

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.13.044

## Krüppel 样转录因子 8 在恶性肿瘤中的研究进展\*

成撒诺,李甲初 综述,张幸平<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016)

[关键词] Krüppel 样转录因子 8;肿瘤;侵袭;血管生成

[中图分类号] R730.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)13-1849-03

Krüppel 样转录因子 8(KLF8)是 KLFs 家族中一名年轻的成员,能结合细胞中 DNA 的 GC box 或 CACCC 元件,调控富含 GC 启动子的基因表达,参与调节细胞周期<sup>[1]</sup>。研究表明<sup>[2]</sup>,KLF8 在人体多种恶性肿瘤中过表达,与肿瘤的发生、发展密切相关。新近研究发现<sup>[3-4]</sup>,KLF8 与多种血管生成因子的表达关系密切,故研究 KLF8 参与肿瘤新生血管生成的作用及其机制有可能为抗肿瘤血管生成靶向治疗提供新的靶点和策略。现将 KLF8 在恶性肿瘤中的研究进展综述如下。

## 1 KLF8 的生物学特征

KLF8 位于人类 X 染色体,包含 359 个氨基酸残基。它最初是作为 Krüppel 样 Cys2/His2 锌指蛋白质家族的一个转录抑制蛋白而被认识。与家族中的其他成员一样,KLF8 有 3 个高度保守的锌指结构及氨基端可变的转录调节结构域<sup>[2]</sup>。KLF8 的 3 种结构域分别为:(1)核定位序列(nuclear localization signal,NLS),负责将 KLF8 转运到细胞核中。与其他家族成员不同的是 KLF8 有 3 个 NLS<sup>[1]</sup>,其中 2 个 NLS 串联在锌指结构上,对 KLF8 的核定位及其在细胞内的功能非常重要。(2)DNA 结合结构域,负责将目的基因启动子的 DNA 与 KLF8 相连。(3)转录调控区域,负责调控目的基因的表达。

KLF8 蛋白翻译后的修饰包括乙酰化、泛素化、类泛素化、多聚 ADP-核糖化作用(PARylation)等。研究显示,小泛素相关修饰物(SUMO-1)、SUMO-2、SUMO-3 可共价修饰 KLF8<sup>[5]</sup>,发挥主要作用的是 SUMO-1。Lu 等<sup>[6]</sup> 研究显示,KLF8 参与调控细胞周期蛋白 D1(Cycling D1)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2,MMP2)、MMP9 等蛋白的转录,并受 SUMO 蛋白修饰和由 DNA 修复酶 1(poly ADP-ribose polymerase 1,PARP-1)介导的 PARylation 的影响。PARP-1 蛋白与 KLF8 锌指结构 1、2 结合,稳定 KLF8 在核中的表达。

研究表明<sup>[7]</sup>,黏着斑激酶(Focal adhesion kinase,FAK)能够诱导 KLF8 表达。FAK 通过激活 PI3K-Akt 信号通路,诱导 KLF8 启动子被转录因子特异性蛋白 1(specificity protein1,Sp1)激活,使 KLF8 作用于 Cycling D1 启动子的 GC box 区域,激活 Cycling D1,使细胞增殖。

KLF8 在正常组织中低表达,但在肾脏、心脏和胎盘中的表达相对较高<sup>[8]</sup>。最新研究显示<sup>[9]</sup>,KLF8 主要表达于早孕期绒毛组织中的滋养细胞,可能与滋养细胞的侵袭力相关。

## 2 KLF8 在恶性肿瘤中的表达及作用

据文献报道,KLF8 在人类乳腺癌、肝癌、肾癌、胃癌和卵巢癌等多种恶性肿瘤细胞中高表达,可能与癌细胞的增殖、侵

袭、转移和治疗抵抗有关。

Chen 等<sup>[10]</sup> 研究显示,KLF8 在胃癌细胞株中的表达明显高于正常细胞。用 siRNA 干扰其表达后,胃癌细胞的增殖速度明显减慢,KLF8 的表达缺失可导致胃癌细胞的死亡,提示 KLF8 有望成为胃癌治疗的一个潜在靶分子。Wang 等<sup>[11]</sup> 通过 Kaplan-Meier 生存分析发现,KLF8 的表达状态与胃癌患者的生存率密切相关:KLF8 阳性表达的患者术后 5 年生存率明显低于 KLF8 阴性患者,分别为 20%、50% ( $P < 0.01$ )。李甲初等<sup>[12]</sup> 研究发现,在正常肝组织、肝硬化组织、无明确转移的肝细胞癌组织和有明确转移的肝细胞癌组织中,KLF8 蛋白的相对表达量依次增高,分别为 16.7%、33.3%、81.8%、83.3% ( $P < 0.01$ ),提示 KLF8 与肝细胞癌的侵袭和转移密切相关。

