

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.007

· 基础研究 ·

LKB1 协同二甲双胍影响宫颈癌 HeLa 细胞的增殖与凋亡及其可能的机制

包传恩, 张雅雅, 崔殿龙, 魏凌云, 郭明(解放军第 174 医院 胸心外科, 福建 厦门 361001)

[摘要] **目的:**探索肝脏激酶 B1 (liver kinase B1, *LKB1* 或 serine-threonine kinase 11, *STK11*) 基因协同二甲双胍对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖与凋亡的影响及其可能的机制。**方法:**构建含有 *LKB1* 基因的重组质粒 LKB1-pEGFP-n1 并转染 HeLa 细胞, MTT 检测 *LKB1* 基因对经二甲双胍处理的 HeLa 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测对细胞周期和凋亡的影响, Western blotting 检测对 LKB1-AMPK 信号通路相关蛋白 AMPK、ACC 和 Rb 磷酸化水平的影响。**结果:**LKB1-pEGFP-n1 和空载体 pEGFP-n1 成功转染 HeLa 细胞, LKB1-pEGFP-n1 转染细胞内稳定表达 LKB1。二甲双胍处理 LKB1-pEGFP-n1 转染细胞的 IC_{50} 显著低于 pEGFP-n1 转染细胞 [$(2.9 \pm 0.4) vs (7.8 \pm 1.3) \text{ mmol/L}$; $t = -6.9921, P = 0.0022$] 及野生型 HeLa 细胞 [$(2.9 \pm 0.4) vs (9.6 \pm 1.5) \text{ mmol/L}$; $t = -7.5271, P = 0.0017$]。经二甲双胍处理后, LKB1-pEGFP-n1 转染细胞周期阻滞于 G_1 期, 而 pEGFP-n1 转染和野生型细胞周期无显著变化。二甲双胍作用剂量为 15 mmol/L 时, LKB1-pEGFP-n1 转染细胞凋亡率较 pEGFP-n1 转染及野生型 HeLa 细胞显著增多 [$(28.6 \pm 2.3)\% vs (9.6 \pm 1.6)\%、(17.8 \pm 1.9)\%$, 均 $P < 0.05$]。LKB1-pEGFP-n1 转染细胞内 AMPK α 和 ACC 的磷酸化水平较 pEGFP-n1 转染和野生型细胞升高, Rb 磷酸化水平降低。**结论:** *LKB1* 能够协同二甲双胍影响 HeLa 细胞的增殖与凋亡, 其可能通过 LKB1-AMPK 信号通路发挥作用。

[关键词] 宫颈癌; HeLa 细胞; 肝脏激酶 B1 基因; 二甲双胍; 凋亡

[中图分类号] R737.33; R730.59

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)02-0153-07

Synergistic effects and underlying mechanisms of liver kinase B1 and metformin on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells and its possible mechanism

Bao Chuanen, Zhang Yaya, Cui Dianlong, Wei Lingyun, Guo Ming (Department of Cardiothoracic Surgery, 174th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Xiamen 361001, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To explore synergistic effects and the underlying mechanisms of liver kinase B1 (*LKB1*) or serine-threonine kinase 11 (*STK11*) and metformin on proliferation and apoptosis of human cervical cancer cells using the HeLa cell line as a model. **Methods:** A recombinant plasmid LKB1-pEGFP-n1 was constructed. HeLa cells were transfected with this construct and the mock-vehicle pEGFP-n1 respectively. Transfectants were then treated with metformin. Cell viability was assessed by MTT assays, apoptosis and cycle progression by flow cytometry, and phosphorylation of AMPK, ACC and Rb (key players in the LKB1-AMPK signaling pathway) by Western blotting, 24 h after metformin treatment. **Results:** Both LKB1-pEGFP-n1 and the mock-vehicle pEGFP-n1 were successfully transfected into HeLa cells. After metformin treatment, IC_{50} was significantly lower in cells transfected with LKB1-pEGFP-n1 (2.9 ± 0.4) mmol/L than those transfected with pEGFP-n1 (7.8 ± 1.3) mmol/L and wild type HeLa cells (9.6 ± 1.5) mmol/L ($P < 0.01$), indicating a significant cell growth-inhibiting effect for LKB1. LKB1-pEGFP-n1 group showed a G_1 phase arrest after treatment with metformin. In contrast, no cell cycle arrest was evident in wild type HeLa cells or HeLa cells transfected with pEGFP-n1. After treatment with 15 mmol/L metformin, apoptosis rate was significantly higher in cells transfected with LKB1-pEGFP-n1 ($28.6 \pm 2.3\%$) than that in cells transfected with pEGFP-n1 ($9.6 \pm 1.6\%$) and wild type cells

