

配合中医整体观念及辨证,随诊加减使用穴位,并采用针刺补泻手法治疗,同时给予普米克令舒雾化和心理疏导,辅以发音治疗,取得了理想的治疗效果。但因本研究病例数偏少,治疗机理和临床效果还有待进一步探讨。

参考文献

[1]席寅,赖克方.慢性咳嗽与声带功能障碍[J].中华哮喘杂志(电子版),2010,4(4):247-250

[2]Vertigan AE,Theodoros DG,Gibson PG,et al.The relationship between chronic cough and paradoxical vocal fold movement: a review of the literature[J].J Voice,2006,20(3):466-480

[3]国家中医药管理局.中医病证诊断疗效标准(2012版)[S].北京:中国医药科技出版社,2012.165

[4]邓峥峥.针刺开音1号穴为主治疗急性创伤性喉炎风热证的疗效分析[J].听力学及言语疾病杂志,2005,13(3):194

[5]江娟娟,谢强.应用针刺开音1号穴为主治疗声带粘膜下出血经验

的临床研究及声学分析[C].南昌:中华中医药学会耳鼻咽喉科分会第十二次学术研讨会暨嗓音言语听力医学专题学术研讨会论文集,2005.65-68

[6]罗红强,谢强,陈丹,等.谢强中医围手术期平衡康复疗法结合电子喉镜手术治疗声带息肉60例疗效观察[J].实用中西医结合临床,2011,11(6):4-5

[7]王芳,谢强.谢氏围手术期平衡康复疗法对声带息肉/小结围手术期的干预研究[J].中医耳鼻喉科学研究杂志,2011,10(2):53-55

[8]谢强,陈丹,龙平,等.消肿散结利喉饮对声带息肉术后康复干预及声学分析[C].杭州:第15届全国中医耳鼻喉科学术研讨和继续教育年会论文汇编,2009.223

[9]肖永涛,谢强,杨淑荣.谢强教授针灸治疗耳鼻喉科疾病经验介绍[J].新中医,2006,38(2):9-10

[10]津嘉山洋(日本).通过神经反射研究治疗方法[J].国外医学?中医中药分册,1993,15(6):768

[11]陈琴.试谈呼吸在针刺中的作用[J].北京针灸骨伤学院学报,1996,3(1):51-53

(收稿日期:2016-01-31)

口腔鳞状细胞癌中 PLK1 蛋白表达与中心体扩增

李世灵¹ 蔡扬^{2#} 于燕妮²

(1 贵州省贵阳市妇幼保健院病理科 贵阳 550003; 2 贵阳医学院附属医院 贵州贵阳 550004)

摘要:目的:探讨口腔鳞状细胞癌(Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC)中保罗样激酶-1(Polo-Like Kinase 1, PLK1)蛋白表达与中心体扩增之间的相关性。方法:采用免疫组化 SABC 法检测 10 例正常口腔黏膜和 47 例 OSCC 中 PLK1 蛋白和 γ -微管蛋白的表达情况,并分析两者之间的相关性。结果:PLK1 蛋白和 γ -微管蛋白在正常口腔黏膜组和 OSCC 组中的阳性表达率分别为 0.0%(0/10)、70.2%(33/47)和 0.0%(0/10)、76.6%(36/47),PLK1 蛋白和 γ -微管蛋白表达在正常口腔黏膜组和 OSCC 组之间的差异均具有统计学意义, $P<0.05$;Spearman 相关分析显示,OSCC 组织中 PLK1 蛋白与 γ -微管蛋白表达之间正相关, $r=0.305, P<0.05$ 。结论:PLK1 蛋白过表达可能是中心体扩增的潜在机制之一,PLK1 蛋白过表达导致中心体扩增及细胞恶性增殖在 OSCC 发生中可能起一定的作用。

关键词:口腔鳞状细胞癌;保罗样激酶-1; γ -微管蛋白;中心体扩增

PLK1 Protein Expression and Centrosome Amplification in Oral Squamous Cell Carcinoma

