

本文引用格式:周杰,李敬东,张立鑫,等.Polo样激酶1在肝细胞肝癌中的作用及临床意义[J].安徽医学,2023,44(10):1173-1179.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.10.006

· 基础医学 ·

Polo样激酶1在肝细胞肝癌中的作用及临床意义

周杰 李敬东 张立鑫 唐涛

[摘要] **目的** 探讨PLK1在肝细胞肝癌中的表达、对肝癌细胞生物学行为的影响及临床转化意义。**方法** 使用TCGA数据库分析PLK1 mRNA在369例肝细胞癌肿瘤患者组织及160例患者癌旁组织中的表达及对无病生存期的影响。提取川北医学院附属医院肝胆外科2019年1~6月收治的30例肝细胞癌患者的肿瘤组织及癌旁组织,应用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测PLK1的mRNA表达水平进行验证。选取HepG2细胞系进行功能实验,分别使用小干扰及GSK461364处理,Western blot实验检测PLK1小干扰RNA敲低效率,检测不同处理肝癌细胞生物学行为变化;流式细胞术检测不同处理细胞周期改变。使用HepG2细胞构建裸鼠皮下成瘤模型,分别给予50 mg/kg GSK461364腹腔注射和等体积生理盐水腹腔注射,20 d后收获皮下肿瘤,进行后续的拍照及免疫组化染色,比较移植瘤体积及Ki-67染色阳性率。提取数据库中患者两年随访资料,同时以PLK1表达中位值为界,将患者分为PLK1高表达组及低表达组,并采用log-rank检验进行生存分析。**结果** TCGA数据库分析结果显示,PLK1在肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织log₂(TPM + 1)值分别为(2.3±7.5)、(0.8±2.7),差异有统计学意义($P < 0.05$)。生存分析显示,PLK1高表达组无病生存期低于PLK1低表达者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。肝癌肿瘤组织标本分析PLK1 mRNA表达结果显示,PLK1在肿瘤组织中的表达为(2.4±1.0)高于癌旁组织(1.3±0.8),差异有统计学意义($P < 0.001$)。使用两条siRNA敲低HepG2细胞中PLK1的表达,敲低效率分别为(71.3±4.8)%、(65.3±5.3)%,细胞增殖、平板克隆形成及细胞周期实验结果显示,与siCtrl组相比,siPLK1-1、siPLK1-2组肝癌细胞HepG2的细胞相对活力明显降低,细胞克隆数减少,HepG2细胞周期阻滞在G₂期,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。使用PLK1特异性小分子抑制剂GSK461364处理HepG2细胞,IC₅₀=25.0 nM,CCK8、平板克隆形成及细胞周期实验结果显示,与DMSO组相比,GSK461364组HepG2的细胞相对活力明显降低,细胞克隆数明显减少,HepG2细胞周期阻滞在G₂期,与小干扰结果一致,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。裸鼠体内成瘤实验结果显示,相对于生理盐水注射组,GSK461364注射组小鼠的移植瘤体积明显减小[(328.3±28.4)mm³比(527.7±26.5)mm³];Ki-67阳性率明显减少,[(52.5±1.9)%比(15.2±1.9)%],差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而体质量无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** PLK1在肝细胞肝癌中高表达,与患者的总体生存率呈负相关,抑制其表达可显著降低肝癌细胞的增殖能力,减慢肝细胞肝癌进展,可作为肝细胞肝癌的潜在治疗靶点。

[关键词] Polo样激酶1;小分子抑制剂;肝细胞肝癌;增殖抑制;诊疗靶点

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.10.006

Polo-like kinase 1 Expression in hepatocellular carcinoma and its effect on cell proliferation

ZHOU Jie, LI Jingdong, ZHANG Lixin, TANG Tao

Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; Hepatobiliary, Pancreatic and Intestinal Diseases Research Institute of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China.

Corresponding author: LI Jingdong, lijingdong358@126.com

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of PLK1 in hepatocellular carcinoma (HCC), its effect on the biological behavior of HCC cells and its clinical transformation significance. **Methods** TCGA database was used to analyze the expression of PLK1 mRNA in 369 patients with hepatocellular carcinoma and 160 patients with paracancerous tissues and its effect on disease-free survival. The tumor tissue and adjacent tissues of 30 patients with hepatocellular carcinoma admitted to our hospital from January 2019 to June 2019 were extracted, and the mRNA expression level of PLK1 was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) for validation. Subsequently, HepG2 cell lines were selected for functional experiments, and treated with small interference and GSK461364 respectively. Western blot was used to detect the knockdown efficiency of PLK1 small interference RNA, and to detect the biological behavior changes of liver cancer cells treated with different treatments; Cell cycle changes were detected by flow cytometry. HepG2 cells were used to construct the subcutaneous tumorigenic model in nude mice, and 50 mg/kg GSK461364 and equal volume of normal saline were injected into the peritoneum

