

# 胃良恶性病变组织中 CHK1 和 PLK1 的表达及意义

姚宏亮, 杨竹林, 李永国

(中南大学湘雅二医院普外科, 长沙 410011)

**[摘要]** 目的:研究胃良恶性病变组织中细胞周期检测点激酶 1 (CHK1) 和 Polo 样激酶 1 (PLK1) 的表达水平及其临床病理意义。方法:收集 59 例胃癌、20 例癌旁组织、42 例淋巴结转移灶及 95 例不同类型胃良性病变(浅表性胃炎 20 例,萎缩性胃炎 20 例,胃溃疡 20 例,胃息肉 35 例),手术切除或胃镜活检标本常规制作石蜡包埋切片。采用 Envision™ 免疫组织化学法检测 CHK1 和 PLK1 的表达。结果:胃癌组织 CHK1 表达阳性率明显高于各类型胃良性病变组织 ( $P < 0.01$ );胃癌 PLK1 表达阳性率明显高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ) 和各类型胃良性病变组织 ( $P < 0.01$ ),且 PLK1 阳性表达的胃良性病变均呈不典型增生;CHK1 和 PLK1 在淋巴结转移灶和其相应原发灶中表达无明显差异 ( $P > 0.05$ );组织学分级 II 级病例 CHK1 表达阳性率明显低于组织学分级 III + IV 级 ( $P < 0.05$ );无淋巴结转移病例 CHK1 和 PLK1 表达阳性率明显低于淋巴结转移病例 ( $P < 0.05$ );胃癌组织中 CHK1 和 PLK1 表达存在相关性 ( $P < 0.05$ )。结论:CHK1 和 PLK1 表达水平可能是反映胃癌发生、进展、生物学行为及指导临床辅助治疗的重要激酶类生物学指标。

**[关键词]** 胃肿瘤; 胃疾病; 细胞周期检测点激酶 1; Polo 样激酶 1; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2010.10.008

## Expression of checkpoint kinase 1 and polo-like kinase 1 and its clinicopathological significance in benign and malignant lesions of the stomach

YAO Hongliang, YANG Zhulin, LI Yongguo

(Department of General Surgery, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

**Abstract:** **Objective** To determine the expressive level of checkpoint kinase 1 (CHK1) and polo-like kinase 1 (PLK1) and to detect their clinicopathological significance in benign and malignant lesions of the stomach. **Methods** Envision Tm immunohistochemistry was used to detect the expression level of CHK1 and PLK1 in conventional paraffin-embedded sections from specimens of primary foci ( $n = 59$ ) and metastatic foci of lymph node ( $n = 42$ ) of gastric cancer, peritumoral tissues ( $n = 20$ ), and benign lesions of the stomach ( $n = 95$ ). **Results** The positive rates of CHK1 were significantly higher in gastric cancer than that in different types of benign lesions ( $P < 0.01$ ). The positive rates of PLK1 were significantly higher in gastric cancer than that in peritumoral tissues ( $P < 0.05$ ) and different types of benign lesions ( $P < 0.01$ ), and the positive cases of PLK1 in benign lesion showed atypical hyperplasia. No significant difference of CHK1 and PLK1 expression was found

收稿日期 (Date of reception) 2010-01-25

作者简介 (Biography) 姚宏亮, 博士, 教授, 主要从事胃肠道肿瘤的基础研究和临床诊断治疗。

通信作者 (Corresponding author) 杨竹林, E-mail: yangzhulin@sina.com

between metastatic foci and corresponding primary foci ( $P > 0.05$ ). The positive rates of CHK1 and PLK1 were significantly lower in the non-metastatic lymph node than that in the metastatic lymph node ( $P < 0.05$ ). The positive rate of CHK1 was significantly lower in histologic grade II than that in the histologic grade III + IV ( $P < 0.05$ ). Positive correlation was found between the expression of CHK1 and PLK1 in gastric cancer tissues ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The expression level of CHK1 and /or PLK1 might be important biological markers of kinases to reflect the carcinogenesis, progression, biological behaviors, and guide clinical auxiliary treatment of gastric cancer.

