

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.003

KLF4 在来曲唑耐药性乳腺癌病理组织中的表达与作用 *

赵 戈¹ 樊 菁¹ 孟慧敏¹ 崔凤强¹ 巫 姜¹ 李松朋¹ 王 敏² 王 廷^{1△}

(1 中国人民解放军空军军医大学西京医院甲乳外科 陕西 西安 710032;

2 中国人民解放军空军军医大学西京医院消化二科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨转录因子 KLF4 在来曲唑(Letrozole)耐药性乳腺癌(breast cancer, BCa)病理组织和细胞中的表达特点及其在来曲唑耐药性病理发生过程中的作用特点及机制。**方法:**采用实时定量 PCR、Western blotting 和免疫组织化学法检测 KLF4 在来曲唑耐药性 BCa 病理组织和细胞中的表达特点;MTT 和细胞凋亡 ELISA 法检测过表达外源性 KLF4 对 BCa 细胞来曲唑药物的影响;荧光素酶报告基因活性检测分析 KLF4 对编码雌激素受体 α (ER- α)的 ESR1 的转录激活作用。**结果:**KLF4 在来曲唑耐药性乳腺癌病理组织及细胞中呈异常高表达($P<0.05$);采用 10^{-5} M 的来曲唑处理 MCF7 细胞可显著抑制细胞活力,并促进细胞发生凋亡,而在细胞中过表达外源性 KLF4 后,这一来曲唑毒性作用可被有效逆转($P<0.05$),细胞活力甚至恢复到来曲唑未处理前状态;荧光素酶报告基因活性检测显示在外源性雌激素 E2 刺激下,GLucON™-ESR1 报告载体的荧光素酶活性显著升高,这一升高趋势可被 10^{-5} M 的来曲唑处理有效抑制;当转染外源性 KLF4 后,来曲唑对 GLucON™-ESR1 报告载体的荧光素酶活性的抑制效应被进一步加强($P<0.01$)。**结论:**KLF4 可能通过转录调控作用直接抑制 ER- α 表达及活性,进而参与对来曲唑耐药性病理发生过程的关键调节作用。

关键词:乳腺癌;来曲唑;KLF4;雌激素受体;转录调控

中图分类号:R-33;R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)04-614-06

Expression and Functional Analysis of KLF4 in Letrozole-Resistant Breast Cancer*

ZHAO Ge¹, FAN Jing¹, MENG Hui-min¹, CUI Feng-qiang¹, WU Jiang¹, LI Song-peng¹, WANG Min², WANG Ting^{1△}

(1 Department of Thyroid Gland and Breast Vascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi,

710032, China; 2 Department of Gastroenterology Division 2, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi,

710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression profiles of transcription factor KLF4 in letrozole-resistant breast cancer (BCa) tissues and in experimentally-induced letrozole-resistant BCa cells and to characterize the potential functions and underlying mechanisms of this key transcription factor during the pathogenesis of letrozole resistance. **Methods:** The expression profiles of KLF4 in letrozole-resistant BCa tissues and in experimentally-induced letrozole-resistant BCa cells were evaluated using RT-qPCR, Western blotting and immunohistochemistry. The effects of the overexpression of exogenous KLF4 on cell viability and apoptosis were determined using MTT assay and apoptotic ELISA. Finally, the potential transcriptional regulation of ESR1 gene (encoding estrogen receptor alpha, ER- α) by KLF4 was assessed using luciferase reporter assay. **Results:** Expression of KLF4 transcriptional factor was significantly induced in letrozole-resistant BCa tissues and in experimentally-induced letrozole-resistant BCa cells ($P<0.05$). Treatment with 10^{-5} M of letrozole significantly inhibited cell proliferation, and resulted in an increased apoptosis in BCa cells. This cytotoxicity of letrozole was noticeably reversed by overexpression of the exogenous KLF4 ($P<0.05$), with cell viability even restoring to the normal level. The luciferase reporter assay demonstrated that stimulation with the exogenous estrogen E2 notably stimulated the relative luciferase activity of GLucON™-ESR1 reporter, and this stimulatory effects were substantially compromised by challenges with 10^{-5} M of letrozole. By contrast, ectopic expression of the exogenous KLF4 further enhanced the inhibitory effects of letrozole on GLucON™-ESR1 activity ($P<0.01$). **Conclusion:** KLF4 may suppress the expression and activity of ER- α at the transcriptional level. KLF4 inhibition of ESR1 transcription may therefore participate in the pathogenesis of letrozole resistance in BCa.

