

*B-Myb*稳定过表达H1299细胞株的构建与分析

蔡伟^{1,2} 王义涛^{1,2} 朱远远^{1,2} 王森^{1,2} 朱慧芳^{1,2} 雷云龙^{1,2}
李轶^{1,2} 张莹^{1,2} 张春冬^{1,2*} 卜友泉^{1,2*}

(¹重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016; ²重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

摘要 *B-Myb*是Myb家族的成员之一,在细胞周期和癌变过程中具有重要作用。但其在肺癌中的作用及其分子机制仍不清楚。为了研究*B-Myb*在肺癌中的作用,构建了*B-Myb*稳定过表达的H1299肺癌细胞株。流式细胞术和MTT检测的结果表明,*B-Myb*稳定过表达导致G₁期细胞减少,S期细胞增加进而促进细胞增殖;克隆形成实验及Transwell的结果表明,*B-Myb*稳定过表达显著增强H1299细胞的克隆形成、侵袭及迁移能力。定量RT-PCR检测结果表明,*B-Myb*稳定过表达显著提高了细胞周期基因*CCNA1*的表达水平;对*CD97*和*MTSSI*等细胞运动相关下游基因的表达则无明显影响。该研究成功构建了*B-Myb*稳定过表达细胞株,发现了*B-Myb*过表达可促进肺癌细胞的增殖、侵袭迁移及克隆形成能力,为进一步研究奠定了基础。

关键词 *B-Myb*; 细胞周期; 细胞增殖; 侵袭; 迁移; 肺癌

Establishment and Analysis of Lung Cancer Cells H1299 with Stable *B-Myb* Over-expression

Cai Wei^{1,2}, Wang Yitao^{1,2}, Zhu Yuanyuan^{1,2}, Wang Sen^{1,2}, Zhu Huifang^{1,2}, Lei Yunlong^{1,2},
Li Yi^{1,2}, Zhang Ying^{1,2}, Zhang Chundong^{1,2*}, Bu Youquan^{1,2*}

(¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, ChongQing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Molecular Medicine and Cancer Research Center, ChongQing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract *B-Myb* is one of members of the Myb family, and it plays critical roles in both cell cycle and cancer development. However, the role and molecular mechanism of *B-Myb* in lung cancer were still unclear. To investigate the role of *B-Myb* in lung cancer, H1299 cells with stable *B-Myb* over-expression were established. FACS and MTT results showed that stable over-expression of *B-Myb* led to decreased percentage of G₁ phase cells, increased percentage of S phase cells and subsequently promoted cell proliferation. Colony formation assay and Transwell assay indicated that stable over-expression of *B-Myb* significantly enhanced the colony formation, invasion and migration abilities of H1299 cells. Quantitative RT-PCR results also demonstrated that *B-Myb* over-expression significantly up-regulated the expression of cell cycle related gene *CCNA1*. There were no significant changes in the expression of cell motility related downstream genes such as *CD97* and *MTSSI*. Taken together, we have successfully established the *B-Myb* stable over-expressed cells and found that over-expression of *B-Myb* can promote proliferation, invasion, migration and colony formation abilities of lung cancer cells.

Key words *B-Myb*; cell cycle; proliferation; invasion; migration; lung cancer

收稿日期: 2014-01-21 接受日期: 2014-03-07

国家自然科学基金(批准号: 81171879、81302263)和重庆市科委自然科学基金(批准号: cstc2013jcyjA10043)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485991, E-mail: zcd308@163.com; Tel: 023-68485991, E-mail: buyqcn@aliyun.com

Received: January 21, 2014 Accepted: March 7, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171879, 81302263) and the Natural Science Foundation Project of Chongqing CSTC (Grant No.cstc2013jcyjA10043)

*Corresponding authors. Tel: +86-23-68485991, E-mail: zcd308@163.com; Tel: +86-23-68485991, E-mail: buyqcn@aliyun.com

网络出版时间: 2014-05-26 15:38 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0021.html>

*Myb*原癌基因的表达产物是一种转录因子,在细胞周期的进程中它可以调节众多细胞周期相关基因的表达^[1]。在脊椎动物中,*Myb*基因家族包括三个成员*A-Myb*、*B-Myb*和*c-Myb*^[1-2]。在哺乳动物中,*A-Myb*和*c-Myb*表达具有组织特异性^[3-5],即只在特定的细胞类型及某个发育时期表达。其中,*c-Myb*高表达于造血系统的细胞,低表达于结肠和脑组织等上皮细胞^[6-7];而*A-Myb*则表达于原始淋巴细胞及生殖系统^[8-9]。*B-Myb*广泛表达于所有增殖的细胞,并且其表达水平与细胞的增殖能力呈正相关;无论是在胚胎干细胞、成体的造血前体细胞或是发育阶段的组织细胞均呈现高度表达^[10-12]。在小鼠胚胎发育过程中,通过转基因敲除*B-Myb*使得囊胚内细胞集落形成受阻,导致小鼠死于胚胎发育早期^[13]。这与*c-Myb*或*A-Myb*敲除后小鼠存活或者源于红细胞形成受阻而导致的胚胎后期致死有着明显的差别^[8,13]。这说明,*B-Myb*在细胞增殖的过程中具有关键作用。