Fu 等<sup>[13]</sup> 通过 RT-PCR、Western blot 等实验发现肾癌细胞中 KLF8 的 mRNA 和蛋白水平的表达均明显升高。进一步研究发现,KLF8 参与调控肾癌细胞的生长、增殖、侵袭及凋亡,其表达程度与肿瘤大小、组织学类型和临床分期明显相关(肿瘤大小  $P < 0.01$ 、组织学类型  $P < 0.001$ 、临床分期  $P < 0.001$ )。在与 KLF8 相关的信号通路的研究中发现,FAK 通过激活 PI3K-Akt 信号通路,诱导 KLF8 高表达<sup>[7]</sup>。FAK 在正常卵巢上皮细胞中很难被检测到,但在卵巢肿瘤中高表达,并诱导 KLF8 的高表达。分析表明,KLF8 的表达状态与卵巢肿瘤的临床表现和不良预后有明显的相关性 ( $P < 0.01$ )<sup>[14]</sup>。KLF8 还异常高表达于神经胶质瘤中<sup>[15]</sup>。在体外,抑制 KLF8 在胶质瘤中的表达会导致瘤细胞丧失增殖能力,但具体的机制尚不清楚。KLF8 在促进肿瘤细胞的侵袭和肿瘤细胞的损伤修复中也发挥了重要作用。Wang 等<sup>[16]</sup> 通过在乳腺癌细胞中下调 E 钙黏蛋白(E-cadherin)、上调 MMP2 和 MMP9 后,发现 KLF8 的表达增加。进一步研究发现 KLF8 与 Snail 蛋白共同作用,导致肿瘤细胞发生上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition,EMT),从而促进肿瘤细胞从非侵袭状态转为侵袭状态。此外,KLF8 还与乳腺癌的化疗耐药相关,乳腺癌中异常高表达的 KLF8 通过减少 DNA 损伤的程度来保护乳腺癌细胞免受化疗药物所致的细胞死亡。另一研究发现<sup>[6]</sup>,乳腺癌细胞中 PARP-1 高表达,而 PARP-1 通过 PARylation 修饰 KLF8,使 KLF8 表达更稳定。肿瘤细胞损伤会引起 KLF8 发生 SUMOylation,这种修饰作用可以保护肿瘤细胞免于化疗所致的死亡。因此,KLF8 具有保护肿瘤细胞的作用,在肿瘤的发生发展和治疗抵抗中起着十分重要的作用。

## 3 KLF8 与肿瘤新生血管生成的关系

新生血管生成不仅对于恶性肿瘤的生长、发展至关重要,

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81001096);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC,2010BB5395)。 作者简介:成撒诺(1989-),硕士研究生,主要从事抗肿瘤血管生成方面的研究。 <sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:Zhang.xinping@163.com。

而且还是肿瘤转移的关键步骤。目前已经明确,恶性肿瘤的远处转移是肿瘤细胞通过新生血管网的血管内皮细胞、基底膜的缺陷穿越进入血管,向远处扩散。参与此过程的细胞因子包括血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素(angiotensin, Ang)、基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinase, MMPs)、低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)等。

