

Polo 样激酶 1 功能及其在肿瘤靶向治疗中的应用

应莉莎 童浩萱¹ 周天华*(浙江大学医学院细胞生物学系, 杭州 310058; ¹浙江大学生命科学学院, 杭州 310058)

摘要 Polo 样激酶 1 (polo-like kinase 1, PLK1) 是一种广泛存在于真核细胞中的丝/苏氨酸激酶, 在细胞周期调控中发挥关键的作用。其主要功能包括参与激活 cyclin B/CDK1 复合体, 协助中心体的功能成熟, 活化细胞分裂后期促进复合物(anaphase promoting complex, APC), 促进染色体正常分离、分配和调控胞质分裂等。现已发现 PLK1 在多种肿瘤中表达增高并与某些肿瘤的预后密切相关。利用反义寡核苷酸、RNA 干扰技术和化学合成 PLK1 小分子抑制剂等方法阻断 PLK1 的表达或降低其激酶活性, 能够有效抑制肿瘤细胞的增殖并介导肿瘤细胞的凋亡, 但对正常细胞没有明显影响, 因此 PLK1 在肿瘤靶向治疗中具有重要的应用前景。

关键词 polo 样激酶 1; 细胞周期; 肿瘤; 小分子抑制剂; RNA 干扰

Polo 样激酶 (polo-like kinases, PLKs) 是一类高度保守的丝/苏氨酸蛋白激酶, 其氨基端均具有一个高度同源的丝/苏氨酸激酶结构域, 羧基端具有调节 PLKs 活性及亚细胞动态定位的特征性结构域 PBD (polo-box domain)。PLKs 家族成员较多, 在哺乳动物中, 包括 PLK1、PLK2 (又称为 Snk)、PLK3 (又称为 Fnk 或 Prk) 和 PLK4 (又称为 Sak)^[1]。它们在细胞周期各个时相的调控中均发挥至关重要的作用。在 4 个家族成员中, 目前对 PLK1 研究最为透彻: PLK1 不但参与调节有丝分裂的多个阶段, 而且发现 PLK1 在多种肿瘤中过表达并与某些肿瘤的预后密切相关。本文主要关注 PLK1 的功能研究及其在肿瘤靶向治疗中的应用前景。

1 PLK1 的功能

PLK1 在细胞周期的不同时相中, 均有十分重要的作用: 在细胞分裂间期, 协助中心体的功能成熟和双极纺锤体的形成; 在 G₂ 晚期/M 初期参与激活 cyclin B/CDK1 复合体, 促使细胞进入 M 期; 在有丝分裂中后期活化细胞分裂后期促进复合物(anaphase promoting complex, APC), 促进染色体正常分离、分配; 在有丝分裂末期, 决定细胞能否按时退出 M 期而进入胞质分离等。同时, PLK1 还介导 DNA 损伤引起的细胞分裂受阻等。

1.1 PLK1 在细胞周期各时相中的作用

1.1.1 PLK1 在 G₂/M 期转变中的作用 PLK1 的表达量及活性与细胞周期的进程密切相关, 在 G₂/M 期达到峰值^[2], 提示其在 G₂/M 期转化中发挥重要作用。

Cdc2/cyclinB 的复合物——成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF), 是细胞由 G₂ 期进入 M 期的主要调控蛋白。在 G₂/M 转化前期, 细胞中的 Wee1 及 Myt1 激酶将 Cdc2 的 Thr14 和 Tyr15 磷酸化, 使 MPF 以无活性的前 MPF (pre-MPF) 形式存在。磷酸酯酶 Cdc25 能够促使 Cdc2 的 Thr14 和 Tyr15 去磷酸化, 从而激活 MPF, 细胞进入 M 期。研究发现, PLK1 既能够活化 Cdc25, 又能够抑制 MPF 的抑制分子 Myt1 的活性, 从而推动 MPF 的激活, 使细胞分裂进入 M 期^[3]。最新研究还表明, PLK1 能够直接抑制 Cdc2 的 Tyr15 磷酸化作用^[4]。这些结果显示 PLK1 通过多方面的调节, 激活 MPF, 推动细胞 G₂/M 期的转变。

