

• 研究论文 •

华蟾毒精靶向KATNB1抑制肿瘤细胞微管形成和有丝分裂

张琦^{1,2#}, 王甜甜^{1,2#}, 汪磊^{1,2}, 柯细松^{1,2}, 屈祎^{1,2}, 张雪^{1,2*}

(1. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203; 2. 上海市中药化学生物学前沿基地, 上海 201203)

摘要: 华蟾素是临床广泛应用的抗肿瘤中药, 但其抗肿瘤分子机制尚未完全清楚。本研究旨在阐明华蟾素活性成分华蟾毒精 (cinobufagin, CBG) 抑制肿瘤细胞有丝分裂的靶标及分子机制。应用碘化丙啶 (PI) DNA 染色法分析 CBG 对肿瘤细胞周期的作用; 通过胸苷同步化细胞至有丝分裂时期, 微管及中心粒染色法表征 CBG 对肿瘤细胞有丝分裂的影响; 采用体外微管聚合实验、微管单体/聚体分离实验及微管 α -tubulin 荧光标记法从分子和细胞水平评价 CBG 对微管聚合的作用; 通过基因编辑技术 CRISPR/Cas9 建立微管切割蛋白 Katanin 调节亚基 B1 (KATNB1) 敲除的肿瘤细胞, CCK-8 法考察 CBG 对野生型和敲除细胞抑制作用的差异; 利用化学生物学的技术方法研究 CBG 和 KATNB1 的结合; 采用 Western blot 及实时定量 PCR 检测 CBG 对 KATNB1 蛋白和 mRNA 的调控。结果发现, CBG 阻滞结肠癌 HCT116 细胞周期于 G₂/M 期; 诱导中心粒异常增生, 抑制肿瘤细胞的有丝分裂; 体内外的微管形成实验表明 CBG 显著抑制微管蛋白聚合; KATNB1 敲除后缓解了 CBG 对 HCT116 细胞的抑制作用, 表明 KATNB1 是 CBG 抗肿瘤的重要靶标; 进一步发现 CBG 与 KATNB1 结合并减少其蛋白水平, KATNB1 突变能阻断两者结合及 CBG 的这种作用。以上结果表明, CBG 靶向微管切割蛋白 KATNB1 抑制微管聚合从而抑制肿瘤细胞有丝分裂。

关键词: 华蟾毒精; 细胞周期; 有丝分裂; 微管; 微管切割蛋白 Katanin 调节亚基 B1

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)08-2334-08

Cinobufagin disrupts mitosis and microtubule polymerization via targeting KATNB1 in cancer cells

ZHANG Qi^{1,2#}, WANG Tian-tian^{1,2#}, WANG Lei^{1,2}, KE Xi-song^{1,2}, QU Yi^{1,2}, ZHANG Xue^{1,2*}

(1. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Frontiers Science Center of TCM Chemical Biology, Shanghai 201203, China)

Abstract: Huachansu is a traditional Chinese medicine widely used in the clinic for cancer therapy, while the underlying mechanism is not fully clarified. This study was to investigate the targets and mechanisms of cinobufagin (CBG), an active component of Huachansu, in terms of blocking mitosis of cancer cells. Propidium iodide (PI) DNA staining was used to analyze the effect of CBG on cell cycle. The effect of CBG on mitosis of cancer cells was examined by α -tubulin and pericentrin staining after synchronization by a double thymidine block. Tubulin turbidity, tubulin polymerization and α -tubulin immunofluorescence assays were used to evaluate the effect of CBG on microtubule polymerization. CRISPR/Cas9 gene-editing technology was used to knockout microtubule-severing protein Katanin regulatory subunit B1 (KATNB1) in HCT116 cells, and the inhibitory effect of CBG on wild-type cells and knockout cells was measured by CCK-8. The engagement of CBG with KATNB1 was measured by CETSA and DARTS assays. The effect of CBG on KATNB1 protein and mRNA level was examined by Western blot and real-time PCR, respectively. Our data showed that CBG arrested HCT116 cell cycle

收稿日期: 2022-02-21; 修回日期: 2022-03-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703757, 81874210).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-21-51322419, E-mail: xuezhang@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0228

at the G₂/M phase, disrupted mitosis and induced centriole overduplication. CBG significantly inhibited tubulin polymerization *in vitro* and *in vivo*. The cytotoxicity of CBG inhibition on HCT116 was significantly attenuated upon KATNB1 depletion. Moreover, CBG bound to KATNB1 and decreased its protein level, while mutated KATNB1 weakened this effect. In conclusion, CBG inhibited microtubule polymerization *via* targeting KATNB1, thereby disrupting mitosis in cancer cells.

