

· 论 著 ·

Polo样激酶4调控口腔鳞状细胞癌侵袭、增殖和凋亡的分子机制研究

秦欢¹, 王洁², 杨杰¹, 华英杰¹, 曲会娟³, 冀洪海³

1. 山东第二医科大学附属第一医院口腔科, 山东 潍坊 261041;
2. 寿光市口腔医院, 山东 潍坊 262700;
3. 山东第二医科大学口腔医学院, 山东 潍坊 261053

[摘要] 背景与目的: Polo样激酶4 (Polo-like kinase 4, PLK4) 为细胞周期调控蛋白, 与多种恶性肿瘤的发生、发展关系密切。本研究旨在探究PLK4对口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 增殖、凋亡和侵袭的影响。方法: 利用基于基因表达水平值的交互式分析平台2数据库 (gene expression profiling interactive analysis 2, GEPIA2) 和阿拉巴马大学伯明翰分校癌症数据分析门户网站数据库 (the University of Alabama at Birmingham Cancer Data Analysis Portal, UALCAN) 在线数据平台分析PLK4在头颈部鳞癌及周围正常组织中的表达, 并分析OSCC细胞系中PLK4的mRNA表达和蛋白水平。采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测进一步分析敲低和过表达PLK4后对磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphorylated phosphoinositide 3-kinase, p-PI3K)、蛋白激酶B (protein kinase B, AKT)、磷酸化蛋白激酶B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT)、生存素 (survivin)、细胞周期蛋白依赖性激酶D1 (cyclin D1) 的mRNA表达和蛋白水平的影响。通过细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 实验、流式细胞术、transwell侵袭实验分析PLK4对细胞的增殖、凋亡和侵袭活动的影响。此外, 通过将12只4周龄SPF级BALB/c nude雌性裸鼠通过随机数字表法分为sh-NC组 ($n=6$) 和sh-PLK4组 ($n=6$)。分别在裸鼠右前腋下注射sh-NC/sh-PLK4细胞进行裸鼠皮下移植瘤模型, 观察统计两组裸鼠体质量、瘤体积和质量, 并对剥离的瘤体组织进行H-E染色病理学诊断。动物实验已获得山东第二医科大学动物实验中心的批准 (编号: 2024SDL840)。结果: PLK4在OSCC中相较于正常组织呈现出高表达。此外, PLK4在OSCC细胞系 (HN6、Cal-27、SCC-4、SCC-9、SCC-25) 中相较于口腔黏膜上皮细胞高表达 ($P<0.05$)。Western blot结果显示, 对OSCC细胞进行敲低和过表达PLK4后, PI3K/AKT信号转导通路蛋白p-PI3K、p-AKT、cyclin D1及survivin分别表达降低和增高 ($P<0.05$); 细胞增殖活力及穿膜细胞数在敲低和过表达PLK4后分别出现降低和增高, 而细胞的凋亡率则分别增高和降低 ($P<0.05$)。此外, 相较于sh-NC组, sh-PLK4组裸鼠肿瘤的体积和质量降低 ($P<0.05$), 而两组裸鼠的质量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。sh-PLK4组裸鼠肿瘤组织相较于sh-NC组肿瘤组织核异形性减少。结论: Polo样激酶4可介导PI3K/AKT信号转导通路参与OSCC的侵袭、增殖和凋亡活动, 有望成为治疗OSCC的新靶点。

[关键词] Polo样激酶4; 口腔鳞状细胞癌; PI3K/AKT信号转导通路; 增殖; 凋亡; 侵袭

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2025.04.004

基金项目: 无。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

伦理批件: 2024SDL840。

知情同意: 不需要。

引用本文: 秦欢, 王洁, 杨杰, 等. Polo样激酶4调控口腔鳞状细胞癌侵袭、增殖和凋亡的分子机制研究 [J]. 中国癌症杂志, 2025, 35(4): 365-375.

Funding: no.

Conflicts of interest: authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: 2024SDL840.

Informed consent: not required.

Cite this article: QIN H, WANG J, YANG J, et al. Mechanistic study on PLK4 regulation of invasion, proliferation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma [J]. Chin Oncol, 2025, 35(4): 365-375.

Mechanistic study on PLK4 regulation of invasion, proliferation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma QIN Huan¹, WANG Jie², YANG Jie¹, HUA Yingjie¹, QU Huijuan³, JI Honghai³ (1. Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Shandong Second Medical University, Weifang 261041, Shandong Province, China; 2. Shouguang Stomatological Hospital, Weifang 262700, Shandong Province, China; 3. School of Stomatology, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China)

Correspondence to: JI Honghai E-mail: zyqk202201@163.com

[**Abstract**] **Background and purpose:** Polo-like kinase 4 (PLK4) is a cell cycle regulatory protein, which is closely related to the occurrence and development of a variety of malignant tumors. The aim of this study was to investigate the role of PLK4 in the proliferation, invasion and apoptosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods:** Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) and the University of Alabama at Birmingham Cancer Data Analysis Portal (UALCAN) were used to analyze the expression of PLK4 in head and neck squamous cell carcinoma and surrounding normal tissues. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) and Western blot were employed to evaluate the mRNA and protein expression of PLK4 in OSCC cells. We further analyzed PLK4, phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphorylated phosphoinositide 3-kinase (p-PI3K), protein kinase B (AKT), phosphorylated protein kinase B (p-AKT), survivin, and cyclin D1 protein expression. The effects of PLK4 on cell proliferation, apoptosis and invasion were analyzed by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, flow cytometry and transwell assay. In addition, 12 4-week-old SPF BALB/c female nude mice were divided into sh-NC group ($n=6$) and sh-PLK4 group ($n=6$) by random number table method. The sh-NC/sh-PLK4 cells were injected into the right anterior armpit of nude mice for subcutaneous tumor formation. The body weight, tumor volume and tumor weight of the two groups of nude mice were observed, and the stripped tumor tissues were analyzed by H-E staining. The animal experiments were approved by the Animal Experiment Center of Shandong Second Medical University (No: 2024SDL840). **Results:** The results of GEPIA2 and UALCAN online databases showed that PLK4 was highly expressed in OSCC compared with normal tissues. In addition, PLK4 was highly expressed in OSCC cell lines (HN6, Cal-27, SCC-4, SCC-9, SCC-25) compared with oral mucosal epithelial cells ($P<0.05$). Western blot results showed that the expression levels of PI3K/AKT signaling pathway proteins p-PI3K, p-AKT, cyclin D1 and survivin were decreased after PLK4 knockdown and increased after PLK4 overexpression in OSCC cells ($P<0.05$). The cell proliferation activity and the number of transmembrane cells were positively correlated with the decrease and increase of PLK4 expression ($P<0.05$), while the cell apoptotic rate was negatively correlated ($P<0.05$), indicating that cell proliferation and apoptosis were both affected. In addition, compared with the sh-NC group, the tumor volume and weight of the nude mice in the sh-PLK4 group were decreased ($P<0.05$), while there was no significant difference in the body weight of the nude mice between the two groups ($P>0.05$). Moreover, the nuclear atypia of tumor tissues in sh-PLK4 group was lower than that in sh-NC group ($P<0.05$). **Conclusion:** PLK4 can regulate the invasion, proliferation and apoptosis of OSCC cells, potentially through the activation of PI3K/AKT signaling pathway.

