

- [28] Cizdziel JV. Determination of lead in blood by laser ablation ICP-TOF-MS analysis of blood spotted and dried on filter paper: a feasibility study[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 388(3): 603-611.
- [29] Hsieh HF, Chang WS, Hsieh YK, et al. Lead determination in whole blood by laser ablation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Talanta, 2009, 79(2): 183-188.
- [30] Di Martino MT, Michniewicz A, Martucci M, et al. EDTA is essential to recover lead from dried blood spots on filter paper[J]. Clin Chim Acta, 2004, 350(1/2): 143-150.

(收稿日期: 2013-01-12)

• 综 述 •

LKB1 抑制肿瘤机制的研究进展*

杨事达, 滕秋艳 综述, 赵鸿梅[△] 审校
(辽宁省人民医院检验科, 辽宁沈阳 110015)

关键词: 肿瘤; 肿瘤抑制基因; 肝激酶 B1
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 12. 030 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2013)12-1557-03

LKB1(liver kinase B1)基因又被称为 STK11(serine/threonine protein kinase 11)基因, LKB1 的胚系突变可导致 Peutz-Jeghers 综合征(PJS), 与错构瘤性息肉向肿瘤的发展密切相关^[1]。LKB1 基因的表达产物在细胞内分布较为广泛, 通过多种信号途径参与调节细胞的凋亡、极性细胞生理过程。尽管 LKB1 的抑癌机制尚不完全清楚, 但现有的研究表明作为一种蛋白激酶, 它对细胞的增殖、生长周期阻滞、凋亡、能量代谢和极性等的调控可能都是抑制肿瘤的重要机制。本文就目前已经证实的 LKB1 抑制肿瘤的分子机制作一综述。

1 概 述

人类 LKB1 基因定位于人染色体 19P3. 3 带, cDNA 全长 2 158 bp, 编码区 1 302 bp 含有 9 个编码外显子和一个不编码的外显子, 编码的 LKB1 蛋白相对分子质量为 48×10^3 , 由 433 个氨基酸组成的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 包括一个激酶区域(49~309 密码子处)、N 端调节域和 C 端调节域。人 LKB1 基因在胎儿和成人的所有组织中广泛表达, 尤以胰腺、肝、睾丸、小肠和骨骼肌表达最多。

2 LKB1 的调节方式

LKB1 的调节方式主要有两种: 磷酸化和亚细胞定位。LKB1 至少有 8 个氨基酸残基可被磷酸化^[2-4]。在哺乳动物细胞内, LKB1 通过与 STRAD 和 MO25 结合形成三聚体复合物调节 LKB1 蛋白的稳定性、激酶活性和蛋白在细胞内的定位。STRAD 一方面与 LKB1 结合能够激活 LKB1 的自身磷酸化和磷酸化下游底物的功能^[5]; 另一方面由于 LKB1 缺乏核输出序列, 需要通过 STRAD 结合帮助 LKB1 核输出到细胞质中并定位在细胞质中发挥生理功能^[6]; MO25 则能够稳定 STRAD 和 LKB1 的相互作用并进一步放大 LKB1 的激酶活性^[2]。

3 LKB1 的作用底物

AMP 活化的蛋白激酶(AMPK)是 LKB1 最重要的底物。AMPK 包括三个亚基, 催化亚基 α 和调节亚基 β 、 γ 。环境刺激导致细胞内 AMP/ATP 比值升高, 能量缺乏时, AMP 结合到 γ 亚基上使 AMPK 发生变构, 结构变化一方面促进 LKB1 对 AMPK α -Thr172 位点的磷酸化活化 AMPK, 另一方面抑制相应磷酸酶对该位点的去磷酸化作用, 二者协同增强 AMPK 的磷酸化水平而使之激活。尽管有研究认为钙调蛋白依赖性激酶激酶 β (CaMKK β)也可激活 AMPK, 但 CaMKK β 只在 Ca^{2+} 浓度改变时活化 AMPK, 在能量下降时激活 AMPK 的是 LKB1。活化的 AMPK 一方面降低耗能的合成代谢(如脂肪

酸、胆固醇、糖原和蛋白合成), 另一面加快分解代谢(如葡萄糖摄入、糖酵解)以产生能量稳定 AMP/ATP 比值^[7]。除 AMPK 之外, 12 种 AMPK 相关激酶也是 LKB1 的直接底物, 然而引起 LKB1 磷酸化激活这些底物的信号刺激还有待于进一步研究。