respectively. Subcutaneous tumor was harvested 20 days later, the subcutaneous tumor was harvested, and the follow-up photos and immunohistochemical staining were performed to compare the volume of transplanted tumor and the positive rate of Ki-67 staining. Two years of follow-up data of patients in the database were extracted. At the same time, patients were divided into PLK1 high expression group and low expression group by taking the median value of PLK1 expression as the boundary, and survival analysis was performed by log-rank test. **Results** The results of TCGA database analysis showed that PLK1 expression in liver cancer tissue was significantly higher than that in adjacent tissues [the value of $\log_2(\text{TPM}+1)$ was (2.3 ± 7.5) and (0.8 ± 2.7) , respectively, $P < 0.05$], and the difference was statistically significant. The survival analysis showed that the disease-free survival of patients with high expression of PLK1 was significantly lower than those with low expression of PLK1 ($P < 0.05$). The analysis of PLK1 mRNA expression in liver cancer tissue samples showed that the expression of PLK1 in tumor tissue was (2.4 ± 1.0) , significantly higher than that in paracancerous tissue (1.3 ± 0.8) , and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Using two siRNAs to knock down the expression of PLK1 in HepG2 cells, the knockdown efficiency was $(71.3 \pm 4.8)\%$ and $(65.3 \pm 5.3)\%$, respectively. The results of cell proliferation, plate cloning and cell cycle experiments showed that compared with the siCtrl group, the relative viability of HepG2 cells in the siPLK1-1 and siPLK1-2 groups was significantly reduced, the number of cell clones was significantly reduced, and the cell cycle of HepG2 cells was blocked in G2 phase, all with statistically significant differences ($P < 0.001$). HepG2 cells were treated with PLK1-specific small molecule inhibitor GSK461364. The results of $\text{IC}_{50}=25.0$ nM, CCK8, plate cloning and cell cycle experiment showed that the relative activity of HepG2 cells in GSK461364 group was significantly lower than that in DMSO group, the number of cell clones was significantly reduced, and the cell cycle of HepG2 was blocked in G2 phase, which were consistent with the results of small interference, and all the difference was statistically significant. The results of tumorigenesis experiment in nude mice showed that compared with the saline injection group, the transplanted tumor volume of GSK461364 injection group was significantly reduced [$(328.3 \pm 28.4) \text{ mm}^3$ vs $(527.7 \pm 26.5) \text{ mm}^3$, $P < 0.001$], the positive rate of Ki-67 was significantly reduced, [$(52.5 \pm 1.9)\%$ vs $(15.2 \pm 1.9)\%$, $P < 0.001$], and the difference was statistically significant. There was no significant difference in body mass ($P > 0.05$). **Conclusion** The high expression of PLK1 in hepatocellular carcinoma is negatively correlated with the overall survival rate of patients. Inhibition of PLK1 expression can significantly reduce the proliferative capacity of hepatocellular carcinoma cells, slow down the progression of hepatocellular carcinoma, and can be a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma.

[**Key words**] Polo-like kinase 1; Small molecule inhibitor; Hepatocellular carcinoma; Proliferation inhibition; Clinical target

据2018年全球癌症统计数据^[1]显示,原发性肝癌发病率占所有癌症发病率的第六位,由于其复杂性、异质性、转移快,手术切除后易复发等特点占据癌症死因的第四位。原发性肝癌包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝内胆管癌以及其他罕见类型,其中HCC占75%~85%。目前,FDA批准的治疗HCC的小分子多靶点药物主要有索拉非尼和仑伐替尼^[2],但两种靶向药物在临床应用过程中均会出现耐药现象,亟须找到新的治疗靶点,为HCC的序贯治疗提供更多的选择,延长患者生存期。Polo样激酶1(Polo-like kinase 1, PLK1)属于Polo样激酶家族,多项研究证明,PLK1在肝细胞肝癌的恶性转化、进展中起重要作用,并提出将其作为有潜力的治疗靶点^[3-5]。本研究旨在探讨PLK1在肝癌细胞中的表达及其影响肝癌进展的作用途径,并验证其小分子抑制剂GSK461364对肝细胞肝癌的有效性,以期找到有效的肝细胞肝癌的诊疗靶点。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞 HepG2细胞购买自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),且已进行