[基金项目] 南京军区医学科技创新课题资助项目(No. 11MA072)。Project supported by the Medical Technology Innovation Topics from Nanjing Military Area Command of PLA(No. 11MA072)

[作者简介] 包传恩(1976-),男,福建省厦门市人,硕士,主要从事胸部肿瘤基础及临床研究。E-mail: baochuanan@163.com

[通信作者] 郭明(Guo Ming, corresponding author), E-mail: 13358378777@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140331.1721.005.html>

(17.8 ± 1.9)% (P < 0.05). Phosphorylation of AMPK α and ACC was increased but phosphorylation of Rb was decreased in cells transfected with LKB1-pEGFP-n1 as compared with untransfected cells and cells transfected with-pEGFP-n1. **Conclusion:** LKB1 and metformin may affect the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells in a coordinated manner, possibly involving the LKB1-AMPK signaling pathway.

[**Key words**] cervical cancer; HeLa cell; liver kinase B1 gene; metformin; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(2): 153-159]

肝脏激酶 B1 (liver kinase B1, LKB1 或 serine-threonine kinase 11, STK11) 基因是目前公认的一种抑癌基因, 在细胞增殖中起到重要调控作用。LKB1 通过调节 AMPK 的磷酸化水平, 影响 AMPK-mTOR 信号通路, 抑制 mTOR 的异常激活, 进而阻止肿瘤的发生和生长^[1-3], 其基因突变导致的功能缺失与在较多恶性肿瘤的发生、发展有着重要的联系^[1]。二甲双胍作为一种胰岛素增敏剂被用于 II 型糖尿病的一线治疗^[4-5]。近来, 研究^[6-7]发现二甲双胍能通过参与 LKB1-AMPK 信号通路降低糖尿病患者的肿瘤发生率, 提示它可能具有抗肿瘤的作用。本研究以 LKB1 表达缺失的宫颈癌 HeLa 细胞为研究对象, 构建 LKB1 基因的稳定性表达模型, 对比具有 LKB1 基因的 HeLa 细胞和正常 HeLa 细胞对潜在的肿瘤治疗药物二甲双胍的敏感性, 观察 LKB1 协同二甲双胍对肿瘤细胞增殖、凋亡以及相关信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

宫颈癌 HeLa 细胞、载体 pEGFP-n1 由厦门大学生命科学学院惠赠。引物由上海生工公司合成, Metformin 购于上海生工公司, 一抗(鼠抗 LKB1、AMPK、p-AMPK、ACC、p-ACC、Rb 及 p-Rb 单抗)购自 Abcam 公司, 二抗(HRP 标记兔抗鼠 IgG 抗体)购自 DAKO 公司。AXIO OBSERVER A1 倒置荧光显微镜购自德国 ZEISS 公司, Tanon-2500 凝胶成像系统购自上海天能公司, Altra 贝克曼流式细胞仪购自美国 Beckman Altra 公司, MK3 多功能酶标仪购自美国 Therm 公司。

1.2 载体构建

以 LKB1 基因全长序列为模板设计 PCR 引物, 酶切位点为 EcoR I / Sal I, 上游引物: 5'- TTA-GAATTCTTATGGAGGTGGTGGACCCGAG-3'; 下游引物: 5'- ATTGTCGACTACTGCTGCTTGCAGCCGA-3'。PCR 产物与 pEGFP-n1 载体重组得到 LKB1-pEGFP-n1 重组载体, 转入 E. coli DH5 α 后经广州英韦创津公司测序。

1.3 LKB1-pEGFP-n1 转染 HeLa 细胞

挑取单克隆接种对数生长期的 HeLa 细胞于 10 cm 培养皿中, 待细胞生长至 70% ~ 80% 汇合, 将 LKB1-pEGFP-n1 质粒和 pEGFP-n1 空质粒分别转染 HeLa 细胞。转染 24 h 后消化细胞, 并以 1:8 比例接种至 6 孔板培养皿中, 按 800 μ g/ml 加入 G418 进行筛选, 维持 12 d, 待非转染细胞全部死亡后, G418 减为 400 μ g/ml, 维持培养。将转染 LKB1-pEGFP-n1 重组质粒和 pEGFP-n1 空质粒的 HeLa 细胞分别置于荧光显微镜中观察转染效率, 后用胰酶消化制成悬液, 通过流式细胞仪评估转染效率, Western blotting 检测 LKB1 在细胞内的表达。