Key words: Breast cancer (BCa); letrozole; KLF4; Estrogen receptor alpha (ER- α); Transcriptional regulation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)04-614-06

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30570982)

作者简介:赵戈(1982-),男,博士,副教授,主要研究方向:乳腺癌内分泌耐药的发病机理研究, E-mail: zhaoge1982119@163.com

△通讯作者:王廷,男,博士,教授,主要研究方向:乳腺癌内分泌耐药的发病机理研究, E-mail: ting_w100@126.com

(收稿日期:2018-08-04 接受日期:2018-08-28)

前言

乳腺癌(breast cancer, BCa)是世界范围内影响女性健康的第二大疾病,也是最常见的女性致死类癌症之一。研究显示70%左右的BCa是雌激素依赖性肿瘤,其发生和发展与雌激素、雌激素受体(estrogen receptor α , ER- α)信号通路密切相关。干扰雌激素作用的内分泌治疗是ER- α 阳性乳腺癌的主要治疗手段之一^[1]。他莫昔芬(Tamoxifen, TAM)作为乳腺癌内分泌治疗的标准用药已有30多年的历史,近年来大样本临床随机对照实验ATAC和BIG1-98等表明第三代芳香化酶抑制剂aromatase inhibitors (AIs)如来曲唑(Letrozole)对绝经后ER- α 阳性乳腺癌患者疗效优于TAM。因此,对于绝经后ER- α 阳性乳腺癌第三代芳香化酶抑制剂有逐步取代TAM之势。然而,临床研究显示应用来曲唑一段时间后40%左右的患者会对来曲唑耐药,导致后续内分泌治疗无从下手、疾病进展迅速,且耐药性BCa的增殖、侵袭和转移等恶性表型均较非耐药性BCa加重^[2]。

来曲唑耐药性乳腺癌细胞的最重要生物学特性是ER- α 表达及活性下降及部分生长因子通路活性的异常升高,二者均可导致癌细胞在不依赖雌激素的情况下持续恶性增殖。此外,生长因子信号的激活反过来亦可抑制ER- α 表达及活性。因此,ER- α 信号无论在BCa病理发展还是来曲唑耐药产生过程中均发挥关键枢纽作用^[3]。鉴于来曲唑是目前为止药效最强的AIs,阐明来曲唑耐药机制对深刻理解AIs耐药发生机制、研制新型靶向内分泌治疗药物、制定合适的治疗方案逆转内分泌治疗耐药、延长患者生存具有重要临床指导意义。

Kruppel-like factor (KLFs)分子超家族是一个包含多个转录因子的重要超家族,已有研究结果显示其在细胞增殖、分化、凋亡、炎症发生、肿瘤侵袭和转移过程中均发挥了重要调控作用^[4]。KLF4是其中一个典型代表,其高表达于肠道、皮肤中的有丝分裂后细胞。既往研究显示KLF4在结肠癌、胃癌、食管癌、肺癌和前列腺癌中均异常低表达,并与肿瘤细胞的高增殖状态、恶性转化过程密切相关,提示KLF4在这些恶性肿瘤细胞中发挥关键抑癌基因作用。有趣的是,在乳腺癌和口腔鳞状细胞癌中,KLF4表达均异常升高^[5]。最新研究表明p21信号通路活性可能是参与调控KLF4作为抑癌基因或癌基因作用的重要信号通路之一^[6]。

鉴于p21在乳腺癌细胞凋亡过程和来曲唑耐药性病理发生过程中的关键调节作用^[7,8],我们推测KLF4在来曲唑耐药性病理发生过程中可能发挥重要作用。据此,本研究系统分析了KLF4在来曲唑耐药性病理组织中的表达特点,并利用过表达外源性KLF4的方法研究了KLF4在来曲唑耐药性病理发生过程中的可能生物学效应,以期深入理解来曲唑耐药性的病理机制提供重要新线索。

1 材料与方法

1.1 人乳腺癌病理样本

本研究获空军军医大学西京医院伦理委员会批准,实验流程严格遵循“赫尔辛基宣言”。45例BCa病例均选自2015-2017年在西京医院就诊患者,所有病人均签署知情同意

书。BCa切除标本根据患者对来曲唑敏感性(影像学检测在来曲唑治疗后瘤体体积减少>50%被认为来曲唑治疗有效)分为“来曲唑敏感”(n=20)、“来曲唑耐药”(n=25)^[9],样本获取后迅速置于液氮中保存,部分样品利用中性福尔马林固定、常规石蜡包埋并行5 μ M切片。

1.2 细胞培养

人乳腺癌MCF7细胞、NIH3T3小鼠胚胎成纤维细胞购自中科院细胞所(Shanghai, China),细胞常规培养于含有10%热灭活胎牛血清(FBS)、100 μ g/mL链霉素和100 U/mL青霉素的DMEM中(75 cm²细胞培养瓶),培养条件为37 $^{\circ}$ C、5% CO₂,培养湿度为95%。来曲唑耐药性MCF7/LR细胞按照文献报道建立:将稳定转染人芳香化酶基因的MCF-7aro细胞(获自ATCC)持续暴露于含有梯度浓度(1、3和5 μ M)的来曲唑培养基中,暴露周期为20周。MCF7/LR细胞最终维持培养于含有1 μ M来曲唑的DMEM中^[9]。pCMV6-KLF4及其空白载体pCMV6 vector购自OriGene公司(北京,中国),过表达外源性KLF4的MCF7/KLF4细胞参考OriGene公司说明书建立。