此外,*B-Myb*还与细胞周期、细胞凋亡、衰老以及肿瘤形成等密切相关^[14-15]。在细胞周期过程中,*B-Myb*的表达在mRNA的表达水平及蛋白水平非常一致且具有明显规律性:在G₁期表达量极低,随着G₁/S转变而快速积累,在S期达到峰值^[16-17];这种周期性表达提示,*B-Myb*与细胞周期进程密切相关。大量研究表明,*B-Myb*与肿瘤发生发展也密切相关,如*B-Myb*在乳腺癌、肝癌、卵巢癌和侵袭性的T淋巴瘤中高度表达^[18-23];在晚期神经母细胞瘤中,*B-Myb*同样呈现高量表达且与预后不良密切相关^[24]。对于前列腺肿瘤的研究表明,*B-Myb*在转移性前列腺癌中的表达显著高于未转移前列腺癌^[23]。这些研究表明,*B-Myb*不仅在细胞增殖过程中具有关键作用,在肿瘤的发生发展过程中也具有重要作用,但是对于*B-Myb*诱发恶性肿瘤发生发展的具体分子机制仍不甚清楚,有待深入研究。

肺癌是全球发病率和死亡率最高的一种恶性肿瘤,迄今为止相关文献报道*B-Myb*在肺癌中过表达并与肺癌的发生发展预后等密切相关^[25-27],但是其分子机制尚未见报道。本研究拟通过构建*B-Myb*稳定过表达的H1299肺癌细胞株,分析*B-Myb*过表达对肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响并初步探索其作用机制,为深入研究*B-Myb*在细胞周期和肺癌中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞系H1299为本实验室保存,RPMI1640培养基、胎牛血清和双抗(青霉素+链霉素)均购自Hyclone公司;pBABE.puro.GWrfA-*B-Myb*质粒由美国Charles M Perou教授惠赠;质粒转染试剂Lipofectamine2000购自Invitrogen公司;Transwell小室(Millipore公司);Rabbit polyclonal anti-*B-Myb*(ab89504, Abcam公司);rabbit polyclonal anti-GAPDH(杭州贤至生物有限公司)。二抗Anti-rabbit IgG、HRP-linked Antibody(7074S, Cell Signaling公司)。6孔板、12孔板、24孔板、96孔板均购自Corning公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H1299细胞复苏后传入10 cm培养皿中用RPMI1640完全培养基(含10% FBS和1% PS)于二氧化碳培养箱(37 °C、5% CO₂)静置培养。待细胞生长状态良好且达到85%左右融合度时,用0.25%胰酶(Genview)消化后传代2~3次,取对数期细胞用于实验,细胞以5×10⁵/mL传入6孔板用于质粒转染。

1.2.2 构建pBABE-*B-Myb*-puro稳定过表达H1299细胞株 pBABE.puro.GWrfA-*B-Myb*质粒经转化,筛选,挑取阳性克隆提取质粒并进行测序确认。质粒抽提参见OMEGA说明书。细胞转染:对照组pBABE-puro质粒和pBABE-*B-Myb*-puro质粒按试剂盒说明书进行,H1299细胞提前1 d接种至6孔板中。pBABE-*B-Myb*-puro质粒组:细胞转染后以嘌呤霉素(1.3 μg/mL)筛选4 d后,用极限稀释法将细胞传入96孔板。待细胞长成单个克隆团,用胰酶消化传入24孔板,待细胞贴壁后用含嘌呤霉素(1.3 μg/mL)的RPMI1640完全培养基培养,24孔板中的细胞长到85%左右融合度时用胰酶消化传入12孔板,继续用含嘌呤霉素的RPMI1640完全培养基培养。12孔板中的细胞长到85%左右融合度时传入6孔板,最后传入10 cm培养皿,用含嘌呤霉素的RPMI1640完全培养基继续传代培养;对照组:质粒转染4 d用胰酶消化传入10 cm培养皿,亦用含嘌呤霉素(最适浓度1.3 μg/mL)的RPMI1640完全培养基传代培养,取对数期的细胞进行后续实验。

1.2.3 提取总RNA及荧光定量PCR检测 待细胞长到85%左右融合度时用0.25%胰酶消化,取1 mL细胞悬液加到1.5 mL离心管中用于提取总RNA。用Total RNA Kit I(OMEGA)提取细胞总RNA,经

NanoDrop Spectrophotometer(Invitrogen公司)测定 D_{260}/D_{280} 比值和浓度;再用PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa公司)把TotalRNA逆转录为cDNA,将cDNA稀释20倍作为模板;用SYBR[®] Premix Ex Taq[™](Perfect Real Time, TaKaRa公司)进行定量PCR检测,反应体系为10 μ L。扩增程序为95 $^{\circ}$ C预变性10 s;94 $^{\circ}$ C变性5 s,60 $^{\circ}$ C退化15 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,共40个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[28]计算靶基因的相对mRNA表达水平。检测相关基因引物序列见表1。

1.2.4 总蛋白提取及Western blot检测 *B-Myb*稳定过表达组和对照组的细胞用胰酶消化后全部收集于1.5 mL离心管中,用PBS清洗3次,加入100 μ L蛋白裂解液和1 μ L PMSF(碧云天生物科技有限公司)于冰上裂解30 min。以1 4000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心12 min,收集上清,用BCA蛋白检测试剂盒(Thermo公司)进行蛋白定量。Western blot检测细胞样品中*B-Myb*的蛋白