Key words: cinobufagin; cell cycle; mitosis; microtubule; KATNB1

传统中药蟾酥在我国有着悠久的用药历史,早在《神农本草经》就有记载,其性温、味辛,有毒,具有解毒、消肿、止痛、开窍醒神之功效^[1]。现代医药以古籍记载为理论依据,将中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑框蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 的干燥皮提取精制,研制出的抗肿瘤中药制剂华蟾素在我国临床上已有 30 余年的应用历史,主要应用于原发性肝癌、胰腺癌、消化道中晚期癌症及肺癌等肿瘤治疗^[2]。华蟾素单药治疗或与化放疗联用能显著延长肿瘤患者生存期和提高生活质量,是疗效确切的抗肿瘤传统中药^[3,4]。

华蟾毒精 (cinobufagin, CBG) 是蟾酥和华蟾素抗肿瘤的主要活性成分之一,研究表明华蟾毒精具有显著且广泛的抗肿瘤活性,对结肠癌、肝癌、骨肉瘤等都具有明显的治疗作用^[5-13]。目前的研究发现,华蟾毒精通过阻滞细胞周期、增强免疫应答^[5]、抗肿瘤血管生成^[9]和诱导细胞凋亡^[12-14]等发挥抗肿瘤作用,然而其抗肿瘤靶标尚不完全清楚,有待进一步阐明。

本课题组前期优化了基于“突变-失活”的药物靶标鉴定新策略 (DrugTargetSeq)^[15],建立了华蟾毒精耐药的结肠癌单克隆细胞株,通过大规模高通量基因组测序发现多个特异性点突变关键蛋白,包括 RNA 拓扑异构酶 TOP3 β 、转运驱动蛋白结合蛋白 2 (trafficking kinesin protein 2, TRAK2) 和微管切割蛋白 Katanin 调节亚基 B1 (Katanin regulatory subunit B1, KATNB1),表明 CBG 的抗肿瘤作用与多个潜在靶标有关^[16]。其中 KATNB1 直接参与调节微管的动态平衡,其功能异常能引起微管异常聚合或解聚,抑制细胞有丝分裂而引起细胞死亡^[17]。值得注意的是,抑制细胞分裂也是 CBG 的重要抗肿瘤表型^[12-14],提示 KATNB1 是 CBG 抗肿瘤功能靶标。

材料与方法

材料 人结肠癌细胞 HCT116 和人宫颈癌细胞 HeLa 均购自中国科学院细胞库,人结肠癌 HCT116 华蟾毒精耐药细胞 C11 保存于本实验室;华蟾毒精 (北京中科质检生物技术有限公司);二甲基亚砜 DMSO、链

霉蛋白酶 pronase (Sigma 公司); RPMI 1640 培养基、MEM 培养基及胎牛血清 (Gibco 公司);双抗 penicillin-streptomycin (PS) (Invitrogen 公司); Cell Counting Kit-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (DOJINDO 公司); Tubulin 聚合分析试剂盒 (Cytoskeleton 公司); DAPI、4% 多聚甲醛溶液、Triton X-100、BSA 及 Thymidine/胸苷 (碧云天公司);碘化丙啶 (PI)/RNase staining buffer (BD Biosciences 公司); α -tubulin、Pericentrin、KATNB1、GAPDH 及 β -actin 抗体 (Proteintech 公司); Mouse-488 荧光二抗及 Rabbit-568 荧光二抗 (Cell Signaling Technology 公司); HER-山羊抗鼠二抗及 HER-山羊抗兔二抗 (Jackson Immuno Research 公司)。

细胞培养 HCT116 细胞和人结肠癌 HCT116 华蟾毒精耐药细胞 C11 用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗 PS 的 RPMI 1640 培养基, HeLa 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗 PS 的 MEM 培养基,均在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

PI染色-流式细胞术 将 HCT116 细胞以 2.5×10^5 个/孔密度接种到 6 孔板上,贴壁后给药处理 24 h,然后用 0.25% 胰蛋白酶对细胞进行消化,收集细胞并用预冷的 70% 乙醇进行固定, -20 °C 过夜处理。次日,细胞离心后,用预冷的 PBS 洗涤固定的细胞,然后将细胞离心,并用 500 μ L PI/RNase staining buffer 重悬细胞,进行避光孵育 15 min。使用流式细胞仪分析 DNA 含量。

细胞同步化 将 HeLa 细胞以 6 000 个/孔的密度接种于 48 孔板中,贴壁后加入含 2 mmol·L⁻¹ 胸苷 (Thy) 的培养基,作用 16 h。弃掉 Thy 培养基,用 PBS 洗 3 次,再换上新鲜培养基继续培养 8 h,重新加入 Thy 培养基 (浓度同上) 进行第 2 次阻断,作用 18 h。再弃掉 Thy 培养基, PBS 洗 3 次后换上普通培养基孵育来释放细胞。释放 7 h 后即得处于 G₂/M 期细胞,加药处理 24 h 进行免疫荧光实验。

免疫荧光实验 将 HeLa 细胞以 1×10^4 个/450 μ L 的密度接种到共聚焦皿中,细胞贴壁后给药。细胞用 4% 多聚甲醛固定, 0.1% Triton X-100 通透, 5% BSA 溶液封闭。再用一抗和二抗依次孵育,用 DAPI 染液染细胞核。使用高内涵成像系统进行拍照。

体外微管蛋白的聚合实验 纯化的 tubulin 蛋白

(纯度 > 99%) 于 4 °C 悬浮在含有 80 mmol·L⁻¹ PIPES、2 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.5 mmol·L⁻¹ EGTA、1 mmol·L⁻¹ GTP (pH 6.9) 和 15% 甘油的 G-PEM 缓冲液中, 并且同时进行药物处理。将混悬液转移到预热的 96 孔板中, 37 °C 下在 340 nm 处测量吸光度 (*A*) 值, 持续 30 min。