[**Key words**] PLK4; Oral squamous cell carcinoma; PI3K/AKT signaling pathway; Proliferation; Apoptosis; Invasion

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是一种较为常见的头颈部鳞状细胞癌, 其具有侵袭性强且容易发生淋巴结转移^[1]。由于OSCC患者早期临床特征不明显, 确诊时往往已处于晚期^[2]。目前主要的治疗方法仍是手术结合放疗及化疗的综合治疗方式。虽然现阶段的治疗方法较之前已有改善, 但OSCC患者的预后仍较差。有研究^[3-4]显示, 未来数十年内, OSCC的发病率和死亡率会再创新高。因此, 积极探寻新的治疗方式具有重要意义。

Polo样激酶4 (Polo-like kinase 4, PLK4) 的编码基因位于染色体4q28上, 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Polo家族的一员, 亦称为SAK, 基因在人类肿瘤细胞中处于常缺失状态, 或被重排^[5]。有研究^[6]表明, PLK4在肝癌中高表达, 与肝癌的生物学行为关系密切。PLK4抑制剂CFI-400945可通过降低肿瘤组织中PLK4的表

达进而调控肝癌细胞周期等途径对肝癌产生抑制。在肺腺癌和肺鳞状细胞癌中, PLK4处于异常高表达状态, 并与患者的预后相关^[7]。在三阴性乳腺癌中, PLK4同样呈高表达, 抑制PLK4可以显著增强放疗的效果^[8]。PLK4高表达可增强肿瘤细胞的侵袭、迁移及增殖能力, 致使肿瘤治疗效果不佳, 患者预后也不理想^[9]。

目前, 对于PLK4在OSCC中的作用的相关研究较少。因此, 本研究通过细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 实验、流式细胞术、transwell侵袭实验、实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 及蛋白质印迹法 (Western blot) 分析PLK4在OSCC中的作用机制, 并通过裸鼠皮下移植瘤模型对PLK4的作用及机制进行分析, 为治疗OSCC提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

12只4周龄SPF级BALB/c nude雌性裸鼠 [体重: (20±2) g] 由济南朋悦实验动物繁育有限公司 [动物生产许可证号: SCXK (鲁) 2022-0006] 提供; 动物实验于山东第二医科大学实验动物中心 [许可证号: SYXK (鲁) 2019-0016] 进行。环境温度22~26 °C, 相对湿度40%~60%, 12 h/12 h昼夜交替, 将所有裸鼠饲养在无特殊病原体的条件下, 提供充足的食物和水。动物实验已经过山东第二医科大学动物实验中心的伦理委员会批准 (编号: 2024SDL840)。

1.1.2 细胞

人OSCC细胞株 (包括HN6、Cal-27、SCC-4、SCC-9、SCC-25细胞) 及对照组的正常细胞 (口腔黏膜上皮细胞) 全部为山东第二医科大学提供。HN6、Cal-27、SCC-4、SCC-9、SCC-25细胞及口腔黏膜上皮细胞于配制的改良鹰酮基本培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 中进行培养和传代。将细胞置于生长环境为CO₂体积分数为5%、相对饱和湿度的37 °C的恒温细胞培养箱内。本研究于山东第二医科大学口腔生物医学重点实验室进行实验。

1.2 药物与试剂

胰蛋白酶、DMEM培养基、青霉素、链霉素购自美国Gibco公司, 兔抗人多抗购自美国CST公司, 反转录试剂盒、RNA提取试剂盒、TB Green Premix Ex TaTM购自日本TaKaRa公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自以色列BI公司, 磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor, PMSF) 购自滁州仕诺达生物科技有限公司, 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国Amersco公司。RTFQ-PCR引物PLK4、GAPDH由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。CO₂细胞培养箱购自美国Thermp公司, CX31显微镜购自日本Olympus公司, DM4B显微镜购自英国Leica公司, RTFQ-PCR仪购自美国Applied Biosystems公司。

1.3 实验方法

1.3.1 在线预测网站

通过BEST (https://rookieutopia.com/app_direct/BEST/)、基于基因表达水平值的交互式分析平台2数据库 (gene expression profiling interactive analysis 2, GEPIA2) (<http://gepia2.cancer-pku.cn>) 和阿拉巴马大学伯明翰分校癌症数据分析门户网站数据库 (the University of Alabama at Birmingham Cancer Data Analysis Portal, UALCAN) (<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>) 在线数据分析平台分析PLK4在头颈部鳞癌 (head and neck squamous carcinoma, HNSC) 组织中的表达水平。并对癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中的HNSC数据进行选择和下载 (纳入分析的标准为: ① 原发性肿瘤; ② 年龄18岁~80岁。排除分析的标准为: ① 有任何其他的肿瘤病史或合并其他肿瘤、转移性肿瘤; ② 临床数据不完整或拒绝随访; ③ 无准确的PLK4表达检测结果)。基于GEPIA2、UALCAN和TCGA数据库只有HNSC选项, 没有OSCC固定选项, 因此本研究选用HNSC作为初步预测OSCC选项, 并通过后续实验进行验证。

1.3.2 sh-PLK4敲低PLK4表达

将处于对数生长期的细胞铺至6孔板, 各孔呈20%~30%的细胞密度。向各孔内分别放入2 μL聚凝胺 (10 g/L) 与30 μL慢病毒液后移入培养箱内培养3 d, 之后用嘌呤霉素培养液 (10 mg/L) 对制备的sh-PLK4稳定转染细胞株进行筛选, 最终通过RTFQ-PCR与Western blot检测对转染效率加以验证。PLK4慢病毒载体 (sh-PLK4) 及其阴性对照 (sh-NC) 由上海吉玛基因科技有限公司设计合成 (表1)。

1.3.2 sh-PLK4敲低PLK4表达

表1 针对PLK4设计的2条干扰序列

表1 针对PLK4设计的2条干扰序列

sh-PLK4	Target sequence (5'-3')
sh-PLK4-1	GCTGTGTGGGTTTCAGTTTAAAT
sh-PLK4-2	GAAATCCAGCAGATCGTTTAA
sh-NC	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG

1.3.3 PLK4过表达质粒转染

PLK4的过表达质粒pcDNA3.1-PLK4和对照质粒pcDNA3.1由上海吉玛基因科技有限公司构建。将处于对数生长期的各组细胞铺至6孔板, 根据操作指导, 将LipofectamineTM3000转染试剂稀释后分别与质粒载体pcDNA3.1和pcDNA3.1-PLK4混合共温育15 min, 之后将最终体系加入6孔板中进行转染, 并将实验分为vector组和PLK4组。

1.3.4 RTFQ-PCR检测PLK4 mRNA表达

使用紫外分光光度计对各组所提RNA浓度与纯度进行测定。每组分别提取2 μL cDNA进行实验, 各组设置3个副孔。以下为

PLK4的引物序列: 编码链为5'-AGCGAACACTTTCACCATTACAG-3', 反义链为5'-CATCATCATCTCTCCAGTAGCA-3'。以下为内参GAPDH的引物序列: 编码链为5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', 反义链为5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。根据说明书来制备PCR反应体系, 并进行相关反应参数的设置。待反应终止, 基于Ct值, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算每组PLK4 mRNA的相对表达量。

1.3.5 Western blot检测

采用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法对所收集的各组蛋白进行测量, 依次完成如下操作: 上样体系配制-电泳-转膜; 完成一抗PLK4 (1:1 000)、磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) (1:1 000)、细胞周期蛋白依赖激酶D1 (cyclin D1) (1:1 000)、磷酸化蛋白激酶B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT) (1:1 000)、生存素 (survivin) (1:1 000)、GAPDH (1:5 000) 的温育, 含有吐温-20三乙醇胺缓冲盐溶液 (Tris-buffered saline Tween, TBST) 稀释二抗 (1:50 000), 温育, 洗膜后用显影液进行显影, 此操作流程需进行3次。

1.3.6 CCK-8实验

向96孔板分别注入对数生长期的Cal-27与SCC-25细胞悬液, 各孔细胞计数约为2 000个细胞, 并于培养箱中进行培养。参照操作说明, 每间隔24 h于孔内注入10 μ L CCK-8溶液, 暗环境下培养2 h, 对 $D_{450\text{nm}}$ 进行测定并完成细胞增殖曲线的制作。实验独立重复3次。

1.3.7 流式细胞术检测细胞周期

待消化结束, 将细胞悬液收集起来, 于1 000 \times g离心5 min, 用1 mL冰浴预PBS对细胞重悬、离心后固定过夜。次日离心弃上清液后向样品中加入RNaseA溶液, 水浴30 min后避光加入0.5 mL PI试剂, 温育30 min并避光, 经滤网过滤后转移至流式管中, 上机检测。实验独立重复3次。

