

胃癌组织 PLK1 的表达及其意义

张庆, 刘南植, 洪玮, 倪志, 李秀梅

张庆, 刘南植, 洪玮, 倪志, 李秀梅, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

通讯作者: 刘南植, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. www95@126.com

电话: 027-83663595

收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-14

Expression of Polo-like kinase 1 and its significance in gastric carcinoma

Qing Zhang, Nan-Zhi Liu, Wei Hong, Zhi Ni, Xiu-Mei Li

Qing Zhang, Nan-Zhi Liu, Wei Hong, Zhi Ni, Xiu-Mei Li, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Nan-Zhi Liu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. www95@126.com

Received: 2005-04-26 Accepted: 2005-05-14

Abstract

AIM: To investigate the expression of Polo-like kinase 1 (PLK1) and its relationship with clinicopathological characteristics, anti-oncogene and tumor proliferation in human gastric carcinoma, and to explore the role of PLK1 in the carcinogenesis and progression of tumor and its clinical significance.

METHODS: The expression of PLK1, P53 and Ki67 was detected in tissues of gastric carcinoma ($n = 54$), atypical hyperplasia ($n = 10$) and normal gastric mucosa ($n = 15$) by immunohistochemical method.

RESULTS: PLK1 was negatively expressed in normal mucosa. Weakly positive staining for PLK1 was observed in 4 out of 11 Atypical hyperplasia tissues. The expression of PLK1 was elevated in 88.9%(48/54) of the gastric carcinoma. There were no significant associations between PLK1 and clinicopathological characteristics such as histological differentiation, distant metastasis and lymph node metastasis ($P > 0.05$). PLK1 expression was significantly related to the depth of invasion ($\chi^2 = 6.775$, $P < 0.01$) and TMN staging ($\chi^2 = 9.009$, $P < 0.01$). In gastric cancer, positive staining for P53 was detected in 38 of 54 cases (70.4%). P53 expression was significantly associated with PLK1 ($\chi^2 = 6.664$, $P < 0.05$). The mean value of Ki67 labelling index (Ki67 LI) was $34.7 \pm 13.4\%$, with a range

of 10.3-60.1%. PLK1 expression was positively associated with Ki67 level ($r = 0.720$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: PLK1 is over-expressed in gastric cancer, and associated with tumor proliferation and anti-oncogene. PLK1 plays an important role in the carcinogenesis and development of gastric carcinoma.

Key Words: Polo-like kinase 1; Gastric carcinoma; P53; Ki67

Zhang Q, Liu NZ, Hong W, Ni Z, Li XM. Expression of Polo-like kinase 1 and its significance in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(13):1499-1502

摘要

目的: 研究 Polo 样激酶 1(Polo-like kinase 1, PLK1)在胃癌中的表达与各临床病理特征、抑癌基因和肿瘤增殖活性的关系, 探讨 PLK1 在胃癌发生发展中的作用以及其临床意义。

方法: 运用免疫组织化学的方法检测正常胃组织 15 例, 非典型增生组织 11 例, 胃癌 54 例中 PLK1, Ki67, P53 的表达。

结果: PLK1 在正常胃组织中表达均为阴性; 11 例非典型增生组织有 4 例弱阳性; 胃癌中有 48 例阳性(88.9%), 其表达与组织分化程度、远处转移和淋巴结转移无关 ($P > 0.05$), 与浸润深度($\chi^2 = 6.775$, $P < 0.01$)和临床分期($\chi^2 = 9.009$, $P < 0.01$)相关。在胃癌中, P53 阳性 38 例(70.4%), PLK1 的表达与 P53 蛋白积聚相关($\chi^2 = 6.664$, $P < 0.05$)。胃癌中 Ki67 标记指数均值为 $34.7 \pm 13.4\%$, 范围为 10.3-60.1%, PLK1 的表达与 Ki67 呈正相关 ($r = 0.720$, $P < 0.01$)。

结论: PLK1 在胃癌中高表达, 与肿瘤的增殖活性和抑癌基因相关, 在胃癌发生发展中起重要作用。

关键词: Polo 样激酶 1; 胃癌; P53; Ki67

张庆, 刘南植, 洪玮, 倪志, 李秀梅. 胃癌组织 PLK1 的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1499-1502
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1499.asp>

