

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.32.005

siRNA 沉默 KLF4 表达促进 HeLa 细胞迁移与增殖 *

宋 晖 任晓丽 刘海霞 魏 莉 陈必良

(第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究 Krü ppe 样因子 4(KLF4)的表达下调对 HeLa 细胞迁移与增殖的影响。**方法:**设计合成针对 KLF4 的 siRNA 和阴性对照 siRNA,并转染至 HeLa 细胞中。使用含有 10 ng/mL TGF- β 1 和 10%胎牛血清的 DMEM 培养液诱导 HeLa 细胞发生上皮间质转化,对照组使用不含 TGF- β 1 的培养液。通过 Transwell 迁移实验和划痕实验观察 HeLa 细胞迁移变化;通过细胞增殖实验和流式细胞术观察 HeLa 细胞增殖状况和细胞周期分布。**结果:**转染了 siRNA 的 HeLa 细胞经 TGF- β 1 诱导后,其细胞迁移能力较其他各组显著提高;与转染了阴性对照 siRNA 和空白对照的细胞相比,转染 siRNA 的 HeLa 细胞增殖能力明显提高;TGF- β 1 可以使 HeLa 细胞周期发生 G1 期阻滞,但是采用 siRNA 干扰 KLF4 的表达对此过程无明显影响。**结论:**使用 siRNA 下调 KLF4 的表达可以促进 HeLa 细胞的迁移与增殖。

关键词:Krü ppe 样因子 4;HeLa 细胞;迁移;增殖;转化生长因子 - β 1

中图分类号:R-33;R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)32-6228-04

Silencing the Expression of KLF4 by siRNA Improves the Migration and Proliferation of HeLa Cells*

SONG Hui, REN Xiao-li, LIU Hai-xia, WEI Li, CHEN Bi-liang

(Department gynecology and obstetrics of Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of KLF4 expression downregulation on the migration and proliferation of HeLa cells. **Methods:** siRNA targeted to KLF4 and control siRNA were designed and transfected into the HeLa cells. DMEM with 10ng/ml TGF- β 1 and 10% fetal calf serum (FBS) was used to induce the epithelial mesenchymal transition of HeLa. Culture medium without TGF- β 1 was taken as control. The migration of HeLa cells were observed by Transwell and scratch wound assay. The proliferation and cell cycle of HeLa cells were detected by proliferation assay and Flow Cytometry. **Results:** Compared with other groups, the migration of HeLa cells were improved greatly after being transfected by siRNA-KLF4 and induced by TGF- β 1. The proliferation of HeLa cells transfected by siRNA-KLF4 were obviously increased compared with the cells transfected by control siRNA and blank control. TGF- β 1 could induce G1 block of HeLa cell cycle, but the downregulation of KLF4 showed no obvious effects. **Conclusion:** Downregulation of the KLF4 expression by siRNA obviously improve the migration and proliferation of HeLa cells.

Key words: KLF4; HeLa cells; Migration; Proliferation; TGF- β 1

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

Article ID: 1673-6273(2017)32-6228-04

前言

Krü ppe 样因子 4(KLF4)作为一种具有锌指结构的转录因子对包括上皮间质转化在内的多种细胞行为如增殖、凋亡、分化、迁移及肿瘤发生都具有调节作用^[1-3]。我们的前期研究也已证实通过 siRNA 沉默 KLF4 表达可促进 HeLa 细胞上皮间质转化,并对此过程中一些标志性蛋白分子表达发挥调节作用,如 E-cadherin、ZO-1 和 N-cadherin 等,对细胞的粘附、迁移等生物学行为也有重要影响,而这些细胞行为是肿瘤发展与转归的基础^[4]。本研究拟在前期研究的基础上,进一步探讨 KLF4 对 HeLa 细胞迁移与增殖的影响,为阐明 KLF4 在宫颈癌发展与转归中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TGF- β 1(Peptidech, 美国);胎牛血清 FBS (四季青生物有限公司,杭州);双抗(青霉素、链霉素)(华北制药股份有限公司);含 EDTA 0.25%胰蛋白酶(Hyclone, 美国);CCK-8 检测试剂盒(碧云天,北京);siRNA 转染试剂(Dharmacon);针对 KLF4 的 siRNA 及阴性对照 siRNA 由锐博生物(广州)设计合成;针对 KLF4 的 siRNA 序列:正义链 5'GGACGGCUGUGGAUGGAAA dTdT 3' 反义链 3'dTdT CCUGCCGACACCUACCUUU 5'。

