论著

文章编号:1000-5404(2014)09-0878-05

# KLF4与Notch1在脱氧胆酸诱导Barrett食管形成过程的作用

李婧文,徐 胤,夏一菊,王 璞,沈才飞,张安然,邵顺子,于晓娜,张昊祥,闫 武,房殿春 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[摘要] **目的** 探讨Krüppel样锌指转录因子4(Krüppel-like factor 4,KLF4)和Notch1在Barrett食管组织中的表达以及脱氧胆酸(deoxycholic acid,DCA)对正常食管鳞状上皮Het-1A细胞KLF4与Notch1表达水平的影响。**方法** 免疫组化S-P法检测49例人正常食管组织、26例食管炎和22例Barrett食管组织中KLF4、Notch1的表达水平;采用不同浓度(0、100、200 μmol/L)的DCA对永生化的正常食管鳞状上皮Het-1A细胞分别处理4、8、12 h,RT-PCR和Western blot检测KLF4、Notch1 mRNA及蛋白表达。**结果** 免疫组化检测发现,与正常人食管鳞状上皮组织相比,食管炎与Barrett食管组织中KLF4呈现高表达,且Barrett食管组织表达最高($P<0.05$),而Notch1的表达则无明显差异。RT-PCR及Western blot结果显示,随DCA浓度的增高以及处理时间的增加,Het-1A细胞表达KLF4、Notch1的mRNA和蛋白的水平逐渐升高($P<0.05$)。**结论** DCA可能通过促进KLF4、Notch1表达而参与正常食管上皮转化为Barrett食管的过程。

[关键词] 脱氧胆酸;Krüppel样锌指转录因子4;Notch1;Het-1A细胞;Barrett食管
[中图法分类号] R363.21; R394.2; R571.02 [文献标志码] A

# Roles of KLF4 and Notch1 in deoxycholic acid-induced Barrett's esophagus

Li Jingwen, Xu Yin, Xia Yiju, Wang Pu, Shen Caifei, Zhang Anran, Shao Shunzi, Yu Xiaona, Zhang Haoxiang, Yan Wu, Fang Dinchuan (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of Krüppel-like factor 4 (KLF4) and Notch homolog 1 (Notch1) in Barrett's esophageal tissues, and the effect of deoxycholic acid (DCA) on the expressions of the 2 molecules in human esophageal squamous epithelial Het-1A cells. **Methods** Immunohistochemical SP staining was applied to evaluate the levels of KLF4 and Notch1 in 49 samples of normal esophageal tissues, 26 samples of esophagitis and 22 samples of Barrett's esophageal tissues. After Het-1A cells were treated with different concentrations of DCA for 4, 8 and 12 h, the expressions of KLF4 and Notch1 at mRNA and protein levels were detected by real-time PCR and Western blotting, respectively. **Results** Immunohistochemical staining indicated that KLF4 was strongly expressed in the Barrett's esophagus and esophagitis tissues compared with normal tissues, and its level was highest in the Barrett's esophagus ($P<0.05$), but no obvious change was seen in the expression of Notch1 among the 3 kinds of tissue samples. RT-PCR and Western blotting revealed that the mRNA and protein levels of KLF4 and Notch1 was enhanced in a time- and dose-dependent manner in HET-1A cells induced by DCA ($P<0.05$). **Conclusion** DCA takes part in the transformation of normal esophageal epithelia to Barrett's esophagus, probably through promoting the expression of KLF4 and Notch1.

