

[文章编号] 1000 - 4718(2007)07 - 1352 - 05

Polo - like 激酶 1 反义 RNA 对肺癌细胞 A549 生长的实验研究

周 琼, 张建初, 金 阳, 张晓菊, 陶晓南, 白 明
(华中科技大学同济医学院附属协和医院呼吸内科, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 探讨 Polo - like 激酶 1 (Plk1) 基因表达下调对肺癌细胞周期分布及其生长的影响。方法: 培养肺腺癌细胞株 A549, 构建表达 Plk1 反义 RNA 的质粒 pcDNA3 - Plk1, 通过脂质体介导转染 A549 细胞, 采用 RT - PCR 和 Western blotting 的方法检测 Plk1 基因的表达, 细胞计数、BrdU 脉冲标记检测细胞增殖, 流式细胞仪分析细胞周期变化和凋亡, MTT 法检测长春瑞宾 (NVB) 对各组细胞的生长抑制率。结果: A549 细胞转染 pcDNA3 - Plk1 后 24 h, Plk1 mRNA 及蛋白表达均下降; 细胞变圆、漂浮、增殖减慢; S 期细胞百分数 (BrdU 标记指数) 显著低于对照组 ($P < 0.05$); 转染后 48 h A549 细胞出现 G₂/M 期阻滞 ($P < 0.05$) 并发生凋亡; 等浓度化疗药物诺维本对转染 pcDNA3 - Plk1 细胞的抑制率明显高于各对照组 ($P < 0.05$), 转染 pcDNA3 与未转染的对照细胞差异无显著 ($P > 0.05$)。结论: pcDNA3 - Plk1 的转染能下调 Plk1 基因的表达, 抑制 A549 细胞增殖, 诱导凋亡, 并能增加 A549 细胞对化疗药物的敏感性。

[关键词] Polo - like kinase - 1; RNA, 反义; 细胞周期; 肺肿瘤

[中图分类号] R734 **[文献标识码]** A

Effect of antisense RNA targeting Polo - like kinase 1 on cell growth in A549 lung cancer cells

ZHOU Qiong, ZHANG Jian - chu, JIN Yang, ZHANG Xiao - ju, TAO Xiao - nan, BAI Ming
(Department of Respiratory Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China. E - mail: zhouqiong@126.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of Polo - like kinase - 1 (Plk1) depletion on cell cycle progression and cell growth in lung cancer cells. **METHODS:** A recombinant plasmid containing antisense RNA targeting Plk1 (pcDNA3 - Plk1) was transfected into A549 cells by lipofectine. RT - PCR and Western blotting were used to examine Plk1 gene expression. Cell proliferation was evaluated by cell counting and BrdU labeling. Cell cycle distribution and apoptosis were examined by flow cytometry. Inhibition rate (IR) of vinorelbine (NVB) was determined by MTT assay. **RESULTS:** After transfected with pcDNA3 - Plk1 into A549 cells, the expression levels of Plk1 mRNA and protein were greatly decreased. Abnormal morphological changes of cells and growth inhibition were observed in pcDNA3 - Plk1 transfected cells. The BrdU labeling index was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). Cells showed a strong G₂/M arrest and apoptosis 72 h post transfection. IR of vinorelbine in pcDNA3 - Plk1 transfected groups was significantly higher than that in other groups. **CONCLUSION:** Antisense RNA targeting Plk1 is capable of suppressing Plk1 expression, and therefore, significantly inhibits cellular proliferation, induces cell cycle arrest and apoptosis. Moreover, the sensitivity of lung cancer cells to chemotherapy is increased.