1.2 主要设备

光学显微镜及照像系统(日本 OLYMPUS 公司);台式离心机(德国 Eppendorf 公司);细胞培养箱(美国 Thermo 公司);Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司);Transwell 小室及配套 12 孔板,细胞培养板(美国 Corning)。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81301921);陕西省自然科学基金项目(2013JM4023)

作者简介:宋晖,E-mail: songhuix@163.com

(收稿日期:2017-05-14 接受日期:2017-06-02)

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 HeLa 细胞接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 37℃、含有 5%CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。待细胞贴壁后, 每两天换一次培养液并用倒置显微镜观察记录细胞形态; 进行 TGF-β1 诱导培养的细胞, 在细胞贴壁后更换为含 10 ng/mL TGF-β1 的 DMEM 条件培养液进行培养。

1.3.2 siRNA 转染 HeLa 细胞以 5 × 10⁵ 孔接种于 6 孔板中, 10%胎牛血清的 DMEM、37℃、5%CO₂ 条件下进行培养。待细胞生长至融合达 60% - 70% 时, 按照转染试剂说明书以 50 nM 终浓度进行 siRNA 转染; 转染 6 小时后, 去除含有转染试剂的培养液, 更换为含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液或者含 TGF-β1 的 DMEM 条件培养液继续培养至预定时间。Western blot 检测各组 HeLa 细胞中 KLF4 表达情况。

1.3.3 Transwell 迁移实验 细胞培养至设计时间后, 将细胞消化, 吹散成为单细胞悬液, 并计数; 按照 2 × 10⁴ 个每孔的数量, 将各组细胞接种于直径 6.5 mm 的 Transwell 小室的上层, 设置 3 个复孔; 6 小时后将 Transwell 小室的上层、下层分别更换为预先设计的培养液; 更换培养液 12 小时后, 去除所有的培养液, 并用 100%甲醇 -20℃ 条件下固定细胞 15 分钟; 待固定液自然晾干后, 1%结晶紫溶液染色 10 分钟, 用棉签擦去附着于 Transwell 小室底膜上层的细胞后, 拍照记录。

1.3.4 划痕实验 细胞培养至设计时间后, 使用无菌的 10 μL 移液枪头沿直尺在培养皿的底部轻轻划痕; 用 PBS 洗去脱落的细胞后, 各组再加入各自的培养液, 取不同视野拍照记录划痕情况; 待细胞培养 36 小时后, 再次拍照记录划痕情况。

1.3.5 细胞增殖实验 各组的细胞培养 1、3、5、7、9 天后, 检测 CCK-8 在 450 nm 波长的 OD 值, 绘制曲线。

1.3.6 细胞周期检测 各组细胞按照前述步骤进行 siRNA 转染后, 加入各自的培养液培养 2 天; 用含 EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化, 离心, 收集细胞; 用含 67%无水乙醇的 PBS 重悬细胞, 并吹散成为单细胞悬液; 经 PI 染色后, 流式细胞仪检测各组周期分布情况。

1.4 统计学方法

数据处理与分析采用 SPSS 17.0 统计学软件进行, 两样本率比较采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA-KLF4 转染对 HeLa 细胞中 KLF4 表达水平的影响

将针对 KLF4 的 siRNA 和阴性对照 siRNA 成功转染入 HeLa 细胞 48 小时后, 提取细胞总蛋白。如图 1 所示, 与空白对照组和阴性 siRNA 组相比, 针对 KLF4 的 siRNA 组的 KLF4 蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$), 而两对照组的 KLF4 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

