

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.24.004

## Polo 样激酶 5 在调控细胞周期参与肾透明细胞癌进展和转移的研究

梁波<sup>1</sup>, 章晓军<sup>1</sup>, 杨振兴<sup>2</sup>

(1. 象山县第一人民医院泌尿外科, 浙江宁波 315700; 2. 陆军军医大学第二附属医院泌尿外科, 重庆 400037)

**[摘要]** **目的** 探讨 Polo 样激酶 5 (PLK5) 在肾脏透明细胞癌进展和转移中的作用机制。**方法** 采用癌症基因组数据库 (TCGA) 和信号通路软件基因组表达富集分析 (GSEA) 预测 PLK5 在肾脏透明细胞癌中的作用; 实时荧光定量 PCR (RT-PCR)、蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 和免疫组织化学染色验证 PLK5 蛋白在肾癌细胞中的表达情况; CCK8 实验、细胞划痕和流式细胞技术分别检测 PLK5 蛋白干扰后肾癌细胞的增殖、迁移和细胞周期情况。**结果** 生物信息分析显示, PLK5 在肾癌患者体内表达水平明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 并且高表达集中在肾癌的高级阶段 ( $P < 0.01$ ); 在 OSRC2 细胞中干扰 PLK5 蛋白后可以明显抑制其增殖和迁移 ( $P < 0.01$ ), 且明显增加细胞周期中 S 阶段 ( $P < 0.01$ )。信号通路分析显示与 PLK5 交互的蛋白均参与肿瘤细胞 S 阶段的调节, 细胞循环通路被激活 ( $P < 0.01$ , FDR  $q = 0.014$ )。**结论** PLK5 蛋白表达与肾脏透明细胞癌的进展及预后密切相关。

**[关键词]** Polo 样激酶; 肾透明细胞癌; 细胞周期; 转移**[中图分类号]** R737.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)24-4157-05

**Study on polo-like kinase 5 involved in the progression and metastasis of clear cell renal cell carcinoma by regulating cell cycle**

LIANG Bo<sup>1</sup>, ZHANG Xiaojun<sup>1</sup>, YANG Zhenxing<sup>2</sup>

(1. Department of Urology, Xiangshan County First People's Hospital, Ningbo, Zhejiang 315700, China; 2. Department of Urology, the Second Hospital Affiliated to AMU, Chongqing 400037, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of polo-like kinase 5 (PLK5) gene in the progression and metastasis of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). **Methods** The cancer genome atlas (TCGA) database and gene set enrichment analysis (GSEA) software was employed to predict the importance of PLK5 in the development of ccRCC. The PLK5 protein expression was validated by real-time quantitative PCR (RT-PCR), Western blot and immunohistochemistry. Proliferation, migration and cell cycle in renal cancer cell after interfering the expression of PLK5 was detected by using CCK8, cell scratch and flow cytometry, respectively. **Results** Bioinformatics analysis indicated that the expression level of PLK5 in patients with ccRCC was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ), and the high expression of PLK5 was concentrated in the advanced stage of renal cancer ( $P < 0.01$ ). Interfering with PLK5 protein in OSRC2 cell line, proliferation and migration were significantly inhibited ( $P < 0.01$ ), and S stage in the cell cycle was significantly extended ( $P < 0.01$ ). Signal pathway analysis showed that proteins interacting with PLK5 were involved in the regulation of S phase of tumor cells, and the cell cycle pathway was activated ( $P < 0.01$ , FDR  $q = 0.014$ ). **Conclusion** The expression of PLK5 protein is closely related to the progression and prognosis of ccRCC.

**[Key words]** polo-like kinase; clear cell carcinoma of kidney; cell cycle; metastasis

近年来,随着经济发展和医疗水平的提高,肾癌的发病率(66.8/100 000)和致死率(23.4/100 000)也在增加,其中大部分是肾脏细胞癌,而肾脏细胞癌中又以透明细胞癌占大多数<sup>[1]</sup>。目前,大部分肾癌患者的诊断都是通过体检发现,然后再辅助精确的病理检查,虽然局限性肾癌超过 50%,但是仍然有 30%的肾癌患者在诊断时就已经转移<sup>[2-3]</sup>。Polo 样激酶(PLK)是参与有丝分裂进入与退出,纺锤体形成,胞质分裂