[KEY WORDS] Polo - like kinase - 1; RNA, antisense; Cell cycle; Lung neoplasms

Polo - like kinase 1 (Plk1) 是一类存在于哺乳动物中的丝/苏氨酸蛋白激酶, 人类 Plk1 的结构和功能与果蝇的 Polo 和酿酒酵母的 cdc5 极为类似, 同属 Polo like 激酶家族。研究表明 Plk1 对细胞分裂至关重要, 作用涉及成熟促进分子 (maturation promoting

factor, MPF) 的激活、中心体的成熟、纺锤体的组装、胞质分裂等^[1], 并参与 DNA 损伤检测点和有丝分裂中期检测点的信号转导^[2]。现今已在肺癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞中检测到 Plk1 蛋白的高表达。临床研究表明, 在非小细胞肺癌中 Plk1 mRNA 高表达的

[收稿日期] 2005 - 10 - 20 [修回日期] 2005 - 12 - 27

Tel: 027 - 62483802; E - mail: zhouqiong@126.com

患者比中等量表达的患者预后要差,因此提出 Plk1 可作为肿瘤标志物,在病情进展和预后方面提供依据^[3]。为进一步明确 Plk1 对肺癌细胞增殖及在基因治疗中的作用,本研究利用反义 RNA 技术抑制 Plk1 基因的表达,分析细胞周期的变化,并对其机制作初步探讨。

材 料 和 方 法

1 材料

RPMI - 1640 培养基、增强型小牛血清为 Hyclone 公司产品;羊抗人 Plk1 抗体、免疫印迹发光试剂、鼠抗人 BrdU 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品;BCA 试剂盒为 Pierce 公司产品;限制性内切酶、Pfu DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 MBI 公司。Trizol 购自 Life Technologies 公司;M - MLV 为 Promega 公司产品, lipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 产品。长春瑞宾制剂(诺维本)由 Pierre Fabre 公司生产。肺癌细胞系 A549 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。pcDNA3 质粒由本实验室保存。

2 方法

2.1 反义 RNA 质粒表达载体的构建 PCR 引物根据发表的序列设计(NM - 005030),上下游引物分别携带 *Xho* I 和 *EcoR* I 酶切位点,上游引物为 5' - CTACTCGAGCTCGGATCGAGGTCTG - 3', 下游引物为 5' - AGTGGAAATTCTGCTGGTGGGCGAGG - 3', 片段长度 387 bp, 由上海博亚公司合成。取 A549 细胞总 RNA 4 μ g 行逆转录后,再取 3 μ L 逆转录产物在高保真 Pfu 酶作用下扩增,循环参数为 95 $^{\circ}$ C, 45 s; 55 $^{\circ}$ C, 45 s; 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 30 个循环。回收 PCR 产物进行 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切,同时亦双酶切 pcDNA3, 经 T4 DNA 连接酶作用构成 Plk1 的反义表达载体 pcDNA3 - Plk1, PCR 产物和重组体序列均经测序证实。

2.2 细胞培养和基因转染 细胞生长于含 10% 新生牛血清的 RPMI - 1640 培养基中(1×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素),在 37 $^{\circ}$ C、5% 的 CO₂ 培养箱中培养。用 lipofectamineTM 2000 进行转染,按厂家说明书操作。细胞分为 3 组,转染 pcDNA3 - Plk1 重组质粒为实验组,转染 pcDNA3 质粒为阴性对照,未转染的 A549 细胞为空白对照。进行 Plk1 蛋白水平的检测时,在 60 mm 培养皿中按 5×10^4 cells/cm² 密度接种细胞,培养 24 h 后用 RPMI - 1640 培养基清洗 3 次,再转染 pcDNA3 - Plk1 和 pcDNA3 各 6 μ g, 6 h 后重新清洗,换以新鲜培养液,继续培养 24 h 或 48 h 后提蛋白。对总 RNA 的提取,在 6 孔板上以 5×10^4 cells/cm² 密度接种细胞,24 h 后进行转染(每

孔 3 μ g),转染后 24 h 或 48 h 提取细胞总 RNA。

2.3 RT - PCR 用 Trizol 提取培养细胞总 RNA,按厂家说明书操作。逆转录参照 M - MLV 逆转录酶说明书操作,取 A549 细胞总 RNA 4 μ g 行逆转录后,再取 3 μ L 逆转录产物进行 Plk1 基因的 PCR 扩增。上游引物为 5' - CCCCTCACAGTCCTCAATAA - 3', 下游引物为 5' - TGTCCGAATAGTCCACCC - 3', 产物长度为 244 bp。扩增条件:94 $^{\circ}$ C, 30 s; 52 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 45 s, 30 个循环。以 β - actin 为内参,引物序列:上游引物为 5' - GGCTACAGCTTCACCACCAC - 3', 下游引物为 5' - TACTCC TGC TTGCTGATCCAC - 3', 产物长度为 498 bp。扩增后 5 μ L PCR 产物在 2% 琼脂糖胶上分离,用柯达凝胶分析软件(Kodak digital science 1D system, Kodak, USA)分析条带吸光度(A)。Plk1 与 β - actin 的条带积分吸光度比值表示 Plk1 mRNA 的相对表达水平。

