基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.004092

基于Tet-on系统的DBN1诱导敲减模型的构建及其对肺癌细胞核形态稳态与衰老的调控作用

胡　星[1]，李　瑶[1]，张　莲[2]，张春冬[1]

（1.重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室，重庆　400016；2.重庆医科大学组织学与胚胎学教研室，重庆　400016）

【摘　要】目的：利用Tet-on慢病毒诱导系统构建发展调节脑蛋白1（developmentally regulated brain protein 1，DBN1）（Drebrin）条件性敲减的肺癌A549细胞模型，探讨DBN1在肺癌恶性表型维持、细胞核形态稳态及细胞衰老中的作用。**方法：**通过UALCAN和基因表达谱交互分析数据库（Gene Expression Profiling Interactive Analysis database，GEPIA）分析DBN1在肺癌中的表达特征及预后价值；构建pInducer10-shDBN1诱导表达系统，筛选并优化Doxy诱导条件；采用蛋白质印迹（Western blot）、克隆形成、划痕实验及β-半乳糖苷酶染色等方法，系统评估DBN1缺失对细胞增殖、迁移、衰老及细胞核形态的影响。**结果：**患者预后不良与肺癌组织中DBN1的异常上调显著相关，临床数据显示该蛋白在癌组织中呈现高丰度表达（$P<0.050$）。成功构建高效、可控的Tet-on诱导敲减模型（4 μg/mL Doxy诱导6 d为最佳条件）。功能实验表明，诱导敲减DBN1明显抑制A549细胞的增殖与迁移（$P<0.010$），并诱发明显的细胞衰老表型［衰老相关分泌表型因子（senescence-associated secretory phenotype factor，SASP）白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）等上调］。免疫荧光显示，DBN1缺失导致F-actin重构异常及核纤层蛋白Lamin A/C分布紊乱，引起细胞核形态扭曲。**结论：**DBN1是肺癌进展的关键促癌因子；本研究通过诱导系统揭示DBN1在维持肺癌细胞核形态稳态及抑制衰老中的新功能，为肺癌靶向“诱导衰老”治疗提供潜在靶点。

【关键词】肺癌；发展调节脑蛋白1；Tet-on系统；细胞衰老

【中图分类号】R734.2　　**【文献标志码】**A

Establishment of a model of developmentally regulated brain protein 1 knockdown based on the Tet-on system and its regulatory effect on nuclear morphological homeostasis and senescence of lung cancer cells

Hu Xing[1]，*Li Yao*[1]，*Zhang Lian*[2]，*Zhang Chundong*[1]

（*1.Department of Biochemistry and Molecular Biology，Chongqing Medical University；*

2.Department of Histology and Embryology，Chongqing Medical University）

【Abstract】*Objective*：To establish a conditional knockdown model of developmentally regulated brain protein 1（DBN1，also known as Drebrin）in human lung cancer A549 cells using the inducible Tet-on lentivirus system，and to investigate the role of DBN1 in maintaining malignant phenotype，preserving nuclear morphological homeostasis，and regulating cellular senescence in lung cancer. ***Methods*：**UALCAN and Gene Expression Profiling Interactive Analysis database were used to analyze the expression characteristics and prognostic value of DBN1 in lung cancer. The pInducer10-shDBN1 inducible expression system was constructed，and doxycycline induction conditions were screened and optimized. Western blot，colony formation assay，wound healing assay，and β-galactosidase staining were used to assess the effect of DBN1 depletion on cell proliferation，migration，senescence，and nuclear morphology. ***Results*：**The poor prognosis of patients was significantly associated with abnormal upregulation of DBN1 in lung cancer tissue，and clinical data showed that this protein was highly abundant in cancerous tissue（$P<0.05$）. An efficient and controllable Tet-on inducible knockdown model was successfully established，with the optimal condition of induction with 4 μg/mL doxycycline for 6 days. Functional experiments showed that inducible knockdown of DBN1 significantly inhibited the proliferation and migration of A549 cells（$P<0.01$）and triggered a pronounced cellular senescence phenotype，accompanied by upregulation of the senescence-associated secretory pheno-

作者介绍：胡　星，Email：huxing1117@outlook.com，研究方向：细胞骨架/肺癌。

通信作者：张春冬，Email：zhangcd@cqmu.edu.cn。

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金资助项目（编号：82403567）。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20260407.1505.006（2026-04-08）

type factors such as interleukin-6 and tumor necrosis factor. Immunofluorescence assay showed that DBN1 depletion resulted in abnormal F-actin remodeling and disrupted distribution of the nuclear lamina proteins Lamin A/C, thereby leading to distorted nuclear morphology. ***Conclusion***: DBN1 is a key oncogenic factor that promotes the progression of lung cancer. By using an inducible knockdown system, this study reveals a novel role of DBN1 in maintaining nuclear morphological homeostasis and inhibiting cellular senescence in lung cancer and provides a potential therapeutic target for senescence-inducing treatment of lung cancer.

【Key words】lung cancer; developmentally regulated brain protein 1; Tet-on system; cellular senescence

肺癌是一种严重危及人类生命的恶性肿瘤，在我国及世界范围内的发病率与死亡率始终居高不下[1-2]。肺癌早期临床表现隐匿，缺乏特异性症状且目前尚无普适性的早期诊断标志物，导致大部分的患者确诊时已处于局部晚期或远处转移阶段[3]。另一方面，肺癌细胞具有高度异质性，且肿瘤微环境驱动的侵袭转移特性突出，进一步加剧了治疗难度[4]。上述问题导致我国肺癌患者5年相对生存率仅约15%~20%，其中晚期患者5年生存率不足5%[2]。因此，深入解析肺癌发生发展的分子机制，挖掘具有临床转化价值的关键治疗靶点，并开发针对性的新型干预策略，已成为改善肺癌患者预后、降低疾病社会负担的迫切需求与核心突破口。

脑发育调节蛋白（developmentally regulated brain protein，Drebrin，DBN1）首次从鸡视顶盖中发现[5]。DBN1基因通过选择性剪接产生2种主要亚型。在成年脑中主要表达的亚型Drebrin A具有神经元特异性，其分子中部含有一段神经元特异性序列插入序列2（insert sequence 2，Ins2）[6]。另一种亚型Drebrin E缺失Ins2序列，广泛存在于多种组织的不同细胞类型[7]。DBN1是一种肌动蛋白结合蛋白[8]，含有多个结构域，包括N端的肌动蛋白解聚因子同源结构域（actin-depolymerizing factor homology domain，ADF-H）、coiled coil结构域、螺旋结构域，C端的脯氨酸富集结构域（proline-rich domain，PP）、Src同源结构域3（Src homology 3 domain，SH3）结构域，通过这些结构域与多种蛋白相互作用，从而调控多种生物学过程[9]。已有研究报道DBN1在胰腺癌、肝癌、胶质瘤以及肺腺癌等多种肿瘤组织中高表达，提示其是参与肿瘤发生发展进程的关键因子[10-14]。但迄今为止，关于DBN1在肺癌中的作用机制仍知之甚少。

