

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.002

抑制 Polo 样激酶 1 对鼻咽癌细胞辐射敏感性的影响

杨红丽^{1a,2}, 王栢耀^{1b}, 袁亚维^{1b}(1. 南方医科大学 a. 第一临床医学院 临床医学八年制 2008 级, b. 南方医院 放疗科, 广东 广州 510515; 2. 深圳市人民医院 放疗科, 广东 深圳 518020)

[摘要] **目的:** 探索抑制 Polo 样激酶 1 (Polo-like kinase 1, PLK1) 对鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 细胞 CNE-1 和 CNE-2 辐射敏感性的影响。**方法:** 分别运用 siRNA 和小分子抑制剂 BI2536 抑制 CNE-1 和 CNE-2 细胞内 PLK1 的表达或磷酸化, 通过 MTT 法检测抑制 PLK1 对 NPC 细胞增殖能力的影响, 流式细胞技术检测对细胞周期和凋亡的影响, 细胞免疫荧光检测对辐射后 DNA 损伤位点的影响, 克隆形成实验及曲线拟合计算对辐射后细胞放射生物参数和放射增敏比 (sensitization enhancement ratio, SER) 的影响。**结果:** 与对照组相比, 抑制 PLK1 可以明显抑制 NPC 细胞增殖, 并诱导细胞发生 G2-M 期阻滞和有丝分裂灾难。抑制 NPC 细胞 PLK1 联合射线辐射后, NPC 细胞克隆形成能力下降 (CNE-1: $P < 0.05$; CNE-2: $P < 0.05$), 且随着 BI2536 浓度的增大克隆形成能力下降更加明显 (CNE-1: $P < 0.05$; CNE-2: $P < 0.05$); 细胞生存分数明显降低 (均 $P < 0.05$); 核中 γ -H2AX 位点数目明显增加 ($P < 0.05$); 细胞凋亡率显著升高 (均 $P < 0.05$); siR-PLK1 转染 CNE-1 和 CNE-2 后 SER 分别为 1.1988 和 1.3198, BI2536 处理 CNE-1 和 CNE-2 后 SER 分别为 1.5508 和 1.2028。**结论:** 抑制 PLK1 可以抑制 NPC 细胞增殖, 诱导发生细胞周期阻滞和有丝分裂灾难, 并能显著提高 NPC 细胞辐射敏感性。

[关键词] Polo 样激酶 1; 鼻咽癌; 小分子抑制剂 BI2536; 辐射敏感性

[中图分类号] R739.63; R730.55; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)03-0222-08

Effect of inhibiting Polo-like kinase 1 on radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells

YANG Hongli^{1a,2}, WANG Baiyao^{1b}, YUAN Yawei^{1b}(1. a. Grade 2008, Eight-Year Track Clinical Medicine, First Clinical Medical College, b. Department of Radiation Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China; 2. Department of Radiation Oncology, Shenzhen Peoples' Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effect of inhibiting Polo-like kinase 1 (PLK1) on radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma (NPC) CNE-1 and CNE-2 cell lines. **Methods:** Using small interfering RNA (siRNA) and small molecule inhibitor BI2536 to inhibit expression and phosphorylation of PLK1 in the CNE-1 and CNE-2 cells respectively. Effect of inhibiting PLK1 on proliferation ability of the NPC cells was tested by MTT assay. Flow cytometry assay was used to detect effect of the inhibition on cell cycle and apoptosis of the NPC cells and immuno fluorescence assay was used to assess the effect of damage sites of DNA in the NPC cells after radiation. Clone formation experiment and curve fitting assay were used to calculate radiation parameters and sensitization enhancement ratio (SER) of the NPC cells after radiation. **Results:** Compared with the control group, inhibition of PLK1 in the NPC cells reduced proliferation of the NPC cells and, induced G2-M arrest and mitotic catastrophe of the NPC cells. Inhibition of PLK1 in the NPC cells combined with

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81572964, No. 81274508); 广东省自然科学基金资助项目 (No. 2014A030313289); 广东省教育厅科研资助项目 (No. 2013KJ CX0038)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81572964, No. 81274508), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2014A030313289), and the Science Research Project from Educational Commission of Guangdong Province (No. 2013KJ CX0038)

[作者简介] 杨红丽 (1992 -), 女, 博士, 主要从事肿瘤放射治疗基础及临床研究, E-mail: yanghl66@126.com

[通信作者] 袁亚维 (YUAN Yawei, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事胶质瘤、鼻咽癌、乳腺癌等放射治疗相关基础及临床研究, E-mail: yuanyawei2015@outlook.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170305.1505.026.html>

irradiation significantly decreased ability of cell colony formation in the NPC cells (CNE-1: $P < 0.05$, CNE-2: $P < 0.05$), and with increasing concentration of the B12536, the ability of cell colony formation in the NPC more pronounced declined (CNE-1: $P < 0.05$, CNE-2: $P < 0.05$). In addition, Inhibition of PLK1 in the NPC cells combined with irradiation reduced the cell survival fraction, increased the number of γ -H2AX loci in nucleus of the cells, and accelerated apoptosis rate of the cells obviously (all $P < 0.05$). SER of the CNE-1 and the CEN2 cells were 1.1988 and 1.3198 respectively after transfection of them with siR-PLK1. And SER of the CNE-1 and the CEN-2 cells were 1.5508 and 1.2028 respectively after treatment of them with the B12536. After treatment of the CEN-1 and the CEN-2 cells with the B12536. **Conclusion:** Inhibition of PLK1 could suppress infiltration of the NPC cells, induce cell-cycle arrest and mitotic catastrophe, and significantly enhance radiosensitivity of the NPC cells.

