

RNA 干涉介导的 Plk1 沉默对乳腺癌细胞恶性生物表型的影响

耿怀成¹ 王冰蝉²

(1 南京军区南京总医院肿瘤内科 江苏 南京 210002 2 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科 陕西 西安 710061)

摘要 目的：研究乳腺癌细胞中丝/苏氨酸蛋白激酶 Plk1 基因表达下调后对其恶性生物表型的影响。方法：利用 pSilencer4.1-CMVneo 质粒，分别构建针对 Plk1 基因的 RNA 干涉载体 (pSilencer4.1-shPlk1)，利用脂质体 Lipofectamine2000 转染 MCF-7 细胞，G418 筛选稳定的转染细胞系。半定量 RT-PCR 和 Western blot 分别检测 Plk1 基因 mRNA 和蛋白表达，MTT 和克隆形成试验检测细胞增殖活性的变化，流式细胞仪分析细胞周期和凋亡的变化，最后分析 MCF-7 细胞对紫杉类药物(紫杉醇和多西他赛)化疗敏感性的变化。结果：成功筛选了稳定转染细胞系 (MCF-7/shPlk1 和 MCF-7/shcontrol)。同 MCF-7/shPlk1 细胞相比，MCF-7/shPlk1 细胞中 Plk1 基因 mRNA 和蛋白表达水平分别下调 65.8%和 74.4% ($P<0.05$)。同 MCF-7/shcontrol，MCF-7/shPlk1 细胞增殖速度显著抑制，到第 5 天时抑制率达到 $44.9\pm 3.2\%$ ($P<0.05$)。同时，MCF-7/shPlk1 细胞的克隆形成能力显著降低 ($P<0.01$)。流式细胞仪技术分析细胞周期结果表明，MCF-7/shPlk1 细胞的 G2/M 期细胞比例显著增加了 $21.1\pm 4.1\%$ ，而 S 期细胞比例则显著降低了 ($18.5\pm 3.1\%$ $P<0.05$)。流式细胞仪技术分析细胞凋亡结果表明，MCF-7/shPlk1 细胞的凋亡率约显著增加了 $13.1\pm 2.3\%$ ($P<0.05$)。同时还发现，MCF-7/shPlk1 细胞中激活的 caspase-3 蛋白显著增加，Bcl-2 蛋白显著降低，而 Bax 蛋白则显著增加。结论：RNA 干涉载体能特异性下调乳腺癌细胞中 Plk1 基因的表达，从而抑制乳腺癌细胞的增殖和体外克隆形成能力，同时诱导乳腺癌细胞的 G2/M 期阻滞和细胞凋亡率显著增加。因此，靶向 Plk1 基因的生物治疗有望成为未来临床乳腺癌的一个重要的辅助治疗策略。

关键词 Plk1；乳腺癌；RNA 干涉；细胞周期；细胞凋亡

中图分类号：R737.9 文献标识码：A 文章编号：1673-6273(2011)20-3830-05

Effect of RNA Interference-Mediated Plk1 Downregulation on Malignant Phenotypes of Breast Cancer Cells

GENG Huai-cheng¹, WANG Bing-chen²

(1 Department of Oncology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China; 2 Department of Surgical Oncology, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China)