**Key words:** stomach neoplasms; stomach diseases; checkpoint kinase 1; polo-like kinase 1; immunohistochemistry

细胞周期检测点激酶 1 (checkpoint kinase 1, CHK1) 是细胞周期检测点 ( $G_1/S$ , S 和  $G_2/S$ ) 发挥作用的主要激酶。肿瘤放化疗导致 DNA 损伤后, DNA 损伤修复系统立即启动, 并激活细胞周期检测点出现细胞周期阻滞, 促进 DNA 修复; 抑制 CHK1 蛋白表达, 可有效消除肿瘤细胞在放化疗后的周期阻滞, 增加放化疗的敏感性。CHK1 的表达水平除与恶性肿瘤发生、发展及生物学行为有关外, 尤与放化疗等辅助治疗的效果密切相关<sup>[1-7]</sup>。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, 对细胞周期的正常进行、中心体成熟及肿瘤发生等均有重要影响<sup>[7-16]</sup>。目前有关 CHK1 和 PLK1 在胃癌组织中表达的研究文献报道较少, 作者应用 Envision™ 二步免疫组织化学法研究胃癌、癌旁组织和多种胃良性病变组织中 CHK1 和 PLK1 的表达水平并探讨其临床病理意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本分组及其临床病理资料

(1) 胃癌患者 59 例, 其中男性 40 例, 女性 19 例, 年龄 35 ~ 72 ( $49.5 \pm 15.8$ ) 岁。病理类型包括中分化腺癌 16 例, 低分化腺癌 31 例和其他类型癌 12 例 (黏液腺癌 6 例, 印戒细胞癌 5 例和未分化癌 1 例); 组织学分级包括 II 级 20 例、III 级 32 例和 IV 级 7 例; 癌细胞侵袭深度包括  $T_1$  2 例、 $T_2$  9 例、 $T_3$  40 例和  $T_4$  8 例; 无区域淋巴结转移 17 例和有转移 42 例; 淋巴结转移病例包括  $N_1$  站 17 例、 $N_2$  站 18 例和  $N_3$  站 7 例; 共有 11 例发生远处器官转移, 包括肝转移 6 例、肺转移 2 例和卵巢

转移 3 例。(2) 淋巴结转移灶取自上述胃癌区域淋巴结转移的转移灶, 共 42 例, 其中男性 31 例, 女性 11 例, 年龄 35 ~ 72 ( $46.9 \pm 15.8$ ) 岁。病理证实转移灶均为腺癌, 病理类型均与原发性灶等同, 组织学分级 II 级 12 例, III 级 23 例和 IV 级 7 例。(3) 癌旁组织 20 例, 距癌组织 3 ~ 5 cm, 取自上述癌组织旁, 病理证实胃黏膜上皮正常至轻度不典型增生 13 例, 中度至重度不典型增生者 7 例。(4) 浅表性胃炎 20 例, 其中男性 10 例, 女性 10 例; 年龄 35 ~ 45 岁 ( $42.5 \pm 6.8$ ) 岁, 病理诊断均为浅表性胃炎。(5) 慢性萎缩性胃炎 20 例, 其中男性 12 例, 女性 8 例; 年龄 38 ~ 47 ( $43.5 \pm 6.5$ ) 岁, 病理诊断均为萎缩性胃炎, 其中轻度、中度和重度萎缩性胃炎分别为 6 例、8 例和 6 例, 6 例重度萎缩性胃炎均伴有胃黏膜中至重度不典型增生, 8 例中度萎缩性胃炎伴中度和重度不典型增生各 1 例。(6) 胃溃疡 20 例, 其中男性 12 例, 女性 8 例; 年龄 35 ~ 55 ( $42.8 \pm 7.4$ ) 岁; 溃疡大小 1 ~ 2.5 cm, 病理诊断均为胃溃疡, 伴胃黏膜中至重度不典型增生 8 例。(7) 胃息肉 35 例, 其中男性 21 例, 女性 14 例; 年龄 35 ~ 60 ( $44.9 \pm 8.2$ ) 岁; 病理诊断为息肉和/或腺瘤, 伴胃黏膜中至重度不典型增生 11 例。所有标本来源于中南大学湘雅二医院 2003 年 1 月至 2004 年 12 月手术切除标本或胃镜活检标本, 经 4% 甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片, 切片厚 4  $\mu\text{m}$ 。

### 1.2 主要试剂

鼠抗人 CHK1 和 PLK1 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, EnVision™ 试剂盒 (兔/鼠) 购自瑞士 Dako 公司。

### 1.3 方法

CHK1 和 PLK1 染色均采用 EnVision™ 二步免疫组织化学法,严格按试剂说明书染色步骤操作,具体染色步骤略。细胞质和(或)细胞核含棕黄色颗粒者为 CHK1 和 PLK1 阳性细胞,随机观察切片中 5 个高倍视野( $\times 400$ )并分别计算阳性细胞率,5 个视野阳性细胞率均值  $\geq 25\%$  定为阳性病例, $< 25\%$  定为阴性病例。以福建迈新生物技术公司提供的阳性切片作为阳性对照,以 0.01 mmol/L PBS 液(pH7.4)替代一抗作为染色的阴性对照。

