF6在癌旁细胞中表达呈强阳性



定位于细胞核、质、膜, ×400。

图3 KLF6在癌前病变细胞中表达呈弱阳性

表1 KLF6蛋白在3组中的表达水平

组别	KLF6 表达		$\chi^2$	P
	+	-		
结直肠癌组 (n=46) <sup>a</sup>	19	27	11.799	0.003
癌前病变组 (n=21) <sup>b</sup>	10	11		
癌旁对照组 (n=21) <sup>c</sup>	18	3		

注: 结直肠癌组与癌旁对照组比较:  $\chi^2 = 11.5$ , <sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; 癌前病变组与癌旁对照组比较:  $\chi^2 = 6.857$ , <sup>b</sup>  $P < 0.05$ ; 结直肠癌组与癌前病变组比较:  $\chi^2 = 0.234$ , <sup>c</sup>  $P = 0.628$ 。

2.1.2 KLF6蛋白表达水平与结直肠癌临床病理参数之间的关系 KLF6表达与浸润情况、分化程度、淋巴结转移、TNM分期有一定相关性( $P < 0.05$ ); KLF6表达与患者的年龄、性别、肿瘤组织学类型、癌灶大小无明显相关性( $P > 0.05$ )。见表2。

表2 KLF6表达水平与结直肠癌临床病理参数之间的关系

临床病理参数	n	KLF6 表达		$\chi^2$	P
		+	-		
年龄					
≤55	26	11	15	0.025	>0.05
>55	20	8	12		
性别					
男	24	10	14	0.003	>0.05
女	22	9	13		
浸润情况					
肌层内	20	5	15	3.880	<0.05
肌层外	26	14	12		
分化程度					
高中分化	14	2	12	6.060	<0.05
低分化	32	17	15		
淋巴结转移					
有	30	17	13	8.396	<0.05
无	16	2	14		
TNM分期					
A、B	21	12	9	3.998	<0.05
C、D	25	7	18		
癌灶大小					
癌灶≥3 cm	17	8	9	0.368	>0.05
癌灶<3 cm	29	11	18		
肿瘤组织学类型					
管状、乳头状腺癌	28	10	18	0.922	>0.05
黏液癌、未分化癌	18	9	9		

2.2 Q-PCR检测结直肠癌、癌前病变及癌旁组织中KLF6的mRNA表达水平 经过核酸蛋白定量仪测定的RNA样品OD值1.8~2.0,纯度符合实验要求。RNA经逆转录为cDNA,然后进行Q-PCR实验,溶解曲线显示KLF6及内参β-actin均为单一波峰且无明显杂峰(图4),说明该扩增产物无非特异性扩增。扩增曲线显示扩增效率较好(图5)。3组实验数据两两比较用F检验,每组比较所得P值均小于0.05,相对表达量用柱状图表达如图6所示。

### 3 讨论

锌指(ZNF)结构是在大量DNA结合基序中最具代表的真核转录因子,并且Cys2His2 ZNF基因序列是最规范类型<sup>[9]</sup>。Kruppel-like转录因子家族为锌指(ZNF)结构的一种,同样对肿瘤发生可能也很重要。Kruppel样因子6(Kruppel like factor 6, KLF6),是一种参与生长发育、细胞增殖、分化及血

管生成等调控过程的核转录调控因子<sup>[10]</sup>。Reeves等<sup>[11]</sup>使用直接测序法和微卫星分析法确立了KLF6和TP53等位基因的失衡机制,并在结直肠癌衍生中用此方法明确KLF6、TP53、K-RAS和APC基因突变导致的发病率与微卫星不稳定性密切相关。

