

调节的作用^[23]。

6 小 结

Th17 与 Th9 细胞能够相互作用,并且与其分泌的细胞因子在哮喘疾病病程中发挥重要作用。这两种细胞之间存在着怎样的具体联系,在哮喘中发挥怎样的作用还不清楚。因此,还需要大量的研究去进一步阐明它们的相互作用、免疫调节功能,为哮喘的生物靶向治疗提供新思路。

参考文献

[1] Park JJ, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4⁺ T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1133-1141.

[2] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1123-1132.

[3] 周宏斌, 陈志华, 李雯. Th17 细胞及白细胞介素 17A 在慢性气道炎症性疾病中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(3): 560-564.

[4] van Hamburg J P, Asmawidjaja PS, Davelaar N, et al. Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including auto-crine interleukin-17A production[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(1): 73-83.

[5] Kreindler JL, Bertrand CA, Lee RJ, et al. Interleukin-17A induces bicarbonate secretion in normal human bronchial epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 296(2): 257-266.

[6] Chen Y, Thai P, Zhao YH, et al. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/auto-crine loop[J]. J Biol Chem, 2003, 278(19): 17036-17043.

[7] Wong CK, Lun SW, Ko FW, et al. Activation of peripheral Th17 lymphocytes in patients with asthma[J]. Immunol Invest, 2009, 38(7): 652-664.

[8] Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+IL-10+Foxp3(-) effector T cells[J]. Nat Immunol, 2008, 9(12): 1347-1355.

[9] Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset[J]. Nat Immunol, 2008, 9(12): 1341-1346.

[10] 徐礼, 罗俊, 向旭东. Th9 与支气管哮喘[J]. 中华哮喘杂志: 电子

版, 2011, 5(3): 48-53.

[11] Chang HC, Sehra S, Goswami R, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation[J]. Nat Immunol, 2010, 11(6): 527-534.

[12] Zhou Y, Sonobe Y, Akahori T, et al. IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes[J]. J Immunol, 2011, 186(7): 4415-4421.

[13] Wong MT, Ye JJ, Alonso MN, et al. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21[J]. Immunol Cell Biol, 2010, 88(6): 624-631.

[14] Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Volkmann B, et al. Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes [J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 111(6): 1319-1327.

[15] Ying S, Meng Q, Kay AB, et al. Elevated expression of interleukin-9 mRNA in the bronchial mucosa of atopic asthmatics and allergen-induced cutaneous late-phase reaction; relationships to eosinophils, mast cells and T lymphocytes [J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32(6): 866-871.

[16] Staudt V, Bothur E, Klein M, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells[J]. Immunity, 2010, 33(2): 192-202.

[17] 田洁, 王胜军, 许化溪. Th9 细胞: 一种新型效应性 CD4⁺ T 细胞亚群[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(9): 853-855.

[18] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages[J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 821-852.

[19] Louahed J, Kermouni A, Van Snick J, et al. IL-9 induces expression of granzymes and high-affinity IgE receptor in murine T helper clones[J]. J Immunol, 1995, 154(10): 5061-5070.

[20] Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma[J]. Immunity, 2008, 28(1): 29-39.

[21] Xing J, Wu Y, Ni B. Th9; a new player in asthma pathogenesis [J]. J Asthma, 2011, 48(2): 115-125.

[22] 邢军超, 倪兵. Th9 与哮喘[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(5): 451-454.

[23] 刘丹丹, 张玲玲, 魏伟. Th17 和 Th9 细胞参与自身免疫性疾病病理机制研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(6): 567-570.

(收稿日期: 2012-11-08)

• 综 述 •

儿童血铅检测方法的研究进展*

部振彦^{1,2}, 余晓刚², 吴美琴²综述, 古桂雄^{1△}, 颜崇淮²审校

(1. 苏州大学附属儿童医院儿保教研室, 江苏苏州 215003; 2. 上海交通大学医学院附属新华医院环境与儿童健康重点实验室, 上海 200092)

关键词: 检测方法; 血铅; 末梢血; 静脉血; 儿童

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 12. 029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)12-1554-04

