

6-溴异香兰素诱发人宫颈癌上皮细胞纺锤体损伤及有丝分裂灾变死亡

张 博, 张士猛, 关 华, 王 豫, 刘晓丹, 徐勤枝, 周平坤

军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

摘要 研究香兰素衍生物中的 6-溴异香兰素 (6-溴-5-羟基-4-甲氧基苯甲醛, BVAN08) 对人宫颈癌上皮 (HeLa) 细胞纺锤体结构、有丝分裂的影响, 及杀死癌细胞的相关机制, 为开发新的抗癌药物提供理论依据。研究发现 BVAN08 对体外培养的人 HeLa 细胞具有剂量依赖性致死效应。通过抗 α -微管蛋白抗体和抗 β -微管蛋白抗体免疫荧光标记和激光共聚焦显微镜观察发现其机制是: BVAN08 对细胞纺锤体结构造成破坏, 诱发生成大量的多中心体细胞, 使细胞阻滞在有丝分裂期。异常多极纺锤体细胞的百分率与 BVAN08 呈浓度依赖效应关系。荧光染料 Hoechst33258 染色观察到多微核或细胞核割裂和染色质凝集现象, 也证实 BVAN08 诱发 HeLa 细胞有丝分裂灾变死亡。同时免疫印迹实验还发现, BVAN08 可导致细胞周期转录调节因子 FoxM1 (Forkhead box) 及其下游靶分子 CyclinB1 的降解, 参与有丝分裂的 FoxM1 蛋白失活, 这表明 BVAN08 通过抑制 FoxM1 蛋白的表达是导致细胞纺锤体装配异常、细胞发生有丝分裂灾变死亡的分子机制之一。研究结果提示 BVAN08 诱发 HeLa 细胞新的死亡方式, 具有被开发为新型抗癌药物的潜力。

关键词 有丝分裂灾变; 细胞周期; 纺锤体结构; 细胞周期检测点

中图分类号 R329.2, R730.5

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)10-0019-05

The Spindle Damage and Mitotic Catastrophe Induced by 6-bromoisovanillin in HeLa Cells

ZHANG Bo, ZHANG Shimeng, GUAN Hua, WANG Yu, LIU Xiaodan, XU Qinzhi, ZHOU Pingkun

Department of Radiation Toxicology and Oncology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China

Abstract This paper studies the effect of vanillin derivative 6-bromoisovanillin (6-bromine-5-hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde, BVAN08) on the spindle structure damage and mitotic catastrophe of HeLa cells, to provide a solid experimental basis for development of new anticancer drugs. BVAN08 was shown to induce death of HeLa cells in a dose-dependent manner. By laser confocal microscopic observation of BVAN08-treated cells immunostained with the anti- α -tubulin antibody and anti- γ -tubulin antibody, the following mechanisms were found. It is indicated that BVAN08 destroys the spindle structure (aberrant multi-polar spindles), induces aberrant multi-polar spindles and multinucleated cells, and causes cell arrest in the mitosis stage. The percentage of abnormal multipolar spindle cells was dose-dependent. Hoechst 33258 fluorescent staining observation of BVAN08-treated cells revealed multiple micronuclei or multinucleated and chromatin aggregation. Western blot analysis indicated that the cell cycle control associated transcription regulation factor FoxM1 (Forkhead box) and its downstream target molecule CyclinB1 protein were down-regulated. Inactivation of FoxM1 protein indicated that the degradation of FoxM1 protein induced by BVAN08 is one of the mechanisms of abnormal spindle assembly and mitotic catastrophe. The result indicates that BVAN08 has the potential to be developed as a new anticancer drug.