0 引言

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], 他参与了细胞周

期中中心体的成熟、纺锤体的形成以及染色体的分离等过程,对细胞的有丝分裂起重要的调控作用.在正常情况下,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)^[2-3].目前已发现PLK1在多种肿瘤中呈异常高表达^[4].为此我们采用免疫组织化学的方法检测PLK1,P53和Ki67在胃癌中的表达,并分析PLK1与各临床病理特征、抑癌基因(P53)和肿瘤增殖活性的相关性,探讨PLK1在人类胃癌发生发展中的作用以及对临床的指导意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2003/2004年华中科技大学同济医学院附属同济医院手术切除的胃癌标本54例,均经病理检查确诊,男33例,女21例,平均年龄52.9岁.按UICC新TMN分期标准分为I期10例,II期17例,III期11例,IV期16例.另非典型增生组织11例和正常胃组织15例(来源于胃镜活检).标本均经40 g/L甲醛固定,常规石蜡包埋,切成3-5 μm 切片.鼠抗人PLK1 mAb购自美国Santa Cruz公司;鼠抗人Ki67 mAb、鼠抗人P53 mAb、AEC显色试剂盒均购自福州迈新公司;SP免疫组化试剂盒和DAB显色试剂盒购自北京中山生物工程有限公司.

1.2 方法 采用免疫组织化学SP法,染色步骤按试剂盒说明进行.用PBS代替一抗作阴性对照,已知阳性切片作阳性对照.PLK1和Ki67采用DAB显色,P53采用AEC显色.阳性结果判断标准:(1)PLK1染色结果判定:胞质或胞核呈棕黄色或棕褐色为阳性,在不同位置取5个高倍视野($\times 400$),记数200个肿瘤细胞/视野,共计1000个,阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为(-);阳性细胞数6-30%为(+);阳性细胞数31-60%之间为(++);阳性细胞数 $>60\%$ 为(+++).(2)Ki67标记指数(Ki67 Labeling Index, Ki67 LI)的测定:胞核呈棕黄色或棕褐色为阳性,每个标本随机选5个高倍镜视野($\times 400$),计数1 000个肿瘤细胞,其中阳性细胞所占百分比即为Ki67 LI.(3)P53阳性判定标准:胞核呈红色为阳性,其中肿瘤细胞着色率 $<10\%$ 为(-),肿瘤细胞着色率 $\geq 10\%$ 为(+).

统计学处理 应用SPSS11.0软件进行统计学处理,根据实验资料要求,选用 χ^2 检验、Fisher精确检验、直线相关分析进行数据分析,以 $P<0.05$ 为差异具有显著性.

2 结果

2.1 PLK1的表达 PLK1表达主要定位于细胞胞质中,为棕黄色或棕褐色,少数胞核中也可有表达.在15例正常胃组织中PLK1均未见明显表达(图1A);11例非典型增生组织中,4例+(36.4%),均为低表达(图1B),7例-.在胃癌组织中PLK1可见明显表达(图1C):54例胃癌中有6例+,30例++,12例+++,6例-,阳性率88.9%,阳性细胞率均值 $40.9 \pm 18.6\%$ (mean \pm SD).则PLK1在胃癌中的表达明显高于正常和非典型增生组织($P<0.05$,表1).

表1 PLK1分别在正常、非典型增生组织和胃癌组织中的表达

诊断	n	-	+	++	+++	阳性数
正常胃组织	15	15	0	0	0	0(0%)
非典型增生	11	7	4	0	0	4(36.4%)
胃癌	54	6	6	30	12	48(88.9%)

2.2 PLK1表达与胃癌临床病理特征的关系 PLK1在胃癌中的表达与组织分化程度、远处转移和淋巴结转移均无关($P>0.05$),而随着临床分期的进展,PLK1的表达增高,各期间的表达率有显著性差异($\chi^2 = 9.009$, $P<0.01$,表2),还与肿瘤的浸润深度相关($\chi^2 = 6.775$, $P<0.01$,表2).