[**Key words**] deoxycholic acid; Krüppel-like factor 4; Notch1; Het-1A cells; Barrett's esophageal

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170356). Corresponding author: Fang Dianchun, E-mail: fangdianchun@hotmail.com

Barrett食管(Barrett's esophageal,BE)是指位于食管远端的正常鳞状上皮被化生的柱状上皮所取代的病理现象。它的发生与慢性胃食管反流性疾病(gastroesophageal reflux disease, GRED)密切相关[1-2],其中伴有胆酸的十二指肠内容物反流至食管被认为是其发生、发展过程中重要的危险因素之一[3]。许多研究表明,脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)可以诱导正常食管鳞状上皮细胞,促使其转变为柱状上皮细胞表型[4]。但DCA导致BE发生的机制还不清楚,揭示BE发生的细胞及分子机制对BE的预

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170356)
[通信作者] 房殿春,E-mail: fangdianchun@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140303.1010.005.html(2014-03-03)

防和治疗具有重要意义。

Krüppel 样锌指转录因子4(Krüppel-like factor 4, KLF4),是 Spl/Krüppel 样转录因子家族中的成员之一,在胃肠道形态发生、肠道黏膜生成以及功能的发挥过程中起重要作用[5-7]。Notch1 属于 Notch 信号通路的受体之一,该通路被广泛认为参与细胞增殖、发育以及肿瘤的发生、发展[8],它与 KLF4 通路协同调节干细胞的自我更新及分化[9-10]。本实验通过免疫组化方法检测人 BE 组织中 KLF4 和 Notch1 的表达以及 DCA 处理正常食管鳞状上皮 Het-1A 细胞,模拟正常生理条件下 Barrett 食管生成环境,探讨 DCA 对 KLF4、Notch1 表达的影响及在 BE 发生中的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 组织与细胞 选取西南医院2012年3-12月的97例消化内科门诊患者,其中男性50例,女性47例,平均年龄50.94(35~65)岁。纳入标准:①所有食管炎患者符合《2007年中国胃食管反流病共识意见》的诊断标准;②所有 BE 患者的诊断均符合中华医学会消化病学分会 Barrett 食管诊治共识修订的标准。排除标准:①其他消化系统疾病及可致胃肠道症状的其他全身性疾病;②临床资料不全者。共制作有49例正常食管组织标本、26例食管炎和22例 Barrett 食管组织标本。病例均有完整的病历资料,并且均经病理科医生证实。标本的搜集均获得患者同意并签署知情同意书。永生化的正常食管鳞状上皮 Het-1A 细胞株购自于美国细胞菌种库(ATCC)。

1.1.2 主要试剂 RIPA Buffer 裂解液以及 DCA 均购自 Sigma 公司,BEBM 培养基购自 Lonza 公司,Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,逆转录、实时荧光定量 PCR 试剂盒及 PCR 引物由购自宝生物工程(大连)有限公司;抗 KLF4、Notch1 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,GADPH 多克隆抗体以及二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组化 经过取材,固定、脱水、石蜡包埋、切片、染色、封片,采用免疫组化 S-P 法,分别检测3组样本的表达。KLF4 的工作浓度为1∶100,Notch1 的工作浓度为1∶50,以 PBS 取代一抗为阴性对照,光镜下观察结果。阳性标准:在人体组织中,KLF4 阳性颗粒定位于细胞核,Notch1 阳性颗粒定位于细胞质,两者出现棕黄或者棕褐色颗粒为免疫组化阳性。由2名病理医师采取双盲法独立阅片,根据每张切片染色强度及阳性细胞数确定表达。①无着色为0分,黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。②阳性细胞数:5%为0分,>5%~25%为1分,>25%~50%为2分,>50%为3分。等级评分:<2分为阴性(-);2~3分为弱阳性(+);>3~5分为阳性(++);>5~7分为强阳性(+++)。

1.2.2 细胞培养 Het-1A 细胞处于对数生长期时用0.05% EDTA-胰酶消化后按 $10^5$ ~ $10^6$/mL 接种于以胶原混合物包被的6孔板中,每孔加入2 mL 的 BEBM 培养液,置于5% $CO_2$ 的37 ℃孵箱中孵育。每2~3天更换培养基1次,细胞长满75%的培养皿时进行传代。

1.2.3 DCA 处理细胞 胃十二指肠反流中,胆酸被认为是较严重的损伤物质,取第4~5代细胞,弃去完整 BEBM 培养基,用预热 PBS 清洗细胞3遍。应用1 mol/L HC1 调定培养基至 pH 值为7.2,采用生理浓度(100、200 μmol/L)的 DCA 分别处理细胞4、8、12 h,置于5% $CO_2$ 的37 ℃孵箱中孵育。对照组为不含 DCA 的 BEBM 培养液,继续培养4、8、12 h。