短串联重复序列(Short Tandem Repeat, STR)鉴定,传代次数20代以内。使用癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas)数据库分析PLK1在中mRNA的表达,从癌症基因组图谱(the Cancer genome atlas, TCGA)数据集(<https://portal.gdc.com>)获得的RNAseq数据和相应的临床病理信息,包括肝癌患者肿瘤组织数据(369例)及肝癌患者癌旁组织数据(160例),分析PLK1在癌及癌旁组织样本的基因表达差异及PLK1表达对肝癌患者生存的影响。

1.1.2 组织 随机选取2019年1~6月在川北医学院附属医院肝胆外一科接受手术治疗的肝癌患者30例为研究对象,包括男性21例,女性9例,年龄23~82岁,平均 (53.1 ± 17.0) 岁。纳入标准:肿瘤最大直径 >2 cm,术后石蜡病理结果确诊为肝细胞肝癌。排除标准:术前接受过抗肿瘤药物新辅助治疗者;存在活动性自身免疫病者;严重肝肾功能障碍者(包括肝肾功能衰竭、感染者)。术中留取大小约 0.5 cm^3 的肿瘤及癌旁组织,储存于液氮中。新鲜组织标本的获取经过川北医学院附属医院伦理委员会批准[伦理号:2019ER(A)067],且于术前获得患者知情同意并签字。

1.1.3 试剂及抑制剂 RPMI 1640培养基、1%左旋-谷氨酰胺(L-glutamine, L-Gln)、1%非必需氨基酸(

non-essential amino acids, NEAA)、1% 双抗(链霉素-青霉素, Penicillin-Streptomycin Solution, P-S)购自美国 Gibco, 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)及实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒购自 Takara, GSK461364 购自美国 Selleck, PLK1 抗体、GAPDH 抗体、Ki-67 抗体购自 CST, 二抗、细胞裂解液、DAB 染色液、苏木素、过氧化氢、山羊血清购自碧云天, 小干扰 RNA 购自美国 sigma, CCK8 试剂盒购自日本同仁, 细胞周期试剂盒购自美国 BD, Trizol 购自美国 Invitrogen。

1.2 方法

1.2.1 细胞及培养人肝癌细胞 HepG2 购自 ATCC 细胞库, 并经过了短串联重复序列(short tandem repeat, STR)鉴定。培养基配制: 90% RPMI 1640 培养基、10% 胎牛血清、1% L-Gln、1% NEAA、1% P-S, 将 HepG2 细胞置于含有 5% CO₂ 的 37°C 培养箱中。

1.2.2 组织及细胞 RNA 的提取 购买的 HepG2 细胞使用 0.25% EDTA 胰酶消化贴壁细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 使用预冷 PBS 清洗 3 遍后, 加入 1 mL Trizol/10⁶ 个细胞, 室温静置 10 min, 加入 1/5 体积氯仿, 充分震荡后静置 5 min 分层, 12 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上层水相后加入等体积预冷异丙醇, 温和混匀室温静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇清洗沉淀, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 生物安全柜中晾干, 加入 20~30 μL RNase-free 水, 充分溶解后于 -20°C 冰箱储存。分别取 100 mg 癌及癌旁组织使用预冷 PBS 反复清洗, 去除组织中的血细胞, 吸水纸吸干后置于研钵中, 加入液氮, 充分研磨至无小块, 加入 1 mL Trizol 静置 10 min, 后续步骤同细胞 RNA 提取。

1.2.3 细胞蛋白的提取 使用 0.25% EDTA 胰酶消化 HepG2 细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 使用预冷 PBS 清洗 3 遍后, 加入 300 μL 细胞中度裂解液/10⁶ 个细胞, 冰上裂解 30 min 后, 12 000 r/min 离心 15 min 取上清, 使用 BCA 法测定蛋白浓度后, 加入蛋白 loading 于金属浴 95°C 变性 10 min 后, 置于 -20°C 冰箱待用。

1.2.4 RT-PCR 冰上配置 RT-PCR 体系: 5×Prime Script RT mix 2 μL、total RNA 500 ng、RNase-free 水定容至 10 μL。反应条件: 37°C 15 min、85°C 5 s、4°C 保存。