2.3 PLK1表达与P53, Ki67 LI的关系 在胃癌中P53和Ki67均为核表达(图2).P53阳性38例(70.4%),其中PLK1(+)/P53(+)37例,PLK1(+)/P53(-)11例,PLK1(-)/P53(+)1例,PLK1(-)/P53(-)5例,在胃癌中PLK1的表达与P53蛋白积聚显著相关($\chi^2 = 6.664$, $P<0.05$,表2).胃癌中Ki67 LI均值为 $34.7 \pm 13.4\%$ (mean \pm SD),范围为10.3-60.1%,通过相关分析PLK1的表达与Ki67 LI呈正相关($r = 0.720$, $P<0.01$).

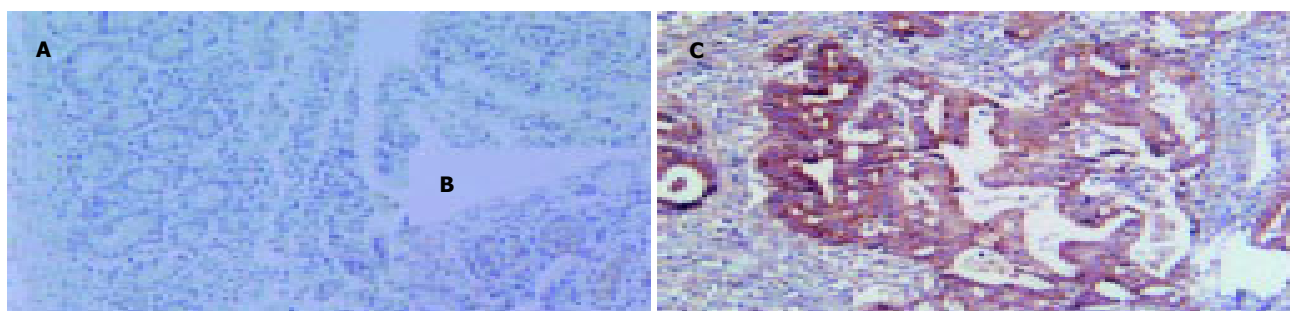


图1 正常、非典型增生组织和胃癌组织PLK1的表达. A: 正常组织未见明显表达($\times 100$, DAB显色); B: 非典型增生组织中可见少数弱阳性($\times 100$, DAB显色); C: 胃癌组织PLK1可见明显表达($\times 200$, DAB显色).

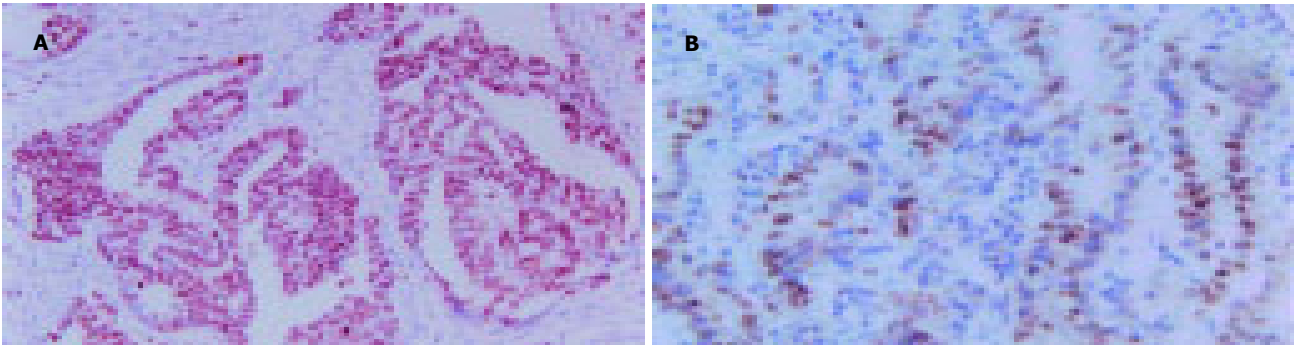


图2 胃癌组织中P53和Ki67的表达. A: P53 阳性表达(× 100, AEC 显色); B: Ki67 阳性表达(× 200, DAB 显色).

表2 PLK1 在胃癌中的表达与各临床病理特征和 P53 的关系

临床特征		n	PLK1	
			阴性	阳性
分化程度	高	5	0	5
	中	10	0	10
	低	39	6	33
临床分期	I	10	4	6 ^b
	II	17	2	15
	III	11	0	11
	IV	16	0	16
浸润深度	T1	11	4	7 ^b
	T2	6	0	6
	T3	24	2	22
	T4	13	0	13
淋巴结转移	有	34	2	30
	无	20	4	18
远处转移	有	15	1	14
	无	39	5	34
P53	阳性	38	1	37 ^b
	阴性	16	5	11
总计		54	6	48

^b*P*<0.01 vs 阴性.

