

研究论文

MEN1胰岛瘤中细胞周期蛋白cyclin B2高表达的作用和机制

吴婷*, 黄小花

厦门大学医学院基础医学部, 厦门 361005

摘要: 多发性内分泌肿瘤1型(multiple endocrine neoplasia type 1, MEN1)是一种常染色体显性遗传的肿瘤综合征, 患者常表现出多发性的内分泌器官肿瘤, 包括垂体瘤、甲状旁腺瘤和胰岛瘤。抑癌基因*Men1*的突变导致MEN1的发生, 其编码的蛋白为核蛋白menin。Menin可以抑制包括胰岛β细胞在内的内分泌细胞增殖。本文探讨menin通过抑制细胞增殖来抑制MEN1胰岛瘤的可能机制。在基因芯片的分析中, 喂养它莫西酚(tamoxifen)14 d后诱导条件敲除*Men1*的小鼠胰岛中cyclin B2表达上升。免疫荧光的实验显示在小鼠MEN1胰岛瘤的组织切片中, cyclin B2表达量显著增加。细胞水平的研究显示, 在*Men1*敲除的细胞中, cyclin B2表达量上升。以第10位丝氨酸磷酸化的组蛋白H3 (phospho-H3S10)抗体对细胞进行免疫荧光实验, 显示*Men1*敲除的细胞中处于有丝分裂的细胞数增加。以 5×10^4 的密度接种细胞, 在第2天、第4天和第6天的时候分别对细胞计数, 显示*Men1*敲除的细胞增殖加快。相反地, 用shRNA敲低细胞中的cyclin B2, 则细胞中处于有丝分裂的细胞数减少, 细胞增长减慢。染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)分析显示, menin影响了cyclin B2启动子区组蛋白H3第4位赖氨酸的三甲基化水平及组蛋白H3的乙酰化水平, 但不影响组蛋白H3第9位赖氨酸和第27位赖氨酸的三甲基化水平。上述结果提示menin可能通过组蛋白修饰而抑制cyclin B2的表达从而抑制了MEN1胰岛瘤的生长。

关键词: 胰岛瘤; cyclin B2; 有丝分裂; 细胞增殖; menin

中图分类号: R335+.6

The role and mechanism of high expression of cyclin B2 in MEN1 insulinoma

WU Ting*, HUANG Xiao-Hua

Department of Basic Medical Sciences, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) is a dominantly inherited tumor syndrome characterized by development of various combinations of tumors in multiple endocrine glands, including the pituitary, parathyroid or pancreas. MEN1 results from mutations in tumor suppressor gene *Men1*, which encodes nuclear protein menin. Menin has been shown to preferentially repress cell proliferation in endocrine tissues including pancreatic beta cells. Herein, the present study was to explore the potential mechanisms underlying menin in repressing cell proliferation in mice MEN1 insulinoma. In the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), *Ccnb2* (encoding cyclin B2) was up-regulated in pancreatic islets of *Men1*-excised mice after 14-day tamoxifen-feeding. Immunofluorescence with antibody against cyclin B2 revealed that the expression of cyclin B2 was greatly increased in MEN1 insulinoma. In *Men1*^{-/-} cells, *Men1* ablation led to an increase in cyclin B2 expression. Immunofluorescent staining by phospho-H3S10 antibody revealed the increasing number of *Men1*^{-/-} cells in mitosis. Cells were seeded at a density of 5×10^4 , then counted on day 2, 4 and 6, and the cell growth curve revealed *Men1* ablation increased the cell proliferation. In contrast, knockdown of cyclin B2 by shRNA diminished the number of cells in mitosis and reduced cell proliferation. Further, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay indicated that menin affected the histone modification of the promoter of *Ccnb2* by reducing the level of histone H3 lysine 4 tri-methylation (H3K4me3) and histone H3 acetylation but not affecting the level of histone H3 lysine 9 tri-methylation (H3K9me3) or histone H3 lysine 27 tri-methylation (H3K27me3). Our results suggest that menin may inhibit MEN1 insulinoma by suppressing cyclin B2 expression via histone modification.

Key words: insulinoma; cyclin B2; mitosis; cell proliferation; menin

Received 2011-05-06 Accepted 2011-06-16

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (No. 20101211105).

*Corresponding author. Tel: +86-592-2188672; Fax: +86-592-2188680; E-mail: wuting78@yahoo.com.cn

多发性内分泌肿瘤 1 型 (multiple endocrine neoplasia type 1, MEN1) 是一种家族遗传性的肿瘤综合征, 呈常染色体显性遗传, 患者常表现出多发性的内分泌器官肿瘤, 包括垂体瘤、甲状旁腺瘤和胰岛瘤, 偶尔也表现出非内分泌组织的肿瘤^[1, 2]。引起 MEN1 疾病的主要原因是抑癌基因 *Men1* 的突变。突变的 *Men1* 失去了抑制肿瘤的功能。在敲除 *Men1* 的杂合缺失的小鼠体内可产生垂体瘤、甲状旁腺瘤和胰岛瘤, 这在很大程度上模拟了人的 MEN1 疾病^[3-5]。此外, *Men1* 编码的核蛋白 menin 过表达可抑制致癌性 Ras 转化的 NIH3T3 细胞的增殖, 抑制移植到裸鼠体内的肿瘤发生以及抑制胰岛瘤细胞的增殖^[6], 这说明 menin 是肿瘤抑制因子。然而分析 menin 蛋白的氨基酸序列显示其与已知的其它任何基因不存在同源性, 也没有发现任何与抑制肿瘤功能相关的保守结构域, 长期以来对 menin 如何抑制肿瘤发生以及其它功能知之甚少, 因此, 阐明 menin 如何抑制肿瘤发生是目前大家所关注的热点。

Cyclin B 是最早被发现的细胞周期蛋白。在蛙卵母细胞中注射 cyclin B 的 mRNA, 能促进卵母细胞的成熟, 主要是促进了有丝分裂促进因子 (mitotic promoting factor, MPF) 的活性^[7]。抑制 cyclin B 的表达, 则蛙卵母细胞停止分裂^[8]。Cyclin B 高表达促进了细胞周期的进程, 促进了细胞的快速增殖。在一些癌组织中均发现 cyclin B2 的过表达, 如结肠癌^[9]、肺癌^[10]等。本研究旨在揭示 menin 如何修饰 cyclin B2 的表达调控 MEN1 胰岛瘤的生长。