1.1.2 PLK1 在有丝分裂中后期的作用 当细胞进入有丝分裂中后期, 姐妹染色单体的分离需要 APC 的激活并水解黏附素 (securin)。PLK1 能够直接磷酸化 APC, 活化的 APC 促使黏附素等后期抑制因子的降解, 从而促进姐妹染色单体正常分离、分配。黏附素的降解还能将磷酸酯酶 Cdc14 从核仁中释放出来, 而 Cdc14 是 MEN (mitotic exit network) 的一部分, 它的活化有助于有丝分裂的正常退出^[5]。在 HeLa 细胞中下调 PLK1 的表达, 发现大约有 45% 细胞的细胞核出现了异常的哑铃状结构, 15% 细胞虽然完成了染色体的分离, 但不能进行正常的胞质分裂^[6]。同时, PLK1 还能够磷酸化早期有丝分裂抑制因子 (early mitotic inhibitor 1, Emi1), 导致 Emi1 降解, 从而解除 Emi1 对 APC 的抑制作用^[7]。

收稿日期: 2007-04-26 接受日期: 2007-06-01

* 通讯作者。Tel: 0571-88208258, E-mail: tzhou@zju.edu.cn

1.1.3 PLK1在胞质分裂中的作用 在细胞进行胞质分裂时,细胞中部赤道板处胞质向下起沟,形成环状缢缩。细胞中部微管增加,与一些浓密物质和囊状物形成中体(midbody),收缩环逐渐缢缩,从而完成胞质分裂。在细胞分离过程中,PLK1定位于中体^[2],推测其可能与胞质分裂相关。研究认为,PLK1对胞质分裂的作用与其磷酸化驱动样蛋白(mitotic kinesin-like protein 2, MKlp2)及细胞核分离基因(nuclear distribution gene C, NudC)相关。阻断PLK1对MKlp2的磷酸化作用,将导致胞质分裂的失败^[8]。Zhou等^[9]用RNA干扰抑制NudC的表达导致胞质分裂异常,导入野生型NudC可以使细胞分裂恢复到正常状态;而导入PLK1磷酸化位点突变的NudC则无法使细胞分裂恢复到正常状态。

1.2 PLK1与周期相关细胞器的作用

1.2.1 PLK1在中心体成熟和纺锤丝形成过程中的作用 在有丝分裂起始阶段,PLK1位于中心体和纺锤体极上^[2],协助中心体功能的成熟,并促进双极纺锤体的形成。在细胞分裂间期,定位于中心体的Nlp(ninein-like protein)能够与 γ -微管蛋白环形复合物(γ -tubulin ring complex, γ -TuRC)相互作用,形成间期微管组织中心。当细胞进入G₂/M期,PLK1活性增加并磷酸化Nlp,使其从中心体上移位,这样有助于招募一些必需的 γ -微管蛋白复合物结合蛋白(γ -tubulin complex binding proteins, GTBPs)到中心体,促进中心体上的微管成核,进而促使中心体成熟以及纺锤丝的形成;同时,在间期后段,PLK1还能促使Nlp与 γ -TuRC的分离,有助于有丝分裂间期微管组织中心消失,取而代之的是星体和纺锤丝。研究表明,在细胞内过表达不能被PLK1磷酸化的Nlp突变体,能严重干扰有丝分裂中纺锤丝的形成^[10]。Lane等^[11]的研究发现,通过在HeLa细胞内注射抗PLK1的抗体降低PLK1的活性,细胞的中心体明显变小, γ -微管蛋白量减少,同时能特异性识别M期磷酸化蛋白质的有

丝分裂磷酸化蛋白单克隆抗体 2(mitotic phosphoprotein monoclonal antibody-2, MPM-2)的免疫反应性也显著降低。由此可见PLK1在中心体成熟以及纺锤丝的形成过程中起到了重要的作用。

1.2.2 PLK1与高尔基体 在细胞分裂过程中高尔基体需要解体,分配到两个子细胞中并融合重构。GRASP65(Golgi reassembly stacking protein of 65 kDa)是高尔基体重要结构蛋白之一,与高尔基体在有丝分裂过程中的遗传密切相关。研究表明,PLK1以及Cdc2能够磷酸化GRASP65,从而使细胞在进入有丝分裂后,内质网与高尔基体之间的囊泡传输中断,进而介导高尔基体特异性崩解^[12]。因此缺乏PLK1将导致高尔基体在有丝分裂过程中崩解不完全,并抑制高尔基体的降解^[13]。