1.2.5 qRT-PCR 冰上配置 qRT-PCR 体系: Super-Real PreMix Plus (2X) 10 μL、上/下游引物 (10 μM) 0.6 μL、cDNA 200 ng、RNase-free 水定容至 20 μL。反应条件: 95°C 5 min、(95°C 10 s、63°C 5 s、72°C 1 min) 39

cycles、4°C 保存。见表 1。

表1 PLK1和β-Actin引物序列

	上游引物	5'-CACCAGCACGTCGTAGGATTC-3'
PLK1	下游引物	5'-CCGTAGGTAGTATCGGGCCTC-3'
β-Actin	上游引物	5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'
	下游引物	5'-GCTGTCACCTTCACCGTCC-3'

1.2.6 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 瞬时转染 将贴壁培养的 HepG2 细胞消化离心后接种到 6 孔板中, 每组接种 10⁵ 个细胞, 待细胞贴壁后, 更换无血清培养基饥饿 2 h, 配置转染试剂: ① 5 μL siRNA (20 μM) + 125 μL 无血清培养基; ② 5 μL Lipofectamine 2000 + 125 μL 无血清培养基, 静置 5 min 后将 ①② 体系柔和混匀, 静置 20 min 后加入 6 孔板中, 4~6 h 更换为完全培养基。

siRNA 序列, siPLK1-1 正义链 5'-GAAGAAGAUCACCCUCCUUA-3', 反义链 5'-UAAGGAGGGUGAUCUUCUUC-3'; siPLK1-2: 正义链 5'-UGAAGAAGAUCACCCUCCUUA-3', 反义链 5'-UAAGGAGGGUGAUCUUCUUC-3'。

1.2.7 Western blot 检测蛋白表达 将提取并变性的细胞裂解液样品加到 10% 电泳预制胶上样孔中, 定压 70 V, 电泳 30 min 后将电压调至 120 V, 电泳 1 h。然后将蛋白定流 300 mA 1 h 转移聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 上。将膜在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。封闭后, 分别将裁剪后的膜与兔抗人 PLK1 抗体 (1:1 000) 及兔抗人 GAPDH 抗体 (1:1 000) 在 4°C 下孵育 12 h, 然后与山羊兔 IgG 抗体 (1:4 000) 在室温下孵育 1 h。使用 ECL plus 系统检测反应, 用 Quantity One 软件 (Bio-Rad) 分析印迹。

1.2.8 CCK8 实验及药物半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 检测 将 siRNA 或药物预处理的 HepG2 细胞接种到 96 孔板中, 每组设置三个复孔, 孵育 6 h 以允许表面粘附。每孔加入 10 μL CCK8 孵育 2 h 后检测 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 吸光度评估生存力。测定 IC₅₀ 每孔接种 5 000 个细胞, 细胞增殖实验, 每孔接种 1 000 个细胞。

1.2.9 平板克隆实验检测细胞增殖 将 siRNA 或药物预处理的 HepG2 细胞接种到 6 孔板中, 每组接种 1 000 个细胞, 设置 3 个复孔, 14 d 后收获细胞, 使用预冷 PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫染色后拍照并计数。

1.2.10 细胞周期检测 将 siRNA 或药物预处理的

HepG2 细胞接种到 6 孔板中, 24 h 后用胰酶收获细胞至流式管, 预冷 PBS 清洗细胞三遍, 在每个流式管中加入 500 μ L PBS 含 5 μ g/mL 碘化丙啶、100 μ g/mL RNAseA、0.2% TritonX-100, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 24 h 内上流式机检测。

1.2.11 动物模型的构建 使用 HepG2 细胞构建裸鼠皮下成瘤模型, 每只裸鼠注射 5×10^5 个细胞, 于 SPF 级环境下喂养 2 周后, 肿瘤体积生长至为 0.5×0.5 cm² 时, 按照裸鼠体质量大小进行编号排序分为 3 组, 每组采取随机分配法分别纳入生理盐水注射组及 GSK461364 注射组, 每组 3 只, 分别给予生理盐水腹腔注射, 及 50 mg/kg GSK461364 腹腔注射, 注射频率为 4 天一次, 同时每隔 4 天测量一次肿瘤大小及小鼠体质量, 20 d 后收获皮下肿瘤。

1.2.12 免疫组织化学染色 解剖动物肿瘤组织使用生理盐水反复清洗, 浸入 10% 的福尔马林固定 12~24 h 后进行包埋切片。组织切片于 70 $^{\circ}$ C 烤箱中融蜡 2 h, 分别在二甲苯 I、II、III 溶液中浸泡 30 min, 无水乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇中浸泡 5 min 脱蜡, 使用枸橼酸盐进行高压修复后, 山羊血清 10 min 及 3% 的过氧化氢 30 min 封闭后, 孵育 Ki-67 一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。转天孵育二抗后进行 DAB 染色、苏木素复染及梯度乙醇和二甲苯脱水处理后, 晾干封片, 于显微镜下观察、拍照。