Keywords mitotic catastrophe; cell cycle; spindle structure; cell cycle checkpoint

收稿日期: 2010-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30772592); 国家自然科学基金杰出青年基金项目 (30825011)

作者简介: 张博, 博士研究生, 研究方向为分子肿瘤学, 电子信箱: xns946@163.com; 周平坤 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: M180000002S), 研究员, 研究方向为放射生物学、基因毒理与 DNA 损伤修复, 电子信箱: zhoupk@nic.bmi.ac.cn

0 引言

细胞周期是一个复杂而又精确调节的过程,在此过程中 G₁/S、G₂/M 和纺锤体等检测点机制监控着细胞周期有序进行,在维持细胞基因组结构稳定性中发挥着重要作用,同时与细胞死亡机制也有密切联系。

细胞死亡是多细胞生物生命过程中重要的生理或病理现象,也是恶性肿瘤治疗的细胞学反应基础,可分为凋亡 (Apoptosis)、坏死 (Necrosis)、自吞噬 (Autophagy) 和有丝分裂灾难死亡 (Mitotic catastrophe),其中有丝分裂灾难死亡是由于细胞有丝分裂异常或细胞长时间阻滞在有丝分裂期而诱发的一种死亡形式,常伴随着细胞周期检测点的异常或纺锤体结构的损伤发生^[1-2]。细胞周期 G₂/M 检测点是监控细胞进入有丝分裂期的重要关卡,在肿瘤细胞耐药中发挥着重要作用^[3]。开发诱导癌细胞多种死亡方式的药物,可以克服单一死亡方式带来的肿瘤耐药性问题,有丝分裂灾难死亡的揭示为恶性肿瘤治疗,特别是对传统化疗药物有耐药性的肿瘤的治疗开辟了新的途径。已有报道天然植物芳香剂香兰素能抑制癌细胞增殖、肿瘤侵袭转移,并能抑制 DNA 修复蛋白 DNA-PKcs 的活性^[4-5]。但是有效浓度较大,不适合实际应用。6-溴异香兰素 (6-溴-5-羟基-4-甲氧基苯甲醛, BVAN08) 是从一系列香兰素衍生物中筛选出来的抗癌细胞增殖的新化合物。先前已有研究发现该化合物能诱发多种癌细胞系死亡,并诱发白血病 Jurkat 细胞 G₂/M 期阻滞,阻断 Akt 信号通路^[6],诱导肝细胞肝癌 HepG2 细胞凋亡和自吞噬^[7]。本文主要研究 BVAN08 对宫颈癌上皮 (HeLa) 细胞增殖、细胞纺锤体结构及有丝分裂灾难死亡的影响,以期为该化合物开发为新的抗肿瘤药物提供更充实的实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

HeLa 细胞由本实验室保存,在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 (Gibco 公司) 中,5% CO₂ 孵箱 37℃ 恒温培养。

1.2 试剂与材料

α-微管蛋白抗体购自北京中杉公司 (ZM0438), γ-微管蛋白抗体购自 Abcam 公司 (ab11317), FoxM1 抗体购自 Abcam 公司 (ab14758), CyclinB1 抗体购自 NeoMarkers (MS868), β-actin 抗体购自 Santa Cruz 公司 (sc1616), FITC 荧光标记山羊抗小鼠二抗购自北京中杉公司 (ZF0312), NC 膜购自 Pharmacia 公司, ECL 显色检测试剂盒购自 Santa Cruz 公司。BVAN08 由军事医学科学院放射与辐射医学研究所植物药物化学研究室王林研究员合成,纯度大于 98%。

1.3 免疫荧光观察细胞纺锤体结构

对数生长期的 HeLa 细胞用 60 μmol/L BVAN08 处理 4~24h 后收集细胞,依次用 -20℃ 预冷的甲醇固定、0.1% TritonX-100 室温温浴、1% BSA (用 PBS 配置) 封闭。加入微管蛋白一抗 (PBS 以 1:100 稀释) 过夜;漂洗后加入 FITC 标记的荧光二

抗 (PBS 以 1:200 稀释) 孵育 1h;漂洗后 5 μg/mL 的 DAPI 染液 (以 PBS 稀释) 染核;漂洗 3 次将玻片倒放在载玻片的树脂滴上封片。TCS SP2 激光共聚焦扫描显微镜 (德国 Leica) 及时观察并采集图像。

