

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.011

LKB1 通过 AMPK 信号通路抑制 HeLa 细胞增殖的机制研究

梁小燕, 王丕龙, 陶小红

(重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察 LKB1 基因对 HeLa 细胞株的抑制作用,探讨其可能的分子机制。**方法:**体外培养 LKB1 表达缺失的 HeLa 细胞株,脂质体介导 LKB1 质粒转染,G418 抗性筛选获得稳定表达株。研究细胞周期的变化,Western blot 检测磷酸化 Rb、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、AMPK α (adenosine monophosphate activated protein kinase α)及磷酸化 AMPK α 的蛋白表达,分析 AMPK 抑制剂 Compound C 对 PCNA 表达的影响。**结果:**成功构建稳定表达 LKB1 的 HeLa 细胞系,与空质粒对照组细胞相比,LKB1 蛋白稳定表达后使 HeLa 细胞 G1 期比例明显增加而 S 期比例减少,Rb 蛋白的磷酸化水平、PCNA 表达水平明显降低,AMPK α 的磷酸化水平明显增强,当用 Compound C 抑制 AMPK 活性后,PCNA 蛋白表达水平明显提高。**结论:**在 HeLa 细胞中,LKB1 通过激活 AMPK 信号通路,抑制 Rb 蛋白的磷酸化,使细胞周期停滞在 G1 期,抑制细胞增殖。

【关键词】细胞周期;抑癌基因;LKB1;AMPK

【中国图书分类法分类号】R730.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-01

Inhibition of HeLa cell proliferation by LKB1 through AMPK signaling pathway

LIANG Xiaoyan, WANG Pilong, TAO Xiaohong

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the inhibitory effect of LKB1 gene on HeLa cell proliferation and to investigate the underlying mechanism. **Methods:** HeLa cell lines lacking LKB1 expression were cultured in vitro and were transfected with liposome mediated LKB1 plasmid. Stable HeLa cell lines constitutively expressing LKB1 protein were established by using G418 antibiotic selection pressure. Cell cycle profile and phase distribution were analyzed by flow cytometry. Protein levels of phosphorylated Rb, proliferating cell nuclear antigen(PCNA), adenosine monophosphate activated protein kinase α (AMPK α) and phosphorylated AMPK α were analyzed by Western blot. AMPK inhibitor Compound C was also used to examine the effect of AMPK inhibition on cell proliferation. **Results:** HeLa cell lines expressing LKB1 protein were successfully established. Constitutive expression of LKB1 in HeLa stable cells led to a delayed G1/S transition, accompanied by a decrease in Rb phosphorylation. Reduced expressions of PCNA and elevated phosphorylation of AMPK α were also observed in HeLa stable cells. Besides, the expression of PCNA was greatly increased in HeLa stable cells treated with AMPK inhibitor Compound C. **Conclusion:** Expression of LKB1 protein in HeLa cells inhibited cell proliferation, which is mediated by LKB1 induced AMPK activation.

【Key words】cell cycle; tumor suppressor; LKB1; adenosine monophosphate activated protein kinase

LKB1 基因编码一种丝/苏氨酸蛋白激酶,在人体内广泛表达,其中成人以上皮、睾丸生精小管和肝脏表达最强,胎儿组织的表达水平高于成人^[1]。近年研究表明 LKB1 基因的功能异常不仅是黑斑息肉病,即 Peutz-Jeghers 综合征的致病因素,还与全身多种肿瘤的发生密切相关^[2-4]。LKB1 作为一个重要的抑癌基因,参与调控多条肿瘤信号转导通路,已成为目前肿瘤分子生物学领域的研究热点。前期研究

表明在人正常细胞株中下调内源性 LKB1 表达,通过抑制 p53 和 p16 的蛋白表达,促进 Rb 蛋白的磷酸化,推动细胞周期从 G1 期进入 S 期,加速细胞增殖^[5],但 LKB1 通过哪条下游信号通路调控细胞周期尚不清楚。