ABSTRACT : To investigate the effect of Plk1 downregulation on malignant phenotypes of human breast cancer cells. **Methods**: Plk1 RNAi vector (pSilencer4.1-shPlk1) was constructed and stably transfected into breast cancer cell line (MCF-7) by using Lipofectamine 2000 agent. Semi-quantitative RT-PCR and Western blot assays were performed to detect the expression of Plk1 mRNA and protein in the stably transfected MCF-7 cells. MTT and colony formation assays were performed to detect the cell viability. Flow cytometry assay was performed to detect cell cycle and apoptosis. **Results**: The stably transfected MCF-7 cells (MCF-7/shPlk1 和 MCF-7/shcontrol) were successfully selected. Compared with MCF-7/shPlk1 cells, the levels of Plk1 mRNA and protein expression were significantly downregulated by 65.8% and 74.4%, respectively ($P<0.05$). The growth of MCF-7/shPlk1 was significantly inhibited, and the highest inhibitory rate was $44.9\pm 3.2\%$ at day 5 ($P<0.05$). Flow cytometric analysis of cell cycle showed that the rate of G2/M phase cells was significantly increased by $21.1\pm 4.1\%$ and the rate of S phase cells was significantly decreased by $18.5\pm 3.1\%$ ($P<0.05$). Flow cytometric analysis of apoptosis showed that the apoptotic rate of MCF-7/shPlk1 cells was significantly increased by approximately $13.1\pm 2.3\%$ ($P<0.05$). The expression of active caspase-3 protein in MCF-7/shPlk1 cells was significantly increased. Moreover, the expression of Bcl-2 protein was significantly downregulated, but the expression of Bax protein was significantly upregulated. **Conclusion**: RNAi vector targeting Plk1 could specifically downregulate the expression of Plk1 gene. The downregulation of Plk1 could significantly inhibit growth and in vitro colony formation capacity. Additionally, Plk1 downregulation could also induce cell arrest in G2/M phase of cell cycle, apoptosis enhancement. Thus, targeting Plk1 will be a potential strategy for the treatment of human breast cancer in future.

Key words: Plk1; Breast cancer; RNA interference; Cell cycle; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code**: A

Article ID:1673-6273(2011)20-3830-05

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤，全世界每年约有 120 万

作者简介：耿怀成，男（1967-），副主任医师，主要研究方向：肿瘤的早期诊断及综合治疗。E-mail: ghc_nj@163.com.

（收稿日期：2011-05-25 接受日期：2011-06-18）

妇女患乳腺癌^[1]。近年来，乳腺癌的发病率呈逐年上升的趋势，年增长率达到 2%，在城市乳腺癌已成为女性最常见的恶性肿瘤。尽管过去几十年中在乳腺癌的早期诊断、外科切除和内分泌治疗等系统治疗策略中取得了很大进展，但是乳腺癌患者的

预后,尤其是进展或转移性乳腺癌患者,仍不甚理想^[2]。因此,探索乳腺癌发生分子机制将有助于为乳腺癌患者的临床治疗寻求新的分子靶点。丝/苏氨酸蛋白激酶 Plk1 (polo-like kinase) 是一类广泛存在于真核细胞中的丝/苏氨酸激酶,Plk1 在细胞有丝分裂过程中参与纺锤体的形成和染色体的分裂^[3]。Plk1 是细胞周期进展和细胞分裂的一个重要调控子,通过磷酸化多种下游底物而实现其功能^[4,5]。课题组前期研究表明,乳腺癌组织中 Plk1 基因 mRNA 的表达水平显著高于癌旁正常乳腺组织,且 Plk1 的表达水平与乳腺癌患者的淋巴结转移状况及 TNM 分期密切相关。另外高表达 Plk1 的乳腺癌患者组的无疾病进展率(PFS)及总体生存率(OS)均低于低表达 Plk1 的乳腺癌患者组,且多因素 COX 模型分析结果表明,高 Plk1 基因 mRNA 表达水平是乳腺癌患者的一个独立预后因子。但是 Plk1 基因在乳腺癌发生发展过程中发挥的生物学功能仍不清楚,国内外文献也未见详细报道。因此本课题拟采取 RNA 干涉的方法下调乳腺癌细胞中 Plk1 基因表达,检测 Plk1 基因表达下调对乳腺癌细胞的增殖、克隆形成、细胞周期及凋亡率的变化,从而为深入探讨 Plk1 能否成为乳腺癌治疗的一个分子靶点奠定实验室基础。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌细胞株(MCF-7)购自中国科学院上海细胞研究所,大肠杆菌 DH5 α 由西安交通大学医学院中心实验室惠赠, pSilencer4.1-CMVneo 载体、脂质体转染试剂盒(LipofectaminTM 2000)、TRIzol 购自 Invitrogen 公司, Plk1 的一抗为 Santa Cruze 公司产品,辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自北京中杉生物公司,高糖 DMEM 干粉剂是 GIBCO 公司产品,小牛血清购自杭州四季青公司。DNA marker、DNA 胶回收纯化试剂盒、T4 连接酶、TaqDNA 聚合酶及逆转录试剂盒为大连 TaKaRa 生物公司产品。小牛血清、DMEM 培养基购于 Gibco 公司。PCR 引物由上海生工生物技术有限公司合成。紫外分光光度计购自上海精密仪器仪表有限公司。Eppendorf PCR 仪购自艾本德中国有限公司。