1.4 MTT 检测 LKB1 联合二甲双胍处理对 HeLa 细胞的生长抑制作用

收集对数生长期的转染及野生型 HeLa 细胞制成单细胞悬液, 以 6 \times 10⁴ 个/ml 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ l; 设 3 孔为无细胞空白对照。培养 24 h 后, 分别加入 0、2、6、10、15 mmol/L 的二甲双胍, 以 PBS 处理为对照组, 继续培养 24 h。培养结束后在每孔中加入 10 μ l 5 mg/ml MTT 溶液, 37 $^{\circ}$ C 反应 3 h, 每孔加 100 μ l 终止液(10% SDS, 0.01 mol/L HCl)过夜, 酶标仪测定波长 595 nm 处的光密度(D)值, 同时显微镜观察细胞形态的改变。实验重复 5 次, 取平均值计算肿瘤细胞生长抑制率。抑制率(%) = (阴性对照组 D 值 - 实验组 D 值) / (阴性对照组 D 值 - 空白组 D 值) \times 100%。

1.5 流式细胞术检测 LKB1 联合二甲双胍处理对 HeLa 细胞凋亡和周期的影响

用于细胞凋亡和周期检测的 HeLa 细胞培养条件与 MTT 检测相同, 二甲双胍设置两个浓度, 分别为 6 mmol/L 和 15 mmol/L; 设 PBS 处理细胞为对照组。处理 24 h 后 PBS 清洗细胞 3 遍, 用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 70% 乙醇固定过夜, PI 染色后流式细胞术检测细胞周期; 按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书操作对细胞染色, 然后进行凋亡检测。

1.6 Western blotting 检测二甲双胍对 LKB1-AMPK 信号通路相关蛋白表达的影响

分别用 0、1、2、6、10、15 mmol/L 的二甲双胍处理转染 LKB1-pEGFP-n1 和转染空载体的两组 HeLa

细胞 24 h,以等量 PBS 处理作为阴性对照。细胞于 4 ℃ 裂解 5 ~ 10 min 后收集,冰浴超声裂解细胞,取裂解液上清测定蛋白质浓度并用 SDS-PAGE 分离蛋白,转至 PVDF 膜,加入 5% BSA 室温封闭 1 h,加入鼠抗 *LKB1*、AMPK、p-AMPK、ACC、p-ACC、Rb 及 p-Rb 单抗(1:1 000)室温培养 2 h,HRP 标记二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,用增强型化学发光剂(ECL)溶液浸泡、显影。

1.7 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 origin7.5 统计软件分析,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P <$

0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 *LKB1*-pEGFP-n1 转染载体

琼脂糖电泳检测结果(图 1A)显示,成功扩增得到 *LKB1*,*LKB1* 的全长序列为 1 299 bp^[8],扩增产物经 *EcoR* I/*Sal* I 双酶切后与 pEGFP-n1 载体(4 700 bp)重组,得到重组载体 *LKB1*-pEGFP-n1(5 999 bp),重组载体及其双酶切琼脂糖电泳检测结果如图 1B、C。

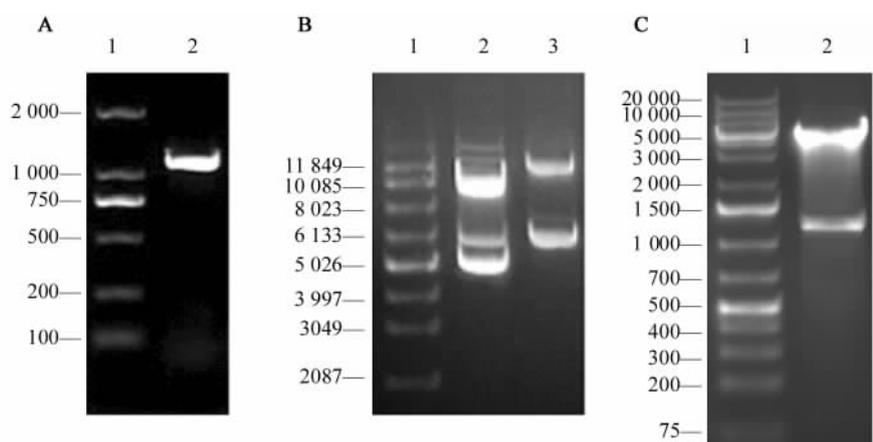


图 1 成功构建 *LKB1*-pEGFP-n1 载体

Fig. 1 *LKB1*-pEGFP-n1 vector was successful constructed

(A) 1: DL2000 marker, 2: PCR product of *LKB1* gene; (B) 1: Supercoiled marker, 2: pEGFP-n1 vector, 3: *LKB1*-pEGFP-n1 vector; (C) 1: SM1343 DNA ladder marker, 2: Doubledigested results of *LKB1* gene