1.3 分组情况 ①小干扰处理 HepG2 细胞分为 siCtrl 组、siPLK1-1 组、siPLK1-2 组; ②小分子抑制剂处理 HepG2 细胞分为 DMSO 组、GSK461364 组; ③动物体内实验分为生理盐水注射组、GSK461364 注射组。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 进行数据整理与分析, 计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异进行独立样本 *t* 检验, 多组间两两比较进行 ANOVA 单因素方差分析; 不符合正态分布的计量资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 采用 Mann-Whitney *U* 检验; 计数资料以例或率表示, 采用 χ^2 检验, 根据 TCGA 数据库对患者的无病生存期 (disease free survival, DFS) 进行 log-rank 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLK1 在肝癌中的表达及临床意义 使用 TCGA (The Cancer Genome Atlas) 数据库分析 PLK1 在肝癌组织 (369 例) 及癌旁组织 (160 例) 中 mRNA 的表达, 结果显示, PLK1 在肝癌中的表达水平明显高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。生存分析显示, PLK1 高表达者 (以基因表达的中位数为表达分界阈值) 的 DFS 明显低于 PLK1 低表达者 ($P < 0.05$)。为进一步

验证, 提取我院 30 例肝细胞肝癌患者的肿瘤组织及癌旁组织分析 PLK1 mRNA 表达, 结果显示, PLK1 在肿瘤组织的表达明显高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见表 2、图 1。

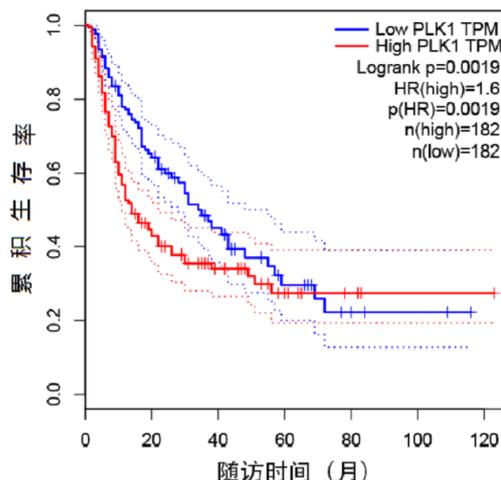


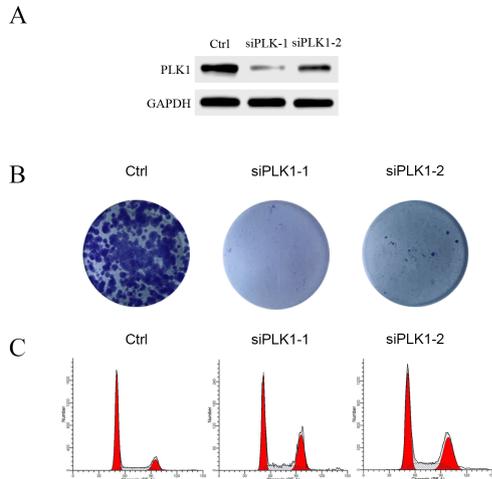
图1 PLK1 表达与肝细胞肝癌患者预后的生存分析

表2 PLK1 在 TCGA 数据库及临床样本肝癌中的 mRNA 表达差异

组别	样本量	TCGA 数据库	临床样本
肝癌组织	369/30	2.3(1.3, 3.3)	2.4 \pm 1.0
癌旁组织	160/30	0.8(0.7, 1.4)	1.3 \pm 0.8
Z/t 值		2.456	4.685
P 值		0.007	<0.001