1 材料和方法

1.1 小鼠 *Men1^{fl/fl}* 小鼠及 *Men1^{fl/fl} Cre-ER* 小鼠均由美国宾夕法尼亚大学医学院华先欣教授提供, 用于构建条件敲除 *Men1* 小鼠, 具体方法参考文献^[11]。*Men1^{fl/fl}* 小鼠在 *Men1* 基因的第 3 外显子和第 8 外显子的两侧有 loxP 位点。*Cre-ER* 小鼠由 floxed *Men1* (*Men1^{fl/fl}*, FVB/129Sv) 小鼠和含有 *Cre-ERT2* (129Sv/C57BL6J) 的小鼠杂交产生。

1.2 细胞培养 *Men1^{-/-}* MEF 细胞 (menin 缺失的 MEF 细胞), *Men1^{+/+}* MEF 细胞 (menin 过表达的 MEF 细胞), 其中, *Men1^{-/-}* MEF 细胞来源于 *Men1^{+/+}* 小鼠杂交后 9.5 天的 *Men1^{-/-}* 小鼠胚胎。A549 细胞和 293T 细胞均使用含 10% 胎牛血清的细胞培养基 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco), 加入 100 units/mL 青链霉素 (GIBCO, 15140) 培养。

1.3 试剂 Cyclin B2 shRNA (Open Biosystems, RMM4534); 免疫染色质沉淀 ChIP 试剂盒 (Quick-ChIP™, IMGENEX Corporation); 乙酰化组蛋白 H3 抗体 (17-615, Millipore); H3K4me3 抗体 (17-614, Millipore); 组蛋白 H3 抗体 (ab1791, Abcam); IgG 抗体 (ab46540-1, Abcam); H3K9me3 抗体 (ab1220, Abcam); H3K27me3 抗体 (ab6002, Abcam); menin 抗体 (BL342; Bethyl Laboratories); cyclin B2 抗体 (sc-22776, Santa Cruz); phospho-Histone H3 (Ser 10) 抗体 (9701, Cell Signaling); goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate (Bio-Rad)。

1.4 组织切片免疫荧光染色 制作石蜡切片, 4 μm 厚, 进行常规脱蜡和入水, 用 10% 羊血清在室温下封闭 1 h; cyclin B2 一抗和胰岛素一抗 4 °C 孵育过夜, PBS 洗 2 次, 每次 5 min; 用 PBS 稀释二抗, 同时加入 DAPI, 将混合液加入培养板中, 避光孵育 1 h; 弃二抗, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 用 Fluoro Gel (Electron Microscopy Sciences) 进行封片; 在荧光显微镜下观察并拍照。

1.5 基因芯片分析 对 *Men1^{fl/fl} Cre-ER* 小鼠喂养它莫西酚 (tamoxifen) 14 d 后诱导 *Men1* 在小鼠胰岛细胞中条件敲除 (*Men1^{ΔΔ}*)。收集对照组 *Men1^{fl/fl}* 小鼠及条件敲除组 *Men1^{ΔΔ}* 小鼠的胰岛提取 RNA, 进行 cDNA microarray 分析, 通过基因富集分析 (GSEA) 方法分析 cyclin B2 基因 *Ccnb2* 的表达。

1.6 细胞生长曲线 在第 0 天的时候, 将 MEF 细胞以 5×10^4 的密度接种在 6 孔板 (Corning) 的细胞培养板中, 每个样品平行接种三个, 在第 2 天、第 4 天和第 6 天的时候分别用胰酶 (0.25% trypsin-EDTA, Gibco) 消化细胞, 于细胞计数板上计数。

1.7 Western Blotting RIPA (R0278, Sigma) 裂解液裂解 MEF 细胞, 收集上清; 于 4%~12% Bis-Tris 胶 (NP0321, Invitrogen NuPAGE) 进行电泳, 100 V 电压, 120 min; 电泳结束后进行转膜, 采用 0.2 μm 的 PVDF 膜 (LC2002, Invitrogen), 150 mA 转膜 90 min; 转膜结束后用丽春红进行染色确定转膜效果和蛋白上样量是否一致; 10% 脱脂奶粉的 PBST (含 0.1% Tween20 的 PBS) 进行封闭, 室温 2 h; 用封闭液稀释一抗, 在 4 °C 孵育过夜; 弃一抗, 用 PBST 清洗 3 次, 每次 10 min; 与二抗在室温下孵育 1 h, PBST 清洗 3 次, 每次 10 min; 用 ECL 试剂盒 (RPN2106, GE) 显色, 用 X 光片曝光和显影。

1.8 RNA 提取和 RT-PCR 1 mL TRIzol (Invitro-

gen) 裂解细胞; 加入 0.2 mL 氯仿, 激烈振荡 15 s, 室温孵育 3 min; 在 4 °C, 以 12 000 r/min 离心 5 min; 吸取水相转移到另一个干净的 eppendorf 管中; 加入 1 倍体积的 70% 乙醇, 混匀; 采用 Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) 提取 RNA; 用 RNase-free 的水溶解 RNA; 以 1 µg RNA 为模板, 以 SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 的试剂盒 (18080-051, Invitrogen), 将 RNA 逆转录成第一条链的 cDNA; 以第一条链的 cDNA 为模板, 采用试剂盒 SYBR Green PCR kit (Qiagen) 进行实时定量 PCR (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems), 每个样本平行上三个样, 以 GAPDH 为内参。目的基因 Cyclin B2 的引物序列如下: 上游引物: 5'-GCTCTGCCACCAAAGTGACAAAT-3'; 下游引物: 5'-TCGATCTTGCAGAGCAGAGCATCA-3'。

1.9 细胞免疫荧光染色 将 MEF 细胞以 1.5×10^4 的密度接种在预先放入玻片的 24 孔板的细胞培养板 (Corning) 中, 在 37 °C 细胞培养箱中培养 48 h; 吸去培养基, 用 PBS 轻轻润洗 1 遍, 吸去 PBS; 加入预冷的 pH 7.4 的 PBS 配制的 4% paraformaldehyde (15710, Electron Microscopy Sciences) 固定细

胞, 室温 15 min; 吸去固定液, 用 PBS 洗两次, 每次 5 min; 加入含 0.25% Triton X-100 的 PBS 通透细胞, 室温 10 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加入含有 10% 羊血清的 PBST 封闭, 室温 30 min; 将一抗用封闭液稀释, 加入培养板中, 4 °C 孵育过夜; 弃掉一抗, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 用 PBS 稀释二抗, 同时加入 DAPI, 将混合液加入培养板中, 避光孵育 1 h; 弃二抗, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 用 Fluoro Gel (Electron Microscopy Sciences) 进行封片; 在荧光显微镜下拍照。