本研究关注Drebrin E（DBN1）在肺癌发生发展中的作用。本研究通过建立Doxy响应型的DBN1基因沉默体系，动态观察A549细胞在DBN1表达受限后的增殖动态与迁移轨迹，试图从分子水平阐明DBN1缺失抑制肺癌恶性演进的内在机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

本研究所需的人肺腺癌A549及人胚肾293T细胞均由本实验室保存。细胞培养：胎牛血清、青链霉素及0.25%胰酶购自Hyclone公司；杜氏改良伊格尔培养基（Dulbecco's modified Eagle medium，DMEM）系列（高糖及F12）与改良型极限培养基（Opti-minimal essential medium，Opti-MEM）选购自Gibco。分子生物学：pInducer10-mir-RUP-PheS质粒（#44011）购自Addgene；核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）提取及逆转录试剂分别购自碧云天与TaKaRa；引物由擎科生物合成。蛋白检测分析：放射免疫沉淀分析（radioimmunoprecipitation assay lysis buffer，RIPA）裂解液、苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF）及二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）试剂盒购自鼎国昌盛；十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）制备与细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）检测分别购自雅酶生物与Dojindo的产品；聚偏二氟乙烯膜（polyvinylidene fluoride membrane，PVDF）（0.45 μm）亦购自鼎国昌盛。抗体及其他：DBN1与甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）一抗分别购自Abcam与Proteintech；诱导剂强力霉素（Doxy）购自碧云天。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析DBN1在肺癌中的表达及其表达与预后的关系 采用UALCAN数据库（https://ualcan.path.uab.edu/index.html）分析DBN1信使核糖核酸（messenger ribonucleic acid，mRNA）和蛋白表达水平的差异；采用基因表达谱交互分析数据库（Gene Expression Profiling Interactive Analysis database，GEPIA）（http://gepia.cancer-pku.cn/）分析DBN1表达与患者预后的关系。

1.2.2 细胞培养 在37 ℃、5% CO_2的标准环境下，A549细胞培养于含10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）及1%双抗的DMEM/F12培养基生长，293T细胞则在DMEM高糖体系（添加10%FBS及1%青霉素-链霉素）中常规传代培养。

1.2.3 构建载体及慢病毒包装 本研究所需的DBN1-

shRNA 靶向片段，均参照 Sigma-Aldrich 网站（www.sigmaaldrich.cn）给出的干扰序列设计原则在线获取，DBN1-shRNA 1#：CTGTGGAAATGAAGCGGATTA；DBN1-shRNA 2#：GCGGATTAAGTTCCTGGTCAT；设计针对 DBN1 基因的特异性 miR30-shRNA 序列[15]。由华大基因公司合成 DBN1-shRNA 序列。将合成的序列克隆至 pInducer10 载体。经测序确认后命名为 DBN1-shRNA 1#和 DBN1-shRNA 2#。将重组慢病毒载体（pInducer10）与包装质粒（PLP1、PLP2 和 VSVG）共转染 293T 细胞进行病毒包装。病毒包装及感染方法参照文献[16]。

1.2.4 稳定敲减 DBN1 细胞系构建 A549 细胞在感染病毒后，在含 1 μg/mL 嘌呤霉素的培养基中筛选抗性克隆，直至建立稳定敲减的模型细胞系。当筛选的细胞未出现死亡后，采用有限稀释法进行单克隆细胞株筛选。

1.2.5 蛋白质印迹（Western blot）检测 参照文献[16]进行操作。一抗稀释比例为 Anti-DBN1（1∶1 000），Anti-GAPDH（1∶5 000）；二抗辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记羊抗兔/鼠免疫球蛋白 G（immunoglobulin G，IgG）稀释比例为 1∶5 000。

1.2.6 克隆形成实验 参照文献[16]进行操作。

1.2.7 划痕实验 6 孔板中细胞密度达到 95% 左右时，用无菌枪头在孔内呈“井”字形划痕，置于孵箱中继续培养，从 0 h 开始每 12 h 拍照 1 次，观察划痕愈合情况。

1.2.8 流式细胞术分析细胞周期及凋亡 将对照组（shCtrl 组）及稳定敲减 DBN1 组（shDBN1-#1、shDBN1-#2）细胞用胰酶消化后收集细胞于离心管中，离心后，加入 1 mL 磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）重悬细胞，洗涤 2 次，加入 75% 预冷乙醇固定，染色前用 PBS 洗去固定液。加入碘化丙啶（propidium iodide，PI）/核糖核酸酶 A（ribonuclease A，RNase A）染色工作液，室温避光孵育 30 min，上机检测并分析细胞周期。细胞用 PBS 洗涤细胞 2 次后，加入 300 μL 1× 结合缓冲液重悬细胞，用 Annexin VFITC 标记，上机前 5 min 加 5 μL PI 染色，同时补加 200 μL 结合缓冲液，根据 Annexin VFITC 和 PI 染色结果分析细胞凋亡情况。

1.2.9 细胞衰老检测实验 处理组细胞在 6 孔板中用含 4 μg/mL Doxy 的培养基诱导 6 d，对照组用含等量 PBS 的培养基培养 6 d。细胞衰老检测参照试剂盒说明书（Abbkine，KTA3030）。

1.2.10 实时定量逆转录聚合酶链式反应（quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction，qRT-PCR） 参照文献[16]进行 RNA 提取及逆转录。引物由擎科生物科技有限公司合成。内参 GAPDH：上游引物 5’-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3’，下游引物 5’-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3’；DBN1：上游引物 5’-AAGGACCCCAACTCTGGACT-3’，下游引物 5’-GCTTTCACAAGGAGAGTGGC-3’；白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）：上游引物 5’-GAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGT-3’，下游引物：5’-AGCTGCGCAGAATGAGATGAGTTG-3’；肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）：上游引物 5’-GCCTCTTCTCCTTCCTGATCG-3’，下游引物 5’-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3’；C-C 基序趋化因子配体 2（C-C motif chemokine ligand 2，CCL2）：上游引物 5’-CAGCCAGATGCAATCAATGCC-3’，下游引物 5’-TGGAATCCTGAACCCACTTC-3’；基质金属蛋白酶 9（matrix metallopeptidase 9，MMP9）：上游引物 5’-TCCCTGGAGACCTGAGAACC-3’，下游引物 5’-CGCCAGGAAGATGAATGGAA-3’。

1.2.11 间接免疫荧光实验 将盖玻片铺于 24 孔板中，分别接种对照组和稳定敲减组细胞，待细胞密度达到 85% 左右后，移除培养基并利用 4% 多聚甲醛溶液室温固定细胞，依次完成一抗与荧光二抗的杂交孵育；细胞核以 4’，6-二脒基-2-苯基吲哚（4’，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）染液复染 5 min 后，借助 Leica SP8 激光共聚焦扫描显微镜进行荧光图像的采集。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。实验结果均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，且所有实验均保证至少 3 次独立重复，2 组间的比对采用两独立样本 t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 在线数据库分析 DBN1 在肺癌中的临床意义

