

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)14-1257-03

野生型 *KLF6* 对前列腺癌 LNCaP 细胞的作用

孙明^{1,2}, 黄健², 林天歆², 庞健¹, 廖勇彬¹, 胡明², 陈学中¹¹ 中山大学附属江门医院泌尿外科, 广东 江门 529070, ² 中山大学附属第二医院泌尿外科, 广东 广州 510120

Effect of wild *KLF6* on prostate cancer cell line LNCaP

SUN Ming^{1,2}, HUANG Jian², LIN Tian-Xin², PANG Jian¹, LIAO Yong-Bin¹, HU Ming², CHEN Xue-Zhong¹¹Department of Urology, Jiangmen Hospital, Sun Yat-sen University, Jiangmen 529070, China, ²Department of Urology, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

【Abstract】 AIM: To observe the effect of wild type *-KLF6* (wt-*KLF6*) on proliferation, cell cycle, invasion and migration of prostate cancer cell line LNCaP by transgenic method. **METHODS:** Wt-*KLF6* cDNA was obtained by RT-PCR method from liver cell and inserted into plasmid pEGFP-C₁ for transfecting into LNCaP cells. The untransfected LNCaP cells served as the controls. MTT was used for observing the cell growth suppression, flow cytometer for apoptosis and cycle phase, invasion capability experiment for cell invasion capability with anti-oncogene wt-*KLF6* on prostate cancer cell line LNCaP by transgenic method for 48 h. **RESULTS:** After wt-*KLF6* was transfected into LNCaP cells, the growth suppression of LNCaP cells was enhanced [(31.9 ± 4.7)% vs 0%, *P* < 0.01], the apoptosis was increased [(29.3 ± 3.7)% vs (8.6 ± 0.9)%], *P* < 0.01], the invasion capability was decreased [immigrated cell population/mm², (102.8 ± 15.4) vs (192.7 ± 25.2)], *P* < 0.05]. Wt-*KLF6* also decreased the ratio of LNCaP cell in phase G₂/M, increased ratio of G₀/G₁ from control group (55.9 ± 7.1)% to transfection group (75.0 ± 8.8)% (*P* < 0.05). **CONCLUSION:** Wt-*KLF6* transfection can suppress the growth and induce the apoptosis, decrease the invasive capability of LNCaP cells, probably by reversing partially its malignant phenotype.

【Keywords】 genes, tumor suppressor; prostatic, neoplasms; LNCaP; *KLF6*

【摘要】 目的: 探讨野生型抑癌基因 *KLF6* 对前列腺癌 LNCaP 细胞的生长增殖、细胞周期和侵袭转移能力的影响及其可能的作用机制。方法: 利用 RT-PCR 法克隆目的基因

KLF6 并将含 *KLF6* 的 pEGFP-C₁ 质粒转入 LNCaP 细胞。分为转染组和对照组分别进行 MTT 法观察 LNCaP 细胞的生长抑制率, 流式细胞仪观察细胞周期比例变化和凋亡率, 细胞爬片划痕法观察 LNCaP 细胞的侵袭转移能力变化。结果: 转染了野生型抑癌基因 *KLF6* 的前列腺癌 LNCaP 细胞生长抑制率为 (31.9 ± 4.7)%, 对照组为 0%, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01) 细胞周期比例表现为 G₂/M 期减少, G₀/G₁ 期比例增加为 (75.0 ± 8.8)%, 对照组为 (55.9 ± 7.1)%, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05) 细胞凋亡率为 (29.3 ± 3.7)%, 对照组为 (8.6 ± 0.9)%, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01) 每毫米划痕区内迁移的细胞数为 102.8 ± 15.4, 对照组为 (192.7 ± 25.2), 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。结论: 野生型抑癌基因 *KLF6* 的转染可以明显抑制前列腺癌 LNCaP 细胞的生长增殖, 并诱导其凋亡, 使其侵袭转移能力下降, 其机制可能与野生型抑癌基因 *KLF6* 部分地逆转 LNCaP 细胞的恶性表型有关。

