

文章编号:1005-6947(2007)10-1010-03

· 简要论著 ·

胰腺癌中 Plk1 的表达及其临床意义

杨卫华^{1,2}, 张松柏¹, 王春友², 熊炯焯², 陶京²

(1. 湖北省荆门市第一人民医院 普外二科, 湖北 荆门 448000; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科中心, 湖北 武汉 430022)

摘要:为探讨 Polo 样激酶 1 (Plk1) 在胰腺癌中的表达及其与各临床病理特征和抑癌基因 p16 的关系、及在胰腺癌发生发展中的作用及临床意义, 笔者应用免疫组织化学方法检测 60 例胰腺癌及其癌旁组织 Plk1 和 p16 的表达, 并结合临床资料进行分析。结果显示, Plk1 在胰腺癌及其癌旁组织中的表达率分别为 86.7% 和 6.67%, 其表达与组织分化程度、远处转移、淋巴结转移及临床分期无关 ($P > 0.05$); p16 在胰腺癌中阳性表达 20 例 (33.3%), Plk1 的表达与 p16 蛋白表达有关 ($P < 0.05$)。提示: Plk1 在胰腺癌中高表达, 与抑癌基因 p16 相互影响, 在胰腺癌的发生发展中起重要作用。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(10): 1010-1012]

关键词: 胰腺肿瘤/病理学; Polo 样激酶 1; p16

中图分类号: R 735.9

文献标识码: B

Polo 样激酶 1 (Polo-like kinase 1, Plk1) 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶^[1], 经磷酸化激活, 在细胞有丝分裂的不同时期起到十分重要的作用^[2]。正常情况下, DNA 受损时会通过抑制 Plk1 的活性而阻止细胞进入分裂期 (M 期)^[3-4]。目前已发现 Plk1 在多种肿瘤中呈异常高表达^[5]。p16 基因系一重要的抑癌基因, 参与细胞周期的调控, 负调节细胞增殖及分裂。为此本研究采用免疫组化方法检测 Plk1 和 p16 在胰腺癌中的表达, 并分析 Plk1 与各临床病理特征和 p16 的关系, 旨在探讨 Plk1 在人类胰腺癌发生发展中的作用以及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 标本来源及分组

1.1.1 胰腺癌组 标本选自武汉协和医院胰腺外科中心 2001—2006 年 60 例经手术切除胰腺癌的患者术前均未接受化疗和放疗。男 36 例, 女 24 例; 年龄 41~68 (平均为 55.4) 岁。临床病理学参数 (分化程度/淋巴结转移/远处转移/TNM 分期) 分类。高分化 7 例, 中分化 12 例, 低分化 41 例; TNM 分期中, I 期 13 例, II 期 17 例, III 期 12 例,

IV 期 18 例; 有淋巴结转移 37 例, 无淋巴结转移 23 例; 有器官转移 42 例。标本为石蜡包埋存档蜡块。

1.1.2 癌旁组织组 取上述胰腺癌患者的癌旁组织 (距瘤体边缘 2 cm 以上)。

1.2 材料

行 5 μ m 连续切片备行免疫组化染色。鼠抗人 Plk1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗人 p16 蛋白多克隆抗体、SP 试剂盒及 DAB 显示剂购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 实验方法

采用免疫组化 SP 法及 DAB 染色, 染色步骤按试剂盒说明进行。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作阴性对照, 用已知阳性切片作阳性对照。阳性结果判断标准: Plk1 染色以胞质或胞核呈棕黄色或棕褐色为阳性; p16 蛋白在各细胞中的阳性表达以胞浆中出现清晰棕褐色着色为阳性标准。应用 HMIAS-2000 型全自动彩色医学图像分析系统对每张切片随机观察 10 个高倍视野。结果以阳性细胞数所占百分比表示, 即每视野计数 100 个细胞, 按阳性细胞百分数分为 4 个等级: 低于 5% 为阴性 (-); 5%~25% 为 (+); 25%~50% 为 (++) ; 50% 以上为 (+++)。

1.4 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理, 根据实验资料要求, 选用 χ^2 检验、Fisher, s 精确概率检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