1.2 RNA 干涉表达载体的构建

利用 siRNA 设计软件,从人 Plk1 基因编码区(GenBank Accession No. NM_005030)的起始密码下游寻找以 "AA" 二连序列开始的序列,设计 Plk1 干扰的靶序列为 Plk1-siRNA: 5'-AUGAAGAUCUGGAGGUGAATT-3',同时设计非特异性对照序列为 control-siRNA 5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3'。人工合成以上寡核苷酸 DNA 单链,并退火成双链,然后与线性化质粒 pSilencer4.1-CMVneo 连接,重组载体转化感受态大肠细菌 JM109,在含 Amp 抗性的 LB 培养液中培养过夜,提取质粒。阳性克隆质粒用 BamHI 和 Hind^{III} 双酶切分析,并送上海生工生物技术公司进行测序,验证序列的正确性。

1.3 细胞转染与稳定筛选

将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中,待贴壁细胞达 90%融合度后进行质粒转染。转染按 Lipofectamin 2000 脂质体说明书进行操作。转染 48 h 后,加入 600 μ g/ml 质量浓度的 G418,筛选 14 d 后,以 400 μ g/ml 质量浓度的 G418 维持、扩

增细胞。细胞分别命名为 MCF-7/shPlk1 和 MCF-7/shcontrol。

1.4 半定量 RT-PCR 试验

参照试剂说明书,使用 TRIzol 试剂对细胞进行提取 RNA,并进行纯度和完整性测定及分光光度法进行定量,提取好的 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。使用反转录试剂盒分别将上述提取的总 RNA 逆转录成 cDNA。PCR 引物序列为 Plk1: 上游引物 5'-TTCGTGTTCTGTTGGT-3',下游引物 5'-CTCGTCAT-TAAGCAGCTCGT-3',扩增产物为 563 bp;内参 GAPDH:上游引物 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3';下游引物 5'-GAA-GATGGTGATGGGATT-3',扩增产物 226 bp。PCR 反应体系为:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C (Plk1) 或 56 $^{\circ}$ C (GAPDH) 30s;72 $^{\circ}$ C 1min(循环 30 次),72 $^{\circ}$ C 10min,最后保存于 4 $^{\circ}$ C。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,分别进行灰度值测定并计算 Plk1 mRNA/GAPDH mRNA 之间的比值。

1.5 蛋白印迹试验

取各组细胞 PBS 洗涤后,提取细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量,与等体积的 2.0 $\times$ SDS 上样缓冲液混合。每泳道 50 μ g 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至硝酸纤维素膜后封闭,Plk1 单克隆抗体,激活 caspase-3, Bcl-2, Bax 和 GAPDH 单克隆抗体(1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗涤后,辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000 稀释)室温孵育 3 h, ECL 检测、曝光和显影。

1.6 体外增殖试验

细胞增殖活性通过 MTT 试验进行测定。按 150 μ l/孔 (1.0×10^4 稳定转染的 LoVo 细胞)接种于 96 孔培养板内,每组 3 个复孔。加入无血清培养液 12 h,使细胞同步化。更换含 10% 胎牛血清的培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下培养 72 h。每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 液 20 μ l,继续培养 4 h,弃培养液,加入 150 μ l 的 DMSO,酶联免疫检测仪检测各孔 OD 值,检测波长 490nm,连续观察 5 天,记录并绘制细胞生长曲线。

1.7 体外克隆形成试验

将 1.0×10^3 稳定转染的 MCF-7/shcontrol 和 MCF-7/shPlk1 细胞个接种于 35cm 平皿中,置 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 及饱和湿度的环境下培养 2~3 周。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时终止培养。弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 2 次。加纯甲醇固定 10 min。然后去固定液,加适量结晶紫应用染色液染 10~30 min,然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。在显微镜(低倍镜)计数大于 10 个细胞的克隆数。