1.3 免疫组织化学

我们利用VECTASTAIN[®] Elite ABC-Peroxidase Staining Kit(Vector Labs, Burlingame, CA, USA)进行免疫组织化学染色分析。切片常规脱蜡、复水后,浸泡于柠檬酸盐修复液于95 $^{\circ}$ C水浴锅中进行抗原修复30分钟,PBS彻底漂洗后滴加正常山羊血清(Vector Labs)室温封闭1小时。随后利用兔抗人KLF4抗体(Cell Signaling, Shanghai, China)1:200在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。随后利用VECTASTAIN[®] Elite ABC-Peroxidase Staining Kit提供的山羊抗兔二抗及ABC-DAB显色系统进行显色,阳性细胞呈棕黄色沉淀。我们利用Axio Imager M1显微镜(Zeiss, Beijing, China)进行免疫组织化学染色观察和分析。

1.4 体外细胞毒杀实验

利用3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐染色法(MTT)检测细胞活力。MTT法:BCa细胞以 1.0×10^4 密度种植于24-孔板,每孔加入含有10% FBS的DMEM培养过夜,随后加入25 nM的 Δ 4 A和不同浓度的来曲唑药物进行刺激,药物持续刺激9天后,向每个培养孔加入20 μ L MTT,继而在37 $^{\circ}$ C孵育4小时,之后吸去培养上清,产生的沉淀物用100 μ L二甲基亚砜(DMSO)溶解。最后在570 nm处测量反应吸光度。对照组细胞吸光度设为100%,药物处理组的细胞活力=药物处理组吸光度值/对照组细胞吸光度值 $\times$ 100%。

1.5 细胞凋亡的量化分析

采用Roche的凋亡ELISA试剂盒(Cell Death Detection ELISA, Cat. No. 11 544 675 001)分析来曲唑诱导BCa细胞发生凋亡的情况。通过检测胞质内组蛋白相关的DNA片段(单核小体、寡核小体)的含量进而判定细胞凋亡状态。BCa细胞如上述利用25 nM的 Δ 4 A和10⁻⁵ M的来曲唑持续刺激9天后,参考试剂盒说明书将细胞用试剂盒提供的裂解液充分裂解,离心后将去裂解液上清转移至链霉亲和素包被的96孔板内,随后利用试剂盒提供的生物素标记抗组蛋白抗体、过氧化物酶标记的抗DNA单克隆抗体在室温孵育2 h,随后在405 nm处利用分光光度计检测细胞凋亡状态。

1.6 实时定量 PCR

BCa 组织或 BCa 细胞利用 Ambion® RNA extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China) 进行裂解提取总 RNA, 在确定后者浓度后取 1 μ g RNA 进行反转录生成 cDNA, 反应体系为 20 μ L, 反转录利用 PrimeScript 反转录试剂盒 (Takara, Dalian, China) 进行。然后取 1 μ L cDNA 进行定量 PCR 检测, 检测使用 SYBR Green PCR kit (Thermo Scientific, IL, USA)。PCR 反应体系如下: 95 $^{\circ}$ C 起始变性 10 分钟, 之后 95 $^{\circ}$ C 每一循环共计反应 30 循环, 然后 53 $^{\circ}$ C 退火一分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸各 1.5 分钟。PCR 反应在 CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad, USA) 上进行, 目的基因的相对表达量与内参基因 18S 相比较获得, 结果表示为相对于内参的表达倍数。本研究所用引物均参考已发表文献合成^[3,10]。

1.7 蛋白免疫印迹

BCa 细胞用预冷的 RIPA buffer (TIANGEN, China) 进行裂解, 裂解后 13,200 rpm 低温离心 1 小时分离总蛋白。蛋白浓度用 BCA 法进行测定, 每一体积蛋白提取液与等体积上样缓冲液均匀混合, 取等同于 20 μ g 蛋白含量的样品行 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳后将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜, 后者用 8%脱脂奶粉室温封闭 1 小时后与不同一抗 (β -actin: Santa, 1:500; KLF4: CST, 1:1000; ER- α : Abcam, 1:1000) 4 $^{\circ}$ C 杂交过夜; 杂交膜用 TBST 缓冲液漂洗 4 次后, 加入辣根光氧化酶标记的二抗 (Thermo Scientific, IL, USA) 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 30 分钟, 阳性信号最后用增强化学发光法 (Thermo Scientific, IL, USA) 进行检测, 阳性条带最后用 BioRad 成像系统捕获、利用 Quantity One (BioRad) 软件进行半定量分析。

1.8 荧光素酶报告基因活性检测

GLucON™-ESR1 报告载体购自 Gene-Copoeia (Rockville, MD, USA), 按照说明书, 利用 ViaFect™ Transfection Reagent (Promega, Beijing, China) 将 pCMV6-KLF4 及其空白载体 pCMV6 vector 分别与 GLucON™-ESR1 报告载体共转染于 NIH3T3 细胞, 转染 48 小时后, 细胞利用外源性雌激素 (E2, 10^{-2} μ M) 和 / 或来曲唑 (10^{-5} M) 刺激 24 小时, 随后利用 Gene-Copoeia 的 Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0 来检测报告基因的相对荧光素酶活性。