1.4 免疫印迹检测 FoxM1 及 CyclinB1 蛋白的表达变化

对数生长期的 HeLa 细胞用 40 μmol/L BVAN08 作用 4~24h 后,分别收集各组细胞提取总蛋白,考马斯亮蓝染色法测定蛋白浓度。取 100 μg 总蛋白上样,经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,与 FoxM1 抗体 (1:1000) 作用 1h,辣根过氧化物酶标记的二抗室温作用 1h,常规程序显影。肌动蛋白 (β-actin) 作为蛋白上样量的标定。

2 结果

2.1 BVAN08 对 HeLa 细胞增殖抑制作用

通过克隆形成分析不同浓度 BVAN08 作用 24h 后对 HeLa 细胞存活的影响 (图 1)。结果显示, BVAN08 对 HeLa 细胞有显著的抑制作用,其抑制作用随着药物浓度的增加而加强,对细胞存活抑制的 IC₅₀ 值为 19.07 μmol/L。

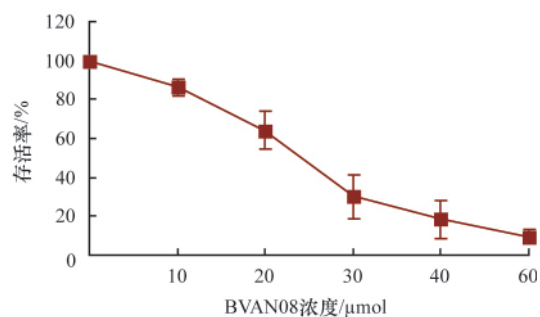


图 1 细胞克隆形成法检测 BVAN08 作用 HeLa 细胞 24h 的存活曲线

Fig. 1 Cell survival curve of HeLa cells treated with BVAN08 for 24h

2.2 BVAN08 破坏细胞纺锤体结构

40 μmol/L BVAN08 作用 HeLa 细胞 24h 后,利用抗 α-微管蛋白抗体进行免疫荧光杂交,激光共聚焦显微镜观察,发现有相当比例细胞阻滞在有丝分裂期,并且有相当多的异常多极纺锤体结构细胞 (图 2)。

进一步用 α-微管蛋白抗体标记微管和 γ-微管蛋白抗体标记中心体,通过免疫荧光激光共聚焦显微镜观察和分析异常纺锤体结构变化。如图 3 所示,正常培养的对照细胞在有丝分裂中期形成完整的二极纺锤体结构,将遗传物质均匀分向两子代细胞,在有丝分裂末期完成胞质分裂。而 BVAN08 作用细胞出现多中心体 (多极体) 结构,如三极纺锤体和多极纺锤体等异常纺锤体细胞,中心体碎裂 (箭头所指) 等异常纺锤体细胞,导致细胞核 DNA 的异常分配和分离。