微管单体/聚体分离实验 HCT116 细胞用药物处理 1 h 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化并离心收集细胞。用 100 μL 低渗缓冲液 (1 mmol·L⁻¹ MgCl₂、2 mmol·L⁻¹ EGTA、0.5% NP-40、2 mmol·L⁻¹ PMSF、200 U·mL⁻¹ aprotinin、100 μg·mL⁻¹ soy bean trypsin inhibitor、5.0 mmol·L⁻¹ ε-amino caproic acid、1 mmol·L⁻¹ benzamidin 和 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 6.8) 裂解细胞。1.6×10⁴ ×g 离心 15 min 分离细胞膜和细胞骨架部分。上清液含有细胞膜微管蛋白 (游离性), 沉淀含有细胞骨架微管蛋白 (聚合型), 然后将其重新悬浮在 0.1 mL 低渗缓冲液中。通过免疫印迹实验检测游离型和结合型微管蛋白水平。

Western blot 实验 用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞, 置于冰上裂解 30 min, 然后进行离心、定量、变性制备样品。每个样品以 20 μg 蛋白量用 10% SDS 凝胶进行电泳, 并转移到 PVDF 膜上, 然后用 5% 脱脂奶粉进行封闭, 再用一抗和二抗依次孵育, 化学发光法检测条带。用 Image J 软件对条带进行灰度值分析。

CRISPR/Cas9 基因敲除技术 本研究通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对 HCT116 细胞中的 KATNB1 基因 exon3 和 exon20 之间的序列进行敲除, 建立 HCT116 细胞 KATNB1 敲除细胞系。设计 sgRNA1 (TGTAGC-CAGCAGCCGCCGGAGG) 靶向 exon3 和 sgRNA2 (GCTCGCGGAAGGTACTGCCATGG) 靶向 exon20, 并构建到 pL-CRISPR.EFS.GFP 载体 (57818, Addgene) 上, 用 Lipofectamine 3000 将 sgRNA1、sgRNA2 以 1:1 转染到 HCT116 细胞中, 培养 48 h 后, 用分选型流式细胞仪 (MoFlo XDP, Beckman Coulter) 对转染细胞进行分选, 得到的细胞以单细胞密度种于 96 孔板并进行扩大培养。然后对扩大的单克隆细胞进行 PCR 和 Western blot 在分子水平和蛋白水平上的验证, 以筛选出 KATNB1 敲除细胞系。

细胞热转变分析实验 (CETSA) 将 HCT116 细胞均等地接种在两个 10 cm 培养皿中, 并使其达到 80% 汇合后进行药物处理 1 h。用 0.25% 胰蛋白酶消化后将细胞重悬于 450 μL 含有蛋白酶抑制剂的 PBS 中, 并平均分配在 7 个 PCR 管中。将每个管中的细胞在指定温度下加热 3 min, 并在室温下保持 3 min。然后通过在液氮中冷冻 1 min 并在室温水里解冻 1 min

的 3 个循环来裂解加热的细胞。将细胞裂解液在 4 °C 以 2×10⁴ ×g 离心 20 min。收集上清液用于蛋白质印迹分析。

药物亲和力反应靶标稳定性实验 (DARTS) HCT116 细胞用含有蛋白酶抑制剂的 M-PER 裂解液进行裂解。离心, 定量后用 PBS 将蛋白浓度定量在 4~6 mg·mL⁻¹。将蛋白液分装到 EP 管中, 在室温下与药物共同孵育 1 h 后, 再用浓度梯度 pronase 进行蛋白水解 30 min, 最后加入蛋白酶抑制剂终止消化。样品变性后用于 Western blot 实验。

CCK-8 实验 将 HCT116 及 C11 细胞以 5 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后进行给药处理。给药 72 h 后, 每孔按培养基:CCK-8 = 10:1 的比例加入 CCK-8 溶液, 37 °C 孵育约 1 h, 用酶标仪在波长 450 nm 下测定 *A* 值, 抑制率 = $A_{\text{小分子}}/A_{\text{DMSO}}$ 值。

实时荧光定量 PCR 实验 使用 TRIzol 从细胞中提取总 RNA, 通过琼脂糖凝胶检查提取的 RNA 的质量。使用 PrimeScript RT Master Mix 将总 RNA 反向转录成 cDNA。使用 PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix 进行定量 PCR, 作 3 个复孔, 检测 KATNB1 mRNA 水平, 以 β-actin mRNA 做为内参。KATNB1 的正向引物序列: 5'-GAGCGGTGCTTTGATGTGG-3', 反向引物序列: 5'-GTAGTCCTCGGCGTTCTGG-3'。β-Actin 的正向引物序列: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', 反向引物序列: 5'-CTCCTTAATGTACGCACGAT-3'。

统计学分析 应用 Image J 软件对 Western blot 条带进行灰度版定量分析; 应用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计分析, 所有实验均重复 3 次, 数值表示为 $\bar{x} \pm s$, 通过 student's *t*-test 检验分析两样本间差异情况, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果