3 讨论

肿瘤的发生和发展是在多种因素的作用下, 包括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作用的归结均在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^[5]. PLK1 在G2晚期M初期参与CDC25C的激活、继而促成Cyclin B/Cdc2的激活, 协助中心体的功能成熟以及纺锤体的形成, 从而促进M期的起始和染色体正常分离分配^[6-8];通过调节APC(anaphase-promoting complex)来决定细胞能否按期离开M期;他在细胞自我保护中也起到着重要作用, 当DNA受损时可引起PLK1 苏氨酸残基磷酸化而使其活性受抑, 从而使细胞阻滞于G2/M期^[9-11];在分裂活跃的组织器官或肿瘤细胞中 PLK1 活性较高.

PLK1 在许多人类肿瘤和细胞系中提示高表达, 如非小细胞肺癌^[12]、头颈部鳞癌^[13]、食管癌、胃癌^[14]、结肠癌^[15]、乳腺癌^[16]、卵巢癌^[17]、子宫内膜癌^[18]、黑色素瘤^[19]、前列腺癌^[20]、非霍奇金淋巴瘤^[21]等. 此外Smith *et al*^[22]报道 PLK1 的过多表达能使NIH3T3 细胞癌基因聚集, 这些细胞能在裸鼠上形成肿瘤. 这些研究表明PLK1可能参与人类肿瘤发生发展. Tokumitsu *et al*^[14]曾从mRNA 水平上对 75 例胃癌 PLK1 的表达进行分析, 高表达为 55 例(73%). 我们从蛋白水平对 PLK1 在正常、非典型增生和胃癌组织进行分析, 正常组织均未见明显表达;非典型增生组织中有 4 例弱阳性(36. 4%), 均为低表达;54 例胃癌中 48 例阳性(88. 9%). 在胃癌中 PLK1 高表达, 明显高于正常和非典型增生性组织;并且PLK1的表达在各临床分期中有着显著性差异, 随临床分期的进展, 表达增高, 还与肿瘤浸润深度相关, 而与组织分化程度、远处转移和淋巴结转移无关. 由此从mRNA 水平和蛋白水平都反映了 PLK1 在胃癌中高表达, 说明 PLK1 在胃癌发生发展上可能起着重要的作用, 在诊断上可作为一个新的肿瘤标志物.

P53 是一种抑癌基因, 对细胞周期的调控和肿瘤的转归起着重要作用^[23]. 据研究表明, PLK1 能抑制P53的转录, 从而影响诱导细胞凋亡的活性, P53可能是 PLK1 的一个作用靶点^[24]. Liu *et al*^[25]在 PLK1 基因敲除细胞中发现 P53 大量聚集, 提示 PLK1 对 P53 的活性有调节作用. 我们在通过突变型P53抗体对胃癌的检测发现, PLK1 (+)/P53(+) 37 例, PLK1 (+)/P53(-) 11 例, PLK1 (-)/P53(+) 1 例, PLK1 (-)/P53(-) 5 例, 在胃癌中 PLK1 的表达与 P53 蛋白积聚明显相关(*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胃癌的发生发展.

在肿瘤诊断中, 肿瘤增殖活性是一个评价肿瘤进展的重要参数. Ki67 是一种细胞增殖核抗原, 存在于G0 期以外的所有细胞周期中, 在有丝分裂后迅速降解或失去抗原决定簇, 因此, 被认为是反映细胞增殖状态的理想标记物, 并且还与肿瘤预后密切相关^[26-27]. 在

我们的实验中,胃癌PLK1的表达与Ki67LI呈正相关($r = 0.720$, $P < 0.01$),表明PLK1可反映胃癌的增殖活性,可能对预后判定也有作用.临床分期和组织分级系统最重要的功能是评价预后和指导治疗,而在我们的实验中PLK1的表达与胃癌临床分期相关.此外许多关于肿瘤PLK1的表达与预后的研究发现^[12-14, 20-21]: PLK1的表达与预后相关,PLK1表达越高预后越差.因此PLK1不仅可反映胃癌的增殖活性,而且可能象非小细胞肺癌、头颈鳞状细胞癌、食管癌、前列腺癌和非霍奇金淋巴瘤等一样对预后判定有着重要意义.