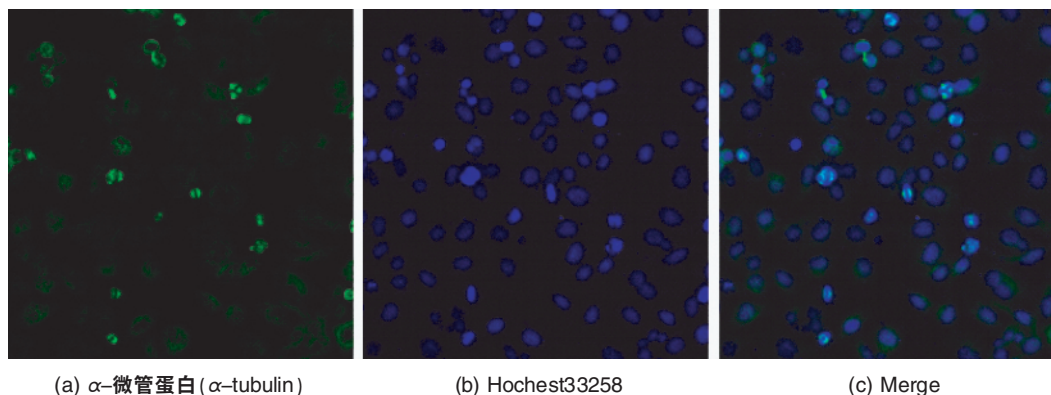


图 2 40 μ mol/L BVAN08 作用 HeLa 细胞 24h 后 α -微管蛋白抗体免疫荧光法检测结果

Fig. 2 α -微管蛋白 antibody immunofluorescent staining of HeLa cell treated with 40 μ mol/L BVAN08 for 24h

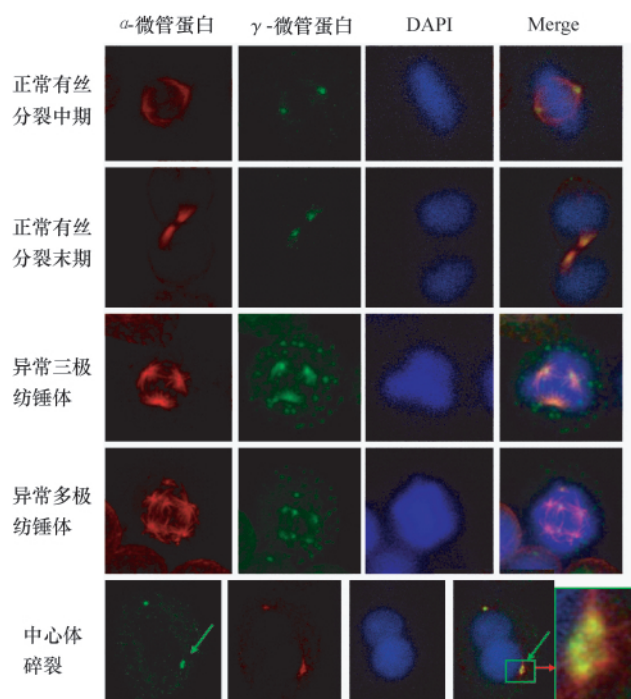
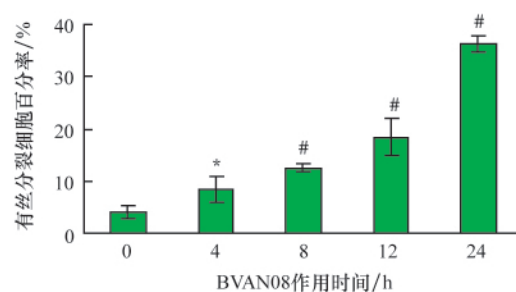


图 3 免疫荧光染色检测细胞纺锤体结构

Fig. 3 Spindle conformation alterations detected by immuno-fluorescent staining

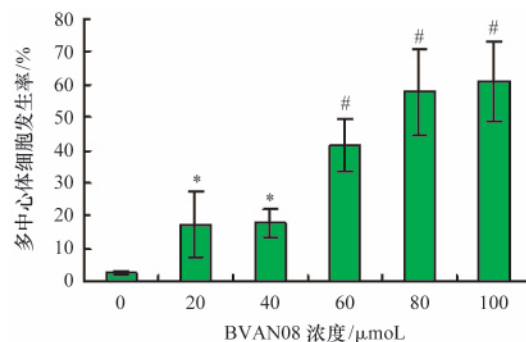
细胞有丝分裂指数统计结果表明, 60 μ mol/L BVAN08 作用 HeLa 细胞 4h 即可导致有丝分裂指数升高, 并且随着 BVAN08 作用时间延长, 有丝分裂指数显著增加 (图 4(a)), 而其中异常多极纺锤体细胞的百分率随着药物浓度的增加而逐渐增多 (图 4(b))。