1.2.4 Real-time PCR 实验检测细胞 KLF4 以及 Notch1 mRNA 水平 DCA 处理的细胞用 PBS 清洗,刮取、离心去上清。用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA,检测 RNA 质量和浓度。按照逆转录试剂盒(RR036A)步骤,反转录成 cDNA,再按照 RT-PCR 试剂盒(RR082A)SYBR Green 法加样并进行 RT-PCR 反应。采用两步法 PCR 扩增标准程序:95 ℃ 预变性60 s;95 ℃ 变性5 s,60 ℃退火45 s,扩增40个循环。每个标本设3个复孔,以 GAPDH 基因作为内参。应用△Ct 值计算基因 mRNA 相对表达量。各基因的引物设计、合成及测序由上海吉凯基因化学技术有限公司提供,引物序列和扩增片段大小见表1。

**表1 各基因的引物序列、PCR 反应条件和扩增片段大小**

| 基因 | 引物序列 | 扩增片段长度 |
|---|---|---|
| KLF4 | 上游:5′-GGAGAGAGACCGAGGAGTTCA-3′ | 126 bp |
| | 下游:5′-ACGACGAAGAGGAGGCTGAC-3′ | |
| Notch1 | 上游:5′-GCCTTTGTGCTTCTGTTCTTC -3′ | 215 bp |
| | 下游:5′-CCCCACTCATTCTGGTC -3′ | |
| GAPDH | 上游:5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′ | 258 bp |
| | 下游:5′-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3′ | |

1.2.5 Western blot 检测细胞 KLF4 及 Notch1 蛋白水平 DCA 处理的细胞用 PBS 清洗,刮取、离心去上清。细胞沉淀用 RIPA 裂解液处理提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。加入1/4体积的5×SDS 上样缓冲液,95 ℃变性3 min。取20 μg 蛋白样品进行10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,洗膜,含5%脱脂奶的 TBST 室温孵育2 h 后,依次加入 KLF4(1∶1 000)、Notch1(1∶500)、GADPH(1∶1 000)一抗、山羊抗兔二抗(1∶5 000),室温孵育1 h,TBST 洗膜4次,凝胶成像系统显影。

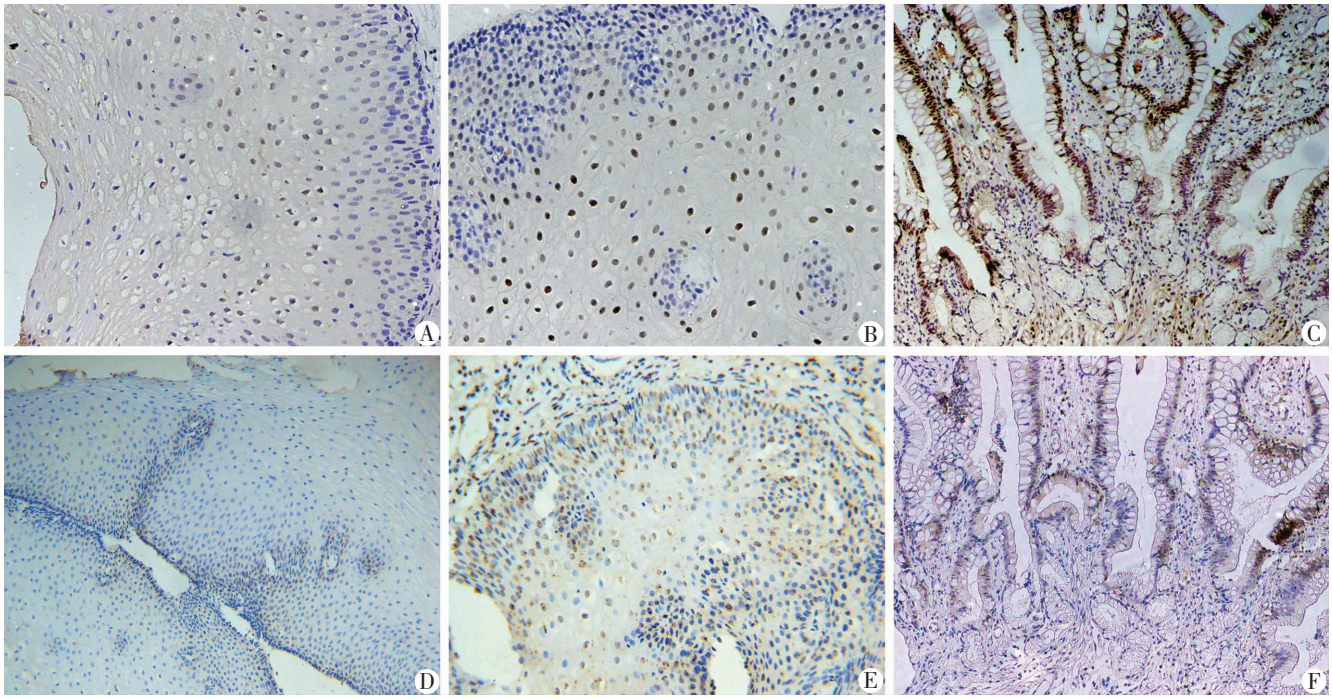
### 1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 KLF4、Notch1 在 Barrett 食管组织中的表达

