

Leukamenin E 诱导人宫颈癌 HeLa 细胞胞质骨架重排和迁移抑制的研究

杜世龙, 宁秀梅, 何苗, 李翡翠, 张会, 丁兰*

西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070

摘要:为了探索对映-贝壳杉烷二萜 leukamenin E 对细胞骨架和细胞迁移的影响, 该文采用 MTT 法、吉姆萨染色、流式细胞术及免疫荧光技术研究了 leukamenin E 诱导 HeLa 细胞的 3 种胞质骨架重排, 细胞迁移抑制及可能的作用机制。结果显示, 0.4 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 leukamenin E 可导致 G_1 期阻滞, 抑制细胞增殖, 使细胞形态及核形态发生显著变化, 细胞伪足减少以及“肾形核”细胞数量增多, 并抑制细胞迁移; Leukamenin E 可显著改变 HeLa 细胞微管和角蛋白纤维的排布, 诱导微管和角蛋白纤维在核周聚集, 但减少胞质中应力纤维数量。Leukamenin E 显著升高 HeLa 细胞内活性氧(ROS)水平, 但加入活性氧清除剂 NAC 可明显减弱 leukamenin E 诱导的细胞形态改变、细胞骨架重排以及细胞迁移的抑制作用, 表明活性氧途径与上述变化相关联。上述结果说明, leukamenin E 通过 ROS 水平升高调节相关信号途径, 导致 HeLa 细胞骨架重排而引起细胞及细胞核形态改变, 同时导致了细胞的迁移的抑制效应。

关键词:对映贝壳杉烷二萜; Leukamenin E; 细胞质骨架; 细胞迁移; 活性氧

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)7-1186-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.7.014

Leukamenin E-induced cytoskeletal rearrangement and migration inhibition in HeLa cells

DU Shi-long, NING Xiu-mei, HE Miao, LI Fei-fei, ZHANG Hui, DING Lan*

College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

Abstract: In order to explore the effects of leukamenin E, an *ent*-kaurane diterpenoid on cytoskeleton and cell migration, leukamenin E-induced cytoskeletal rearrangement and inhibition of cell migration were investigated by using MTT, Giemsa staining, flow cytometry and immunofluorescence assay. The results showed that 0.4-1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E inhibited the proliferation of HeLa cells through G_1 arrest, led to obvious change in cellular morphology and nuclear morphology, while reduced the number of pseudopods and increased the number of flattened nucleus. Moreover, the migration of HeLa cells was inhibited. Leukamenin E could significantly alter the arrangement of microtubules and keratin filaments, decrease stress filaments in the cytoplasm, and the aggregation of microtubules and keratin filaments into large bundles around the nucleus have been showed. Leukamenin E induced a significant increase in intracellular ROS levels. A radical scavenger NAC, reduced leukamenin E-induced cell morphology changes, cytoskeletal rearrangement and inhibition of cell migration, namely, these changes was associated with the increase of ROS. These results suggested that upregulation of ROS level induced by leukamenin E resulted in the rearrangement of HeLa cytoskeleton by regulating the related signal pathway, which leads to morphological changes of cells and nuclear, and inhibits cell migration.

Key words: *ent*-kaurane diterpenoid; leukamenin E; cytoskeleton; cell migration; ROS

真核细胞内的微丝、微管和中间纤维通过与其结合蛋白相互连接, 形成了高度有序的三维网络状

的胞质骨架系统, 它们参与细胞内物质运输、信息传递、细胞分裂、细胞迁移以及细胞形态维持等关键性细胞生命过程。细胞骨架的动力学过程受到高度调控以服务于细胞生命活动的需求, 其组装失调将导致细胞生长抑制, 细胞分裂停滞, 甚至细胞凋亡发

收稿日期: 2020-09-17 接受日期: 2020-12-10

基金项目: 国家自然科学基金(31660101, 30960464)

* 通信作者 E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn

生^[1]。一些抗肿瘤药物可通过改变细胞骨架的解聚和聚合作用,破坏微管的动态平衡,进而抑制细胞增殖,发挥抗肿瘤作用。植物源性抗癌药物长春花生物碱和紫杉烷类药物可与 β -tubulin结合,干扰微管骨架的动力学过程,用于治疗多种肿瘤,包括乳腺癌、肺癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、急性白血病等^[2]。以细胞骨架及其相关蛋白为靶点的抗肿瘤药物的研究与发现已成为非常活跃的前沿研究领域^[1]。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)作为细胞内的信号分子,参与细胞增殖和分化等重大细胞生命过程^[3]。在肿瘤细胞中由于代谢通路发生改变,ROS的含量增多,特别是 H_2O_2 显著增加,使肿瘤细胞对ROS水平的变化更为敏感,因而ROS生成和抗氧化防御对细胞内组分的特定修饰被确定为癌症治疗的靶点^[4]。研究显示,由NADPH氧化酶和其他来源产生的ROS可直接修饰微丝、微管和中间丝蛋白而对其组装-解组装的动态过程产生影响^[5],或通过相关信号通路活化细胞骨架上游Rho GTP酶而重塑细胞骨架^[6]。NADPH氧化酶介导的胞内氧化应激还对细胞骨架相关疾病有重要的调节作用^[6]。近年来,研究者对ROS参与细胞骨架动力学调节产生了广泛兴趣。