2.2 *LKB1*-pEGFP-n1 载体成功转染并获得 *LKB1* 稳定表达的 HeLa 细胞

荧光显微镜观察显示(图 2),经脂质体介导和 G418 筛选,转染 *LKB1*-pEGFP-n1 载体和 pEGFP-n1 载体后的 HeLa 细胞在 488 nm 波长激发下均呈现出绿色荧光信号,证明载体转染进入 HeLa 细胞株并成功表达相应蛋白。流式细胞术检测结果(图 3)显示,转染 *LKB1*-pEGFP-n1 载体组和转染 pEGFP-n1 载体的 HeLa 细胞的转染率分别为 68.2% 和 71.8%。Western blotting 检测结果(图 4)显示,*LKB1*-pEGFP-n1 转染细胞中表达有 *LKB1* 蛋白条带,而 pEGFP-n1 组及野生型 HeLa 细胞不表达。

2.3 过表达 *LKB1* 基因促进二甲双胍对 HeLa 细胞增殖的抑制

转染 *LKB1*-pEGFP-n1 的 HeLa 细胞经二甲双胍处理后,与对照组相比,细胞生长受到显著的抑制,

在浓度为 15 mmol/L 的二甲双胍作用下,出现了大量的凋亡小体,并有很多细胞开始变圆脱壁;转染了 pEGFP-n1 质粒的 HeLa 细胞及野生型 HeLa 细胞形态的改变不明显(图 5)。

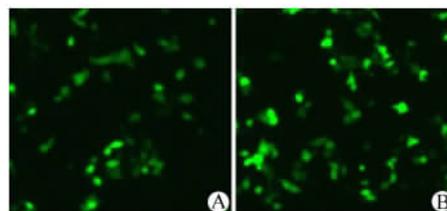


图 2 *LKB1*-pEGFP-n1 及 pEGFP-n1 载体成功转染 HeLa 细胞(×100)

Fig. 2 *LKB1*-pEGFP-n1 and pEGFP-n1 transfected HeLa cells successfully(×100)

A: *LKB1*-pEGFP-n1; B: pEGFP-n1

MTT 检测结果(图 6)显示,二甲双胍杀伤 LKB1-pEGFP-n1 组细胞的 IC₅₀ 显著低于转染 pEGFP-n1 组细胞 [(2.9 ± 0.4) vs (7.8 ± 1.3); $t = -6.9921, P = 0.0022$] 及野生型 HeLa 细胞 [(2.9 ± 0.4) vs (9.6 ± 1.5); $t = -7.5271, P = 0.0017$]; 并且显示,转染细胞对二甲双胍的敏感性表现出更强的剂量依赖性。

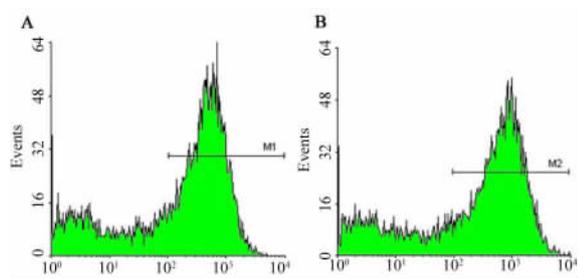


图 3 流式术 LKB1-pEGFP-n1 及 pEGFP-n1 载体转染效率的检测

Fig. 3 Transfection rate of LKB1-pEGFP-n1 and pEGFP-n1 detected by FCM

A: LKB1-pEGFP-n1 group; B: pEGFP-n1 group



图 4 LKB1 在 HeLa 细胞内表达的 Western blotting 检测

Fig. 4 Detection of LKB1 in HeLa cells by Western blotting
1: LKB1-pEGFP-n1 group; 2: pEGFP-n1 group; 3: Wild type cells

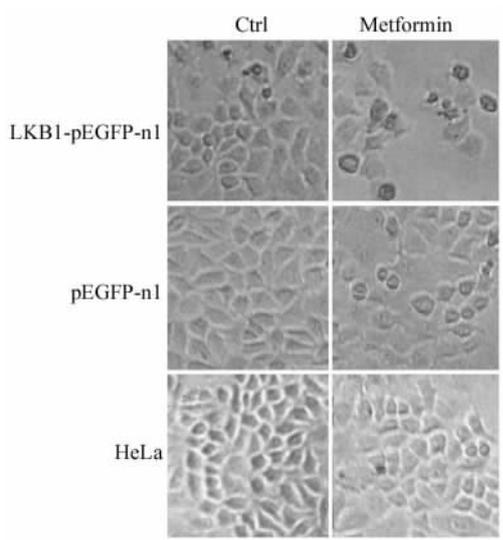


图 5 二甲双胍处理后 HeLa 细胞形态的改变(×100)