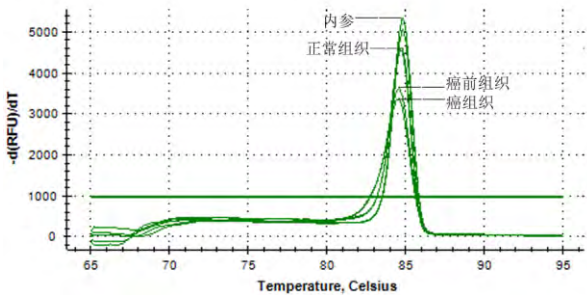


图4 Q-PCR检测结直肠癌、癌前病变及癌旁组织中KLF6表达的溶解曲线

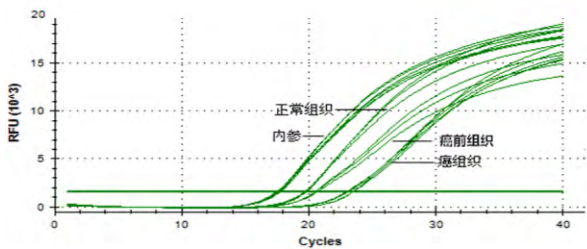


图5 Q-PCR检测结直肠癌、癌前病变及癌旁组织中KLF6表达的扩增曲线

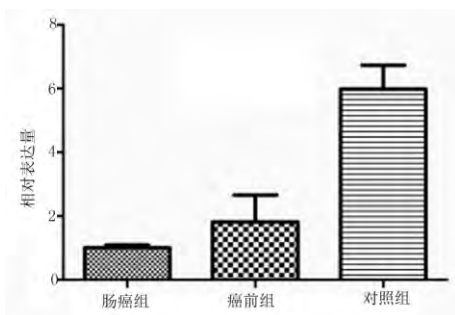


图6 Q-PCR检测结直肠癌、癌前病变及癌旁组织中KLF6 mRNA的表达(2<sup>-ΔΔCT</sup>法)

本实验我们分别采用免疫组化和Q-PCR的方法检测了结直肠癌和结直肠癌癌前病变中KLF6的表达水平,结果提示了KLF6在结直肠癌组织中的表达水平明显低于癌旁正常组织( $P < 0.05$ ),KLF6在结直肠癌癌前病变组织中的表达水平明显低于癌旁正常组织( $P < 0.05$ ),可能因为KLF6为抑癌基因,

所以在直肠癌及癌前与正常组织存在明显表达差异。或许我们将来可以将KLF6因子当作一种肿瘤标记物。KLF6在结直肠癌组织的表达与癌前病变组织中表达尚无明确定论,本实验的免疫组化和Q-PCR结果存在差异,可能与免疫组化结果为定性的,而Q-PCR数据读取是定量的有关,因此存在差异,还需要我们进一步的研究。

本研究同时还显示结直肠癌中KLF6的表达与肿瘤的浸润情况、分化程度、淋巴结转移、TNM分期密切相关( $P < 0.05$ );KLF6蛋白表达减弱时,肿瘤浸润肌层,TNM分期越晚,淋巴结远处转移越多,分化程度也越差;以上均提示KLF6可能作为一种新型的KLF6抑癌基因,可能成为结肠癌治疗的新靶点,为结直肠癌治疗提供分子生物学依据。

### 【参考文献】

- [1] 曾志良.结直肠癌的临床病例特征及预后分析[J].医学理论与实践,2013,26(3):283-284.
- [2] 张梁,罗桂飞.结直肠癌患者血清中可溶性P-选择素和L-选择素水平及临床意义[J].中国癌症杂志,2014,24(8):599-603.
- [3] ZANDBERGWF,KUMARASAMY J,PINTO BM,et al.Metabolic inhibition of sialyl L-Lewis X biosynthesis by 5-thiofucose remodels the cell surface and impairs selectin-mediated cell adhesion[J].Biol Chem,2012,287(47):40021-40030.
- [4] 李娜,佟秀琴.KLF6在肿瘤中的研究进展[J].疾病监测与控制杂志,2012,6(5):273-277.
- [5] LUPO A,CESARO E,MONTANO G,et al.KRAB-Zinc Finger Proteins: A Repressor Family Displaying Multiple Biological Functions[J].Curr Genomics,2013,14:268-278.
- [6] 王勇强,孙燕.转录因子KLF6通过下调Basigin-2的表达抑制肝癌细胞侵袭转移[J].现代肿瘤医学,2015(9):1188-1192.
- [7] 张修稳,赵国海.KLF6蛋白在胃炎、上皮内瘤变和胃癌中的表达及意义[J].中国实用医刊,2014(24):9-12.
- [8] 于宁,关媛.抑癌基因KLF6在肿瘤中作用机制的研究进展[J].健康研究,2010,30(2):141-145.
- [9] CHUA YJ,ZALCBERG JR.Progress and challenges in the adjuvant treatment of stage II and III colon cancers[J].Expert Review Of Anticancer Therapy,2008,8(4):595-604.
- [10] YANG G,MA F,ZHONG M,et al.ZNF703 acts as an oncogene that promotes progression in gastric cancer[J].Oncology Reports,2014,31(4):1877-1882.
- [11] REEVES HL,NARLA,OGUNBIYIO,et al.Kruppel-like factor 6(KLF6) is a tumor suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer[J].Gastroenterology,2004,126(40):90-103.