为明确 DBN1 在肺癌组织中的表达水平及其临床意义，首先利用在线网站 UALCAN 分析癌症基因组图谱数据库（The Cancer Genome Atlas database，TCGA）中肺腺癌（lung adenocarcinoma，LUAD）、肺鳞癌（lung squamous cell carcinoma，LUSC）及对应癌旁正常组织中 DBN1 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示，与癌旁组织相比，LUAD 和 LUSC 组织中 DBN1 mRNA 和蛋白表达水平均明显上调（P<0.000 1）（图 1A~D）。为进一步探究 DBN1 表达与肺癌患者预后的关系，本研究采用 GEPIA 数据库对 TCGA 数据库中肺癌患者的 DBN1 表达数据与生存信息进行关联分析。为进一步探究 DBN1 高表达对肺癌患者预后的影响，本研究采用 GEPIA 数据库（http://gepia.cancer-pku.cn/）分析 TCGA 数据库中肺癌患者的 DBN1 表达与生存数据的关系。在 LUAD 患者中，DBN1 高表达组的总体生存率明显低于低表达组（P=0.030 0）（图 1E）；在 LUSC 患者中，DBN1 高表达组的无病生存率明显低于低表达组（P=0.004 6）（图 1F）。以上结果表明，DBN1 在肺癌组织中呈高表达，且其高表达不仅与肺癌患者总体生存预后不良相关，还与肿瘤复发或疾病进展风险增加密切相关。

2.2 肺癌 A549 细胞中 Tet-on 诱导型 DBN1 敲减系统的构建与优化

本研究通过慢病毒感染 A549 细胞，经嘌呤霉素抗性筛

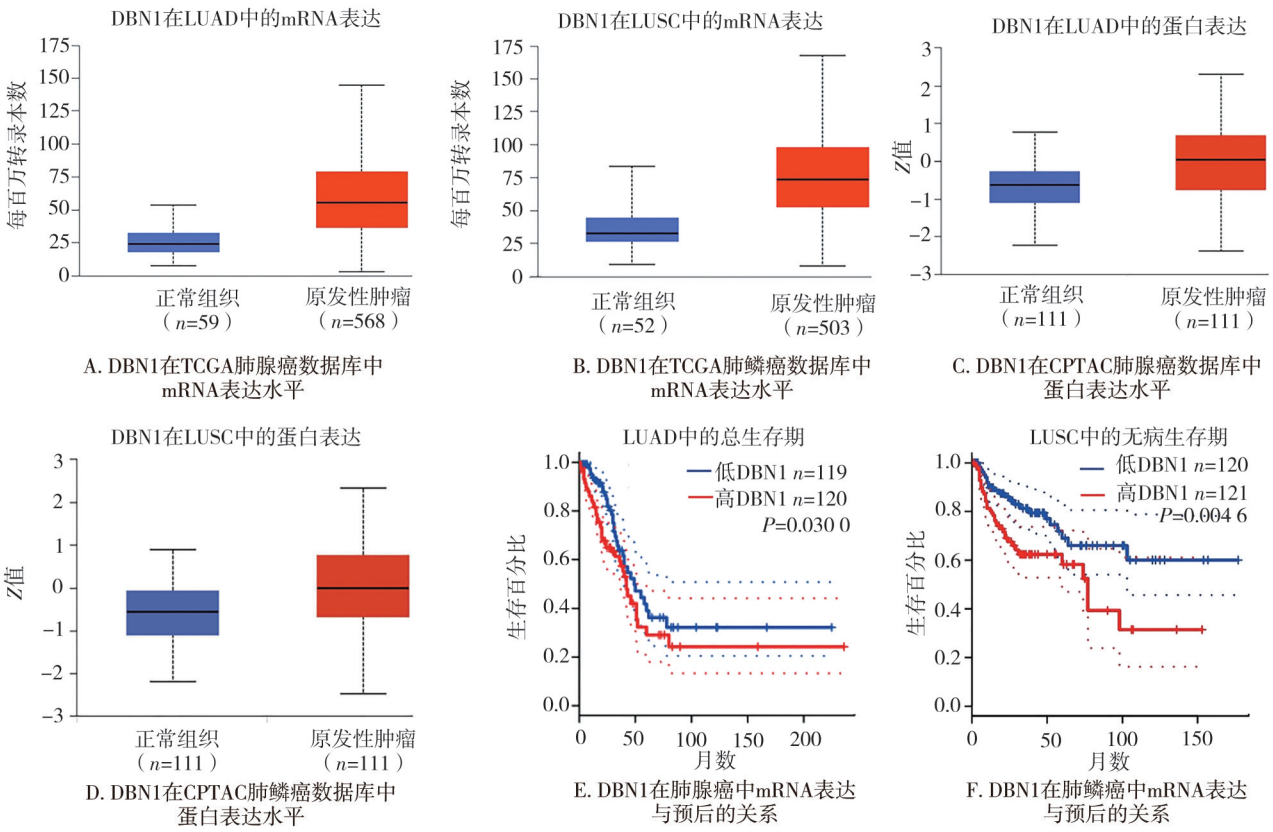
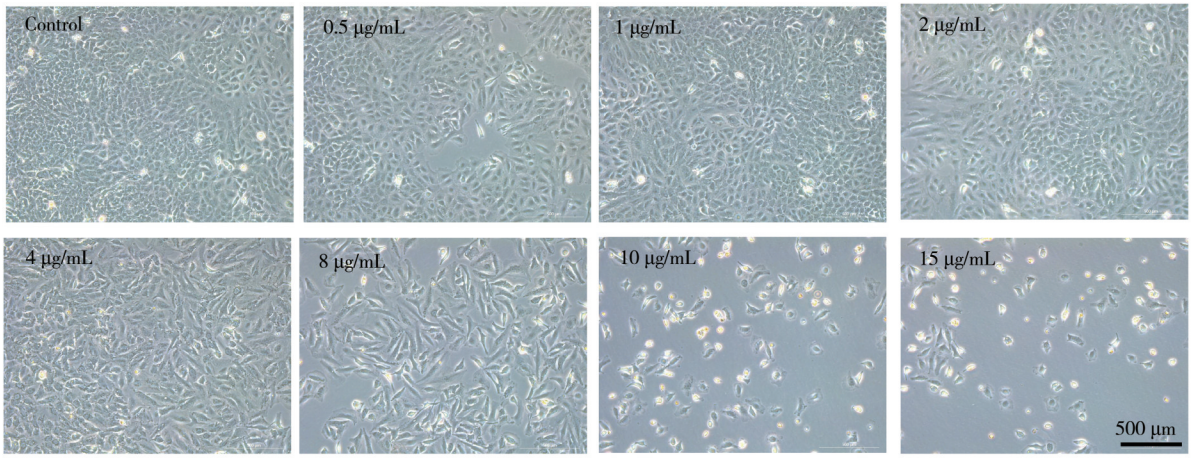