和减数分裂细胞周期调节的一类激酶,在果蝇、萌芽酵母和裂殖酵母的基因组中仅发现一个 PLK 表达。然而,脊椎动物有许多 PLK 家族成员,包括 PLK1、PLK2、PLK3、PLK4 和 PLK5。在脊椎动物 PLK 家族成员中,哺乳动物 PLK1 已被广泛研究<sup>[4]</sup>。人类 PLK5 基因也是最近发现的参与细胞周期循环的关键激酶,在人类神经元分化和肿瘤形成中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。并且,最近的研究显示 PLK5 调控细胞周期参

与肾脏透明细胞癌的淋巴结转移<sup>[5-6]</sup>。因此,本研究将探索 PLK5 蛋白参与肾脏透明细胞癌发生和进展的作用机制,旨在阐述 PLK5 可能对肾癌转移产生的潜在影响,并可能成为后续临床用药和治疗的靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 所有肾癌组织标本均来自象山县第一人民医院和陆军军医大学第二附属医院,参与患者均被告知参与研究,并且通过医院伦理委员会批准。肾透明细胞癌细胞系购自上海中乔新舟生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学公司;1640 培养基购自美国 Gibco 公司;FITC nexinV 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;PLK5 抗体购自 CST 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实时荧光定量 PCR** 细胞和组织 RNA 的提取,在使用 TRIZOL 试剂裂解的样品中加入 0.2 mL 氯仿剧烈振荡管体 15 s,15~30 °C 孵育 2~3 min,4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min。离心后混合液体将分为下层的红色酚氯仿相、中间层及无色水相上层。加入异丙醇沉淀和提取,分离保存 RNA。运用 SYBR Green 染料试剂盒,按照操作说明进行实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测。

**1.2.2 蛋白质免疫印迹法(Western blot)** 采用 Western blot 检测 PLK5 蛋白表达情况,步骤如下:分别收集肾癌细胞系和组织标本,使用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂,冰浴 20 min。离心,收集上清液,采用二喹啉甲酸法(BCA)测定蛋白水平。各组取等量总蛋白加上样缓冲液,煮沸变性 5 min,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。然后转移到硝酸纤维素膜上,10%脱脂奶粉封闭 1 h,将对应相对分子质量条带剪下后分别用一抗 PLK5 在 4 °C 孵育过夜后,加相应二抗孵育 1 h,膜上滴加化学发光剂在暗室进行曝光显影。

**1.2.3 免疫组织化学染色** 组织标本免疫组织化学染色步骤如下:切片常规脱蜡,缓冲液 PBS 洗 3 次,每次 5 min,将切片放在 Hydrogen Peroxide Block 中孵育 10~15 min,缓冲液洗 3 次,每次 5 min。加入 4% 多聚甲醛固定 20 min,弃 4% 多聚甲醛后用 PBS 洗涤 2 次,滴加一抗工作液 37 °C 孵育 1~2 h,或抗 CX43 抗体的 PBS-BSA (1:200) 孵育,4 °C 过夜。向 1 mL DAB Plus Substrate(或 AEC Plus Substrate)中滴加 1~2 滴 DAB Plus Chromogen(或 AEC Plus Chromogen),混匀后滴加到切片上,孵育 3~15 min。滴加适量的辣根酶或碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液,37 °C 孵育 10~30 min,显色剂显色 3~15 min(DAB 或 NBT/BCIP),锡箔纸包裹置于 37 °C 温箱孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 3 min,置于激光共聚焦显微镜下观察。

**1.2.4 慢病毒构建和转染** 慢病毒构建是由吉玛生物公司协助完成,所有肾癌细胞系培养在合适的培养基中,含 10% 胎牛血清,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱中进行孵育培养。六孔板细胞没空感染 20 mL 慢病毒,24 h 以后观测荧光强度,进行后续试验。

**1.2.5 CCK-8 检测和划痕实验** CCK-8 检测使用购买自碧云天的 CCK8 试剂盒,取对数生长期的上述肾癌细胞经胰酶消化细胞计数后,按每孔 3 000 个细胞接种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔。加入 90  $\mu$ L 1640 培养基和 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,放细胞培养箱孵育 1 h 后,用酶标仪测 450 nm 波长各孔吸光度值。划痕实验具体步骤:先用 marker 笔在 6 孔板背后均匀地划横线;在孔中加入约  $5 \times 10^5$  个细胞,具体数量因细胞种类不同而不同;PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基培养;使用统计软件计算细胞间距离的均值。