[**Key words**] Polo-like kinase 1 (PLK1); nasopharyngeal carcinoma (NPC); small molecule inhibitor B12536; radiosensitivity

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(3): 222-229. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.002]

Polo 样激酶 1(Polo-like kinase 1, PLK1)是一类广泛存在于真核生物细胞中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,参与调节细胞的有丝分裂、G2-M 期转换、胞质分离、DNA 复制和损伤修复等过程,是细胞内具有重要调节功能的蛋白激酶^[1-3]。PLK1 在多种肿瘤组织中高表达并与患者预后不良密切相关,抑制 PLK1 可以抑制细胞生长,诱导细胞发生 G2-M 期阻滞和细胞凋亡,抑制细胞侵袭和干细胞的产生等^[4-5]。此外,在胶质瘤细胞中抑制 PLK1 还可以加重辐射诱导的细胞毒性,但是对正常细胞却没有明显影响^[6]。因此,PLK1 是抗肿瘤治疗的理想靶点,辐射联合 PLK1 分子抑制剂也成为肿瘤治疗的新策略。目前已研制出多种针对 PLK1 的小分子抑制剂,如 BI2767、GSK461364、GW843682、BI2536 等,并先后投入临床试验中。BI2536 作为一种二氢蝶啶酮类 ATP 竞争性 PLK1 抑制剂,具有抑制肿瘤生长、提高化疗敏感性和辐射敏感性的重要作用^[5,7]。放疗是鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)治疗的重要手段,如何提高 NPC 细胞的辐射敏感性以改善患者预后是目前的研究重点。目前尚无 PLK1 小分子抑制剂在 NPC 中的相关研究,特别在辐射敏感性方面并未见报道。本实验以 NPC 细胞 CNE-1 和 CNE-2 为研究对象,分别使用 siRNA 和 BI2536 抑制 PLK1 的表达和磷酸化,观察其对 NPC 细胞增殖、凋亡、细胞周期和辐射敏感性的影响。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及主要试剂

NPC 细胞株 CNE-1 和 CNE-2(中国科学院上海细胞研究所细胞库)。RPMI 1640 培养基及胎牛血清(Gibco, USA), LipofectaminTM 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Opti-MEMI Reduced Serum Me-

dium(Invitrogen, USA), siR-PLK1/siR-Negative Control(锐博,广州),兔抗 PLK1、兔抗 p-PLK1(Cell Signaling Technology, USA),鼠抗 β -actin(Protein Tech, USA),抗 γ -H2AX 抗体(1:100 稀释,Abcam),兔抗小鼠 AlexaFlour 488 二抗(1:200 稀释,Invitrogen),山羊抗兔 AlexaFlour 568 二抗(1:200 稀释,Invitrogen),细胞周期试剂盒(Cell cycle staining kit)及细胞凋亡试剂盒(Annexin V-APC/7AAD apoptosis kit) (联科,杭州), BI2536 粉剂(Selleck Biochemical, USA)以 DMSO 溶解成 10 mg/ml 储备液,用无菌生理盐水稀释。

1.2 细胞培养与转染分组

CNE-1 和 CNE-2 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。

转染实验前 1 d 将 NPC 细胞按 2×10^5 /ml 的密度接种于 6 孔板中,每孔加入约 2 ml 无抗生素培养基,使转染时细胞密度能达到 70% ~ 80%。

针对 PLK1 设计 3 条不同 siRNA,向 CNE-1 和 CNE-2 细胞分别转染 siR-PLK1/siR -Negative Control (详细步骤参照 LipofectaminTM 2000 说明书)。在 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中培养 6 ~ 8 h 后将培养液换为含血清的完全培养基。转染完成 48 h 后提取细胞蛋白,Western blotting 鉴定 siRNA 的干扰效果,选择干扰效果最佳的 siRNA 进行后续实验。

siRNA-1: 5'-CAACGGCAGCGTGCAGATCAA-3';
siRNA-2: 5'-CCCGAGGTGCTGAGCAAGAAA-3';
siRNA-3: 5'-CGCGGGCAAGATTGTGCCTAA-3'。

1.3 MTT 实验检测抑制 PLK1 对 NPC 细胞增殖的影响

将 siRNA 干扰后的对数生长期 NPC 细胞以 2 000 个/200 μ l 的密度接种于 96 孔板,或将正常

NPC 细胞以 2 000 个/100 μ l 接种于 96 孔板后加入 100 μ l 含 BI2536 的培养基, 使 BI2536 终浓度分别为 10、20、50 nmol/L, 阴性对照组不加任何药物, 各组设置 5 个复孔, 周围孔加 PBS 200 μ l 防止干燥。接种 24、48、72 h 后分别取一块 96 孔板, 每孔加入 50 μ l MTT, 继续孵箱孵育 2 h。除去培养基, 加入 200 μ l DMSO, 震荡 10 min。在波长 490 nm 处测定样品光密度(D)值, 计算细胞相对生长率。细胞相对生长率(%) = $D_{\text{实验组/对照组}}(\text{Time})/D_{\text{实验组/对照组}}(\text{T} = 0 \text{ h}) \times 100\%$ 。