2.4 Western blotting 细胞用 PBS 洗涤后,0.25% 胰酶消化收集细胞,用如下裂解液提取细胞总蛋白:50 mmol/L Tris - HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 脱氧胆酸钠, 1% Triton X - 100, 0.1% SDS, 1 mmol/L sodium fluoride (NaF), 1 mmol/L Na₃VO₄, 加蛋白酶抑制剂 10 mg/L aprotinin, 1 mmol/L PMSF。离心取上清,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。取等量蛋白 60 μ g 上样于 12% 聚丙烯酰胺凝胶,再转移至硝酸纤维素膜;膜于含 5% 脱脂奶粉的 TBST [50 mmol/L Tris - HCl (pH 7.6), 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20] 中室温下封闭 1 h,加以封闭液稀释的抗体(Plk1, 1:200; p53, 1:200; β - actin, 1:500), 4 $^{\circ}$ C 放置过夜;次日用 TBST 洗膜 3 \times 15 min,加封闭液稀释的 HRP 标记 II 抗(1:10 000),室温下 1 h, TBST 洗膜 3 \times 15 min,加 ECL 试剂, X 光胶片曝光、洗片。

2.5 细胞计数 以约 5×10^4 cells/cm² 密度将细胞接种于 6 孔板上,转染后 48 h 弃培养液, PBS 洗 2 遍, 0.5 mL 0.25% 胰蛋白酶消化 1 min, 加入 1.5 mL PBS, 吹打成单细胞悬液后用 0.1% 台盼蓝染色,用血细胞计数板计数台盼蓝染色阳性的细胞,换算成细胞总数。用未转染的培养 48 h 的 A549 细胞数校正各转染组细胞数,再以对照组校正值为 100%, 处理组表示为对照组的百分数。

2.6 BrdU 掺入和免疫荧光检测 培养于贴片上的细胞经转染处理 24 h 或 48 h, 在最后的 30 min 加入 1 mmol/L BrdU 至终浓度为 10 μ mol/L, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 30 min。取出贴片,用冰冷的 PBS 漂洗后,纯甲醇 - 20 $^{\circ}$ C 固定 10 min; PBS 洗片,继以水洗, 4 mol/L HCl 作用 30 min, 0.1 mol/L 四硼酸钠中和 10 min,

PBS 洗 3 × 5 min, 加 BrdU I 抗 (1:30), 室温下孵育 1 h; PBS 洗 3 × 5 min, 加 FITC 标记 II 抗 (1:50), 室温下孵育 1 h; PBS 洗 3 × 5 min, Hoechst33258 复染细胞核 15 min (终浓度 50 mg/L), PBS 甘油封片, Olympus X70 荧光显微镜观察。随机选取 6 个以上 200 倍视野, 数码相机照相后计数细胞, 计算阳性细胞百分率为标记指数 (labeling index, LI%)。

2.7 流式细胞术 A549 转染后 48 h 用胰酶消化、离心收集细胞, 80% 乙醇 -20 °C 固定过夜。上机前离心收集细胞, 弃乙醇, PBS 洗 1 遍, 最后加 0.5 mL PBS 重悬, 再加入 1 g/L 碘化丙锭和 10 g/L RNA 酶至终浓度分别为 10 mg/L 和 100 mg/L, 4 °C 温育 30 min, 上机检测。FACSCalibur (Becton Dickinson) 分析细胞周期分布和凋亡。