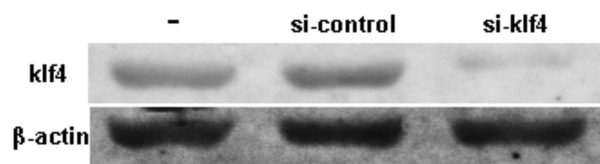


图 1 siRNA-KLF4 转染对 HeLa 细胞中 KLF4 表达水平的影响

Fig. 1 Effect of siRNA-KLF4 transfection on the KLF4 expression in HeLa cells

2.2 沉默 KLF4 对 HeLa 细胞迁移的影响

经 siRNA-KLF4 转染及 TGF-β1 诱导的 HeLa 细胞按照一定密度接种于 Transwell 小室上层, 贴壁迁移 12 小时后, 固定染色, 擦去上层细胞, 结果如图 2 所示。仅经 TGF-β1 诱导 4 天的细胞与未经诱导的细胞相比, 其迁移能力明显增加。经过 12 小时的迁移, 诱导组迁移至 Transwell 小室底膜下层的细胞数显著高于未诱导组 ($P < 0.05$), 转染 siRNA-KLF4 但是未经 TGF-β1 诱导的细胞与对照组相比迁移至 Transwell 小室底膜下层的细胞数也明显提高 ($P < 0.05$), siRNA-KLF4 转染并经过 4 天 TGF-β1 诱导的细胞与仅进行诱导的细胞相比, 迁移至 Transwell 小室底膜下层的细胞数明显增加 ($P < 0.05$)。

除了 Transwell 实验, 测定细胞迁移能力的经典实验还有划痕实验。在转染了 siRNA-KLF4 后, 各实验组根据设计加入不同的培养液培养 4 天后, 划痕并洗去脱落的细胞, 然后加入同样的培养液再培养 36 小时后固定, 结果如图 3 所示, 图中虚线所示为细胞划痕的边缘和细胞迁移的前缘。通过计算划痕平均宽度 (面积 / 高度) 比较各组间迁移能力。与空白对照组相比, TGF-β1 诱导组细胞的迁移能力提高明显 ($P < 0.05$), 而转染了 siRNA-KLF4 同时进行 TGF-β1 诱导的细胞, 其迁移能力较单纯对照组增加更多 ($P < 0.05$)。这两组的实验结果与 Transwell 实验相一致。但是, 同时我们也观察到, 未进行 TGF-β1 诱导的

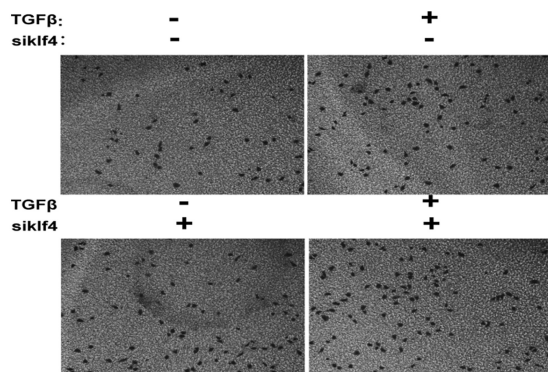
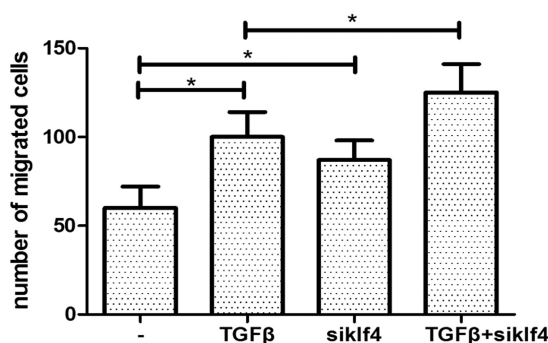


图 2 siRNA 和 TGF-β1 联合对 HeLa 细胞迁移的影响: Transwell 实验 (与空白对照组相比, $*P < 0.05$)

Fig. 2 Combined effect of siRNA and TGF-β1 on the migration of HeLa cells: Transwell assay (vs. blank control, $*P < 0.05$)