1.10 免疫染色质沉淀 (ChIP) 使用 ChIP 试剂盒 (QuickChIP™, IMGENEX Corporation), 按照试剂盒中说明书的步骤进行操作。ChIP 实验中所用到的 4 对 cyclin B2 启动子的引物序列: Cyclin B2-P1: 5'-GAAATGTCAGATTTGGGCGAAGGG-3' 和 5'-AGTGCCAGCAGAACGACTTGAGAT-3'; Cyclin B2-P2: 5'-AGCCAGCCAATCAACGTGCAGAAA-3' 和 5'-TGACGCACTATTGGGTAGACGCAC-3'; Cyclin B2-P3: 5'-TCTACCCAATAGTGCGTCAGC-3' 和 5'-AAGTGCGGACGAGGCACA-3'。

1.11 Cyclin B2 的 shRNA 序列 具体序列见表 1。

表 1. Cyclin B2 的 shRNA 序列
Table 1. shRNA sequences for cyclin B2

shRNA	Sequence
sh1	CCGGGCTTCTCAGATCCTGTATGTA CT CGAGTACATACAGGATCTGAGAAGCTTTTTG
	Sense Antisense
Sh2	CCGGGCGCTTCTCAGATCCTGTATGCTCGAGC AT ACAGGATCTGAGAAGCGCTTTTTG
	Sense Antisense

1.12 统计学分析 两组间的比较用 Student's *t* 检验; 多组间的比较用 one-way ANOVA 分析; $P < 0.05$ 时认为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 条件敲除 *Men1* 的小鼠胰岛细胞中 *Ccnb2* (编码 cyclin B2) 表达增加

对照组 *Men1^{fl/fl}* 小鼠及条件敲除组 *Men1^{ΔA}* 小鼠胰岛 cDNA microarray 分析显示, 条件敲除 *Men1* 的小鼠胰岛细胞中 *Ccnb2* 表达增加 (图 1)。

2.2 Cyclin B2 在小鼠 MEN1 胰岛瘤细胞中表达显著增高

在 *Men1* 基因杂合缺失 (*Men1^{+/-}*) 的小鼠中, 当

小鼠长到约 16 个月大的时候产生了垂体瘤、甲状旁腺瘤和胰岛瘤 (MEN1 肿瘤), 这在很大程度上模拟了人的 MEN1 疾病。本文检测了 MEN1 疾病小鼠的胰岛瘤组织和正常小鼠胰岛组织石蜡切片中 cyclin B2 表达量的变化。用 cyclin B2 抗体 (红色荧光) 和胰岛素抗体 (绿色荧光) 进行免疫荧光实验, 用 DAPI 染细胞核 (蓝色荧光)。与前面的 GSEA 结果一致的是, *Men1* 基因缺失小鼠的胰岛瘤组织中 cyclin B2 的表达量比正常野生型小鼠的胰岛中 cyclin B2 的表达量显著增高 (图 2)。

2.3 细胞中 menin 的过表达抑制了 cyclin B2 的表达

在细胞水平的研究上, 本实验用 Western Blotting 和实时定量 PCR 的方法分别检测 menin 敲除和

menin 过表达的 MEF 细胞中 cyclin B2 的表达量。结果显示在 menin 过表达的 MEF 细胞中 cyclin B2 的蛋白水平 (图 3A) 和 mRNA 水平都受到了显著的抑制 (图 3B)。以 pMX-menin-puro 的质粒包装出逆转录病毒转染 A549 细胞及 293T 细胞, 利用嘌呤

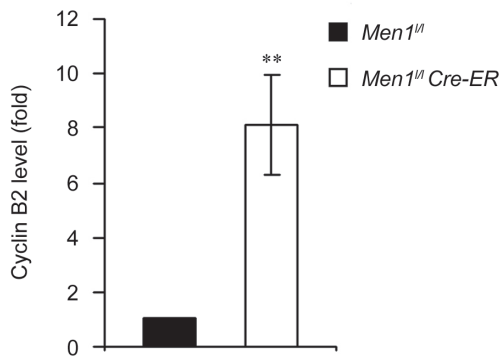


图 1. 基因芯片结果显示敲除 *Men1* 的小鼠胰岛细胞中 *Ccnb2* 表达上调

Fig. 1. *Ccnb2* (encoding cyclin B2) is up-regulated in *Men1*-excised pancreatic islets by Gene Set Enrichment Analysis. Pancreatic islets were isolated from control *Men1^{fl/fl}* ($n = 8$ mice) or *Men1^{fl/fl} Cre-ER* mice ($n = 6$ mice) 14 d after tamoxifen (TAM) feeding and processed for RNA isolation and cDNA microarray analysis. Mean \pm SD, ** $P < 0.01$ vs *Men1^{fl/fl}*.

霉素筛选出稳定过表达 menin 的细胞, 实时定量 PCR 的方法显示 menin 的过表达抑制了细胞中 cyclin B2 的表达 (图 3C 和 3D)。

2.4 MEF细胞中 *Men1* 的敲除促进了细胞的有丝分裂和细胞的生长

组蛋白 H3 第 10 位的丝氨酸的磷酸化 (phospho-H3S10) 是有丝分裂期细胞所特有的标志, 它与细胞有丝分裂期染色质的浓缩密切相关^[12-14]。Menin 的缺失促进了 cyclin B2 的表达, 而 cyclin B2 可以促进细胞的有丝分裂, 因此, 以磷酸化 H3S10 的抗体用于免疫荧光检测 menin 缺失和 menin 过表达的 MEF 细胞中处于有丝分裂期的细胞数是否有区别。随机选取了 5 个 $200 \times$ 显微镜视野下的细胞 (约为 1 000 个细胞) 进行计数和统计分析, 在 menin 缺失的细胞中, 磷酸化 H3S10 阳性的细胞, 即处于有丝分裂期的细胞数约为 2% 左右, 而在 menin 过表达的 MEF 细胞中, 处于有丝分裂期的细胞数不到 1% (图 4A~G)。同时, 细胞生长曲线的结果显示, *Men1* 敲除后, 细胞生长明显增快 (图 4H)。