1 华蟾毒精抑制肿瘤细胞有丝分裂

为检测华蟾毒精对肿瘤细胞周期的作用, 本研究通过 PI 染色后进行流式细胞术分析, 结果显示, HCT116 细胞经华蟾毒精处理后, 细胞周期阻滞在 G₂/M 期 (图 1A)。本课题组进一步研究华蟾毒精对肿瘤细胞有丝分裂期的作用, 采用 Thy 双阻断法使 HeLa 细胞的细胞周期停留在有丝分裂期后, 加药处理 24 h 后, 使用免疫荧光检测微管蛋白 α-tubulin 和中心粒周蛋白 pericentrin。紫杉醇 (taxol) 和长春新碱 (vincristine, VCR) 对有丝分裂具有确切的抑制作用, 作为阳性对照。根据免疫荧光实验结果, 对观察到的有丝分裂细胞的分布情况、总异常率及不同类型异常细胞占比进

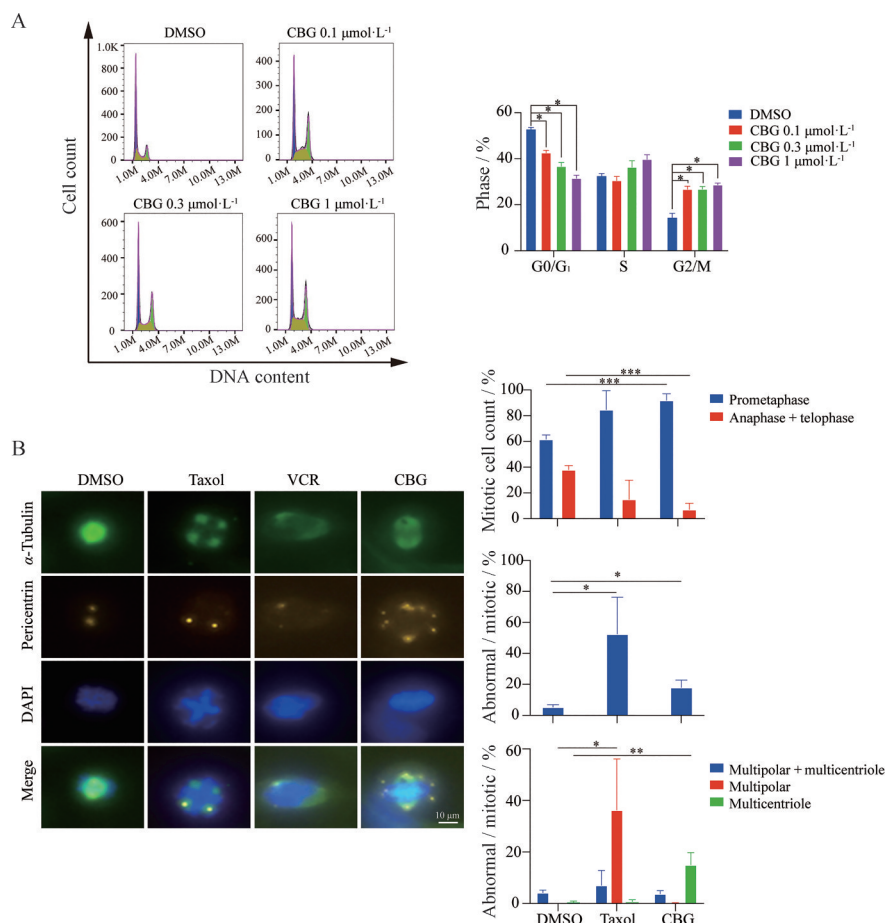


Figure 1 Cinobufagin (CBG) arrested cell cycle and inhibited mitosis. A: HCT116 cells were treated with DMSO, CBG (0.1, 0.3, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, DNA was then stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry; B: HeLa cells were synchronized by the double-thymidine-block and released. Synchronized cells were treated with DMSO, taxol (0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), vincristine (VCR, 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and CBG (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, then cells were analyzed by immunofluorescence with the indicated antibodies. Percentages of mitotic cells with abnormalities were calculated. The results performed statistical analysis on the distribution of the observed mitotic cells, the total abnormal rate, and the proportion of different types of abnormalities. After VCR treatment, cells in G₂/M phase could not be observed and counted. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

行统计分析。其中,长春新碱作用后,难以检测到有丝分裂期细胞,无法统计。统计结果显示:紫杉醇和华蟾毒精处理后,均明显提高有丝分裂前中期细胞占比率,显著增加有丝分裂细胞异常率;紫杉醇主要促进多极纺锤体的形成,而华蟾毒精主要促进中心粒的异常扩增(图1B)。

2 华蟾毒精抑制微管聚合

微管是细胞骨架的主要成分之一,在细胞分裂中起着重要作用,是抑制细胞分裂类抗肿瘤药物的有效靶标^[18]。正常条件下,微管动力学高度可控,游离型和结合型微管蛋白二聚体之间保持着动态平衡^[19]。经典抗肿瘤药物紫杉醇和长春新碱均属于微管蛋白结合剂(tubulin-binding agents, TBAs),紫杉醇促进微管蛋白的聚合,使微管稳定并抑制肿瘤细胞的有丝分裂^[20];长春新碱直接结合微管蛋白抑制微管形成,使肿瘤细