KLF4 在正常食管、食管炎及 Barrett 食管组织的阳性率分别为16.33%、38.46%、68.18%,虽然它在 Barrett 食管与食管炎组织样本中表达不完全一致,但与正常食管比较,2组 KLF4 表达明显增高,分别是正常食管的4.18、2.36倍;Notch1 在3种组织样本的阳性表达率分别为22.45%、23.08%、36.36%,其差异无统计学意义($P>0.05$),见图1、表2。




A：KLF4在正常食管组织中的表达；B：KLF4在食管炎组织中的表达；C：KLF4在Barrett食管组织中的表达；D：Notch1在正常食管组织中的表达；E：Notch1在食管炎组织中的表达；F：Notch1在Barrett食管组织中的表达

**图1 各组组织样本中KLF4、Notch1的免疫组化染色观察** （S-P ×200）

**表2 KLF4、Notch1在正常食管、食管炎以及Barrett食管组织中的表达**

| 类别 | $n$ | KLF4表达 | | 阳性率 | Notch1表达 | | 阳性率 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | − | + ~ +++ | (%) | − | + ~ +++ | (%) |
| 正常食管 | 49 | 41 | 8 | 16.33 | 38 | 11 | 22.45 |
| 食管炎 | 26 | 16 | 10 | 38.46 | 20 | 6 | 23.08 |
| Barrett食管 | 22 | 7 | 15 | 68.18[a] | 14 | 8 | 36.36 |

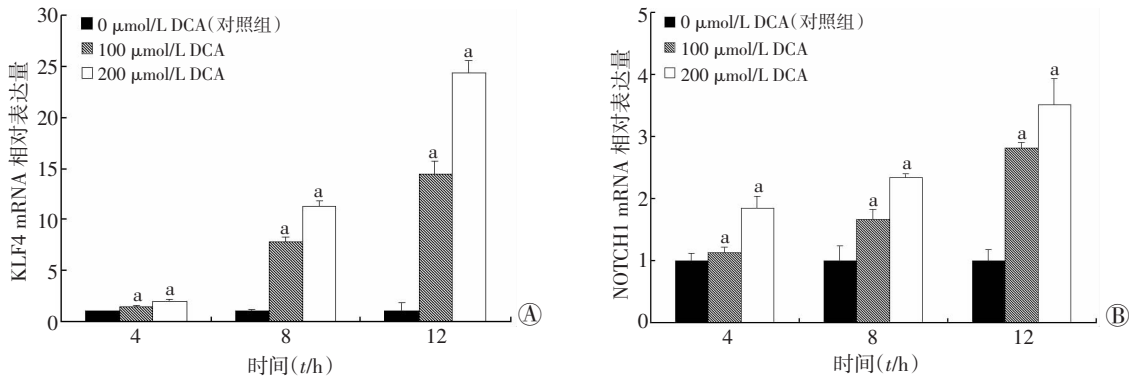
a：$P<0.05$，与正常食管比较

## 2.2 Real-time PCR检测细胞KLF4与Notch1 mRNA水平

结果（图2）显示对照组KLF4、Notch1 mRNA表达水平低于处理组，且随着处理时间的延长以及DCA浓度的增高，两者的表达量逐渐升高，趋势明显（$P<0.05$）。