1.9 统计学分析

实验数据以均值 $\pm$ 标准误差表示, 并采用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析 (双尾非配对 T 检验), 多实验组之间的统计学差异利用单因素方差分析进行评估, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 来曲唑耐药性 BCa 病理组织中过表达 KLF4

为了研究 KLF4 与来曲唑耐药性 BCa 之间的作用关系, 我们首先采用实时定量 PCR 法检测了 20 例来曲唑敏感性 BCa 病理组织和 25 例来曲唑耐药性 BCa 病理组织中 KLF4 mRNA 的表达, 结果显示: 来曲唑耐药性 BCa 病理组织中 KLF4 mRNA 的表达显著高于来曲唑敏感性 BCa 病理组织 (1.69 ± 0.76 vs. 0.83 ± 0.44), 升高约 2.04 倍 ($P < 0.05$) (图 1A)。随后, 采用免疫组织化学染色方法检测 KLF4 蛋白表达, 结果显示来曲唑耐药性 BCa 病理组织中 KLF4 蛋白表达较来曲唑敏感性 BCa 病理组织显著升高, 阳性信号主要集中于 BCa 细胞核 (图 1B)。

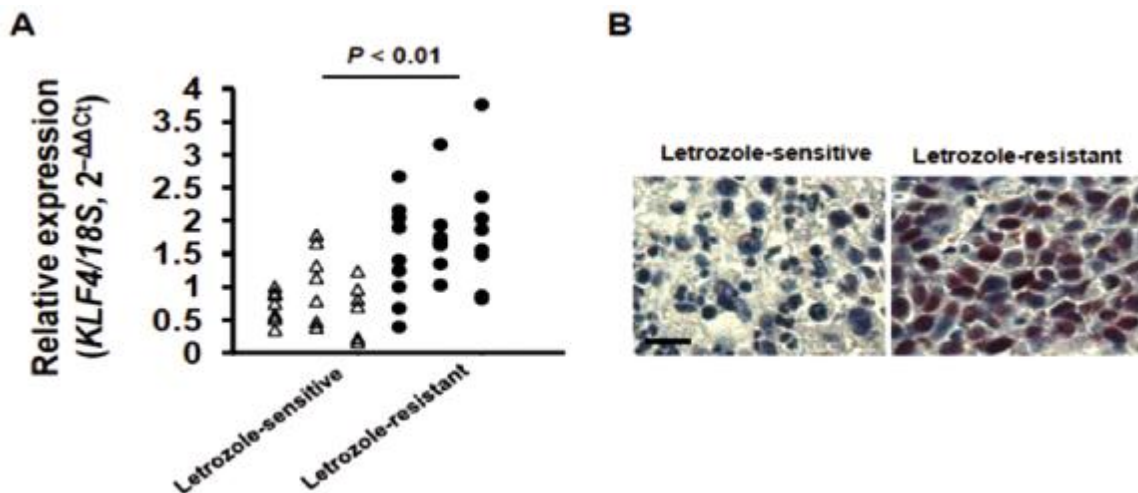


图 1 来曲唑耐药性 BCa 病理组织中过表达 KLF4。(A)实时定量 PCR 检测 KLF4 在不同 BCa 病理组织中的表达状态;(B)免疫组织化学法检测 KLF4 在不同 BCa 病理组织中的免疫定位。Bar=25 μ m

Fig.1 Upregulation of KLF4 in Letrozole-resistant BCa tissues. (A) RT-PCR analysis of KLF4 expression in different BCa tissues. (B) Immunohistochemical staining in different BCa tissues with an anti- KLF4 antibody. Bar=25 μ m

2.2 KLF4 在实验性诱导来曲唑耐药性 BCa 细胞系中异常高表达

为了进一步确定 KLF4 的表达升高与来曲唑耐药性的相关关系, 我们参照文献报道建立了来曲唑耐药性 MCF7/LR 细胞。如图 2A 所示, 相对于来曲唑敏感的 MCF7 细胞, MCF7/LR

细胞在高浓度 (10^{-5} ~ 10^{-4}) 来曲唑刺激时, 细胞仍具有较强 (>80%) 的细胞活力。实时定量 PCR 和蛋白免疫印迹分别显示来曲唑耐药性 MCF7/LR 细胞中 KLF4 mRNA (图 2B) 和 KLF4 蛋白 (图 2C) 均较 MCF7 细胞显著升高 ($P < 0.05$)。

