

沉默 PLK1 基因表达对食管鳞癌细胞肿瘤生物学行为的影响*

张少为, 陈 阁, 张耀中, 米 源, 廖海江, 王 雷[△]

(河北医科大学第四医院胸心外科, 石家庄 050011)

[摘要] **目的** 探讨沉默 PLK1 基因对食管鳞癌 KYSE-30 细胞肿瘤生物学行为的影响并分析其相关的分子机制。**方法** 将 PLK1 siRNA 和空白对照 siRNA 转染 KYSE-30 细胞 48 h。Real time 荧光定量 PCR 法检测 KYSE-30 细胞 PLK1 mRNA 表达水平, Western blot 法检测 PLK1、C-myc、Vimentin 和基质金属蛋白酶 2(MMP2) 蛋白的表达水平, 流式细胞术检测细胞周期分布变化, Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力的改变。**结果** PLK1 siRNA 组 PLK1 mRNA 表达较 Control siRNA 组明显降低, 差异有统计学意义($t=37.90$, $P=0.000$)。PLK1 siRNA 组 PLK1、C-myc、Vimentin、MMP2 蛋白表达较 Control siRNA 组均明显降低, 差异有统计学意义($t=40.72, 24.57, 25.15, 8.85$, $P<0.05$)。PLK1 siRNA 组 G₂/M、S 期细胞与 Control siRNA 组比较明显减少($P<0.05$), G₀/G₁ 期细胞无明显变化($P>0.05$)。与 Control siRNA 组穿膜细胞数(94.00±4.04)个比较, PLK1 siRNA 组(44.00±4.51)个明显减少, 差异有统计学意义($t=14.30$, $P=0.000$)。**结论** PLK1 在食管鳞癌的生长转移中具有重要作用, 沉默 PLK1 基因表达可明显抑制细胞有丝分裂能力和侵袭转移。

[关键词] RNA, 小分子干扰; 食管肿瘤; 癌, 鳞状细胞; PLK1; 细胞周期; 上皮间质转化

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)06-0929-04

Influence of silencing PLK1 gene expression on cellular oncological biologic behaviors of esophageal squamous carcinoma*

ZHANG Shaowei, CHEN Ge, ZHANG Yaozhong, MI Yuan, LIAO Haijiang, WANG Lei[△]

(Department of Cardiothoracic Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of silencing PLK1 gene expression on cellular oncological biologic behaviors of esophageal squamous carcinoma KYSE-30 cells and to analyze its related molecular mechanism. **Methods** PLK1 siRNA and blank control siRNA were respectively transfected into KYSE-30 cells for 48 h. The expression level of PLK1 mRNA was detected by real time fluorescence quantitative PCR. The protein expression levels of PLK1, C-myc, Vimentin and MMP2 were detected by the Western blot assay. The distribution change of cell cycles was determined by the flow cytometry method. The invasion ability change was detected by the Transwell invasion assay. **Results** The expression of PLK1 mRNA in the PLK1 group was significantly decreased compared with the Control siRNA group, and the difference was statistically significant ($t=37.90$, $P=0.000$). The expressions of PLK1, C-myc, Vimentin and MMP2 proteins were significantly decreased compared with the Control siRNA group, and the difference was statistically significant ($t=40.72, 24.57, 25.15, 8.85$, $P<0.05$). The cells of G₂/M and S stages in the PLK1 siRNA group were significantly decreased compared with the Control siRNA group ($P<0.05$), while the cells at G₀/G₁ stages had no obvious change ($P>0.05$). Compared with the transmembrane cells (94.00±4.04) in the Control siRNA group, which (44.00±4.51) in the PLK1 siRNA group were significantly decreased, and the difference was statistically significant ($t=14.30$, $P=0.000$). **Conclusion** PLK1 has an important role in the growth and metastasis of esophageal squamous carcinoma. Silencing PLK1 gene expression may obviously inhibit the cellular mitosis ability and invasive metastasis.