1.4 克隆形成实验检测抑制 PLK1 对 NPC 细胞放射剂量敏感性的影响

将 siRNA 干扰前、后的 NPC 细胞按预定数量接种于 6 孔板, 用含不同浓度(10、20、50 nmol/L) BI2536 培养基处理 12 h, 每组均分为 0、2、4、6、8 Gy 5 个剂量组, 每一剂量组设 3 个复孔。照射后将细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内继续培养。当出现肉眼可见克隆时, 终止培养, 甲醇固定, 1% 结晶紫乙醇溶液染色。显微镜下计数含 50 个细胞以上的克隆数, 计算克隆形成率(planting efficiency, PE), $PE(\%) = \text{克隆数}/\text{接种细胞数} \times 100\%$; 计算存活分数(surviving fraction, SF), $SF = \text{受照射细胞的克隆形成率}/\text{对照细胞的克隆形成率}$ 。以 3 次照射的存活分数均值进行分析, 运用 GraphPad Prism 5.0 软件进行多靶单击模型曲线拟合, 依据此模型公式绘制剂量存活曲线, 并计算 10% 存活分数时的放射剂量增敏比(sensitization enhancement ratio, SER)。

1.5 流式细胞术检测抑制 PLK1 对 CNE-1 细胞周期的影响

收集 siR-NC/siR-PLK1 转染后以及不同浓度 BI2536(10、20、50 nmol/L) 处理后的 CNE-1 细胞(2×10^5)~(1×10^6) 个, PBS 洗涤 1 次, 加入含有 1 ml DNA Staining solution 和 10 μ l Permeabilization solution, 涡旋震荡 5~10 s, 室温避光孵育 30 min 后, 流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.6 流式细胞术检测抑制 PLK1 对 NPC 细胞凋亡的影响

NPC 细胞分别经 siR-NC/siR-PLK1 转染或 BI2536(10 nmol/L) 处理并联合 0 或 6 Gy 辐射处理后, 收集不同处理组细胞, PBS 洗涤 1 次, 加入 5 μ l Annexin-V-APC 和 10 μ l 7-AAD, 混匀后冰上避光孵育 15 min, 加入 380 μ l 1 \times 结合缓冲液后, 流式细胞仪检测细胞凋亡比例。

1.7 细胞免疫荧光实验检测抑制 PLK1 对 NPC 细胞 DNA 损伤的影响

NPC 细胞分别经 siR-NC/siR-PLK1 转染或 BI2536(10 nmol/L) 处理并联合 0 或 6 Gy 辐射处理后, 不同处理组细胞接种于含有盖玻片的 24 孔板内, 细胞经过 6 Gy 照射 24 h 后, 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 用 0.25% Triton \times 100 对细胞打孔, 随后用 1% 山羊血清封闭抗原 30 min, 加入抗 γ -H2AX 抗体后 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 PBS 清洗细胞, 加入兔抗小鼠 AlexaFlour 488 二抗和山羊抗兔 AlexaFluor 568 二抗, 常温下避光孵育 1 h。用 PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 min。用加入了 DAPI 的荧光固定介质固定细胞。在荧光显微镜下观察细胞, 人工点数细胞核内的 γ -H2AX 荧光点(1 000 倍; $n = 5$)。

1.8 Western blotting 检测 siRNA 干扰及 BI2536 处理对 NPC 细胞内 PLK1 及其磷酸化的影响

将 siRNA 干扰或不同浓度 BI2536(10、20、50 nmol/L) 处理后的 NPC 细胞用 RIPA 提取细胞总蛋白, 测定蛋白浓度, 取等量蛋白经 SDS-PAGE 分离后转至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别用兔抗 PLK1、兔抗 p-PLK1 及鼠抗 β -actin 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日与辣根酶标记羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗室温孵育 1 h, 最后进行曝光显影。

1.9 统计学处理

使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 根据不同需要采用完全随机设计资料的方差分析(One-way ANOVA) 或两独立样本的 t 检验(independent-sample t test) 统计学方法对数据进行分析处理。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 PLK1 可以抑制 NPC 细胞的生长和增殖

根据 Western blotting 检测结选出干扰效果最明显的 siRNA-2 进行后续实验。由于小分子抑制剂 BI2536 并不能直接抑制 PLK1 的表达, 而是通过竞争性结合 ATP 结合域抑制 PLK1 磷酸化, 通过 Western blotting 验证, 结果(图 1) 显示 BI2536 组细胞内 p-PLK1 水平降低。

CNE-1 和 CNE-2 用 siR-PLK1 抑制 *PLK1* 表达后, MTT 检测结果(图 2) 显示, 与对照组相比抑制 *PLK1* 后细胞相对生长率显著降低(CNE-1: $P < 0.01$; CNE-2: $P < 0.01$)。分别用 10、20、50 nmol/L 浓度的 BI2536 处理 CNE-1 和 CNE-2 细胞, MTT 结果显示随着药物浓度的增大, 对 NPC 增殖的抑制效果更加明显, 不同处理组间均具有显著差异(CNE-1: $P < 0.01$; CNE-2: $P < 0.01$)。

