

文章编号:1005-6947(2006)02-0098-04

· 胃癌专题研究 ·

保罗样激酶 1 mRNA 及蛋白质在胃癌中的表达意义

兰斌^{1,2}, 陈雪华¹, 刘炳亚¹, 瞿颖¹, 蔡劬¹, 朱正纲¹

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院 外科、上海消化外科研究所, 上海 200025; 2. 福建医科大学附属第一医院 肿瘤外科, 福建 福州 350005)

摘要:目的 探讨保罗样激酶 1 (plk1) 在胃癌组织中 mRNA 及蛋白质的表达, 并探讨其表达水平与临床病理指标的关系。方法 采用实时定量多聚酶链反应及免疫印迹 (Western blot) 分别检测了 60 例胃癌患者新鲜切除胃癌组织及其对应正常胃粘膜组织中 plk1 mRNA 及蛋白质的表达。结果 胃癌组织中 plk1 mRNA 及蛋白质水平均明显高于正常组织 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 并且其水平与胃癌的分化程度和浸润深度有关 ($P < 0.05$); 蛋白质表达水平与胃癌的分化有关 ($P < 0.05$)。结论 plk1 的过表达可能在胃癌发生发展中起促进作用; 其表达程度可望作为胃癌的某些生物学行为新的判定指标。

关键词: 胃肿瘤/病理生理学; 保罗样激酶 1

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A

Significance of polo like kinase 1 and protein expression in gastric carcinomas

LAN Bin^{1,2}, CHEN Xue-hua¹, LIU Bing-ya¹, QU Ying¹, CAI Qu¹, ZHU Zheng-gang¹

(1. Department of Surgery, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Department of Tumor Surgery, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China.)

Abstract: **Objective** To study the significance of polo like kinase 1 (plk1) mRNA and protein expression in gastric cancer tissues and the relationship between the plk1 mRNA and protein expression level in gastric cancer tissues and the clinicopathological parameters. **Methods** Plk1 mRNA and protein level were respectively measured by real-time PCR and Western blot in fresh tumor tissues and the normal gastric mucosa from 60 patients with gastric cancer. **Results** plk1 mRNA and protein expression level in gastric cancer tissues was significantly higher than that in normal gastric tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). plk1 mRNA expression level in gastric cancer tissues was closely related to degree of tumor differentiation and depth of invasion ($P < 0.05$), and plk1 protein level was closely related to tumor differentiation ($P < 0.05$). **Conclusions** The overexpression of plk1 may promote carcinogenesis and the development of gastric cancer, and plk1 can be a novel marker for determining certain biological behaviours of gastric cancer.

Key words: Stomach Neoplasms/physiopathol; plk1

CLC number: R735.2 **Document code:** A

保罗样激酶 1 (polo-like kinase 1, plk1) 在细胞

基金项目: 国家 973 重点基础研究发展规划基金资助项目 (2002CB713700); 福建医科大学科学研究发展基金资助项目 (FJGX040727)。

收稿日期: 2005-09-07; **修订日期:** 2006-02-14。

作者简介: 兰斌, 男, 福建福州人, 福建医科大学附属第一医院副主任医师, 主要从事胃癌临床与基础方面的研究。

通讯作者: 朱正纲 电话: 021-64370045-611009; E-mail: zzg1954@hotmail.com。

有丝分裂中扮演关键角色, 与细胞有丝分裂期多个事件密切相关, 如中心体复制、纺锤体形成、染色体分离以及胞质分裂等^[1] 近年研究^[2] 表明, Plk1 的过表达与细胞的过度增殖乃至肿瘤发生有关。国外多篇报道^[3-10] 显示, plk1 在多种实体瘤中存在着过表达并与肿瘤的生物学行为及预后有关, 故有人拟将 plk1 列为实体瘤的 1 个新的生物学指标。国内外有关 plk1 在胃癌中表达的详细研究报道较少。弄清 plk1 在胃癌组织中的表达对于阐明 plk1 在胃癌临床及病理学方面具有理论意义及潜在的应用