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 List of primer sequences used for qPCR analysis

基因名称	引物序列
Gene names	Primer sequences
<i>B-Myb</i>	F1067: 5'-AGAAAC GAG CCT GCCTGC CTTACA-3' R1220: 5'-AGA TGG TTC CTC AGG GAG GT-3'
<i>GAPDH</i>	F833: 5'-ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA-3' R1060: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'
<i>CDC2</i>	F64: 5'-GCT CTG ATT GGC TGC TTT GA-3' R248: 5'-TGG CTA CCA CTT GAC CTG TA-3'
<i>CDK2</i>	F531: 5'-CAT TCC TCT TCC CCT CAT CA-3' R703: 5'-CAG GGA CTC CAA AAG CTC-3'
<i>CCNA1</i>	F1560: 5'-CCA GAA ACC CTT GCT GCA TT-3' R1713: 5'-TGA GGG ACA CAC ACA GGT AC-3'
<i>CCNA2</i>	F50: 5'-GAG CGC TTT CAT TGG TCC AT-3' R291: 5'-GAC CCG GCC AAA GAA TAG TC-3'
<i>CCNB1</i>	F796: 5'-TGA GGA AGA GCA AGC AGT CA-3' R1011: 5'-AAC ATG GCA GTG ACA CCA AC-3'
<i>CCND1</i>	F526: 5'-GCA TGT TCG TGG CCT CTA AG-3' R753: 5'-CGT GTT TGC GGA TGA TCT GT-3'
<i>NRP1</i>	F1501: 5'-ACA GGT AGA CTT GGG CCT TC-3' R1694: 5'-CAA CAT CTG TGG GGT TGG TG-3'
<i>MTSSI</i>	F2409: 5'-GAT CCC TGT CAA GAC CCC AA-3' R2591: 5'-GGA AGT GGA GGG TTA ACG GA-3'
<i>CD97</i>	F471: 5'-CCT CAG AAC TCC TCG TGT GT-3' R633: 5'-TGT TCC AGC AGT CCG AGA AT-3'
<i>TGF-βR3</i>	F305: 5'-CAC TTT CCT ATC CCG CAA GC-3' R531: 5'-TCA GGA GGC ACA CAC TTA GG-3'

水平,采用10% SDS-PAGE分离胶电泳分离变性后的30 μ g总蛋白,5%脱脂奶粉中室温封闭90 min。封闭后兔抗*B-Myb*抗体(ab89504, Abcam公司,1:1 000稀释)的稀释液中4 $^{\circ}$ C孵育过夜,孵育结束用TBST(NaCl 0.1% Tween20)摇床上洗膜3次,每次10 min然后把膜条放入HRP标记的羊抗兔二抗(7074S, Cell Signaling公司,1:6 000)稀释液中室温孵育60 min。TBST洗膜3次后,用SuperSignal West Dura发光试剂盒(Thermo Scientific公司)检测。以兔抗GAPDH多克隆抗体作为内参(杭州贤至生物有限公司,1:1 000)。

1.2.5 细胞周期检测 *B-Myb*稳定过表达组和对照组细胞用0.25%胰酶消化后装入离心管低速离心5 min(1 000 r/min),弃去上清液,用灭菌PBS清洗3次。用50 μ L的PBS将细胞重悬混匀,往离心管中缓缓加入预冷的无水乙醇固定10 h,使用流式细胞仪进行周期分析^[28]。

1.2.6 细胞增殖实验 *B-Myb*稳定过表达组和对照组细胞用胰酶消化后,调整细胞浓度为30 000/mL,设立对照组和实验组,每个组分别设立0,24,48,72,96 h五个时间点,每个时间点设三个重复检测孔,每孔加100 μ L细胞悬液。分别在相同的时间点加入10 μ L CCK-8(Dojindo Laboratories Japan)检测试剂,37 $^{\circ}$ C孵育1 h于酶标仪450 nm处检测吸光度值(D)。

1.2.7 侵袭及迁移实验 Matrigel(BD) 100 μ L使用无血清的RPMI1640培养,1:8稀释,取60 μ L稀释液均匀铺到Transwell小室的上室,放入细胞孵箱过夜。从孵箱取出小室,上室加入100 μ L无血清RPMI1640培养基水化30 min,将细胞用胰酶消化后浓度调至 1×10^5 /mL,取100 μ L加到上室,下室加入600 μ L含15% FBS的RPMI1640培养基,放于37 $^{\circ}$ C孵箱24 h后弃去培养基。把小室用甲醇固定、结晶紫染色、PBS清洗,光学显微镜下随机取3~5个视野拍照并计算穿到下室的细胞数量。细胞迁移实验与侵袭的操作过程完全相同,不同之处在于迁移实验小室上室未铺Matrigel。

1.2.8 克隆形成实验 (1)平板克隆:稳定细胞株用胰酶消化后,1 000/mL传入6孔板于CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)静置培养,培养10 d弃去培养基,用甲醇固定30 min,0.25%结晶紫染色15 min。计算克隆数和克隆形成率[(克隆形成数/接种细胞数) \times 100%]。(2)软琼脂克隆:首先配制2 \times RPMI1640培养基(20% FBS,2% PS),1.2%和0.7%的琼脂液,琼脂液高压蒸汽灭菌后保存于40 $^{\circ}$ C水浴锅。1.2%琼脂和2 \times RPMI1640