根据PLK1在许多肿瘤中高表达,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PLK1 mRNA的反义寡核苷酸和小干扰RNA(small interference RNA, siRNA),他们能特异性的对PLK1 mRNA及其蛋白产物表现为剂量依赖性的抑制作用,由此也抑制了PLK1的丝氨酸/苏氨酸激酶的活性,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^[28].说明了PLK1可以作为肿瘤治疗的一个靶点,在临床治疗中有着重要的指导作用.综合以上,我们的研究表明PLK1在胃癌中表达明显高于正常和非典型增生组织,其表达与临床分期、浸润深度和肿瘤增殖活性密切相关,与抑癌基因(P53)相互作用,在胃癌的发生发展中可能起着重要作用,在胃癌诊断中可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的指导意义.

4 参考文献

- Donohue PJ, Alberts GF, Guo Y, Winkles JA. Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase. *J Biol Chem* 1995; 270:10351-10357
- Smits VA, Klompmaker R, Arnaud L, Rijksen G, Nigg EA, Medema RH. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol* 2000;2:672-676
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 2003;5:143-148
- Eckerdt F, Yuan J, Strebhardt K. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene* 2005;24:267-276
- Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35:111-115
- Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, Marshall LA. The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal* 2000;12:405-411
- Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* 2002;3:341-348
- Yuan J, Eckerdt F, Bereiter-Hahn J, Kurunci-Csacsko E, Kaufmann M, Strebhardt K. Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* 2002;21:8282-8292
- Kotani S, Tugendreich S, Fujii M, Jorgensen PM, Watanabe N, Hoog C, Hieter P, Todokoro K. PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* 1998;1:371-380
- Sumara I, Vorlaufer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA, Peters JM. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* 2002;9:515-525
- Golan A, Yudkovsky Y, Hershko A. The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem* 2002;277:15552-15557
- Wolf G, Elez R, Doermer A, Holtrich U, Ackermann H, Stutte HJ, Altmannsberger HM, Rubsamen-Waigmann H, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1997;14:543-549
- Knecht R, Elez R, Oechler M, Solbach C, von Ilberg C, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59:2794-2797
- Tokumitsu Y, Mori M, Tanaka S, Akazawa K, Nakano S, Niho Y. Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma. *Int J Oncol* 1999;15:687-692
- Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, Kimura M, Okano Y, Saji S. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci* 2003; 94:148-152
- Wolf G, Hildenbrand R, Schwar C, Grobholz R, Kaufmann M, Stutte HJ, Strebhardt K, Bleyl U. Polo-like kinase: a novel marker of proliferation: correlation with estrogen-receptor expression in human breast cancer. *Pathol Res Pract* 2000;196:753-759
- Weichert W, Denkert C, Schmidt M, Gekeler V, Wolf G, Kobel M, Dietel M, Hauptmann S. Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2004;90:815-821
- Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Polo-like kinase (PLK) expression in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2001;169:41-49
- Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, Wolter M, Binder A, Kaufmann R. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J Cutan Pathol* 2002;29:354-358
- Weichert W, Schmidt M, Gekeler V, Denkert C, Stephan C, Jung K, Loening S, Dietel M, Kristiansen G. Polo-like kinase 1 is overexpressed in prostate cancer and linked to higher tumor grades. *Prostate* 2004;60:240-245
- Mito K, Kashima K, Kikuchi H, Daa T, Nakayama I, Yokoyama S. Expression of Polo-Like Kinase (PLK1) in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2005;46:225-231
- Smith MR, Wilson ML, Hamanaka R, Chase D, Kung H, Longo DL, Ferris DK. Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:397-405
- Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331
- Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279:25549-25561
- Liu X, Erikson RL. Polo-like kinase (Plk) 1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:578
- van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijksen G. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol* 1998;110:24-31
- Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002;40:2-11
- Reagan-Shaw S, Ahmad N. Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: implications for the treatment of prostate cancer. *FASEB J* 2005;19:611-613