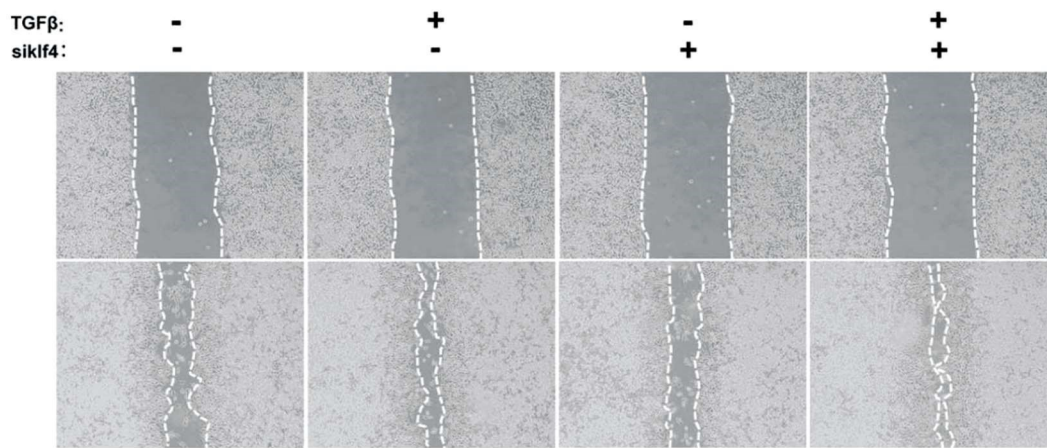


图 3 siRNA 和 TGF-β1 联合作用对 HeLa 细胞迁移的影响:划痕实验

Fig.3 Combined effect of siRNA and TGF-β1 on the migration of HeLa cells: Scratch wound assay

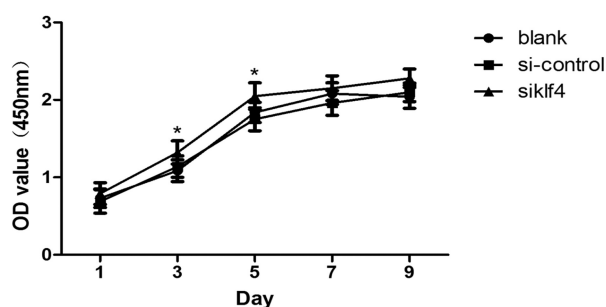


图 4 siRNA-KLF4 对 HeLa 细胞增殖的影响

(与空白对照组相比, *P<0.05, N=18)

Fig. 4 Influence of siRNA-KLF4 on the proliferation of HeLa cells

(vs. blank control, *P<0.05, N=18)

siRNA-KLF4 转染组与空白对照组相比却未表现出明显的差别 (P>0.05)。

2.3 沉默 KLF4 对 HeLa 细胞增殖的影响

不同分组的细胞培养 1、3、5、7、9 天后, 检测 CCK-8 在 450nm 波长的 OD 值,结果如图 3 所示。转染了 si-Control 的细

胞,其细胞增殖能力与对照组相比无统计学上的差异。转染了 siRNA-KLF4 的 HeLa 细胞, 其 OD 值在第 3 天和第 5 天与空白对照组及阴性对照组相比有统计学上的差异,但是增殖能力的提升并不明显。当时间延长到第 7 天之后,各组之间几乎没有任何差别。造成这种现象的原因,可能是 siRNA-KLF4 的作用消失,也可能是细胞增殖较快,导致出现了接触抑制,从而使得各组间的差异消失。

2.4 沉默 KLF4 对 HeLa 细胞周期的影响

本部分实验分组与上述两部分相同,经转染及诱导培养 2 天后, 流式细胞仪检测各组细胞周期如图所示。未转染组经 TGF-β1 诱导后与空白对照组相比,G1 期的细胞比例呈现出统计学上的差异, 提示在 TGF-β1 作用下,HeLa 细胞发生了 G1 期阻滞。转染了 siRNA-KLF4 但未进行 TGF-β1 诱导的细胞周期的分布与对照组无明显区别。而转染 siRNA-KLF4 经 TGF-β1 诱导的细胞与转染 siRNA-KLF4 未诱导的细胞相比也发生了明显的 G1 期阻滞。