收稿日期: 2007-07-30; 修订日期: 2007-10-09。

作者简介: 杨卫华, 男, 湖北荆门人, 湖北省荆门市第一人民医院医师 (华中科技大学同济医学院附属协和医院硕士研究生), 主要从事胰腺疾病方面的研究。

通讯作者: 杨卫华 E-mail: arhua800@yahoo.com.cn

2 结果

2.1 Plk1 的表达

Plk1 表达主要定位于细胞质中,为棕褐色;在少数胞核中也可见表达(图 1)。Plk1 在胰腺癌中表达明显高于癌旁组织的表达,两者相比有显著差异($P < 0.01$)(表 1)。

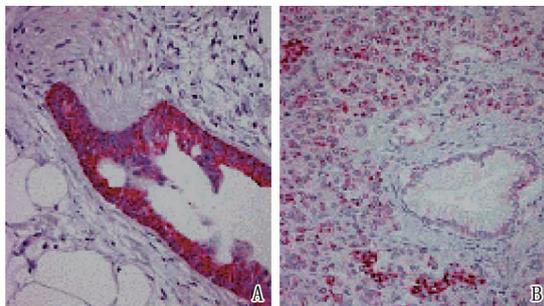


图 1 胰腺癌及癌旁组织中 Plk1 的免疫组化染色(DAB 显色 $\times 100$) A:Plk1 阳性的癌组织; B:Plk1 阴性的癌旁组织

表 1 Plk1 在胰腺癌及癌旁组织中的表达

| 组别 | 例数 | 阳性 | 阴性 | 阳性表达率(%) | P 值 |
|-------|----|----|----|----------|-------|
| 胰腺癌组织 | 60 | 52 | 8 | 86.7 | <0.01 |
| 癌旁组织 | 60 | 4 | 46 | 6.67 | |

2.2 Plk1 表达与胰腺癌生物学行为的关系

Plk1 的表达与胰腺癌患者的性别、年龄、分化程度、临床分期、淋巴结及远处转移无关;上述各参数 2 组间差异无显著性($P > 0.05$)(表 2)。

表 1 Plk1 在胰腺癌中的表达与各临床病理特征的关系

| 临床特征 | 例数 | Plk1 表达 | | P 值 |
|-----------|----|---------|----|-------|
| | | 阳性 | 阴性 | |
| 性别 | | | | >0.05 |
| 男 | 36 | 31 | 5 | |
| 女 | 24 | 21 | 3 | |
| 年龄(岁) | | | | >0.05 |
| <55 | 27 | 25 | 2 | |
| ≥ 55 | 33 | 27 | 6 | |
| 分化程度 | | | | >0.05 |
| 高分化 | 7 | 7 | 0 | |
| 中分化 | 12 | 11 | 1 | |
| 低分化 | 41 | 34 | 7 | |
| TNM 分期 | | | | >0.05 |
| I | 13 | 10 | 3 | |
| II | 17 | 15 | 2 | |
| III | 12 | 10 | 2 | |
| IV | 18 | 17 | 1 | |
| 淋巴结转移 | | | | >0.05 |
| 有 | 37 | 34 | 3 | |
| 无 | 23 | 18 | 5 | |
| 器官转移 | | | | >0.05 |
| 有 | 18 | 16 | 2 | |
| 无 | 42 | 36 | 6 | |
| p16 | | | | <0.05 |
| 阳性 | 20 | 14 | 6 | |
| 阴性 | 40 | 38 | 2 | |

2.3 Plk1 表达与 p16 的关系

在胰腺癌中 p16 蛋白表达均位于胞质,阳性细胞呈灶性或弥漫性分布(图 2)。p16 蛋白阳性 20 例(33.3%),其中 Plk1(+)/p16(+)14 例, Plk1(+)/p16(-)38 例, Plk1(-)/p16(+)6 例, Plk1(-)/p16(-)2 例,在胰腺癌中 Plk1 的表达与 p16 蛋白缺失有关($P < 0.05$)(表 2)。