2.8 MTT 法检测化疗药物对各组细胞的生长抑制率 化疗药物诺维本 (Lab. Pierre Fabre, France) 浓度根据参考文献^[4] 设定。转染 24 h 后收获细胞, 调整细胞浓度为 3 × 10⁴ cells/cm² 接种于 96 孔板。细胞贴壁后, 加入 0 - 10 nmol/L 不同浓度 (分别为 0、1、5、10 nmol/L) 的诺维本培养 24 h, 每组细胞均设化疗药物实验孔和空白对照孔, 每组设 6 个复孔。每

孔加入 5 g/L 的 MTT 10 μL, 继续培养 4 h, 倾尽上清, 用 100 μL 含 0.1 mol/L HCl 的异丙醇溶解结晶, 用酶标仪在波长 570 nm 处检测各孔吸光度值 (A 值), 诺维本对细胞生长抑制率 (IR) = (1 - 化疗药物实验孔 A 值/空白对照孔 A 值) × 100%。再根据周廷潮等^[5] 药物效应中效方程式 $fa/fu = (D/Dm)^m$, 进行中效作图 $y = \log fa/fu, x = \log D, y = ax + b$ (fa 为效应, fu = 抑制率, fu = 1 - fa, D 为药物浓度, Dm 为中效剂量, 即 0.5 效应时的药物浓度, m 为斜率)。计算各组细胞中诺维本的中效浓度 (IC₅₀)。

3 统计学处理

所有数据均以均值 ± 标准差表示, 运用 SPSS 11.5 软件统计处理, 多组间均数比较采用 F 检验, 均数间的两两比较采用 q 检验。

结 果

1 反义 RNA 降低 Plk1 mRNA 和蛋白的表达

A549 细胞转染表达反义 Plk1 的 pcDNA3 - Plk1 后 24 h 即出现 Plk1 mRNA 的下降, 转染后 48 h 更为明显, 转染 pcDNA3 质粒中 Plk1 mRNA 表达与正常细胞比较无显著差异 (图 1、表 1)。

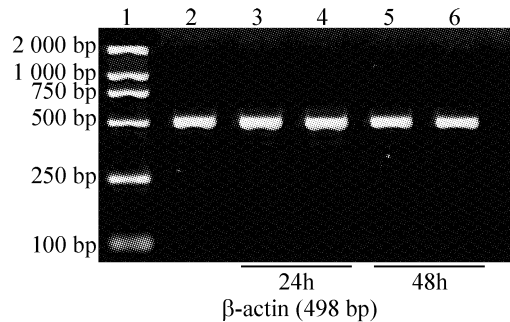
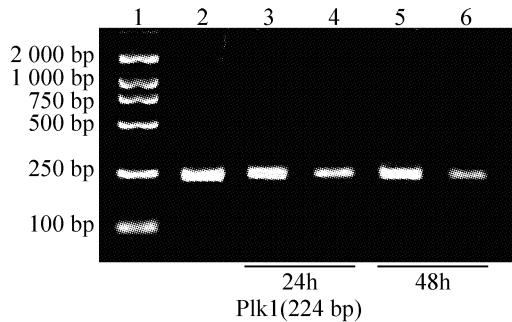


Fig 1 Effect of antisense RNA transfection on Plk1 mRNA levels of A549 cells. Lane 1: DL2000 DNA marker; Lane 2: untransfected control A549 cells; Lane 3 and 5: A549 cells transfected with pcDNA3 as negative control; Lane 4 and 6: A549 cells transfected with pcDNA3 - Plk1.

图 1 反义 RNA 分子对 Plk1 mRNA 表达的影响

表 1 反义 RNA 分子对 Plk1 mRNA 表达水平的影响

Tab 1 Effect of antisense RNA on the level of Plk1 mRNA expression of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Plk1/β-actin (% vs control)	Control cell	Transfected with pcDNA3	Transfected with pcDNA3 - Plk1
24 h	100	85.52 ± 6.42 ^Δ	53.25 ± 4.37 [▲]
48 h	100	91.93 ± 4.28 ^Δ	38.16 ± 4.82 [▲]

The sum A value of Plk1 band was adjusted by that of β-actin. The result of treated cells were expressed as the percentage relative to control cells (100%). ^ΔP > 0.05, [▲]P < 0.05 vs control.