1.3 PLK1在细胞自我防护机制中的作用

除了参与调控细胞周期的进程以外,PLK1在DNA损伤情况下引发的细胞自我防护机制中也发挥重要作用。正常情况下,DNA损伤时,DNA损伤检验点将产生一系列信号将细胞阻断在G₁期和G₂期,从而防止由于损伤DNA的复制引起基因突变或染色体高频率重排,这是细胞的一种自我保护机制。研究表明当DNA损伤时,G₂期的检验点激酶ATM和ATR被激活,它们能够抑制PLK1的S137和T210氨基酸磷酸化,使PLK1不能被激活,细胞停滞于有丝分裂的G₂期或M期^[4];而当PLK1结构域的保守氨基酸位点发生突变,DNA损伤的信号通路不足以引起PLK1失活时,细胞就会继续有丝分裂进程。DNA损伤诱导的突变将被复制并分配到子细胞,这样就大大增加了细胞癌变的频率。由此显示PLK1介导了DNA损伤所致的细胞分裂阻抑,从而参与了DNA的修复机制。

综上所述,PLK1的功能可归纳为图1^[15]。

2 PLK1在肿瘤靶向治疗中的应用

由于PLK1在细胞周期的多个重要事件中均起

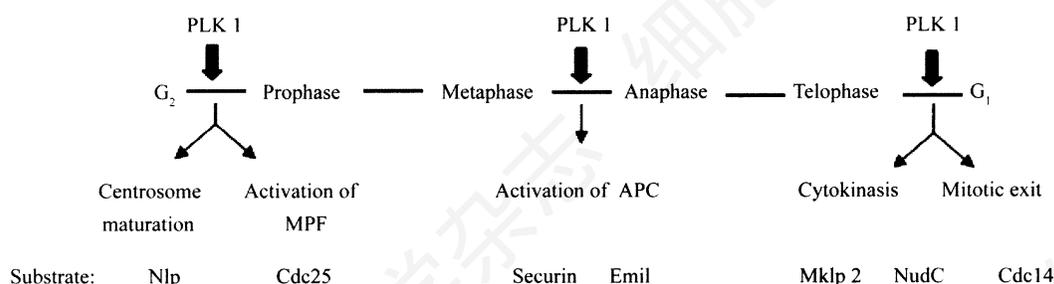


图1 PLK1调控有丝分裂过程的分子机制^[15]

到关键的作用,它与肿瘤的关系也越来越受到人们的关注。临床的研究结果表明 PLK1 在大多数人类肿瘤组织均有高表达,一些肿瘤组织中 PLK1 的表达水平还与肿瘤的转移及预后密切相关^[16],如 PLK1 在非小细胞性肺癌、头颈部肿瘤、食管癌、卵巢癌、黑色素瘤等肿瘤组织的高表达均提示预后不良^[17,18]。另外,PLK1 过量表达不仅可以使 NIH/3T3 成纤维细胞发生恶性转化,而且能够磷酸化 p53 并阻断其促进癌细胞凋亡的作用^[19],这些结果提示 PLK1 在肿瘤的发生发展和治疗中具有重要作用。目前,针对 PLK1 在肿瘤靶向治疗中的研究取得重要进展,这些工作显示,阻断 PLK1 的表达或降低其激酶活性,能够有效抑制肿瘤细胞的增殖并诱导其凋亡,但对正常细胞没有明显影响。

2.1 基因操作

Phillip 等^[20]研究发现,利用合成的 PLK1 反义寡核苷酸降低其表达水平,可以有效地控制胰腺癌的生长。Reagan-Shaw 等^[21]报道,通过小干扰 RNA 使 PLK1 发生沉默可以导致人类前列腺癌细胞发生凋亡。Liu 等^[22,23]利用 RNA 干扰特异性降低 PLK1 的表达,能够有效控制肿瘤细胞的增殖,并诱导肿瘤细胞的凋亡,而对于 hTERT-RPE1、MCF10A 等正常细胞则没有明显的作用。可见 PLK1 是一个非常具有前景的抗癌药物的靶点,通过应用反义寡核苷酸、RNA 干扰等技术,抑制 PLK1 的表达水平或其激酶活性可能起到靶向抗肿瘤的作用。