1.3.8 流式细胞术检测细胞凋亡

使用胰蛋白酶消化处理各组细胞, 500 \times g离心5 min, 然后在室温下使用Annexin V-FITC和PI染色15 min (避光), 结果采用FACSCalibur流式细胞仪进行相关分析。实验独立重复3次。

1.3.9 细胞侵袭实验

4 $^{\circ}$ C环境下将Matrigel基质胶稀释备用。将小室放入24孔板, 之后取50 μ L Matrigel基质胶稀

释胶加入到小室上层, 培养箱中过夜24 h。之后在上室中加入200 μ L密度为 1×10^5 个/mL各组细胞, 下室加入650 μ L完全培养基。24 h后用棉签轻轻擦拭Matrigel基质胶及胶上的细胞, 并将小室放入4%的多聚甲醛后固定20 min。用0.1%的结晶紫染色15 min, PBS洗3遍, 除去未与细胞结合的结晶紫, 并用棉签轻轻擦拭小室的上侧后于高倍显微镜下选取5个视野观察细胞并计数。

1.3.10 BALB/c裸鼠皮下移植瘤实验

通过参考相关研究报道^[10], 本研究构建裸鼠皮下移植瘤模型数量及具体操作简述如下: 将12只4周龄SPF级的BALB/c nude雌性小鼠 (通过耳标对裸鼠进行编号), 按照6只/组的分组将裸鼠通过随机数字表法随机分为sh-PLK4组 ($n=6$) 和sh-NC组 ($n=6$)。适应性饲养1周, 发现裸鼠未出现打架、护食等不良事件。1周后分别将sh-PLK和sh-PLK4组小鼠按每只 2×10^7 细胞皮下植入。部位为裸鼠右前腋下, 以周为单位对肿瘤体积^[11] (计算标准先验设定, $V=ab^2/2$, a 为肿瘤最长径, b 为与肿瘤垂直的最短径) 进行记录, 接种30 d后 (sh-NC及sh-PLK4组裸鼠, 精神状态良好, 饮食、活动等行为尚可, 未出现因各种原因导致的死亡情况。右前腋下瘤体处均未出现皮肤破溃、出血、感染等, 故将sh-NC及sh-PLK4组12只裸鼠纳入统计分析), 对裸鼠腹腔注射戊巴比妥钠进行安乐死, 剥离瘤体并处理, 称重瘤体质量, 拍照并记录数据, 然后用10%的福尔马林对肿块进行固定、石蜡包埋并制备切片, 对其进行H-E染色后置于显微镜下观察。随机选择5个视野观察并进行记录。为降低实验过程中产生的偏倚, 整个动物实验过程中研究者采用随机数字表法随机对裸鼠进行处理和数据测量。同时, 采用盲法进行动物实验。① 动物分配: 研究者对于裸鼠的分组情况不知情; ② 实验实施: 动物管理者和研究者对分组情况不知情; ③ 结果评估及数据分析: 对实验结果进行评估和分析的研究者对分组不知情。

1.4 统计学处理

所有实验均独立重复3次。实验数据的呈现方式为 $\bar{x}\pm s$ 。若数据符合正态分布, 则由 t 检验进行2组间对比, 单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组间对比, 进一步两两比较采用LSD- t 检验。若数据不符合正态分布, 则采用Kruskal-Wallis或Mann-Whitney检验。根据PLK4表达量的中位值, 将TCGA-HNSC数据集分为PLK4高表达组和PLK4低表达组, 用R软件limma包筛选两组之间的差异基因, 以Benjamini-Hochberg (BH) 进行校正后的 $P<0.05$ 为标准进行筛选。使用R包

“clusterProfiler”，“enrichplot”和“ggplot2”对差异基因进行KEGG功能富集分析，并通过RStudio软件进行可视化。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。利用SPSS 16.0和Graphpad Prism 10.1.2软件对实验结果分析计算和作图。

2 结果

2.1 PLK4在OSCC组织及细胞系中高表达情况

为探究PLK4在OSCC组织中的表达情况，本研究通过GEPIA2和UALCAN在线数据分析平台进行分析。从GEPIA2平台中的31种肿瘤中选择HNSC，并输入PLK4（Ensembl ID：ENSG00000142731.10），结果显示，相较于正常组织（ $n=44$ ），PLK4在HNSC组织（ $n=519$ ）中的表达水平显著增高（ $P < 0.01$ ）。而从UALCAN平台中的35种肿瘤中选择HNSC，并输入PLK4，结果显示，相较于正常组织（ $n=44$ ），PLK4在HNSC组织（ $n=520$ ）中的

表达水平显著增高（ $P < 0.01$ ）。以上结果表明，PLK4可能在OSCC组织中表达异常增高（图1A~D）。

此外，本研究通过RTFQ-PCR和Western blot实验对OSCC细胞系中PLK4的mRNA和蛋白的表达进行分析。RTFQ-PCR实验结果显示，PLK4在OSCC细胞系中的mRNA相对表达量均高于正常细胞（正常细胞为 0.280 ± 0.043 ，HN6细胞为 0.650 ± 0.044 ，Cal-27细胞为 0.840 ± 0.087 ，SCC-9细胞为 0.759 ± 0.040 ，SCC-25细胞为 0.533 ± 0.067 ，SCC-4细胞为 0.718 ± 0.101 ，图1E）；Western blot结果表明，较正常细胞，PLK4在OSCC细胞系中高表达（正常细胞为 0.185 ± 0.071 ，HN6细胞为 0.824 ± 0.076 ，Cal-27细胞为 1.373 ± 0.141 ，SCC-9细胞为 0.967 ± 0.096 ，SCC-25细胞为 0.352 ± 0.106 ，SCC-4细胞为 1.310 ± 0.157 ，图1F、G）。以上结果表明，PLK4在OSCC细胞中表达同样异常高表