Chen 等^[1]研究指出铅中毒(血铅浓度大于 100 μg/L)对儿童的智商和行为产生不利影响, 诸多研究指出血铅浓度低于

* 基金项目: 卫生部行业公益性项目(201002006); 卫生部行业公益性项目(201002001); 科技部 973 项目(2012CB525001)。 作者简介: 部振彦, 女, 在读硕士研究生, 主要从事儿童铅中毒的诊断治疗研究。 △ 通讯作者, E-mail: szgxx000@163.com。

100 $\mu\text{g/L}$ 时,亦对儿童智能及运动发育产生消极作用^[2-3]。Carlisle 等^[4]研究评估铅暴露的风险指标时指出血铅每升高 100 $\mu\text{g/L}$,可致在校学生平均智商降低 1 分。目前评估铅负荷的主要生物监测指标为血铅,而血铅检测方法多样,本文就近几年血铅筛查及诊断方法的研究进展进行归纳总结。

1 标本类型

Barton^[5]研究发现发铅测定误差大,齿铅、骨铅及组织铅取材不易,而尿铅主要反映铅排泄情况。因此血铅成为反映儿童铅暴露的理想监测指标,加之血铅测定方法成熟,质控体系完善,国际上公认全血铅检测是评价人体铅负荷的最佳方法^[6]。

1.1 静脉血 2006 年中国《儿童高铅血症和铅中毒预防指南》规定,儿童血铅水平的筛查可以采用末梢血或静脉血,但诊断必须采用静脉血。国外研究亦明确静脉血样为评价儿童血铅水平的最佳指标^[6-7],末梢血样可作为血铅筛查的合适选择^[8]。但是,末梢血筛查儿童血铅水平高于 100 $\mu\text{g/L}$ 时,必须采集静脉血进行血铅水平复查,以进一步确诊^[9]。Taylor 等^[10]提倡在儿童及家庭血铅筛查时,采用静脉血,若无法采集静脉血,可选择末梢血。

1.2 末梢血 Anticono 等^[11]在关于秘鲁亚马逊盆地儿童铅暴露筛查时,测得末梢血与静脉血结果有较好的相关性。在偏远山区,无法储存血标本测定血铅,纸片法(FP)作为末梢血的载体,显示出其独特的优势。Srivuthana 等^[12]研究纸片法测定儿童血铅水平时得出,纸片法与静脉血测定结果相关系数在 0.96 以上。Shen 等^[13]进行纸片法测定中国儿童血铅浓度的方法学及适用性研究,结果显示末梢血纸片法血铅测定与静脉血有很好的相关性。但是,末梢血采集易受环境及人为污染,常导致假阳性结果出现,尤其纸片法更增加污染的机会。因此,末梢血采集必须严格按照流程操作,以尽可能避免血标本的污染。

2 血铅测定方法

2.1 二硫腍比色法 早期血铅测定方法,为二硫腍比色法,但该方法操作比较繁琐,试剂成本较高,并且灵敏度较低,重复性差,且二硫腍为有毒试剂,目前逐步为其他方法所替代。

2.2 原子吸收光谱法

2.2.1 石墨炉原子吸收光谱法(GFASS) 国际应用最多且最为经典的血铅测定方法,该法原子化效率高,几乎达 100%,常规使用的检测限为 10~20 $\mu\text{g/L}$ ^[14],但是系统必须用塞曼背景修正^[15]。Zentner 等^[16]在血铅测定方法研究中亦指出 GFASS 法虽具有较高的灵敏度及准确度,但是,其分析时间较长,需要操作人员具备一定的实验技能,对于现场测定仍有一定局限性,特别是当血铅浓度小于或等于 100 $\mu\text{g/L}$,建议选用便携式血铅测定仪进行血铅筛查。

2.2.2 氢化物发生-原子吸收光谱法(HGASS) Arbab-Zavar 等^[17]通过氢化物-原子吸收光谱法测定铅含量时得出此方法的检测限为 11 $\mu\text{g/L}$,相对标准偏差 5%,提示此法精密度较高,干扰少。但是血样前处理硝酸-高氯酸消解或微波消解较复杂,且血铅结果主要受硼氢化钠浓度影响,因此,需严格控制酸及硼氢化钠的量。

2.2.3 钨舟无火焰原子吸收光谱法 主要应用于国内的血铅测定方法,庄宝玲^[18]研究认为此法有较好的稳定性,在进行全血二价阳离子的生理浓度干扰试验中提示无明显干扰。但是,此法检验结果的准确性受钨舟片质量及元素灯的影响,若使用时间久,或进行连续大样本测定时,需及时更换钨舟片或元素灯^[19],并清洗仪器,目前主要用于血铅的筛查。