2.5 MEF细胞中 cyclin B2 的敲低抑制了细胞的有丝分裂和细胞的生长

为了进一步验证 menin 通过抑制 cyclin B2 影响了细胞的有丝分裂及细胞生长, 本实验在敲除

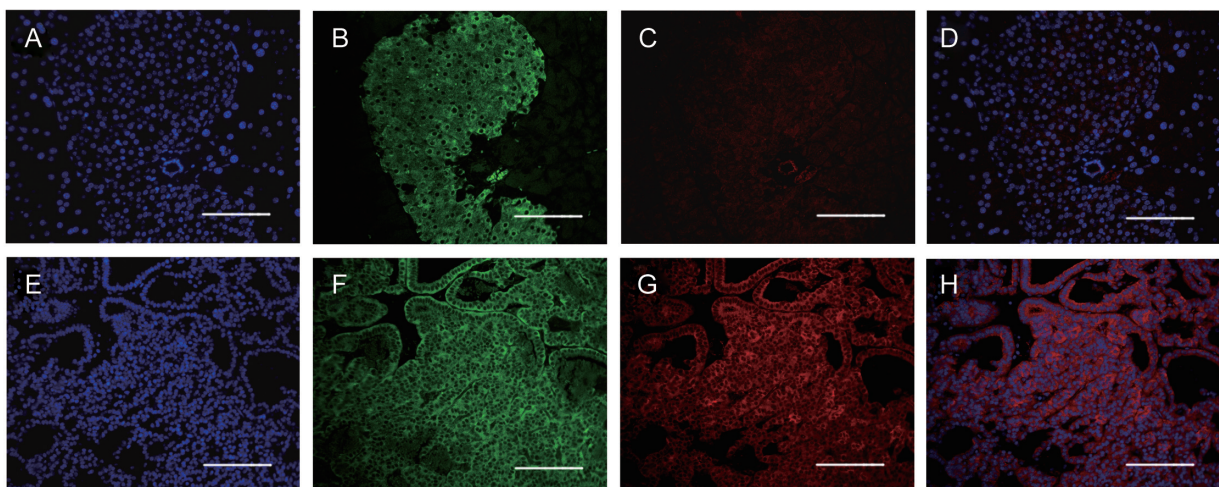


图 2. Cyclin B2 在小鼠 MEN1 胰岛瘤中高表达

Fig. 2. Cyclin B2 is up-regulated in mice MEN1 insulinoma. A: DAPI staining for the nucleus in normal pancreatic islet from wild-type mouse. B: Immunofluorescent staining with insulin antibody in normal pancreatic islet from wild-type mouse. C: Immunofluorescent staining with cyclin B2 antibody in normal pancreatic islet from wild-type mouse. D: Merge of DAPI staining and cyclin B2 antibody staining in normal pancreatic islet from wild-type mouse. E: DAPI staining for the nucleus in mice MEN1 insulinoma. F: Immunofluorescent staining with insulin antibody in mice MEN1 insulinoma. G: Immunofluorescent staining with cyclin B2 antibody in mice MEN1 insulinoma. H: Merge of DAPI staining and cyclin B2 antibody staining in mice MEN1 insulinoma. Scale bar, 100 μ m.

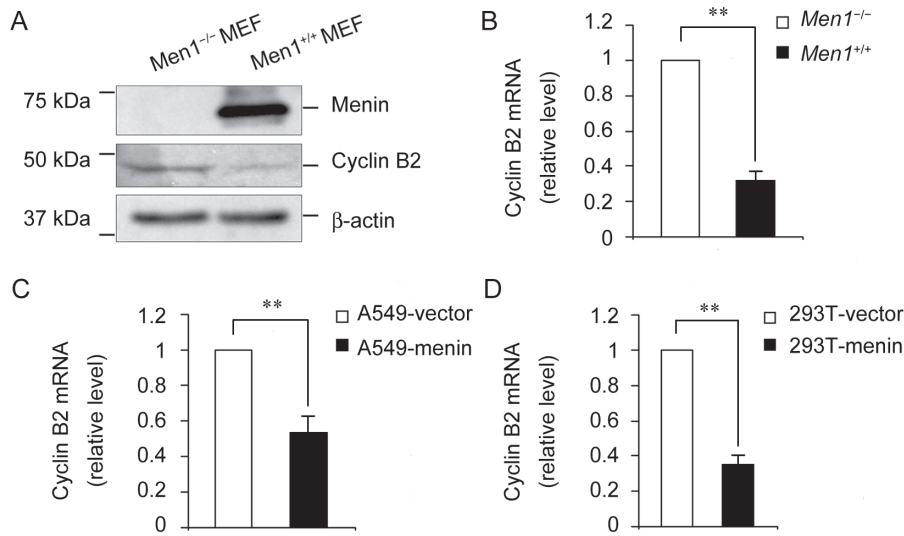


图 3. 细胞中Menin的过表达抑制了cyclin B2的表达

Fig. 3. Over-expression of menin decreases the level of cyclin B2. *A*: Western blotting analysis results in *Men1*^{-/-} and *Men1*^{+/+} MEFs. *B*: qRT-PCR analysis in *Men1*^{-/-} and *Men1*^{+/+} MEFs. *C*: qRT-PCR analysis results in A549 cells and A549 cells over-expressing menin. *D*: qRT-PCR analysis results in 293T cells and 293T cells over-expressing menin. Mean ± SD, *n* = 3; ***P* < 0.01.