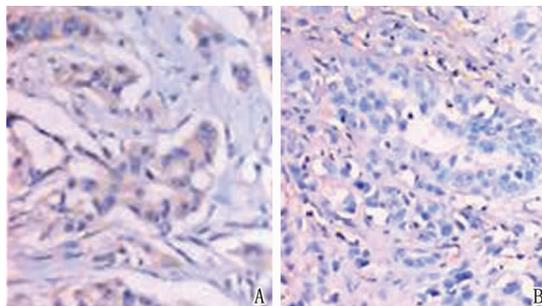


图 2 胰腺癌及癌旁组织中 p16 蛋白的免疫组化染色(DAB 显色 $\times 200$) A:p16 阳性的癌旁组织; B:p16 阴性的癌组织

3 讨论

肿瘤的发生发展是癌基因激活以及抑癌基因失活的结果;而癌基因和抑癌基因的作用均归结于对细胞周期的调控,细胞周期的调控失常是肿瘤发生的主要原因^[6]。Plk1 在调控细胞从 G₂ 期进入 M 期的进程中起了关键性作用。有关研究表明,其主要作用机制是通过磷酸化 cyclinB1 第 133 位的丝氨酸,促进 Cdc2/cyc1 inB1 复合物在 G₂/M 期向细胞核内迁移^[7]。同时 Plk1 可以磷酸化 Cdc25C 的第 198 位丝氨酸,活化 Cdc25C 并促使其向核内迁移^[8],继而通过活化的 Cdc25C 使 Cdc2/cyc1 inB1 复合物在细胞核内表现出激酶活性。活化后的 Cdc2/cyc1 inB1 复合物促使细胞从 G₂ 期进入 M 期。Plk1 对 G₂/M 期检验点的作用有利于癌细胞通过这一检验点,继续畸变与增殖过程。

Gray 等^[9]通过免疫组化方法检测 35 例胰腺癌组织,发现 74% 有 Plk1 高表达,其中 31% Plk1 表达强阳性。通过实时定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)对 4 例胰腺癌组织的检测显示,4 例均有 Plk1 mRNA 高表达,其中 1 例 Plk1 mRNA 的表达量是正常胰腺组织的 20 倍。Weichert 等^[10]应用免疫组化方法分析 86 例胰腺癌和 5 例慢性胰腺炎标本,发现在正常腺泡上皮内仅有点状 Plk1 阳性,而在主副胰管上皮、有黏液样变性或增生导管上皮及胰腺间质内,Plk1 表达均为阴性。同时在慢性胰腺炎标本中发现 Plk1 的表达有轻度增

加,但仍达不到阳性的标准;而浸润性胰腺癌中有47.7% Plk1强阳性表达。该作者还发现,Plk1阳性表达与胰腺癌的播散、分级和胰腺癌患者的预后无明显相关性。以上研究表明,Plk1表达可能是胰腺癌发生的一个早期事件,并进一步促进肿瘤发展。本研究显示,Plk1在胰腺癌及其癌旁组织中的表达分别为86.7%和6.67%,其表达与组织分化程度、远处转移、淋巴结转移临床分期无关($P > 0.05$)。由此从蛋白水平反映了Plk1在胰腺癌中高表达,说明Plk1在胰腺癌发生发展上可能起重要作用,在诊断上可望作为一个新的肿瘤标志物。

p16抑癌基因编码的p16蛋白能与细胞周期依赖性激酶4(CDK4)高度特异性结合,从而使细胞周期蛋白cyclinD1与CDK4的结合受到竞争性抑制,影响CDK4/CDK4复合物的激酶活性,阻止细胞从G₁进入S期的演进,而G₁进入S期是细胞分化的关键转折点^[11-12]。笔者等^[13]用免疫组化方法分析46例原发性胰腺癌,其p16蛋白阳性率为41.3%;p16蛋白表达与胰腺癌组织分化程度、淋巴结转移、PTNM分期有显著差意义。本研究显示,p16蛋白阳性20例中Plk1(+)/p16(+)14例,Plk1(+)/p16(-)38例,Plk1(-)/p16(+)6例,Plk1(-)/p16(-)2例;在胰腺癌中Plk1的表达与p16蛋白缺失有明显的相关性($P < 0.05$)。从而表明,Plk1除了对肿瘤细胞的细胞周期调控外,可能还通过对抑癌基因调节参与胰腺癌的发生发展。