胞的有丝分裂阻滞在中期^[21](图2)。

本研究通过体外实验测定华蟾毒精对微管蛋白聚合的作用,同时,利用Western blot实验测定华蟾毒精对肿瘤细胞HCT116游离型和结合型微管的作用。结果显示,华蟾毒精在体内外均能够显著抑制微管的聚合(图2A、B)。此外, α -tubulin免疫荧光实验结果显示,华蟾毒精处理后, α -tubulin荧光显著减弱(图2C)。综上所述,华蟾毒精可显著抑制微管的聚合,促进微管的解聚,扰乱肿瘤细胞微管的动态平衡。

3 华蟾毒精依赖 KATNB1 抑制肿瘤细胞

本课题组前期通过建立华蟾毒精耐药细胞系并进行转录组RNA-Seq测序,对测序数据进行基因突变分析,发现了在多个耐药细胞中特异性突变的候选靶标(图3A)。其中KATNB1作为微管剪切蛋白Katanin的亚基之一,对微管的动态变化具有重要作用^[17]。而上

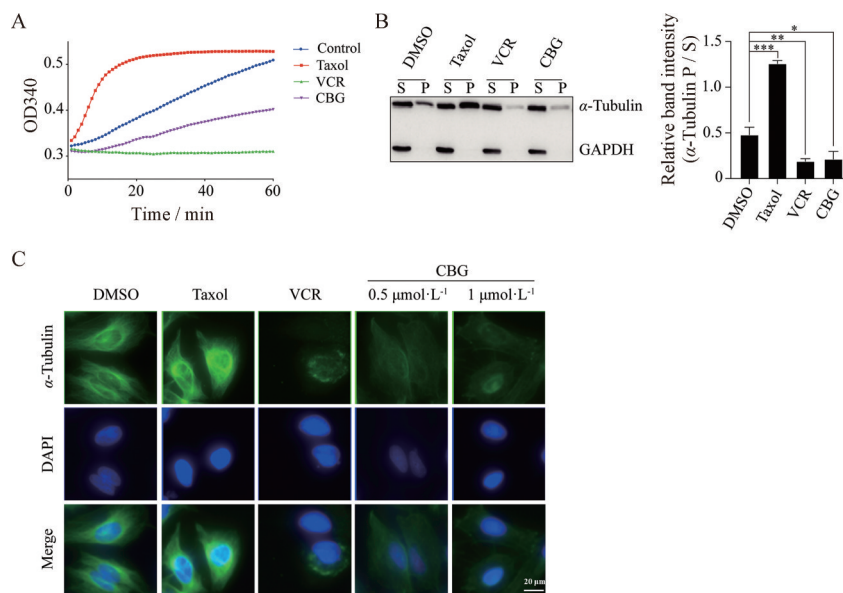


Figure 2 CBG inhibited microtubule polymerization. A: *In vitro* tubulin polymerization assay was used to test the effect of CBG, taxol, VCR on tubulin assembly; B: Western blot assay to detect the soluble (S) and polymerized (P) tubulin fractions with anti- α -tubulin antibody. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; C: After being treated with taxol ($0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), VCR ($0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and CBG ($0.5, 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), HeLa cells were processed for anti- α -tubulin immunofluorescence

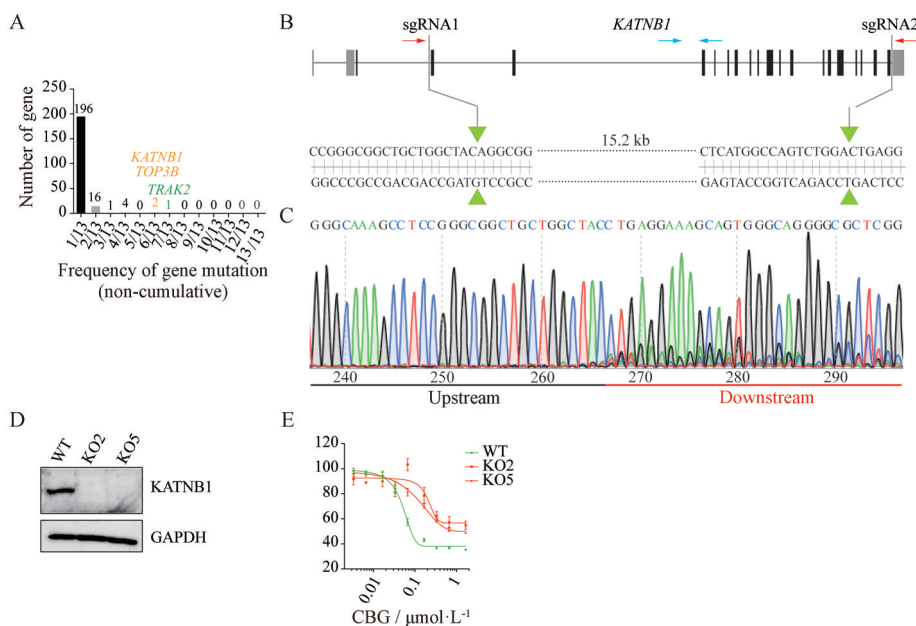


Figure 3 Katanin regulatory subunit B1 (KATNB1) was an anti-tumor target of CBG. A: RNA-seq analysis of gene mutations in HCT116 cells after CBG resistance; B: Schematic of CRISPR/Cas9 gene-editing technology based KATNB1 genomic DNA deletion, two sgRNAs (sgRNA1 and sgRNA2) were designed to target exon3 and exon20. Two primer pairs (red and blue arrows) are designed for PCR-based verification; C, D: KATNB1 knockout clones KO2 and KO5 were verified by PCR along with sequencing (C) and Western blot (D); E: HCT116 wild-type cells (WT) and KO2/KO5 were treated with CBG at a concentration gradient for 72 h, and the cell viability was detected by CCK-8 assay