图1　在线数据库中的DBN1 mRNA和蛋白表达水平及其与预后关系

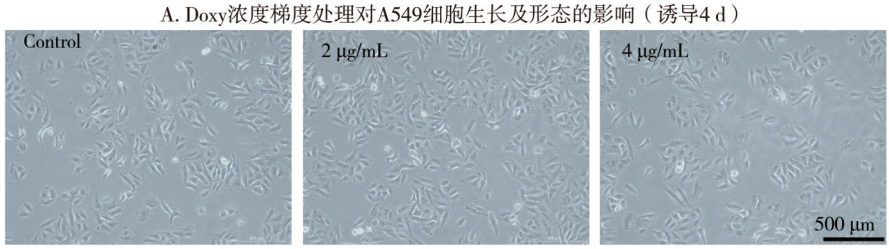
选获得阳性克隆，成功建立Tet-On诱导型DBN1敲减稳转细胞系（A549-DBN1-shRNA-Tet-On），并筛选得到2个靶向DBN1的单克隆细胞株（DBN1-shRNA 1#、DBN1-shRNA 2#）。已有研究报道10 μg/mL Doxy可抑制A549细胞增殖，为筛选既不影响细胞生理状态又能有效诱导基因敲减的Doxy浓度，本研究首先检测不同浓度Doxy对亲本A549细胞的影响。将A549细胞分别用2、4、8 μg/mL及10 μg/mL Doxy处理4 d，以未加药组为对照，通过细胞形态观察和增殖能力检测发现：2 μg/mL和4 μg/mL Doxy处理组细胞形态规则、生长状态良好，与对照组相比增殖速率无明显差异；而8 μg/mL和10 μg/mL Doxy处理组细胞增殖明显受抑制（图2A、B），提示低浓度（≤4 μg/mL）Doxy对A549细胞无明显毒性，可用于后续诱导实验。为确定最佳诱导条件，将A549-DBN1-shRNA 1#和2#单克隆细胞分别用不同浓度Doxy处理，通过Western blot检测DBN1蛋白表达水平。结果如图2C和2D所示，4 μg/mL Doxy诱导6 d后，2个单克隆细胞株的DBN1蛋白表达量均明显下调。同时，基于慢病毒载体携带的红色荧光蛋白（red fluorescent protein，RFP）报告基因，在4 μg/mL Doxy持续诱导过程中，通过荧光显微镜动态观察细胞荧光信号变化。诱导第6天，Doxy处理组细胞中RFP信号均匀分布，荧光覆盖率达100%，表明该浓度下诱导系统完全激活，细胞均能响应Doxy调控并启动shRNA表达（图2E）。以上结果表明A549 DBN1-shRNA细胞株最佳诱导条件为4 μg/mL Doxy持续处理6 d。

2.3　缺失DBN1对肺癌细胞增殖与迁移能力的抑制作用

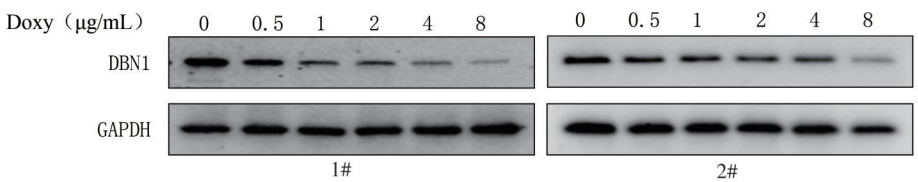
为了系统评价所构建的Tet-On诱导型A549-DBN1-shRNA稳转单克隆细胞株对肺癌细胞生物学行为的影响，本研究首先验证了1#与2#单克隆细胞株的敲减效能。Western blot定量分析显示（图2C和2D），在4 μg/mL Doxy诱导6 d后，1#与2#克隆的DBN1蛋白表达水平分别显著下调了70%和34%。随后，本研究采用克隆形成实验和划痕实验，分别探究DBN1敲减对肺癌细胞增殖及迁移能力的影响。采用克隆形成实验检测4 μg/mL Doxy诱导DBN1敲减后细胞的克隆形成能力。结果显示，与PBS对照组[克隆数：1#（212 ± 9）个；2#（278 ± 15）个]相比，Doxy诱导DBN1敲减组[克隆数：1#（19 ± 5）个；2#（40 ± 7）个]的细胞克隆形成数目明显减少（图3A和B），这表明敲减DBN1表达抑制肺癌细胞增殖能力。划痕实验结果显示，与对照组[相对细胞面积：1#（81 ± 2）；2#（65 ± 4）]相比，Doxy诱导敲减DBN1表达后肺癌细胞迁移能力受抑[相对细胞面积：1#（59 ± 1）%；2#（38 ± 1）%]（1#：P=0.008；2#：P=0.033）（图3C、D）。以上结果表明DBN1-shRNA 1#与2#2个单克隆株在下调DBN1蛋白水平及抑制关键细胞表型（增殖与迁移）上呈现高度一致的趋势。鉴于1#克隆在蛋白敲减效率更高且在功能实验更为稳定，本研究后续深度机制实验将主要采用shRNA 1#单克隆株进行。