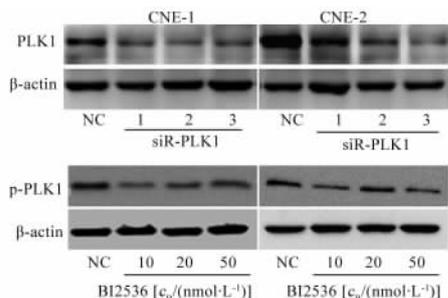
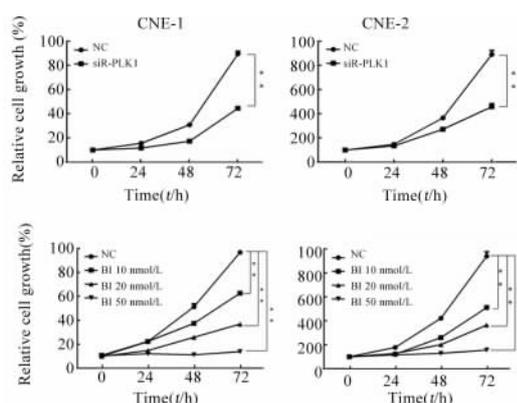


图 1 siRNA-PLK1 和 BI2536 分别抑制鼻咽癌细胞中 PLK1 的表达或磷酸化

Fig.1 siRNA-PLK1 and BI2536 inhibited the expression or phosphorylation of PLK1 in NPC cells respectively



** $P < 0.01$ vs NC group

图 2 抑制 PLK1 降低鼻咽癌细胞增殖能力

Fig.2 Inhibition of PLK1 reduced the proliferation of the NPC cells

进一步用 siR-PLK1 和不同质量浓度的 BI2536 处理 CNE-1 和 CNE-2 细胞后行克隆形成实验, 结果显示, 抑制 PLK1 后 NPC 细胞的克隆形成数显著低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且随着 BI2536 浓度的增大克隆形成数下降更加明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.05$) (图 3)。

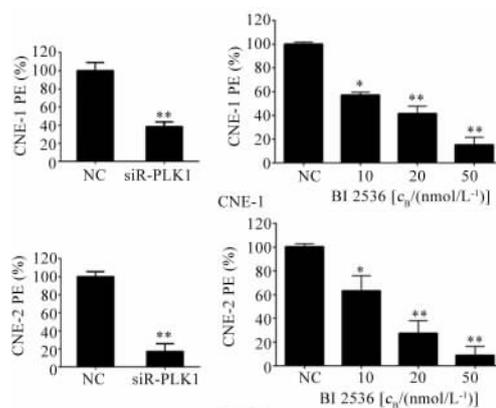
2.2 抑制 PLK1 诱导 NPC 细胞 G2-M 期阻滞

通过流式细胞技术检测细胞周期变化, 结果 (图 4A) 显示 siR-PLK1 抑制 PLK1 可以导致 G2-M 期细胞比例明显增加 ($P < 0.05$), 细胞发生 G2-M 期阻滞。分别用 10、20、50 nmol/L 浓度的 BI2536 处理 CNE-1 细胞 12 h 后进行检测, 结果显示 (图 4B), 与对照组相比, 经过 BI2536 处理后, G2-M 期细胞比例增加, 且随着浓度增大 G2-M 期细胞比例增加更为明显, 不同处理组间均具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.3 抑制 PLK1 导致 NPC 细胞有丝分裂灾难

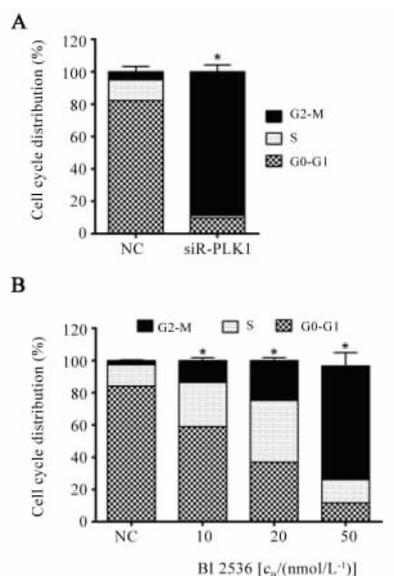
使用 siR-PLK1 抑制 NPC 细胞 CNE-1 中 PLK1

的表达, 计数异常细胞核细胞数, 结果显示抑制 PLK1 可以导致 NPC 细胞中异常细胞核的细胞数增加 (37.333 ± 2.517 vs 1.667 ± 1.155 , $t = -22.311$, $P < 0.05$) (图 5A)。用不同浓度的 BI2536 处理 CNE-1 细胞 12、24 和 48 h, 结果显示, 随着药物浓度的增加和处理时间的延长, 出现有丝分裂灾难的细胞数目进一步增加, 且不同浓度处理组间均具有显著差异 ($P < 0.05$) (图 5B)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group

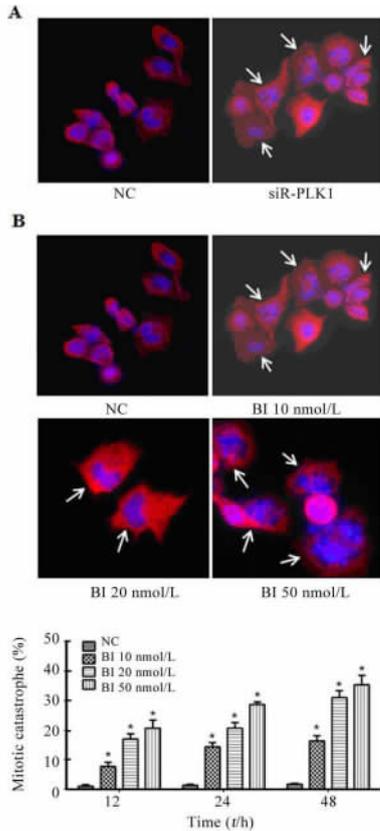
图 3 抑制 PLK1 降低鼻咽癌细胞克隆形成能力
Fig.3 Inhibition of PLK1 decreased the colony forming ability of the NPC cells