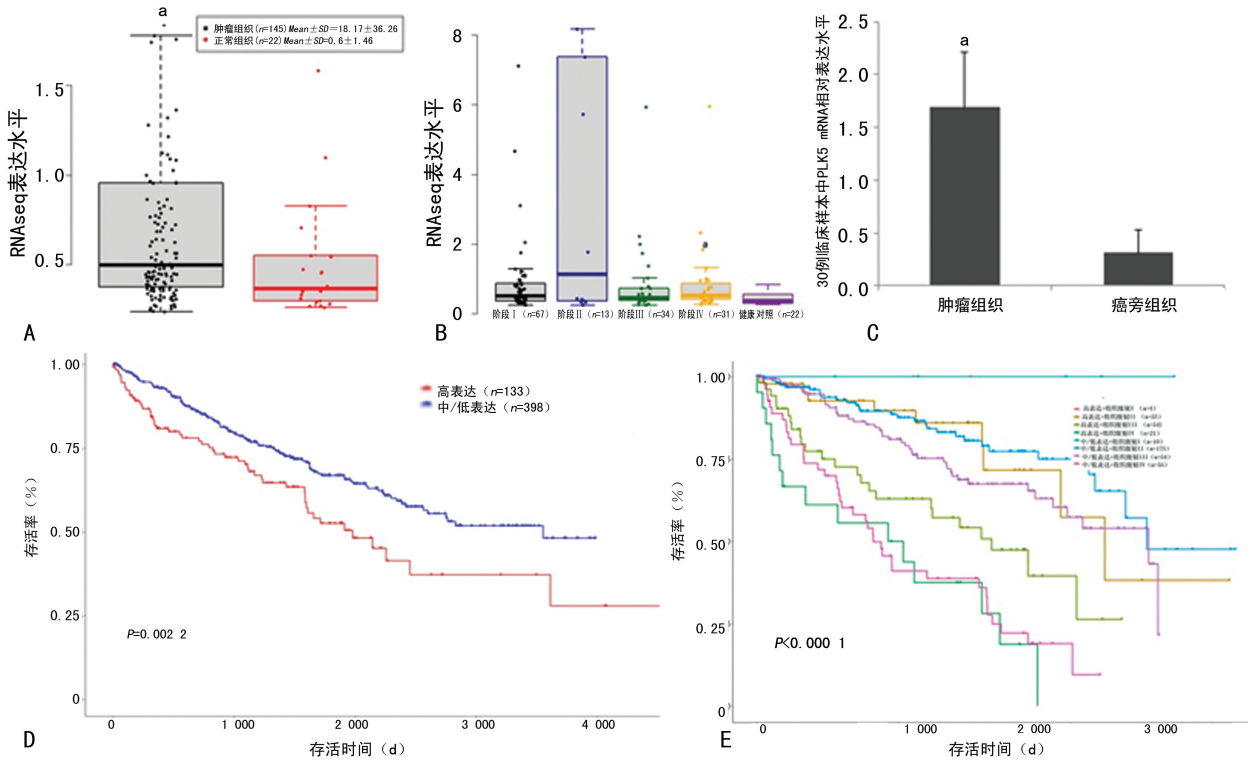
**1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期** OSRC2 细胞经胰酶消化后铺 6 孔板,每孔 2 mL 培养基,生长至 80% 后经胰酶消化收集细胞,加入预冷的 75% 乙醇 4 °C 固定过夜,离心收集细胞,进行流式细胞仪鉴定细胞周期改变。

**1.3 统计学处理** 所有生物信息分析相关数据均来自于癌症基因组数据库(TCGA,网址:<https://portal.gdc.cancer.gov/>),下载和使用均按照相关政策规定。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,蒙特卡洛抽样、*t* 检验和方差检验来比较两组均值差异。计数资料以例数或百分比表示, $\chi^2$  检验比较生存分析数据,细胞周期比较采用单因素方差分析。所有统计分析和画图均使用 R 软件<sup>[7]</sup>完成(<https://www.r-project.org/>)。GSEA 软件<sup>[8]</sup>用来分析 PLK5 介导的信号通路可能参与肾脏透明细胞癌的发生和发展。