[Key words] RNA, small Interfering; esophageal neoplasms; carcinoma, squamous cell; PLK1; cell cycle; epithelial-mesenchymal transition

食管癌是消化道常见恶性肿瘤之一, 其在全球所有恶性肿瘤的发病率占第八位, 病死率占第六位。我

* 基金项目: 河北省科技厅科技攻关计划(132077127D); 河北省卫生和计划生育委员会医学重点科研基金(20160177)。 作者简介: 张少为(1972-), 副主任医师, 硕士, 主要从事肺部、食管肿瘤的手术及靶向治疗研究。 [△] 通信作者, E-mail: yuankundu@163.com。

国是食管鳞癌高发区,每年新发病率和病死率均居世界第一位,在国内食管癌位居全部恶性肿瘤死亡第四位^[1]。目前传统治疗方法主要是手术切除辅助放疗,但食管癌在被确诊时多是中晚期,术后复发和转移的比例高,预后不佳。食管癌发病机制与原癌基因的激活和抑癌基因的失活密切相关,因此从基因分子水平阐明其发生机制是目前研究热点。PLK1(polo-like kinase)作为丝氨酸-苏氨酸激酶家族之一,是细胞有丝分裂关键的调控因子,其在启动、维持和有丝分裂的过程中发挥重要的作用。研究表明 PLK1 在黑色素瘤、皮肤梅克尔细胞癌、胰腺癌和肝癌等多种恶性肿瘤中高表达^[2-5],下调 PLK1 表达可以通过减少细胞增殖、促进凋亡等机制起到明显抗肿瘤作用。目前全世界关于 PLK1 与食管鳞癌发生、发展与上皮-间质转化之间相关的研究较少。本研究通过沉默 PLK1 基因表达,探讨其与食管鳞癌肿瘤生物学行为的分子机制,旨在为食管鳞癌的靶向治疗提供一个新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人食管鳞癌细胞株 KYSE-30 购自上海通派生物科技有限公司;胎牛血清购自上海素尔生物科技有限公司;Ham 和 RPMI1640 培养液购自上海钰森生物技术有限公司;Silencer™ Select PLK1 和 control siRNA 购自美国 Life Technologies 公司;TaqMan® PLK1 引物和探针(Hs00983227_m1)和 TaqMan® GAPDH(Hs02758991_g1)购自美国 Life Technologies 公司;75%酒精购自北京华兴科诺公司;Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂盒和 Opti-MEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司;iScript™ cDNA 合成试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司;TaqMan® 基因表达预混液购自美国 Applied Biosystems 公司;结晶紫购自美国 Sigma 公司;2X Laemmli Sample Buffer、Tris/甘氨酸/蛋白电泳缓冲液和 Mini-PROTEAN TGX 预制胶购自美国 Bio-Rad 公司;总 RNA 提取试剂盒购自上海谱振生物科技有限公司;鼠抗人 Vimentin 和 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;兔抗人 PLK1 和 C-myc 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;兔抗人 MMP2 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司;West Femto 最高灵敏度化学发光底物试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司;Pierce-BCA 蛋白分析试剂盒购自上海创赛科技有限公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;甲醇购自天津永大化学试剂有限公司;Transwell 膜嵌套、matrigel 胶购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

将食管鳞癌 KYSE-30 细胞用 RPMI 1640 和 Ham 细胞培养液培养液在 37 °C、CO₂ 维持在 5%左右的恒温恒湿的培养箱中培养,待细胞融合达 80%左右并将生长状态良好的食管鳞癌 KYSE-30 细胞接种到 6 孔板上,按照转染说明书进行

转染并设立 PLK1 siRNA 组及空白对照 Control siRNA 组,终浓度均为 100 nmol/L,转染完成后再培养 48 h。

1.2.2 Real time 荧光定量 PCR 法检测 PLK1 mRNA 的表达

首先进行总 RNA 的提取,用 PBS 洗涤转染好的食管鳞癌 KYSE-30 细胞,参照总 RNA 提取试剂盒说明书提取每组的总 RNA,纯化 RNA 上机检测 RNA 浓度。然后进行逆转录合成 cDNA,参照 iScript™ cDNA 合成的说明书进行每组样本 cDNA 的反转录,在 25 °C 5 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min 的条件下进行 cDNA 合成并保存备用。最后进行 Real time 荧光定量 PCR 扩增,将 Taqman 基因表达预混液、TaqMan® PLK1 物和探针 0.5 μL 或 TaqMan® GAPDH 引物和探针、样本 cDNA,上机在 95 °C 10 s,60 °C 10 s,72 °C 10 s 的条件下进行 PCR 扩增,共 40 个循环。以 GAPDH 的 Ct 值为标准,用 2^{-ΔCt} 法进行分析。