2.3 电化学分析方法

2.3.1 阳极溶出伏安法 预先在恒定电位下将被测物富集在固定的工作电极上,然后使微电极的电位由负向正移动,富集

的物质反向溶出(阳极溶出),并记录溶出过程的电流-电位(伏安)曲线,进行分析测定。

2.3.2 微分电位溶出法 阳极溶出伏安法测定精密度高,且抗干扰能力强。微分电位溶出法测定线性范围宽,精密度高,当延长富集时间,可降低检测限,提高灵敏度,血铅的测定范围为 10~1 000 $\mu\text{g/L}$,特别是血铅高于 100 $\mu\text{g/L}$ 时,重复性最佳^[14]。

2.3.3 方法评价 以上两种方法一般应用汞作为工作电极,分析过程会析出有毒金属汞,对环境及人体造成危害。目前研究主要集中于改进工作电极,Chuanuwatanakul 等^[20]在应用顺序注射方波阳极溶出伏安法测定血铅时采用镀铋的印刷碳电极作为工作电极,并测得铅的线性范围为 0~70 $\mu\text{g/L}$,检出限为 0.89 $\mu\text{g/L}$ 。Armstrong 等^[21]应用铋电极单独及联合测定锌、铅及镉的研究中,指出铋电极操作简单、稳定性良好,是一种理想的重金属测定工作电极。

值得一提的是基于溶出伏安法原理设计的便携式血铅测定仪(Lead Care),可以现场快速测定血铅,测定标本为末梢血或静脉血^[22]。Charalambous 等^[23]及 Anticono 等^[11]在应用 Lead Care I (美国 ESA 公司)进行血铅筛查时,通过盲法抽样与石墨炉原子吸收光谱法测定静脉血铅结果比较,有较好相关性。Bischoff 等^[15]在血铅测定研究中比较 Lead Care II 与石墨炉原子吸收光谱法,结果显示相关性较好,但后者测定结果偏低。Yantasee 等^[24]研究指出血铅分析仪测定血铅的精确度与 ICP-MS 相当,相对标准差小于 5%。总之,Lead Care 法测定更简便、快捷,样本量较少(50 μL)^[14],血铅测定范围为 33~650 $\mu\text{g/L}$,可广泛用于血铅筛查。铅中毒的确诊仍需采用 GFASS 法等其他方法,特别是当血铅浓度高于 400 $\mu\text{g/L}$ 时^[22]。

2.4 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS) Sobin 等^[25]比较研究低水平儿童血铅测定的 ICP-MS 与便携式血铅测定仪 Bland-Altman 法,指出 ICP-MS 是测定血铅,特别是低浓度血铅的金标准,结果的重复性及精密度高。Jedrychowski 等^[26]应用电感耦合等离子体质谱法测定脐血及母亲血铅浓度,结果显示此法有较好的灵敏度及精确度,同时指出此方法亦适用于末梢血血铅的筛查。Chillrud 等^[27]应用铁共沉淀原理,采用 ICP-MS 法可精确测得全血中铅同位素比值,经同位素稀释后,重复性提高 6%。Cizdziel 等^[28]利用激光灼烧电感耦合等离子体质谱联合技术(LA-ICP-MS)测定纸片血斑血铅,无需前处理,更适合快速大样本血铅筛查,测得结果与实验室能力验证的血铅值有很好的相关性,但设备条件要求较高。Hsieh 等^[29]研究水标准标定及矩阵匹配校准方法,得出 LA-ICP-MS 的回收率为 97.8%~112.8%,检出限为 1 $\mu\text{g/L}$,相对标准差小于 10%。但是,ICP-MS 成本较高,在检测较多样品以及较多元素时,相对较为经济^[14]。

3 血铅检测的质量控制

3.1 实验室间质量评价 实验室应当按时参加卫生部认定的室间质量评价机构组织的质量评价活动。对接受质量评价检测的样本应随机加入日常血铅样品检测中进行,不得另选检测系统分析,以真正反映本实验室的实际检测水平。根据实验室间质量评价结果,决定是否采取改善措施。