培养基1:1混合后六孔板每孔加2 mL作为底层琼脂;待底层琼脂自然凝固后,取1 mL 0.7%琼脂和1 mL 2×RPMI1640培养基混合后加入200 μL细胞悬液(细胞浓度 10^3 /mL),混匀,取1 mL加入到底层琼脂的上层。放入孵箱培养14 d,经固定、染色后于光学显微镜下取3~5个视野拍照并计算阳性克隆数(>50个细胞)。

1.2.9 统计分析 每组实验设立3个重复,结果以均值±标准差表示,两组间比较使用SPSS 16.0软件进行独立样本 t 检验, $P<0.05$ 则差别具有统计学意义。

2 结果

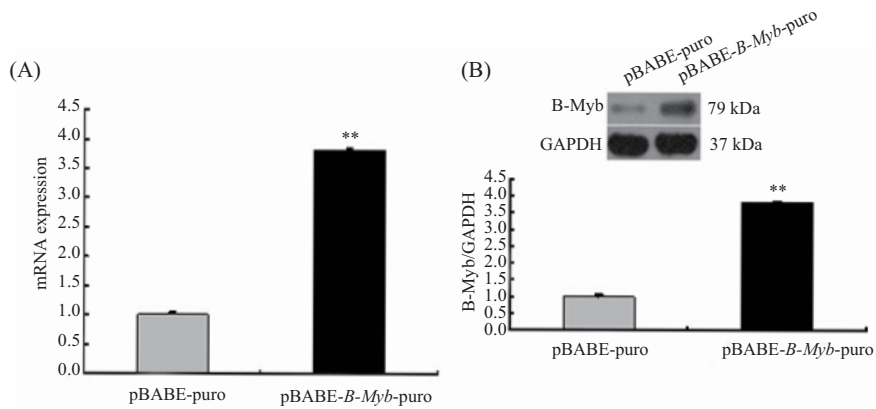
2.1 稳定细胞株中*B-Myb*的mRNA及蛋白表达水平分析

获得*B-Myb*稳定过表达肺癌H1299细胞株后,

待细胞长至85%以上融合度时收集细胞,提取总RNA及总蛋白,且通过荧光定量PCR技术和Western blot检测*B-Myb*的表达水平。本实验一共筛得4株稳定细胞,我们均进行了荧光定量PCR和Western blot检测,选取表达量最高的一株(编号20138152)用于后续实验。结果如图1所示,*B-Myb*稳定过表达细胞株中mRNA及蛋白水平均显著高于对照组($P<0.001$)。这表明,*B-Myb*在肺癌H1299细胞中实现稳定过表达,可以用于后续实验并进行分析。

2.2 *B-Myb*稳定过表达对细胞周期和增殖的影响

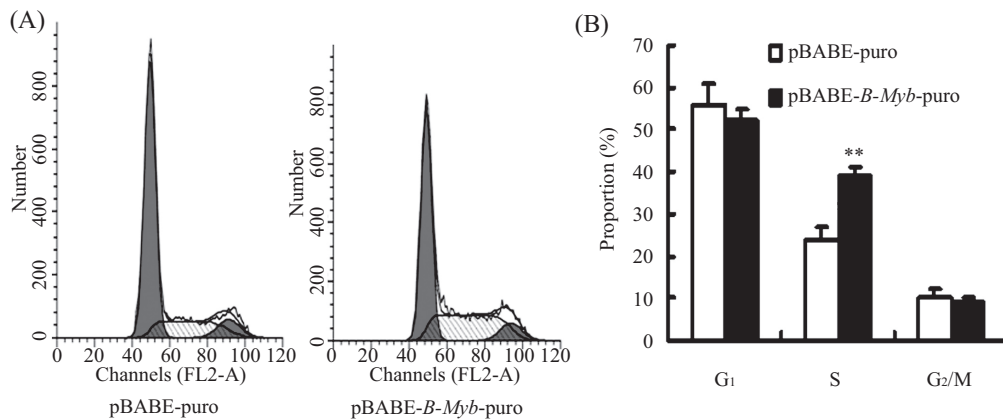
实验首先分析了*B-Myb*稳定过表达后对肺癌H1299细胞周期和细胞增殖的影响。流式细胞检测结果表明,与对照组细胞相比,*B-Myb*稳定过表达细胞的G₁期细胞比例减少,而S期细胞比例显著增加($P<0.001$,图2),但G₂/M期细胞比例无显著变化;



A: 荧光定量PCR检测稳定细胞株*B-Myb*的mRNA水平; B: Western blot检测稳定细胞株*B-Myb*的蛋白表达水平。** $P<0.001$,与对照组比较。
A: the level of *B-Myb* mRNA in stable cell line was detected by Real time-PCR; B: the level of *B-Myb* in stable cell line was detected by Western blot. ** $P<0.001$ vs control group.

图1 稳定细胞株中*B-Myb*表达水平分析

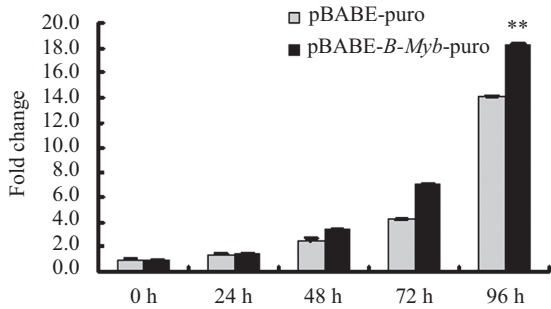
Fig.1 Determination of *B-Myb* expression levels in stable cell line



A: 流式细胞图; B: 统计分析图。** $P<0.001$,与对照组比较。
A: flow cytometry graph; B: statistical analysis diagram. ** $P<0.001$ vs control group.