1.2.3 Western blot 检测 PLK1 蛋白的表达

PBS 洗涤转染 48 h 后 KYSE-30 细胞加到 6 孔板上,每孔总蛋白提取试剂 100 μL 并含有蛋白酶抑制剂的 M-PER 细胞,收集样本的总蛋白提取液并离心取上清液,用 BCA 法测定样本的总蛋白浓度。再转印槽中加上 Tris/甘氨酸/蛋白电泳液,在 Mini-PROTEAN TGX 预制胶中行每组样本蛋白上样,进行电泳。用双蒸水冲洗凝胶,在 Tris/甘氨酸缓冲液中转至 PVDF 膜(冰浴),室温含 5%脱脂奶粉的 TBST 液封膜 1 h,加入一抗 PLK1(1 : 1 000)、一抗 C-myc(1 : 1 000)、一抗 Vimentin(1 : 10 000)、一抗 GAPDH(1 : 20 000)、一抗 MMP2(1 : 1 000)、4 °C 摇床孵育过夜。第 2 天 TBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,将发光底物滴于 PVDF 膜上,5 min 后于暗室曝光显影,用 Image 软件对蛋白灰度值进行分析。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期的变化

将转染 48 h 的 KYSE-30 细胞用 PBS 洗涤,胰酶消化,PBS 漂洗,离心,吹打均匀重悬细胞,加入 4 °C 70%冰乙醇固定 30 min 以上。PBS 去除乙醇,重悬细胞并加碘化丙啶和 RNaseA 的 PBS,避光 4 °C 染色。尼龙网过滤后用 MuticycleAV 分析软件进行细胞周期分析,PI 激发波长 488 nm。

1.2.5 Transwell 侵袭实验

液化 Matrigel 胶于聚碳酸酯膜。将转染 48 h 的 KYSE-30 细胞加入 Transwell 小室上室。下室加 10%PBS 的细胞培养液,于恒温恒湿箱中进行孵育,24 h 后将靠近内室一面的基质胶和细胞去掉,室温甲醇固定 30 min,最后用 0.1%结晶紫染色清水漂洗晾干膜,紧接着在显微镜下进行观察,随机选取 4 个高倍视野进行计数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,实验重复 3 次,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Real time 荧光定量 PCR 法检测 PLK1 mRNA 的表达 PLK1 siRNA 组 PLK1 mRNA 表达 0.29 ± 0.03 较 Control siRNA 组 1.00 ± 0.02 明显降低, 差异有统计学意义 ($t=37.90, P=0.000$), 见图 1。

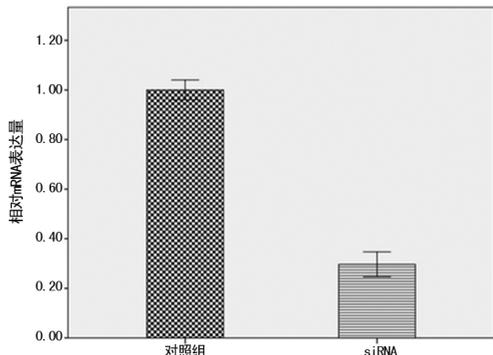


图 1 两组 PLK1 mRNA 的表达情况

2.2 Western blot 检测 PLK1 蛋白的表达 PLK1 siRNA 组 PLK1、C-myc、Vimentin、MMP2 蛋白表达较 Control siRNA 组均明显降低, 差异有统计学意义 ($t=40.72, 24.57, 25.15, 8.85, P<0.05$), 见图 2。

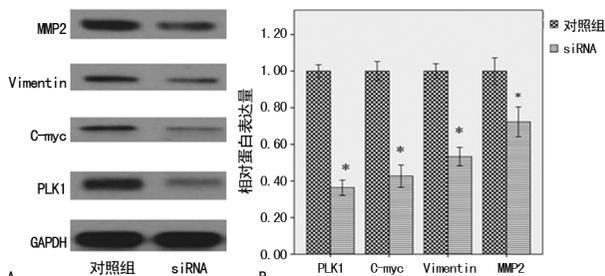


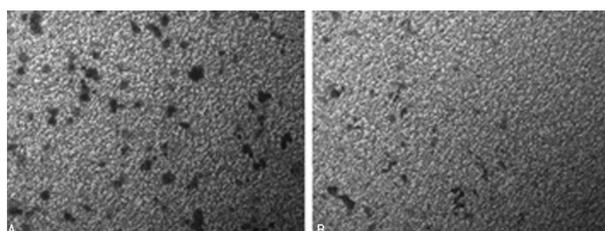
图 2 两组 PLK1、C-myc、Vimentin 和 MMP2 蛋白的表达

2.3 流式细胞术检测细胞周期变化 PLK1 siRNA 组 G_2/M 、S 期细胞与 Control siRNA 组比较明显降低 ($P<0.05$), G_0/G_1 期细胞无明显变化 ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 流式细胞术检测细胞周期的变化