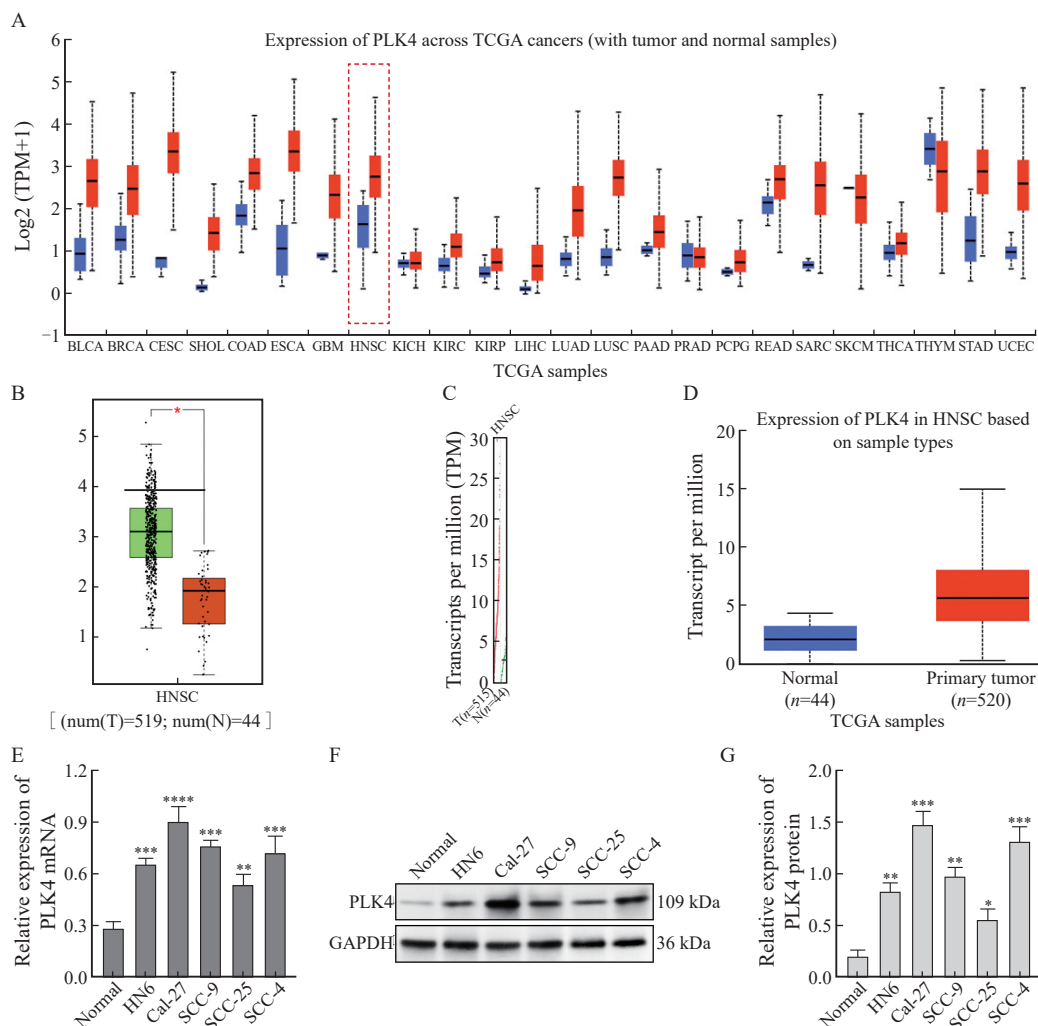


图1 PLK4在HNSC及OSCC组织及细胞系中高表达

Fig. 1 PLK4 was highly expressed in HNSC and OSCC tissues and cell lines

A-D: The expression of PLK4 in OSCC was analyzed in GEPIA2 and UALCAN. The blue color in A and B indicated normal tissue, and the red color indicated tumor tissue; E: The PLK4 mRNA in OSCC and normal cells; F-G: Protein expression of PLK4 in OSCC and normal cells; *: $P < 0.05$, compared with normal; **: $P < 0.01$, compared with normal; ***: $P < 0.001$, compared with normal; ****: $P < 0.0001$, compared with normal. Normal: Normal oral mucosal epithelial cells.

达。在OSCC细胞系中, mRNA及蛋白相对表达量最高的是Cal-27细胞 ($P < 0.001$), 最低的是SCC-25细胞 ($P < 0.05$)。

2.2 敲低PLK4表达抑制Cal-27细胞增殖和侵袭, 促进凋亡

RTFQ-PCR结果显示, 在Cal-27细胞中sh-P-1和sh-P-2组的PLK4 mRNA相对表达量明显低于sh-NC组 (sh-NC为 0.841 ± 0.076 , sh-P-1为 0.205 ± 0.076 , sh-P-2为 0.374 ± 0.066 , 图2A); Western blot结果显示, 在Cal-27细胞中sh-P-1和sh-P-2组的PLK4蛋白相对表达量显著低于sh-NC组 (sh-NC为 1.343 ± 0.147 , sh-P-1为 0.512 ± 0.079 , sh-P-2为 0.797 ± 0.058 , 图2B)。

通过以上结果表明, sh-P-1对Cal-27细胞PLK4的敲低效果更佳理想, 故选取sh-P-1进行后续实验。

流式细胞术分析Cal-27细胞凋亡率结果显示, sh-PLK4组中的Cal-27细胞凋亡率显著高于sh-NC组 (Cal-27细胞凋亡率: 22.577 ± 1.864 vs 17.020 ± 1.129 , $P < 0.01$, 图2C)。CCK-8结果显示, sh-PLK4组中的Cal-27细胞增殖能力显著低于sh-NC组 (D_{24h} 值: 0.440 ± 0.071 vs 0.689 ± 0.055 , $P < 0.01$; D_{48h} 值: 0.572 ± 0.071 vs 0.933 ± 0.089 , $P < 0.01$; D_{72h} 值: 0.754 ± 0.059 vs 1.289 ± 0.094 , $P < 0.01$, 图2D)。流式细胞术分析Cal-27细胞增殖周期结果显示, 相较于sh-NC

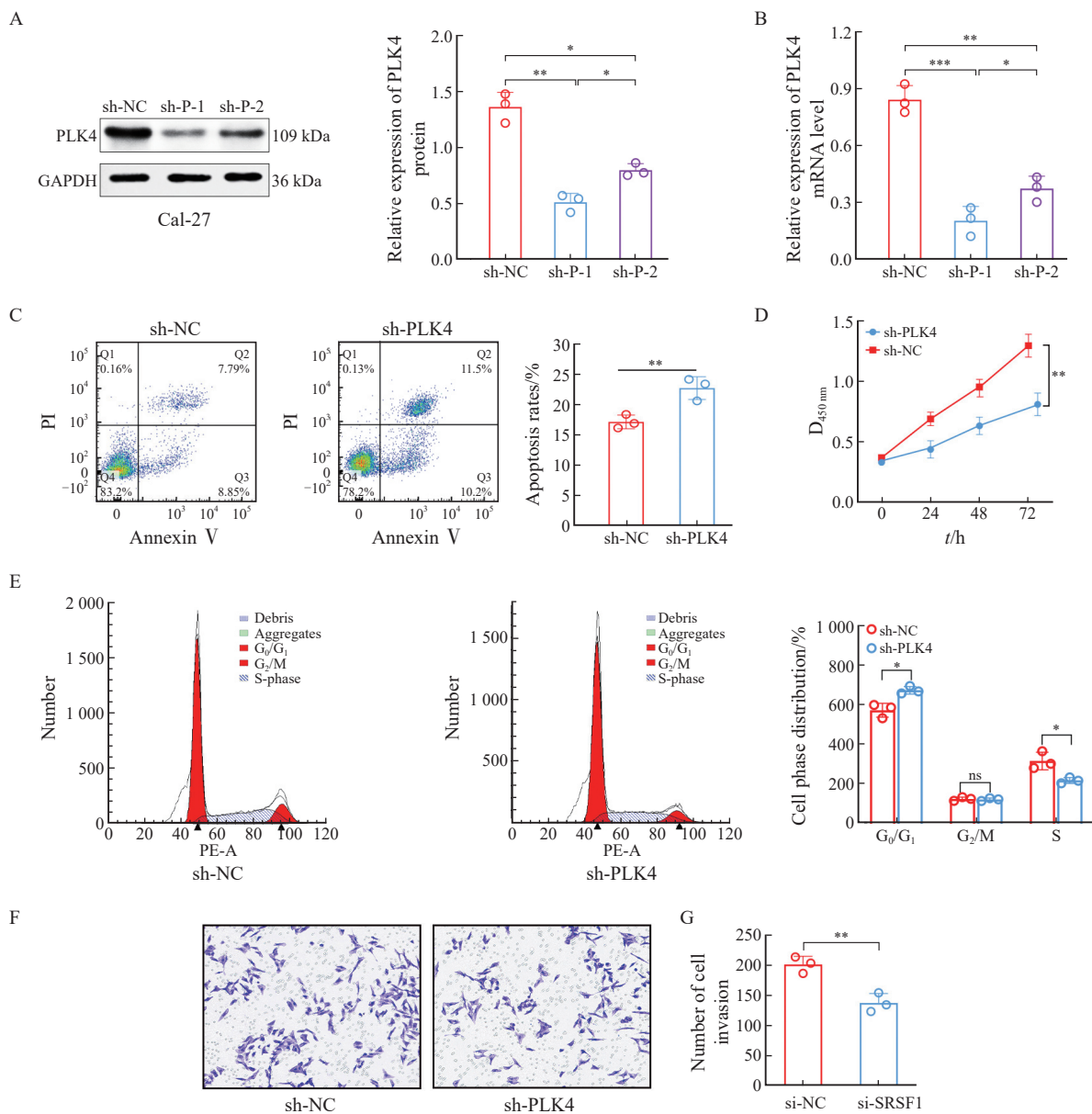


图2 敲低PLK4表达抑制Cal-27细胞增殖和侵袭, 促进凋亡

Fig. 2 Knockdown of PLK4 expression inhibited the proliferation and invasion of Cal-27 cells and promoted apoptosis

A: Western blot test was used to detect the protein expression of PLK4 in OSCC cells; B: RTFQ-PCR was used to detect the mRNA expression of PLK4 in OSCC cells; C: Effect of PLK4 knockdown on OSCC cell apoptosis; D: Effect of PLK4 knockdown on the proliferation of OSCC cells; E: Effect of PLK4 knockdown on OSCC cell proliferation cycle; F-G: Effect of PLK4 knockdown on OSCC cell invasion. Compared with sh-NC group; *: $P < 0.05$, compared with each other; **: $P < 0.01$, compared with each other; ***: $P < 0.001$, compared with each other. ns: No significance.