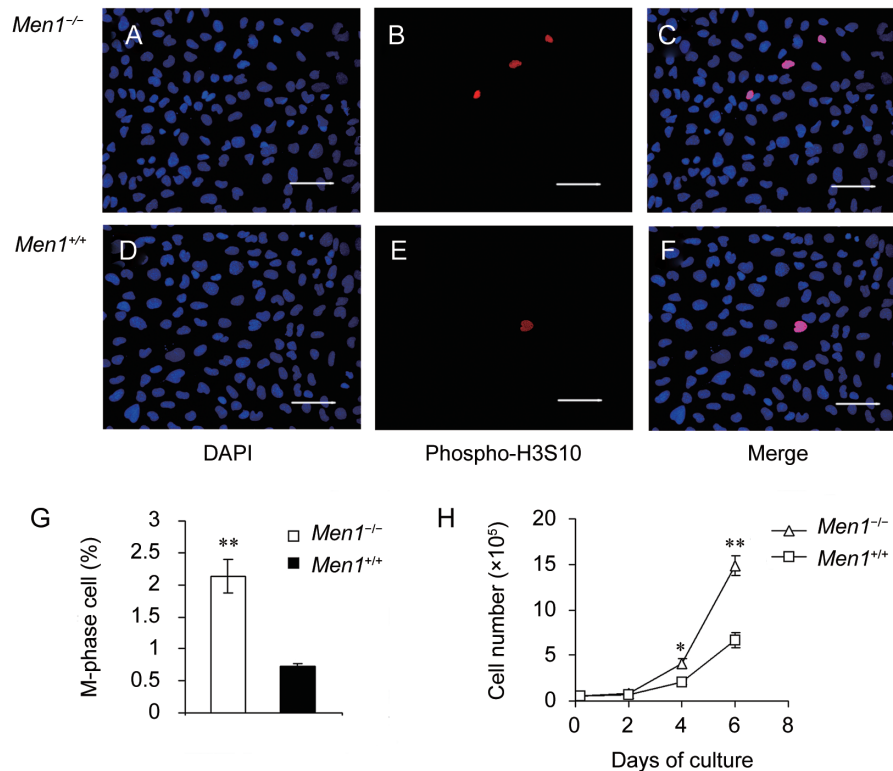


图 4. Menin缺失促进了细胞的有丝分裂和细胞增殖

Fig. 4. Increased percentage of cells in mitosis and cell proliferation in *Men1*^{-/-} MEFs as compared with *Men1*^{+/+} MEFs. *A*: DAPI staining for the nuclear DNA in *Men1*^{-/-} MEFs. *B*: Immunofluorescent staining with phospho-H3S10 antibody in *Men1*^{-/-} MEFs. *C*: Merge of DAPI staining and phospho-H3S10 antibody staining in *Men1*^{-/-} MEFs. *D*: DAPI staining for the nuclear DNA in *Men1*^{+/+} MEFs. *E*: Immunofluorescent staining with phospho-H3S10 antibody in *Men1*^{+/+} MEFs. *F*: Merge of DAPI staining and phospho-H3S10 antibody staining in *Men1*^{+/+} MEFs. *G*: The percentage of mitotic cells in *Men1*^{-/-} MEFs and *Men1*^{+/+} MEFs based on the immunofluorescent staining for histone H3S10 phosphorylation. *H*: Cell growth curve of *Men1*^{-/-} MEFs and *Men1*^{+/+} MEFs. Scale bar, 100 μm. Mean ± SD, *n* = 3; **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs *Men1*^{+/+}.

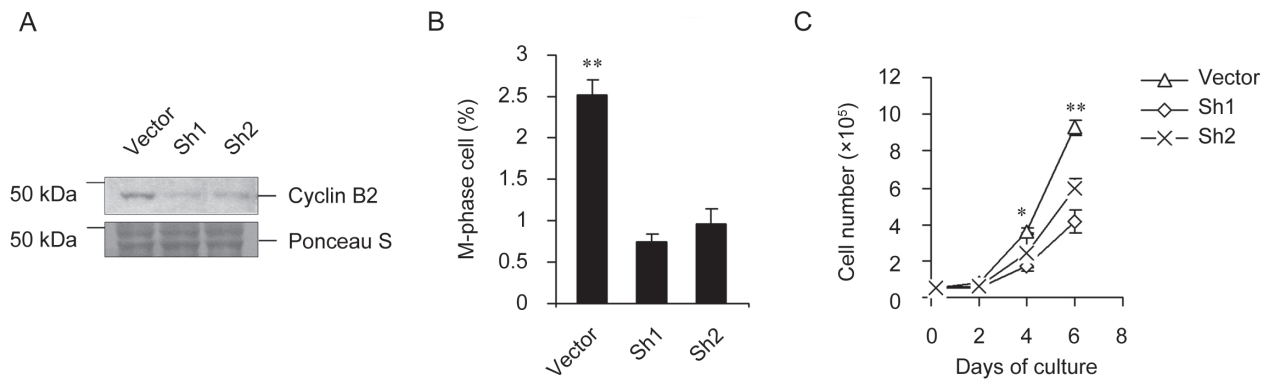


图 5. *Men1*^{-/-} MEF细胞中cyclin B2的敲低抑制了细胞的有丝分裂和细胞的生长

Fig. 5. Decreased percentage of cells in mitosis and cell proliferation in cyclin B2 knock-down *Men1*^{-/-} MEFs. *A*: Western Blotting analysis of cyclin B2 level in the cyclin B2 knock-down cells and control cells. *B*: The percentage of M phase cells in control cells (2.526 ± 0.180) and cyclin B2 shRNA 1 (0.736 ± 0.100) or 2-transduced cells (0.965 ± 0.180), based on immunofluorescent staining for histone H3S10 phosphorylation. Mean \pm SD, $n = 5$. *C*: Cell growth curve of the indicated cells. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sh1 or sh2.

menin 的 MEF 细胞中敲低 cyclin B2 的表达, 以两个独立的构建在 pLKO.1 质粒上的 shRNA (Sh1 和 Sh2) 包装慢病毒, 分别稳定转染 menin 敲除的 MEF 细胞, Western Blotting 检测 cyclin B2 敲低的效果 (图 5A)。免疫荧光检测 cyclin B2 敲低的细胞中处于有丝分裂期细胞数的百分比, 及细胞生长曲线检测细胞的生长速度。结果显示, 在 menin 敲除的细胞中由于 cyclin B2 的敲低, 处于有丝分裂的细胞比例下降 (图 5B), 细胞生长速度也明显下降 (图 5C)。

2.6 在敲低cyclin B2的MEF细胞中重新导入cyclin B2后细胞的生长速度和细胞有丝分裂比例得到了恢复

将表达 cyclin B2 的 pCDNA3 质粒瞬时转染到 cyclin B2 敲低的 MEF 细胞中, Western Blotting 检测 cyclin B2 补充的效果 (图 6A)。细胞生长曲线和免疫荧光实验结果揭示在敲低 cyclin B2 的细胞中重新导入 cyclin B2 后, 细胞的生长速度和细胞有丝分裂比例得到了恢复 (图 6B 和 6C)。为了排除导入质粒本身影响了细胞表现的可能性, 分别比较了在敲低 cyclin B2 的细胞中导入 pCDNA3 空载体和表达 cyclin B2 的 pCDNA3 质粒的细胞生长曲线 (图 6D) 和细胞进入有丝分裂期的比例 (图 6E)。实验结果进一步证明, 导入 cyclin B2 后细胞的生长速度和细胞有丝分裂比例得到了恢复。