## 2.3 Western blot检测细胞KLF4以及Notch1蛋白水平

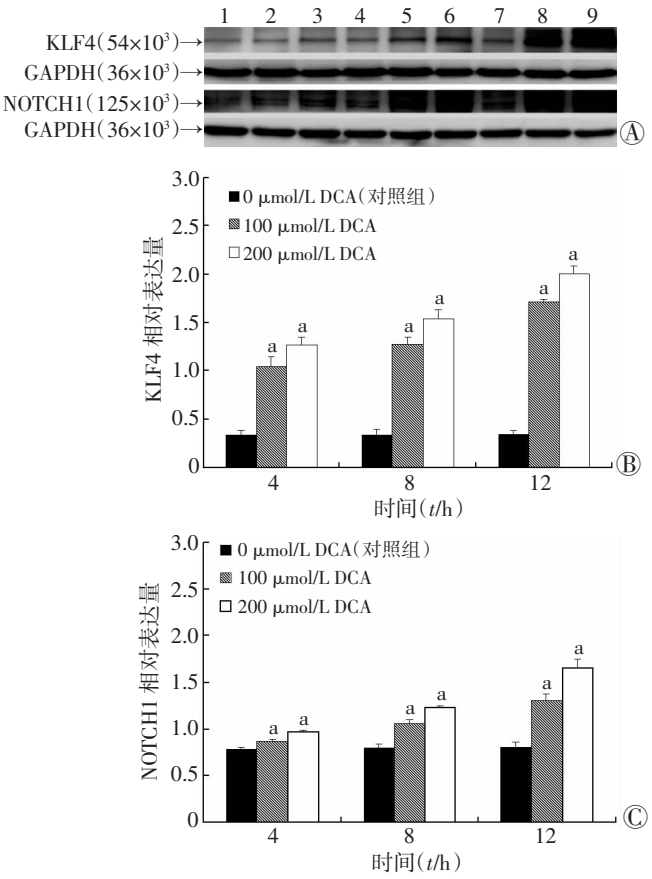
DCA处理的Het-1A细胞KLF4和Notch1表达量高于对照组；而处理组内两因子表达水平随着DCA浓度增加而增加，处理组间随着时间延长两者蛋白表达也增加（图3A）；进一步半定量分析结果显示，与对照组比较，DCA处理的4、8、12 h的Het-1A细胞KLF4/Notch1/表达水平明显升高（$P<0.05$，图3B）。




a：$P<0.05$，与对照组比较

A：KLF4；B：Notch1

**图2 RT-PCR检测不同浓度DCA处理Het-1A细胞各时间点KLF4、Notch1 mRNA的表达**




A:Western blot 检测结果　1、4、7:正常 Het-1A 细胞培养 4、8、12 h;2、5、8:分别为 DCA 100 μmol/L 处理 4、8、12 h;3、6、9:分别为 DCA 200 μmol/L 处理 4、8、12 h;B、C:分别为 KLF4、Notch1 蛋白表达的半定量分析结果　a:$P<0.05$,与对照组比较