1.8 流式细胞术(FCM)检测细胞周期

用胰酶将细胞消化后,1800r/min 离心 5 min,用冷 PBS 离心洗 3 遍,加 PBS 移入 EP 管,轻轻吹打均匀。重悬细胞后加入 75%酒精固定 0.5 h,3500 rpm 离心 5 min,用 PBS 洗 3 遍,细胞重悬于 100 μ L PBS 中,加入 RNase 酶 2.5 μ L (浓度 10 mg/mL),加入 25 μ L 碘化丙啶(浓度 10 mg/mL)染色 30 min。用 FACS Aria 流式细胞仪 (American BD Company) 测试,分析 G1/G0 期、G2/M 期和 S 期比例。

1.9 流式细胞术(FCM)检测细胞周期

采用 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡。简言之,消化收集各组细胞, PBS 重悬细胞。按照试剂盒说明进行操作,流式细胞仪进行检测。图中左下象限为细胞碎片组,右下象限为早

期凋亡细胞组;右上象限为晚期凋亡细胞组;左上象限为死亡细胞组。连续测定三次,计算各组细胞的平均凋亡率。

1.10 裸鼠成瘤实验

购买 20 只 BALB/C 裸鼠,随机分成两组($n=10$)。分别消化并计数约 7.0×10^6 个 MCF-7/shcontrol 或 MCF-7/shPlk1 细胞,行皮下接种,每只裸鼠皮下 0.2 ml。每隔 4d 用游标卡尺测量各组裸鼠瘤体长(a)、宽(b)、高(c),按下式计算瘤体积:瘤体积(V) = $(\pi/6)(abc)$,并绘制裸鼠肿瘤体积变化曲线图。

1.11 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件统计分析数据结果,数据以均数 Mean $\pm$ SD 表示,样本均数间比较采用单因素分析。 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 pSilencer4.1-shPlk1 显著下调乳腺癌细胞中 Plk1 基因表达

为了验证 pSilencer4.1-shPlk1 对 Plk1 基因表达干涉的效率,半定量 RT-PCR 和蛋白印迹试验分别检测稳定转染细胞(MCF-7/shcontrol 和 MCF-7/shPlk1) 中 Plk1 基因 mRNA 和蛋白表达情况。以 GAPDH 作为内参照,分别计算 Plk1 mRNA 与 GAPDH mRNA 的比值。如图 1 所示:相对于对照细胞 MCF-7/shcontrol, MCF-7/shPlk1 细胞中 Plk1 基因 mRNA 相对表达水平显著降低了约 65.8% ($P<0.05$)。相对于对照细胞, MCF-7/shPlk1 细胞中 Plk1 基因蛋白相对表达水平则显著降低了约 74.4% ($P<0.01$; 图 2)。因此,针对 Plk1 基因的 RNA 干扰载体能够高效而特异地降低乳腺癌细胞中 Plk1 基因的表达。

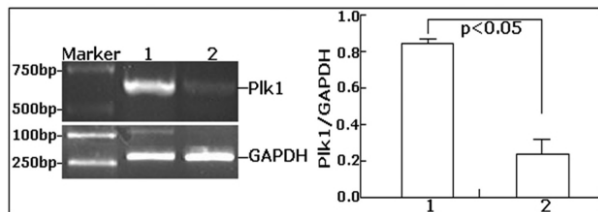


图 1 半定量 RT-PCR 检测稳定转染细胞中 Plk1 mRNA 的表达情况,内参为 GAPDH

Fig. 1 Semi-quantitative RT-PCR analysis of Plk1 mRNA expression in stably transfected cells and GAPDH was used as an internal control.

Marker: DL2000; 1: MCF-7/shcontrol; 2: MCF-7/shPlk1

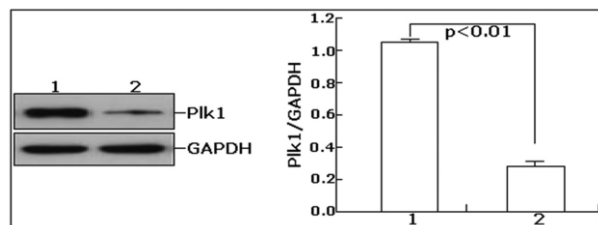


图 2 蛋白印迹试验检测稳定转染细胞中 Plk1 蛋白的表达情况,内参为 GAPDH

Fig. 2 Western blot analysis of Plk1 protein expression in stably transfected cells and GAPDH was used as an internal control. 1: MCF-7/shcontrol; 2: MCF-7/shPlk1