## 2 结果

**2.1 PLK5 基因参与肾脏透明细胞癌的进展和预后** 来自癌症数据库 TCGA 的 RNA-seq 表达数据分析表明,肾癌患者 PLK5 蛋白的表达明显高于健康对照组( $n=145$  vs.  $n=22$ , $P<0.01$ ,图 1A);并且这种高表达集中在肾癌的高级阶段(阶段 IV, $n=84$ , $P<0.01$ ,图 1B);来自 30 对肾癌及癌旁组织的临床数据也提示 PLK5 在肾癌患者中高表达( $P<0.01$ ,图 1C);另外,生存分析数据也显示,PLK5 高表达者预后较低表达者差( $P=0.0022$ ,图 1D),特别是在 PLK5 高表达并且病理分级高的患者中生存率明显降低( $P<0.01$ ,图 1E)。

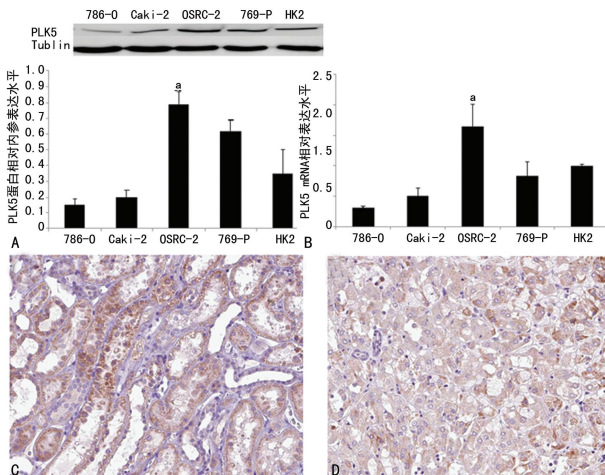
**2.2 PLK5 蛋白在肾癌细胞系和组织中的表达情况** 在 4 种肾癌细胞系(769-P、OSRC2、786-O、Caki-2)和人正常肾脏上皮永生化细胞 HK2 中检测 PLK5 表达情况,结果显示,无论是 Western blot( $P<0.01$ ,图 2A)还是 RT-PCR( $P<0.01$ ,图 2B) 实验均表明



A: PLK5 在癌组织和癌旁组织中的 RNA 测序结果; B: 癌症不同分期 PLK5 的表达水平; C: 收集的临床标本 PLK5 mRNA 表达水平; C: 不同表达水平患者生存曲线; D: 不同表达肿瘤级别患者生存曲线; \*,  $P < 0.01$ , 与癌旁组织/正常组织比较

图 1 PLK5 与肾癌进展和预后的关系

OSRC2 细胞中 PLK5 表达较其他细胞类型高。对临床肾透明细胞癌患者的肿瘤及其癌旁组织的免疫组织化学染色发现, 在肾脏透明细胞癌中 PLK5 主要表达于肾脏远曲小管(图 2C), 且主要定位在细胞核, 表达水平高, 而在癌旁正常组织(图 2D) PLK5 蛋白表达水平低。

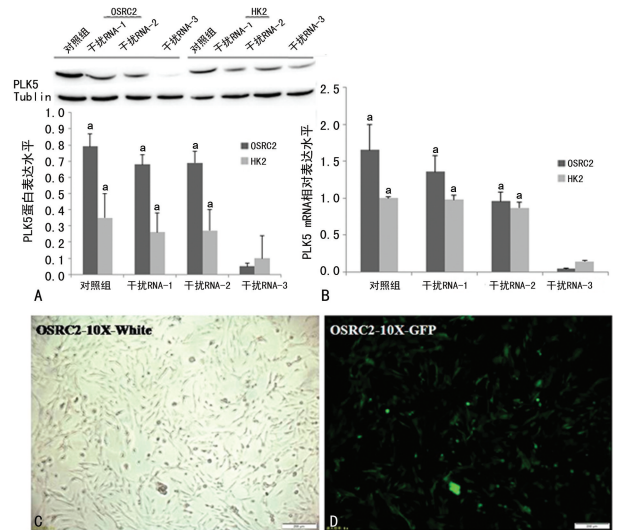


A: Western blot 检测 PLK5 在肾癌细胞系统的表达; B: RT-PCR 检测 PLK5 在肾癌细胞系统的表达; C: 肾脏透明细胞癌组织的免疫组织化学染色; D: 正常肾脏组织免疫组织化学染色; \*,  $P < 0.01$ , 与 HK2 细胞比较