根据Plk1在许多肿瘤中的高表达,与肿瘤细胞增殖和致癌性转化密切相关。目前已经建立了针对Plk1mRNA的反义寡核苷酸和小干扰RNA(smal1 interference RNA, siRNA),它们能特异性地对Plk1mRNA及其蛋白产物表现出剂量依赖性抑制作用;由此也抑制了Plk1的丝氨酸/苏氨酸激酶活性,能有效抑制培养细胞系或裸鼠肿瘤模型中肿瘤细胞的增殖^[14]。周琼等^[15]研究了Plk1反义RNA对肺癌A549细胞细胞周期的影响,在成功构建表达Plk1反义RNA的质粒pc3.0P后,将其导入A549细胞,发现特异性地对应Plk1降解,A549细胞增殖减慢,细胞周期阻滞并发生凋亡。林莉等^[16]研究了Plk1反义寡核苷酸对裸鼠移植瘤的生长抑制作用,发现用药组瘤体体积增长缓慢而对照组瘤体体积增长迅速。说明Plk1可作为肿瘤治疗的一个靶点,对临床治疗有着潜在的指导意义。综上所述,本研究表明Plk1在胰腺癌中表达明显高于其癌旁组织,其表达与抑癌基因

p16相互影响,对胰腺癌的发生发展可能起着重要作用,在胰腺癌诊断中可望作为一种新的肿瘤标志物,在临床治疗和预后判定中有一定潜在的指导意义。

参考文献:

- [1] Elez R, Piiper A, Giannini CD, *et al*. Polo-like kinase 1, a new target for antisense tumor therapy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269(2): 352 - 356.
- [2] 兰斌, 刘炳亚, 朱正纲. Plk1在细胞周期生物学的研究进展[J]. *医学分子生物学杂志*, 2005, 2(1): 65 - 67.
- [3] Smits VA, Klompmaaker R, Arnaud L, *et al*. Polo-like kinase 1 is a target of the DNA damage checkpoint [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(9): 672 - 676.
- [4] Jackman M, Lindon C, Nigg EA, *et al*. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(2): 143 - 148.
- [5] Eckerdt F, Yuan T, Strebhardt K. Polo-like kinases and oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2005, 24(2): 267 - 276.
- [6] Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, *et al*. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach [J]. *Gastroenterol*, 2000, 35(12): 111 - 115.
- [7] Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Shinya N, *et al*. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase [J]. *Nature*, 2001, 410(6825): 215 - 220.
- [8] Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase [J]. *EMBO Rep*, 2002, 3(4): 341 - 348.
- [9] Gray PJ Jr, Bearss DJ, Han H, *et al*. Identification of human polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(5): 641 - 646.
- [10] Weichert W, Schmidt M, Jacob J, *et al*. Overexpression of Polo-like kinase 1 is a common and early event in pancreatic cancer [J]. *Pancreatol*, 2005, 5(2-3): 259 - 265.
- [11] Kamb A, Gruis NA, Weaver FJ, *et al*. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [J]. *Science*, 1994, 264(4): 436 - 440.
- [12] Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinase, INK inhibitors and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1602(1): 1101 - 1107.
- [13] 杨卫华, 王春友, 朱求实, 等. 胰腺癌中p16基因甲基化改变及其蛋白表达分析 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(5): 446 - 450.
- [14] Reagan-Shaw S, Ahmad N. Silencing of polo-like kinase (Plk1) via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: implications for the treatment of prostate cancer [J]. *FASEB*, 2005, 19(6): 611 - 613.
- [15] 周琼, 白明, 苏远. Polo-like 激酶 1 反义 RNA 对肺癌细胞 A549 细胞周期的影响 [J]. *癌症杂志*, 2005, 24(2): 149 - 154.
- [16] 林莉, 王启升, 管伟, 等. Plk1 基因为靶的反义寡核苷酸对 HepG2 肝癌细胞的体内外抗肿瘤作用 [J]. *癌症杂志*, 2001, 20(11): 1233 - 1236.