2.2 Plk1 基因表达下调对乳腺癌细胞体外增殖活性的影响

首先我们分析了 Plk1 基因表达下调对体外增殖活性和克

隆形成能力的影响。MTT 法检测稳定转染细胞在不同时间的吸光值,绘制其与时间的相关曲线(图 3A),计算细胞存活率(实验组吸光值/对照组吸光值 $\times 100\%$)。我们可以看到,相对于对照组 MCF-7/shcontrol 细胞, MCF-7/shPlk1 细胞的增殖速度显著受到了抑制,且呈现时间依赖性,到达第 5 天时细胞抑制率约达到 $44.9 \pm 3.2\%$ ($P<0.05$)。14 天后计算各组细胞的克隆形成数(图 3B),结果显示, MCF-7/shPlk1 细胞的克隆形成数(604 ± 25)显著低于 MCF-7/shcontrol 细胞(243 ± 17 , $P<0.05$)。因此,推断 Plk1 基因表达下调后可以显著诱导 MCF-7 细胞的增殖活性和体外克隆形成能力显著降低。

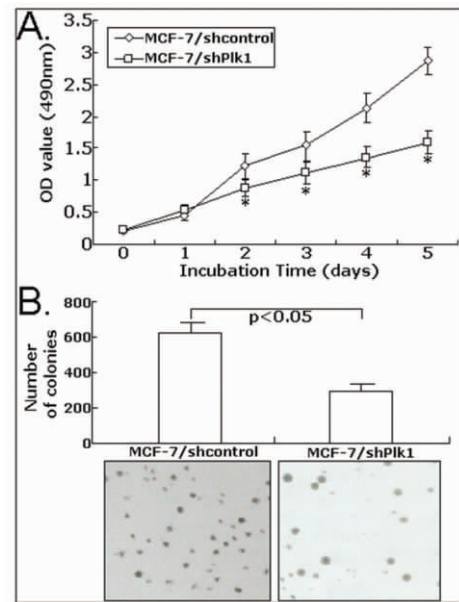


图 3 分析 Plk1 基因表达下调对 MCF-7 细胞体外增殖活性的影响
Fig. 3 Analysis of the effect of Plk1 downregulation on in vitro growth of MCF-7 cells

(A) MTT assay; (B) Colony formation assay. Each assay was performed at least in triplicate. * $p<0.05$.

2.3 Plk1 基因下调后对乳腺癌细胞周期的影响

为了深入研究 Plk1 基因表达下调诱导乳腺癌细胞增殖抑制的机制,我们首先分析了周期变化情况。流式细胞仪分析细胞周期结果表明(图 4):相对于对照组细胞 MCF-7/shcontrol, MCF-7/shPlk1 细胞的 G2/M 期细胞比例显著增加($21.1 \pm 4.1\%$)而 S 期细胞比例则显著降低($18.5 \pm 3.1\%$, $P<0.05$),但是 G0/G1 期细胞比例则无显著统计学差别($60.4 \pm 3.5\%$, $P>0.05$)。因此我们可以认为, Plk1 基因表达下调诱导 MCF-7 细胞阻滞于 G2/M 期。

2.4 Plk1 基因下调后对乳腺癌细胞凋亡影响及其可能的分子机制

同时我们还采用流式细胞仪技术分析了 Plk1 表达下调对乳腺癌细胞凋亡的影响。如图 5 所示,相对于 MCF-7/shcontrol 细胞, MCF-7/shPlk1 细胞的凋亡率显著增加了 $13.1 \pm 2.3\%$ ($P<0.05$)。接着分析了 Plk1 表达下调诱导乳腺癌细胞凋亡增加的可能机制,首先我们分析了 caspase-3 的激活情况。如图 6A 所示,同对照组细胞相比, MCF-7/shPlk1 细胞中激活 caspase-3 蛋白的表达量显著增加了约 42.5% ($P<0.05$),而总 caspase-3 蛋