2.7 Menin影响了Ccnb2启动子区组蛋白H3某些位点的三甲基化修饰和乙酰化修饰

Menin 可与染色质结合蛋白作用影响组蛋白的修饰从而促进或抑制基因的转录 [15-18]。研究表明

menin 可与甲基转移酶 MLL^[17, 19-24]、EZH2^[25] 和去乙酰基酶等作用影响组蛋白 H3K4、H3K27 及乙酰化等的修饰, 从而影响基因的转录。采用 ChIP 的方法研究 menin 对 *Ccnb2* 转录起始位点附件的启动子区组蛋白 H3 甲基化和乙酰化修饰的影响。在 cyclin B2 启动子上设计了 3 对 PCR 引物用于 ChIP 实验, 其中 P1 位于转录起始位点上游 700 和 800 bp 的位置, P2 和 P3 在转录起始点上游 100 bp 和下游 100 bp 之内。结果显示, 在转录起始位点附近 menin 下调了组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸的三甲基化 (H3K4me3, 图 7A) 和 H3 乙酰化水平 (图 7D), 而对组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸 (H3K9me3, 图 7B) 和第 27 位赖氨酸的三甲基化 (H3K27me3, 图 7C) 的水平没有明显影响。为了排除组蛋白修饰水平的变化可能由组蛋白 H3 在染色体上结合量的改变而引起, 也应用了没有发生任何修饰的组蛋白 H3 的抗体于 ChIP 实验, 实验结果显示, 在 menin 缺失和 menin 过表达的细胞中, 结合在 *Ccnb2* 启动子上的组蛋白 H3 的水平并没有改变 (图 7E), 说明组蛋白修饰水平的变化并不是由于组蛋白结合的变化引起的。同时, 在 ChIP 实验中, 以 IgG 抗体作为阴性对照, 结果见图 7F。

3 讨论

胰岛瘤是 MEN1 中常见的肿瘤。*Men1* 基因编码的蛋白 menin 能有效地抑制细胞的增殖和肿瘤的发生。有研究表明 menin 的敲除促进了细胞周期

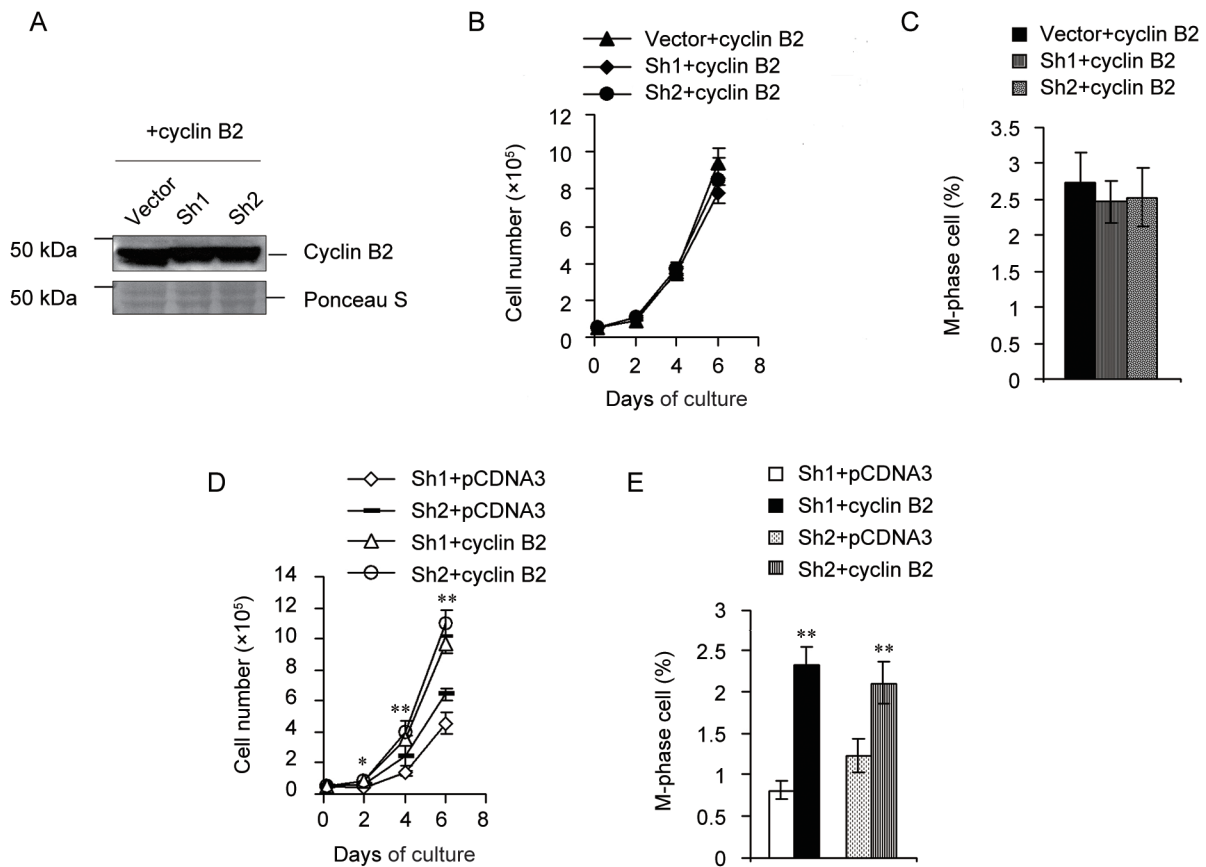


图 6. 在敲低cyclin B2的细胞中重新导入cyclin B2后细胞的生长速度和细胞有丝分裂比例得到了恢复

Fig. 6. Expression of cyclin B2 rescues the phenotype of the shRNA-expressing cells. *A*: Western Blotting analysis of cyclin B2 level in the cyclin B2 knock-down cells and control cells after Fugene-mediated transfection of cyclin B2 cDNA. *B*: Cell growth curve of the indicated cells. *n* = 3. *C*: The percentage of mitotic cells of the indicated cells, based on immunofluorescent staining for histone H3S10 phosphorylation. *n* = 5. *D*: Cell growth curve of the cyclin B2 shRNA1- or shRNA2-knockdown cells that were transfected with either control pCDNA3 or pCDNA3-cyclin B2 cDNA. *n* = 3. *E*: The percentage of M phase cells in cells described in *D*, based on immunofluorescent staining for histone H3 S10 phosphorylation. *n* = 5. Mean \pm SD, **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs sh1(2) + pCDNA3.