VEGF 是重要的促血管生长因子<sup>[17]</sup>,在肿瘤新生血管生成中发挥着重要作用。当肿瘤直径超过 1 mm 以后,被激活的肿瘤组织通过自分泌或旁分泌方式分泌 VEGF,促进肿瘤周围组织建立起丰富的毛细血管网。HIF-1 与 VEGF 之间关系密切,有研究表明 HIF-1 可促进 VEGF 的表达,从而促进肿瘤血管的发生<sup>[18]</sup>。HIF-1 同时还调控着多种血管生成因子的转录,如 Ang1、Ang2 和胎盘生长因子。Ang2 在肿瘤血管新生中作用显著,在多种肿瘤组织中均可见 Ang2 及其受体表达增加,尤其是在肿瘤边缘的新生血管区。研究显示<sup>[19]</sup>,Ang2 是胶质瘤、乳腺癌、黑色素瘤细胞转移和侵袭的调控因子,是胰腺癌淋巴结转移的促进因子,而 VEGF 可显著上调 Ang2 在宿主基质细胞中的表达<sup>[17]</sup>。有研究显示 VEGF 可激活 FAK 和相关蛋白,从而维持上皮细胞的存活信号通路。VEGF 还可通过 PI3K-Akt 途径抑制细胞凋亡,而 FAK 可通过激活 PI3K-Akt 信号通路诱导 KLF8 表达,说明 KLF8 与 VEGF 之间有着密切的联系,并且可能还与 HIF-1 和 Ang2 之间有着间接的联系<sup>[20]</sup>。

MMPs 是一类能降解细胞外基质的高度保守的蛋白水解酶,恶性肿瘤细胞通过 MMP2 和 MMP9 实现肿瘤的侵袭和转移。Li 等<sup>[21]</sup>研究发现在肝癌细胞中,KLF8 通过上调 Cyclin D1 和 MMP2 的活性来促进肿瘤细胞的增殖和侵袭,并抑制肿瘤细胞凋亡。Wang 等<sup>[16]</sup>发现 KLF8 可直接结合并激活人 MMP9 基因启动子促进 MMP9 的表达,从而促进乳腺癌细胞的侵袭和转移。Han 等<sup>[3]</sup>研究发现,在肝癌细胞中,KLF8 的表达量与 MMP9 呈正相关,提示 MMP9 可能是 KLF8 的一个下游基因。肝癌的 TNM 分期越晚,KLF8、MMP9 蛋白的表达量及肿瘤血管侵袭的程度越高,提示 KLF8 可能与肿瘤新生血管生成有关。

另有研究显示<sup>[4]</sup>,在肝癌组织中 KLF8 过表达组与对照组比较,VEGF、Ang2、HIF1- $\alpha$  及 MMP2 这些促血管生成因子的 mRNA 表达增加,提示 KLF8 可能通过调控 VEGF、Ang2、HIF1- $\alpha$  及 MMP2 来调控肿瘤血管生成,从而决定肿瘤的侵袭程度。

微血管密度(microvessel density, MVD)是目前广泛应用的评估肿瘤血管生成程度的“金标准”,已被证实与肿瘤的转移及预后有关<sup>[11]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup>通过免疫组化实验发现胃癌组织中 MVD $\geq 32$ ,KLF8 的表达程度与 MVD 水平呈正相关( $P < 0.001$ )。Li 等<sup>[21]</sup>建立小鼠的肝癌模型后,用 KLF8-RNAi 慢病毒感染,肿瘤的新生血管明显减少,MVD 值从 64.3 减少到 21.0( $P < 0.01$ )。提示 KLF8 可能通过新生血管生成参与肿瘤的发展过程。

上述研究结果表明,KLF8 与多种参与肿瘤新生血管生成的因子相关,它们之间可能存在着一个相互调控的网络,但其具体的作用机制仍不清楚。

#### 4 结 语

KLF8 是 KLFs 家族的成员之一,在肿瘤的发生发展和侵袭转移中发挥着重要的作用。KLF8 不仅在肿瘤细胞中高表达,还与多种血管生成因子密切相关,参与肿瘤血管新生的调