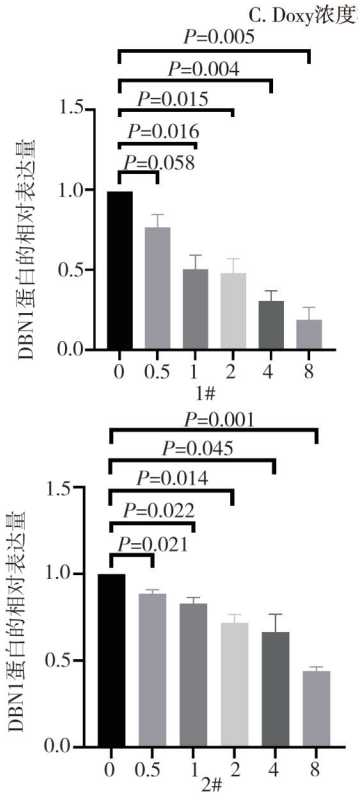
A. Doxy浓度梯度处理对A549细胞生长及形态的影响（诱导4 d）



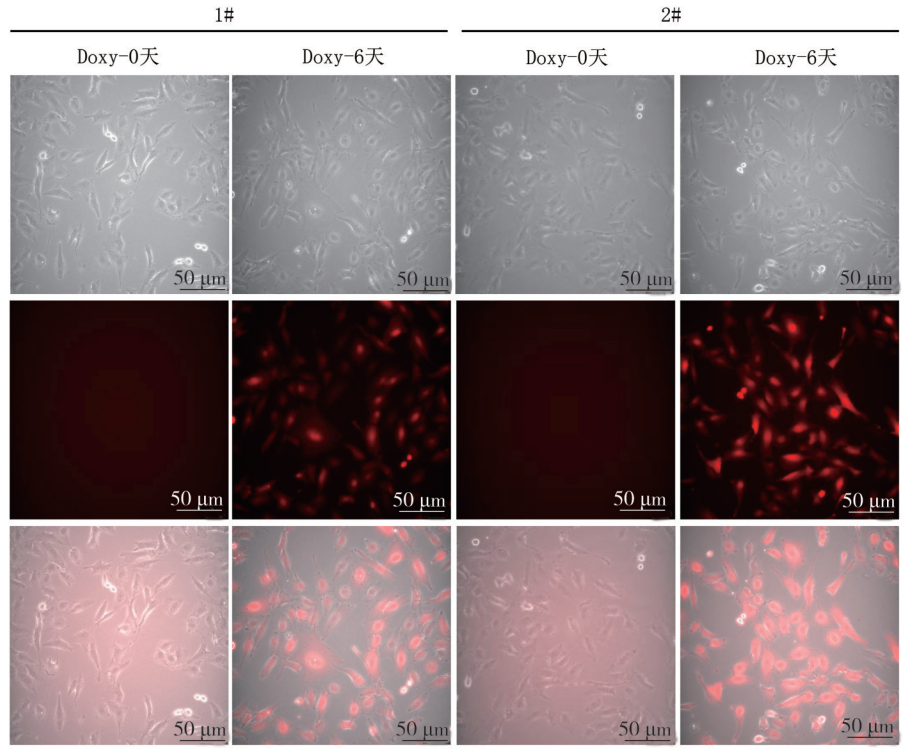
B. 低浓度Doxy长期处理（30 d）后A549细胞的显微特征



C. Doxy浓度梯度处理A549-DBN1-shRNA 1#和2#细胞WB检测DBN1蛋白表达水平（6 d）

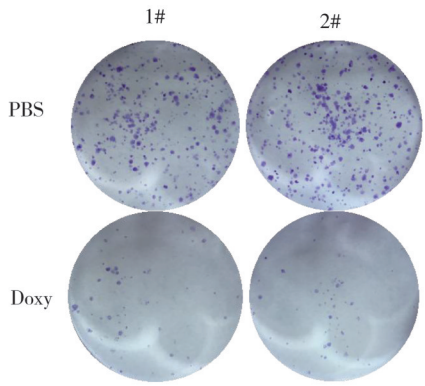


D. 图C各组DBN1蛋白相对表达水平的定量统计

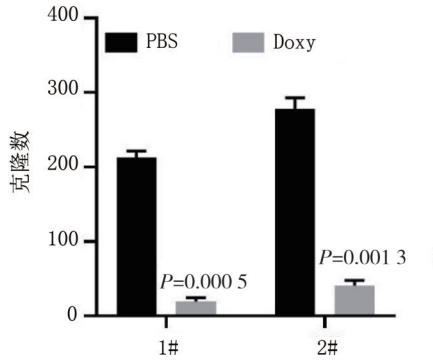


E. 在4 μg/mL Doxy处理A549-DBN1-shRNA 1#和2#细胞6 d后荧光显微镜下观察RFP表达效率

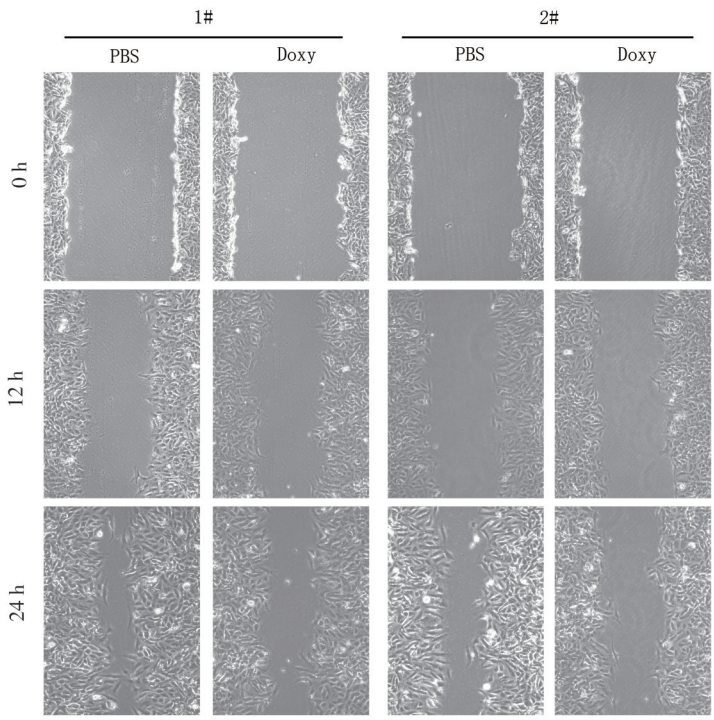
图2 Tet-on 系统介导Doxy诱导敲减DBN1肺癌细胞系构建



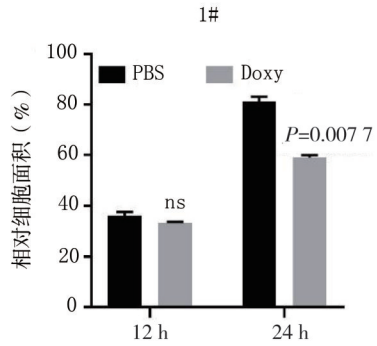
A. 克隆形成实验检测细胞增殖能力



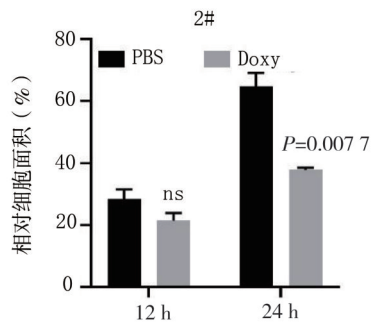
B. 图A中各组克隆形成能力的定量分析



C. 划痕实验检测细胞迁移能力



D. 1#克隆各组细胞划痕愈合水平的统计分析



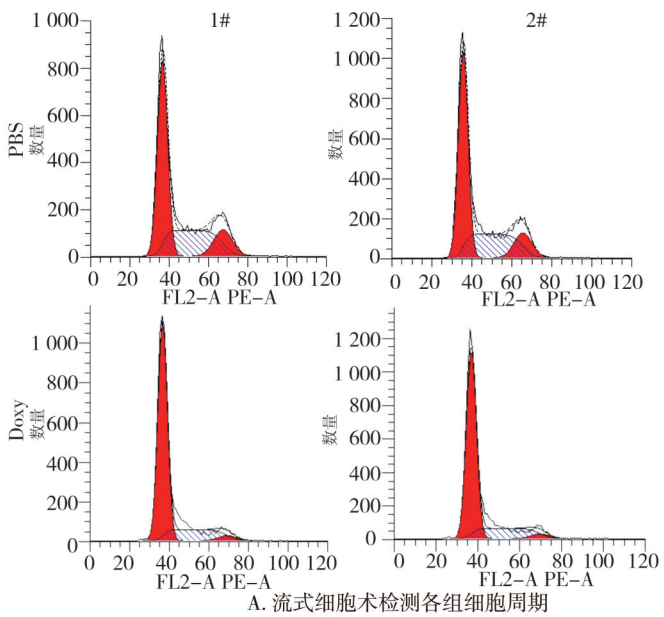
E. 2#克隆各组细胞划痕愈合水平的统计分析

图3　肺癌细胞中敲减DBN1表达对A549恶性表型的影响

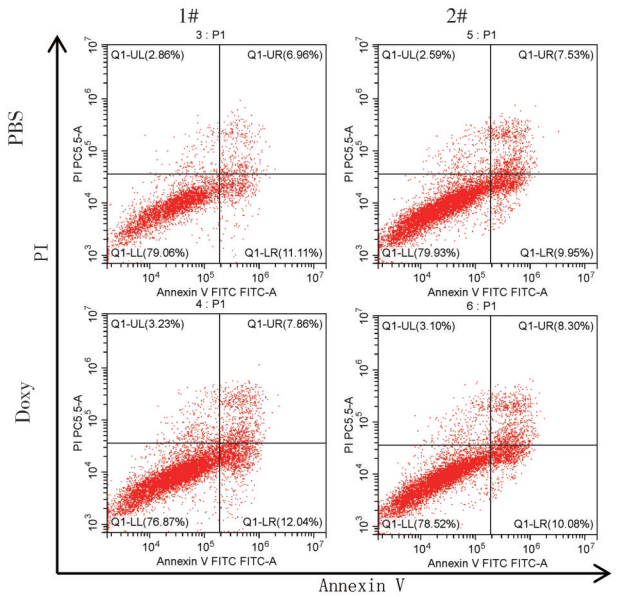
2.4　DBN1在维持细胞核形态稳态及抑制肺癌细胞衰老中的功能分析

通过流式细胞术分析发现，在A549-DBN1-shRNA细胞中，经Doxy诱导下调DBN1表达后，细胞周期进程发生明显阻滞，但凋亡水平无统计学差异（图4A~D）。为阐明A549细胞中敲减DBN1抑制细胞增殖的机制，进一步检测敲减DBN1对细胞衰老的影响。如图4E和F所示，β-半乳糖苷酶染色结果显示，在Doxy诱导DBN1表达下调后，A549细胞的染色阳性率明显升高（P=0.010）。同时，qRT-PCR检测结果揭示了衰老相关分泌表型（SASP）的变化：相较于PBS组，Doxy处理组中IL-6、TNF、CCL2及MMP9等关键衰老相关因子的mRNA表达水平均显著上调（P=0.010，图4G）。