图 2 PLK5 蛋白在肾癌细胞系和组织中的表达

**2.3 RNA 干扰 PLK5 蛋白的效率分析** 构建 3 种 PLK5 干扰病毒, 分别转染肾癌细胞系 OSRC2 和正常肾脏上皮细胞系 HK2, 免疫荧光观察显示慢病毒感

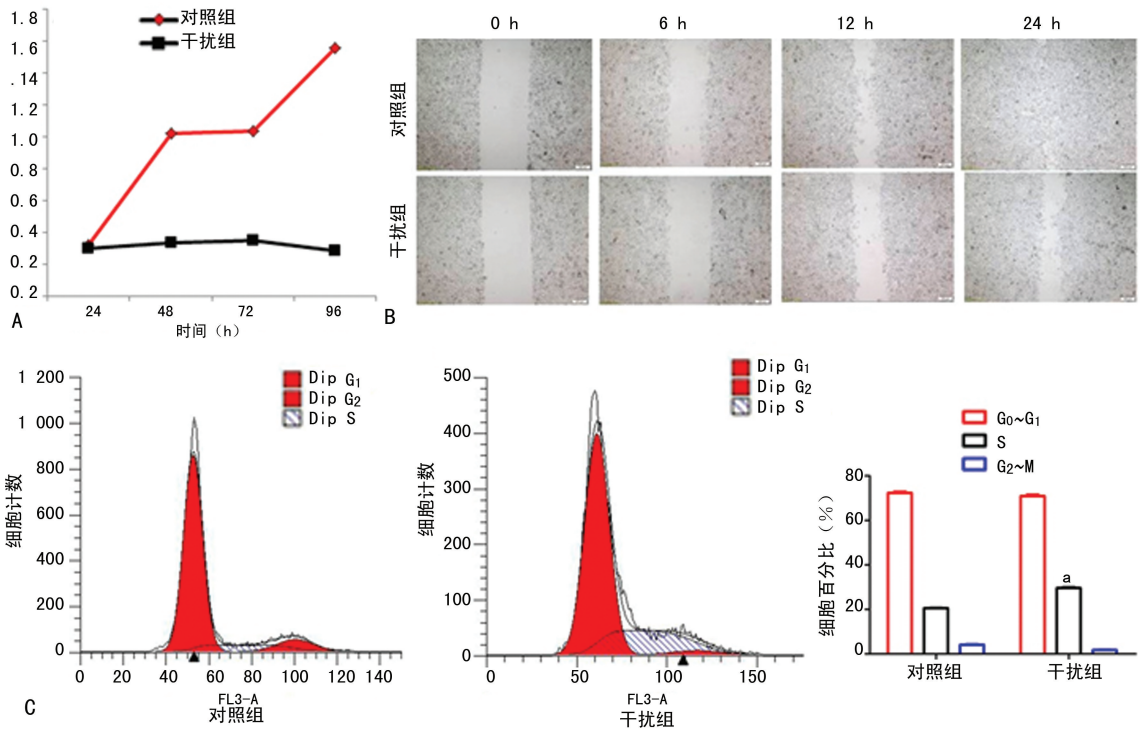
染效率高( $>90\%$ , 图 3C、D)。而结果分析显示, 第 3 种 RNA 干扰标签效果最好, 无论是 RT-PCR( $P < 0.01$ , 图 3A)还是 Western blot( $P < 0.01$ , 图 3B)实验都显示 PLK5 蛋白表达水平低于其他对照组。因此后续研究均以第 3 类干扰 RNA 做分析。



A: Western blot 检测显示 3 种 RNA 干扰效率; B: RT-PCR 检测显示 3 种 RNA 干扰效率; C: OSRC2 肾癌细胞干扰 RNA-3 的白光; D: OSRC2 肾癌细胞干扰 RNA-3 的荧光; \*,  $P < 0.01$ , 与同细胞系干扰 RNA-3 比较