价值。本实验使用实时逆转录-多聚酶链反应(real-time PCR)与 Western blot(免疫印迹)检测了60例胃癌新鲜标本中 plk1 mRNA 与蛋白质的表达水平,探讨其与胃癌临床病理指标的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集60例胃癌患者新鲜组织肿瘤及其对应的远离肿瘤切端的正常黏膜,手术标本离体后立即放入液氮中,然后转移至 -80°C 冰箱保存备用。标本来自上海交通大学医学院(原第二医科大学)附属瑞金医院外科2003~2004年胃癌手术切除标本。患者均未接受术前化疗,本组男33例,女27例;平均年龄67.6岁(45~82岁);21例肿瘤位于胃上1/3,17例于胃中1/3,22例于远端1/3;肿瘤直径大于10cm者36例,小于10cm 24例。Borrmann I型8例,II型14例,III型31例,IV型7例。10例高分化,14例中分化,36例低分化。浸润深度 T_1 8例, T_2 18例, T_3 19例, T_4 15例。淋巴结转移,阴性37例,阳性23例。术后TNM分期,I期8例,II期13例,III期25例,IV期14例(按UICC第5版)^[11]。

1.2 主要试剂及仪器

Real-time PCR 扩增仪(美国 MJ Research 公司)、免疫酶标仪(美国 BIO-TEKuQuant 公司)、DU640 核酸蛋白分析仪(美国 Beckman 公司)、Dounce 匀浆器(国产)、垂直电泳仪、全湿转膜仪、凝胶图像分析仪(三者均为美国 Bio-Rad 公司);荧光标记物(SYBRGreen PCR Master Mix, 美国 Applied Biosystems 公司)、PCR 引物(上海博亚生物技术有限公司合成)、RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司)、plk1 鼠抗人单克隆一抗(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)、HRP 标记的兔抗鼠二抗(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实时 RT-PCR 总 RNA 的提取加入 Trizol 裂解,并按试剂盒(Invitrogen 公司,美国)提供的操作步骤进行 RNA 抽提,分光光度计测定浓度。取 $3\mu\text{g}$ 的 RNA 按试剂盒说明操作,逆转录至 cDNA,实时 RT-PCR 在 96 孔聚丙烯板上置于 real-time PCR 仪上进行。plk1 引物序列:5-CGACTTCGTGTTCTGCTG-3(上游),5-AATAACTCGGTTTCGGTGC-3(下游)。内参 GAPDH 引物序列如下:5-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3(上游),5-GTAGCCCAGGATGCCCTTGA-3(下游)。每孔反应体系为 $20\mu\text{L}$,其中含 $1\mu\text{L}$ 的 $1:10$ 的样本 cDNA,引物终浓度为 200nmol/L ,以及 $2\times$ 的荧光标记物 SYBRGreen PCR Master Mix。扩增

条件: 50°C 2min, 95°C 10min, 40 循环的 95°C 15s, 60°C 60s。最后1个循环后,得到 $-55\sim 95^{\circ}\text{C}$ 的融解曲线。所有 PCR 采用3个复孔并使用 GAPDH 为内参。数据分析:在 PCR 任意循环中,当荧光强度值大于由仪器自带的软件计算出的阈值(threshold value, CT)时,样本被认为阳性,plk1 mRNA 表达量用 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 表示($2^{-\Delta\text{CT}}$ 即比值, ΔCT 由 plk1 的 CT 值减去 GAPDH 的 CT 值)^[12],实验重复测量3次,取比率的平均值作为 plk1 最后的表达水平。

1.3.2 Western blot 组织加入蛋白裂解液机械匀浆,按试剂盒(Active Motif 公司,美国)说明抽提蛋白质。采用 BCA 蛋白测定试剂盒(PIERCE 公司,美国)测定蛋白浓度,取 $100\mu\text{g}$ 的蛋白进行浓度为12.5%的聚丙烯酰胺电泳,电泳毕将蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂牛奶室温阻断2h,1:200的 plk1 一抗室温孵育2h, TBST 液(20mM Tris/137mM NaCl/0.1% Tween20 pH7.6)洗3次,1:1000 HRP 标记的二抗室温孵育1h, PVDF 膜最后使用二氨基联苯胺(DAB)试剂显色。

1.4 统计分析

采用 SPSS 11.0 软件包。使用方差检验、符号秩和检验、Wilcoxon 秩和检验、Kruskal Wallis 检验及 Spearman 等级相关分析进行统计处理, $P < 0.05$ 为差别具有显著性意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 plk1 mRNA 的表达水平

60例正常胃组织中,比值的中位数为0.000819(0.000195~0.013741);而癌组织比值的中位数为0.001767(0.000195~0.020675);胃癌组织中 plk1 mRNA 表达水平明显高于正常胃组织($P < 0.05$)(附图 a)。