Western blotting 的结果与此类似, 转染了 pcDNA3 - Plk1 后 24 h Plk1 的蛋白表达下调, 转染后 48 h 进一步降低, 对照组中 Plk1 蛋白表达与正常细

胞无明显差异 (图 2)。

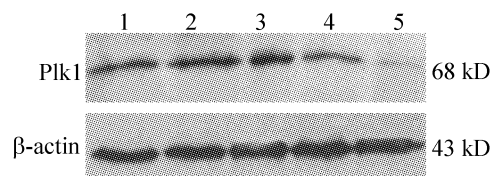


Fig 2 Effect of antisense RNA transfection on Plk1 protein levels of A549 cells. Lane 1: untransfected control cells; Lanes 2 and 3: pcDNA3 - transfected cells at time points of 24 h and 48 h; Lanes 4 and 5: pcDNA3 - Plk1 - transfected cells at time points of 24 h and 48 h.

图 2 反义 RNA 分子对 Plk1 蛋白表达的影响

p53 蛋白的检测结果显示在转染 pcDNA3 - Plk1

组中 p53 蛋白的表达水平明显高于其它各组(图 3)。

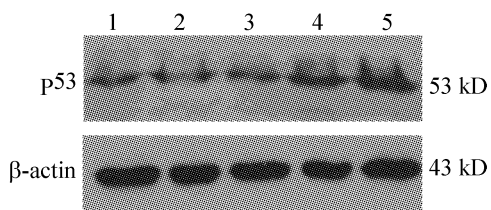


Fig 3 Effect of antisense RNA transfection on p53 protein levels of A549 cells. Lane 1: untransfected control cells; Lanes 2 and 3: pcDNA3-transfected cells at time points of 24 h and 48 h; Lanes 4 and 5: pcDNA3-Plk1-transfected cells at time points of 24 h and 48 h.

图 3 反义 RNA 分子对 p53 蛋白表达的影响

2 反义 RNA 作用后 A549 细胞增殖减慢

转染 pcDNA3-Plk1 后 48 h, 相差显微镜下见细胞部分变圆, 漂浮; 转染 pcDNA3 组中也有部分漂浮细胞, 但较实验组少, 为转染试剂的毒性所致。细胞计数显示, 转染 pcDNA3-Plk1 后 48 h, 存活的 A549 细胞数为 27.18 ± 3.67 , 明显低于转染 pcDNA3 组的细胞 (48.27 ± 3.28) 和对照细胞 (56.83 ± 5.64) ($P < 0.05$), 而在后两组细胞中差异无显著 ($P > 0.05$)。

3 抑制 Plk1 的表达对 A549 细胞 S 期细胞百分数 (BrdU 标记指数, LI%) 的影响

BrdU 是胸腺嘧啶核苷的类似物, S 期细胞可将

其摄入以进行 DNA 的合成, 故可利用 BrdU 抗体检测出 S 期细胞。实验中转染 pcDNA3-Plk1 后 48 h, A549 细胞中 BrdU 脉冲标记结果明显低于对照组 ($P < 0.05$), 提示 S 期细胞的减少。对照组与正常细胞的 BrdU 标记指数无显著差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 反义 RNA 分子对 A549 S 期细胞百分数 (BrdU 标记指数) 的影响

Tab 2 Effect of antisense RNA transfection on S phase percentage of A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

BrdU labeling index (% vs control)	Control cell	Transfected with pcDNA3	Transfected with pcDNA3-Plk1
24 h	42.22 ± 6.12	$38.63 \pm 4.52^\Delta$	$28.47 \pm 5.29^\Delta$
48 h	41.13 ± 5.68	$37.65 \pm 5.74^\Delta$	$25.59 \pm 4.25^\Delta$

$^\Delta P > 0.05$, $^\Delta P < 0.05$ vs control.