Fig. 5 Changes of HeLa cell's morphology after treated with metformin (×100)

2.4 LKB1 提高二甲双胍处理后 HeLa 细胞的凋亡率

流式细胞术检测结果(图 7)显示,随着二甲双胍浓度逐渐增加,转染 LKB1-pEGFP-n1 的细胞首先表现出了凋亡比例增加的趋势,当二甲双胍浓度为 15 mmol/L 时凋亡细胞较 PBS 对照组显著增多 [(28.6 ± 2.3)% vs (9.6 ± 1.6)% , $t = -11.3788, P = 0.00034$], 也显著高于转染 pEGFP-n1 载体细胞 [(28.6 ± 0.9)% vs (21.4 ± 1.5)% ; $t = 4.3606, P = 0.0121$] 及野生型 HeLa 细胞 [(28.6 ± 0.9)% vs (17.8 ± 1.9)% ; $t = 6.03121, P = 0.0038$]。

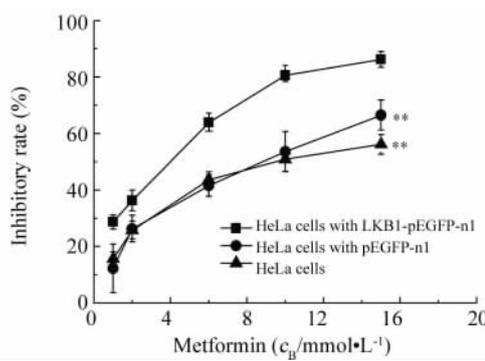


图 6 二甲双胍抑制 HeLa 细胞的增殖

Fig. 6 Metformin inhibited the growth of HeLa cells

** $P < 0.01$ vs LKB1-pEGFP-n1 group

2.5 LKB1 促进二甲胍处理后 HeLa 细胞阻滞于 G₁ 期

流式细胞术检测结果(图 8)显示, LKB1-pEGFP-n1 组细胞在二甲双胍浓度为 15 mmol/L 时,与未经二甲双胍处理的细胞相比, G₁ 期细胞明显增加 [(68.5 ± 2.8)% vs (86.4 ± 4.6)% ; $t = -5.8352, P = 0.0043$], pEGFP-n1 组细胞 [(63.5 ± 3.6)% vs (67.9 ± 3.2)% ; $t = -1.5528, P = 0.1954$] 和野生型 HeLa 细胞 [(71.3 ± 2.3)% vs (75.9 ± 2.3)% ; $t = -2.4403, P = 0.0712$] G₁ 期细胞比例变化不显著。

2.6 二甲双胍对 LKB1-AMPK 信号通路的影响

Western blotting 结果(图 9)显示,随着二甲双胍浓度的增加, LKB1-pEGFP-n1 转染细胞 AMPK α 和 ACC 的磷酸化均有明显的增多, Rb 的磷酸化水平相应地减少,由此可说明,二甲双胍激活了 LKB1-AMPK 信号通路。pEGFP-n1 转染组与野生型 HeLa 细胞株中 AMPK α 和 Rb 的磷酸化水平无显著改变, ACC 的磷酸化水平无升高。

3 讨论

恶性肿瘤发生与发展最主要的原因是细胞周期

调控的紊乱,导致细胞增殖失控^[9]。正常细胞的细胞周期是一个高度有序的运转过程,在未受外界刺激情况下一般都停留在 G_1 期,而肿瘤细胞由于某个抑制增殖的基因发生突变,使得细胞突破了 G_1 期这个限制点,而不再依赖外源性增殖分裂信号自主进

入无限制的细胞分裂周期。*LKB1* 是公认的抑癌基因,许多恶性肿瘤的发生都与其突变后失去活性相关,有研究表明 *LKB1* 具有抑制细胞增殖将细胞阻滞在 G_1 期的作用^[10-11]。