白的表达量则无显著性变化($P<0.05$)。同时,我们又分析了 Plk1 基因表达下调对 Bcl-2、Bcl-xL、Bax 蛋白表达的影响。如图 6B 所示:我们可以看到 Bcl-2 和 Bcl-xL 蛋白在 MCF-7/shPlk1 细胞中的表达显著降低,而 Bax 蛋白的表达水平则显著升高

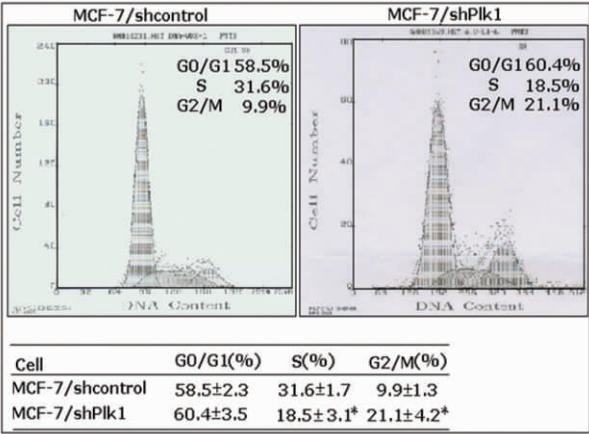


图 4 流式细胞仪分析 MCF-7/shcontrol 和 MCF-7/shPlk1 细胞周期的变化

Fig. 4 Flow cytometry analysis of cell cycle in MCF-7/shcontrol or MCF-7/shPlk1 cells. Each assay was performed at least in triplicate. * $P<0.05$.

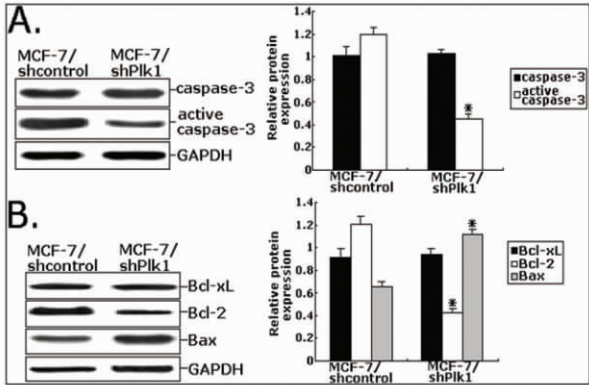


图 6 蛋白印迹试验检测 MCF-7/shcontrol 和 MCF-7/shPlk1 中蛋白的变化

Fig. 6 Analysis of protein expression in MCF-7/shcontrol or MCF-7/shPlk1 cells. GAPDH was used as an internal control. (A) Western blot analysis of caspase-3 and active caspase-3 protein expression. (B) Western blot analysis of Bcl-xL, Bcl-2 and Bax protein expression. Each assay was performed at least in triplicate. * $P<0.05$.

3 讨论

近年来,乳腺癌的发病率呈明显上升趋势,严重影响着女性的生活质量及威胁其生命。乳腺癌的现代诊治已趋于个体化模式,靶向治疗在乳腺癌的治疗中占重要作用,针对 Her-2、EGFR 等分子的靶向治疗药物已应用于临床^[6-8],探讨乳腺癌的发生、发展的分子发生机制有望为临床治疗进一步探索新的靶点奠定理论基础。

Polo Like 激酶 1 是一种高度保守的一类丝/苏氨酸蛋白激酶,为 Polo 家族的一员,和 PLKs 家族其它成员一样,N 端具有一个高度保守的催化区,C 端常有两个被称作 Polo 盒的保

($P<0.05$)。因此,Plk1 基因表达下调诱导 MCF-7 细胞发生 caspase-3 依赖性的凋亡率增加,而这和 Bcl-2/Bax 比例降低密切相关。