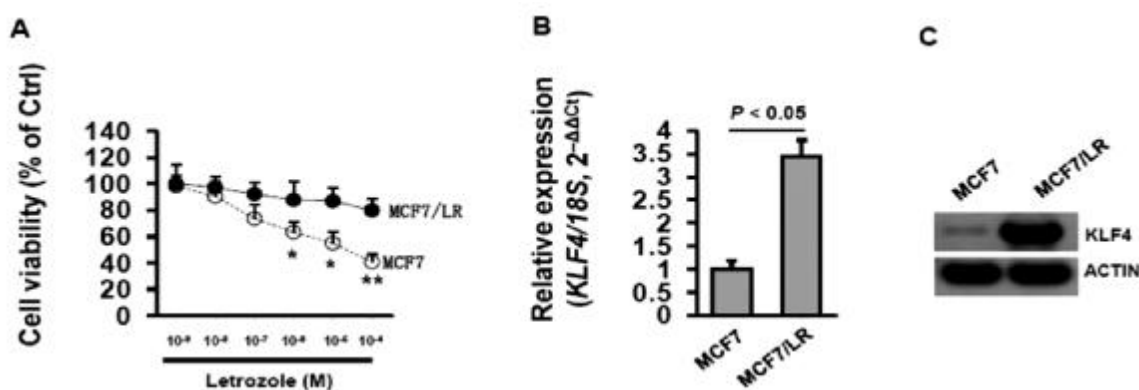


图2 KLF4在实验性诱导来曲唑耐药性BCa细胞系中异常高表达。(A)MTT法检测细胞相对活力进而判断来曲唑耐药性MCF7/LR细胞的建立情况:将稳定转染人芳香化酶基因的MCF-7aro细胞(获自ATCC)持续暴露于含有梯度浓度(1、3和5 μ M)的来曲唑培养基中,暴露周期为20周。MCF7/LR细胞最终维持培养于含有1 μ M来曲唑的DMEM中(*P<0.05,**P<0.01)。(B)实时定量PCR法检测MCF7/LR细胞和MCF7细胞中KLF4 mRNA的表达水平。(C)蛋白免疫印迹法检测MCF7/LR细胞和MCF7细胞中KLF4蛋白的表达水平。

Fig. 2 Upregulation of KLF4 in experimentally-induced letrozole-resistant BCa cells. (A) Verification of the establishment of experimentally-induced letrozole-resistant BCa cells using MTT assay (*P<0.05, **P<0.01). (B) RT-qPCR analysis of KLF4 expression in experimentally-induced letrozole-resistant BCa cells. (C) Western blotting analysis of KLF4 expression in experimentally-induced letrozole-resistant BCa cells.

2.3 过表达外源性KLF4显著提升BCa细胞来曲唑抵抗性

为了明确高表达KLF4是否是引起来曲唑耐药性病理发生的关键因素这一科学问题提供直接证据,我们将外源性KLF4稳定转染于MCF7细胞,构建了MCF7/KLF4细胞。如图3A所示,MCF7/KLF4细胞中,KLF4蛋白含量显著高于MCF7细胞(P<0.05)。采用10⁻⁵M的来曲唑处理MCF7细胞可显著抑

制细胞活力,并促进细胞发生凋亡,而在细胞中过表达外源性KLF4后,这一来曲唑毒性作用可被有效逆转,细胞活力甚至恢复到来曲唑未处理前状态(图3B、3C)。以上结果提示KLF4在来曲唑耐药性病理发生过程中发挥了重要的癌基因作用。此外,过表达外源性KLF4本身对细胞活力、细胞凋亡率无任何影响,提示KLF4主要是在来曲唑刺激细胞时发挥其生物学效应。

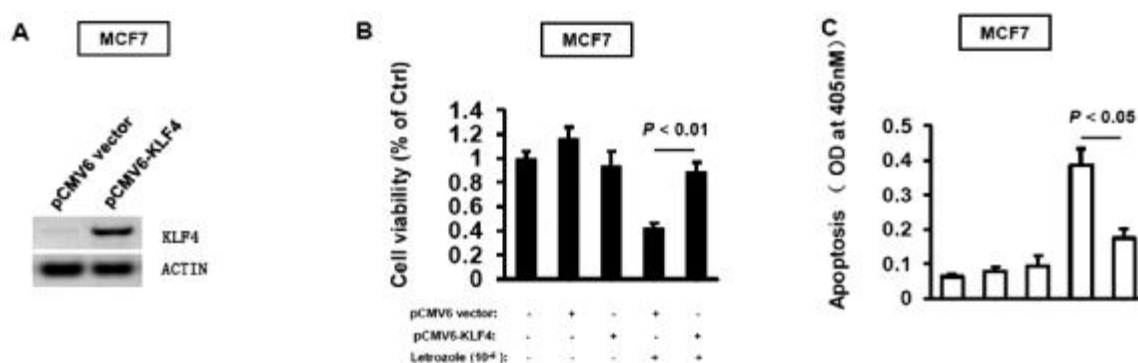


图3 KLF4过表达在BCa细胞中诱导来曲唑耐药性发生。(A)蛋白免疫印迹法确定外源性KLF4在MCF7细胞中的表达情况。(B)Bca细胞以1.0×10⁴密度种植于24-孔板,每孔加入含有10%FBS的DMEM培养过夜,随后加入25nM的 Δ 4A和不同浓度的来曲唑药物进行刺激,药物持续刺激9天后,向每个培养孔加入20 μ L MTT,继而在37℃孵育4小时,之后吸去培养上清,产生的沉淀物用100 μ L二甲基亚砜(DMSO)溶解。最后在570nm处利用MTT法检测细胞相对活力。(C)Bca细胞如上述利用25nM的 Δ 4A和10⁻⁵M的来曲唑持续刺激9天后,利用凋亡ELISA试剂盒来分析来曲唑诱导Bca细胞发生凋亡的情况。