### 1.4 统计学处理

将所得数据输入 SPSS13.0 统计软件包中进行统计学处理;2 组之间比较行  $\chi^2$  检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ , $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

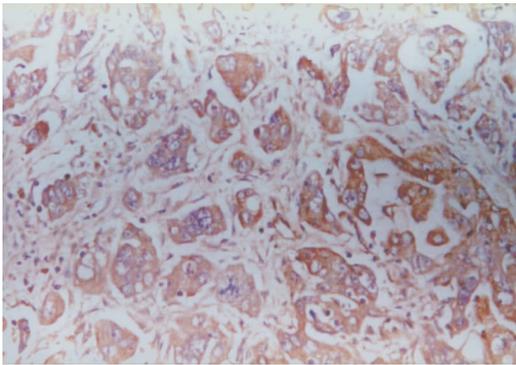


图1 胃中分化腺癌中 CHK1 阳性表达(Envision™免疫组织化学法, $\times 200$ )。

Fig. 1 Positive expression of CHK1 in moderate-differentiated adenocarcinoma of the stomach (Envision™,  $\times 200$ ).

## 2 结果

### 2.1 CHK1 和 PLK1 在胃良恶性病变组织中的表达

CHK1 和 PLK1 免疫组织化学阳性产物主要定位于细胞质,部分病例细胞质和细胞核同时着色(图1,2)。胃癌组织 CHK1 表达阳性率明显高于浅表性胃炎、萎缩性胃炎、胃溃疡和胃息肉( $P < 0.01$ ,表1),但与癌旁组织差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表1);胃癌组织 PLK1 表达阳性率明显高于癌旁组织( $P < 0.05$ ,表1)及各类型胃良性病变组织( $P < 0.01$ ,表1),且 PLK1 阳性表达的胃良性病变均呈不同程度不典型增生。

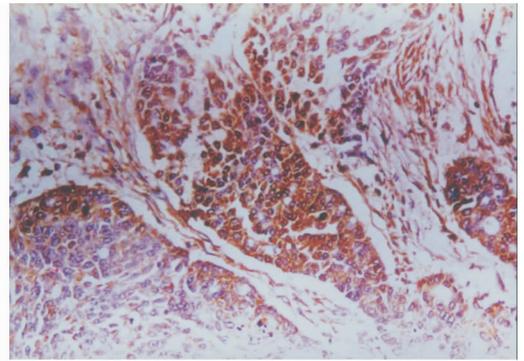


图2 胃低分化腺癌中 PLK1 阳性表达(Envision™免疫组织化学法, $\times 200$ )。

Fig. 2 Positive expression of PLK1 in poor-differentiated adenocarcinoma of the stomach (Envision™,  $\times 200$ ).

表1 胃良恶性病变组织中 CHK1 和 PLK1 表达情况

Tab. 1 Expression levels of CHK1 and PLK1 in benign and malignant lesions of stomach

病理类型	例数	CHK1			PLK1		
		阳性数(%)	$\chi^2$	<i>P</i>	阳性数(%)	$\chi^2$	<i>P</i>
浅表性胃炎	20	1(5.0)	17.77	$< 0.01$	0(0.00)	19.21	$< 0.01$
萎缩性胃炎	20	2(10.0)	14.59	$< 0.01$	2(10.0)	12.77	$< 0.01$
胃溃疡	20	4(20.0)	9.24	$< 0.01$	2(10.0)	12.77	$< 0.01$
胃息肉	35	10(28.6)	8.32	$< 0.01$	6(17.1)	13.61	$< 0.01$
癌旁组织	20	8(40.0)	2.25	$> 0.05$	4(20.0)	7.75	$< 0.05$
胃癌	59	35(59.3)			33(55.9)		

### 2.2 胃癌淋巴结转移灶 CHK1 和 PLK1 表达情况

42 例淋巴结转移灶 CHK1 和 PLK1 阳性病例分别为 25 例(59.5%)和 26 例(61.9%);其相应原发灶 CHK1 和 PLK1 阳性病例分别为 28 例(66.7%)和 29 例(69.1%);转移灶和原发灶相比,CHK1 和 PLK1 表达阳性率均无明显差异( $\chi^2_{CHK1} = 0.46$ , $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{PLK1} = 0.47$ , $P > 0.05$ )。