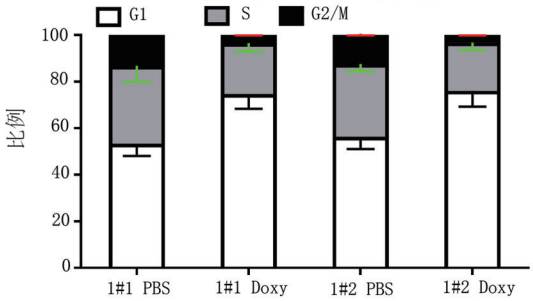
已有多项研究证实，肌动蛋白结合蛋白DBN1在调控细胞形态方面发挥重要作用[17]，然而其对细胞核结构的影响尚不明确。核纤层蛋白Lamin A/C是维持细胞核结构稳定的关键组分，其组装与分布受胞浆及胞核中F-肌动蛋白（filamentous actin，F-actin）的调控[18-20]。采用共聚焦显微镜结合间接免疫荧光技术，观察DBN1缺失对A549细胞内F-actin（红色）与Lamin A/C（绿色）组装及空间构象的影响。结果显示，DBN1表达下调后，F-actin荧光强度较对照组明显升高（图4H、4I）。在核周分布方面，对照组Lamin A/C呈规则的环状轮廓且胞核形态圆润；而DBN1敲减组，Lamin A/C的典型环状分布消失，排布紊乱，并伴随严重的细胞核畸变，表现为核轮廓锯齿化及核皱缩（P=0.010，图4H、4I）。这提示胞内机械张力可能发生显著重构，进而通过连接细胞骨架与核骨架的力学传导通路压迫细胞核。上述结果表明，诱导下调肺癌细胞中DBN1表达不仅阻滞了细胞周期，还导致了细胞核形态稳态的失衡。这种由DBN1缺失引起的核畸变与Lamin A/C重排，是细胞进入衰老状态（cellular senescence）的典型形态学标志。



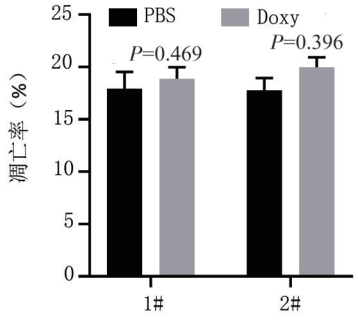
A. 流式细胞术检测各组细胞周期



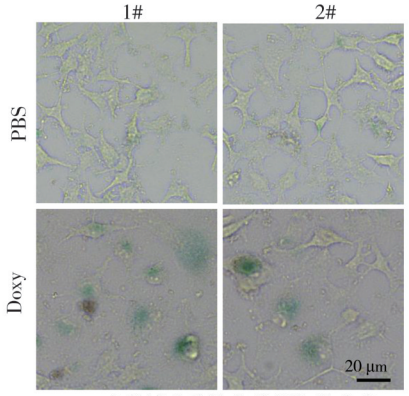
C. 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况（Annexin V-FITC/PI双染）



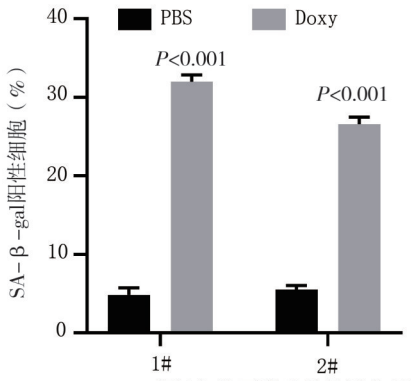
B. 统计细胞周期各阶段（G1、S、G2/M）比例



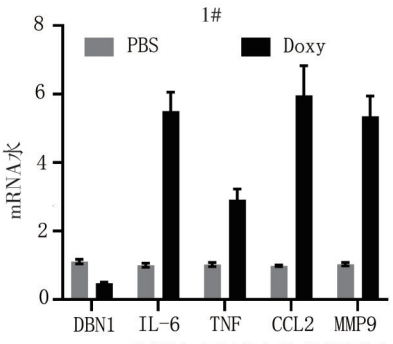
D.细胞凋亡的统计分析



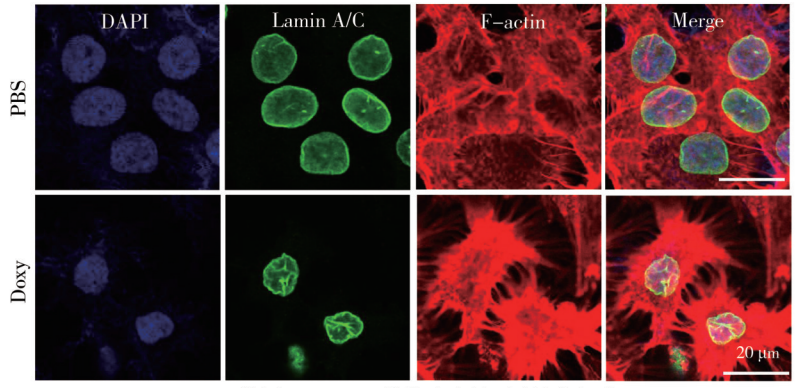
E. β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老