4 Plk1 的削减致 A549 细胞周期阻滞于 G₂/M 期并发生凋亡

流式细胞术用于分析转染 pcDNA3-Plk1 的 A549 细胞有无特定细胞周期的阻滞。转染 pcDNA3-Plk1 后 24 h, A549 细胞周期与对照组比较无显著差异; 转染后 48 h, S 期细胞减少 ($P < 0.05$), G₂/M 细胞增多 ($P < 0.05$), 并有亚 G₁ 峰形成 (表 3)。至转染后 72 h, 亚 G₁ 峰值明显升高, 提示凋亡细胞增多。

表 3 反义 RNA 分子对 A549 细胞周期的影响

Tab 3 Effect of antisense RNA transfection on cell cycle distribution of A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Group	48 h after transfection				72 h after transfection			
	Apoptosis rate (%)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	Apoptosis rate (%)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	0.4 ± 0.2	50.8 ± 2.5	29.5 ± 1.6	21.8 ± 1.6	0.4 ± 0.3	51.1 ± 2.6	28.7 ± 2.3	20.6 ± 3.2
pcDNA3	$0.5 \pm 0.3^\Delta$	48.5 ± 3.4	$28.1 \pm 2.1^\Delta$	$19.9 \pm 2.8^\Delta$	$0.5 \pm 0.3^\Delta$	49.6 ± 2.9	$27.2 \pm 3.4^\Delta$	$19.4 \pm 2.8^\Delta$
pcDNA3-Plk1	$0.5 \pm 0.4^\Delta$	43.2 ± 5.2	$19.8 \pm 3.6^\Delta$	$28.5 \pm 3.2^\Delta$	$18.6 \pm 2.2^\Delta$ ■	40.4 ± 1.9	$9.4 \pm 2.1^\Delta$ ■	$30.6 \pm 2.6^\Delta$ ■

$^\Delta P > 0.05$, $^\Delta P < 0.05$ vs control; ■ $P < 0.05$ vs the same transfection group for 48 h.

5 化疗敏感性分析

MTT 分析结果显示, 诺维本作用 24 h 后, 各组细胞的抑制率均随诺维本浓度的增加而增加, 但增加的幅度不同, 以转染 pcDNA3-Plk1 组最为显著。IC₅₀ 的计算结果显示, 转染 pcDNA3-Plk1 组的 IC₅₀ 值为 $[(7.25 \pm 0.12) \mu\text{mol/L}]$, 较转染 pcDNA3 组 $[(13.04 \pm 0.20) \mu\text{mol/L}]$ 低 44.4%, 较对照细胞 $[(14.38 \pm 0.26) \mu\text{mol/L}]$ 低 49.38%。

讨 论

细胞分裂的正常进行对维持肿瘤的生长至关重要, Plk1 参与有丝分裂的各个环节。Cdc2/cyclin B 是细胞进入 M 期的触发因素, 可被 Cdc25C 去磷酸

化激活^[6]。体外研究表明^[7], 纯化重组的 Plk1 蛋白可磷酸化激活重组的 Cdc25C, 且这一反应具有时间和浓度依赖性。细胞内 Plk1 通过何种机制激活 Cdc25C 目前尚不清楚, 有实验认为 Plk1 除可激活 Cdc25C 的磷酸脂酶活性外, 尚可促进其核转位^[8] 从而更直接地发挥功能。Plk1 的降解使得此信号通路不能被激活, 细胞进入 M 期受阻而停滞在 G₂/M 期。但现今亦有与此相反的结论, Liu 等^[9] 的研究显示降低 Plk1 的表达后能增加 Cdc2/cyclin B 的活性; van Vugt 等^[10] 则观察到 Plk1 削减的细胞未发生 G₂/M 期阻滞, 而表现为分裂后期和胞质分裂的异常, 故而认为尽管 Plk1 是参与有丝分裂进程的重要分子, 但它不是启动有丝分裂的决定因素。本实验中因未进

行激酶活性的测定,所以不清楚 Cdc2/cyclin B 的活性变化,但流式细胞术的结果显示转染 pcDNA3 - Plk1 48 h 后 A549 细胞中 4N DNA 含量增加,G₂/M 期细胞明显增多,提示发生 G₂/M 期阻滞。这说明削减 Plk1 的效应在不同的细胞中可能存在差异,但有丝分裂的异常却是它们的共同点,只是在时间点上有所不同。