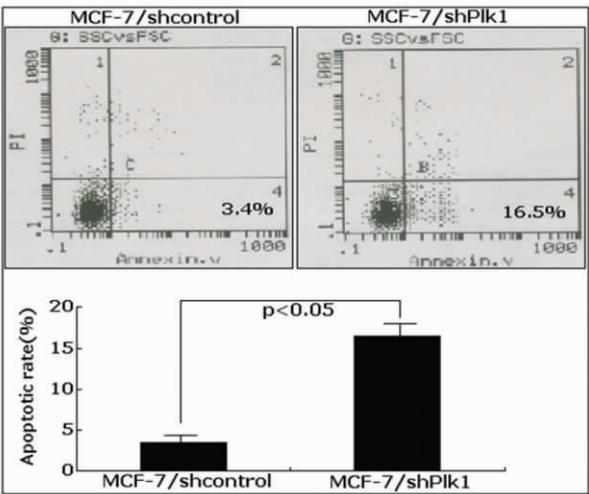


图 5 流式细胞仪分析 MCF-7/shcontrol 和 MCF-7/shPlk1 细胞凋亡率的变化

Fig. 5 Flow cytometry analysis of apoptosis in MCF-7/shcontrol or MCF-7/shPlk1 cells. Each assay was performed at least in triplicate. * $P<0.05$.

守区域(Polo-Box domain, PBD)^[9]。激酶结构域位于激酶的氨基端,后面接着非接触反应的 Polo-盒结构域,其中有非连续的高度保守氨基酸-Polo-盒。Polo-盒结构域有调控 Polo-like 激酶在细胞中的定位和与蛋白质间的相互作用^[10]。大量的国内外文献已经表明,Plk1 在细胞的有丝分裂中起广泛调节作用,在细胞增殖中也起着关键作用,Plk1 能促进肿瘤的转化在肿瘤发生发展中发挥着重要作用,同时 Plk1 能与许多抑制蛋白相互作用也能与抑癌基因相互作用,这些增殖信号的失衡与紊乱可促进肿瘤的发生与发展^[11]。到目前为止,Plk1 基因已经在多种肿瘤细胞和组织中呈现高表达水平,比如胃癌、食道癌、肝癌、宫颈癌、膀胱癌等^[12-16]。同时,我们前期的研究也表明,Plk1 基因在乳腺癌细胞和组织中发现该基因呈现过表达水平,且与乳腺癌患者的预后密切相关。同时,有关 Plk1 与乳腺癌生物学表型形成之间关系的研究目前国内外也已有多篇文献报道。Weichert 等学者分析了 Polo-like 激酶家族分子(Plk1 和 Plk3)在乳腺癌进展过程中的重要作用^[17]。国内韩淑萍等学者采用免疫组织化学 S-P 法分析了 Plk1 在中国乳腺癌患者肿瘤组织中特异性高表达状态,且与肿瘤分化程度、雌激素受体、孕激素受体表达有关^[18]。综上所述,Plk1 基因表达水平的升高在乳腺癌发生、发展过程中发挥着重要的作用,但是 Plk1 基因与乳腺癌的恶性生物学表型的作用及其机制目前还不清楚,国内外也未见详细报道,因此,本课题拟深入了解 Plk1 基因表达与乳腺癌细胞增殖活性、细胞周期及凋亡等表型之间的关系。

RNA 干扰是一种由双链 RNA 诱发的基因沉默 RNA 干扰技术,是近年来发展起来的一项用于基因表达、调控相关研究的新技术,已经广泛应用于新基因功能研究和信号转导通路的

研究^[19,20]。相对于传统的反义核酸技术, RNA 干扰技术具有稳定性好、特异性强、细胞毒性低以及作用更持久等众多优点, 因此使得其成为疾病包括病毒性疾病和肿瘤等研究领域的热点^[21]。本研究中, 我们成功构建了针对 Plk1 基因的真核表达载体, 分别从转录水平和翻译水平均能显著下调乳腺癌细胞中 Plk1 基因的表达。通过稳定转染细胞系, 我们分析了细胞体外增殖和克隆形成能力、细胞周期和凋亡变化, 及其可能的分子调控机制。结果表明, RNA 干涉介导的 Plk1 基因表达下调能够诱导乳腺癌细胞的体外增殖活性显著降低且克隆形成能力显著抑制。同时该基因表达下调能够诱导乳腺癌细胞发生 G2/M 期细胞周期阻滞和凋亡率显著增加。进一步分析了可能的分子机制, 发生凋亡率增加可能和 caspase-3 的激活有关, 而这种激活是 Bcl-2 家族蛋白表达水平变化的综合结果。尽管我们在 Plk1 基因下调的乳腺癌细胞中没有检测到 Bcl-xL 蛋白表达的变化, 但是 Bcl-2 蛋白表达的显著降低及 Bax 蛋白表达的显著增加使得 Bcl-2/Bax 比值显著降低, 从而导致 caspase-3 的激活, 从而为 Plk1 基因在乳腺癌中的作用揭示了新的分子机理。