3 讨论

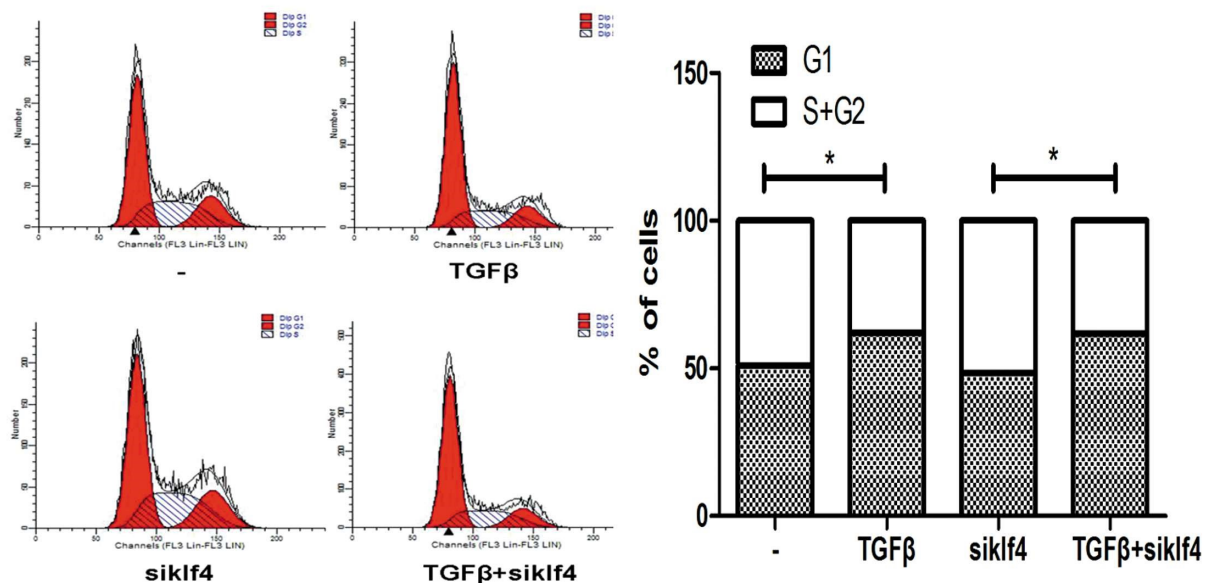


图 5 siRNA 与 TGF-β1 联合作用对 HeLa 细胞周期的影响(*P<0.05)

Fig. 5 Combined effect on cell cycle distribution of HeLa cells by siRNA and TGF-β1: (*P<0.05)

宫颈癌作为全球发病率第二大的女性癌症,其转移和复发对患者的生命健康构成极大威胁^[7]。但是,宫颈癌细胞自身的转移和侵袭机制目前尚不清楚。近些年的研究认为造成宫颈癌转移侵袭的一个重要因素是上皮间质转化^[8,9]。研究证实 TGF- β 1 能够促使 HeLa 细胞发生上皮间质化^[10],并且 TGF- β 1 在此过程中通过 Smad 和非 Smad 途径最终作用于细胞表面的粘附分子,其中最为重要的是 E-cadherin^[11]。E-cadherin 通常被视为细胞发生上皮间质化的标志性分子。当 E-cadherin 在细胞中表达降低并从细胞表面解离后,细胞内与其结合的 β -catenin 将会进入细胞浆。作为一种转录因子, β -catenin 自身也能够调控与上皮间质化相关的分子的表达。同时,E-cadherin 的解离也能够引起胞内与其结合的 p120 的释放,而 p120 能够调节与细胞骨架重组密切相关的 Rho GTPases 蛋白,从而促进细胞的迁移。

KLF4 作为一种能够调控多种基因表达的转录因子,其表达同样受到 TGF- β 的调节^[12,13]。有研究表明 KLF4 在肿瘤细胞中的表达随着肿瘤发展程度的增加而减少^[14-17]。这些结果提示 KLF4 对肿瘤细胞的发生发展在一定程度上发挥着抑制作用。我们的前期研究也显示在 HeLa 细胞的上皮间质化过程中,KLF4 的表达同样是受到抑制的。同时,通过 siRNA 抑制 KLF4 的表达后,客观上促进了 HeLa 细胞的上皮间质化过程,具体表现为细胞上皮间质化的标志性蛋白的表达改变^[6]。在此基础上细胞的迁移能力进一步得到提升^[18,19]。

在本实验研究中,通过 Transwell 实验和划痕实验,我们同样观察到经过 TGF- β 1 诱导的 HeLa 细胞,其迁移能力较未诱导者明显增加。这个结果提示在宫颈癌细胞的转移过程中,TGF- β 1 也可能作为一种促进因子,通过促使癌细胞发生上皮间质化而提升其转移能力。当我们仅仅降低 KLF4 在 HeLa 细胞中的表达而不对其进行 TGF- β 1 诱导时,从 Transwell 结果来看,其迁移能力也得到了部分提升,但是划痕实验的结果则未能观察到同样的现象。这些结果的出现可能与 KLF4 对 HeLa 细胞迁移的影响力不够有关,单纯的 KLF4 的表达改变还不足以影响到细胞整体的迁移能力。但是,当我们将 KLF4 的表达抑制和 TGF- β 1 诱导结合起来共同作用于 HeLa 细胞时,其迁移能力的改变则是显著的。上述结果说明虽然 TGF- β 1 自身能够抑制 KLF4 的表达并促进细胞的迁移,但这个过程受到了其他因素的反馈作用的。当 KLF4 的表达继续降低后,细胞的迁移能力能够再次得到提升。