本研究以 LKB1 表达缺失的 HeLa 细胞为研究对象,构建 LKB1 基因的稳定性表达模型,观察恢复 LKB1 蛋白表达后 HeLa 细胞增殖、细胞周期以及相关信号通路重要分子表达的变化,探讨 LKB1 对 HeLa 细胞增殖的影响及可能的机制。

作者简介:梁小燕,Email:lxian925@yahoo.com.cn,

研究方向:胃肠道肿瘤。

通信作者:陶小红,Email:xiaohao88@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 主要材料

LKB1 基因真核表达质粒(pEGFP-LKB1)由美国哈佛大学袁均英教授惠赠;抗体:LKB1、GAPDH 购自 Santa Cruz 公司,磷酸化 Rb、AMPK α (adenosine monophosphate activated protein kinase α)、磷酸化 AMPK α 、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)购自 Cell Signaling 公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、抗鼠二抗购自北京中杉金桥公司;Compound C(CC)购自 Merck 公司;G418、Lipofectamine2000、胎牛血清购自 Invitrogen 公司。ECL 发光试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌 HeLa 细胞由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室保存,采用含 10%胎牛血清的 MEM 培养液,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。

1.2.2 细胞转染和挑取单克隆 接种对数生长期的 HeLa 细胞于 3.5 cm 培养皿中,待细胞汇合至 70%~80%,将 pEGFP-LKB1 质粒和 pEGFP 空质粒分别转染 HeLa 细胞;将转染 24 h 后的细胞消化,以 1:10 比例接种至 10 cm 培养皿中;按 600 μ g/ml 的浓度加入 G418 进行筛选,维持 2 周,待非转染细胞全部死亡后,G418 浓度减为 300 μ g/ml 维持培养,至逐渐形成单克隆。

1.2.3 Western blot 收集对数生长期的细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品,电转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,TBST 稀释一抗 LKB1(1:400)、GAPDH(1:1 000)、磷酸化 Rb(1:1 000)、AMPK α (1:1 000)、磷酸化 AMPK α (1:1 000)、PCNA(1:2 000),4℃过夜,TBST 洗膜后二抗(1:10 000)室温孵育 1 h,ECL 显色,暗室内胶片曝光显影。胶片扫描后,用定量软件 Quantity One 分析目标条带的吸光度值,将管家基因 GAPDH 作为内参,以校正蛋白上样量。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的细胞,胰酶消化后离心,PBS 漂洗,70%乙醇 4℃固定过夜,RNase I 37℃孵育,PI 染色后,上机检测。

1.3 统计学处理

由 SPSS 11.0 统计软件完成,所有数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选稳定表达 LKB1 的 HeLa 细胞

Western blot 结果显示,筛选获得稳定表达 LKB1 的 HeLa 细胞(LKB1)出现与 LKB1 单克隆抗体特异性结合的条带,而空质粒稳定转染的对照组细胞(Mock)无此条带(图 1),表明 LKB1 蛋白在 HeLa 细胞中得到了稳定的表达,LKB1 稳定转染的 HeLa 细胞模型构建成功。

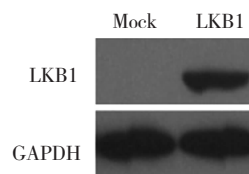


图 1 Western blot 检测 HeLa 细胞中 LKB1 蛋白的表达水平

Fig.1 Expressions of LKB1 protein in HeLa cells detected by Western blot

2.2 LKB1 稳定表达对 HeLa 细胞形态的影响

如图 2,与空质粒稳定转染的对照组 HeLa 细胞相比,稳定表达 LKB1 的 HeLa 细胞大体形态发生了明显改变,细胞由椭圆形变梭形、体积变小、细胞间间隙增大,提示在 HeLa 细胞中恢复 LKB1 基因表达后影响了细胞的生长、分化。