综上所述, 我们的研究表明 Plk1 是一个应用前景非常好的抗肿瘤治疗药物新分子靶点, 可以设计出能抑制 Plk1 表达或酶活性的单克隆抗体或小分子拮抗剂用于乳腺癌的临床治疗。因此, 靶向 Plk1 也有望为乳腺癌的临床治疗开辟新的思路, 同时为进一步研究和开发以 Plk1 为靶点的肿瘤治疗药物奠定了理论基础。当然本研究还存在很多局限性, 首先, 研究中只用了一种乳腺癌细胞系, 还需要在其它乳腺癌细胞系中深入研究 Plk1 基因的功能; 另外, 缺乏活体动物试验进一步地验证 Plk1 基因的功能。

参考文献(References)

- [1] Barrett SV. Breast cancer [J]. J R Coll Physicians Edinb, 2010, 40(4): 335-338
- [2] Guarneri V, Conte PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004, 31: S149-161
- [3] Golsteyn RM, Lane HA, Mundt KE, et al. The family of polo-like kinases [J]. Prog Cell Cycle Res, 1996, 2: 107-114
- [4] Eckerdt F, Strebhardt K. Polo-like kinase 1: target and regulator of anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis [J]. Cancer Res, 2006, 66(14): 6895-6898
- [5] Park JE, Soung NK, Johmura Y, et al. Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function [J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67 (12): 1957-1970
- [6] Guarneri V, Barbieri E, Dieci MV, et al. Anti-HER2 neoadjuvant and adjuvant therapies in HER2 positive breast cancer [J]. Cancer Treat

Rev, 2010, 36 Suppl 3: S62-66

- [7] Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN. Emerging targeted therapies for breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(20): 3366-3379
- [8] Burris HA. Trastuzumab emtansine: a novel antibody-drug conjugate for HER2-positive breast cancer. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(6): 807-819
- [9] Dai W, Wang X. Grabbing Plk1 by the PBD [J]. Mol Cell, 2006, 24(4): 489-490
- [10] Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(4): 265-275
- [11] Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, et al. Polo-like kinases (Plks) and cancer [J]. Oncogene, 2005, 24(2): 287-291
- [12] Weichert W, Ullrich A, Schmidt M, et al. Expression patterns of polo-like kinase 1 in human gastric cancer [J]. Cancer Sci, 2006, 97 (4): 271-276
- [13] Feng YB, Lin DC, Shi ZZ, et al. Overexpression of PLK1 is associated with poor survival by inhibiting apoptosis via enhancement of survivin level in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2009, 124(3): 578-588
- [14] Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2010, 51(3): 857-868
- [15] Chhavi, Saxena M, Singh S, et al. Expression profiling of G2/M phase regulatory proteins in normal, premalignant and malignant uterine cervix and their correlation with survival of patients [J]. J Cancer Res Ther, 2010, 6(2): 167-171
- [16] Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, et al. Overexpression of polo-like kinase 1 (PLK1) and chromosomal instability in bladder cancer [J]. Oncology, 2006, 70(3): 231-237
- [17] Weichert W, Schmidt M, Jacob J, et al. Overexpression of Polo-like kinase 1 is a common and early event in pancreatic cancer [J]. Pancreatol, 2005, 5(2-3): 259-265
- [18] HAN Shu-mei, MA Ting-hang, TANG Xiao-yong. Expression and clinical significance of PLK1 and PCNA in breast carcinoma [J]. SHANDONG MEDICAL JOURNAL, 2007, 47(8): 18-20
- [19] Hokaiwado N, Takeshita F, Banas A, et al. RNAi-based drug discovery and its application to therapeutics [J]. IDrugs, 2008, 11(4): 274-278
- [20] Aigner A. Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(1): 9-21
- [21] Cejka D, Losert D, Wacheck V. Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic [J]? Clin Sci, 2006, 110(1): 47-58