KLF4 对肿瘤细胞的抑制作用除了通过抑制其癌细胞的迁移能力减弱其转移,也能够通过抑制癌细胞的增殖减缓肿瘤的生长。本实验研究中,我们通过 siRNA 抑制了 KLF4 的表达后,仅在抑制后的第 3 天和第 5 天观察到了细胞增殖能力的增加。在检测的起始阶段,可能是 siRNA 的效应尚未表现。在后期的实验中,可能是细胞间的接触抑制抵消了本应体现出的增殖改变。由于本部分实验未对其在细胞内的分子机制进行研究,因此无法对此现象进行更为详细的解释,其背后具体的机制还需要进一步的实验证实。

考虑到 KLF4 能够影响细胞的增殖,我们推断其有可能是通过影响细胞周期发挥作用的。同时也有研究显示正常的动物上皮细胞受到 TGF- β 1 的作用,其细胞周期将会停留在 G1 早

期^[20]。因此,在本实验研究中,我们也检测了转染 siRNA 并进行 TGF- β 1 诱导的 HeLa 细胞的细胞周期变化,结果显示单一的 siRNA 转染对细胞周期没有明显的影响。但是经 TGF β 1 诱导的细胞,无论之前是否转染了 siRNA,其细胞周期都发生了明显的 G1 期阻滞。因此,在 HeLa 细胞的 EMT 过程中,KLF4 的表达受到抑制并不影响其细胞周期的变化,在此过程中发挥作用的主要是 TGF- β 1 的诱导作用。

综上所述,使用 siRNA 下调 KLF4 的表达可以促进 HeLa 细胞的迁移与增殖,但对细胞周期无明显影响。

参考文献(References)

- [1] Cui J, Shi M, Quan M, et al. Regulation of EMT by KLF4 in gastrointestinal cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9): 986-995
- [2] Simmen RC, Pabona JM, Velarde MC, et al. The emerging role of Kruppel-like factors in endocrine-responsive cancers of female reproductive tissues[J]. *J Endocrinol*, 2010, 204(3): 223-231
- [3] Yang WT, Zheng PS. Promoter hypermethylation of KLF4 inactivates its tumor suppressor function in cervical carcinogenesis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88827
- [4] Segura MF, Jubierre L, Li S, et al. Kruppel-like factor 4 (KLF4) regulates the miR-183~96~182 cluster under physiologic and pathologic conditions[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 26298-26311
- [5] Nishimura K, Aizawa S, Nugroho FL, et al. A Role for KLF4 in Promoting the Metabolic Shift via TCL1 during Induced Pluripotent Stem Cell Generation[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(3): 787-801
- [6] 任晓丽, 宋晖, 刘海霞, 等. siRNA 沉默 KLF4 表达促进 HeLa 细胞上皮间质化[J]. *现代妇产科进展*, 2016, 25(4): 241-244
- [7] Ren Xiao-li, Song Hui, Liu Hai-xia, et al. Silencing the expression of KLF4 by siRNA improve the epithelial mesenchymal transition of HeLa cells[J]. *Prog Obstet Gynecol*, 2016, 25(4): 241-244
- [7] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, et al. The Global Burden of Cancer 2013[J]. *JAMA Oncol*, 2015, 1(4): 505-527
- [8] Xiao W, Zhou S, Xu H, et al. Nogo-B promotes the epithelial-mesenchymal transition in HeLa cervical cancer cells via Fibulin-5[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(1): 109-116
- [9] Tian T, Li X, Hua Z, et al. S100A7 promotes the migration, invasion and metastasis of human cervical cancer cells through epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 24964-24977
- [10] Cheng KY, Hao M. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Regulates Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition via Decreased Pyruvate Kinase M2 (PKM2) Expression in Cervical Cancer Cells[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 2017-2028
- [11] Chen W, Zhao K, Miao C, et al. Silencing Trim59 inhibits invasion/migration and epithelial-to-mesenchymal transition via TGF- β /Smad2/3 signaling pathway in bladder cancer cells [J]. *Oncotargets Ther*, 2017, 10: 1503-1512
- [12] Liu Y N, Abou-Kheir W, Yin J J, et al. Critical and reciprocal regulation of KLF4 and SLUG in transforming growth factor beta-initiated prostate cancer epithelial-mesenchymal transition [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(5): 941-953