Fig.3 Overexpression of KLF4 potentiates letrozole-resistance in Bca cells. (A) Verification of the KLF4 overexpression in Bca cells using Western blotting analysis. (B) Bca cells with different transfections were seeded in 24-well plates at the density of 1.0×10⁴ and cultured overnight. Subsequently, cells were cultured in medium containing 25 nM of Δ 4A and different concentrations of letrozole for another 9 days. The supernatants were then collected and the absorbance was measured in triplicate spectrophotometry by a MTT method at 570 nm. (C) Bca cells with different transfections were treated as described above and cell apoptosis was then determined using an apoptotic ELISA kit.

2.4 KLF4激活ER- α 编码基因ESR1的转录水平

ER- α 在BCa细胞中表达量降低,可使细胞不依赖雌激素生长,ER- α 的代偿反应消失是来曲唑耐药性病理发生的核心因素之一^[11]。有趣的是,表达谱分析显示编码乳腺癌病理组织中ER- α 的ESR1基因mRNA水平与KLF4 mRNA在表达水平呈显著负相关关系(r=-0.7642,P<0.05,图4A)。进一步研究显

示,过表达外源性KLF4可显著抑制ER- α 在乳腺癌细胞中的表达水平(图4B)。为了提供KLF4可在转录水平直接抑制ESR1基因表达的分子证据,我们应用了荧光素酶报告基因活性检测方法。如图4C所示,在外源性雌激素E2刺激下,GLucON™-ESR1报告载体的荧光素酶活性显著升高,这一升高趋势可被10⁻⁵M的来曲唑处理有效抑制。更为重要的是,当转染

外源性 KLF4 后, 来曲唑对 GLucON™-ESR1 报告载体的荧光素酶活性的抑制效应被进一步加强($P < 0.01$), 提示 KLF4 可在转录水平直接抑制 ESR1 的转录表达。

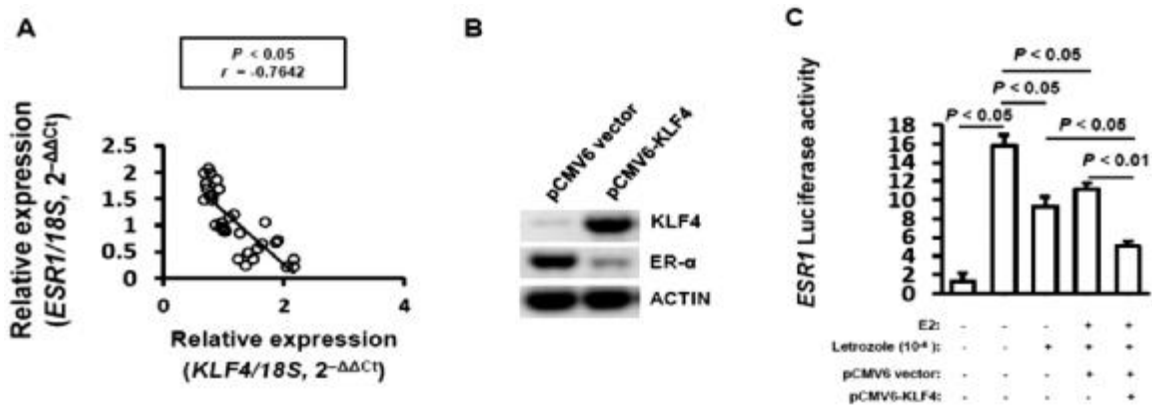


图4 KLF4 转录激活 ESR1 表达水平。(A)实时定量 PCR 结合 Pearson Chi-Square test 分析 KLF4、ESR1 的转录表达水平在 45 例 BCa 临床病理组织中的表达相关关系。(B)蛋白免疫印迹法检测过表达外源性 KLF4 对 ER-α 表达含量的影响。(C)利用 ViaFect™ Transfection Reagent (Promega, Beijing, China)将 pCMV6-KLF4 及其空白载体 pCMV6 vector 分别与 GLucON™-ESR1 报告载体共转染于 NIH3T3 细胞, 转染 48 小时后, 细胞利用外源性雌激素(E2, 10⁻² μM)和 / 或来曲唑(10⁻⁵M)刺激 24 小时, 随后利用 Gene-Copoeia 的 Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0 来检测报告基因的相对荧光素酶活性。

Fig.4 Transactivation of ESR1 by KLF4 signaling in BCa cells. (A) The correlation between KLF4 mRNA and ESR1 mRNA in 45 cases of BCa clinical samples was evaluated using RT-qPCR, followed by Pearson Chi-Square test. (B) Western blotting analysis of KLF4 and ER-α expression in BCa cells with different transfections. (C) NIH3T3 cells were co-transfected with pCMV6-KLF4 or empty vector, along with GLucON™-ESR1 reporter plasmids. 48 h after transfection, cells were stimulated with 10⁻² μM of E2 and 10⁻⁵ M of letrozole for another 24 h. Cells were then harvested and subjected to luciferase reporter assay using Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0.