**图 3　Western blot 检测不同浓度 DCA 处理 Het-1A 细胞各时间点的 KLF4、Notch1 蛋白表达**

## 3　讨论

BE 是目前公认的食管腺癌的重要的癌前病变,它通过化生-异型增生-癌变的顺序导致食管腺癌的发生。对人体食管内胆酸和 pH 水平监测及动物实验研究证实,反流相关性炎症可能是 BE 发生的重要机制。反流相关性炎症的患者病变中有 12% 发现有 BE 病变[11]。该炎症通过机体多种细胞与因子作用于食管上皮细胞,是 BE 发生、发展进程中不可缺少的因素。我们过去的研究表明,食管鳞状上皮细胞在酸性环境下经 DCA 处理,可以诱导出柱状上皮细胞表型[4]。本研究旨在通过体内外实验探讨 KLF4 和 Notch1 是否参与正常食管上皮细胞转化为 BE 的过程以及其作用方式。因此,我们采用免疫组化方法观察了食管炎和 BE 上皮 KLF4 和 Notch1 表达,结果发现,KLF4 的阳性率从正常组食管黏膜,经食管炎至 BE 顺序递增,BE 和食管炎组的阳性率显著高于正常食管组,提示 KLF4 的表达可能在 BE 的发生中起重要作用;而与正常组织相比,食管炎和 BE 组织 Notch1 的表达却并无明显差别。

同时本研究采用 DCA 处理永生化的正常人食管鳞状 Het-1A 细胞,模拟人体 BE 发生环境,检测该细胞 KLF4、Notch1 mRNA 以及蛋白表达水平,明确两者在 BE 形成过程中是否有作用。KLF4 是一种肠黏膜发生中的重要转录因子,参与调节细胞增殖、分化和发育等多种生理过程[12-14]。它在体内外的内皮细胞均有表达,并由促炎因子所诱导。肠上皮 KLF4 缺失,会导致上皮细胞增殖和分化异常,功能缺失。同时 KLF4 在维持干细胞可塑状态中也起重要作用。Takahashi 等[15]证实,将 Oct4、Sox2、C-myc 和 KLF4 四种因子转入小鼠成纤维细胞,可诱导其发生转化,产生与胚胎干细胞相似的诱导性多能干细胞,说明 KLF4 与多能干细胞分化的密切相关。本实验通过对正常食管鳞状上皮进行胆酸处理,发现它能诱导食管上皮细胞 KLF4 mRNA 和蛋白水平的表达,由此推测,胆酸诱发的 KLF4 的表达可能参与了正常食管鳞状上皮细胞向 BE 的转化过程。

Notch 信号传导通路在肠道发育过程中起重要作用。该通路通过自身受体与不同的配体相结合,改变细胞间的信息来调节人体干细胞特性和细胞分化方向[16-17]。Notch 信号传导通路激活可使小鼠肠道杯状细胞的出现异常的增殖分化[18-19]。而在 BE 大鼠模型,阻断 Notch 信号通路能使食管化生的柱状上皮转变为正常的杯状细胞,由此可见,抑制 Notch 信号传导通路能够促使杯状细胞分化成熟从而介导 BE 的发生。本研究采用免疫组化检测了食管炎和 BE 组织 Notch1 的表达,与正常组织相比,食管炎和 BE 组织 Notch1 的表达并无明显差别,但体外研究发现,Het-1A 细胞经过脱氧胆酸处理后,Notch1 的 mRNA 以及蛋白水平均明显增高,可能是因为本实验是用 DCA 直接处理细胞,对细胞损伤作用较大,导致 Notch1 表达较为明显。因此,体外实验提示胆酸诱发的 Notch1 的表达可能参与了正常食管鳞状上皮细胞向 BE 的转化过程。

关于 BE 的起源有多种学说,但均未得到有力的证实。DCA 能促进正常食管鳞状上皮获得肠型细胞特征,向肠化方向转化。而本研究结果显示 KLF4、

Notch1 通过上调表达而参与 Barrett 食管的形成,两者均在干细胞干性的维持及分化过程中起重要作用,提示 BE 形成有可能是细胞在外部环境作用细胞逆分化而重编程再分化的结果。虽然许多实验结果表明,在肠道肿瘤中 KLF4 与 Notch1 呈现相反关系,KLF4 促进杯状细胞生成发挥着抗癌作用,Notch 信号则通过抑制 KLF4 的表达,减少杯状细胞生成,促进肿瘤发生[18-19]。但 KLF4 参与胚胎干细胞自我更新,使成体细胞获得多潜能性;Notch1 是细胞未分化状态维持的必要因素,在细胞干性的产生以及维持方面两者是否有相互作用尚不清楚。本实验结果也证实有可能 KLF4 与 Notch1 信号相互促进使得成体细胞获得多潜能性的发生。同时本研究仅限于体外研究,对于 KLF4 与 Notch1 表达水平的改变在人 BE 发生中的作用尚需进一步大样本、人体内研究来证实。