【关键词】 基因, 肿瘤抑制, 前列腺肿瘤, LNCaP, *KLF6*

【中图分类号】 R979.1; R737.25 **【文献标识码】** A

0 引言

新近发现抑癌基因 *KLF6* (Kruppel-like factor 6) 与前列腺癌的发病有密切关系, 很可能前列腺癌的关键的“看门人 (gatekeeper)”抑癌基因。本实验即旨在研究将野生型抑癌基因 *KLF6* 转染入前列腺癌细胞系 LNCaP 后, 观察其对 LNCaP 细胞生长增殖、细胞周期及侵袭转移能力的影响, 并探求其可能的作用机制, 以期为使用抑癌基因 *KLF6* 治疗激素依赖型前列腺癌提供实验和理论证据。

1 材料和方法

1.1 材料 目的基因 cDNA 的获得及载体构建按《分子克隆实验指南》方法从正常人肝组织细胞中提取 RNA, 按 GenBank 公布的野生型 *KLF6* 基因序列及文献设计引物序列: 5' 端引物: 5'-AAGGTACCA-TGGACGTGCTCCCTATGTGC-3', 3' 端引物 5'-CGTCT-AGATCAGAGGTGCCTCTTCATGTG-3'。RT-PCR 反应扩增获得 *KLF6* 基因外显子片段 p*KLF6*。p*KLF6* 用内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切, 真核表达载体 pEGFP-C₁ 同样用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切, 与 p*KLF6* 相连接, 筛选出重组质粒 pEGFP-C₁-*KLF6*。

收稿日期 2006-04-12; 接受日期 2006-11-13

作者简介 孙明, 博士, 副主任医师。Tel: 13422590468 Email: sunming2003@163.com

1.2 方法

1.2.1 质粒转染 将 5 μg 的 pEGFP-C₁-KLF6 和 10 μg 的脂质体加入 100 μL 无血清培养液中, 15 min 后加入 1.8 mL 的无血清培养液中混匀, 并加入处于对数生长期约 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 的 LNCaP 细胞培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO₂ 培养箱中转染 1 h, 再加入含 100 mL/L 新生小牛血清的完全培养液 1 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO₂ 中继续培养。转染后每天进行细胞计数及细胞排斥观察。同时以 pEGFP-C₁ 空载体转染的 LNCaP 细胞作为对照。

1.2.2 阳性克隆细胞的筛选和培养 荧光显微镜检查转染后的 LNCaP 细胞, 并采用 G418 筛选获得含 KLF6 基因的阳性 LNCaP 克隆细胞, 继续传代培养 6 wk, 收获细胞悬液或取其细胞爬片待用。人前列腺癌 LNCaP 细胞及转染后的 KLF6-LNCaP 细胞培养于含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI-1640 培养液(Gibco 公司)中, 添加 100 IU/mL 青霉素及 100 mg/L 链霉素。37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mg/L CO₂ 的条件下常规培养。

1.2.3 噻唑蓝(MTT)法观察细胞生长抑制率 将 $5 \times 10^6/\text{L}$ 的前列腺癌 LNCaP 细胞和转染 KLF6 后的 LNCaP 细胞接种于 96 孔板, 每孔 200 μL , 贴壁生长 48 h 后, 弃上清后, 每孔加入 200 μL 新配制的 5 g/L 的 MTT, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h, 弃上清加入 150 μL 的二甲基亚砜(DMSO), 混匀后于 DG3022 型酶标仪, 在 490 nm 波长测定吸光度(A)。细胞生长抑制率 = (1 - 实验孔测定值/对照孔测定值) \times 100%。重复实验 3 次, 结果取平均值。

1.2.4 流式细胞仪分析 LNCaP 细胞和转染后的 KLF6-LNCaP 细胞, 消化分离为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 离心后用 0.1 mol/L 的 PBS 液洗涤 3 次, 700 mL/L 乙醇固定 30 min, 10 g/L 的 Triton X-100 10 mL 处理 10 min, 10 g/L 的 RNase 1 mL 处理 10 min, 2.5 g/L 的碘化丙锭染色 30 min, 采用美国 Coulter 公司 Elite ESP 型流式细胞仪分析。重复实验 3 次, 结果取平均值。