图2 *B-Myb*稳定过表达对细胞周期的影响

Fig.2 The effect of *B-Myb* stable over-expression on cell cycle



** $P < 0.001$, 与对照组比较。

** $P < 0.001$ vs control group.

图3 *B-Myb*稳定过表达对细胞增殖的影响

Fig.3 The effect of *B-Myb* stable over-expression on cell proliferation

MTT检测结果显示,从48 h到96 h, *B-Myb*稳定过表达细胞组的增殖能力明显强于对照组(图3)。这表明, *B-Myb*稳定过表达能够增强细胞周期 G_1/S 期转换,从而促进肺癌细胞增殖。

2.3 *B-Myb*稳定过表达对细胞侵袭及迁移能力的影响

进一步通过Transwell实验检测*B-Myb*稳定过表达对肺癌细胞的侵袭及迁移的影响。结果表明, *B-Myb*稳定过表达实验组穿到Transwell小室下室的细胞数明显多于对照组(图4, $P < 0.001$)。这一结果提示, *B-Myb*稳定过表达显著促进了肺癌细胞的侵袭及迁移能力。

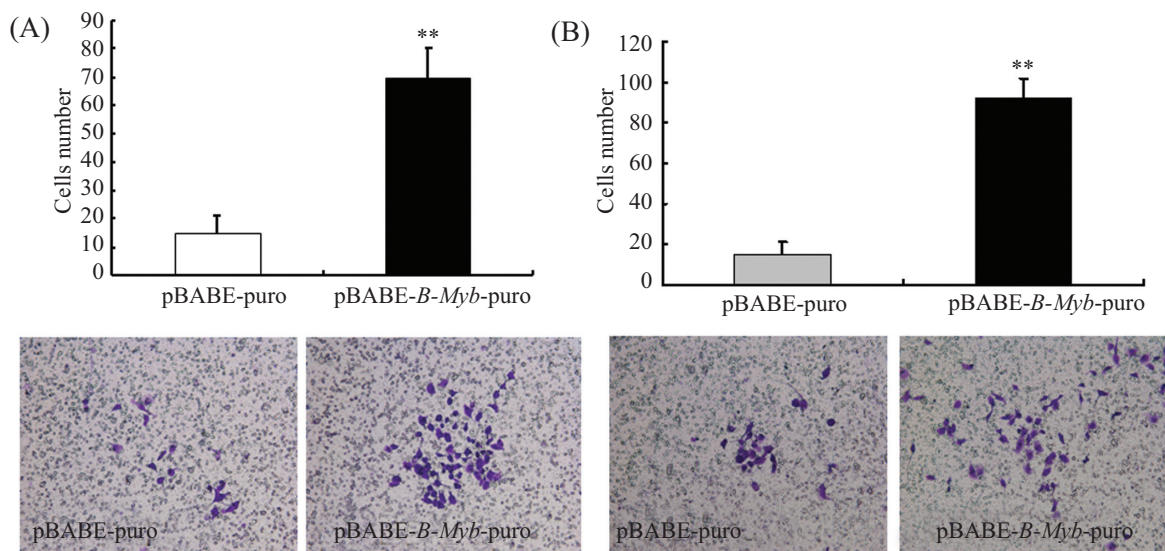
2.4 *B-Myb*稳定过表达对肺癌细胞克隆形成能力的影响

的影响

通过平板克隆及软琼脂克隆形成实验检测*B-Myb*稳定过表达对肺癌细胞克隆形成能力的影响。结果表明, *B-Myb*稳定过表达实验组的克隆形成率、细胞克隆数量及克隆团的大小均明显高于对照组(图5, $P < 0.001$)。这一结果提示了*B-Myb*稳定过表达促进了肺癌细胞的增殖和克隆形成能力,可能具有促进肺癌发生发展的作用。

2.5 *B-Myb*稳定过表达对下游靶基因的影响

鉴于*B-Myb*稳定过表达可促进肺癌细胞的S期进程、侵袭及迁移能力,我们又通过定量RT-PCR检测*B-Myb*稳定过表达的H1299细胞株中细胞周期及运动相关基因的表达水平,以期初步探索*B-Myb*调节肺癌细胞周期进程、侵袭及迁移的分子机制。结果表明, *B-Myb*稳定过表达后,细胞周期相关基因*CCNA1*明显上调($P < 0.001$, 图6A), *CDC2*、*CDK2*、*CCND1*和*CCNB1*则无明显变化(图6A),这5个基因为公认的细胞周期调控基因且可能受*B-Myb*的直接调控^[29-31];而运动相关基因*TGF- β 3*和*NRP1*轻度上调, *CD97*和*MTSS1*则无明显变化(图6B)。有文献报道这4个基因与细胞运动能力密切相关且也可能受*B-Myb*的直接调控^[32]。本结果提示, *B-Myb*在肺癌细胞中可能通过对靶基因*CCNA1*的调节促进了细胞周期S期的进程,从而促进了肺癌细胞增殖;而所选的几个细胞运动相关基因的转录水平均无明显变化,