2.2 胃癌组织中 plk1 蛋白质的表达水平

Western blot 结果以灰度比(plk1/GAPDH)来评估 plk1 蛋白质的表达水平。结果:60例正常胃组织中,plk1 蛋白质灰度比的中位数为0.451(0.113~0.822),而癌组织灰度比的中位数为1.458(1.115~4.785),胃癌组织中 plk1 蛋白质的表达水平明显高于正常胃组织($P < 0.01$)(附图 b)。

2.3 plk1 mRNA 与蛋白质表达水平的关系

为便于分析与 mRNA 表达水平的相关性,将癌组织蛋白质灰度比分为3组: $< 2.3(+)$; $2.3\sim 3.5(++)$; $> 3.5(+++)$ 。Spearman 等级相关分析显示,随着蛋白质表达水平的升高($+ \sim +++$),mRNA 水平亦呈明显上升,二者存在明显相关($P < 0.05$)。

2.4 Plk1 表达水平与胃癌的临床病理指标的关系

plk1 mRNA 与胃癌的分化程度及浸润深度均有关 ($P < 0.05$), 而与年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、Borrmann 分型、淋巴结转移、TNM 分期无关 (组间差异 $P > 0.05$); plk1 蛋白质仅与胃癌的分化程

度有关 ($P < 0.05$), 而与其他临床病理指标 - 年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、浸润深度、Borrmann 分型、淋巴结转移、TNM 分期无关 (附表)。两个水平的分析共同之处是胃癌组织的 plk1 mRNA 及蛋白质表达均与肿瘤分化程度有关。

附图 a: 胃癌及正常胃黏膜组织中 plk1 mRNA 表达水平的比较。6 例胃癌组织的 plk1 mRNA 表达均较正常组织明显升高

附图 b: 胃癌及正常胃黏膜组织中 plk1 蛋白质表达水平的比较。6 例胃癌组织的 plk1 蛋白质表达均较正常组织明显升高

附表 plk mRNA 及蛋白质的表达与胃癌临床病理指标的关系

临床病理指标	例数	plk1 蛋白质		plk1 mRNA	
		中位数(灰度比)	P 值	中位数(ratio 值)	P 值
年龄(岁)					
<60	23	1.86	0.35	0.002147	0.44
>60	37	2.17		0.001811	
性别					
男	33	1.81	0.69	0.001931	0.56
女	27	2.67		0.002554	
部位					
近端	21	2.51	0.46	0.002173	0.23
中部	17	1.81		0.001315	
远端	22	2.42		0.001782	
大小(cm)					
<10	24	2.34	0.71	0.001466	0.51
>10	36	2.52		0.001823	
Borrmann 分型					
I,II	22	1.92	0.31	0.001354	0.29
III,IV	38	2.28		0.000943	
侵犯深度					
T ₁	8	2.14	0.14	0.000434	0.025
T ₂	18	3.51		0.000859	
T ₃	19	2.34		0.003643	
T ₄	15	3.19		0.005434	
淋巴结转移					
阴性	37	3.13	0.62	0.000902	0.75
阳性	23	2.80		0.001351	
TNM 分期					
I	8	1.92	0.25	0.000873	0.48
II	13	2.33		0.000984	
III	25	2.18		0.000695	
IV	14	2.19		0.001563	
肿瘤分化					
高	10	1.27	0.02	0.000741	0.016
中	14	2.55		0.001834	
低	36	3.56		0.002732	