控,使其可能成为抗肿瘤血管生成治疗的新靶点。但目前关于 KLF8 与恶性肿瘤中血管生成因子之间的作用机制尚未完全明确,有待进一步的深入研究。

#### 参考文献

- [1] Mehta TS, Lu H, Wang X, et al. A unique sequence in the N-terminal regulatory region controls the nuclear localization of KLF8 by cooperating with the C-terminal zinc-fingers[J]. *Cell Res*, 2009, 19(9): 1098-1109.
- [2] Lahiri SK, Zhao J. Krüppel-like factor 8 emerges as an important regulator of cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2012, 4(3): 357-363.
- [3] Han S, Han L, Sun H, et al. Krüppel-like factor expression and correlation with FAK, MMP9 and E cadherin expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(1): 81-88.
- [4] 李旭,徐亚丽,李英,等. 干扰 Krüppel 样因子 8 表达对肝癌 SMMC7721 细胞中血管生成相关因子的调控作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(5): 483-487.
- [5] 万伟峰,朱继,方升,等. Krüppel 样转录因子 8(KLF8)的结构及功能[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(4): 305-309.
- [6] Lu H, Hu L. A novel role of Krüppel-like factor 8 in DNA repair in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(52): 43720-43729.
- [7] Eaton SA, Funnell AP, Sue N, et al. A network of Krüppel-like factors (Klfs). Klf8 is repressed by Klf3 and activated by Klf1 in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(40): 26937-26947.
- [8] van Vliet J, Turner J, Crossley M. Human Krüppel-like factor 8: a CACCC-box binding protein that associated with CtBP and represses transcription [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(9): 1955-1962.
- [9] Yang Z, Bai B, Luo X, et al. Downregulated Krüppel-Like Factor 8 is involved in decreased trophoblast invasion under hypoxia-reoxygenation conditions [J]. *Reprod Sci*, 2014, 21(1): 72-81.
- [10] Chen G, Yang WJ, Jin W, et al. Lentivirus-mediated gene silencing of KLF8 reduced the proliferation and invasion of gastric cancer cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(10): 9809-9815.
- [11] Wang WF, Li J, Du LT, et al. Krüppel-like factor 8 overexpression is correlated with angiogenesis and poor prognosis in gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(27): 4309-4315.
- [12] 李甲初,杨欣荣,崔越宏,等. KLF8 在不同肝癌细胞株及肝癌组织中的表达及其意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(8): 967-969.
- [13] Fu WJ, Li JC, Wu XY, et al. Small interference RNA targeting Krüppel-like factor 8 inhibits the renal carcinoma 786-0 cells growth in vitro and in vivo[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(8): 1255-1265.
- [14] Wang X, Urvalek AM, Liu J, et al. Activation of KLF8 transcription by focal adhesion kinase in human ovarian epithelial and cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283

(20):13934-13942.

- [15] Schnell O, Romagna A, Jaehnert I, et al. Krüppel-like factor 8 (KLF8) is expressed in gliomas of different WHO grades and is essential for tumor cell proliferation[J]. PLoS One, 2012, 7(1):e30429.
- [16] Wang X, Zheng M, Liu G, et al. Krüppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion[J]. Cancer Res, 2007, 67(15):7184-7193.
- [17] 何立丽, 张伟京, 苏航, 等. Ang-2 与 VEGF 的协同作用及其在抗肿瘤血管新生治疗中的应用[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(2):445-448.
- [18] Monti E, Gariboldi MB. HIF-1 as a target for cancer chemotherapy, chemosensitization and chemoprevention[J]. Curr Mol Pharmacol, 2011, 4(1):62-77.

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.13.045

- [19] Kienast Y, Klein C, Scheuer W, et al. Ang-2-VEGF-A CrossMab, a novel bispecific human IgG1 antibody blocking VEGF-A and Ang-2 functions simultaneously, mediates potent antitumor, antiangiogenic, and antimetastatic efficacy[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(24):6730-6740.
- [20] 段泽星, 谢立群. VEGF 在肿瘤生长和血管生成中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(27):2894-2900.
- [21] Li JC, Yang XR, Sun HX, et al. Up-regulation of Krüppel-like factor 8 promotes tumor invasion and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2010, 139(6):2146-2157.