LI Shi-ling¹, CAI Yang^{2#}, YU Yan-ni²

(1Department of Pathology, Maternal and child health-care hospital of Guiyang City, Guiyang, Guizhou550003;

2The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou550004)

Abstract: Objective: To study the correlation between polo-like kinase 1 protein expression and centrosome amplification in oral squamous cell carcinoma. Methods: The expressions of PLK1 and γ -tubulin proteins in 10 cases of normal oral mucosa and 47 cases of oral squamous cell carcinoma were investigated by SABC method, and analyzed the correlation between them. Results: Rate of positive expression of Plk1 protein and γ -tubulin in normal oral mucosa group and OSCC group were 0% (0/10), 70.2% (33/47) and 0% (0/10), 76.6% (36/47) respectively, and differences of Plk1 protein and γ -tubulin expression between OSCC group and normal oral mucosa group were statistically significant, $P<0.05$. Spearman correlation analysis showed that the expression of PLK1 protein in OSCC tissue was positively correlated with the expression of gamma tubulin, $r=0.305, P<0.05$. Conclusion: Over-expression of PLK1 protein may be a potential mechanism of centrosome amplification, while PLK1 protein leads to centrosome amplification and cell proliferation may play a role in the occurrence of OSCC expression.

Key words: Oral squamous cell carcinomas; Polo-like kinase 1 (PLK1); γ -Tubulin protein; Centrosome amplification

中图分类号:R780.2

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2016.03.002

基因不稳定是人类肿瘤发生发展的中心环节,染色体不稳定性(Chromosome Instability, CIN)作为基因不稳定的形式之一,是肿瘤细胞一个非常显著的共同特征性表现。中心体异常被认为是染色体不

稳定形成的潜在原因之一而与肿瘤发生有关。目前,中心体扩增可见人类大多数肿瘤中,其中也包括口腔鳞状细胞癌(Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC)^[1],但其扩增机制仍不清楚。有研究提示保罗

通信作者:蔡扬, Email: caiyang85@163.com

样激酶-1 (Polo-Like Kinase 1, PLK1) 异常与中心体扩增、染色体不稳定及细胞恶性转化密切相关^[2-3]。 γ -微管蛋白作为一个典型的中心体核心蛋白,对于细胞周期的调控发挥很大作用^[4]。我们通过采用免疫组化 SABC 法检测 OSCC 中 PLK1 蛋白和 γ -微管蛋白的表达情况,初步探讨两者之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床病理资料 选取 2000~2007 年贵阳医学院附属医院口腔科临床活检或手术切除标本,包括:经患者知情同意自阻生齿拔除时切除的正常牙龈黏膜组织 10 例、口腔黏膜上皮非典型增生组织 29 例(轻度 14 例,中度 10 例,重度 5 例)、OSCC 组织 47 例(高分化 33 例,中分化 11 例,低分化 3 例;伴有淋巴结转移者 31 例,无淋巴结转移者 16 例;按 2002 年 WHO 国际抗癌联盟制定的肿瘤分期标准: I 期和 II 期共 9 例, III 期和 IV 期共 38 例)。病人术前均未接受任何手术或化、放疗治疗。所有组织均经病理检查确诊。

1.2 实验试剂与方法

1.2.1 实验试剂 鼠抗人 PLK1 单克隆抗体(购自美国 Santa 公司, SC-17783), 鼠抗人 γ -微管蛋白单克隆抗体(购自美国 Sigma 公司, GTU-88), 免疫组化 SABC 试剂盒、抗原修复液及 DAB 显色试剂盒(均购自武汉博士德生物技术有限公司)。