1.2.5 细胞迁移实验 取处于对数生长期的转染前后的 LNCaP 细胞, 制成单细胞悬液, 按 2×10^4 个细胞/孔将细胞加入 24 孔细胞培养板, 50 mL/L CO₂ 条件下 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4~6 h, 在约 60%~80% 融合的单层细胞表面划出一约 2 mm 无细胞的细痕。用 PBS 漂洗 3 次以去除划下的细胞。加入新鲜无血清培养液继续培养 24 h 后, 显微镜下计数迁移到单位长度划痕区的细胞数。每组做 3 复孔平行样。

统计学处理: 所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件进行处理, 采用 *t* 检

验, 其中 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 反应及质粒构建 样本经过 RT-PCR 反应, 显示电泳在约 852 bp 位置出现条带, 为 KLF6 的 cDNA。KLF6-pEGFP-C₁ 质粒载体构建完成后, 酶切鉴定并测序, 结果与已知序列一致。

2.2 KLF6 阳性克隆细胞的筛选 荧光显微镜检查可见成功转染了 pEGFP-C₁ 表达绿色荧光蛋白的阳性表达细胞, 并采用 G418 筛选获得足够数量阳性克隆的含 KLF6 基因的 LNCaP 细胞, 以 KLF6 基因引物进行 RT-PCR 扩增出 KLF6 的 cDNA 证明转染成功。

2.3 KLF6 的表达对 LNCaP 细胞生长的抑制作用

MTT 法观察及细胞生长曲线显示, 转染 KLF6 基因后的 LNCaP 细胞生长增殖受到明显的抑制, 生长抑制率为 (31.9 \pm 4.7)% , 对照组为 0% ($P < 0.01$)。

2.4 细胞周期及 DNA 含量的变化 流式细胞仪定量检测表明, 转染野生型 KLF6 后的 LNCaP 细胞生长 24 h 时即有微弱的凋亡峰出现, 48 h 后出现较为明显的凋亡峰 [Ap 峰 = (29.3 \pm 3.7)%], 与对照组 (8.6 \pm 0.9)% 比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。转染野生型 KLF6 后 48 h, G₀/G₁ 期细胞增加, S 期和 G₂/M 期细胞减少, 转染野生型 KLF6 后的 LNCaP 细胞的细胞周期阻滞以 G₀/G₁ 期为主, 作用 48 h 组占 (75.0 \pm 8.8)% , 对照组为 (55.9 \pm 7.1)% , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 48 h 转染抑癌基因 KLF6 对 LNCaP 细胞周期及 DNA 含量的影响 ($n=3$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡峰	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照	8.6 \pm 0.9	55.9 \pm 7.1	13.5 \pm 1.9	22.9 \pm 2.4
KLF6	29.3 \pm 3.7 ^b	75.0 \pm 8.8 ^a	8.3 \pm 0.6 ^a	16.5 \pm 2.1 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照。

2.5 细胞迁移能力变化 转染野生型 KLF6 后的 LNCaP 细胞划痕后生长 24 h, 显微镜下计数迁移到每平方毫米划痕区的细胞数为 102.8 \pm 15.4, 未转染的对照组 LNCaP 细胞迁移到每平方毫米划痕区的细胞数为 192.7 \pm 25.2, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

近来研究发现抑癌基因 KLF6 与前列腺癌的疾病有密切关系, 其在前列腺癌中的突变率高达 77% , 并且有高度前列腺癌组织特异性, 其研究前景非常广阔^[1]。Chen 等^[2]通过对高分级肿瘤和肿瘤移植组

织、细胞系的研究发现 28% 的高分级肿瘤中 29% 的培养前列腺癌细胞系中存在 *KLF6* 的杂合子突变。前列腺癌的病因学研究中,虽然抑癌基因的缺失或癌基因的过表达均有报道,但仍没有那个单基因被确定为主要的“看门人(gatekeeper)”基因,甚至著名的抑癌基因如 p53, PTEN, k-ras 等也都仅在晚期前列腺癌中起作用^[3]。