G1/S 期的进程和细胞的增殖 [26], 从而促进了胰岛瘤的发生。本研究显示, 在 MEN1 胰岛瘤中 cyclin B2 的表达显著增高; menin 的缺失促进了细胞周期蛋白 cyclin B2 的表达从而促进细胞的有丝分裂和细胞的增殖。结果说明 menin 抑制细胞的增殖是多途径的, 而对细胞周期调控的影响可能是 menin 抑制细胞增殖的重要途径之一。Cyclin B2 是促有丝分裂因子 MPF 的重要组成之一, cyclin B2 表达的抑制会影响 MPF 的活性, 从而使细胞周期 G2/M 期的进程和细胞的有丝分裂受到抑制。为了进一步证实 menin 的缺失通过上调 cyclin B2 的表达而影响细胞的增殖和细胞的有丝分裂, 本实验在 menin 敲除的细胞中进一步敲低 cyclin B2 并检测细胞生

长曲线和细胞有丝分裂的标志物——磷酸化的 H3S10 的表达。在敲低 cyclin B2 的 *Men1*^{-/-} 细胞中, 细胞增殖和细胞的有丝分裂均受到了抑制, 而当瞬时转染补充 cyclin B2 后, 细胞的增殖和有丝分裂的比例又得到了恢复。这些结果均表明 menin 通过抑制 cyclin B2 的表达而抑制了细胞的增殖。此外, 我们推测 menin 还可能影响了其它与细胞周期 G2/M 期相关的因子, 如 p53、CDK1 或者 CDK1 的抑制剂 p21 等。这些机制有待在以后进一步深入探讨。

Menin 的另一个重要的功能是调控基因的转录。Menin 不仅可以促进基因的转录, 还可以抑制基因的转录。研究表明 menin 可与甲基转移酶 MLL 相互作用, 通过上调组蛋白 H3K4 的甲基化水平从而

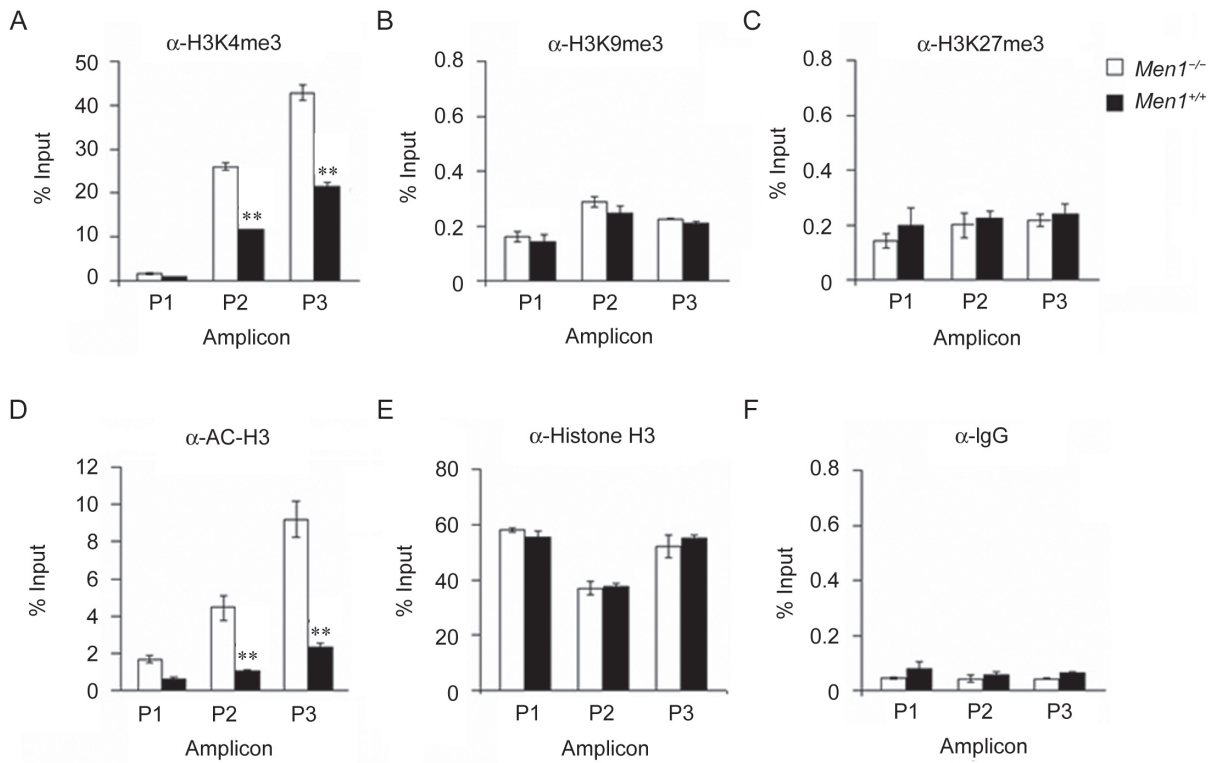


图 7. Menin对*Ccnb2*启动子区组蛋白修饰的影响

Fig. 7. The effect of menin on the *Ccnb2* locus histone modification. A: ChIP assay using antibody of trimethylated H3K4 (H3K4me3) in *Men1*^{-/-} MEFs and *Men1*^{+/+} MEFs. B: ChIP assay using antibody of trimethylated H3K9 (H3K9me3). C: ChIP assay using antibody of trimethylated H3K27 (H3K27me3). D: ChIP assay using antibody of acetylated-histone H3 (AC-H3). E: ChIP assay using antibody of histone H3. F: ChIP assay using antibody of IgG as a negative control. *n* = 3; Mean ± SD, **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs *Men1*^{-/-}.