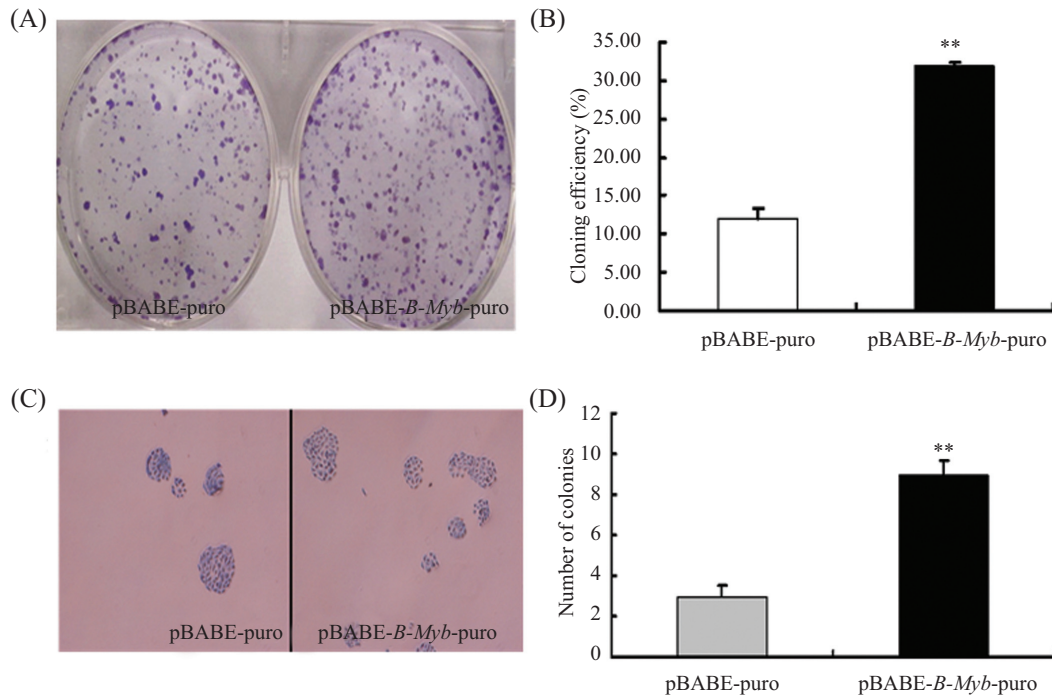


A: 侵袭实验; B: 迁移实验。 ** $P < 0.001$, 与对照组比较。

A: cell invasion assay; B: cell migration assay. ** $P < 0.001$ vs control group.

图4 *B-Myb*稳定过表达对肺癌细胞侵袭及迁移能力的影响

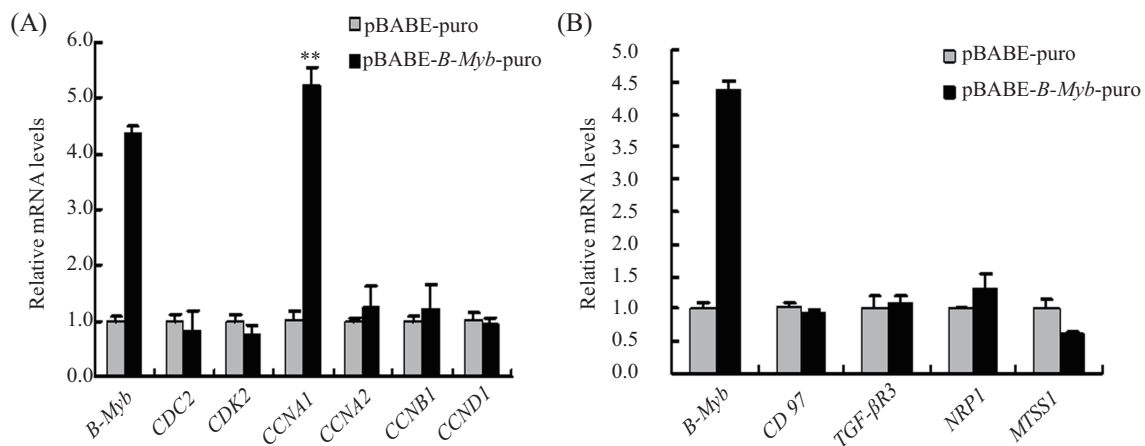
Fig.4 The effect of *B-Myb* stable over-expression on cell invasion and migration



A、B: 为平板克隆, 6孔板每孔铺2 000细胞, 培养10 d后收细胞固定染色, 拍照计数克隆数量并计算克隆形成率。把结果进行统计分析; C、D: 为软琼脂克隆, 克隆长成后结晶紫染色, 于光学显微镜下每个孔取3~5个视野拍照并计算阳性克隆数(>50细胞)。** $P < 0.001$, 与对照组比较。
A,B: dish colony formation assay. 2 000 cells were seeded onto each well of 6-cell plate, and then fixed and stained after 10 days culture. Colonies were photographed and calculated; C,D: soft agar colony formation assay. Crystal violet was used for staining. Colonies were photographed and calculated under microscope (>50 cells). ** $P < 0.001$ vs control group.