4 LKB1 的抑癌机制

4.1 LKB1 通过引起 G1 周期阻滞, 调节细胞生长 将 LKB1 转入 LKB1 缺失的肿瘤细胞如 HeLa 和 G360 细胞, 可引起 G1 期细胞生长阻滞^[8-9]。在 G361 的 G1 期细胞中, LKB1 在细胞核中稳定 P53 并且能够直接或间接磷酸化 P53 的 15 和 392 位^[10], 升高细胞周期依赖型激酶 CDK(CDK)的抑制物 P21/WAF1 的水平引起 G1 细胞周期阻滞。不过在缺失 P53 的 HeLaS3 细胞中, LKB1 则绕过 P53 与 LMO4, GATA6, 和 LDB1 形成复合物诱导 P21 表达^[11]。Scott 等研究发现 LKB1 可以不依赖 P21 和 P53 单独诱导 G1 周期阻滞, 但当 LKB1 与 P21 和 P53 联合能够中等程度提高 LKB1 介导的 G1 周期阻滞^[12]。

4.2 LKB1 诱导细胞凋亡, 调节细胞生长 Karuman 等^[13]首先证实在上皮细胞中, LKB1 诱导凋亡需要有功能的 P53 蛋白才能发生; 在 P53^{-/-}果蝇的模型中也观察到 LKB1 依赖 Caspase 途径介导凋亡^[14]; 由此可见在凋亡诱导过程中, LKB1 与 P53 独立进行或者联合诱导凋亡取决于细胞类型和细胞内的环境条件。此外, JNK 途径作为 LKB1 诱导凋亡的下游信号, 其激活对于线粒体释放细胞色素 γ 和 Caspase 介导的凋亡通路的激活是必需的, 并且 JNK 异常引起程序性死亡缺陷是肿瘤发生的前提条件。在果蝇中 LKB1 可以激活 JNK 途径而诱导发育过程中的细胞凋亡, LKB1 敲除的果蝇则表现出凋亡缺陷和中央神经系统的异常增生; 同样, JNK 信号通路阻滞可抑制 LKB 诱导的凋亡^[14]。需要注意的是, 在细胞内能量缺乏时, AMP/ATP 比值升高时, LKB1-AMPK 信号途径首先是抑制分解代谢, 促进合成代谢, 维持能量平衡, 保护细胞, 抑制细胞凋亡; 只有当 AMP/ATP 比值持续异常难以逆转时, LKB1 诱导细胞凋亡发生^[15-16]。

4.3 LKB1 下调 mTORC1 信号途径, 调节细胞生长 mTORC1 是 LKB1-AMPK 调节细胞生长和细胞周期的最关键靶点之一。mTORC1 包括 mTOR、mLST8 和 raptor, mTORC1 活性受 rapamycin 抑制且对营养状况敏感。LKB1 主要在 TSC2——结节性硬化综合征的突变致病蛋白介导下调 mTORC1 活性, 是 AMPK 的底物之一, 有 GTP 酶激活蛋白

* 基金项目: 辽宁省博士科研启动基金资助项目(20091040)。 作者简介: 杨事达, 男, 主管检验技师, 主要从事实验诊断研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zhaohongmei0527@126. com。

(GAP)结构域。AMPK 被 LKB1 磷酸化后激活 TSC2 而抑制 mTORC1 的活性^[17]。除 TSC2 依赖途径,上述调节因子在许多肿瘤细胞中都出现活性异常,在能量压力下,LKB1-AMPK 还可直接磷酸化 mTORC1 复合体的支架亚基 Raptor 而抑制 mTORC1 活性^[18]。