凋亡是转染 pcDNA3 - Plk1 细胞的另一个显著特征,表现为亚 2N DNA 含量增加,“亚 G₁ 峰”形成。Plk1 的降解可通过多种途径引发细胞凋亡。Liu 等^[11]发现降低 HeLa 细胞中 Plk1 的表达水平后能诱导细胞凋亡,并检测到凋亡效应蛋白 caspase 8、caspase 9 和 caspase 3 的活性片段,表明受体介导的凋亡途径和线粒体途径均有参与。p53 蛋白亦是参与细胞凋亡的重要因子,对受体途径和线粒体途径均有作用。研究表明 Plk1 与 p53 的功能活性密切相关^[12],Plk1 结合于 p53 的 DNA 结合域,参与调节 p53 的稳定性,并抑制 p53 的转录因子活性和促凋亡活性。实验中 Western blotting 的结果也表明转染 pcDNA3 - Plk1 组中 p53 的表达水平增高,提示 Plk1 表达下调后 p53 稳定性增加。p53 的表达升高可通过激活 CD95、TRAIL、Apaf - 1、Bax 等众多参与细胞凋亡的核心分子以启动细胞凋亡^[13]。

诺维本是现今治疗非小细胞肺癌的首选药物,对微管蛋白有高度的亲和力,可阻滞微管蛋白聚合形成微管,诱导微管解聚,使细胞周期停止于 G₂ 期及有丝分裂中期,并诱导细胞凋亡^[4]。Plk1 羧基端的 polo 盒也能与微管相结合,抑制 Plk1 表达后微管蛋白聚合不良,影响纺锤体的组装以及胞核、胞质分裂,故此推测抑制 Plk1 的表达应和诺维本存在协同效应。实验结果提示诺维本作用 24 h 后,各组细胞的抑制率均随诺维本浓度的增加而增加,但增加的幅度不同,以转染 pcDNA3 - Plk1 组最为显著。IC₅₀ 的计算结果表明 pcDNA3 - Plk1 的转染将 A549 细胞对诺维本的敏感性提高了约 3 倍。因此,Plk1 是极有价值的肿瘤基因治疗靶位,Plk1 的表达降低在整体实验中的效应将是进一步的研究方向。

[参 考 文 献]

- [1] Donaldson MM, Tavares AA, Hagan IM, et al. The mitotic roles of Polo - like kinase[J]. J Cell Sci, 2001, 114 (Pt 13): 2357 - 2358.
- [2] van Vugt MA, Bras A, Medema RH. Restarting the cell cycle when the checkpoint comes to a halt[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7037 - 7040.
- [3] Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, et al. Polo - like kinases (Plks) and cancer[J]. Oncogene, 2005, 24 (2): 287 - 291.
- [4] Jung M, Grunberg S, Timblin C, et al. Paclitaxel and vinorelbine cause synergistic increase in apoptosis but not in microtubular disruption in human lung adenocarcinoma cells(A - 549)[J]. Histochem Cell Biol, 2004, 121 (2): 115 - 121.
- [5] 周廷潮, 韩 锐, 胥 彬. 多种药物协同及拮抗作用的定量分析原理在化疗中的应用[A]. 见: 韩锐 主编. 肿瘤化学预防及药物治疗[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1991. 315.
- [6] van Vugt MA, Smits VA, Klompmarker R, et al. Inhibition of Polo - like kinase - 1 by DNA damage occurs in an ATM - or ATR - dependent fashion[J]. J Biol Chem, 2001, 276(45): 41656 - 41660.
- [7] Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, et al. The human Polo - like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase[J]. Cell Signal, 2000, 12(6): 405 - 411.
- [8] Toyoshima - Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase[J]. EMBO Rep, 2002, 3(4): 341 - 348.
- [9] Liu X, Erikson RL. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(13): 8672 - 8676.
- [10] van Vugt MA, van De Weerd BC, Vader G, et al. Polo - like kinase - 1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis[J]. J Biol Chem, 2004, 279(35): 36841 - 36854.
- [11] Liu X, Erikson RL. Polo - like kinase (plk) 1 depletion induces apoptosis in cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(10): 5789 - 5794.
- [12] Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, et al. Polo - like kinase 1(Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (24): 25549 - 25561.
- [13] 周彩虹, 黄启福. 凋亡与肿瘤及其治疗进展[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(11): 2124 - 2133.