组别	G_2/M 期	S 期	G_0/G_1 期
Control siRNA 组	14.67 ± 1.15	36.00 ± 1.67	49.33 ± 0.55
PLK1 siRNA 组	18.60 ± 1.23	31.20 ± 0.62	50.20 ± 1.01

2.4 Transwell 侵袭实验 与 Control siRNA 组穿膜细胞数 (94.00 ± 4.04) 个比较, PLK1 siRNA 组 (44.00 ± 4.51) 个明显减少, 差异有统计学意义 ($t=14.30, P=0.000$), 见图 3。



A: Contor siRNA 组; B: PLK1 siRNA 组

图 3 两组细胞侵袭能力的变化 ($\times 400$)

3 讨 论

PLKs 是丝氨酸/苏氨酸激酶, 家族中包括从 PLK1 到 PLK5, 在细胞周期的各个时相的调控中发挥着核心作用。其中 PLK1 作为细胞周期检点的主要调节者, 在有丝分裂过程与纺锤体形成及染色体的分离具有密切关系, 此外, 研究表明 PLK1 的高表达和肿瘤的发生、发展及预后密切相关, 可以作为一个潜在的有效抗肿瘤靶点^[6-8]。RNA 干扰技术属于转录后基因沉默机制, 可以使靶基因 mRNA 沉默达到定向敲除与肿瘤细胞发生、发展相关基因的功效, 因其具有高特异性和高效性等特点作为一种崭新的实验方法被广泛应用于基因功能的研究及肿瘤细胞信号传导通路的分析。本研究应用 siRNA 沉默 KYSE-30 细胞 PLK1 基因表达, 结果显示 KYSE-30 细胞中存在 PLK1 高表达, RNA 干扰可明显减少肿瘤细胞 PLK1 mRNA 和蛋白表达。

细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程, 受细胞周期蛋白、多种激素、细胞周期蛋白激酶、三磷酸肌醇 (IP3)、Ca 信使系统及细胞周期蛋白激酶抑制剂等多个蛋白共同调节, 当细胞周期紊乱可导致肿瘤细胞异常增殖。PLK1 作为细胞周期依赖性激酶, 在细胞有丝分裂调节过程中可以通过促进中心体成熟、细胞周期由 G_2 期进入 M 期及染色体分离等功能发挥重要作用。阻止癌细胞增殖和促进凋亡是肿瘤基因治疗的基本原则, AMANI 等^[9]采用 PLK1 靶向抑制剂 BI 6727 处理神经胶质瘤细胞发现, 可以通过显著阻滞细胞于 G_2/M 期, 导致肿瘤细胞增殖和凋亡增加。本研究应用流式细胞术分析了转染 PLK1 siRNA 对 KYSE-30 细胞的周期分布变化的影响, 发现转染组较空白对照组相比可将更多细胞阻滞于 G_2/M 期, 从而调控肿瘤细胞的增殖, 这与 AMANI 等的结果相一致。TAN 等^[10]研究发现 PLK1 是肿瘤细胞中 PDK1-PLK1-Myc 通路的核心成分, 活化状态的 PLK1 进一步激活 Myc 促进肿瘤的生长增殖和分化。笔者同时检测了细胞周期相关蛋白 C-myc 的表达来进一步探讨食管鳞癌细胞 PLK1 表达和周期变化的可能机制, 结果发现沉默 PLK1 基因后 PLK1 和 C-myc 蛋白表达下调, 表明在食管鳞癌细胞周期调控中 PLK1 发挥重要作用, 其可以通过上调 C-myc 表达促进细胞异常增殖。

上皮-间质转化是上皮来源的恶性肿瘤侵袭转移的重要机制之一, 主要以 E-Cadherin 等上皮表型标志下调^[11], Vimentin 等间质表型特征分子表达上调为特征^[12-13]。Vimentin 可以通过调节 MT1-MMP 改变乳腺癌细胞的黏附及迁移能力, 并且与患者的预后密切相关, 下调 Vimentin 表达可以影响肿瘤细胞的侵袭和迁移能力^[14]。此外, 细胞外基质的降解也是肿瘤侵袭及转移重要的一部分, 肿瘤细胞可以通过破坏细胞外基质扩散并浸润到周围正常组织, MMP2 是锌结