4.4 LKB1 调节葡萄糖和脂类代谢 LKB1 磷酸化 AMPK 的第 172 位苏氨酸,激活型 AMPK 能磷酸化多种物质代谢途径的关键酶,促进分解代谢,抑制合成代谢,重建细胞能量稳态。细胞能量下降时,AMPK 被 LKB1 激活后可迅速磷酸化脂肪酸和胆固醇合成限速酶乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)和 HMG-辅酶 A 还原酶(HMGCR)从而抑制脂类合成,降低能量消耗,同时快速调节糖酵解关键酶 6-磷酸果糖激酶(PFK2)活性而促进糖酵解过程产生能量。除通过酶活性修饰快速调节糖脂代谢外,LKB1 还在转录水平上调节糖脂代谢相关基因的表达。mTORC1 依赖的转录因子 SREBP1 可促进生脂基因的表达,其活性受固醇水平的调控,同时其核移位和转录激活功能还依赖于 mTORC1。LKB1 磷酸化 AMPK,抑制 mTORC1 而使 SREBP1 活性下调,在转录水平上抑制脂类生成过程。ACC 等酶类是一些肿瘤细胞生存所必需的,化学抑制其活性可抑制肺癌和前列腺癌转移癌的生长^[4,19],由此推测抑制脂类合成和调节糖酵解过程可能是 LKB1 抑癌机制的一部分。

4.5 LKB1 维持细胞极性 极性调节蛋白 Par-1b/MARK2/Emk 是受 LKB1 调节的又一丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员,从酵母到人类高度保守,对多种组织和细胞极性的维持至关重要^[20-23]。LKB1 调节细胞极性主要依赖 MARK 和 Brsk/SAD 激酶以及 AMPK。MARK 激酶是线虫、果蝇和哺乳动物中保守的细胞极性调节激酶^[24],Brsk/SAD 激酶是脑中控制神经元极性形成的激酶^[25],二者均可磷酸化 MAP 的微管结合区域而改变微管稳定性,进而影响细胞极性。AMPK 调节细胞极性是通过直接磷酸化肌球蛋白轻链(MLC)实现的^[26]。LKB1 可以通过激活 Mst4 激酶促进上皮细胞顶端膜刷状缘的形成,LKB1-STRAD-MO25 复合体的形成通过某种未知机制使 Mst4 从高尔基体移位到质膜上,磷酸化骨架连接蛋白 Ezrin 而诱导刷状缘形成^[27]。基因组学和蛋白组学研究发现,在 LKB1 缺失细胞中原癌蛋白激酶 Src 活性升高,黏着斑激酶(FAK)表达增加,细胞迁移加快^[28];另有研究发现,LKB 可直接磷酸化 PAK1(P21-activated kinase)Thr109 并抑制其活性,从而抑制细胞的运动^[29]。

5 小 结

作为一个新的抑癌基因,LKB1 参与的信号通路和对生命活动的调节作用正逐渐被揭示和解析,现有研究已证实一些关于 LKB1 抑癌机制,然而还存在许多未知困惑。随着对 LKB1 抑癌机制的深入研究会有更多肿瘤发生过程中的关键分子被发现,从而被用来干预肿瘤的发生、发展,这也为广大医务工作者理解肿瘤的发生和诊治提供更广泛的思路。

参考文献

- [1] Zhan Y, Ginanni N, Tota MR, et al. Control of cell growth and survival by enzymes of the fatty acid synthesis pathway in HCT-116 colon cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(18): 5735-5742.
- [2] Chajès V, Cambot M, Moreau K, et al. Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival[J]. Cancer Res, 2006, 66(10): 5287-5294.
- [3] Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, et al. RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6719-6725.
- [4] Beckers A, Organe S, Timmermans L, et al. Chemical inhibition of

acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(17): 8180-8187.