2.2 小分子抑制剂

由于合成反义寡核苷酸易受到核酶的攻击而降解, RNA 干扰技术存在安全性、稳定性和脱靶效应等问题^[24,25]。科学家也尝试从有机合成的化学小分子或中药单体等天然产物中筛选 PLK1 特异性抑制剂。迄今为止,已发现十余种 PLK1 化学小分子抑制剂,包括 scytonemin、ON01910、BI 2536、LFM-A13 等。这些小分子抑制剂不仅都具有抗肿瘤作用,而且对于正常细胞没有明显的影响。

2.2.1 scytonemin 前寒武纪蓝细菌中进化而来的一种屏蔽色素——scytonemin^[26],是第一个被报道的 PLK1 的小分子抑制剂。scytonemin 主要是通过 ATP 竞争性结合和非竞争性结合两种方式抑制 PLK1 的功能,除了抑制 PLK1 活性外,scytonemin 还可下调 PLK1 的表达。通过这两个作用共同抑制肿瘤细胞的增殖,诱导细胞的凋亡。scytonemin 半数抑制肿瘤细胞生长的浓度(IC₅₀)为 2 μmol/L。体外实

验发现 scytonemin 抑制作用主要是取决于自身浓度的变化,并不随时间改变。而且 scytonemin 对于 PLK1 的抑制效应是可逆的,在作用浓度为 10 μmol/L 的范围内,细胞内未见显著的化学毒性^[27],这为其能够在临床应用提供了保障。作为第一个报道的 PLK1 小分子抑制剂,scytonemin 有其自身的优点,也有其缺陷:scytonemin 药物作用靶点特异性不足,它同时对其他的激酶产生抑制作用,其中包括蛋白激酶 Cβ2、Chk1、CDK1/cyclinB 等;此外,scytonemin 对 PLK1 活性抑制效果不佳,其 IC₅₀ 浓度(2 μmol/L)过高。因此,可行的策略是将 scytonemin 的化学结构骨架作为 PLK1 小分子抑制剂的模板,通过进一步的化学修饰与改造提高其对于 PLK1 的选择性抑制作用。

2.2.2 ON01910 ON01910 是一种非 ATP 竞争的 PLK1 小分子化学抑制剂。它能有效抑制肿瘤细胞有丝分裂过程中纺锤体形成并使染色体不能与纺锤丝正常相连等,引起细胞周期停滞和细胞生长抑制,从而激活细胞的凋亡通路^[28]。

体外研究结果显示,ON01910 用药量很低,其 IC₅₀ 在 50~200 nmol/L 之间,对受检的 94 种人类肿瘤细胞系都诱导了凋亡^[29],其中包括多种多重耐药性的肿瘤细胞系。但人类正常细胞系却能抵抗 ON01910 的促凋亡作用,经 ON01910 处理后的正常细胞系有丝分裂仍正常进行。对人类乳腺癌、肝癌和胰腺癌裸鼠模型研究结果还显示,ON01910 发挥抑制作用时未见白细胞减少和肝肾损伤等毒性反应。

作为 PLK1 的小分子抑制剂,ON01910 最大的优点在于它是非 ATP 竞争的;同时,它与其他化学药物协同治疗的效果非常好。在移植肿瘤模型试验中,ON01910 与奥沙利铂、阿霉素等抗肿瘤药物协同作用能够完全消除肿瘤。但是,需要指出的是 ON01910 在低浓度条件下同样也抑制 AbI、Flt-1、PDGFR 等激酶的活性。

与 scytonemin 相比,ON01910 不管在作用浓度还是在选择性上都有明显的改善。目前美国约翰霍普金斯大学医学院 Kimmel 癌症研究中心正开展 ON01910 靶向治疗乳腺癌、肺癌和大肠癌的 I 期临床实验,以进一步评估该化合物的毒副作用、药代动力学及其联合其他抗肿瘤药物协同抗肿瘤效应等。