KLF6 是一个哺乳动物体内广泛表达的锌指转录因子,在机体内参与细胞的生长分化、生长相关的信号转导、细胞增殖、凋亡和血管生成等^[4]。*KLF6* 通过上调细胞周期依赖激酶抑制物 p21 的表达, p21 阻止 Rb 蛋白的磷酸化,进而导致 E2F 不能激活调节细胞周期进展的关键基因^[5]。p53 主要通过激活和上调 p21 而发挥作用,而 p53 的突变频率在前列腺癌中并不高,而且往往见于转移癌,那么 *KLF6* 是否可以解释这种非依赖 p53 的 p21 的激活,目前仍不明确。Narla 等^[4]认为 *KLF6* 很可能在前列腺癌中扮演类似 p53 在其他肿瘤中的关键的“看门人”抑癌基因的角色和作用。

肿瘤细胞的细胞周期缩短和恶性增殖是其危害机体的重要原因之一,也是恶性肿瘤细胞的基本特征之一,如何使肿瘤细胞的细胞周期变慢,使其恶性增殖特点逆转,成为治疗肿瘤的重要追求目标^[6]。本实验研究证实转染野生型抑癌基因 *KLF6* 后,雄激素依赖型前列腺癌 LNCaP 细胞的生长增殖能力受到了明显的抑制, G_0/G_1 细胞周期内的细胞数目显著增加,说明显著阻止了前列腺癌 LNCaP 细胞的细胞周期进展,说明野生型 *KLF6* 可以部分地逆转前列腺癌 LNCaP 细胞的恶性增殖的表型,减缓其细胞周期进展,提示 *KLF6* 在前列腺癌的发生和进展方面扮演着关键性的作用,是前列腺癌病因和进展中的一个重要抑癌基因。

诱导使肿瘤细胞生长阻滞细胞周期中的某个稽查点(checkpoint),阻滞肿瘤细胞周期的进展,诱导恶性肿瘤细胞发生凋亡是治疗肿瘤的重要途径之一^[7]。本实验结果表明转染野生型抑癌基因 *KLF6* 后,雄激素依赖型前列腺癌 LNCaP 细胞的细胞周期被阻滞在了 G_0/G_1 期,并且流式细胞检测出现了显著的 LNCaP 细胞的凋亡,说明野生型 *KLF6* 可以诱导使前

列腺癌 LNCaP 细胞的细胞周期得到阻滞,诱导使其发生凋亡,减缓细胞增殖的速度,减少肿瘤细胞的数量。提示野生型 *KLF6* 可用于激素依赖型前列腺癌的治疗,也提示 *KLF6* 在前列腺癌的发生和进展方面是一个重要的抑癌基因。

恶性肿瘤的侵袭与转移是其发生和演变过程中最危险的阶段,多数临床肿瘤死于晚期的侵袭转移及其并发症,因此控制肿瘤的侵袭与转移是当今研究的重要课题,降低恶性肿瘤细胞的侵袭转移能力可有效地阻止恶性肿瘤的临床进展,延长肿瘤患者的生存期^[8]。本实验研究证实转染野生型抑癌基因 *KLF6* 后,体外培养的前列腺癌 LNCaP 细胞的侵袭能力明显下降,说明野生型 *KLF6* 可以使前列腺癌 LNCaP 细胞侵袭转移的恶性表型得到一定抑制,减缓前列腺癌的进展,提示 *KLF6* 可以用于激素依赖型前列腺癌的治疗。

【参考文献】

- [1] Narla G, Heath KE, Reeves HL, et al. *KLF6*, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer[J]. *Science*, 2001, 294(5551): 2563-2566.
- [2] Chen C, Hyytinen ER, Sun X, et al. Deletion, mutation, and loss of expression of *KLF6* in human prostate cancer[J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(4): 1349-1354.
- [3] Isaacs W, De marzo A, Nelson WG. Focus on prostate cancer[J]. *Cancer Cell*, 2002, 2: 113-116.
- [4] Narla G, Friedman SL, Martignetti JA. Kruppel cripples prostate cancer: *KLF6* progress and prospects[J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(4): 1047-1052.
- [5] Jeng YM, Hsu HC. *KLF6*, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(5): 625-629.
- [6] Narla G, DiFeo A, Yao S. Targeted inhibition of the *KLF6* splice variant, *KLF6* SV1, suppresses prostate cancer cell growth and spread[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13): 5761-5768.
- [7] Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(36): 9408-9421.
- [8] Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhau HE. Molecular insights into prostate cancer progression: The missing link of tumor microenvironment[J]. *J Urol*, 2005, 173(1): 10-20.