3.2 实验室内质量控制

3.2.1 样品处理 实验室内样品处理会带来污染风险,最好在国际质量标准 5 级环境或更清洁的环境中进行^[14]。实验室应绘制室内质量控制图,以评价本实验室的检测质量。以每日实际检测分析中所测的质控标准物质的不同浓度检测结果,分别标点制图。

3.2.2 校准曲线 每次分析样品时须制备标准曲线。标准曲线应由 3~5 个已知浓度(包括空白浓度)的标准溶液,以测量

信号值为纵坐标,以浓度(或量)为横坐标,按样品的测定步骤制备。所应用的校准曲线信号值与浓度(或量)相关系数应大于或等于 0.995,样品浓度必须在所作校准曲线的浓度范围内,不得将校准曲线任意外延。连续测量多次后,必须重新校正标准曲线。

3.3 全过程铅污染的控制

3.3.1 采血过程的质量控制 采血场所必须远离铅污染源,室内地面和墙壁应湿化清洁,采血前清洁采血场所,不得使用风扇降温,尽可能降低环境铅污染。静脉采血时经皮肤去铅处理后,采血过程基本密封。末梢采血时,弃第一滴血液,用聚乙烯管收集血滴。采血完成后立即盖好盖子,直立涡旋混匀以使与抗凝剂充分混合。采血针及针套都应保证无铅,并预先检测其所含铅本底,或进行严格酸洗^[14]。

3.3.2 标本的质量控制 储血管器采用经抽样空白检测合格的真空采血管(预置抗凝剂)或实验室用的优质聚乙烯管。Di Martino 等^[30]研究指出用纸片法筛查血铅需在提取液中加入 5 mmol/L EDTA,洗脱滤纸片,以提高铅的回收率。由于脐带血处于高凝状态,抗凝剂应该增加或加倍。静脉血或末梢血应冷藏保存,而干燥在纸片上的血斑则可常温或 4 ℃冷藏。通常在 2~4 周内测定血铅结果均稳定。Shen 等^[13]提出,末梢血纸片法的标本经干燥后置入去离子处理的塑料袋密封,并放入 4 ℃冰箱保存,在 1 个月内测定结果稳定。

4 小 结

综上所述,血铅检测方法正在逐步改进,不仅更为精确、方便,而且正广泛用于儿童血铅水平的筛查及诊断。测定血铅时,可根据需求的检测限、精密度、期望完成分析的时间周期、样品数量选择合适的测定方法。同时开展儿童血铅水平筛查及测定技术的推广将成为重要研究课题。

参考文献

[1] Chen A, Cai B, Dietrich KN, et al. Lead exposure, IQ, and behavior in urban 5- to 7-year-olds; Does lead affect behavior only by lowering IQ[J]. *Pediatrics*, 2007, 119(3) : e650-e658.

[2] Téllez-Rojo MM, Bellinger D, Arroyo-Quiroz C, et al. Longitudinal associations between blood lead concentrations lower than 10 microg /dL and neurobehavioral development in environmentally exposed children in Mexico City[J]. *Pediatrics*, 2006, 118(2) : e323-e330.

[3] Jusko D, Henderson CR, Lanphear BP, et al. Blood lead concentrations < 10 microg /dL and child intelligence at 6 years of age[J]. *Environ Health Perspect*, 2008, 116 (2): 243-248.

[4] Carlisle JC, Dowling KC, Siegel DM, et al. A blood lead benchmark for assessing risks from childhood lead exposure[J]. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2009, 44(12) : 1200-1208.

[5] Barton HJ. Advantages of the use of deciduous teeth, hair, and blood analysis for lead and cadmium bio-monitoring in children. A study of 6-year-old children from Krakow (Poland)[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 143(2) : 637-658.

[6] CDC. Managing Elevated Blood Lead Levels Among Young Children: Recommendations from the Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention[M]. Atlanta: Dept of Health and Human Services, 2002.

[7] Warniment C, Tsang K, Galazka SS. Lead poisoning in children [J]. *Am Fam Physician*, 2010, 81(6) : 751-757.

[8] American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. Lead exposure in children: prevention, detection, and management[J]. *Pediatrics*, 2005, 116(4) : 1036-1046.