2.2.3 BI 2536 BI 2536 是一种二氢蝶啶酮类化合物。它通过与 PLK1 的结构域结合,抑制 PLK1 活性,引起肿瘤细胞有丝分裂的异常,如细胞停滞

于 G₂/M 期等, 进而诱导细胞的凋亡。

BI 2536 抑制 PLK1 活性的 IC₅₀ 为 0.83 nmol/L^[30]。它能够广泛的抑制人类肿瘤细胞的增殖, 如乳腺癌细胞、肺癌细胞、结肠癌细胞、胰腺癌细胞等。BI 2536 最大的优点是对 PLK1 强大的选择性抑制作用。研究表明, 与其他 63 种蛋白激酶相比, BI 2536 对于 PLK1 的选择性抑制作用要明显高 1 000 倍。虽然它对 PLK2 及 PLK3 也有抑制效应, 但是 PLK2、PLK3 并不在增殖的细胞系中特定表达, 而且目前普遍认为它们主要在有丝分裂的 G₁、S 期发挥作用, 没有表现出直接调控有丝分裂的功能^[1], 因此并不影响 BI 2536 作为 PLK1 特异性小分子抑制剂的作用。

与上述两种 PLK1 的小分子抑制剂相比, BI 2536 在对 PLK1 的作用浓度及选择性上都有明显的优势。目前 BI 2536 已进入治疗癌症的 I 期临床实验。

2.2.4 LFM-A13 LFM-A13 最早被认为是 Btk (Bruton S tyrosine kinase) 特异性阻断剂, 近来研究发现它可能也是 PLK1 潜在的小分子抑制剂。

LFM-A13 作为 PLK1 的小分子化学抑制剂, 其在爪蟾的 Plx1 (PLK1 的同源基因) 的作用位点为 Plx1 丝/苏氨酸激酶结构域的 ATP 结合位点, 通过与激酶结构域中 ATP 位点结合从而引起 Plx1 构象的改变, 抑制 Plx1 激酶的活性, 从而引起肿瘤细胞有丝分裂的停滞, 形成单极或多极异常纺锤体, 但是它并不马上引起肿瘤细胞的凋亡。

LFM-A13 抑制 PLK1 的 IC₅₀ 为 10.3 μmol/L。它最大的优点在于它能够选择性抑制 PLK1 的活性。而对其他 7 种同样含有丝/苏氨酸激酶结构域非 PLK 家族的激酶, 如: CDK1、CDK2、CDK3、CHK1、IKK、MAPK1 和 SAPK2a; 以及 10 种酪氨酸激酶, 如: ABL、BRK、BMX、c-KIT、FYN、IGF1R、PDGFR、JAK2、MET 和 YES 等均不产生抑制作用^[31]。

与其他 PLK1 的小分子抑制剂不同的是, LFM-A13 主要在乳腺癌细胞中起作用, 体内外实验均证明它能有效的抑制人类乳腺癌细胞的增殖, 与目前临床上使用的抗肿瘤药物, 如紫杉醇、吉西他滨等的作用效果相当。由此可见, LFM-A13 在体内的活性和安全性使得其在临床抗乳腺癌靶向治疗中具有良好得应用前景。

除了上述几种 PLK1 的小分子抑制剂外, 还有一些小分子化合物也可以抑制 PLK1 的活性。Masuda 等^[32]报道了植物紫草提取物 β-羟异戊酰紫草醌能有效抑制 PLK1 的表达及其激酶活性, 并进一步诱导

人类白血病细胞发生凋亡。苯并噻唑氮类化合物 cyclapolin 1^[33]和磷酸肌醇-3 激酶超家族的选择性抑制剂 wortmannin^[34], 可能也是 PLK1 潜在的小分子抑制剂。最新报道的一类噻吩苯并咪唑化合物, 也能够低浓度(nmol/L)情况下通过与 ATP 竞争的方式抑制 PLK1 活性, 引起肿瘤细胞有丝分裂的异常, 包括暂时 G₂/M 期的阻滞、纺锤体的缺损以及多核现象的产生等进而诱导肿瘤细胞的凋亡^[35]。