- [5] Boudeau J, Baas AF, Deak M, et al. MO25alpha/beta interact with STRAD alpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm[J]. EMBO J, 2003, 22(19): 5102-5114.
- [6] Orita H, Coulter J, Lemmon C, et al. Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(23): 7139-7145.
- [7] Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling[J]. Circ Res, 2007, 100(3): 328-341.
- [8] Tiainen M, Ylikorkala A, Mäkelä TP. Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(16): 9248-9251.
- [9] Qiu W, Schönleben F, Thaker HM, et al. A novel mutation of STK11/LKB1 gene leads to the loss of cell growth inhibition in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oncogene, 2006, 25(20): 2937-2942.
- [10] Xie X, Wang Z, Chen Y. Association of LKB1 with a WD-repeat protein WDR6 is implicated in cell growth arrest and p27(Kip1) induction[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 301(1/2): 115-122.
- [11] Setogawa T, Shinozaki-Yabana S, Masuda T, et al. The tumor suppressor LKB1 induces p21 expression in collaboration with LMO4, GATA-6, and Ldb1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(4): 1186-1190.
- [12] Scott KD, Nath-Sain S, Agnew MD, et al. LKB1 catalytically deficient mutants enhance cyclin D1 expression[J]. Cancer Res, 2007, 67(12): 5622-5627.
- [13] Karuman P, Gozani O, Odze RD, et al. The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death[J]. Mol Cell, 2001, 7(6): 1307-1319.
- [14] Lee JH, Koh H, Kim M, et al. JNK pathway mediates apoptotic cell death induced by tumor suppressor LKB1 in Drosophila[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(7): 1110-1122.
- [15] Lee JH, Koh H, Kim M, et al. JNK pathway mediates apoptotic cell death induced by tumor suppressor LKB1 in Drosophila[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(7): 1110-1122.
- [16] Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(10): 3329-3335.
- [17] Mukherjee P, Mulrooney TJ, Marsh J, et al. Differential effects of energy stress on AMPK phosphorylation and apoptosis in experimental brain tumor and normal brain[J]. Mol Cancer, 2008, 7: 37.
- [18] Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth[J]. Biochem J, 2008, 412(2): 179-190.
- [19] Cheng SW, Fryer LG, Carling D, et al. Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status[J]. J Biol Chem, 2004, 279(16): 15719-15722.
- [20] Almeida A, Moncada S, Bolanos JP. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phospho fructo-2-kinase pathway[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(1): 45-51.
- [21] Liang J, Shao SH, Xu ZX, et al. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(2): 218-224.
- [22] Martin SG, St Johnston D. A role for Drosophila LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity[J]. Nature, 2003, 421(6921): 379-384.
- [23] Kusakabe M, Nishida E. The polarity-inducing kinase Par-1 con-

trols *Xenopus* gastrulation in cooperation with 14-3-3 and aPKC [J]. *EMBO J*, 2004, 23(21): 4190-4201.

[24] Bayraktar J, Zygmunt D, Carthew RW. Par-1 kinase establishes cell polarity and functions in Notch signaling in the *Drosophila* embryo[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(4): 711-721.

[25] Cohen D, Brennwald PJ, Rodriguez-Boulan E, et al. Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton[J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(5): 717-727.

[26] Kishi M, Pan YA, Crump JG, et al. Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization[J]. *Science*, 2005, 307(5711): 929-932.

[27] Lee JH, Koh H, Kim M, et al. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase[J]. *Nature*, 2007, 447(7147): 1017-1020.

[28] Deguchi A, Miyoshi H, Kojima Y, et al. LKB1 suppresses p21-activated kinase-1 (PAK1) by phosphorylation of Thr109 in the p21-binding domain [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(24): 18283-18290.

[29] Carretero J, Shimamura T, Rikova K, et al. Integrative genomic and proteomic analyses identify targets for Lkb1- deficient metastatic lung tumors[J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(6): 547-559.

(收稿日期: 2012-11-08)

• 综 述 •

单核苷酸多态性检测方法的研究进展

李穗雯¹综述, 胡大春²审校

(1. 昆明医科大学, 云南昆明 650011; 2. 昆明市第一人民医院检验科, 云南昆明 650011)

关键词: 单核苷酸多态性; 高通量; 检测方法
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 12. 031 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2013)12-1559-03

单核苷酸多态性(SNP)是指 DNA 序列上发生的单个核苷酸碱基的变异。SNP 是人类基因组 DNA 序列中最常见的变异形式, 被认为是决定疾病易感性和药物反应的决定因素^[1]。本文就 SNP 检测技术的传统方法进行回顾并介绍几种具有代表性的高、中通量 SNP 检测技术。

1 传统方法

1.1 单链多态性技术(PCR-SSCP) 该技术是出现最早、应用较广的等位基因分型方法^[2], 其原理是单个碱基差异导致单链 DNA 构象不同, 这种构象差异可导致单链 DNA 在凝胶电泳中迁移率的改变, 使基因的多态性得以检测和鉴定。利用该方法进行 SNP 分型的主要限制来自于 DNA 片段的长度, DNA 片段越长, 单碱基差异引起构象改变造成的正常基因与突变基因之间的电泳迁移率的差别越小。PCR-SSCP 一般用于 300 bp 以内的 DNA 片段。PCR-SSCP 基因分型方法耗时较长, 操作繁琐, 对聚丙烯酰胺凝胶要求较高, 目前已经很少采用。