组, sh-PLK4组中的G₀/G₁期细胞比重增加, S期减少, 细胞增殖周期阻滞于G₀/G₁及S期 (G₀/G₁期: 66.893±1.932 vs 56.813±3.552, *P*<0.05; G₂/M期: 11.737±0.726 vs 12.017±0.907, *P*>0.05; S期: 21.370±1.474 vs 31.170±4.432, *P*<0.05, 图2E)。Transwell侵袭实验结果显示, sh-PLK4组中的Cal-27细胞侵袭能力显著低于sh-NC组 (Cal-27细胞侵袭数: 140.333±21.221 vs 200.667±13.650, *P*<0.01, 图2F、G)。

2.3 过表达PLK4促进SCC-25细胞增殖和侵袭, 抑制凋亡

Western blot结果显示, 在SCC-25细胞中PLK4组的PLK4蛋白相对表达量明显高于

vector组 (PLK4为0.979±0.072, vector为0.370±0.057, *P*<0.01, 图3A); RTFQ-PCR检测结果显示, 在SCC-25细胞中PLK4组的PLK4 mRNA相对表达量明显高于vector组 (PLK4为0.795±0.108, vector为0.508±0.077, *P*<0.01, 图3B)。

流式细胞术分析SCC-25细胞凋亡率结果显示, PLK4组中的SCC-25细胞凋亡率显著低于vector组 (SCC-25细胞凋亡率: 5.497±1.201 vs 16.977±0.599, *P*<0.01, 图3C)。CCK-8实验结果显示, PLK4组中的SCC-25细胞增殖能力显著高于vector组 (*D*_{24h}值: 1.098±0.154 vs 0.688±0.141, *P*<0.05; *D*_{48h}值: 1.619±0.148

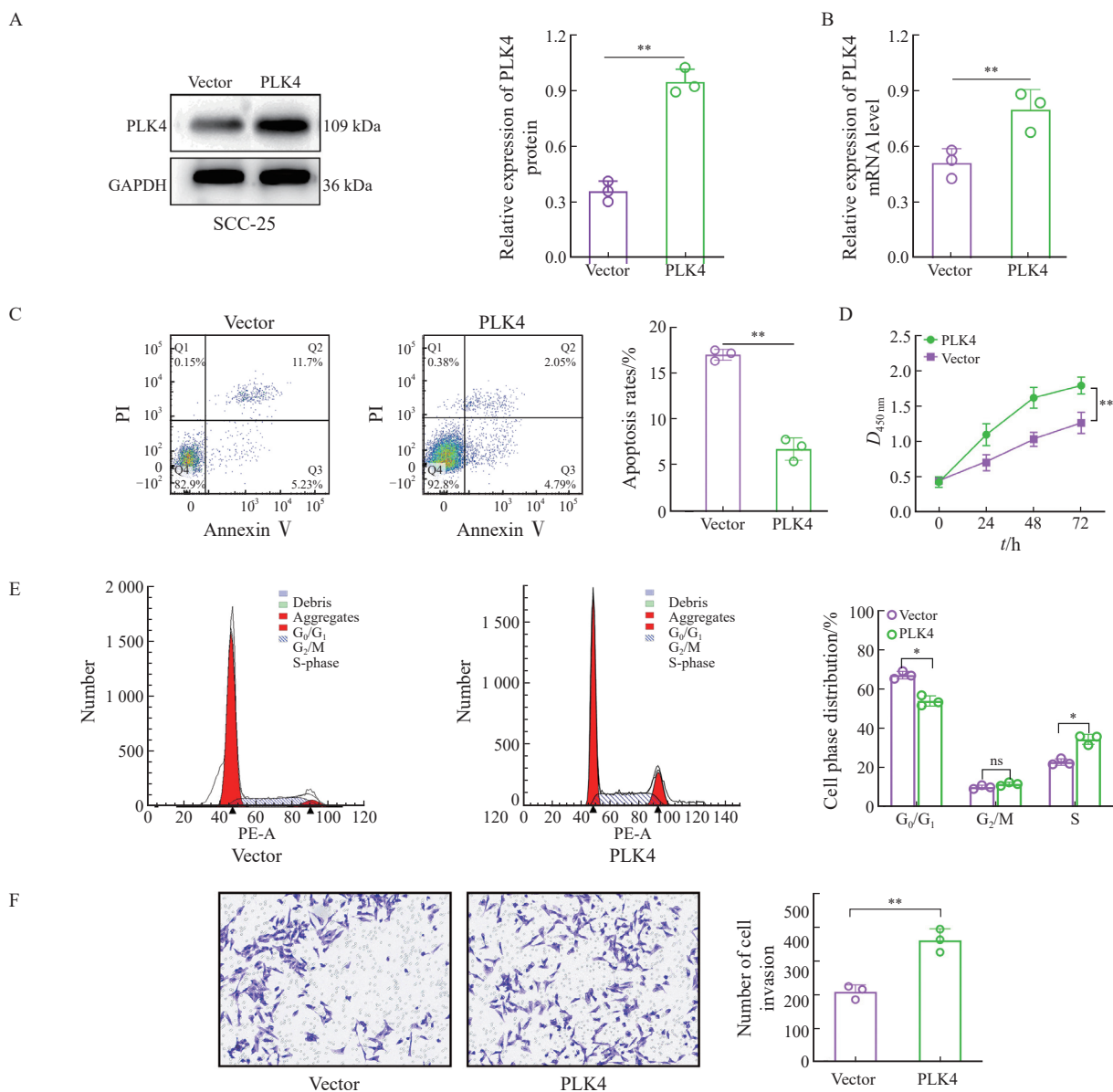


图3 过表达PLK4促进SCC-25细胞增殖和侵袭并抑制凋亡

Fig. 3 Overexpression of PLK4 up-regulated the proliferation and invasion of SCC-25 cells and inhibited apoptosis

A: Western blot assay was used to detect the protein expression of PLK4 in OSCC cells with overexpression; B: The PLK4 mRNA in OSCC cells with overexpression was analyzed via RTFQ-PCR; C: Effect of PLK4 overexpression on the apoptosis of OSCC cells; D: Effect of PLK4 overexpression on the proliferation of OSCC cells; E: Effect of PLK4 overexpression on the proliferation cycle of OSCC cells; F: Effect of PLK4 overexpression on OSCC cell invasion. *: *P*<0.05, compared with each other; **: *P*<0.01, compared with each other; ***: *P*<0.001, compared with each other; ****: *P*<0.0001, compared with each other.

vs 0.990 ± 0.118 , $P < 0.05$; D_{72h} 值: 1.791 ± 0.120 vs 1.267 ± 0.148 , $P < 0.01$, 图3D)。流式细胞术分析SCC-25细胞周期结果显示,相较于vector组,PLK4组中的 G_0/G_1 期细胞占比减少,S期增加,细胞周期集中于S期(G_0/G_1 期: 54.057 ± 2.653 vs 67.263 ± 1.959 , $P < 0.05$; G_2/M 期: 11.547 ± 0.905 vs 9.957 ± 0.993 , $P > 0.05$; S期: 34.397 ± 2.545 vs 22.780 ± 1.678 , $P < 0.05$, 图3E)。Transwell侵袭实验结果显示,PLK4组中的SCC-25细胞侵袭能力显著高于vector组(SCC-25细胞侵袭数: 358.667 ± 33.561 vs 207.000 ± 19.655 , $P < 0.01$, 图3F)。