述研究结果显示华蟾毒精具有显著的抑制微管聚合的作用, 这提示KATNB1可能是华蟾毒精抑制微管聚合的功能靶标。

因此, 本研究通过CRISPR/Cas9基因编辑技术构建KATNB1敲除细胞系(图3B), 研究华蟾毒精的抗肿

瘤活性是否依赖于KATNB1。KO2和KO5是KATNB1敲除成功的HCT116细胞系(图3C、D)。CCK-8的结果显示, KATNB1敲除后缓解了华蟾毒精对HCT116细胞的抑制作用, 表明KATNB1是华蟾毒精抗肿瘤的重要靶标(图3E)。

4 华蟾毒精直接靶向 KATNB1 并降低其蛋白水平

本研究通过细胞热转变分析实验 (CETSA) 和药物亲和力反应靶标稳定性实验 (DARTS) 从活细胞及裂解液两方面考察 CBG 和 KATNB1 的结合, 结果显示华蟾毒精能显著改变活细胞中 KATNB1 的热稳定性 (图 4A), 及裂解液中 KATNB1 对 pronase 酶解的耐受性 (图 4B), 提示华蟾毒精可能与 KATNB1 结合。C11 是对华蟾毒精耐药的 HCT116 细胞系 (图 4C), 其 KATNB1

基因 895 位点碱基 G 突变成 A (图 4D), 从而导致了 KATNB1 蛋白第 299 个氨基酸由缬氨酸突变为蛋氨酸 (V299M)。通过 CETSA 实验, 检测了华蟾毒精与突变的 KATNB1 间的结合作用, 结果显示, 突变的 KATNB1 (V299M) 与华蟾毒精不具有结合作用 (图 4E)。

此外, 通过 Western blot 实验考察了华蟾毒精对 KATNB1 蛋白水平的调控作用, 发现华蟾毒精能够降低 KATNB1 蛋白水平, 并且呈现出明显的浓度依赖性