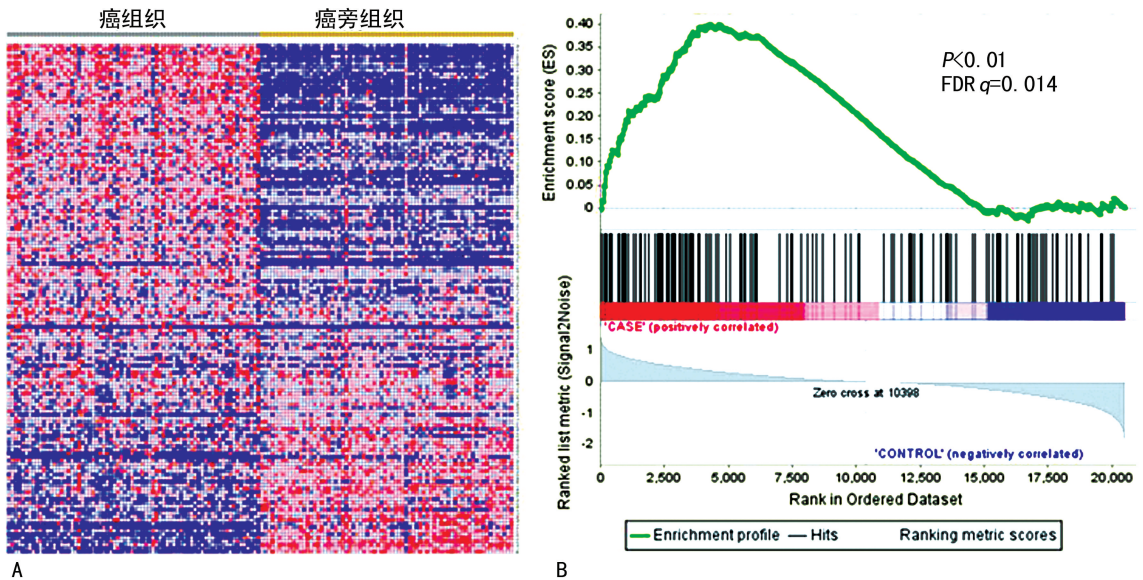
图 3 RNA 干扰 PLK5 蛋白表达的效率分析

**2.4 PLK5 蛋白干扰明显影响肾癌细胞的表型** 分析 PLK5 蛋白干扰以后的细胞表型, CCK8 细胞增殖



A: 干扰组和对照组的 CCK8 增殖实验; B: 干扰组和对照组的细胞划痕实验; C: 干扰组和对照组的细胞周期实验; <sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较

图 4 干扰 PLK5 蛋白表达对肾癌细胞表型的影响



A: 22 对癌组织和癌旁组织基因 RNA-seq 表达热图分析; B: GSEA 分析显示细胞循环通路中大部分基因在癌组织中被激活

图 5 信号通路分析

实验显示, 干扰组较对照组 OSRC2 细胞 48 h 以后增殖明显减慢 ( $P < 0.01$ , 图 4A), 而划痕实验也证实干扰组细胞迁移速度明显减慢, 24 h 测量两组划痕距离有明显差异 ( $P < 0.01$ , 图 4B)。由于干扰后, OSRC2 细胞增殖速度明显减慢, 所以随后检测的细胞周期也发现 hRNA3 组细胞周期阻滞在 S 期 ( $P < 0.01$ , 图 4C)。

**2.5 PLK5 蛋白通过抑制肾癌细胞的细胞周期产生作用** 运用癌症 TCGA 数据库中癌组织和癌旁组织 (22 对) 的 RNA-seq 表达数据, 在软件基因组表达富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 中分析

结果显示, 与 PLK5 相互作用的蛋白 (图 5A) 均参与了肾癌细胞的进展, 这些基因均参与了细胞周期  $G_1$  到 S 期的调控 (图 5B)。明显富集的细胞周期通路为细胞循环 (cell cycle,  $P < 0.01$ ,  $FDR q = 0.014$ )。

### 3 讨论

在当前的研究中, 前期的生物信息学分析发现 PLK5 蛋白在肾脏透明细胞癌患者中表达增加, 尤其表现在肾癌的高级阶段的患者中, 并且生存分析显示 PLK5 基因表达与患者预后密切相关, 高表达患者预后明显较差。在接下来的分子生物学实验中, 作者证实干扰 PLK5 基因表达可以明显干扰细胞周期 S 阶