(收稿日期:2014-12-18 修回日期:2015-02-19)

## USP18 及其在病毒性肝炎等疾病中的研究进展\*

李麟综述, 秦波<sup>△</sup>审校

(重庆医科大学附属第一医院感染科 400016)

[关键词] USP18; 干扰素; 病毒性肝炎; JAK-STAT

[中图分类号] R512.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)13-1851-03

泛素特异性蛋白酶 18(USP18)最初在 1999 年被克隆,其编码的蛋白相对分子质量为  $43 \times 10^3$ ,因此也被称作泛素特异性蛋白酶 43(UBP43)。USP18 最初是 Liu 等<sup>[1]</sup>在分析 AML1-ETO 融合基因敲入小鼠的基因差异表达时被发现并克隆的。近年研究发现 USP18 在干扰素(IFN)治疗多种疾病的应答不佳组中高表达,USP18 可能在其中扮演了重要角色。本文就近年来 USP18 的结构、信号转导及在病毒性肝炎等疾病中的生物学功能等研究进展综述如下。

### 1 USP18 概述

**1.1 USP18 的结构** 人类 USP18 基因定位于 22q11.2 染色体上,属于泛素特异性降解酶家族,在肝脏、胸腺和单核巨噬细胞中高表达。USP18 基因的转录启动子位于干扰素刺激应答反应元件(ISRE)内,故干扰素可以强烈诱发机体表达 USP18。生物信息学分析显示 USP18 编码 372 个氨基酸,蛋白质理论相对分子质量为 43 010.7,蛋白质理论等电点(pI)为 8.05。原子总数(total number of atoms)为 6 015,分子式为 C1900H3007N527O551S30。在哺乳动物网织红细胞中预测半衰期为 30 h;酵母体内预测半衰期大于 20 h;大肠杆菌体内预测半衰期大于 10 h。不稳定系数(instability index)为 57.20,是一个不稳定蛋白质。USP18 蛋白中相对含量比较多的氨基酸是 Leu(45 个,12.1%)、Ser(29 个,7.8%)、Gln(25 个,6.7%)、Lys(23 个,6.2%)、Glu(22 个,5.9%)、Arg(22 个,5.9%)、Val(21 个,5.6%)。酸性氨基酸残基总数(total number of negatively charged residues, Asp+Glu)为 42,碱性氨基酸残基总数(total number of positively charged residues, Arg+Lys)为 45,总平均疏水性(grand average of hydropathicity, GRAVY)为 -0.288,是可溶性蛋白质。USP18 基因编码的蛋

白质二级结构中有 43.01% 是  $\alpha$ -螺旋,12.63% 是  $\beta$ -折叠,41.94% 为无规则卷曲,为混合蛋白质。采用 WoLFPSORT、NetPhos 2.0 Server 等工具进行 USP18 亚细胞定位预测,分析结果显示它位于细胞外或内质网膜上,证明了其分泌蛋白的属性。磷酸化位点预测结果显示 USP18 有 15 个丝氨酸、2 个苏氨酸、2 个酪氨酸,表明其参与了细胞内信号转导。USP18 的活性中心含有高度保守短序列——半胱氨酸残基(半胱氨酸盒)和组氨酸残基(组氨酸盒),该结构是 USP 家族蛋白酶所特有的结构<sup>[2]</sup>。

目前对全长的 USP18 研究较多,普遍认为密码子 AUG 可翻译全长的 USP18 蛋白。Burkart 等<sup>[3]</sup>研究发现了 USP18 的截短亚型 USP18-sf,并证明它是由一种罕见的起始密码子(CUG)编码,这种非常规的起始部位具有较弱的转录起始效率,其可促进约 70% 的 USP18-sf 的表达。功能分析表明,USP18-sf 与全长蛋白都表现出酶活性和干扰 I 型干扰素信号转导的作用;与全长蛋白相比,USP18-sf 表现出不同的亚细胞分布,并在细胞核内表现出增强的去 ISGylation 活性,表明其可能具有更为特殊的功能,但其发挥作用的机制尚不清楚。Tokarz 等<sup>[4]</sup>发现在哺乳动物 F-box 蛋白 skp2 和异位 USP18 水平之间具有逆相关性,进一步研究发现 skp2 蛋白可结合 USP18 并启动它的多泛素化作用,使得 USP18 通过蛋白酶体降解,从而调节 USP18 蛋白的水平,因此 skp2 可能在调节 I 型干扰素的信号转导中发挥重要作用。

**1.2 USP18 与信号转导** USP18 有两个主要功能,即其酶活性和下调下游 I 型干扰素的信号转导。IFN- $\alpha/\beta$  的刺激可上调干扰素刺激基因 15(ISG15)的表达,USP18 能够特异性的从 ISGylation 的蛋白结合物中移出 ISG15,并进一步水解 ISG15 从