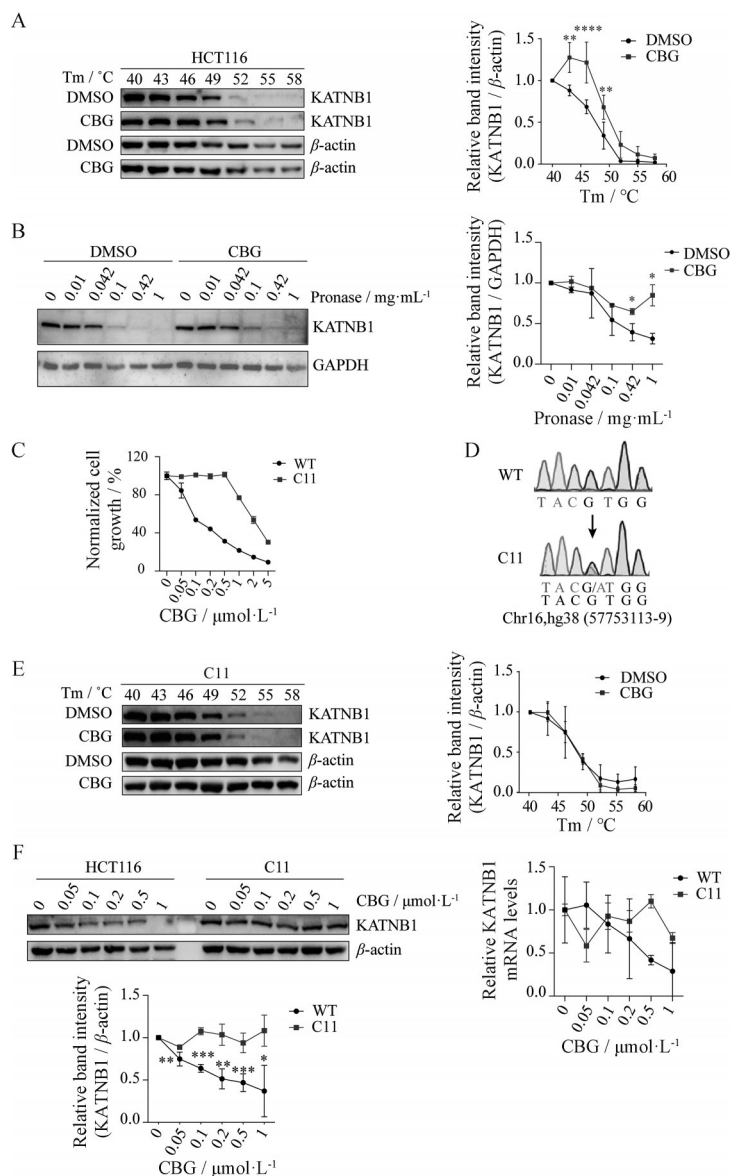


Figure 4 CBG directly bound to KATNB1 and promoted protein degradation. A, B: Cellular thermal shift assay (CETSA) and drug affinity responsive target stability (DARTS) to examine the binding of CBG to KATNB1 in HCT116 cells. Data was analyzed between CBG and DMSO at each of the T_m /pronase, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs DMSO; C: Quantitative analysis of colony formation: CBG resistance was validated of C11 cells by colony formation (data not shown); D: Sequencing the KATNB1 gene of C11 cells identified a G-to-A point mutation at nucleotide position 895; E: CETSA to examine the engagement of CBG to KATNB1 in C11 cells; F: HCT116 WT cells and C11 cells were treated with CBG at a concentration gradient, the protein level of KATNB1 was detected by Western blot and the mRNA level of KATNB1 was detected by RT-PCR assay. Data was compared to the blank control in WT or C11, respectively. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs C11

(图4F)。而在华蟾毒精耐药细胞系C11中,华蟾毒精对突变的KATNB1(V299M)蛋白无明显作用(图4F)。同时,本研究也检测了华蟾毒精对KATNB1 mRNA的作用,与蛋白趋势一致的是CBG显著降低野生型HCT116细胞中KATNB1的mRNA水平,但对突变的C11中KATNB1 mRNA影响较小(图4F);但值得注意的是,野生型细胞中,0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CBG不影响KATNB1 mRNA但降低其蛋白水平(图4F),且0.1~0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CBG对KATNB1蛋白的降低作用也超过对其mRNA的作用(图4F)。以上结果提示,CBG降低KATNB1蛋白水平在低浓度下可能与促进其降解相关,而随着浓度的升高CBG会影响KATNB1转录及蛋白降解等多条途径。

讨论

蟾酥及华蟾素具有良好的抗肿瘤活性,在我国被广泛应用于临床肿瘤治疗^[3,4]。国内外研究发现,华蟾毒精是蟾酥和华蟾素抗肿瘤活性的主要成分之一,在肿瘤治疗上具有重要的应用前景^[5]。尽管华蟾毒精抗肿瘤药理作用被广泛报道,但其分子靶标还需进一步研究。本课题组前期发现3个华蟾毒精的候选靶标TOP3 β 、KATNB1、TRAK2(图3A)。其中,已经证实RNA拓扑异构酶TOP3 β 是华蟾毒精抗肿瘤分子靶标之一,华蟾毒精靶向TOP3 β 诱导应激颗粒、R-Loop及DNA损伤,从而起到抗肿瘤作用^[16]。

KATNB1是微管切割酶Katanin亚基之一,在细胞分裂中起着重要作用^[22]。值得注意的是,KATNB1虽然最早被鉴定为微管切割蛋白,具有破坏微管细胞骨架作用,但近期有研究报道,KATNB1对微管具有双重作用,动态调节微管的聚合和解聚,严格调控微管的动态平衡^[23]。此外,KATNB1定位于中心体和纺锤体,研究发现KATNB1缺失会引起纺锤体结构异常及中心粒异常增多^[24]。因此本研究聚焦在华蟾毒精对肿瘤细胞有丝分裂的作用,并进一步探索华蟾毒精与KATNB1之间的关系。

本研究结果表明,华蟾毒精促使有丝分裂期中心粒异常扩增,抑制肿瘤细胞有丝分裂,将细胞周期阻滞在G₂/M期(图1)。华蟾毒精对肿瘤细胞有丝分裂的作用与KATNB1功能缺失的表型一致,提示华蟾毒精可能通过KATNB1抑制肿瘤细胞的有丝分裂。此外,本研究发现华蟾毒精对微管聚合具有显著的抑制作用(图2),研究报道,微管切断酶Katanin活性的丧失导致微管质量减少^[25],这进一步提示华蟾毒精可能通过KATNB1作用抑制微管形成。

进一步,通过建立KATNB1敲除的肿瘤细胞系,

本研究发现KATNB1缺失后显著缓解华蟾毒精对肿瘤细胞的抑制作用(图3E),提示KATNB1是华蟾毒精抗肿瘤活性的功能靶标。在华蟾毒精调控KATNB1机制研究方面,华蟾毒精能与KATNB1结合,并降低KATNB1的蛋白水平(图4A、B、F),KATNB1 V299M突变阻断二者的结合及华蟾毒精减少KATNB1蛋白的作用(图4E、F),这些结果提示,华蟾毒精可能是通过减少KATNB1蛋白而抑制微管聚合,且提示了KATNB1 299位缬氨酸可能是华蟾毒精的潜在重要位点。不过更直接确切的华蟾毒精与KATNB1结合及299位缬氨酸的重要性还有待进一步研究。