### 2.3 CHK1 和 PLK1 表达与胃癌主要临床病理特征的关系

组织学分级 II 级和淋巴结未转移病例 CHK1

表达阳性率分别明显低于组织学分级 III + IV 级和淋巴结转移病例 ( $P < 0.05$ , 表 2); 淋巴结未转移病例 PLK1 表达阳性率明显低于淋巴结转移病例 ( $P < 0.05$ , 表 2)。浸润深度  $T_1 + T_2$ 、淋巴结转移  $N_1$  站及远处未转移病例 CHK1 和 PLK1 表达阳性率低于浸润深度  $T_3 + T_4$ 、淋巴结转移  $N_2 + N_3$  站及远处转移病例, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 组织学分级 II 级病例 PLK1 表达阳性率低于组织学分级 III + IV 级, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 CHK1 和 PLK1 表达与胃癌主要临床病理特征的关系

Tab. 2 Relationship among the expression levels of CHK1 and PLK1 and the clinicopathological features in gastric cancer

临床病理特征 例数	CHK1			PLK1		
	阳性数(%)	$\chi^2$	$P$	阳性数(%)	$\chi^2$	$P$
组织学分级						
II 级 20	8(40.0)	4.68	<0.05	8(40.0)	3.11	>0.05
III + IV 级 39	27(69.2)			25(64.1)		
浸润深度						
$T_1 + T_2$ 11	5(45.5)	1.08	>0.05	5(45.5)	0.60	>0.05
$T_3 + T_4$ 48	30(62.5)			28(58.3)		
淋巴结转移						
无 17	6(35.3)	5.71	<0.05	6(35.3)	4.13	<0.05
有 42	29(69.1)			27(64.3)		
淋巴结转移站						
$N_1$ 17	9(52.9)	3.47	>0.05	8(47.1)	3.69	>0.05
$N_2 + N_3$ 25	20(80.0)			19(76.0)		
远处转移						
无 48	26(54.2)	2.84	>0.05	24(50.0)	3.68	>0.05
有 11	9(81.8)			9(81.8)		

2.4 CHK1 和 PLK1 在胃癌组织中表达的相互关系

35 例 CHK1 阳性表达胃癌病例中 PLK1 阳性表达 24 例, 两者表达存在相关性 ( $\chi^2 = 5.58$ ,  $P < 0.05$ )。

3 讨论

CHK1 是  $G_2/M$  检测点活化的重要效应分子。其作用是使细胞阻滞在  $G_2/M$  期, 供受损的 DNA 修复<sup>[1-2]</sup>。近年研究发现 *CHK1* 基因缺陷相关的

肿瘤很少见<sup>[1]</sup>。在外界损伤因素的作用下, 肿瘤细胞充分利用  $G_2/M$  期检测点的活化, 使  $G_2/M$  的阻滞延长, 修复受损的 DNA 而获得耐药性, 因此抑制 CHK1 表达有可能成为逆转肿瘤细胞耐药的一个重要治疗手段<sup>[2,5]</sup>。此外, 近年一些研究<sup>[1-7]</sup>发现 CHK1 除与 DNA 损伤修复有关外, 其表达水平也与一些恶性肿瘤进展及生物学行为有较密切的关系, CHK1 高水平表达者多分化差和临床分期高, 因此 CHK1 可作为评估恶性肿瘤预后的重要指标<sup>[1-7]</sup>。本组资料发现: 胃癌组织 CHK1 表达阳性率明显高于各类型胃良性病变组织, 但与癌旁组织相比差异无统计学意义; 组织学分级 II 级、浸润深度  $T_1 + T_2$ 、无淋巴结转移、淋巴结转移  $N_1$  站及无远处器官转移病例 CHK1 表达阳性率低于组织学分级 III + IV 级、浸润深度  $T_3 + T_4$ 、淋巴结转移、淋巴结转移  $N_2 + N_3$  站及远处器官转移病例, 但只有组织学分级和淋巴结转移方面的差异有统计学意义。此结果与国内外学者在其他良恶性肿瘤的报道较一致, 提示 CHK1 除通过其本身的生物学作用参与 DNA 损伤修复外, 也可能通过其他方式影响胃癌的进展、转移及生物学行为, 但其作用机制有待更深入研究。