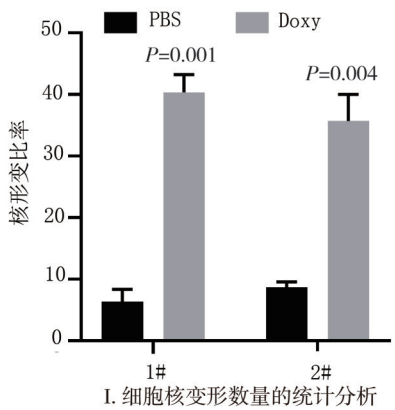
F. SA-β-gal阳性细胞百分比的统计分析



G. qRT-PCR检测衰老相关细胞分泌因子



H. 使用 Lamin A/C 抗体和鬼笔环肽染色细胞



I. 细胞核变形数量的统计分析

图4　肺癌细胞中诱导敲减 DBN1 表达导致细胞衰老及细胞核形态

3 讨 论

作为调节细胞骨架稳态的关键蛋白，高度保守的DBN1（Drebrin）在维持肿瘤细胞恶性表型中的作用日益受到关注。本研究通过在线临床大数据分析证实，DBN1在肺腺癌与肺鳞癌组织中均呈显著高表达，且其表达水平与患者的总体生存率及疾病进展密切相关。这一结果不仅在临床层面强化了DBN1作为肺癌预后评估生物标志物的潜力，亦与既往报道中DBN1在胰腺癌、肝癌及胶质瘤等多种实体瘤中所展现的促癌效应相互印证[10-12]。已有研究发现DBN1是致癌驱动因子SRY相关高迁移率族盒蛋白11（SRY-box transcription factor 11，SOX11）直接转录靶标[21]。在胶质瘤细胞中DBN1主要定位于细胞突起的顶端和片状伪足的膜皱褶处，并与这些区域的F-actin共定位[11]。还有研究报道DBN1定位于细胞间黏附连接（adherens junction）处[22-24]。在肿瘤发展进程中，多项研究证实DBN1是重要的相互作用蛋白。在乳腺癌细胞中，DBN1是鞘氨醇激酶1（sphingosine kinase 1）的结合蛋白[25]。在膀胱癌细胞中，DBN1与颗粒蛋白前体（progranulin）相互作用调控F-actin重排[26]。然而，尽管DBN1调控胞浆骨架动力学的功能已得到较多证实，但其对细胞核形态稳态及细胞应激反应等深层生物学过程的影响，其具体的分子机制尚不清楚。本研究的独特价值在于，首次在肺癌A549细胞中发现，敲减DBN1不仅抑制细胞增殖与迁移，还诱导了显著的细胞核形态畸变与细胞衰老表型。这一发现将DBN1的功能从胞浆延伸至胞核，为阐明肺癌细胞恶性表型的维持提供了新的视角，也为探讨肌动蛋白结合蛋白在核稳态中的作用提供了实验依据。

鉴于DBN1在肺癌组织中的显著高表达及其作为促癌因子的潜在重要性，深入解析其功能有赖于稳定、可靠的基因沉默模型。然而，本课题组在前期探索中利用pLKO.1慢病毒系统构建稳定敲减DBN1的细胞株时发现，DBN1表达的持续下调会迅速诱导A549细胞发生严重的增殖抑制及不可逆的衰老表型。这种“终末性表型”的过早出现，不仅使得稳定细胞株难以跨代扩增，且由于强烈的生存选择压力，可能促使存活细胞发生代偿性生理调节，从而掩盖DBN1缺失后的原发性生物学效应。针对这一局限，本研究引入了Tet-on可控诱导表达系统。该系统通过强力霉素（Doxy）精准开启shRNA的表达，实现了对DBN1敲减时机及程度的有效调控。这种“时空可控”的策略优势在于：一方面，避免长期基因沉默带来的细胞适应性干扰，保留了细胞在敲减初期的原始状态；另一方面，可动态观察DBN1从正常水平降低缺失过程中，细胞骨架动力学与核形态变化的序贯过程。因此，本研究建立的Tet-on诱导敲减模型不仅是单纯的技术优化，更是深入动态解析DBN1维持肺癌细胞核稳态功能的关键实验平台，为后续探寻其下游作用机制提供了稳健的研究基础。

本研究发现，肺癌A549细胞中DBN1的缺失显著诱发细胞核形态畸变及细胞衰老。这一表型背后蕴含着深刻的力学转导机制：DBN1作为肌动蛋白结合蛋白，其表达下调导致的F-actin异常富集，极可能打破细胞骨架与细胞核之间的力学平衡。细胞核形态的物理扭曲往往是细胞应激与衰老的早期信号[27-31]。核纤层结构的完整性对于异染色质的锚定及基因组稳定至关重要[18,32-33]。本研究观察到的Lamin A/C分布异常，可能诱发了衰老相关异染色质灶（senescence-associated heterochromatin foci，SAHF）的形成及促炎因子（如IL-6、TNF等）的转录激活，即衰老相关分泌表型（senescence-associated secretory phenotype，SASP）的出现。这解释了DBN1缺失为何不仅引发形态变化，更导致不可逆的增殖停滞。基于此发现，DBN1介导的核稳态调控为肺癌治疗提供了新视角。近年来提出的“先诱导衰老，再靶向清除（Senolytic strategy）”的“两步走”抗癌策略[34-36]，有望通过靶向DBN1实现：首先利用诱导系统使DBN1缺失以精准启动癌细胞衰老程序，随后利用衰老细胞在代谢与抗凋亡通路上的脆弱性进行针对性清除。该策略不仅能有效抑制肿瘤进展，还有望突破肺癌高度异质性带来的治疗瓶颈，具有重要的转化医学前景。

DBN1作为一种在神经元、胃壁细胞及肾足细胞等高度依赖F-actin重塑的细胞中发挥关键作用的蛋白[22,37-38]，其在肺癌细胞中的高表达显然被肿瘤利用以维持高度的生物力学可塑性。本研究通过构建Tet-on诱导敲减系统，不仅规避了传统基因沉默导致的细胞代偿效应，更真实地揭示了DBN1在维持肺癌细胞核形态稳态中的核心作用。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 胡星：实验实施，实验验证，初稿撰写；李瑶：实验验证，数据分析；张莲：论文修订，数据分析；张春冬：课题构思，论文修订