Cell cycle changes were analyzed by flow cytometry. CNE-1 cell was transfected with siRNA for 48 h (A) or treated with different concentrations of BI2536 for 12 h (B), the results showed that both siRNA and BI2536 led to obvious G2-M phase arrest

* $P < 0.05$ vs NC group

图 4 抑制 PLK1 诱导 NPC 细胞 G2-M 期阻滞
Fig.4 Inhibition of PLK1 induced G2-M arrest of the CNE-1 cells



CNE-1 cell was transfected with siRNA for 48 h (A) or treated with different concentrations of BI2536 for 12 h (B), the results showed that both siRNA and BI2536 lead to obvious mitotic catastrophe * $P < 0.05$ vs NC group

图 5 抑制 PLK1 导致 NPC 细胞有丝分裂灾难($\times 1\ 000$)
Fig. 5 Inhibition of PLK1 induced mitotic catastrophe of the CNE-1 cells($\times 1\ 000$)

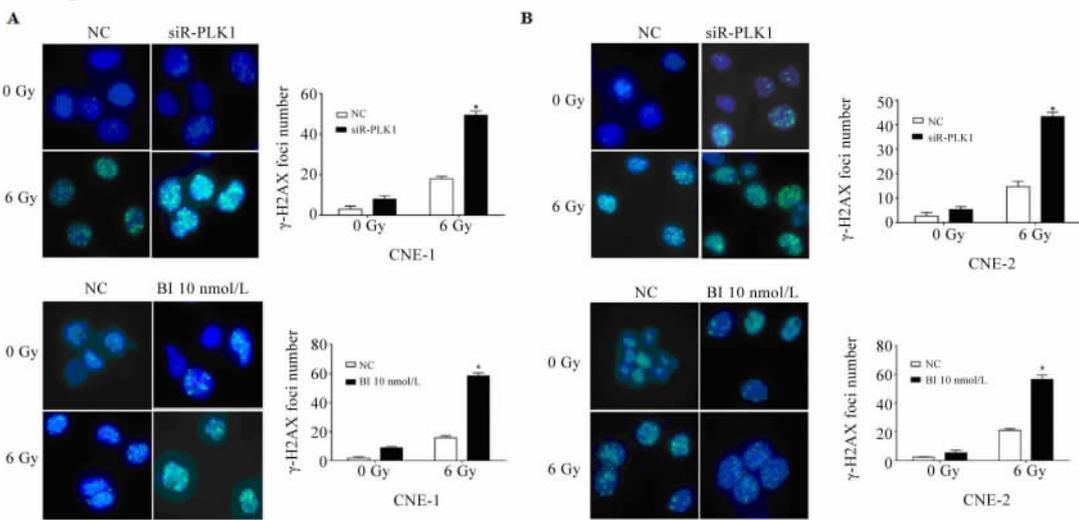
2.4 抑制 PLK1 增强 NPC 细胞辐射敏感性

γ -H2AX 位于细胞核中断裂的 DNA 双链处, 是公认的 DNA 双链断裂损伤的标志。实验中分别用 siR-PLK1 和小分子抑制剂 BI2536 抑制 PLK1, 然后行 6 Gy 射线处理, 24 h 后通过细胞免疫荧光实验, 检测细胞核中 γ -H2AX 位点数。结果(图 6A、B)显示, 抑制 PLK1 后, CNE-1 和 CNE-2 细胞核中 γ -H2AX 位点数目明显增加($P < 0.05$)。同时抑制 PLK1 联合 6 Gy 辐射处理后, CNE-1 和 CNE-2 细胞凋亡比例明显增加($P < 0.05$)(图 7A、B)。

进一步行辐射后克隆形成实验, 结果(图 8)表明, siR-PLK1 和小分子抑制剂 BI2536 抑制 PLK1 后 NPC 细胞 SF 明显降低, 细胞辐射敏感性增强, siR-PLK1 转染 CNE-1 和 CNE-2 后 SER 分别为 1.1988 和 1.3198, BI2536 处理 CNE-1 和 CNE-2 后放射增敏比 SER 分别为 1.5508 和 1.2028。

3 讨论

目前已针对 PLK1 研制出多种小分子抑制剂, BI2536 在大量的体内、外实验中表现出明显的抗肿瘤作用, 是第一个被应用于临床研究的 PLK1 小分子抑制剂。尽管由于存在毒副作用, BI2536 单药疗法的临床 II 期试验被中止, 但最新研究^[8-9]表明, BI2536 在提高肿瘤放疗及化疗敏感性方面起到一定作用。