2.4 敲低或过表达PLK4对PI3K/AKT信号转导通路和细胞周期相关蛋白表达的影响

为进一步分析PLK4对OSCC细胞增殖、凋亡和侵袭能力产生影响的潜在机制。本研究从BEST在线数据分析平台中的27个癌种分类中选取HNSC选项(包含8个数据集,共1356例样本),并检索PLK4(Ensembl ID: ENSG00000142731)。结果显示,PLK4可能与PI3K/AKT信号转导通路(富集分数0.68, $P < 0.01$)和细胞周期(富集分数0.52, $P < 0.01$)有着紧密联系(图4A)。此外,通过对TCGA数据库中HNSC数据(正常组织44例, HNSC组织518例)下载,然后对PLK4高和PLK4低组中差异基因进行KEGG富集分析,结果显示,共有53条信号转导通路获得显著富集,包括核糖体生物合成、细胞质翻译、非编码核糖核酸过程、核糖体核糖核酸代谢过程、细胞周期、PI3K/AKT信号转导通路等相关途径。以上结果表明:PLK4可能与PI3K/AKT信号转导通路和细胞周期有着紧密联系(图4B)。

为进一步验证PLK4能否通过PI3K/AKT信号转导通路和细胞周期相关蛋白对OSCC细胞增殖和凋亡产生影响。本研究通过Western blot对PI3K/AKT信号转导通路和细胞周期相关蛋白的表达进行分析,结果显示,相较于sh-NC组,敲低PLK4表达后,sh-PLK4组p-PI3K、p-AKT、survivin和cyclin D1蛋白均表达降低(p-PI3K: 0.929 ± 0.039 vs 0.528 ± 0.054 , $P < 0.01$; p-AKT: 0.950 ± 0.044 vs 0.706 ± 0.083 , $P < 0.05$; survivin: 0.713 ± 0.089 vs 0.347 ± 0.062 , $P < 0.001$;

cyclin D1: 0.760 ± 0.082 vs 0.151 ± 0.063 , $P < 0.001$);相较于vector组,过表达PLK4后,PLK4组p-PI3K、p-AKT、survivin和cyclin D1蛋白均表达增高(p-PI3K: 0.778 ± 0.095 vs 1.220 ± 0.080 , $P < 0.01$; p-AKT: 0.900 ± 0.057 vs 1.526 ± 0.095 , $P < 0.01$; survivin: 0.473 ± 0.074 vs 1.075 ± 0.102 , $P < 0.001$; cyclin D1: 0.780 ± 0.102 vs 1.518 ± 0.070 , $P < 0.001$)。而敲低和过表达PLK4后,PI3K及AKT蛋白表达无明显改变(Cal-27细胞PI3K: 0.940 ± 0.039 vs 0.931 ± 0.049 , $P > 0.05$; AKT: 0.947 ± 0.052 vs 0.954 ± 0.094 , $P > 0.05$; SCC-25细胞PI3K: 0.698 ± 0.079 vs 0.710 ± 0.058 , $P > 0.05$; AKT: 0.757 ± 0.047 vs 0.762 ± 0.101 , $P > 0.05$)。以上结果表明,PLK4可通过PI3K/AKT信号转导通路及对细胞周期进行调控进而对OSCC细胞增殖、凋亡和侵袭能力产生影响(图4C、D)。

2.5 敲低PLK4表达抑制裸鼠皮下成瘤

为进一步验证敲低PLK4对OSCC成瘤的影响,本研究将sh-NC和sh-PLK4的Cal-27细胞注入裸鼠有前腋下,构建裸鼠皮下瘤模型进行分析。通过对裸鼠剥离的瘤体进行分析,结果显示,敲低OSCC细胞PLK4表达后,可抑制裸鼠体内肿瘤的生长(0.151 ± 0.063 vs 0.496 ± 0.096 , 效应量为-5.278, 95% CI: -7.798~-2.712, $P < 0.001$, 图5A)。两组裸鼠的质量在干预前后差异无统计学意义 [W_{1w} 值: (18.300 ± 0.216) g vs (18.050 ± 0.238) g; W_{2w} 值: (19.575 ± 0.512) g vs (19.600 ± 0.606) g; W_{3w} 值: (20.675 ± 0.556) g vs (20.075 ± 0.386) g; W_{4w} 值: (22.075 ± 0.512) g vs (21.625 ± 0.479) g; W_{5w} 值: (22.375 ± 0.763) g vs (22.325 ± 0.262) g; W_{6w} 值: (23.350 ± 0.719) g vs (23.225 ± 0.403) g, $P > 0.05$]。而裸鼠的瘤体体积从第4周开始与对照组相比差异有统计学意义,且随着时间的增加,差异明显程度增加 [V_{4w} 值: (96.267 ± 22.810) mm^3 vs (32.933 ± 13.051) mm^3 , $P < 0.01$; V_{5w} 值: (175.433 ± 23.359) mm^3 vs (65.767 ± 16.720) mm^3 , $P < 0.01$; V_{6w} 值: (308.433 ± 24.093) mm^3 vs (101.400 ± 20.555) mm^3 , $P < 0.001$, 图5B]。此外,H-E数据表明,敲低PLK4表达后组织的核异型性程度降低(图5C、D)。

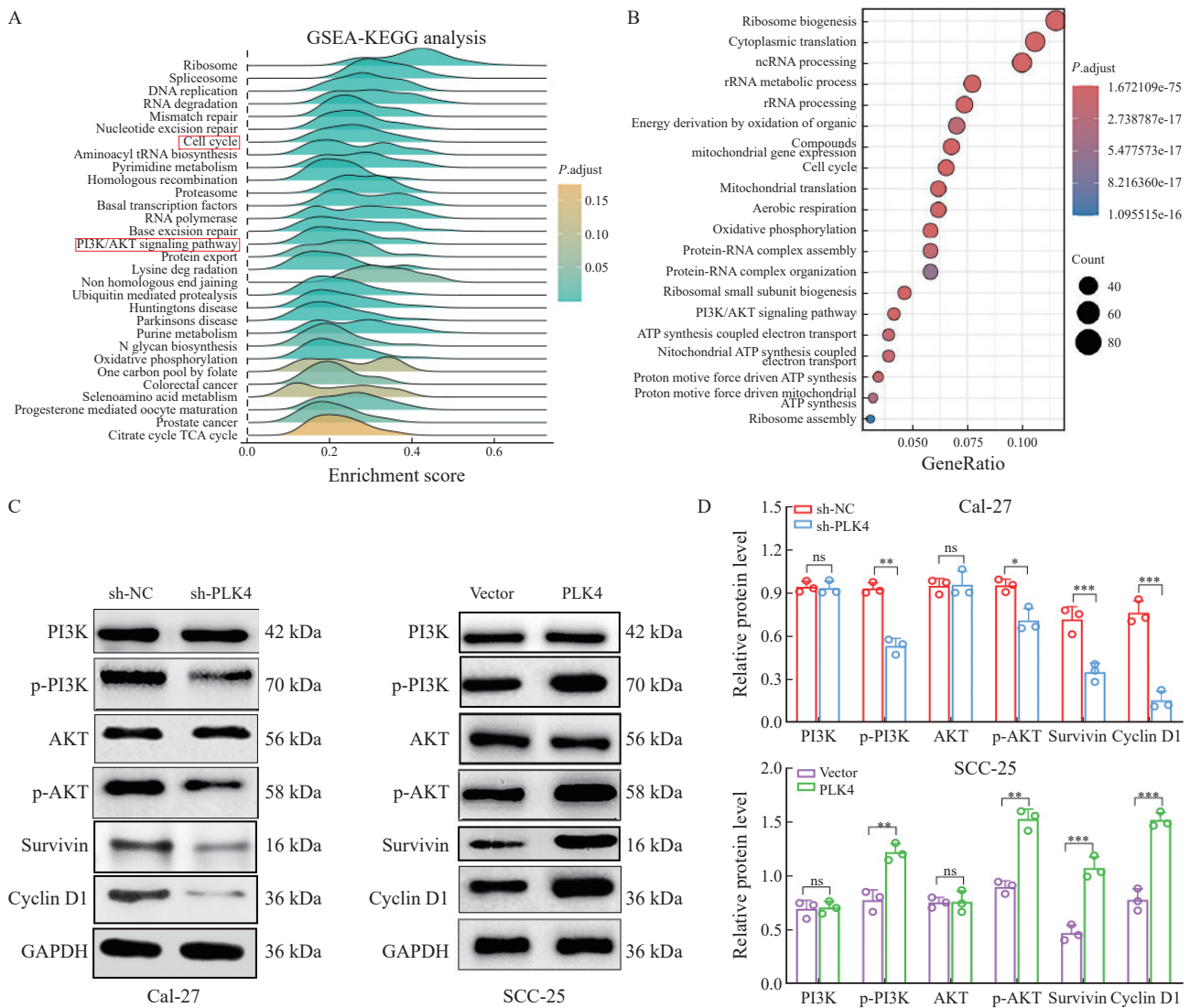


图4 敲低或过表达PLK4对PI3K/AKT信号转导通路和周期相关蛋白表达的抑制和促进作用

Fig. 4 Inhibitory and promoting effects of knockdown or overexpression of PLK4 on PI3K/AKT pathway and cyclin-related protein expression