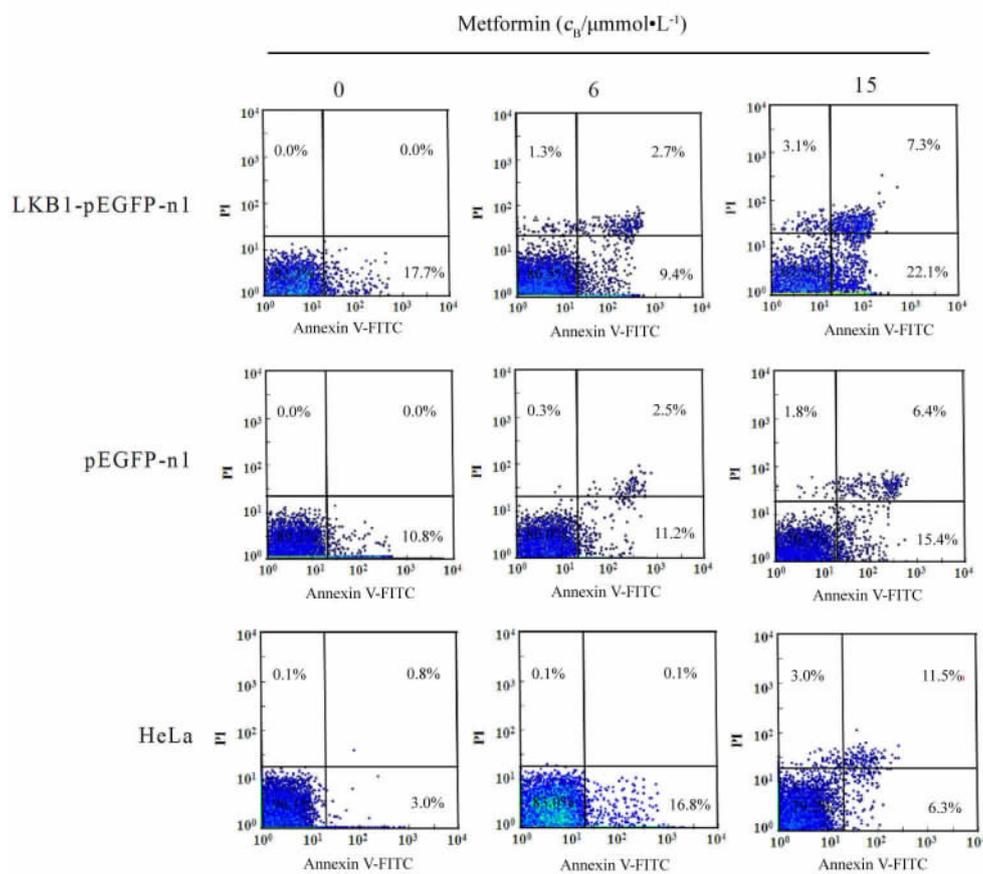


图7 二甲双胍促进不同组的 HeLa 细胞的凋亡

Fig.7 Metformin promoted the apoptosis of HeLa cells in different groups

本研究结果表明,转染 *LKB1* 基因的 HeLa 细胞对二甲双胍的敏感性大为增强,经药物处理后大部分细胞都被阻滞在 G_1 期,而转染 pEGFP-n1 空载体的 HeLa 细胞则未见明显改变。是 经转染 *LKB1* 基因的 HeLa 细胞在二甲双胍作用下, G_1/S 调控点的中心成分 Rb 蛋白磷酸化水平呈现出梯度下降,进一步解释了二甲双胍导致转有 *LKB1* 基因的 HeLa 细胞发生 G_1 期阻滞的现象^[12];也说明二甲双胍激活了 *LKB1*-AMPK 信号通路,使与癌症发生、发展密切相关的蛋白活性受到抑制^[13-14],进而抑制了肿瘤细胞的增殖^[15-16]或促使肿瘤细胞凋亡。同时,对照组细胞中仅 ACC 磷酸化水平升高,推测是由于二甲双胍对 AMPK 也具有单独的调控作用,导致 AMPK 发生了部分的自身磷酸化,并激活下游蛋白 ACC 的

磷酸化^[17]。

mTOR 蛋白是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在调节细胞生长、增殖、调控,细胞周期等多个方面扮演着重要角色,其活性的异常,与肿瘤发生有着密切的联系^[18-19]。研究表明,被激活的 AMPK 能直接磷酸化激活 TSC2^[20-21],激活的 TSC2 通过抑制小蛋白 Rheb (ras homologue enriched in brain) 而抑制 mTORC1 的活性,最终阻滞了肿瘤细胞的生长。*LKB1* 和二甲双胍在 AMPK 中起着至关重要的作用,因此本研究中转染了 *LKB1* 基因的 HeLa 细胞在二甲双胍作用下,与未转染该基因的 HeLa 细胞相比,具有明显的生长抑制现象。

综上所述,二甲双胍能够抑制转有 *LKB1* 基因的 HeLa 细胞增殖并且促进其凋亡,而未转染 *LKB1*

基因的 HeLa 细胞则对二甲双胍敏感性较低,部分肿瘤的发生与 LKB1 突变失活密切相关,在对肿瘤进行靶向治疗时需充分的对病人的基因分型进行分析,有针对性的应用靶向药物,才能获得更好的治疗