[9] Binns HJ, Campbell C, Brown MJ, et al. Interpreting and managing blood lead levels of less than 10 microg/dL in children and reducing childhood exposure to lead; recommendations of the Cen-

ters for Disease Control and Prevention Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention [J]. *Pediatrics*, 2007, 120 (5) : e1285-1298.

[10] Taylor JY, Holtrop TG. Yemeni families and child lead screening in Detroit[J]. *J Transcult Nurs*, 2007, 18(1) : 63-69.

[11] Anticona C, Bergdahl IA, San Sebastian M. Lead exposure among children from native communities of the Peruvian Amazon basin [J]. *Rev Panam Salud Publica*, 2012, 31(4) : 296-302.

[12] Srivuthana K, Yee HY, Bhambhani K, et al. A new filter paper method to measure capillary blood lead level in children [J]. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 1996, 150(5) : 498-502.

[13] Shen XM, Zhang YW, Wu SH, et al. Applicability of a filter paper method to measure blood lead levels in large populations of Chinese children[J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 328(1/2) : 99-104.

[14] World Health Organization. Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. Brief guide to analytical methods for measuring lead in blood[M]. Geneva: World Health Organization, 2011:1-12.

[15] Bischoff K, Gaskill C, Erb HN, et al. Comparison of two methods for blood lead analysis in cattle: graphite-furnace atomic absorption spectrometry and LeadCare (R) II system[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2010, 22(5) : 729-733.

[16] Zentner LE, Rondó PH, Latorre Mdo R. Blood lead concentrations in maternal and cord blood evaluated by two analytic methods[J]. *Arch Environ Occup Health*, 2005, 60(1) : 47-50.

[17] Arbab-Zavar MH, Chamsaz M, Youssefi A, et al. Evaluation of electrochemical generation of volatile zinc hydride by heated quartz tube atomizer atomic absorption spectrometry [J]. *Anal Sci*, 2012, 28(7) : 717-722.

[18] 庄宝玲. 全血铅钨舟无焰原子吸收光谱法测定的探讨[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(11) : 1137-1138.

[19] 张凤琴, 李亚娥, 白艳丽. BH2100 原子吸收光谱仪测定血铅(Pb)结果的可靠性分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2007, 22(4) : 25.

[20] Chuanuwatanakul S, Dungchai W, Chailapakul O, et al. Determination of trace heavy metals by sequential injection-anodic stripping voltammetry using bismuth film screen-printed printed carbon electrode[J]. *Anal Sci*, 2008, 24(5) : 589-594.

[21] Armstrong KC, Tatum CE, Dansby-Sparks RN, et al. Individual and simultaneous determination of lead, cadmium, and zinc by anodic stripping voltammetry at a bismuth bulk electrode[J]. *Talanta*, 2010, 82(2) : 675-680.

[22] Bossarte RM, Brown MJ, Jones RL, et al. Blood lead misclassification due to defective LeadCare blood lead testing equipment[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(5) : 994-995.

[23] Charalambous A, Demoliou K, Mendez M, et al. Screening for lead exposure in children in Belize[J]. *Rev Panam Salud Publica*, 2009, 25(1) : 47-50.

[24] Yantasee W, Lin Y, Hongsirikarn K, et al. Electrochemical sensors for the detection of lead and other toxic heavy metals: the next generation of personal exposure biomonitors [J]. *Environ Health Perspect*, 2007, 115(12) : 1683-1690.

[25] Sobin C, Parisi N, Schaub T, et al. A Bland-Altman comparison of the Lead Care? System and inductively coupled plasma mass spectrometry for detecting low-level lead in child whole blood samples [J]. *J Med Toxicol*, 2011, 7(1) : 24-32.

[26] Jedrychowski W, Perera F, Maugeri U, et al. Intrauterine exposure to lead may enhance sensitization to common inhalant allergens in early childhood: a prospective prebirth cohort study[J]. *Environ Res*, 2011, 111(1) : 119-124.

[27] Chillrud SN, Hemming NG, Ross JM, et al. A rapid and precise procedure for Pb isotopes in whole blood by Fe co-precipitation and MC-ICPMS analysis[J]. *Appl Geochem*, 2005, 20(4) : 807-813.

- [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], 升高细胞周期依赖性激酶 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, E-mail: zhaohongmei0527@126.com。

作者简介: 杨事达, 男, 主管检验技师, 主要从事实验诊断研究。 \triangle 通讯