A-B: The differentially expressed genes in the PLK4 high and PLK4 low differential groups led to the enrichment of PI3K/AKT. C-D: Western blot assay was used to find the expression of PI3K/AKT signaling pathway proteins. Compared with sh-NC or vector group, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

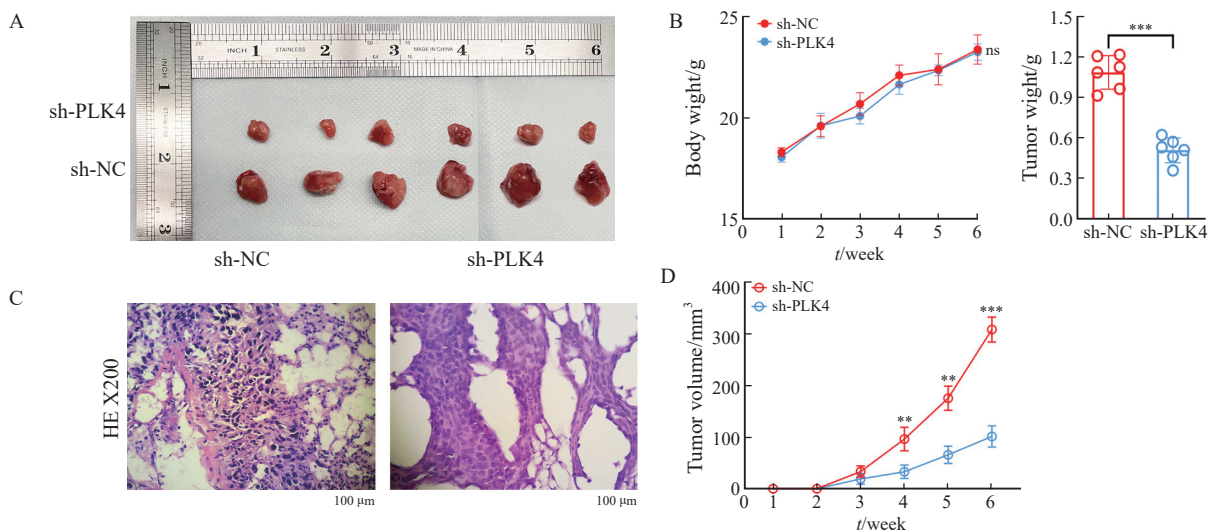


图5 敲低PLK4表达抑制裸鼠皮下成瘤

Fig. 5 Knockdown of PLK4 expression inhibited subcutaneous tumor formation in nude mice

A: Effect of PLK4 knockdown on subcutaneous tumor formation in nude mice; B: Effects of PLK4 knockdown on body weight, tumor weight and volume of nude mice; C: H-E staining was used to analyze the tumor tissues of sh-NC and sh-PLK4 groups. D: Tumor volume. Compared with sh-NC group, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

3 讨 论

PLK4作为目前已知的细胞周期调控蛋白,其在多种恶性肿瘤中呈高表达并与肿瘤的发生发展关联密切^[12]。研究^[13]表明,PLK4抑制剂能够抑制卵巢癌细胞株体外增殖和迁移,诱导肿瘤细胞的凋亡,导致有丝分裂缺陷肿瘤细胞增多。PLK4在结肠癌中过表达后,可使上皮标志物E-cadherin表达降低,间质标志物N-cadherin表达水平增高,进而使肿瘤细胞具有更强的迁移和侵袭能力^[14]。而在人食管鳞癌中,PLK4处于异常高表达状态,并通过mTOR/p70S6K信号转导通路促进食管鳞癌细胞进展^[15]。此外,PLK4抑制剂可通过降低甲状腺癌中PLK4表达,抑制Wnt/ β -catenin信号转导通路及阻滞细胞周期,进而对肿瘤细胞产生抑制作用^[16]。本研究中通过TCGA、UALCAN、GEPIA2数据库对PLK4在OSCC的表达进行分析,发现OSCC中PLK4的表达与上述研究一致,即在OSCC中PLK4同样处于异常高表达。提示PLK4可能在OSCC的进展中起重要作用。此外,通过RTFQ-PCR及Western blot检测对PLK4在OSCC细胞系HN6、Cal-27、SCC-4、SCC-9、SCC-25细胞的表达进行分析,结果表明,相较于口腔黏膜上皮细胞,PLK4在HN6、Cal-27、SCC-4、SCC-9、SCC-25中均异常高表达,且在Cal-27中表达最高,在SCC-25中表达最低。因此本研究选择Cal-27和SCC-25细胞作为OSCC的代表性细胞株进行体外实验,探究PLK4在OSCC中的作用。结果显示,敲低PLK4表达能显著抑制OSCC细胞增殖和侵袭能力,诱导OSCC细胞凋亡;而PLK4过表达能显著促进OSCC细胞增殖和迁移能力,抑制OSCC细胞凋亡,提示PLK4可对OSCC侵袭、增殖和凋亡能力产生影响。

为进一步探讨PLK4对OSCC产生影响的相关机制,本研究中通过KEGG富集分析发现,PLK4在OSCC中可富集于PI3K/AKT信号转导通路,提示PI3K/AKT信号转导通路在OSCC的发生、发展中起重要作用。通过对PI3K/AKT信号轴关键靶点蛋白表达进行分析发现,敲低PLK4表达后,p-PI3K及p-AKT蛋白的表达降低,PI3K及AKT蛋白表达不变;而过表达PLK4后,p-PI3K及p-AKT蛋白的表达增高,PI3K及AKT蛋白表达不变。提示PLK4可介导调控OSCC细胞中PI3K/AKT轴。PI3K蛋白家族的脂质激酶有3类,而其中由两种亚单位(调节和催化)所构成的第一类型与癌细胞的侵袭、迁移、增殖和凋亡关系密切^[17]。

AKT蛋白具有对癌细胞生物学行为(如细胞分化、增殖、凋亡、侵袭等)进行调控的作用,与肿瘤发生、发展存在显著关联。目前临床上针对多种肿瘤已研发出AKT抑制剂,用以抑制肿瘤的恶性行为^[18-20]。此外研究显示,PI3K/AKT在癌症中常处于异常激活状态,而作为丝氨酸/苏氨酸激酶家族一员的AKT蛋白则在此信号转导途径中扮演着极其重要的角色,该信号转导通路被激活后,可通过磷酸化下游靶基因,加速细胞迁移、侵袭和增殖进程,并使细胞的凋亡能力受到抑制^[21-23]。因此,我们推测PLK4可通过影响PI3K/AKT信号调节OSCC细胞的增殖、凋亡和侵袭能力。