与此同时, 还可见 BVAN08 诱发多核细胞的产生 (图 5(a)), 多核细胞发生率与 BVAN08 作用浓度呈正相关 (图 5(b))。荧光染料 Hoechst33258 染色检测, 进一步观察到多微核或细胞核割裂和染色质凝集现象 (图 5(c))。上述结果表明 BVAN08 能破坏细胞纺锤体结构, 导致细胞有丝分裂异常和



(a) 60 μ mol BVAN08 作用不同时间的有丝分裂细胞百分率

(a) Mitotic index of HeLa cells with 60 μ mol BVAN08 treatment for different time periods



(b) 不同浓度 BVAN08 作用 24h 后多中心体细胞发生率

(b) Incidence of multipolar spindle cells of HeLa cells treated with different concentrations of BVAN08 for 24h

图 4 BVAN08 诱发 HeLa 细胞有丝分裂期阻滞及纺锤体损伤

Fig. 4 Induction of mitotic arrest and spindle damage by BVAN08

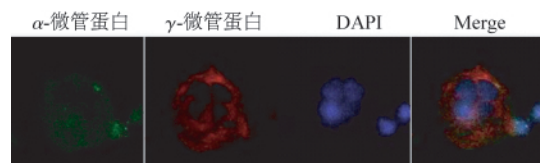
注: 与未处理对照比较; * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

Notes: As compared with the untreated control cells, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$.

有丝分裂灾难死亡。

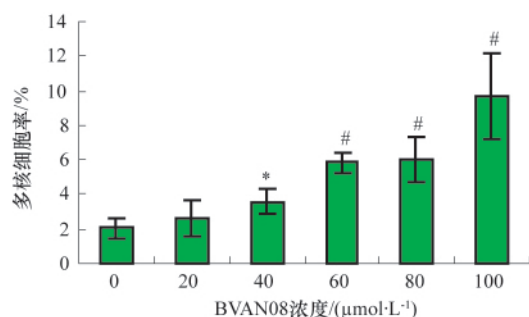
2.3 BVAN08 抑制细胞中 FoxM1 蛋白表达

FoxM1 蛋白作为转录调节因子对于 G_1/S 、 G_2/M 的细胞周



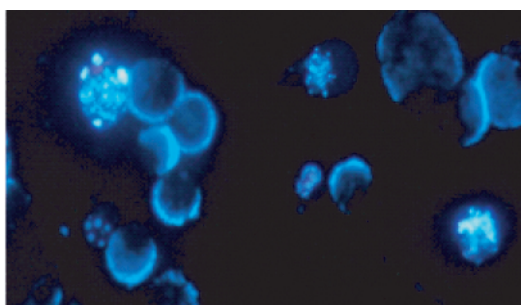
(a) BVAN08 诱发的多核细胞

(a) Multinucleated cells induced by BVAN08



(b) 不同浓度 BVAN08 作用 24 h 后多核细胞发生率

(b) The incidence of multiple nuclei cells of HeLa cells treated with different concentrations of BVAN08 for 24h



(c) Hoechst33258 荧光染色显示 BVAN08 诱发 HeLa 细胞有丝分裂灾变死亡 (多微核或核割裂)

(c) BVAN08-induced mitotic catastrophe of HeLa cells demonstrated as multiple micronuclei /multinucleated by Hoechst33258 fluorescent staining

图 5 BVAN08 诱发多核细胞和有丝分裂灾变死亡

Fig. 5 Induction of multinucleated cells induced by BVAN08

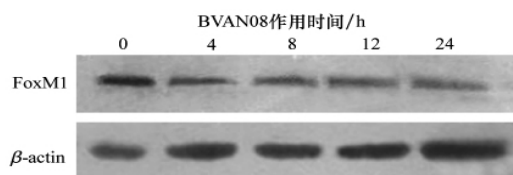
注: 与未处理对照比较: * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

Notes: As compared with the untreated control cells, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$.