PLK1 具有调控细胞周期、抑制肿瘤细胞凋亡及促进肿瘤形成等作用。PLK1 在  $G_1$  期几乎检测不出, 于 S 期开始积累,  $G_2$  及 M 期表达水平较高, 分裂完成后急剧减少。当 DNA 受损时, PLK1 在 M 期检测点发挥作用, 从而使细胞阻滞于 M 期<sup>[8-9,15]</sup>。放疗后的 DNA 受损肿瘤细胞被阻滞于  $G_2/M$  周期检测点, 客观上为肿瘤细胞生存提供了条件, 这也是临床上肿瘤放疗抵抗和化疗耐药产生的重要机制。因此, 将 CHK1, PLK1 等周期检测点激酶作为放疗增敏的靶点, 可能是较理想的肿瘤治疗策略<sup>[8-9,15]</sup>。新近一些文献<sup>[10-17]</sup>报道: 大多数恶性肿瘤组织 PLK1 呈高表达, 而在相应的正常组织及良性病变组织中多呈低表达, 且其表达水平与恶性肿瘤的进展及生物学行为和预后关系密切。本组资料显示: 胃癌组织 PLK1 表达阳性率明显高于癌旁组织及各类型胃良性病变组织, PLK1 阳性表达的胃良性病变多呈不典型增生; 淋巴结未转移病例 PLK1 表达明显低于转移病例; 组织学分级 II 级、浸润深度  $T_1 + T_2$ 、淋巴结转移  $N_1$  站及远处未转移病例 PLK1 表达

阳性率低于组织学分级Ⅲ+Ⅳ级、浸润深度 $T_3$ + $T_4$ 、淋巴结转移 $N_2$ + $N_3$ 站及远处转移病例,但差异均无统计学意义;胃癌组织中CHK1和PLK1表达存在相关性。上述结果提示:PLK1表达水平除与受损DNA修复有关外,也与胃癌发生进展及生物学行为有较密切关系,尤其与胃癌转移关系密切;胃癌组织中CHK1和PLK1之间可能存在内在密切联系,有待更深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] Bartek J, Lukas J. Chk1 and chk2 kinases in checkpoint control and cancer[J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(5):421-429.
- [2] Senderowicz A M. Novel direct and indirect cyclin-dependent kinase modulators for the prevention and treatment of human neoplasms[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, 52(suppl):s61-s73.
- [3] Zhang W H, Poh A, Fanous A A, et al. DNA damage-induced S phase arrest in human breast cancer depends on chk1, but G<sub>2</sub> arrest can occur independently of chk1, chk2 or MAPKAPK2[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(11):1668-1677.
- [4] Verlinden L, Vande Bempt I, Eelen G, et al. The E2F-regulated gene chk1 is highly expressed in triple-negative estrogen receptor/progesterone receptor/HER-2 breast carcinomas[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(14):6574-6581.
- [5] Matsumoto K, Nagahara T, Okano J, et al. The growth inhibition of hepatocellular and cholangiocellular carcinoma cells by gemcitabine and the roles of extracellular signal-regulated and checkpoint kinases[J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(4):863-872.
- [6] Menoyo O A, Alazzouzi H, Espin E, et al. Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(21):7727-7730.
- [7] 马全富,黄晓园,高庆蕾,等. CHK1/2 and PLK1蛋白在子宫内膜癌中的表达[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(6):424-426.
- [8] MA Quanfu, HUANG Xiaoyuan, GAO Qinglei, et al. Expression of CHK1/2 and plk1 protein in endometrial carcinoma[J]. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2008, 35(6):424-426.
- [9] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(1):60-65.
- [10] Martin B T, Strebhardt K. Polo-like kinase1: target and regulator of transcriptional control[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(24):2881-2885.
- [11] Wang X Q, Zhu Y Q, Luis K S, et al. Aberrant polo-like kinase1-cdc25A pathway in metastatic hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21):6813-6820.
- [12] Rizki A, Mott J D, Bissell M J. Polo-like kinase1 is involved in invasion through extracellular matrix[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(23):1106-1110.
- [13] Denkert C, Thoma A, Niesporek S, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia-association with increased expression of polo-like kinase-1[J]. *Prostate*, 2007, 67(4):361-369.
- [14] Kanaji S, Saito H, Tsujitani S, et al. Expression of polo-like kinase1 (PLK1) protein predicts the survival of patients with gastric carcinoma[J]. *Oncology*, 2006, 70(2):126-133.
- [15] Weichert W, Schmidt M, Jacob J, et al. Overexpression of polo-like kinase1 is a common and early event in pancreatic cancer[J]. *Pancreatology*, 2005, 5(2/3):259-269.
- [16] Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, et al. Polo-like kinases (PLKs) and cancer[J]. *Oncogene*, 2005, 24(2):287-291.
- [17] Takahashi T, Sano B, Nagata T, et al. Polo-like kinase1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers[J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(2):148-152.
- [18] Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, et al. Overexpression of polo-like kinase1 (PLK1) and chromosomal instability in bladder cancer[J]. *Oncology*, 2006, 70(3):231-237.

(本文编辑 郭征)