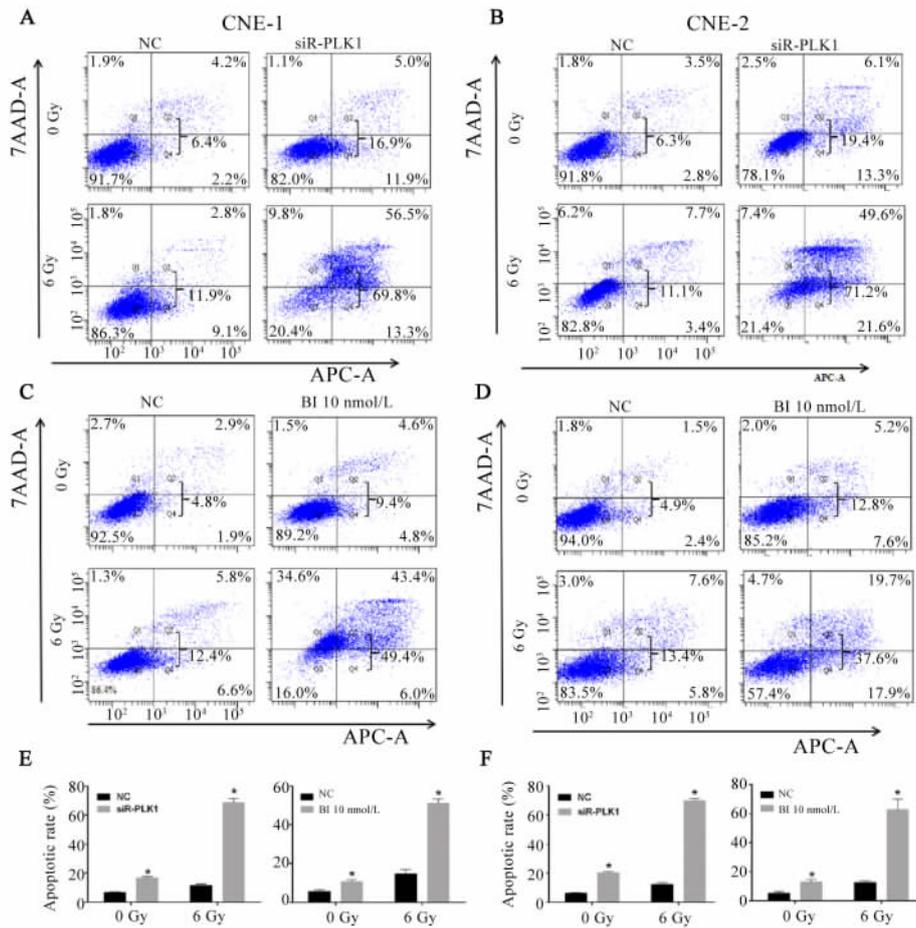
* $P < 0.05$ vs NC group

Representative immunofluorescence micrographs of γ -H2AX foci formation. CNE-1 (A) and CNE-2 (B) cells were treated with siRNA for 48 h or BI2536 for 12 h, then the both cells were exposed to irradiation (6 Gy).

The number of γ -H2AX foci in the combined treatment group was significantly increased; * $P < 0.05$ vs NC

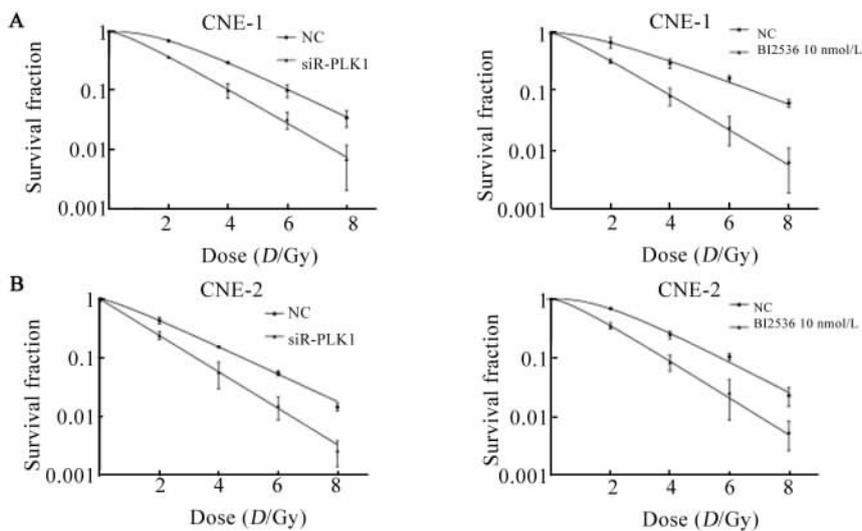
图 6 抑制 PLK1 加重辐射诱导的 NPC 细胞 DNA 损伤($\times 1\ 000$, $n = 5$)

Fig. 6 Inhibition of PLK1 aggravated radiation-induced DNA damage in the NPC cells($\times 1\ 000$, $n = 5$)



CNE-1 and CNE-2 cells were treated with siRNA for 48 h (A,B) or BI2536 for 12 h (C,D), the cells were then exposed to irradiation(6 Gy). After 24 h, apoptosis of the cells was analyzed by flow cytometry. The apoptosis of the combined treatment group was significantly increased. The histogram (E, F) is the average value of the results of the experiments repeated three times
图 7 抑制 PLK1 促进辐射诱导 NPC 细胞凋亡

Fig. 7 Inhibition of PLK1 promoted radiation-induced cell apoptosis of the NPC cells



CNE-1 and CNE-2 cells were treated with siRNA (A) for 48 h or BI2536 (B) for 12 h, then the cells were exposed to irradiation. Colony formation assays showed that done in NPC cells, and survival curves were created from three independent experiments with a multitarget single-hit model. Radiosensitivity in the NPC cells with inhibition of PLK1 was higher than that in the control cells