合内肽酶家族成员之一,高表达的 MMP2 在多种肿瘤组织中可以通过降解、破坏肿瘤附近的细胞基质,促进肿瘤细胞的侵袭及转移^[15-16]。本研究表明抑制 PLK1 表达后可导致 Vimentin 和 MMP2 蛋白表达下调,Transwell 侵袭实验进一步显示穿膜细胞数明显减少,可以说明敲掉 PLK1 基因后可以抑制肿瘤细胞上皮-间质转化,并减少了 MMP2 介导的细胞外基质的破坏,从而降低食管鳞癌细胞的侵袭能力,分析其原因可能是 PLK1 通过诱导食管鳞癌细胞的 EMT 过程促进侵袭转移。

总之,本研究发现 PLK1 在食管鳞癌细胞的异常增殖和促进侵袭转移过程中发挥重要作用,但是具体的调控机制尚需进一步研究,PLK1 有望成为食管鳞癌分子靶向治疗的重要靶标。

参考文献

- [1] 陈万青. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 1-7.
- [2] CHOLEWA B D, NDIAYE M A, HUANG W, et al. Small molecule inhibition of polo-like kinase 1 by volasertib (BI 6727) causes significant melanoma growth delay and regression in vivo[J]. Cancer Lett, 2017(385): 179-187.
- [3] KADLETZ L, BIGENZAHN J, THURNHER D, et al. Evaluation of Polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in Merkel cell carcinoma[J]. Head Neck, 2016, 38 Suppl 1: E1918-1925.
- [4] LI J, WANG R, SCHWEICKERT P G, et al. Plk1 inhibition enhances the efficacy of gemcitabine in human pancreatic cancer[J]. Cell Cycle, 2016, 15(5): 711-719.
- [5] WANG D, CHANG R, WANG G, et al. Polo-like kinase 1-targeting Chitosan Nanoparticles suppress the progression of hepatocellular carcinoma [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2017, 17(7): 948-954.
- [6] WU J, IVANOV A I, FISHER P B, et al. Polo-like kinase 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and promotes epithelial cell motility by activating CRAF/ERK signaling[J]. Elife, 2016, 5. pii: e10734.
- [7] GUTTERIDGE R E, NDIAYE M A, LIU X, et al. PLK1 inhibitors in cancer therapy: From laboratory to clinics [J]. Mol Cancer Ther, 2016, 15(7): 1427-1435.
- [8] XIAO D, YUE M, SU H, et al. Polo-like kinase-1 regulates myc stabilization and activates a feedforward circuit promoting tumor cell survival[J]. Mol Cell, 2016, 64(3): 493-506.
- [9] AMANI V, PRINCE E W, ALIMOVA I, et al. Polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in diffuse intrinsic pontine glioma[J]. BMC Cancer, 2016, 16: 647.
- [10] TAN J, LI Z, LEE P L, et al. PDK1 signaling toward PLK1-MYC activation confers oncogenic transformation, tumor-initiating cell activation, and resistance to mTOR-targeted therapy[J]. Cancer Discov, 2013, 3(10): 1156-1171.
- [11] LI H, YUE D, JIN J Q, et al. Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in human lung adenocarcinomas [J]. Oncotarget, 2016, 7(49): 80415-80425.
- [12] BARRIERE G, TARTARY M, RIGAUD M. Metformin: a rising star to fight the epithelial mesenchymal transition in oncology[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2013, 13(2): 333-340.
- [13] ZHANG W, WU X, HU L, et al. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances epithelial-mesenchymal transition via STAT3 signaling pathway in non-small cell lung cancer cells [J]. Oncol Res, 2017, 25(5): 843-852.
- [14] PULYAEVA H, BUENO J, POLETTE M, et al. MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells [J]. Clin Exp Metastasis, 1997, 15(2): 111-120.
- [15] GRZELCZYK W L, SZEMRAJ J, JOZEFOWICZ-KORCZYNSKA M. The matrix metalloproteinase in larynx cancer [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2016, 70(23): 1190-1197.
- [16] MA W, ZHU M, ZHANG D, et al. Berberine inhibits the proliferation and migration of breast cancer ZR-75-30 cells by targeting Ephrin-B2 [J]. Phytomedicine, 2017, 25(1): 45-51.

(收稿日期: 2018-10-28 修回日期: 2018-12-21)