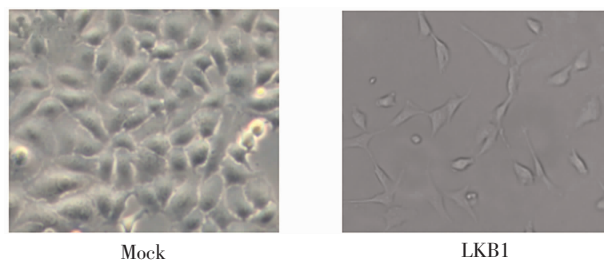


图 2 不同质粒稳定转染的 HeLa 细胞系形态

Fig.2 Morphology of HeLa cells stably expressing LKB1 vectors

2.3 LKB1 稳定表达对 HeLa 细胞细胞周期的影响

流式细胞术检测结果显示,与对照组细胞相比,LKB1 基因稳定转染的 HeLa 细胞 G1 期比例明显增加,而 S 期比例明显降低($P < 0.05$, 图 3),说明在 HeLa 细胞中恢复 LKB1 表达能够抑制 G1/S 转换,使细胞周期停滞在 G1 期。

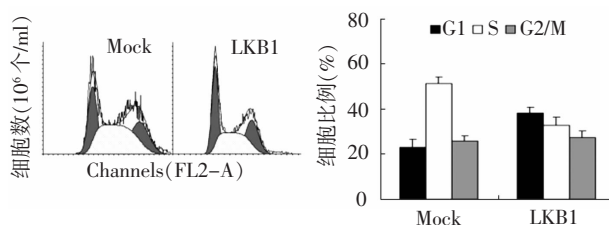


图 3 流式细胞术检测 HeLa 细胞的细胞周期

Fig.3 Cell cycle of HeLa cells detected by flow cytometry

2.4 LKB1 稳定表达对 HeLa 细胞 Rb 磷酸化的影响

Western blot 结果显示,与空质粒稳定转染的对照组细胞相比,LKB1 基因稳定转染的 HeLa 细胞,Rb 蛋白的磷酸化水平明显降低(图 4),表明在 HeLa 细胞中恢复 LKB1 表达能够抑制 Rb 蛋白的磷酸化。

2.5 LKB1 稳定表达对 HeLa 细胞 AMPK 磷酸化的影响

Western blot 结果显示,与对照组细胞相比,LKB1 基因稳定转染的 HeLa 细胞,AMPK α 的磷酸化水平明显增强,而 AMPK α 总蛋白的表达水平无明显变化(图 5),说明在 HeLa 细胞中恢复 LKB1 表达能够促进 AMPK α 蛋白的磷酸化,但

不影响 AMPK α 总蛋白的表达。

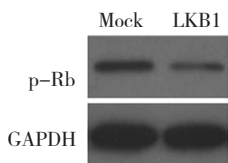


图 4 Western blot 检测 HeLa 细胞中磷酸化 Rb 的蛋白水平

Fig.4 Protein levels of phosphorylated Rb in HeLa cells detected by Western blot

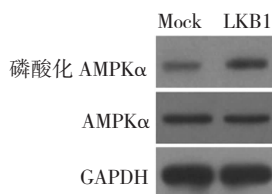


图 5 Western blot 检测 HeLa 细胞中总 AMPK α 和磷酸化 AMPK α 的蛋白水平

Fig.5 Protein levels of total AMPK α and phosphorylated AMPK α in HeLa cells detected by Western blot

2.6 LKB1 稳定表达对 HeLa 细胞 PCNA 表达的影响

Western blot 结果显示,与对照组细胞相比,LKB1 基因稳定转染的 HeLa 细胞 PCNA 表达水平明显降低,当使用 AMPK 特异性抑制剂 CC(20 μ mol)处理 LKB1 稳定细胞株 4 h 后,PCNA 蛋白表达显著增强(图 6),说明在 HeLa 细胞中恢复 LKB1 表达能够抑制细胞的增殖能力,并且这种抑制作用是通过 AMPK 的激酶活性来实现的。