图 8 抑制 PLK1 增强 NPC 细胞辐射敏感性

Fig. 8 Inhibition of PLK1 enhanced radiosensitivity of NPC cells

PLK1 主要分布于增殖活跃的细胞中,自 S 期开始表达,G2 和 M 期逐渐增加,至 M 期达到顶峰^[4]。PLK1 可以通过 Cdc25 或者 WEE1/MYT1 通路调节 CDK1-cyclin B 复合体活性,进而调控有丝分裂进程,其中 cyclin B 对介导细胞进入 M 期至关重要^[10]。抑制 PLK1 可以使肿瘤细胞发生有丝分裂灾难和细胞凋亡,导致细胞周期阻滞和细胞死亡^[11-13]。本实验分别使用 siRNA 和 BI2536 抑制 PLK1,然后通过 MTT 法检测 NPC 细胞增殖能力,结果显示抑制 PLK1 可以明显抑制 NPC 细胞的生长和增殖,且随着 BI2536 浓度的增大抑制效果更加明显。随后检测不同处理组 NPC 细胞的细胞周期分布,发现用 siRNA 和 BI2536 抑制 PLK1 后可以诱导细胞发生 G2-M 期阻滞,并且随着药物浓度增加,阻滞现象更加明显。

有丝分裂灾难是细胞有丝分裂失败时的一种死亡方式,主要表现为多叶核细胞和异形核细胞的形成,曾有研究报道抑制 PLK1 可以诱导细胞发生有丝分裂灾难^[14-15]。本实验检测了抑制 PLK1 对 NPC 细胞有丝分裂的影响,发现抑制 PLK1 后可以导致 NPC 细胞发生有丝分裂灾难。

辐射可以导致 DNA 损伤,而 PLK1 参与调节 DNA 损伤修复。当 DNA 损伤发生在细胞分裂间期时,DNA 损伤通过抑制 ATM/ATR 通路抑制 PLK1 活性,使细胞不能进入 M 期^[16]。当 DNA 损伤发生在 M 期时,PLK1 主要被 PP2A 灭活,细胞 M 期延长,促进 DNA 损伤修复。一旦 DNA 损伤修复,PLK1 会从新激活使细胞进入 M 期^[17]。此外,DNA 损伤可以通过 ATM/ATR 或者 PP2A 直接抑制 PLK1,也可以通过 ATM/ATR 和 Chk1/Chk2 通路激活 p53,增强 p53 对 PLK1 的抑制作用,PLK1 活性降低又进一步减弱其对 p53 的抑制作用,最终导致 p53 活性增强和 PLK1 活性降低,从而导致细胞周期阻滞和细胞凋亡^[16, 18-20]。γH2AX 是 DNA 双链损伤的标志,本实验中使用 siRNA、BI2536 处理 NPC 细胞后再行辐射处理,通过细胞免疫荧光实验检测细胞 DNA 损伤情况,结果显示抑制 PLK1 后再行辐射处理可以使 NPC 细胞 DNA 损伤增加,同时细胞凋亡比例也显著增加。

有研究^[21-22]指出在辐射前使用 PLK1 抑制剂可以使细胞停留在对辐射最敏感 G2-M 期,从而提高了细胞的辐射敏感性,增加 DNA 损伤,但是如果在辐射后抑制 PLK1,细胞的辐射敏感性则会显著降低,这是由于辐射后抑制 PLK1 使细胞 M 期延长,促进了 DNA 损伤的修复并降低了有丝分裂损伤。本

实验中先分别使用 siRNA、BI2536 处理 NPC 细胞,然后行辐射处理,通过细胞克隆实验检验细胞辐射敏感性,结果发现,抑制 PLK1 可以明显提高 NPC 细胞的辐射敏感性。

影响细胞辐射敏感性的因素有很多,如细胞周期的分布、细胞凋亡、肿瘤干细胞、异常信号通路的激活等^[23-26]。本实验结果显示,抑制 PLK1 可以有效抑制 NPC 细胞增殖,诱导细胞 G2-M 期阻滞和细胞有丝分裂灾难,增加细胞的辐射敏感性。本实验研究结果为 BI2536 应用于 NPC 临床治疗提供了部分理论依据,提示 PLK1 小分子抑制剂在提高肿瘤辐射敏感性方面存在一定的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] LOWERY D M, LIM D, YAFFE M B. Structure and function of Polo-like kinases[J]. *Oncogene*, 2005, 24(2): 248-259. DOI: 10.1038/sj.onc.1208280.
- [2] SANHAJI M, RITTER A, BELAHAM H R, et al. Polo-like kinase 1 regulates the stability of the mitotic centromere-associated kinesin in mitosis[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(10): 3130-3144. DOI: 10.1038/sj.onc.1208280.
- [3] ALVES I T, VAN VUGT M A. PLK1 manages DNA break repair during mitosis[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(9): 1356-1357. DOI: 10.1080/15384101.2015.1024586.
- [4] CHOLEWA B D, LIU X, AHMAD N. The role of Polo-like kinase 1 in carcinogenesis: cause or consequence? [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(23): 6848-6855. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2197.
- [5] LEE K S, BURKE T J, PARK J E, et al. Recent advances and new strategies in targeting PLK1 for anticancer therapy[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(12): 858-877. DOI: 10.1016/j.tips.2015.08.013.
- [6] TANDLEE A T, KRAMP T, KIL W J, et al. Inhibition of polo-like kinase 1 in glioblastoma multiforme induces mitotic catastrophe and enhances radiosensitisation[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(14): 3020-3028. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.05.013.
- [7] LUND-ANDERSEN C, PATZKE S, NAHSE-KUMPF V, et al. PLK1-inhibition can cause radiosensitization or radioresistance dependent on the treatment schedule[J]. *Radiother Oncol*, 2014, 110(2): 355-361. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.12.014.
- [8] BRASSESCO M S, PEZUK J A, MORALES A G, et al. In vitro targeting of Polo-like kinase 1 in bladder carcinoma: comparative effects of four potent inhibitors[J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(7): 648-657. DOI: 10.4161/cbt.25087.
- [9] HARRIS P S, VENKATARAMAN S, ALIMOVA I, et al. Polo-like kinase 1 (PLK1) inhibition suppresses cell growth and enhances radiation sensitivity in medulloblastoma cells[J/OL]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 80[2016-12-05]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-80>. DOI: 10.1186/1471-2407-12-80.
- [10] WENG N W, SHIN J S, ROBERTS T L, et al. Molecular interac-