图5 *B-Myb*稳定过表达后对肺癌细胞克隆形成能力的影响

Fig.5 The effect of *B-Myb* stable overexpression on cell clone formation



A: 周期相关基因的表达水平; B: 运动相关基因的表达水平。** $P < 0.001$, 与对照组比较。
A: the expressions of cell cycle related genes; B: the expressions of motility-related genes. ** $P < 0.001$ vs control group.

图6 *B-Myb*稳定过表达对周期及运动相关基因表达的影响

Fig.6 The effect of *B-Myb* over-expression on expression of cell cycle and motility related genes

提示*B-Myb*可能是通过对其他运动相关基因的调节来促进肺癌细胞的侵袭及迁移能力。

3 讨论

*B-Myb*是转录因子*Myb*家族的成员之一, 在哺乳动物中广泛表达于增殖细胞。*B-Myb*在细胞周期

进程中呈现周期性表达, *B-Myb*在S期积累并且通过转录调控靶基因的表达调控细胞周期和细胞增殖。同时, 研究表明*B-Myb*是一个重要的肿瘤相关基因, 其在乳腺癌、肝癌和卵巢癌等恶性肿瘤中高表达, 且*B-Myb*的表达与肿瘤愈后呈负相关^[18-23]。因此, *B-Myb*不仅对于细胞增殖具有关键作用, 而且在

肿瘤的发生发展过程中也具有重要作用。

迄今为止,大量研究数据证明,*B-Myb*同时参与细胞周期进程和肿瘤的发生发展,但对于*B-Myb*在肺癌中的作用和分子机制仍不清楚。为了解析*B-Myb*稳定过表达促进肺癌细胞增殖和侵袭迁移能力的分子机制,本研究构建了*B-Myb*稳定过表达的肺癌H1299细胞株,并实现了*B-Myb*的稳定过表达。流式细胞检测及MTT分析结果表明,*B-Myb*稳定过表达促进了细胞周期S期的进程,从而促进了肺癌细胞生长增殖。这与文献报道*B-Myb*在细胞增殖及肿瘤发生中的作用是一致的,即在细胞增殖过程中*B-Myb*是S期重要的阳性调控因子^[14]。定量RT-PCR检测*B-Myb*稳定过表达细胞中S期和G₂/M期细胞周期相关基因的表达,结果表明,在*B-Myb*稳定过表达细胞中S期相关基因*CCNA1*的表达水平显著升高,而其它G₁期和G₂/M期相关基因及相关激酶的表达水平则无显著差异。细胞周期进程是一个受到精密调控的级联反应过程,多种重要的蛋白因子参与其中;而S期和G₂/M期最主要的阳性调控蛋白为细胞周期素CCNE、CCNA及CCNB和周期蛋白依赖性激酶CDK2与CDK1^[29-31]。研究表明,在S期细胞中*CCNA1*能够与CDK2激酶形成复合物从而调节细胞S期进程^[33];同时,*B-Myb*为S期重要的转录调控因子,通过激活相关靶基因的转录促进细胞周期S期进程^[1,12]。我们的研究结果与文献报道的吻合,提示*B-Myb*在肺癌细胞中可能通过对靶基因*CCNA1*的调节来促进细胞周期S期的进程,从而促进了肺癌细胞生长增殖。*B-Myb*是否是直接调控*CCNA1*促进细胞增殖,有待采用ChIP、EMSA等实验予以验证。

恶性肿瘤的显著特点为细胞增殖不受限及细胞的侵袭迁移能力显著增加^[18-21],我们的研究结果表明,*B-Myb*稳定过表达能够显著增强肺癌H1299细胞的侵袭迁移能力。因此,*B-Myb*稳定过表达H1299细胞系可能是一个研究*B-Myb*促进恶性肿瘤细胞侵袭迁移分子机制的细胞模型。定量RT-PCR检测细胞运动相关基因*TGF-β3*、*NRP1*、*CD97*和*MTSSI*的mRNA表达水平,有文献报道这4个基因与细胞运动能力密切相关且可能受*B-Myb*的直接调控^[32]。结果显示,我们所选的几个代表性的细胞运动相关基因除*TGF-β3*、*NRP1*轻度上调,*CD97*和*MTSSI*则无明显变化。我们的研究结果与文献报道*B-Myb*在侵袭转移能力强的恶性肿瘤中呈现高表达^[22-24]是一致

的,但是*B-Myb*可能是通过对其他细胞运动相关基因的调节来促进肺癌细胞的侵袭及迁移能力,这一假设有待进一步研究。

综上所述,我们构建并鉴定了*B-Myb*稳定过表达的肺癌H1299细胞株,证明了*B-Myb*稳定过表达能促进肺癌细胞的增殖、克隆形成和侵袭迁移能力,并初步阐明了*B-Myb*促进肺癌细胞周期进程和增殖的分子机制,为后续相关研究奠定了坚实的基础。

参考文献 (References)