期转换十分重要,并且调节纺锤体的装配。免疫印迹检测 40 $\mu\text{mol/L}$ BVAN08 作用后 HeLa 细胞中 FoxM1 的表达,发现细胞中 FoxM1 蛋白的表达水平降低 (图 6 (a))。Cyclin B1 是 FoxM1 的下游调节靶分子,免疫印迹结果也显示 40 $\mu\text{mol/L}$ BVAN08 作用后,细胞中 Cyclin B1 蛋白表达水平明显降低 (图 6(b))。

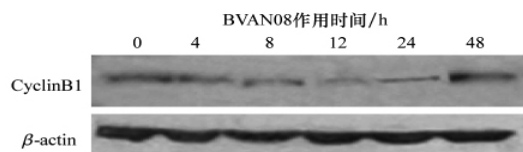
3 讨论

本研究表明,BVAN08 对 HeLa 细胞增殖产生明显的抑制作用,抑制率与 BVAN08 剂量呈依赖效应关系。诱发癌细胞有丝分裂灾变死亡是近年来倍受关注的新的抗癌药物研制



(a) 免疫印迹杂交检测 FoxM1 蛋白表达

(a) Expression of FoxM1 detected by Western blotting analysis



(b) 免疫印迹杂交检测 Cyclin B1 蛋白表达

(b) Expression of Cyclin B1 detected by Western blotting analysis

图 6 40 $\mu\text{mol/L}$ BVAN08 作用 HeLa 细胞中 FoxM1 与 Cyclin B1 蛋白表达分析

Fig. 6 Analyses of FoxM1 and CyclinB1 proteins expression in HeLa cells treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ BVAN08

的策略,这种细胞死亡的典型特征是:有丝分裂异常,细胞体积变大;中心体异常复制导致细胞出现多中心体或多极纺锤体;出现多核细胞或核割裂现象等^[8-9]。研究发现,BVAN08 破坏细胞纺锤体结构,细胞由于阻滞在有丝分裂中期,导致出现多中心体细胞和体积增大的多核细胞、多微核细胞等现象,并且 BVAN08 诱发细胞有丝分裂指数显著升高。从一系列有丝分裂灾变死亡的特征来看,长时间的细胞周期阻滞会导致有丝分裂灾变死亡^[10],遗传物质异常分配形成多核后,也能启动有丝分裂灾变死亡通路^[9-10]。因此,研究证实 BVAN08 可以诱发细胞有丝分裂灾变死亡。

FoxM1 蛋白作为转录调节因子可以调节纺锤体的装配,维持染色体数目的稳定和有丝分裂期姐妹染色体的正确分离^[11-12]。FoxM1 蛋白表达抑制的细胞表现出 DNA 断裂增加、 G_2/M 期转换受阻,出现染色体错误排列、胞质分裂异常等现象,产生多倍体和亚倍体细胞^[13-15]。本研究发现 BVAN08 可以抑制细胞中 FoxM1 蛋白的表达,表明 BVAN08 通过抑制 FoxM1 蛋白的表达是导致细胞纺锤体装配异常、细胞发生有丝分裂灾变死亡的分子机制之一。CyclinB1 是受 FoxM1 直接调节的靶分子,细胞在 G_2/M 期转换时需要 CyclinB1/Cdk1 复合物的激活,持续到有丝分裂的早期和中期,而细胞进入后期需要 CyclinB/Cdk1 复合物活力突然降低^[16]。本研究发现,BVAN08 作用后细胞中 CyclinB1 蛋白的表达也下降,而通过免疫荧光检测到大部分细胞阻滞在有丝分裂期,表明细胞并没有进入有丝分裂后期,而是由于长时间细胞周期阻滞发生有丝分裂灾变死亡。

4 结论

本研究证实 BVAN08 可以抑制 HeLa 细胞增殖、破坏细胞纺锤体结构、诱发 HeLa 细胞有丝分裂灾变死亡,并且发生有丝分裂灾变死亡机制与抑制细胞中 FoxM1 蛋白表达有关。6-溴异香兰素诱发新的细胞死亡方式,对研究癌细胞的耐药性问题及抗肿瘤药物的开发具有参考价值。