1.2.2 实验方法 所有组织均经 10% 福尔马林液固定后,制成蜡块并切片,切片用 APES 溶液制成的胶片捞片,通过二甲苯脱蜡,梯度酒精水化后,将切片置于修复液中(pH6.0, 0.01 mol 枸橼酸盐缓冲液),高压热修复 3 min,待冷却后用磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗 2 次,5 min/次,滴加一抗(PLK1 蛋白和 γ -微管蛋白工作液稀释度分别为 1:100 和 1:200),在室温孵育 120 min; PBS 液冲洗,滴加二抗,在室温下孵育 30 min, PBS 液冲洗,最后用 DAB 显色后苏木素复染 10 s,流水冲洗,梯度酒精脱水后封片。每批染色同时设置阳性和阴性对照:以已知阳性标本为阳性对照,以 PBS 液取代一抗作为阴性对照。免疫组化结果由两位资深病理科医师独立判定取均值。

1.3 结果判断 PLK1 蛋白以细胞浆或细胞核着黄色颗粒或团块为阳性染色, γ -微管蛋白以胞浆着黄色颗粒或团块为阳性染色。随机选取上皮或肿瘤区的 5 个不同区域,观察 5 个 400 倍高倍视野,计数阳性细胞数、阳性细胞百分率和评定显色强度,依照阳性细胞百分率 <5%, 5%~25%, 25%~50%, 50%

~75%, >75% 分别得 0、1、2、3、4 分;依照显色强度未着色、浅黄色、棕黄色、棕褐色分别得 0、1、2、3 分,两项得分相乘,并取 5 个高倍视野得分的平均值。按照分数分为 4 个等级:0~3 为阴性(-), 4~6 为低表达(+), 7~8 为中表达(++), 9 分以上为高表达(+++)。(+)、(++) 和(+++) 的病例均归为阳性。

1.4 统计学处理 数据处理采用 SPSS13.0 统计软件,进行 χ^2 检验、Fisher's 确切概率法和 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLK1 蛋白在正常口腔黏膜组织和 OSCC 中的表达情况 PLK1 蛋白在正常口腔黏膜组中未见阳性表达,在 OSCC 组中的阳性表达率达为 70.2% (33/47),中、高表达共 28 例。PLK1 蛋白阳性表达率在 OSCC 组显著高于正常口腔黏膜组, $P < 0.05$ 。见图 1~图 2。

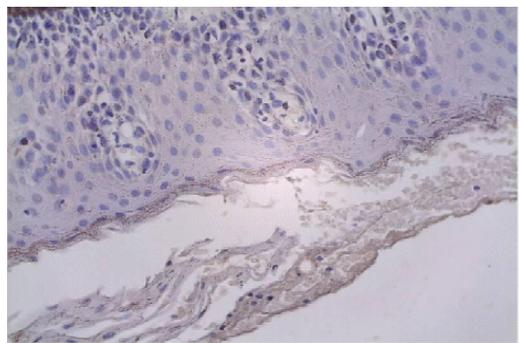


图 1 PLK1 蛋白在正常口腔黏膜组织中的阴性表达(SABC×400)

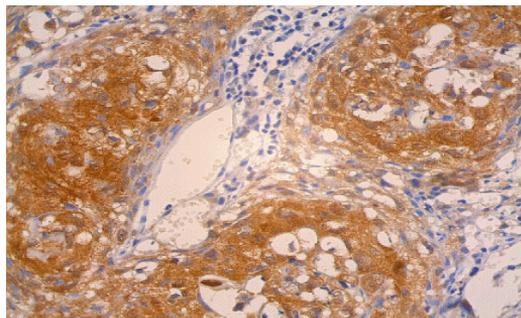


图 2 PLK1 蛋白在口腔鳞癌组织中的阳性表达(SABC×400)

2.2 γ -微管蛋白在正常口腔黏膜组织和 OSCC 中的表达情况 γ -微管蛋白在正常口腔黏膜上皮基底层仅见极少数基底细胞浆阳性着色,按标准判为阴性表达;而在 OSCC 组织中的阳性表达率为 76.6% (36/47),阳性细胞以中、高度表达为主呈大量散在分布,有的甚至满布视野。 γ -微管蛋白表达在正常口腔黏膜组与 OSCC 组比较差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。见图 3~图 4。