作为细胞周期调控网络中的关键蛋白, PLK1 对细胞周期各大重要事件的顺利进行以及周期相关检验点的调控都发挥着至关重要的作用。鉴于其在细胞周期中的重要功能, 以 PLK1 为靶基因来研发抗癌新药已成为癌症药物开发的新热点。虽然各种 PLK1 的小分子抑制剂发挥作用的机制不同, 但是在实验过程中, 它们均抑制肿瘤细胞的增殖, 而对正常细胞没有明显的影响, 显示出各种 PLK1 的小分子抑制剂高效低毒性, 因而具有良好的靶向抗肿瘤应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Barr FA *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**: 429
- [2] Golsteyn RM *et al. J Cell Biol*, 1995, **129**: 1617
- [3] Roshak AK *et al. Cell Signal*, 2000, **12**: 405
- [4] Zhang Z *et al. Mol Reprod Dev*, 2007, **74**: 1247
- [5] Wasch R *et al. Oncogene*, 2005, **24**: 1
- [6] Nigg EA *et al. Curr Opin Cell Biol*, 1998, **10**: 776
- [7] Moshe Y *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 7937
- [8] Neef R *et al. J Cell Biol*, 2003, **162**: 863
- [9] Zhou T *et al. Dev Cell*, 2003, **5**: 127
- [10] Casenghi M *et al. Dev Cell*, 2003, **5**: 113
- [11] Lane HA *et al. J Cell Biol*, 1996, **11**: 615
- [12] Lin CY *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 12589
- [13] Preisinger C *et al. EMBO J*, 2005, **24**: 753
- [14] Tsvetkov L *et al. Cell Cycle*, 2005, **4**: 166
- [15] Glover DM *et al. Genes Dev*, 1998, **12**: 3777
- [16] Takai N *et al. Oncogene*, 2005, **24**: 287
- [17] Tatsuka M *et al. Cancer Res*, 1998, **58**: 4811
- [18] Yuat J *et al. Cancer Res*, 2001, **62**: 4186
- [19] Eckerdt F *et al. Oncogene*, 2005, **24**: 267
- [20] Phillip J *et al. Mol Cancer Ther*, 2004, **3**: 641
- [21] Reagan-Shaw S *et al. FASEB J*, 2005, **19**: 611
- [22] Liu X *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 5789
- [23] Liu X *et al. Mol Cell Biol*, 2006, **26**: 2093
- [24] Pai SI *et al. Gene Ther*, 2006, **13**: 464
- [25] Lin X *et al. Nucleic Acids Res*, 2005, **33**: 4527
- [26] Garcia-Pichel F. *Orig Life Evol Biosph*, 1998, **28**: 321
- [27] Christopher S *et al. J Pharmacol Exp Ther*, 2002, **303**: 858
- [28] Reddy EP *et al. U.S. Patent*, 2002, No.6541475
- [29] Gumireddy K *et al. Cancer Cell*, 2005, **7**: 275
- [30] Lenart P *et al. Curr Biol*, 2007, **17**: 304
- [31] Uckun FM *et al. Bioorg Med Chem*, 2007, **15**: 800

[32] Masuda Y *et al. Oncogene*, 2003, **22**: 1012

[34] Liu Y *et al. Chem Biol*, 2005, **12**: 99

[33] McInnes C *et al. Nat Chem Biol*, 2006, **2**: 608

[35] Lansing TJ *et al. Mol Cancer Ther*, 2007, **6**: 450

The Function of Polo-like Kinase 1 and Its Implication in Cancer Targeting Therapy

Li-Sha Ying, Hao-Xuan Tong¹, Tian-Hua Zhou*

(Department of Cell Biology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

¹College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Polo-like kinase 1 (PLK1), a highly conserved serine/threonine kinase, plays pivotal roles in the regulation of cell cycle progression, including the activation of Cdc2/cyclin B, centrosome assembly and maturation, activation of the anaphase-promoting complex (APC) during the metaphase-anaphase transition, mitotic exit and cytokinesis. Recent studies show that PLK1 is generally overexpressed in various human tumors and possesses prognostic potential in cancer. Inhibition of PLK1 expression or activity induces the significant apoptosis of tumor cells, but not normal cells. Here we discuss the study on PLK1 and the application of PLK1 as a target for therapeutic intervention against cancer.

Key words polo-like kinase 1; cell cycle; tumor; small molecule inhibitor; RNA interference

Received: April 26, 2007 Accepted: June 1, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-571-88208258, E-mail: tzhou@zju.edu.cn