3 讨论

大量研究证实关键转录因子及其下游信号通路的表达及活性改变是引起乳腺癌来曲唑耐药性病理发生的重要分子机制之一, 然而究竟有多少转录因子参与其中, 且其下游的分子通路又是如何被调控的尚不完全清楚^[1]。我们的研究显示 KLF4 在来曲唑耐药性病理发生过程中异常高表达, 很可能通过转录调控作用直接抑制 ER-α 表达及活性, 进而参与对来曲唑耐药性病理发生过程的关键调节作用。

目前为止, KLF4 在来曲唑耐药性 BCa 病理组织中异常高表达的分子机制尚未完全明确。氧化应激(Oxidative Stress, OS)是指体内氧化与抗氧化作用失衡, 倾向于氧化, 导致中性粒细胞炎性浸润, 蛋白酶分泌增加, 产生大量氧化中间产物。氧化应激是由自由基在体内产生的一种负面作用, 并被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素。大量研究证实, OS 的异常升高是导致 BCa 耐药、疾病进展迅速的重要原因之一。而当持续的暴露于来曲唑时, BCa 体内会产生大量自由基, 包括超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($OH^{\cdot}$)和过氧化氢(H_2O_2)等, 从而导致氧化应激状态异常升高^[12,13]。有趣的是, 已有研究显示 KLF4 在神经细胞^[14]、心肌细胞^[15]和部分肿瘤细胞^[6]均可受 OS 的调控。此外, KLF4 自己也可以通过调节 AMPK 信号通路来干预血管平滑肌细胞的 OS 代谢过程^[17]。以上数据充分表明 KLF4 既可作为氧化应激信号的靶点又可作为其上游调节信号来影响 OS 的代谢过程。

从癌细胞自身角度而言, BCa 细胞主要通过两个途径促进 AIs 耐药性产生。一方面, 抑制 ER-α 表达和转录活性, 使癌细

胞对低雌激素水平的需求降低, 进而促使细胞在缺乏雌激素的情况下持续生长; 另一方面, 激活其他促生长(Her-2、IGF-1R)、抗凋亡信号通路活性(如 PI3K/AKT、mTOR)进一步使癌细胞在不依赖于雌激素的环境中继续增殖。需要强调的是, 激活其他促生长和抗凋亡信号通路往往与抑制 ER-α 表达具有重要 crosstalk, 例如, MAPK 激活后在胞质中激活一系列蛋白激酶或进入核内引起转录因子 AP-1、核因子 NF-κB 或 ER-α 的磷酸化, 并能增强 ER-α 与共刺激因子的结合, 减弱 ER-α 与共抑制因子的结合, 从而调控 ER-α 下游基因的转录^[18-20]。鉴于此, 对 ER-α 表达水平的抑制是其他参与诱导 AIs 耐药性发生的不同机制的终末汇合点或关键 crosstalk 交互点, 积极找寻 AIs 耐药性病理发生过程中抑制 ER-α 表达的分子机制将会大大有助于理解这一复杂病理过程并筛选逆转耐药的靶向治疗新方法。大量研究证实对 ESR1 基因的转录抑制作用是 BCa 细胞中诱发 ER-α 表达水平降低的关键分子机制之一, 如肿瘤转移相关蛋白 1(MTA1)是一个在 BCa 转移、侵袭过程发挥关键促进作用的转录因子, MTA1 可通过募集组蛋白去乙酰化酶至 ESR1 基因的启动子区, 发挥抑制 ER-α 表达水平的作用^[7]。类似的, 锌指蛋白 Slug 也可在转录水平有效抑制 ESR1 表达, 而干预 BCa 细胞中的 Slug 表达水平可成功逆转并回复 ER-α 表达水平, 从而显著增强 BCa 细胞对内分泌疗法的敏感性^[8]。我们的研究继续深入拓宽了上述分子机制, 帮助鉴定出 KLF4 可作为 ESR1 基因的直接上游调控信号, 通过直接结合于 ESR1 基因的启动子区域发挥转录抑制作用。此外, 由于转录调控机制往往发生于细胞产生明确生化代谢变化及生物学功能之前, 因此, 继续深入研究 KLF4 调控 ESR1 基因表达的作用性质及其

分子机制将有助于筛选到对于 BCa 来曲唑耐药性病理发生具有重要诊断、预后指导意义的早期分子标志物,具有显著转化医学意义。

综上,本研究系统分析了关键转录因子 KLF4 在来曲唑耐药性乳腺癌病理组织及细胞中的表达特点、利用过表达干预手段研究了上调 KLF4 表达水平对于 BCa 细胞来曲唑敏感性的生物学作用,进而明确 KLF4 很可能通过转录调控作用直接抑制 ER- α 表达及活性进而参与对来曲唑耐药性病理发生过程的关键调节作用。本研究从 "ER- α 表达及活性" 调控机制为着眼点,系统阐明了 KLF4 在来曲唑耐药性乳腺癌病理过程中的表达及作用特点,为从转录水平理解乳腺癌来曲唑耐药性的复杂发病机理提供了重要新线索。