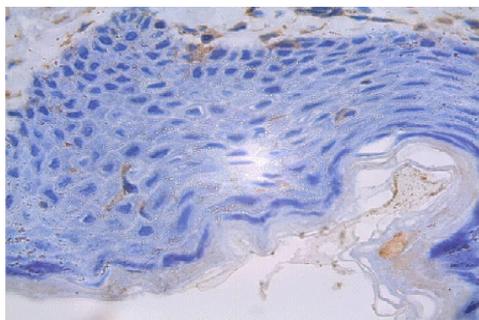


图 3 γ -微管蛋白在正常口腔黏膜组织中的阴性表达(SABC× 1000)

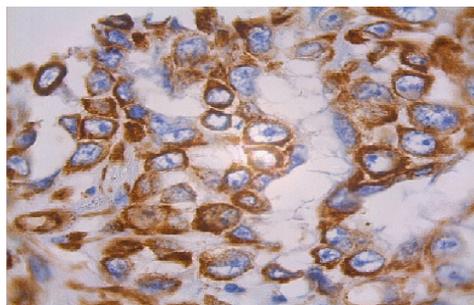


图 4 γ -微管蛋白在口腔鳞癌组织中的阳性表达(SABC× 1000)

2.3 PLK1 与 γ -微管蛋白表达之间的相关性 Spearman 相关分析显示,OSCC 组织中 PLK1 蛋白表达与 γ -微管蛋白表达之间正相关, $r=0.305, P<0.05$ 。见表 1。

表 1 口腔鳞癌组织中 PLK1 与 γ -微管蛋白表达之间的相关性分析(例)

检测指标	PLK1(+)	PLK1(-)
γ -微管蛋白(+)	29	7
γ -微管蛋白(-)	4	7

3 讨论

中心体异常可表现为中心体数目扩增、结构异常、中心粒周围物质聚集过多、中心体蛋白的异常磷酸化、无粒中心体、微管成核能力增强等^[4]。中心体由中心粒和中心粒周围物质(Pericentriolar Materia, PCM)两部分组成,目前的相关研究提示中心体上恒定存在的蛋白(也即核心蛋白,指的是在用各种方法解聚微管之后它们的中心体定位并不会受影响)并不多,而 γ -微管蛋白就是一个典型的中心体核心蛋白^[5],主要以 γ -微管蛋白环式复合物(γ -Tubulin Ring Complex, γ -TuRC) 和 γ -微管蛋白小复合物(γ -Tubulin Small Complex, γ -TuSC) 两种形式存在, γ -TuRC 和 γ -TuSC 能与一些 γ -微管蛋白复合物结合蛋白结合,锚定在微管组织中心参与微管成核起始。研究发现,向微管蛋白溶液中加入 γ -TuRC,能够引起微管蛋白的聚集,微管成核能力随着 γ -TuRC 的浓度的增加呈线性增长^[6]。Iemura K 等^[7]研究发现通过 Western blot 方法测定细胞中 γ -微管蛋白的平

均含量可以用来评价中心体扩增情况。本研究应用免疫组化的方法以 γ -微管蛋白的单克隆抗体在 OSCC 细胞中的表达情况来评价中心体扩增情况,发现其结果与卢红等^[8]应用免疫荧光方法检测 OSCC 组织中中心体扩增情况相似。

中心体上除了 γ -微管蛋白等核心蛋白之外还存在随着细胞周期的改变而被中心体核心蛋白直接或间接招募到中心体上的一些调控因子,PLK1 就是这些众多调控因子之一^[9]。PLK1 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,是细胞周期相关事件包括双极纺锤体形成、染色体分离和中心体成熟的重要调控因子^[10-11]。大量研究发现,PLK1 在许多恶性肿瘤中呈高表达,并与肿瘤的某些生物学行为密切相关^[12-13],提示 PLK1 可能在恶性肿瘤转化过程中发挥重要作用。本研究中,正常口腔黏膜组织未见 PLK1 蛋白阳性表达,而在 OSCC 中其阳性表达率为 70.2%(33/47),以中、高度表达为主。本研究及相关报道说明,PLK1 过表达确实普遍存在于实体肿瘤组织中,包括 OSCC 组织^[14]。