参 考 文 献

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] Han BF, Zheng RS, Zeng HM, et al. Cancer incidence and mortal-

ity in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53.
[3] 中华医学会肿瘤学分会, 韩宝惠, 王 洁, 等. 中华医学会肺癌临床诊疗指南(2025版)[J]. 中华肿瘤杂志, 2025, 47(9): 769-810. Oncology Society of Chinese Medical Association, Han BH, Wang J, et al. Chinese Medical Association guideline for clinical diagnosis and treatment of lung cancer(2025 edition)[J]. Chin J Oncol, 2025, 47(9): 769-810.
[4] Wu FY, Fan J, He YY, et al. Single-cell profiling of tumor heterogeneity and the microenvironment in advanced non-small cell lung cancer[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2540.
[5] Shirao T, Obata K. Two acidic proteins associated with brain development in chick embryo[J]. J Neurochem, 1985, 44(4): 1210-1216.
[6] Kojima N, Shirao T, Obata K. Molecular cloning of a developmentally regulated brain protein, chicken drebrin A and its expression by alternative splicing of the drebrin gene[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1993, 19(1/2): 101-114.
[7] Shirao T, Sekino Y. Drebrin: From Structure and Function to Physiological and Pathological Roles[M]. Tokyo: Springer Japan, 2017.
[8] Ishikawa R, Hayashi K, Shirao T, et al. Drebrin, a development-associated brain protein from rat embryo, causes the dissociation of tropomyosin from actin filaments[J]. J Biol Chem, 1994, 269(47): 29928-29933.
[9] Dart AE, Gordon-Weeks PR. The Role of Drebrin in Cancer Cell Invasion, in Drebrin: From Structure and Function to Physiological and Pathological Roles, T. Shirao and Y. Sekino, Editors. 2017, Springer Japan: Tokyo. p. 375-389.
[10] Monami G, Emiliozzi V, Bitto A, et al. Proepithelin regulates prostate cancer cell biology by promoting cell growth, migration, and anchorage-independent growth[J]. Am J Pathol, 2009, 174(3): 1037-1047.
[11] Terakawa Y, Agnihotri S, Golbourn B, et al. The role of drebrin in glioma migration and invasion[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(4): 517-528.
[12] Sun Y, Wei HN, Yu WT, et al. The actin-binding protein drebrin disrupts NF2-LATS kinases complex assembly to facilitate liver tumorigenesis[J]. Hepatology, 2025, 81(5): 1433-1451.
[13] Iyama S, Ono M, Kawai-Nakahara H, et al. Drebrin: A new oncofetal biomarker associated with prognosis of lung adenocarcinoma[J]. Lung Cancer, 2016, 102: 74-81.
[14] Yu QY, Tang FY, Cao FY, et al. Drebrin promotes lung adenocarcinoma cell migration through inducing integrin β1 endocytosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 630: 175-182.
[15] Meerbrey KL, Hu G, Kessler JD, et al. The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference *in vitro* and *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(9): 3665-3670.
[16] Li Y, Song MY, Hu X, et al. TNIK regulates cytoskeletal organization to promote focal adhesion turnover and mitosis in lung adenocarcinoma[J]. Front Biosci, 2025, 30(5): 38875.
[17] Shirao T, Sekino Y. Drebrin: From Structure and Function to Physiological and Pathological Roles[M]. Tokyo: Springer Japan, 2017.
[18] Mishra S, Levy DL. Nuclear F-actin and Lamin A antagonistically modulate nuclear shape[J]. J Cell Sci, 2022, 135(13): jcs259692.
[19] Kalukula Y, Stephens AD, Lammerding J, et al. Mechanics and functional consequences of nuclear deformations[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(9): 583-602.
[20] Vahabikashi A, Sivagurunathan S, Nicdao FAS, et al. Nuclear lamin isoforms differentially contribute to LINC complex-dependent nucleocytoskeletal coupling and whole-cell mechanics[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(17): e2121816119.
[21] Wang X, Björklund S, Wasik AM, et al. Gene expression profiling and chromatin immunoprecipitation identify DBN1 SETMAR and HIG2 as direct targets of SOX11 in mantle cell lymphoma[J]. PLoS One, 2010, 5(11): e14085.
[22] Keon BH, Jedrzejewski PT, Paul DL, et al. Isoform specific expression of the neuronal F-actin binding protein, drebrin, in specialized cells of stomach and kidney epithelia[J]. J Cell Sci, 2000, 113 Pt 2: 325-336.
[23] Peitsch WK, Grund C, Kuhn C, et al. Drebrin is a widespread actin-associating protein enriched at junctional plaques, defining a specific microfilament anchorage system in polar epithelial cells[J]. Eur J Cell Biol, 1999, 78(11): 767-778.
[24] Peitsch WK, Hofmann I, Bulkescher J, et al. Drebrin, an actin-binding, cell-type characteristic protein: induction and localization in epithelial skin tumors and cultured keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2005, 125(4): 761-774.
[25] Yagoub D, Wilkins MR, Lay AJ, et al. Sphingosine kinase 1 isoform-specific interactions in breast cancer[J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(11): 1899-1915.
[26] Xu SQ, Buraschi S, Morcavallo A, et al. A novel role for drebrin in regulating progranulin bioactivity in bladder cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(13): 10825-10839.
[27] de Magalhães JP. Cellular senescence in normal physiology[J]. Science, 2024, 384(6702): 1300-1301.
[28] Pathak RU, Soujanya M, Mishra RK. Deterioration of nuclear morphology and architecture: A hallmark of senescence and aging[J]. Ageing Res Rev, 2021, 67: 101264.
[29] Colucci M, Sarill M, Maddalena M, et al. Senescence in cancer[J]. Cancer Cell, 2025, 43(7): 1204-1226.
[30] Sohrabi Molina M, Brauer E, Günther R, et al. Increased substrate stiffness disrupts nuclear-cytoskeletal mechanical coupling in senescent cells[J]. Mater Today Bio, 2025, 35: 102472.
[31] Zhou ZY, Qin Q, Dong CY, et al. The dual guardians of cellular stability: exploring nesprin and lamin in senescence[J]. Cell Death Dis, 2025, 16(1): 757.
[32] Dauban L, Eder M, de Haas M, et al. Interactions between the genome and the nuclear *Lamina* are multivalent and cooperative[J]. Nat Struct Mol Biol, 2025, 32(11): 2335-2348.
[33] Gholamalamdari O, van Schaik T, Wang YC, et al. Major nuclear locales define nuclear genome organization and function beyond A and B compartments[J]. Elife, 2025, 13: RP99116.
[34] Lee S, Schmitt CA. The dynamic nature of senescence in cancer [J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(1): 94-101.
[35] Wang LQ, Lankhorst L, Bernards R. Exploiting senescence for the treatment of cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(6): 340-355.
[36] McHugh D, Durán I, Gil J. Senescence as a therapeutic target in cancer and age-related diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2025, 24(1): 57-71.
[37] Aoki C, Sekino Y, Hanamura K, et al. Drebrin A is a postsynaptic protein that localizes *in vivo* to the submembranous surface of dendritic sites forming excitatory synapses[J]. J Comp Neurol, 2005, 483(4): 383-402.
[38] Peitsch WK, Hofmann I, Endlich N, et al. Cell biological and biochemical characterization of drebrin complexes in mesangial cells and podocytes of renal glomeruli[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(6): 1452-1463.

（收稿：2026-01-16；修回：2026-03-19；录用：2026-03-20）
（责任编辑：李青颖）

本文引用格式：
胡 星, 李 瑶, 张 莲, 等. 基于Tet-on系统的DBN1诱导敲减模型的构建及其对肺癌细胞核形态稳态与衰老的调控作用[J]. 重庆医科大学学报, 2026, 51(5): 645-653.