- tions of Polo-like kinase 1 in human cancers [J/OL]. J Clin Pathol, 2016, 69(7): 557-562 [2016-12-05]. <http://jcp.bmj.com/content/69/7/557>. DOI: 10.1136/jclinpath-2016-203656.
- [11] GILMARTIN A G, BLEAM M R, RICHTER M C, et al. Distinct concentration-dependent effects of the polo-like kinase 1-specific inhibitor GSK461364A, including differential effect on apoptosis [J]. Cancer Res, 2009, 69(17): 6969-6977. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0945.
- [12] SCHMIT T L, ZHONG W, SETALURI V, et al. Targeted depletion of Polo-like kinase (PLK) 1 through lentiviral shRNA or a small-molecule inhibitor causes mitotic catastrophe and induction of apoptosis in human melanoma cells [J]. J Invest Dermatol, 2009, 129(12): 2843-2853. DOI: 10.1038/jid.2009.172.
- [13] MBOM B C, SIEMERS K A, OSTROWSKI M A, et al. Nek2 phosphorylates and stabilizes-catenin at mitotic centrosomes downstream of PLK1 [J]. Mol Biol Cell, 2014, 25(7): 977-991. DOI: 10.1091/mbc.E13-06-0349.
- [14] ARCHAMBAULT V, LÉPINE G, KACHANER D. Understanding the Polo kinase machine [J]. Oncogene, 2015, 34(37): 4799-4807. DOI: 10.1038/onc.2014.451.
- [15] WANG N N, LI Z H, ZHAO H, et al. Molecular targeting of the oncoprotein PLK1 in pediatric acute myeloid leukemia: R03280, a novel PLK1 inhibitor, induces apoptosis in leukemia cells [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(1): 1266-1292. DOI: 10.3390/ijms16011266.
- [16] ZHOU Z, CAO J X, LI S Y, et al. p53 Suppresses E2F1-dependent PLK1 expression upon DNA damage by forming p53-E2F1-DNA complex [J]. Exp Cell Res, 2013, 319(20): 3104-3115. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.09.012.
- [17] JANG Y J, JI J H, CHOI Y C, et al. Regulation of Polo-like kinase 1 by DNA damage in mitosis. Inhibition of mitotic PLK-1 by protein phosphatase 2A [J]. J Biol Chem, 2007, 282(4): 2473-2482. DOI: 10.1074/jbc.M605480200.
- [18] APPELLA E. Modulation of p53 function in cellular regulation [J]. Eur J Biochem, 2001, 268(10): 2763. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.02224.
- [19] LIU X S, LI H, SONG B, et al. Polo-like kinase 1 phosphorylation of G2 and S-phase-expressed 1 protein is essential for p53 inactivation during G2 checkpoint recovery [J]. EMBO Rep, 2010, 11(8): 626-632. DOI: 10.1038/embor.2010.90.
- [20] YANG X, LI H, ZHOU Z, et al. PLK1-mediated phosphorylation of Topors regulates p53 stability [J]. J Biol Chem, 2009, 284(28): 18588-18592. DOI: 10.1074/jbc.C109.001560.
- [21] LUND-ANDERSEN C, PATZKE S, NAHSE-KUMPF V, et al. PLK1-inhibition can cause radiosensitization or radioresistance dependent on the treatment schedule [J]. Radiother Oncol, 2014, 110(2): 355-361. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.12.014.
- [22] LENS S M, VOEST E E, MEDEMA R H. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(12): 825-841. DOI: 10.1038/nrc2964.
- [23] ZHAI X, YANG Y, WAN J, et al. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Oncol Rep, 2013, 30(6): 2983-2991. DOI: 10.3892/or.2013.2735.
- [24] ZAFAR F, SEIDLER S B, KRONENBERG A, et al. Homologous recombination contributes to the repair of DNA double-strand breaks induced by high-energy iron ions [J]. Radiat Res, 2010, 173(1): 27-39. DOI: 10.1667/RR1910.1.
- [25] MONCHARMONT C, LEVY A, GILORMINI M, et al. Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell [J]. Cancer Lett, 2012, 322(2): 139-147. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.03.024.
- [26] SHI L, ZHANG S, WU H, et al. MiR-200c increases the radiosensitivity of non-small-cell lung cancer cell line A549 by targeting VEGF-VEGFR2 pathway [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(10): e78344 [2016-12-07]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0078344>. DOI: 10.1371/journal.pone.0078344.
- [收稿日期] 2016 - 12 - 23 [修回日期] 2017 - 02 - 28
[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB/T 3358 - 2009《统计学词汇及符号》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用英文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用英文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)