2.2 3 组 siRNA 敲低 HepG2 细胞增殖情况比较 使用 siRNA 敲低 HepG2 细胞中 PLK1 的表达, 结果显示两对 siRNA 对 PLK1 的敲低效率分别为 (71.3 \pm 4.8)%、(65.3 \pm 5.3)% [与对照组相比, 相对灰度值分别为 (0.2 \pm 0.2) 比 (1.0 \pm 0.2), $t_1=14.752$, $P < 0.001$; (0.4 \pm 0.2) 比 (1.0 \pm 0.2), $t_2=9.771$, $P < 0.001$] (图 2A), 与 siCtrl 组相比, siPLK1-1、siPLK1-2 组肝癌细胞 HepG2 增殖能力明显降低 [CCK8 实验中 96 h 的细胞相对活力为 [(4.4 \pm 0.2) 比 (9.8 \pm 0.2), $t_1=33.068$, $P < 0.001$; (4.8 \pm 0.2) 比 (9.8 \pm 0.2), $t_2=30.619$, $P < 0.001$]。平板克隆实验中细胞克隆数差异有统计学意义为 [(20.8 \pm 4.3) 比 (201.5 \pm 8.9), $t_1=31.664$, $P < 0.001$; (28.6 \pm 5.0) 比 (201.5 \pm 8.9), $t_2=29.336$, $P < 0.001$] (图 2B) 周期实验结果显示, 与 siCtrl 组相比, siPLK1 组的 HepG2 细胞周期阻滞在 G2 期 [细胞 G2 期比例为 (37.2 \pm 1.7)% 比 (13.6 \pm 1.2)%, $t_1=19.644$, $P < 0.001$; (36.5 \pm 1.9)% 比 (13.6 \pm 1.21)%, $t_2=17.001$, $P < 0.001$] (图 2C)。见表 3。

2.3 DMSO 组与 GSK461364 组肝癌细胞增殖情况比



注:A. WB实验检测 siRNA 敲低 PLK1 效率;B. 克隆形成实验检测敲低 PLK1 对 HepG2 细胞集落形成能力的影响;C. 流式细胞学检测敲低 PLK1 对 HepG2 细胞周期的影响。

图 2 siRNA 敲低 PLK1 抑制肝癌细胞增殖

表 3 敲低 PLK1 对肝癌细胞的增殖抑制作用比较

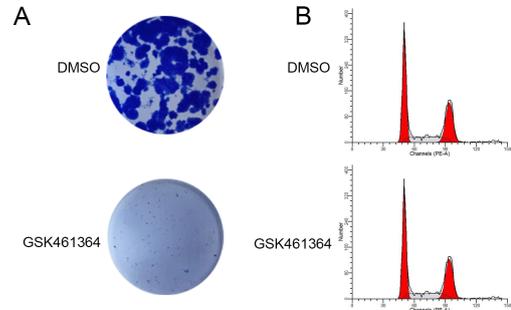
组别	孔数	CCK8 实验	平板克隆实验	细胞周期 G2 期 (%)
siCtrl 组	3	9.8±0.2	201.5±8.9	13.6±1.2
siPLK1-1	3	4.4±0.2	20.8±4.3	37.2±1.7
siPLK1-2	3	4.8±0.1	28.6±5.0	36.5±2.0
F 值		84.847	124.658	72.873
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

较 随后使用 PLK1 特异性小分子抑制剂 GSK461364 处理 HepG2 细胞,测定 IC₅₀=24.960 nM,选用 25 nM 浓度,分别进行 CCK8、平板克隆及细胞周期实验,结果显示,与 DMSO 组相比,GSK461364 组细胞相对活力明显降低($P<0.001$)。细胞克隆数明显减少,差异有统计学意义($P<0.001$)(图 3A),细胞周期阻滞在 G2 期,与 siRNA 处理后实验结果一致,差异有统计学意义($P<0.001$)(图 3B),GSK461364 可有效抑制肝癌细胞系 HepG2 的增殖,差异有统计学意义。见表 4。

2.4 生理盐水注射组与 GSK461364 注射组抑制 HepG2 移植瘤增殖情况比较 使用 HepG2 细胞构建裸鼠皮下成瘤模型进行体内给药处理,结果显示相对于生理盐水注射组,GSK461364 注射组的肝癌生长速度明显减慢($P<0.001$);Ki-67 染色阳性率明显降低($P<0.001$)。见图 4、表 5。

3 讨论

HCC 患者就诊时通常已处于晚期阶段,死亡率极高,是癌症相关死亡率的第二大诱因^[6-8]。癌细胞的

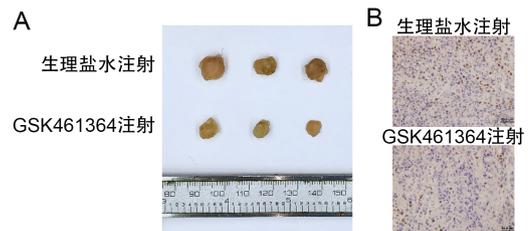


注:A. 克隆形成实验检测 GSK461364 对 HepG2 细胞集落形成能力的影响;B. 流式细胞学检测 GSK461364 对 HepG2 细胞周期的影响。