效果。本研究为二甲双胍靶向 LKB1 突变的相关肿瘤的治疗提供了实验依据,为二甲双胍抗肿瘤的临床应用提供了可靠的指导方案。

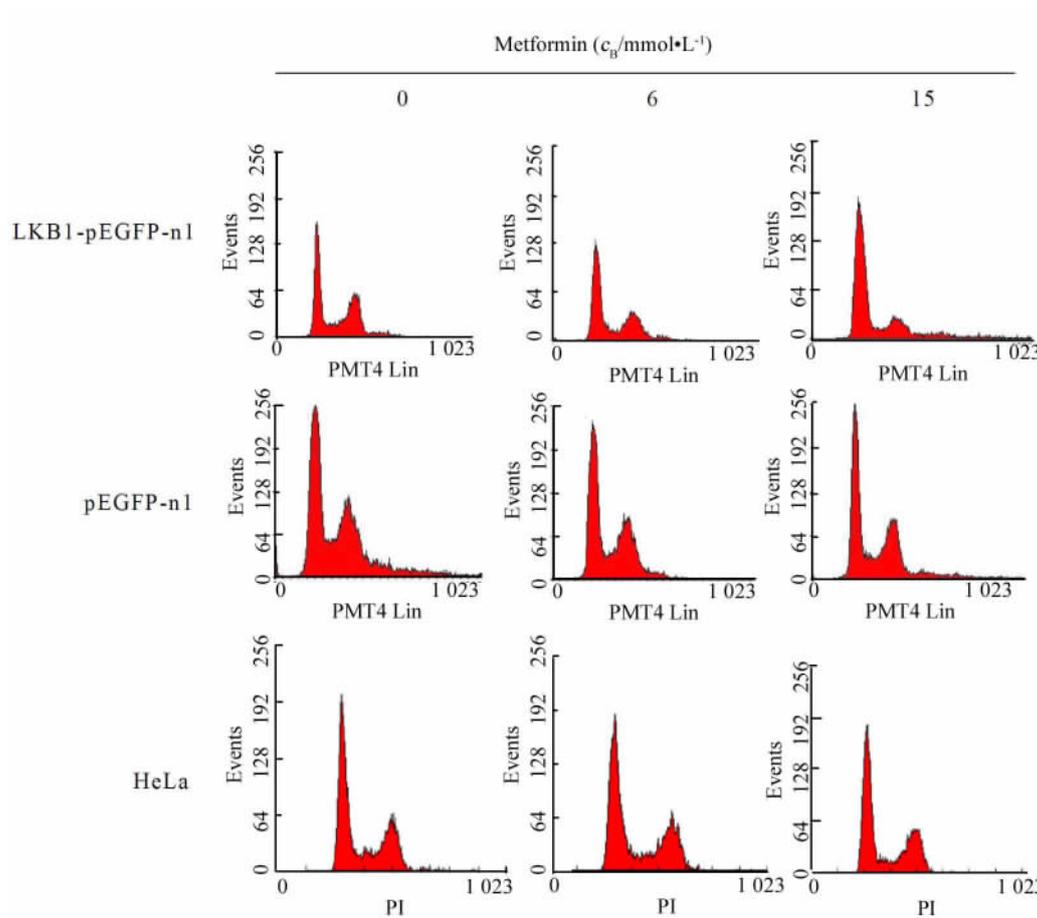


图 8 二甲双胍对不同组的 HeLa 细胞周期的影响

Fig.8 Effect on cell cycle of HeLain different groups which treated by Metformin

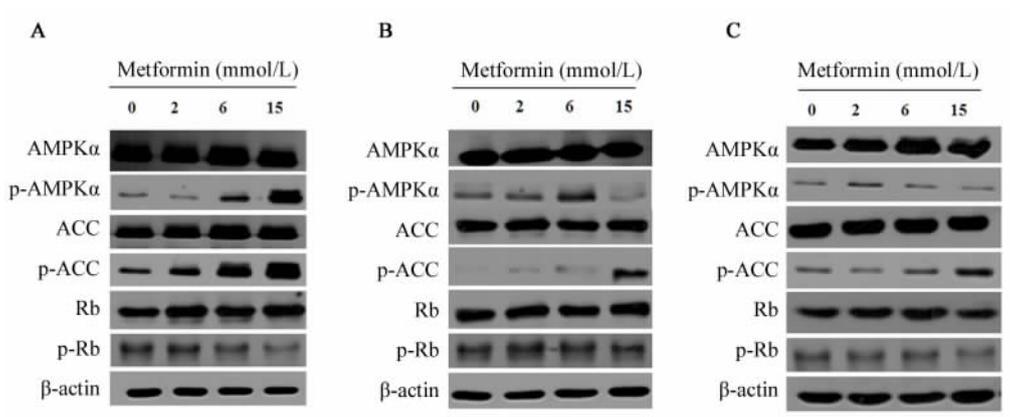


图 9 二甲双胍对 HeLa 细胞中 AMPK、ACC 及 Rb 等蛋白的表达及其磷酸化水平的影响

Fig.9 Effect of metformin on the expression and phosphorylation of AMPK, ACC and Rb in HeLa cells