段,抑制肿瘤细胞增殖和迁移。

淋巴结转移是透明细胞癌最常见的转移方式,检测与转移相关的基因表达对于诊断和干预是非常有价值的<sup>[9]</sup>。尽管许多原发基因突变(如 VHL、PBRM1、SETD2、BAP1 等)可以导致肾癌的发生,但是哪些基因参与肾癌转移仍然未知<sup>[3]</sup>。由于肿瘤巨大的异质性,鉴定转移相关的基因比较困难<sup>[10]</sup>。越来越多的证据显示,PLK5 参与肿瘤细胞的淋巴结转移,PLK5 激酶是哺乳动物体内参与细胞循环的一类最重要的激酶,在小鼠 NIH3T3 细胞内过表达 PLK5 cDNA 可以明显诱导 G<sub>1</sub> 期静止,增加 S 阶段细胞循环,作为肿瘤细胞的抑制子是 G<sub>1</sub>/S 阶段的重要调控蛋白<sup>[5,11]</sup>。PLK5 基因定位在人类染色体 19p13.3,全长 11.4 kb,包含 14 个外显子,以及 PBD1 和 PBD2 两个主要功能域,缺乏激酶活性结构域,与 PLK2 和 PLK3 有极大同源性<sup>[5,12]</sup>。PLK5 蛋白主要定位在细胞核,肿瘤细胞中 PLK5 表达可以抑制 G<sub>1</sub> 期进入 S 阶段,并且诱导氧化应激和 DNA 损伤<sup>[13-14]</sup>。另外,还有研究显示,PLK5 特异的甲基化调控可以在肿瘤患者体内控制 PLK5 表达,促进肿瘤细胞的增殖和迁移<sup>[15-16]</sup>。

本研究在肾脏细胞癌模型中检测 PLK5 蛋白的作用,研究显示 PLK5 蛋白在肿瘤细胞的表达增加可以促进肿瘤细胞增殖和迁移,与肿瘤细胞迁移有很大关联,并且信号通路分析显示,与 PLK5 相互作用的蛋白在肾癌患者中有共同的作用,所有这些研究提示 PLK5 蛋白与肾脏透明细胞癌的进展及预后密切相关。

## 参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Nature*, 2013, 499(7456): 43-49.
- [3] PROTZEL C, MARUSCHKE M, HAKENBERG O W. Epidemiology, aetiology, and pathogenesis of renal cell carcinoma [J]. *EurUrol*, 2012, 11(3): 52-59.
- [4] DE CÁRCER G, MANNING G, MALUMBRES M. From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(14): 2255-2262.
- [5] DE CÁRCER G, ESCOBAR B, HIGUERO A M, et al. Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(6): 1225-1239.
- [6] LI Z J, HAO P, WU Q J, et al. Genetic mutations associated with metastatic clear cell renal cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16172-16179.
- [7] R Core Team. R: a language and environment for statistical computing [EB/OL]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018. [2019-09-20]. <https://www.R-project.org/>.
- [8] SUBRAMANIAN A, KUEHN H, GOULD J, et al. GSEA-P: a desktop application for gene set enrichment analysis [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(23): 3251-3253.
- [9] LJUNGBERG B, BENSALAH K, CANFIELD S, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update [J]. *EurUrol*, 2015, 67(5): 913-924.
- [10] HSIEH J J, PURDUE M P, SIGNORETTI S, et al. Renal cell carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17009.
- [11] SHAKIL S, BAIG M H, TABREZ S, et al. Molecular and enzoinformatics perspectives of targeting polo-like kinase 1 in cancer therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 56: 47-55.
- [12] VAID R, SHARMA N, CHAUHAN S, et al. Functions of polo-like kinases: a journey from yeast to humans [J]. *Protein Pept Lett*, 2016, 23(2): 185-197.
- [13] ANDRYSIK Z, BERNSTEIN W Z, DENG L, et al. The novel mouse Polo-like kinase 5 responds to DNA damage and localizes in the nucleolus [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(9): 2931-2943.
- [14] GOROSHCHUK O, KOLOSENKO I, VIDARSDOTTIR L, et al. Polo-like kinases and acute leukemia [J]. *Oncogene*, 2019, 38(1): 1-16.
- [15] GUIRETTI D, SEMPERE A, Lopez-Atalaya J P, et al. Specific promoter deacetylation of histone H3 is conserved across mouse models of Huntington's disease in the absence of bulk changes [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 89: 190-201.
- [16] LIU X. Targeting polo-like kinases: a promising therapeutic approach for cancer treatment [J]. *Transl Oncol*, 2015, 8(3): 185-195.

(收稿日期: 2019-05-10 修回日期: 2019-08-11)