参考文献(References)

- [1] Tancredi R, Furlanetto J, Loibl S. Endocrine Therapy in Premenopausal Hormone Receptor Positive/Human Epidermal Growth Receptor 2 Negative Metastatic Breast Cancer: Between Guidelines and Literature[J]. *Oncologist*, 2018, 23(8): 974-981
- [2] Augusto TV, Correia-da-Silva G, Rodrigues CMP, et al. Acquired resistance to aromatase inhibitors: where we stand! [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(5): R283-R301
- [3] Yu T, Yu HR, Sun JY, et al. miR-1271 inhibits ERalpha expression and confers letrozole resistance in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(63): 107134-107148
- [4] Sweet DR, Fan L, Hsieh PN, et al. Kruppel-Like Factors in Vascular Inflammation: Mechanistic Insights and Therapeutic Potential [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018; 5: 6
- [5] Yu M, Hao B, Zhan Y, et al. Kruppel-like factor 4 expression in solid tumor prognosis: A meta-analysis [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 485(6): 50-59
- [6] Jia ZM, Ai X, Teng JF, et al. p21 and CK2 interaction-mediated HDAC2 phosphorylation modulates KLF4 acetylation to regulate bladder cancer cell proliferation [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37 (6): 8293-8304
- [7] Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, et al. Discordant cellular response to presurgical letrozole in bilateral synchronous ER+ breast cancers with a KRAS mutation or FGFR1 gene amplification [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(10): 2301-2305
- [8] Nair HB, Kirma NB, Ganapathy M, et al. Estrogen receptor-beta activation in combination with letrozole blocks the growth of breast cancer tumors resistant to letrozole therapy [J]. *Steroids*, 2011, 76 (8): 792-796
- [9] Vilquin P, Donini CF, Villedieu M, et al. MicroRNA-125b upregulation confers aromatase inhibitor resistance and is a novel marker of poor prognosis in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17 (4): 13-33
- [10] Lee HK, Lee DS, Park JC. Nuclear factor I-C regulates E-cadherin via control of KLF4 in breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15 (2): 113-124
- [11] Zhang Q, Liu XY, Li S, et al. Repression of ESR1 transcription by MYOD potentiates letrozole-resistance in ERalpha-positive breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 492 (3): 425-433
- [12] Muhammad A, Ibrahim MA, Erukainure OL, et al. Metabolism and toxicological implications of commonly used chemopreventive drugs against breast cancer/carcinogenesis[J]. *Curr Drug Metab*, 2016[Epub ahead of print]
- [13] Khatri R, Shah P, Guha R, et al. Aromatase Inhibitor-Mediated Downregulation of INrf2 (Keap1) Leads to Increased Nrf2 and Resistance in Breast Cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(7): 1728-1737
- [14] Zhou G, Meng S, Li Y, et al. Optimal ROS Signaling Is Critical for Nuclear Reprogramming[J]. *Cell Rep*, 2016, 15(5): 919-925
- [15] Liao X, Zhang R, Lu Y, et al. Kruppel-like factor 4 is critical for transcriptional control of cardiac mitochondrial homeostasis[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3461-3476
- [16] Liu C, La Rosa S, Hagos EG. Oxidative DNA damage causes premature senescence in mouse embryonic fibroblasts deficient for Kruppel-like factor 4[J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54(9): 889-899
- [17] Sunaga H, Matsui H, Anjo S, et al. Elongation of Long-Chain Fatty Acid Family Member 6 (Elovl6)-Driven Fatty Acid Metabolism Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Through AMP-Activated Protein Kinase/Kruppel-Like Factor 4 (AMPK/KLF4) Signaling [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(12). pii: e004014
- [18] Lee W, Ko KR, Kim HK, et al. Dehydrodiconiferyl Alcohol Inhibits Osteoclast Differentiation and Ovariectomy-Induced Bone Loss through Acting as an Estrogen Receptor Agonist[J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(6): 1343-1356
- [19] Mu PW, Jiang P, Wang MM, et al. Oestrogen exerts anti-inflammation via p38 MAPK/NF-kappaB cascade in adipocytes [J]. *Obes Res Clin Pract*, 2016, 10(6): 633-641
- [20] Wu YM, Chen ZJ, Liu H, et al. Inhibition of ERRalpha suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells by directly targeting fibronectin [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 25588- 25601
- [21] Ning Z, Gan J, Chen C, et al. Molecular functions and significance of the MTA family in hormone-independent cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2014, 33(4): 901-919
- [22] Bai JW, Chen MN, Wei XL, et al. The zinc-finger transcriptional factor Slug transcriptionally downregulates ERalpha by recruiting lysine-specific demethylase 1 in human breast cancer [J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(5): e330-e341