Cyclin D1作为原癌基因的表达产物,其能够促进癌细胞由G₁期向S期转变,调控癌细胞的增殖周期,对于肿瘤的形成作用显著^[24]。研究^[25]表明,当相关基因活化后,可使cyclin D1蛋白表达异常增高,使细胞更早发展至S期,进而引起肿瘤的恶性增殖。Survivin为凋亡抑制蛋白^[26]。Western blot结果显示,对PLK4进行敲低后,OSCC细胞中cyclin D1和survivin表达呈正相关性降低;而过表达PLK4后,OSCC细胞中cyclin D1和survivin蛋白表达明显增高,表明PLK4在OSCC细胞中参与cyclin D1和survivin蛋白的调控。因此,我们推测PLK4可通过影响PI3K/AKT信号转导通路调节OSCC细胞的增殖和凋亡能力。

此外,本研究仍存在局限性:①本研究选用Cal-27细胞进行敲低实验,SCC-15进行过表达实验,但在此基础上未进行回复实验予以验证。②本研究通过构建裸鼠皮下瘤模型以验证PLK4对OSCC的成瘤影响,并未构建裸鼠原位瘤模型。由于口腔内血液、淋巴循环丰富,舌体运动频繁,构建裸鼠原位瘤模型可更具说服力。本团队后期将对以上局限性进行深入探究,以进一步验证PLK4对OSCC细胞增殖、凋亡和侵袭能力的影响和具体机制。此外,本团队将对临床OSCC组织样本进行临床资料统计及病理学检查,从而进一步验证PLK4在OSCC组织中的表达。同时,通过对PLK4生物抑制剂的开发应用,使其在多种实验条件下发挥抑制PLK4表达效果,以进一步提高本研究结果的普适性。

综上所述,PLK4在OSCC中高表达,并介导PI3K/AKT轴参与影响癌细胞的增殖、凋亡和侵袭恶性表型。PLK4有望成为治疗OSCC的新分子靶点,但PLK4所介导的具体分子机制仍需后续实验进行深入研究。

作者简介:

秦欢 (ORCID: 0009-0004-7270-1137), 硕士, 主治医师。

通信作者:

冀洪海 (ORCID: 0009-0009-2849-8510), 副教授, 山东第二医科大学口腔医学院副院长, E-mail: zyqk202201@163.com。

作者贡献声明:

秦欢: 文章撰写及研究实施; 王洁: 实施研究及数据分析; 杨杰: 图片整理; 华英杰: 数据分析; 曲会娟: 实验分析; 冀洪海: 设计研究思路及方案, 审核文章。

【参 考 文 献】

- [1] 梁 壮, 王 伟, 郭文博, 等. DPP3在口腔鳞状细胞癌中的表达及生物学作用 [J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(18): 3426-3433.
LIANG Z, WANG W, GUO W B, et al. The expression and biological role of DPP3 in oral squamous cell carcinoma [J]. J Mod Oncol, 2024, 32(18): 3426-3433.
- [2] SAIKIA P J, PATHAK L, MITRA S, et al. The emerging role of oral microbiota in oral cancer initiation, progression and stemness [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1198269.
- [3] SAIDAK Z, LAILLER C, TESTELIN S, et al. Contribution of genomics to the surgical management and study of oral cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2021, 28(11): 5842-5854.
- [4] NIU Q, SUN Q N, BAI R S, et al. Progress of nanomaterials-based photothermal therapy for oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(18): 10428.
- [5] LEI Q, YU Q W, YANG N, et al. Therapeutic potential of targeting polo-like kinase 4 [J]. Eur J Med Chem, 2024, 265: 116115.
- [6] CHAN C Y, YUEN V W, CHIU D K, et al. Polo-like kinase 4 inhibitor CFI-400945 suppresses liver cancer through cell cycle perturbation and eliciting antitumor immunity [J]. Hepatology, 2023, 77(3): 729-744.
- [7] DENG S S, LU X L, ZHANG Z, et al. Identification and assessment of PLK1/2/3/4 in lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma: evidence from methylation profile [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(14): 6652-6663.
- [8] PELLIZZARI S, BHAT V, ATHWAL H, et al. PLK4 as a potential target to enhance radiosensitivity in triple-negative breast cancer [J]. Radiat Oncol, 2024, 19(1): 24.
- [9] ZHAO Y, WANG X. PLK4: a promising target for cancer therapy [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(10): 2413-2422.
- [10] 宋 宁, 李敏敏, 郑文甜, 等. 突触融合蛋白结合蛋白4对口腔鳞状细胞癌细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(8): 1390-1398.
SONG N, LI M M, ZHENG W T, et al. Effects of syntaxin binding protein 4 on proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma cells [J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(8): 1390-1398.
- [11] CHEN Y F, HAN Z Y, ZHANG L, et al. TIMELESS promotes reprogramming of glucose metabolism in oral squamous cell carcinoma [J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 21.
- [12] GARVEY D R, CHHABRA G, NDIAYE M A, et al. Role of polo-like kinase 4 (PLK4) in epithelial cancers and recent progress in its small molecule targeting for cancer management [J]. Mol Cancer Ther, 2021, 20(4): 632-640.
- [13] KRESSIN M, FIETZ D, BECKER S, et al. Modelling the functions of polo-like kinases in mice and their applications as cancer targets with a special focus on ovarian cancer [J]. Cells, 2021, 10(5): 1176.
- [14] FU F M, CHEN L K, YANG X H, et al. PLK4 is a key molecule in the formation of PGCCs and promotes invasion and migration of progeny cells derived from PGCCs [J]. J Cancer, 2022, 13(9): 2954-2969.
- [15] 张进忠, 李悦淇, 石 科, 等. *PLK4*基因在人食管鳞癌组织中的表达及对癌细胞增殖、侵袭迁移影响的研究 [J]. 中国癌症杂志, 2021, 31(12): 1185-1193.
ZHANG J Z, LI Y Q, SHI K, et al. Expression and clinical significance of *PLK4* gene in esophageal squamous cell carcinoma and its effect on cell proliferation, invasion and migration [J]. China Oncol, 2021, 31(12): 1185-1193.
- [16] ZHU W, XIE B. PLK4 inhibitor exhibits antitumor effect and synergizes sorafenib via arresting cell cycle and inactivating Wnt/ β -catenin pathway in anaplastic thyroid cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2023, 24(1): 2223383.
- [17] HE Y, SUN M M, ZHANG G G, et al. Targeting PI3K/AKT signal transduction for cancer therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 425.
- [18] XU P, HU K, ZHANG P, et al. Hypoxia-mediated YTHDF2 overexpression promotes lung squamous cell carcinoma progression by activation of the mTOR/AKT axis [J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 13.
- [19] MAO X Q, CHENG Y, ZHANG R Z, et al. RNA-seq and ATAC-seq analyses of multilineage differentiating stress enduring cells: comparison with dermal fibroblasts [J]. Cell Biol Int, 2022, 46(9): 1480-1494.
- [20] TANG W, JIA P, ZUO L, et al. Suppression of CX3CL1 by miR-497-5p inhibits cell growth and invasion through inactivating the ERK/AKT pathway in NSCLC cells [J]. Cell Cycle, 2022, 21(16): 1697-1709.
- [21] TUFAIL M, WAN W D, JIANG C H, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR signaling to overcome drug resistance in cancer [J]. Chem Biol Interact, 2024, 396: 111055.
- [22] GLAVIANO A, FOO A S C, LAM H Y, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer [J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 138.
- [23] YU L, WEI J, LIU P D. Attacking the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 69-94.
- [24] HE C P, CHEN Y T, ZHANG X M, et al. Down-regulation of ESRP2 inhibits breast cancer cell proliferation via inhibiting cyclinD1 [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 28475.
- [25] 刘玉娟, 郭明艳. *JMJD3*与*Cyclin D1*基因在喉鳞状细胞癌组织中的表达及意义 [J]. 检验医学与临床, 2023, 20(8): 1126-1129.
LIU Y J, GUO M Y. Expressions and significance of *JMJD3* and *CyclinD1* in cancer tissues of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Lab Med Clin, 2023, 20(8): 1126-1129.
- [26] SIRAGUSA G, TOMASELLO L, GIORDANO C, et al. Survivin (BIRC5): implications in cancer therapy [J]. Life Sci, 2024, 350: 122788.

(收稿日期: 2024-10-24 修回日期: 2025-02-10)

(责任编辑: 王琳辉)