3 讨论

Plk1 基因是近年来细胞周期领域研究较为活跃的基因之一。因为 plk1 在启动维持细胞有丝分裂中发挥重要的调控作用^[13], 细胞分裂期相关的系列事件 - 中心体复制、纺锤体形成、染色质分离、胞质分裂等皆与 plk1 基因功能相关。有趣的是, 研究显示 plk1 与肿瘤存在着密切关系, plk1 的过表达可导致细胞恶性转化^[2]。各种肿瘤的组织研究也证实, plk1 在诸多恶性实体瘤中存在过表达并与肿瘤生物学行为及预后有着密切关系, 迄今为止, 关于 plk1 在各种实体瘤中表达的报道有: 结肠癌、卵巢癌、食管癌、肺癌、头颈部鳞癌、黑色素瘤、胶质瘤、乳腺癌^[3-10]。这些研究的共同点在于, plk1 无论是在 mRNA 水平抑或蛋白质水平均存在过表达。然而, 笔者发现少有同时对 plk1 mRNA 水平及蛋白质表达水平进行研究的报道, 本实验, 对 60 例新鲜标本进行了两个水平的定量 (mRNA) 及半定量 (蛋白质) 检测。结果显示, 胃癌组织中 plk1 蛋白表达明显高于正常胃粘膜上皮组织, 且癌组织中 mRNA 与蛋白质水平变化基本一致, 此结果与上述各家的报道一致。说明 plk1 的过表达现象普遍存在于包括胃癌在内的各种恶性实体瘤中, 证实了 plk1 在恶性肿瘤发生发展中起促进作用的推测, 至于 plk1 过表达的原因目前尚未完全阐明。有研究认为肿瘤中 RB 蛋白的丢失, 使 RB 对 plk1 启动子抑制减弱致使 plk1 表达增强^[14]。

进一步对 plk1 表达水平与胃癌生物学行为的分析发现, plk1 mRNA 表达水平与 60 例患者胃癌的分化程度及浸润深度有关, plk1 蛋白质表达水平与胃癌的分化程度有关, 虽然二者结果不完全相同, 但都提示与胃癌的分化程度有关。故笔者推测, plk1 可能与胃癌的分化调节途径存在着较为密切的关联。但尚需充分的实验予以证实。另外, 与胃癌浸润深度的关系也需进一步确认。

本实验证实, plk1 在胃癌组织中转录及翻译水平都出现明显的上调, 与胃癌分化也存在密切的关系, 此结果将有助于阐明胃癌的发病机制及其在临床病理学诊断方面的应用, 对胃癌药物基因

靶向治疗也将提供有意义的线索。

参考文献:

- [1] Liu X, Erikson RL. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA [J]. Proc Natl Acad Sci. 2002, 99 (13): 8672 - 8676.
- [2] Smith MR, Wilson ML, Hamanaka R, et al. Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo - like kinase [J]. Biochem Biophys Res Commun [J]. 1997, 234 (2): 397 - 405.
- [3] Takahashi T, Sano B, Nagata T, et al. Polo - like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers [J]. Cancer Sci. 2003, 94 (2): 148 - 152.
- [4] Weichert W, Denkert C, Schmidt M, et al. Polo - like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma [J]. Br J Cancer. 2004, 90 (4): 815 - 821.
- [5] Tokumitsu Y, Mori M, Tanaka S, et al. Prognostic significance of polo - like kinase expression in esophageal carcinoma [J]. Int J Oncol. 1999, 15 (4): 687 - 692.
- [6] Wolf G, Elez R, Doermer A, et al. Prognostic significance of polo - like kinase (PLK) expression in non - small cell lung cancer [J]. Oncogene, 1997, 14 (5): 543 - 549.
- [7] Knecht R, Elez R, Oechler M, et al. Prognostic significance of polo - like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck [J]. Cancer Res, 1999, 59 (12): 2794 - 2797.
- [8] Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, et al. Expression of polo - like kinase (PLK1) in thin melanomas: A novel marker of metastatic disease [J]. J Cutan Pathol, 2002, 29 (6): 354 - 358.
- [9] Dietzmann K, Kirches E, von Bossanyi, et al. Increased human polo - like kinase - 1 expression in gliomas [J]. J Neurooncol, 2001, 53 (1): 1 - 11.
- [10] Wolf G, Hildenbrand R, Schwar C, et al. Polo - like kinase: A novel marker of proliferation: Correlation with estrogen - receptor expression in human breast cancer [J]. Pathol Res Pract, 2000, 196 (11): 753 - 759.
- [11] Sobin LH, Wittekind Ch, eds. UICC TNM Classification of Malignant Tumors [M]. 5th ed. New York: John Wiley&Sons, 1997. 59 - 62, 66 - 69.
- [12] Masuhito, Nishimura, Shinsaku Naito, et al. Tissue - specific mRNA Expression Profiles of Human Nuclear Receptor Subfamilies [J]. Drug Metab Pharmacokin. 2004, 19 (2): 135 - 149.
- [13] 兰斌. 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.
- [14] Gunawardena RW, Siddiqui H, Solomon DA, et al. Hierarchical requirement of SWI/SNF in RB - mediated repression of Plk1 [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (28): 29278 - 29285.