参考文献 (References)

- [1] Weaver B A, Cleveland D W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death[J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(1): 7-12.
- [2] 张博, 周平坤. Mitotic catastrophe 研究进展[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(6): 849.
Zhang Bo, Zhou Pingkun. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2007, 29(6): 849.
- [3] Goldwasser F, Shimizu T, Jackman J, *et al.* Correlations between S and G₂ arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(19): 4430-4437.
- [4] Ho K, Yazan L S, Ismail N, *et al.* Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin [J]. *Cancer Epidemiol*, 2009, 33(2): 155-160.
- [5] Liang J A, Wu S L, Lo H Y, *et al.* Vanillin inhibits matrix metalloproteinase -9 expression through down -regulation of nuclear factor -kappaB signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(1): 151-157.
- [6] Yan Y Q, Xu Q Z, Wang L, *et al.* Vanillin derivative 6-bromine-5-hydroxy-4- methoxybenzaldehyde-elicited apoptosis and G₂/M arrest of Jurkat cells proceeds concurrently with DNA -PKcs cleavage and Akt inactivation [J]. *Int J Oncology*, 2006, 29(5): 1167-1172.
- [7] Yan Y Q, Zhang B, Wang L, *et al.* Induction of apoptosis and autophagic

cell death by the vanillin derivative 6 -bromine -5 -hydroxy -4 - methoxybenzaldehyde is accompanied by the cleavage of DNA-PKcs and rapid destruction of c -Myc oncoprotein in HepG2 cells [J]. *Cancer Letters*, 2007, 252(2): 280-289.

- [8] Castedo M, Perfettini JL, Thomas R, *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (16): 2825-2837.
- [9] Eom Y W, Kim M A, Park S S, *et al.* Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: Apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence -like phenotype [J]. *Oncogene*, 2005, 24(30): 4765-4777.
- [10] Ulrich S, Qing Z, Susana A G. Forkhead transcription1 factor FoxM1 regulates mitotic entry and prevents spindle defects in cerebellar granule neuron precursors [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(23): 8259-8270.
- [11] Huang X, Tran T, Zhang L, *et al.* DNA damage -induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1 -dependent mitotic exit DNA damage checkpoint [J]. *PNAS*, 2005, 102(4): 1065-1070.
- [12] Robert H C. FoxM1 dances with mitosis[J]. *Nature Cell Biology*, 2005, 7 (2): 108-109.
- [13] Tan Y, Raychaudhuri P, Costa R H. FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(3): 1007-1016.
- [14] Diane R W, Maximillian T F. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe [J]. *Cancer Research*, 2005, 65(12): 5181-5189.
- [15] Jamila L, Matthijs R H, Alexandra B, *et al.* FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability [J]. *Cell Biology*, 2005, 7(2): 126-136.
- [16] Smits V A, Medema R H. Checking out the G₂/M transition [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1519 (1-2): 1-12.

(责任编辑 王芷)

本期完词填空答案

低	碳							顿
	酸	梅	汤					开
	饮			利			孟	茅
	料			害		奥	德	塞
			许	攸			斯	
	世			关	关	雎	鸲	
	界		金					
三	杯	两	盞	淡	酒			黑
			花		精	卫	填	海

本期九宫填数答案

九宫 难度系数 ◆◆◆◆◇

1	4	5	3	6	7	2	9	8
9	6	2	1	5	8	3	4	7
8	3	7	2	4	9	1	6	5
2	8	3	9	1	6	5	7	4
5	9	1	7	2	4	6	8	3
6	7	4	8	3	5	9	2	1
7	5	9	6	8	3	4	1	2
4	1	6	5	7	2	8	3	9
3	2	8	4	9	1	7	5	6
	9	7	1	5	3	6	2	8
	3	2	8	1	4	7	9	6
	6	4	5	8	9	2	3	1
	2	8	4	9	5	1	7	3
	1	9	3	6	7	8	5	4
	5	6	7	4	2	3	1	9