癌细胞中过量的中心体可能导致染色体的错误分类及破坏,形成非整倍体性染色体,可导致肿瘤抑制基因的丢失,活化致癌基因^[15],故认为中心体可能是癌症形成的驱动力而非结果,而 PLK1 对中心体成熟的必要性可能是其致癌作用的一种机制。中心体成熟实际上是 γ -TuRC 和其他的 PCM 向中心体聚集的过程。 γ -TuRC 的形成依赖于 PLK1,但其完整的机制还并不清楚。有报道称^[16],作为 γ -TuRC 成员之一的 Nedd1 的磷酸化可能起到了重要的作用。Nedd1 首先被 CDK 磷酸化,形成于一个与 PLK1 结合的区域,然后 PLK1 相继磷酸化 Nedd1 的另外 4 个位点,促进其与 γ -tubulin 的结合,以此决定 γ -TuRC 在中心体的募集。Yamamoto Y 等^[17]发现,发生 PLK1 过表达的膀胱癌与没有发生 PLK1 过表达的膀胱癌相比较,前者更易发生中心体扩增。本研究发现,在 OSCC 组织中,PLK1 阳性表达与 γ -微管蛋白表达之间正相关, $r=0.305, P<0.05$,推测 PLK1 过表达可能通过直接调控中心体组分或对中心体相关蛋白磷酸化作用失调,而引发 OSCC 中心体扩增,从而导致异常纺锤体极形成和染色体分离错误,最终导致 OSCC 的形成。

参考文献

[1]Thirthagiri E,Robinson CM,Huntley S,et al.Spindle assembly checkpoint and centrosome abnormalities in oral cancer[J].Cancer Lett,2007,258(2):276-285

(下转第 26 页)

与手术创伤、术后进食过早、患者精神紧张等多方面因素有关。主要的临床症状有上腹部胀痛、恶心、呕吐、暖气、反酸等^[4]，在治疗上主要以维持水盐平衡、洗胃、禁食、胃肠减压、止酸、营养支持等西医疗法为主，但是患者的疗效不佳。而中医认为健脾益气养胃才是关键，而中西医结合治疗对胃切除手术后胃排空障碍则起到了至关重要的作用。中医认为，脾胃互为表里，脾升胃降，才能够共同完成对食物的消化与吸收，由于行胃部切除手术后耗气伤血，使胃失和降，所吃的食物便停留在胃脘处，随着胃气的上逆就造成了患者出现呕吐、暖气的症状^[5]。因此，治疗以通为主，如何解决健运失司、中气不足才是解决该病的关键。在本药方中黄芪、党参、白术主要起到健脾益气养胃的作用；厚朴、当归、枳实则有行气破积的作用，并且厚朴还对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等具有不同程度的抗菌和抑菌的作用，能够降低术后对伤口处的感染；而枳实可以对小肠平滑肌钙离子的浓度起到调节作用，不仅能够降低胃肠平滑肌的张力及起到解痉作用，而且还能使胃肠兴奋起到增进逆蠕动的作用；桃仁、赤芍有活血化瘀的作用，能够促进残胃的恢复和吻合血供，有效的改善微循环；陈皮则有行气止痛的作用；半夏、生姜、柴胡则有温胃止呕、和胃降逆的作用；大黄具有通里攻下的作用

^[6]。相关研究显示，中西医结合治疗在胃切除手术后胃排空障碍上能明显的降低患者术后的症状，并且加快患者胃动力的恢复^[7]。本研究结果显示，观察组总有效率为 96.9%，明显高于对照组；观察组患者术后 2 个月症状及恢复胃动力时间均少于对照组，同样也证明了本研究中中医的配方能有效的起到缓解患者胃切除手术后胃排空障碍，促进患者胃动力的恢复，减少患者术后的临床症状反应。综上所述，中西医结合治疗胃切除手术后胃排空障碍具有疗效好、症状轻及少的优点，值得临床推广使用。