综上所述,我们推测 DCA 通过上调 KLF4 和 Notch1 的表达参与了 BE 的发生,提示 BE 形成有可能是细胞在外部环境作用下先使食管鳞状上皮细胞逆分化为具有干细胞潜能的多能干细胞,再转分化为具有胃肠表型的上皮细胞产生的。这一发现不仅为深入了解 BE 发生的细胞来源及分子机制提供了新的依据,而且为预防食管癌的发生以及治疗提供了新的线索。

**参考文献:**


[1] Jankowski J A, Harrison R F, Perry I, *et al*. Barrett's metaplasia[J]. Lancet, 2000, 356(9247): 2079-2085.

[2] Lieberman D A, Oehlke M, Helfand M. Risk factors for Barrett's esophagus in community-based practice. GORGE consortium. Gastroenterology Outcomes Research Group in Endoscopy[J]. Am J Gastroenterol, 1997, 92(8): 1293-1297.

[3] Nehra D, Howell P, Williams C P, *et al*. Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity[J]. Gut, 1999, 44(5): 598-602.

[4] Zhou G, Sun Y G, Wang H B, *et al*. Acid and bile salt up-regulate BMP4 expression in human esophageal epithelium cells[J]. Scand J Gastroenterol, 2009, 44(8): 926-932.

[5] Shields J M, Christy R J, Yang V W. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest[J]. J Biol Chem, 1996, 271(33): 20009-20017.

[6] Katz J P, Perreault N, Goldstein B G, *et al*. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon[J]. Development, 2002, 129(11): 2619-2628.

[7] Ton-That H, Kaestner K H, Shields J M, *et al*. Expression of the gut-enriched Krüppel-like factor gene during development and intestinal tumorgenesis[J]. FEBS Lett, 1997, 419(2/3): 239-243.

[8] Capaccione K M, Pine S R. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(7): 1420-1430.

[9] Koch U, Lehal R, Radtke F. Stem cells living with a Notch[J]. Development, 2013, 140(4): 689-704.

[10] Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, *et al*. Notch signalling regulates stem cell numbers *in vitro* and *in vivo*[J]. Nature, 2006, 442(7104): 823-826.

[11] Chandra S, Gorospe E C, Leggett C L, *et al*. Barrett's esophagus in 2012: updates in pathogenesis, treatment, and surveillance[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2013, 15(5): 322.

[12] Jaubert J, Cheng J, Segre J A. Ectopic expression of kruppel like factor 4 (Klf4) accelerates formation of the epidermal permeability barrier[J]. Development, 2003, 130(12): 2767-2777.

[13] Ghaleb A M, Nandan M O, Chanchevalap S, *et al*. Krüppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation[J]. Cell Res, 2005, 15(2): 92-96.

[14] Black A R, Black J D, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer[J]. J Cell Physiol, 2001, 188(2): 143-160.

[15] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676.

[16] Perdigoto C N, Bardin A J. Sending the right signal: Notch and stem cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(2): 2307-2322.

[17] 王荥, 徐惠成. Notch 信号通路对干细胞分化的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(4): 439-443.

[18] Zhao W, Hisamuddin I M, Nandan M O, *et al*. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(2): 395-402.

[19] Sikandar S S, Pate K T, Anderson S, *et al*. NOTCH signaling is required for formation and self-renewal of tumor-initiating cells and for repression of secretory cell differentiation in colon cancer[J]. Cancer Res, 2010, 70(4): 1469-1478.


(**收稿**:2013-12-31;**修回**:2014-02-02)

(编辑 王 红)