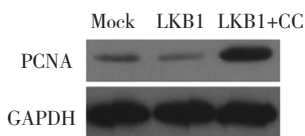


图 6 Western blot 检测 HeLa 细胞中 PCNA 蛋白的表达水平

Fig.6 Expressions of PCNA protein in HeLa cells detected by Western blot

3 讨论

恶性肿瘤最基本的生物学特性是细胞增殖失控,而增殖失控的根本原因是细胞周期调控紊乱。细胞周期是一个高度有序的运转过程,即 G1 $\rightarrow$ S $\rightarrow$ G2 $\rightarrow$ M 的序贯进行。真核细胞周期有 2 个重要的调控点,即 G1/S 和 G2/M,其中 G1/S 点尤为重要,因为一旦细胞通过了此限制点,将会自主完成细胞周期而不再依赖外源性增殖分裂信号^[6]。G1/S 调控点的中心成分是 Rb 蛋白,当被上游激酶磷酸化后,磷酸化的 Rb 蛋白释放其结合并抑制的 E2F,游离的 E2F

进入核内结合相关基因启动子区,诱导一系列与 G1/S 转变和 S 期行进相关靶分子的表达,推动 G1 期向 S 期的转变^[7]。

AMPK 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,以异源三聚体的形式存在,包含 α 催化亚基和 β 、 γ 调节亚基^[8]。AMPK 的活化需要上游激酶(AMP-activated protein kinase kinase, AMPKK)对其 α 亚基 T 环上第 172 位苏氨酸(Thr172)进行磷酸化来完成^[9]。LKB1 是体内主要的 AMPKK 之一,通过直接磷酸化 AMPK 的 α 亚基 Thr172 而激活 AMPK^[10]。研究发现,LKB1 除了可以磷酸化激活 AMPK 外,还可以磷酸化 12 个 AMPK 相关激酶,使它们的活性增加 50 倍以上^[11-12]。AMPK 与这 12 个 AMPK 相关激酶包括 BRSK1、BRSK2、MARK1、MARK2、MARK3、MARK4、NUAK1、NUAK2、SIK1、SIK2 (QIK)、SIK3 (QSK)、SNRK 共同构成了 LKB1 激酶主要的下游底物,介导 LKB1 在体内的多条信号通路^[13-14]。其中以 LKB1-AMPK 信号通路尤为重要,在细胞生长、蛋白合成、极性诱导调控等方面均发挥着重要作用^[15-16]。

本实验将 LKB1 质粒转染 LKB1 表达缺失的 HeLa 细胞株,通过 G418 抗性筛选获得稳定表达 LKB1 的 HeLa 细胞,结果发现稳定表达 LKB1 的 HeLa 细胞 G1 期比例明显增加、S 期比例减少,Rb 蛋白的磷酸化水平、PCNA 的表达水平明显降低,说明在 HeLa 细胞中恢复 LKB1 表达能够降低 Rb 蛋白的磷酸化水平,阻碍细胞周期 G1 期向 S 期转换,抑制细胞的增殖。与对照组细胞相比,稳定表达 LKB1 的 HeLa 细胞,AMPK α 的磷酸化水平明显增强,说明恢复 LKB1 表达能够促进 AMPK α 蛋白的磷酸化,提高内源性 AMPK 的激酶活性,进一步证实了 LKB1 是 AMPKK 之一。当使用特异性抑制剂 CC 抑制 AMPK 激酶活性后,HeLa 稳定细胞株 PCNA 蛋白水平明显提高,表明 LKB1 抑制细胞的增殖是通过 LKB1-AMPK 信号通路来实现的。此外发现稳定表达 LKB1 的 HeLa 细胞大体形态发生显著改变,提示恢复 LKB1 基因表达可能重新诱导 HeLa 细胞极性形成,具体机制有待进一步的研究。

本研究表明,在人宫颈癌 HeLa 细胞中恢复 LKB1 表达后细胞增殖减慢、极性恢复,其可能的机制是增强内源性的 AMPK 信号通路的活性,进而抑制细胞周期 G1/S 转换。但是相关的体内研究模型也需要进一步开展,以便深入解析细胞增殖的分子信号网络,为肿瘤防治提供新思路 and 理论依据。