- [8] Scholten RJ, Opstelten W, van der Plas CG, et al. Accuracy of physical diagnostic tests for assessing ruptures of the anterior cruciate ligament: a meta-analysis[J]. *J Fam Pract*, 2003, 52(9): 689-694
- [9] Weber W, Weber E. *Mechanics of the Human Walking Apparatus*[M]. Springer Verlag, 1992, 273: 75-92
- [10] Frank CB, Jackson DW. The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1997, 79 (10): 1556-1576
- [11] Lerat JL, Moyon BL, Cladiere F, et al. Knee instability after injury to the anterior cruciate ligament. Quantification of the Lachman test[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2000, 82(1): 42-47
- [12] Griffin LY, Agel J, Albohm MJ, et al. Noncontact anterior cruciate ligament injuries: risk factors and prevention strategies[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2000, 8(3): 141-150
- [13] Hughston JC, Andrews JR, Cross MJ, et al. Classification of knee ligament instabilities. Part I. The medial compartment and cruciate ligaments[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1976, 58(2): 159-172
- [14] Fitzgerald GK, Axe MJ, Snyder-Mackler L. Proposed practice guidelines for nonoperative anterior cruciate ligament rehabilitation of physically active individuals [J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2000, 30(4): 194-203
- [15] Malanga GA, Andrus S, Nadler SF, et al. Physical examination of the knee: a review of the original test description and scientific validity of common orthopedic tests [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2003, 84(4): 592-603
- [16] Bomberg BC, McGinty JB. Acute hemarthrosis of the knee: indications for diagnostic arthroscopy [J]. *Arthroscopy*, 1990, 6(3): 221-225
- [17] Torg JS, Conrad W, Kalen V. Clinical diagnosis of anterior cruciate ligament instability in the athlete [J]. *Am J Sports Med*, 1976, 4(2): 84-93
- [18] Kim SJ, Kim HK. Reliability of the anterior drawer test, the pivot shift test, and the Lachman test [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1995, 317: 237-242
- [19] Anderson AF, Lipscomb AB. Preoperative instrumented testing of anterior and posterior knee laxity [J]. *Am J Sports Med*, 1989, 17(3): 387-392
- [20] Mitsou A, Vallianatos P. Clinical diagnosis of ruptures of the anterior cruciate ligament: a comparison between the Lachman test and the anterior drawer sign[J]. *Injury*, 1988, 19(6): 427-428
- [21] Katz JW, Fingerhuth RJ. The diagnostic accuracy of ruptures of the anterior cruciate ligament comparing the Lachman test, the anterior drawer sign, and the pivot shift test in acute and chronic knee injuries [J]. *Am J Sports Med*, 1986, 14(1): 88-91

(上接第 6231 页)

- [13] Yao S, Tian C, Ding Y, et al. Down-regulation of Krü ppe-like factor-4 by microRNA-135a-5p promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by transforming growth-factor- β 1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 42566-42578
- [14] Xu J, Lü B, Xu F, et al. Dynamic down-regulation of Kruppel-like factor 4 in colorectal adenoma-carcinoma sequence [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(8): 891-898
- [15] Mohan N, Ai W, Chakrabarti M, et al. KLF4 overexpression and apigenin treatment down regulated anti-apoptotic Bcl-2 proteins and matrix metalloproteinases to control growth of human malignant neuroblastoma SK-N-DZ and IMR-32 cells [J]. *Mol Oncol*, 2013, 7 (3): 464-474
- [16] Yang WT, Zheng PS. Krü ppel-like factor 4 function as a tumor suppressor in cervical carcinoma [J]. *Cancer*, 2012, 118 (15): 3691-3702
- [17] Hsu HT, Wu PR, Chen CJ, et al. High cytoplasmic expression of Kruppel-like factor 4 is an independent prognostic factor of better survival in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 9894-9906
- [18] Lin ZS, Chu HC, Yen YC, et al. Kruppel-like factor 4, a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cells reverts epithelial mesenchymal transition by suppressing slug expression[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43593
- [19] Liu CH, Huang Q, Jin ZY, et al. miR-21 and KLF4 jointly augment epithelial mesenchymal transition via the Akt/ERK1/2 pathway[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(4): 1109-1115
- [20] Park SJ, Yang SW, Kim BC. Transforming growth factor- β 1 induces cell cycle arrest by activating atypical cyclin-dependent kinase 5 through up-regulation of Smad3-dependent p35 expression in human MCF10A mammary epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(3): 502-507