图 3 PLK1 小分子抑制剂 GSK461364 抑制肝癌细胞增殖

表 4 GSK461364 抑制肝癌细胞增殖能力情况

组别	孔数	CCK8 实验	平板克隆实验	细胞周期 G2 期 (%)
DSMO 组	3	10.4±0.2	150.2±8.3	14.0±1.2
GSK461364 组	3	5.6±0.2	30.0±3.7	35.2±1.5
t 值		29.394	22.910	19.115
P 值		<0.001	<0.001	<0.001



注:A. 两组小鼠皮下移植瘤生长情况;B. 免疫组织化学染色检测两组不同处理动物 ki-67 表达情况。放大倍数 200 倍。

图 4 PLK1 小分子抑制剂 GSK461364 在动物体内抑制肝细胞肝癌进展

表 5 GSK461364 在动物体内抑制肝细胞肝癌进展能力情况

组别	裸鼠数量	第 20 天肿瘤体积(mm ³)	Ki-67 染色阳性率 (%)
生理盐水组	3	527.7±26.5	52.5±1.9
GSK461364 组	3	328.3±28.4	15.2±1.9
t 值		8.891	24.043
P 值		<0.001	<0.001

恶性增殖受多种信号通路的调控,靶向癌细胞不可控制的有丝分裂过程关键成分是抑制其进展最重要的治疗方法之一,尤其是靶向关键有丝分裂激酶的新型抗有丝分裂剂的开发,具有抗击 HCC 的巨大潜力^[9]。PLK1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,广泛存在于真核细胞

中,已被确定是细胞周期进程,尤其是有丝分裂的关键调节剂,在细胞周期调控中起着关键作用,被认为是HCC中有希望的靶标。

作为PLK家族的成员,PLK1蛋白主要分为三个功能不同的结构域:高度保守的N末端激酶催化结构域(APT结合区和T-loop区),C末端 polo-box 结构域以及中间的连接区域。PLK1蛋白可以通过 polo-box 结构域与某些蛋白的磷酸肽结合。在正常情况下, polo-box 结构域总是与N末端激酶结构域结合,以抑制激酶中T210的磷酸化,从而抑制PLK1的激酶活性。当 polo-box 结构域与不同的磷酸肽相互作用而募集到特定的细胞位置时,其激酶结构域被释放,PLK1被激活,磷酸化不同的蛋白质或同一蛋白质的不同位点^[10],调节发育、细胞有丝分裂及DNA损伤应答等过程。PLK1在多种类型的肿瘤细胞中异常表达^[11-14],并且PLK1水平升高与肿瘤发生和不良的临床预后密切相关。多项研究显示,PLK1的过表达与转移性HCC疾病和HCC预后不良有关^[5, 15-17]。本项研究中,在大多数HCC患者中发现了PLK1基因的过表达,这表明PLK1可能在HCC的肿瘤发生中起作用;生存分析显示,PLK1的高表达与更低的HCC总体生存率相关,表明PLK1同时可能在HCC的发展中起重要作用,是HCC诊断及预后的潜在靶点之一。另一方面本研究体外CCK8、平板克隆结果显示,敲低PLK1蛋白表达,HepG2细胞增殖速度明显减慢。PLK1在细胞周期的G2期后期被激活,是进入有丝分裂所必需的^[18],本研究流式细胞学结果显示,敲低PLK1后,细胞周期阻滞在G2/M期,验证了PLK1可促进肝癌细胞增殖。因此,PLK1可被认为是HCC潜在治疗靶点之一。

GSK461364是可逆的ATP竞争性的PLK1选择性抑制剂,对PLK1的选择性比对PLK2和PLK3的选择性高至少390倍,抑制PLK1会导致细胞中有丝分裂延迟,有丝分裂异常退出和p53活化,相对其他抑制剂治疗时产生的毒性相关副作用更少,在乳腺癌、神经系统肿瘤等多种肿瘤中已得到应用^[19-20]。本研究体外使用PLK1小分子抑制剂GSK461364处理HepG2细胞,检测药物IC₅₀=24.96 nM,表明肝癌细胞对GSK461364具有较高的敏感性,低剂量即可产生明显的抑制作用,CCK8、平板克隆结果显示,GSK461364可有效抑制HCC细胞增殖,诱导细胞发生G2/M阻滞,抑制肝癌进展。本研究证明PLK1在肝细胞肝癌中的促癌作用,将其预测为治疗的潜在靶点,但存在一定的局限性。首先,目前对于PLK1在肝细胞肝癌中表达升高的调控机制,以及PLK1诱导肝细胞肝癌进展的下游通路仍无明确报道,有待进一步寻找并验证。其次,