A: LKB1-pEGFP-n1 group; B: pEGFP-n1 group; C: HeLa cells group

[参考文献]

- [1] Mahoney CL, Choudhury B, Davies H, et al. *LKB1*/KRAS mutant lung cancers constitute a genetic subset of NSCLC with increased sensitivity to MAPK and mTOR signalling inhibition [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(2): 370-375.
- [2] Green AS, Chapuis N, Lacombe C, et al. *LKB1*/AMPK/mTOR signaling pathway in hematological malignancies: From metabolism to cancer cell biology [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(13): 2115-2120.
- [3] Shaw RJ, Bardeesy ND, Manning BD, et al. The *LKB1* tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(1): 91-99.
- [4] Baradari AG, Emami Zeydi A, Aarabi M, et al. Metformin as an adjunct to insulin for glycemic control in patients with type 2 diabetes after CABG surgery: A randomized double blind clinical trial [J]. *Pak J Biol Sci*, 2012, 14(23): 1047-1054.
- [5] Simmons D, Walters BN, Rowan JA, et al. Metformin therapy and diabetes in pregnancy [J]. *Med J Aust*, 2004, 180(9): 462-464.
- [6] Gardiner SJ, Begg EJ, Kirkpatrick CM, et al. Metformin, an antidiabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334(1): 206-213.
- [7] Habibollahi P, van den Berg NS, Kuruppu D, et al. Metformin--an adjunct antineoplastic therapy--divergently modulates tumor metabolism and proliferation, interfering with early response prediction by 18F-FDG PET imaging [J]. *J Nucl Med*, 2013, 54(2): 252-258.
- [8] Shen Z, Wen XF, Lan F, et al. The tumor suppressor gene *LKB1* is associated with prognosis in human breast carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2085-2090.
- [9] Foster SS, De S, Johnson LK, et al. Cell cycle- and DNA repair pathway-specific effects of apoptosis on tumor suppression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(25): 9953-9958.
- [10] Tiainen M, Ylikorkala A, Mäkelä TP. Makela growth suppression by *Lkb1* is mediated by a G(1) cell cycle arrest [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(16): 9248-9251.
- [11] Nakada D, Saunders TL, Morrison SJ. Morrison *Lkb1* regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2010, 468(7324): 653-658.
- [12] Delston RB, Harbour JW. Harbour Rb at the interface between cell cycle and apoptotic decisions [J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(7): 713-718.
- [13] Lizcano JM, 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.
- [14] Wei C, Bhattaram VK, Igwe J, et al. The *LKB1* tumor suppressor controls spindle orientation and localization of activated AMPK in mitotic epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41118.
- [15] Sung YH, Kim HJ, Lee HW. Lee Identification of a novel Rb-regulated gene associated with the cell cycle [J]. *Mol Cells*, 2007, 24(3): 409-415.
- [16] Lee TC, Almeida D, Claros N, et al. Cell cycle-specific and cell type-specific expression of Rb in the developing human retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(12): 5590-5598.
- [17] Zhang Y, Wang Y, Bao C, et al. Metformin interacts with AMPK through binding to gamma subunit [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 368(1/2): 69-76.
- [18] Seeliger H, Guba M, Kleespies A, et al. Role of mTOR in solid tumor systems: A therapeutical target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(3/4): 611-621.
- [19] Proud CG. mTOR signalling in health and disease [J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39(2): 431-436.
- [20] Inoki K, Ouyang H, Zhu T, et al. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth [J]. *Cell*, 2006, 126(5): 955-968.
- [21] Feng Z, Hu W, de Stanchina E, et al. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: Stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(7): 3043-3053.

[收稿日期] 2013 - 10 - 14

[修回日期] 2014 - 02 - 26

[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学实验动物管理实施细则》，本刊对论文中有关实验动物的描述，要求写清楚以下事项：(1)品种、品系及亚系的确切名称；(2)遗传背景或其来源；(3)微生物检测状况；(4)性别、年龄、体重；(5)质量等级及合格证书编号；(6)饲养环境和实验环境；(7)健康状况；(8)对动物实验的处理方式。

医学实验动物分为四级：一级为普通级；二级为清洁级；三级为无特定病原体(SPF)级；四级为无菌级(包括悉生动物)。省部级课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

(本刊编辑部)