- Joaquin M, Watson RJ. Cell cycle regulation by the *B-Myb* transcription factor. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(11): 2389-40.
- Oh IH, Reddy EP. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* 1999; 18(19): 3017-33.
- Roussel M, Saule S, Lagrou C, Rommens C, Beug H, Graf T, *et al.* Three new types of viral oncogene of cellular originspecific for haematopoietic cell transformation. *Nature* 1979; 281(5731): 452-5.
- Shen-Ong GL. The myb oncogene. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032(1): 39-52.
- Nomura N, Takahashi M, Matsui M, Ishii S, Date T, Sasamoto S, *et al.* Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, A-myb and *B-Myb*. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(23): 11075-89.
- Shin DH, Lee HW. Constitutive expression of c-myb mRNA in the adult rat brain. *Brain Res* 2001; 2(1): 203-7.
- Zorbas M, Sicurella C, Bertocello I, Venter D, Ellis S, Mucenski M, *et al.* *c-Myb* is critical for murine colon development. *Oncogene* 1999; 18(42): 5821-30.
- Toscani A, Mettus RV, Coupland R, Simpkins H, Litvin J, Orth J, *et al.* Arrest of spermatogenesis and defective breast development in mice lacking A-myb. *Nature* 1997; 386(6626): 713-7.
- Trauth K, Mutschler B, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Klempnauer KH. Mouse A-myb encodes a trans-activator and is expressed in mitotically active cells of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes. *EMBO J* 1994; 13(24): 5994-6005.
- Sitzmann J, Noben-Trauth K, Kamano H, Klempnauer KH. Expression of *B-Myb* during mouse embryogenesis. *Oncogene* 1996; 12(9): 1889-94.
- Tanaka Y, Patestos NP, Maekawa T, Ishii S. B-myb is required for inner cell mass formation at an early stage of development. *J Biol Chem* 1999; 274(40): 28067-70.
- Sala A, Watson R. *B-Myb* protein in cellular proliferation, transcription control, and cancer: Latest developments. *J Cell Physiol* 1999; 179(3): 245-50.
- Mucenski ML, McLain K, Kier AB, Swerdlow SH, Schreiner CM, Miller TA, *et al.* A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 1991; 65(4): 677-89.
- Sala A. B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41(16): 2479-84.
- Martinez I, Dimaio D. *B-Myb*, cancer, senescence, and microRNAs. *Cancer Res* 2011; 71(16): 5370-3.

- 16 Lam EW, Robinson C, Watson RJ. Characterization and cell cycle-regulated expression of mouse B-myb. *Oncogene* 1992; 7(9): 1885-90.
- 17 Lam EW, Bennett JD, Watson RJ. Cell-cycle regulation of human B-myb transcription. *Gene* 1995; 160(2): 277-81.
- 18 Zondervan PE1, Wink J, Alers JC, IJzermans JN, Schalm SW, de Man RA, *et al.* Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non-viral hepatocellular carcinoma: Analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathol* 2000; 192(2): 207-15.
- 19 Mao X, Orchard G, Lillington DM, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ. Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T cell lymphomas. *Blood* 2003; 101(4): 1513-9.
- 20 Tanner MM, Grenman S, Koul A, Johannsson O, Meltzer P, Pejovic T, *et al.* Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1833-9.
- 21 Forozan F, Mahlamaki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, *et al.* Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: A basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res* 2000; 60(16): 4519-25.
- 22 Skotheim RI, Monni O, Mousses S, Fossa SD, Kallioniemi OP, Lothe RA, *et al.* New insights into testicular germ cell tumorigenesis from gene expression profiling. *Cancer Res* 2002; 62(8): 2359-64.
- 23 Bar-Shira A, Pinthus JH, Rozovsky U, Goldstein M, Sellers WR, Yaron Y, *et al.* Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Res* 2002; 62(23): 6803-7.
- 24 Raschella G, Cesi V, Amendola R, Negroni A, Tanno B, Altavista P, *et al.* Expression of B-myb in neuroblastoma tumors is a poor prognostic factor independent from MYCN amplification. *Cancer Res* 1999; 59(14): 3365-8.
- 25 Hibi K1, Liu Q, Beaudry GA, Madden SL, Westra WH, Wehage SL, *et al.* Serial analysis of gene expression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1998; 58(24): 5690-4.
- 26 Long EM, Long MA, Tsigotis M, Gray DA. Stimulation of the murine Uchl1 gene promoter by the *B-Myb* transcription factor. *Lung Cancer* 2003; 42(1): 9-21.
- 27 Amatschek S, Koenig U, Auer H, Steinlein P, Pacher M, Gruenfelder A, *et al.* Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* 2004; 64(3): 844-56.
- 28 Bu Y, Suenaga Y, Okoshi R, Sang M, Kubo N, Song F, *et al.* NFBD1/MDC1 participates in the regulation of G₂/M transition in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 397(2): 157-62.
- 29 Robinson C, Light Y, Groves R, Mann D, Marias R, Watson R. Cell-cycle regulation of *B-Myb* protein expression: Specific phosphorylation during the S phase of the cell cycle. *Oncogene* 1996; 12(9): 1855-64.
- 30 Sala A, Kundu M, Casella I, Engelhard A, Calabretta B, Grasso L, *et al.* Activation of human B-MYB by cyclins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(2): 532-6.
- 31 Ziebold UI, Bartsch O, Marais R, Ferrari S, Klempnauer KH. Phosphorylation and activation of *B-Myb* by cyclin A-Cdk2. *Curr Biol* 1997; 7(4): 253-60.
- 32 Sadasivam S, Duan S, DeCaprio JA. The MuvB complex sequentially recruits *B-Myb* and FoxM1 to promote mitotic gene expression. *Genes Dev* 2012; 26(5): 474-89.
- 33 Malumbres M, Carnero A. Cell cycle dysregulation: A common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res* 2003; 5: 5-18.