综上所述,本研究结果表明华蟾毒精通过靶向微管切割蛋白KATNB1,下调其蛋白水平,从而抑制微管聚合、诱导中心粒异常增生,起到抑制肿瘤细胞有丝分裂的作用。本研究在课题前期研究基础上,进一步阐明华蟾毒精抗肿瘤的分子机制和靶标,证实华蟾毒精通过多靶点发挥抗肿瘤作用,对提高华蟾毒精临床用药的准确性及新型抗肿瘤药物的开发均具有积极意义。此外,本研究还发现华蟾毒精对有丝分裂的作用主要为促进中心粒的异常生成,这与TBAs紫杉醇及长春新碱的作用均不一样(图1B),提示华蟾毒精是一种新的有丝分裂抑制剂。微管蛋白是抗肿瘤药物研究的重要靶点之一,但近年来越来越多研究发现TBAs在临床上的应用容易出现多药耐药的问题^[26],从而促使研究人员将目光转向其他有丝分裂关键因子^[27],本研究结果提示微管剪切蛋白KATNB1可能是一个新的肿瘤治疗靶标。

作者贡献: 张雪负责课题总体设计;张雪、张琦和汪磊负责完成实验的具体实施;张雪、王甜甜负责实验数据分析、文章撰写;柯细松和屈伟对课题进行及论文撰写进行指导。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Lei ZQ, Chen YS, Gao XM. Traditional Chinese Medicine (中医学)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1998: 274-275.
- [2] Li QW, Sun T, Hu KW. Research progress on anti-tumor mechanism of cinobufagin [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2010, 25: 2075-2078.
- [3] Meng Z, Yang P, Shen Y, et al. Pilot study of Huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, non-small cell lung cancer, or pancreatic cancer [J]. Cancer, 2009, 115: 5309-5318.
- [4] Qin TJ, Zhao XH, Yun J, et al. Efficacy and safety of gemcitabine-oxaliplatin combined with huachansu in patients with advanced gallbladder carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14: 5210-5216.

- [5] Wu JH, Cao YT, Pan HY, et al. Identification of antitumor constituents in Toad venom by spectrum-effect relationship analysis and investigation on its pharmacologic mechanism [J]. *Molecules*, 2020, 25: 4269.
- [6] Bai Y, Wang X, Cai M, et al. Cinobufagin suppresses colorectal cancer growth *via* STAT3 pathway inhibition [J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11: 200-214.
- [7] Li X, Chen C, Dai Y, et al. Cinobufagin suppresses colorectal cancer angiogenesis by disrupting the endothelial mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor 1 α axis [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110: 1724-1734.
- [8] Apryani E, Ali U, Wang ZY, et al. The spinal microglial IL-10/ β -endorphin pathway accounts for cinobufagin-induced mechanical antiallodynia in bone cancer pain following activation of α 7-nicotinic acetylcholine receptors [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17: 75.
- [9] Jin X, Wang J, Zou S, et al. Cinobufagin triggers defects in spindle formation and cap-dependent translation in liver cancer cells by inhibiting the AURKA-mTOR-eIF4E axis [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48: 651-678.
- [10] Kim GH, Fang XQ, Lim WJ, et al. Cinobufagin suppresses melanoma cell growth by inhibiting LEF1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 6706.
- [11] Pan Z, Luo Y, Xia Y, et al. Cinobufagin induces cell cycle arrest at the S phase and promotes apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109763.
- [12] Zhang L, Liang B, Xu H, et al. Cinobufagin induces FOXO1-regulated apoptosis, proliferation, migration, and invasion by inhibiting G9a in non-small-cell lung cancer A549 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 291: 115095.
- [13] Niu J, Wang J, Zhang Q, et al. Cinobufagin-induced DNA damage response activates G₂/M checkpoint and apoptosis to cause selective cytotoxicity in cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21: 446.
- [14] Pan Z, Zhang X, Yu P, et al. Cinobufagin induces cell cycle arrest at the G₂/M phase and promotes apoptosis in malignant melanoma cells [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 853.
- [15] Kasap C, Elemento O, Kapoor TM. DrugTargetSeqR: a genomics- and CRISPR-Cas9-based method to analyze drug targets [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 626-628.
- [16] Zhang X, Wang L, Zhang Q, et al. Small molecule targeting topoisomerase 3 β for cancer therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 174: 105927.
- [17] McNally FJ, Vale RD. Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules [J]. *Cell*, 1993, 75: 419-429.
- [18] Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 253-265.
- [19] Akhmanova A, Steinmetz MO. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16: 711-726.
- [20] Crossin KL, Carney DH. Microtubule stabilization by taxol inhibits initiation of DNA synthesis by thrombin and by epidermal growth factor [J]. *Cell*, 1981, 27: 341-350.
- [21] Bensch KG, Marantz R, Wisniewski H, et al. Induction *in vitro* of microtubular crystals by vinca alkaloids [J]. *Science*, 1969, 165: 495-496.
- [22] Hartman JJ, Mahr J, McNally K, et al. Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit [J]. *Cell*, 1998, 93: 277-287.
- [23] Kuo YW, Howard J. Cutting, amplifying, and aligning microtubules with severing enzymes [J]. *Trends Cell Biol*, 2021, 31: 50-61.
- [24] Hu WF, Pomp O, Ben-Omran T, et al. Katanin p80 regulates human cortical development by limiting centriole and cilia number [J]. *Neuron*, 2014, 84: 1240-1257.
- [25] Vemu A, Szczesna E, Zehr EA, et al. Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation [J]. *Science*, 2018, 361: 6404.
- [26] Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 194-204.
- [27] Penna LS, Henriques JAP, Bonatto D. Anti-mitotic agents: are they emerging molecules for cancer treatment? [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 173: 67-82.