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.012

重型肝炎患者外周血 Toll 样受体信号通路负性调节因子基因表达的初步研究

兰淑青, 秦 波

(重庆医科大学附属第一医院感染科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)信号转导通路负性调控因子在重型乙型肝炎患者免疫发病机制中的作用。**方法:**采用荧光定量 PCR 检测慢性乙型肝炎组 20 例、重型肝炎早期组 17 例、重型肝炎中晚期组 9 例患者及健康对照组 18 例外周血单个核细胞 TLRs 信号通路负性调节因子髓样分化蛋白 88 短臂(myeloid-differentiation-88-short, MyD88s)、白介素 1 受体相关激酶-M(interleukin-1R-associated-kinase-M, IRAK-M)、单免疫球蛋白白介素 1 受体相关蛋白(single-immunoglobulin-interleukin-1R-related-molecule, SIGIRR)、锌指蛋白 A20 及 TLR4 基因的表达;ELISA 法检测血浆肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)的水平。**结果:**与健康对照组相比, MyD88s、IRAK-M、A20 的基因表达水平及血清 TNF- α 、IL-10 水平随病情加重逐渐升高($P<0.05$);而 IL-10 在慢性乙型肝炎组与重型肝炎早期组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$);TLR4 mRNA 在慢性乙型肝炎组、重型肝炎早期组、重型肝炎中晚期组均高于健康对照组, 重型肝炎中晚期组低于早期组($P<0.05$)。相关性分析显示, 慢性乙型肝炎组、重型肝炎早期组 TLR4 mRNA 与同组 TNF- α 、总胆红素水平正相关($P<0.05$), 与凝血酶原活动度呈负相关($P<0.05$)。**结论:**TLRs 信号通路负性调节因子参与慢性肝炎和重型肝炎的发生, 且负性调节因子持续升高可能导致重型肝炎患者免疫抑制。

作者简介: 兰淑青, Email: lanshuqing@yahoo.com,

研究方向: 慢性乙型肝炎和重型乙型肝炎的发病机制。

通信作者: 秦 波, Email: eqqinbo@126.com。

基金资助: 重庆市卫生局重点资助项目(编号: 2011-1-040)。

参 考 文 献

- [1] Sanchez-Céspedes M.A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome[J]. *Oncogene*, 2007, 26(57): 7825-7832.
- [2] Ji H, Ramsey M R, Hayes D N, et al. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis[J]. *Nature*, 2007, 448(7155): 807-810.
- [3] Wingo S N, Gallardo T D, Akbay E A, et al. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression[J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5137.
- [4] Zhou J, Huang W, Tao R, et al. Inactivation of AMPK alters gene expression and promotes growth of prostate cancer cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28(18): 1993-2002.
- [5] Liang X, Wang P, Gao Q, et al. Endogenous LKB1 knockdown accelerates G(1)/S transition through p53 and p16 pathways[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(2): 156-160.
- [6] Sclafani R A, Holzen T M. Cell cycle regulation of DNA replication[J]. *Annu Rev Genet*, 2007, 41: 237-280.
- [7] Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression[J]. *Oncogene*, 2006, 25(38): 5220-5227.
- [8] Hardie D G. AMP-activated protein kinase as a drug target[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 185-210.
- [9] Bright N J, Thornton C, Carling D. The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009, 196(1): 15-26.
- [10] Jansen M, Ten Klooster J P, Offerhaus G J, et al. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism[J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(3): 777-798.
- [11] Lizcano J M, Göransson O, Toth R, et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/ PAR-1[J]. *EMBO J*, 2004, 23(4): 833-843.
- [12] Shackelford D B, Shaw R J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 563-575.
- [13] Tassan J P, Le Goff X. An overview of the KIN1/PAR-1/MARK kinase family[J]. *Biol Cell*, 2004, 96(3): 193-199.
- [14] Jaleel M, McBride A, Lizcano J M, et al. Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(6): 1417-1423.
- [15] Hezel A F, Bardeesy N. LKB1: linking cell structure and tumor suppression[J]. *Oncogene*, 2008, 27(55): 6908-6919.
- [16] Williams T, Brenman J E. LKB1 and AMPK in cell polarity and division[J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(4): 193-198.

(责任编辑: 冉明会)