参考文献

[1] 陈飞,季加孚.腹部手术后胃瘫综合征的诊治进展[J].中国实用外科杂志,2013,33(4):340-343
 [2] 韩芳,赵兵,孟源,等.胃大部分切除后胃瘫综合征 28 例临床治疗疗效分析[J].现代预防医学,2012,39(10):2618-2619
 [3] 李连顺,李玉民,焦作义.胰十二指肠切除术后胰胃吻合和胰肠吻合安全性与疗效的 Meta 分析 [J]. 中国普通外科杂志,2015,24(3):319-326
 [4] 向进见,田夫,李明忠,等.腹部手术后胃瘫 40 例临床分析[J].重庆医学,2010,39(1):90-91
 [5] 徐金芳,虞立平,王悦.腹部手术后功能性胃排空障碍的护理体会 [J].江苏医药,2012,38(21):2635-2636
 [6] 曲义坤,刘伟新,张英海,等.中西医结合疗法对腹部手术后患者胃瘫的预防作用[J].中国老年学杂志,2013,33(9):2194-2195
 [7] 府剑英,熊佩华,梁瑾.腹部手术后胃瘫综合征的中西医结合疗效观察[J].中国中西医结合杂志,2013,33(12):1708-1710

(收稿日期: 2016-01-07)

(上接第 6 页)

[2] De Carcer G, Malumbres M. A centrosomal route for cancer genome instability[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(6): 504-506
 [3] Zou J, Zhang D, Qin G, et al. BRCA1 and FancJ cooperatively promote interstrand crosslinker induced centrosome amplification through the activation of polo-like kinase 1[J]. Cell Cycle, 2014, 13(23): 3685-3697
 [4] Salisbury JL, Whitehead CM, Lingle WL, et al. Centrosomes and cancer [J]. Biol Cell, 1999, 91(6): 451-460
 [5] Joshi HC, Palacios MJ, McNamara L, et al. Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation[J]. Nature, 1992, 356(6364): 80-83
 [6] Job D, Valiron O, Oakley B. Microtubule nucleation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(1): 111-117
 [7] Iemura K, Kamemura K, Miwa M. Assessment of the centrosome amplification by quantification of gamma-tubulin in Western blotting [J]. Analytical Biochemistry, 2007, 371(2): 256-258
 [8] 卢虹, 杨宏, 蔡扬. 口腔鳞癌中心体扩增与 p53 STK15 蛋白表达相关性[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(13): 775-778
 [9] Wang G, Jiang Q, Zhang C. The role of mitotic kinases in coupling the centrosome cycle with the assembly of the mitotic spindle [J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt19): 4111-4122

[10] Hyun SY, Hwang HI, Jang YJ. Polo-like kinase-1 in DNA damage response[J]. BMB Rep, 2014, 47(5): 249-255
 [11] Kishi K, van Vugt MA, Okamoto K, et al. Functional dynamics of Polo-like kinase 1 at the centrosome [J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(11): 3134-3150
 [12] Oliveira JC, Pezuk JA, Brassesco MS, et al. PLK1 expression and BI 2536 effects in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Pediatr Blood Cancer, 2014, 61(7): 1227-1231
 [13] Zhang Z, Zhang G, Kong C. High expression of polo-like kinase 1 is associated with the metastasis and recurrence in urothelial carcinoma of bladder[J]. Urol Oncol, 2013, 31(7): 1222-1230
 [14] 李世灵, 蔡扬, 于燕妮, 等. 口腔癌及癌前病变中 PLK1 蛋白表达及其意义[J]. 临床实验病理学杂志, 2010, 26(1): 107-108
 [15] Doxsey SJ. Centrosomes as command centres for cellular control[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(5): E105-108
 [16] Johmura Y, Soung NK, Park JE, et al. Regulation of microtubule-based microtubule nucleation by mammalian polo-like kinase 1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(28): 11446-11451
 [17] Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawachi S, et al. Overexpression of polo-like kinase 1 (PLK1) and chromosomal instability in bladder cancer[J]. Oncology, 2006, 70(3): 231-237

(收稿日期: 2016-02-21)