促进了细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 抑制剂 *p18^{Ink4c}* 和 *p27^{Kip1}* 的表达 [22, 27]。相反, *menin* 通过与去乙酰基转移酶 HDAC 相互作用而抑制 JunD 激活的转录 [28]。本研究显示 *menin* 过表达抑制了 *Ccnb2* 启动子上组蛋白 H3 的乙酰化和 H3K4 的三甲基化, 而对 H3K9 和 H3K27 的三甲基化水平并没有影响。我们推测 *menin* 可能阻碍了乙酰基转移酶和甲基转移酶在 *Ccnb2* 启动子上的结合, 改变了组蛋白的修饰水平, 进而影响了启动子区域染色质的解旋程度, 使得染色质的包装更紧密, 从而使正向调控的转录因子无法有效地和启动子区域结合, 抑制了 *Ccnb2* 的转录。但 *menin* 如何影响 *Ccnb2* 启动子区组蛋白的甲基化和乙酰基化的修饰水平仍需要进一步深入的研究和阐明。

Menin 的缺失会导致包括胰岛瘤在内的多个内分泌器官的肿瘤。而对 *menin* 如何抑制肿瘤发生的机理还不甚清楚。我们的研究揭示了抑癌蛋白

menin 可能通过影响 *Ccnb2* 启动子区组蛋白 H3K4 的三甲基化水平和组蛋白 H3 乙酰化水平抑制了 *cyclin B2* 的转录, 从而抑制细胞的有丝分裂和细胞增殖, 达到抑制 MEN1 肿瘤的效果。这只是 *menin* 抑制肿瘤的可能机制之一, 而全面阐明 *menin* 调节细胞周期、细胞增殖以及抑制 MEN1 肿瘤发生中的关键作用将对治疗 MEN1 疾病及其它相关肿瘤疾病提供重要的理论指导作用。

* * *

致谢: 衷心感谢美国宾夕法尼亚大学医学院华先欣教授为本研究工作提供实验小鼠及相关质粒, 以及为本文的研究设计提供了指导和帮助。

参考文献

- Chandrasekharappa SC, Teh BT. Functional studies of the MEN1 gene. *J Intern Med* 2003; 253(6): 606-615.

- 2 Pannett AA, Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6(4): 449–473.
- 3 Bertolino P, Tong WM, Galendo D, Wang ZQ, Zhang CX. Heterozygous Men1 mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol Endocrinol* 2003; 17(9): 1880–1892.
- 4 Bertolino P, Tong WM, Herrera PL, Casse H, Zhang CX, Wang ZQ. Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res* 2003; 63(16): 4836–4841.
- 5 Biondi CA, Gartside MG, Waring P, Loffler KA, Stark MS, Magnuson MA, Kay GF, Hayward NK. Conditional inactivation of the MEN1 gene leads to pancreatic and pituitary tumorigenesis but does not affect normal development of these tissues. *Mol Cell Biol* 2004; 24(8): 3125–3131.
- 6 Kim YS, Burns AL, Goldsmith PK, Heppner C, Park SY, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ. Stable overexpression of MEN1 suppresses tumorigenicity of RAS. *Oncogene* 1999; 18(43): 5936–5942.
- 7 Westendorf JM, Swenson KI, Ruderman JV. The role of cyclin B in meiosis I. *J Cell Biol* 1989; 108(4): 1431–1444.
- 8 Dagle JM, Walder JA, Weeks DL. Targeted degradation of mRNA in *Xenopus* oocytes and embryos directed by modified oligonucleotides: studies of An2 and cyclin in embryogenesis. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(16): 4751–4757.
- 9 Park SH, Yu GR, Kim WH, Moon WS, Kim JH, Kim DG. NF-Y-dependent cyclin B2 expression in colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3): 858–867.
- 10 Hofmann HS, Hansen G, Burdach S, Bartling B, Silber RE, Simm A. Discrimination of human lung neoplasm from normal lung by two target genes. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(5): 516–519.
- 11 Yang Y, Gurung B, Wu T, Wang H, Stoffers DA, Hua X. Reversal of preexisting hyperglycemia in diabetic mice by acute deletion of the *Men1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(47): 20358–20363.
- 12 Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, Okawa K, Iwamatsu A, Okigaki T, Takahashi T, Inagaki M. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* 1999; 274(36): 25543–25549.
- 13 Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 1997; 106(6): 348–360.
- 14 Preuss U, Landsberg G, Scheidtmann KH. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(3): 878–885.
- 15 Yang Y, Hua X. In search of tumor suppressing functions of menin. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265–266: 34–41.
- 16 La P, Desmond A, Hou Z, Silva AC, Schnepf RW, Hua X. Tumor suppressor menin: the essential role of nuclear localization signal domains in coordinating gene expression. *Oncogene* 2006; 25(25): 3537–3546.
- 17 Yokoyama A, Cleary ML. Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell* 2008; 14(1): 36–46.
- 18 Jin S, Zhao H, Yi Y, Nakata Y, Kalota A, Gewirtz AM. c-Myb binds MLL through menin in human leukemia cells and is an important driver of MLL-associated leukemogenesis. *J Clin Invest* 2010; 120(2): 593–606.
- 19 Caslini C, Yang Z, El-Osta M, Milne TA, Slany RK, Hess JL. Interaction of MLL amino terminal sequences with menin is required for transformation. *Cancer Res* 2007; 67(15): 7275–7283.
- 20 Chen YX, Yan J, Keeshan K, Tubbs AT, Wang H, Silva A, Brown EJ, Hess JL, Pear WS, Hua X. The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(4): 1018–1023.
- 21 Hughes CM, Rozenblatt-Rosen O, Milne TA, Copeland TD, Levine SS, Lee JC, Hayes DN, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Biondi CA, Kay GF, Hayward NK, Hess JL, Meyerson M. Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus. *Mol Cell* 2004; 13(4): 587–597.
- 22 Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, Schnepf RW, Krankel C, Livolsi VA, Gibbs D, Hua X, Roeder RG, Meyerson M, Hess JL. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(3): 749–754.
- 23 Yokoyama A, Somerville TC, Smith KS, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Cleary ML. The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* 2005; 123(2): 207–218.
- 24 Yokoyama A, Wang Z, Wsocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, Herr W, Cleary ML. Leukemia proto-oncogene MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol*

- Cell Biol 2004; 24(13): 5639–5649.
- 25 Gao SB, Feng ZJ, Xu B, Wu Y, Yin P, Yang Y, Hua X, Jin GH. Suppression of lung adenocarcinoma through menin and polycomb gene-mediated repression of growth factor pleiotrophin. *Oncogene* 2009; 28(46): 4095–4104.
- 26 Schnepf RW, Chen YX, Wang H, Cash T, Silva A, Diehl JA, Brown E, Hua X. Mutation of tumor suppressor gene Men1 acutely enhances proliferation of pancreatic islet cells. *Cancer Res* 2006; 66(11): 5707–5715.
- 27 Karnik SK, Hughes CM, Gu X, Rozenblatt-Rosen O, McLean GW, Xiong Y, Meyerson M, Kim SK. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(41): 14659–14664.
- 28 Kim H, Lee JE, Cho EJ, Liu JO, Youn HD. Menin, a tumor suppressor, represses JunD-mediated transcriptional activity by association with an mSin3A-histone deacetylase complex. *Cancer Res* 2003; 63(19): 6135–6139.