1.2 限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP) PCR-RFLP 是 PCR 技术与 RFLP 技术的结合, 通过 PCR 扩增目的片段, 然后选择适当的限制性内切酶, 消化 PCR 产物, 不同的基因型会得出不同的特异性长度的电泳谱带, 据此来进行 SNP 分型。PCR-RFLP 技术应用范围仅限于 SNP 位点突变引起酶切位点改变时, 不适用于所有 SNP 位点。PCR 扩增完成后, 需进行纯化才能进行限制性酶切, PCR 体系中的成分会影响酶活性, 导致酶切反应的失败。

1.3 等位基因特异性 PCR(AS-PCR) 根据 PCR 过程中要求引物与模板之间严格互补配对来实现对 SNP 的检测。利用此原理, 除一条公共引物外, 再设计两条等位基因特异性引物, 使引物的 3' 末端最后碱基与正常或异常 SNP 位点的碱基互补, 其余引物的碱基一样。通过加入的特异性引物的类型以及 PCR 扩增后电泳检测产物的有无来区分 SNP 的类型。该方法需要的仪器及试剂简单且花费较小, 但是需要两个反应得到一个 SNP 位点的分型, 同时由于两条等位基因特异性引物只有末端碱基不同, 有时候可能会出现错误的扩增, 从而产生错误的判断^[3]。

2 高通量 SNP 检测方法

2.1 基因芯片 Affymetrix 以及 Infinium 基因芯片技术是目前高通量的基因芯片 SNP 分型技术的代表。Affymetrix Human SNP Array 6.0 基因芯片, 在一张芯片上可以分析一个样本的 906 600 个 SNP 的基因型, Infinium 技术是目前 SNP 芯片技术中通量最高的, 可达 110 万。SNP 分析百万级通量技术的出现, 使全基因组关联研究(GWAS)成为可能; GWAS 在本质上, 就是从人类全基因组范围内序列变异中, 筛选出与疾病性状相关联的 SNP。GWAS 分析基因组内的所有基因, 不再受候选基因的限制, 使众多功能不明的基因以及基因间区的 SNP 位点都为疾病的研究提供了相关线索。

2.1.1 Affymetrix Human SNP Array 6.0 Affymetrix Human SNP Array 6.0 采用原位合成法制备芯片。利用 LM-PCR 的方法进行全基因组扩增制备靶基因。提取的基因组 DNA 进行纯化后, 分别使用 Nsp I 和 Sty I 限制性内切酶处理 DNA 样品。酶切片段形成黏性末端, 在 T4 连接酶的作用下, Nsp I 接头和 Sty I 接头分别连接至 Nsp I 和 Sty I 酶切产物上, 形成正反两条链 5' 端部分序列相同的双链 DNA 片段。以 Nsp I 和 Sty I 酶切产物即片段化后基因组 DNA 为模板, 使用与 Nsp I 接头和 Sty I 接头上的碱基序列互补的一条通用引物进行单引物 PCR 扩增, 从而得到大量片段化的基因组 DNA。将 Sty I PCR 产物和 Nsp I PCR 产物混合后进行纯化洗脱, 并测定纯化度。将纯化后的 PCR 产物片段化后在末端脱氧核糖转移酶的作用下进行标记反应。将标记后的 PCR 产物变性后杂交, 杂交完成后经过洗涤、染色后, 用专业分析平台采集荧光信号进行 SNP 位点分析^[4]。

2.1.2 Infinium 技术 Infinium 技术采用的是点样法合成芯片, 芯片介质是微珠。将提取的基因组 DNA 定量, 利用 NaOH 变性后, 进行全基因组扩增, 将扩增后的产物进行随机内切酶酶切, 使 DNA 片段化。将完成片段化后的 DNA 片段经沉淀纯化, 重悬后与芯片杂交。在杂交过程中, DNA 片段与位于微珠上的特异性探针退火, 杂交后洗去未杂交和非特异性杂交的 DNA 片段, 用已捕获的 DNA 为模板, 在芯片上进行单碱基延伸反应, 延伸反应中, 经过不同荧光染料标记的 dNTP