GSK461364目前仅完成了淋巴瘤的临床试验,在肝癌中的大规模临床试验仍未开展,但本研究中的体内给药疗效为该肝细胞肝癌恶性进展相关靶点抑制剂的临床转化提供了良好的实验室基础。

综上所述,PLK1在大多数肝癌患者中高表达,与肝癌的发生、发展及不良预后密切相关,是潜在的诊疗靶点,其小分子抑制剂GSK461364在动物体内的应用可有效降低肝细胞肝癌的恶性程度,抑制肿瘤进展,可作为有效的治疗策略之一,具有良好的临床转化前景。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] SUN Y, MA W, YANG Y, et al. Cancer nanotechnology: enhancing tumor cell response to chemotherapy for hepatocellular carcinoma therapy[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2019, 14(6): 581-594.
- [3] DIAB A, FOCA A, FUSIL F, et al. Polo-like-kinase 1 is a proviral host factor for hepatitis B virus replication[J]. *Hepatology*, 2017, 66(6):1750-1765.
- [4] MOK W C, WASSER S, TAN T, et al. Polo-like kinase 1, a new therapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(27): 3527-3536.
- [5] SUN W, SU Q, CAO X, et al. High expression of polo-like kinase 1 is associated with early development of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Genomics*, 2014, 2014:312130.
- [6] 孙可欣,郑荣寿,张思维,等.2015年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2019,28(1):1-11.
- [7] 王捷,陈茄威,郑国荣,等.肝癌外科治疗的演变与发展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 10(36): 2161-2166.
- [8] LI L, HUANG K, ZHAO H, et al. CDK1-PLK1/SGOL2/ANLN pathway mediating abnormal cell division in cell cycle may be a critical process in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(10): 1236-1252.
- [9] DENG Z, CHEN G, LIU S, et al. Discovery of methyl 3-((2-((1-(dimethylglycyl)-5-methoxyindolin-6-yl)amino)-5-(trifluoro-methyl)pyrimidin-4-yl)amino)thiophene-2-carboxylate as a potent and selective polo-like kinase 1 (PLK1) inhibitor for combating hepatocellular carcinoma[J]. *Eur J Med Chem*, 2020(206):112697.
- [10] LIU Z, SUN Q, WANG X. PLK1, A potential target for cancer therapy[J]. *Transl Oncol*, 2017, 10(1):22-32.
- [11] 武佳琦,杨英. Polo样蛋白激酶1与乳腺癌发生、发展及治疗的相关性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(4): 462-465.
- [12] 乔国梁,郭敛容,方黎.抑制Polo样激酶1对鼻咽癌细胞

- CNE-1 和 CNE-2 辐射敏感性的影响[J]. 中国实用医药, 2018,13(19):194-195.
- [13] GAO W, ZHANG Y L, LUO H J. Targeting SKA3 suppresses the proliferation and chemoresistance of laryngeal squamous cell carcinoma via impairing PLK1-AKT axis-mediated glycolysis[J]. *Cell Death Dis*, 2020,11(10):919.
- [14] ZENG Y, LI N H, LIU W. Analyses of expressions and prognostic values of Polo-like kinases in non-small cell lung cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020,146(10):2447-2460.
- [15] STUDACH L L, RAKOTOMALALA L, WANG W H, et al. Polo-like kinase 1 inhibition suppresses hepatitis B virus X protein-induced transformation in an in vitro model of liver cancer progression[J]. *Hepatology*, 2009, 50(2): 414-23.
- [16] LI H Y, LUO F, LI X Y, et al. Inhibition of polo-like kinase 1 by bi2536 reverses the multidrug resistance of human hepatoma cells in vitro and in vivo[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, 19(6): 740-749.
- [17] LIN P, WEN D Y, DANG Y W, et al. Comprehensive and Integrative analysis reveals the diagnostic, clinicopathological and prognostic significance of Polo-Like kinase 1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(3): 925-947.
- [18] LI Y, ZHAO Z G, LUO Y, et al. Dual targeting of Polo-like kinase 1 and baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 in TP53-mutated hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(32): 4786-4801.
- [19] GIORDANO A, LIU Y, ARMESON K, et al. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibition synergizes with taxanes in triple negative breast cancer[J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0224420.
- [20] SMITH L, FARZAN R, ALI S, et al. The responses of cancer cells to PLK1 inhibitors reveal a novel protective role for p53 in maintaining centrosome separation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16115.

(2022-04-18收稿)
(本文编校:崔月婷,张迪)