香茶菜属植物在我国分布90余种,供药用的约有30余种,其中冬凌草(*Isodon rubescens*)曾被收入《中国药典》,主要用于抗菌消炎及抗肿瘤等疾病的治疗^[7]。冬凌草素(oridonin)作为冬凌草的主要活性成分,其抗癌机制已有较深入研究,它的结构修饰物已作为抗白血病药物进入一期临床试验^[8]。现已发现对映-贝壳杉烷二萜约1300余种,在香茶菜属植物的枝叶中含量尤为丰富,该类化合物显示了广泛的抗癌活性,有望从中发现新的抗癌药物^[8]。目前仅有冬凌草素等极少数的对映-贝壳杉烷二萜的抗癌机制有较深入系统的研究,其他该类二萜的相关研究还很欠缺,但近年来也取得了一些重要进展。近年来,发现某些对映-贝壳杉烷二萜可作用于细胞骨架系统而发挥抗癌活性。例如,pharicin A直接靶向BubR1蛋白而激活纺锤体组装检查点,阻止细胞中期向后期转换,抑制白血病细胞Raji和Jurkat的有丝分裂期^[9];wangzaozin A和epinodosin分别引起HeLa细胞和HL-60细胞骨架(微丝、微管和中间丝)重排^[10,11],与其诱导细胞分化相关联;leukamenin E还能诱导HUVECs和PLC细胞的角蛋白磷酸化进而阻滞角蛋白纤维网络正常组装^[12,13]。

本文继续报道leukamenin E对HeLa细胞的3种骨架纤维(微丝、微管及角蛋白纤维)重排的影响以及所导致的细胞生长和迁移抑制的可能机制,为阐明对映-贝壳杉烷二萜类化合物的抗癌分子机制提供线索,也为该化合物的进一步开发应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂与受试化合物

DMEM培养基、MTT、吉姆萨染色剂、碘化丙啶(propidium iodide, PI)及TRITC Phalloidin(Sigma公司);Pan-Keratin Mouse mAb、 α -tubulin Mouse mAb(Cell Signaling Technology公司);Goat anti-mouse IgG-FITC(Santa Cruz公司);胰蛋白酶(trypsin,中国生工生物公司);RNase A(Solarbio);新生小牛血清(中国杭州四季青生物技术有限公司);荧光探针DCFH-DA(2,7-dichlorofluorescein-diacetate)、抗氧化剂NAC(*N*-acetyl-*L*-cysteine)(江苏碧云天生物技术研究所),其他试剂均为国产分析纯。

对映-贝壳杉烷型二萜leukamenin E由本实验室从甘肃产总序香茶菜(*Isodon racemosa*(Hemsl) Hara)中分离得到,采用紫外,红外,质谱,核磁共振等波谱学方法对其结构进行了鉴定^[14]。用DMSO溶解leukamenin E(纯度大于99.5%),配制成10 mmol/L的母液于4℃储存备用。本实验体系中助溶剂DMSO终浓度小于0.01%,对细胞的生长无影响。Leukamenin E的分子结构如图1。

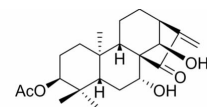


图1 Leukamenin E的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of leukamenin E

1.1.2 实验仪器

CO₂培养箱(Forma Scientific,美国),超净工作台(苏净集团,江苏),倒置显微镜(Olympus CKX41SF,日本),正置荧光显微镜(Leica DMI4000B,德国),高速低温离心机(Beckman Coulter Allegra64R,美国),流式细胞仪(Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC Flow Cytometer,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

人宫颈癌细胞株HeLa购自中科院上海典藏细胞库。细胞培养于含10%小牛血清、100 U/mL青

霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的恒温培养箱中培养。

1.2.2 MTT 法检测 leukamenin E 对 HeLa 细胞生长的影响

取对数生长期的 HeLa 细胞,以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板,贴壁培养 24 h 后,加入含有不同浓度 leukamenin E 的培养基,继续培养 24 或 48 h 后每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL),孵育 4 h 后弃去培养基,加入 150 μL DMSO,震荡 10 min,490 nm 处测量 OD 值。

1.2.3 平板集落形成法检测 leukamenin E 对 HeLa 细胞集落形成的影响

取对数生长期的 HeLa 细胞,以 100 个/孔的密度接种于 24 孔培养板中,24 h 后加入与“1.2.2”相同的受试药物浓度,培养 7 天后用甲醇固定,吉姆萨染色,在显微镜下记录每孔的细胞集落数(≥ 50 个细胞为一个集落)。

1.2.4 流式细胞术检测 leukamenin E 对 HeLa 细胞周期的影响

细胞接种及药物的加入与“1.2.2”所述相同。当细胞培养 48、72 h 后收集细胞;预冷的 PBS (pH7.4)洗 2 次,离心,弃上清。加入预冷的 70% 乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,1 200 rpm 离心 5 min,弃固定液后用 PBS 洗 2 次,加入 RNase A (终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后,再加入 PI (终浓度 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)避光孵育 30 min 后,260 目尼龙网过滤,上机检测。

1.2.5 吉姆萨染色观察 leukamenin E 对 HeLa 细胞及细胞核形态的影响

细胞接种密度与药物的处理见“1.2.2”。在细胞培养 48 h 和 72 h 后于倒置显微镜下观察细胞形态并拍照,且对细胞伪足进行定量分析^[15]。在细胞培养 48、72 h 后,取出细胞爬片,PBS 洗 2 次,用甲醇-冰乙酸(3:1)固定 30 min,晾干后用吉姆萨染液染色 20 min,用蒸馏水冲洗干净,于显微镜下观察细胞核形态并拍照。

1.2.6 划痕法检测 leukamenin E 对 HeLa 细胞迁移的影响

取对数生长期的 HeLa 细胞,以 5×10^4 个/mL 密度接种于 24 孔板,待细胞培养 24 h 后,加入丝裂霉素(终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理 2 h,用灭菌的 10 μL 枪头在每孔底部中间划一窄线,用培养基洗去漂浮细胞,加入不同浓度的药物。药物处理 24、48 h 后置

细胞培养板于倒置显微镜下观察拍照。

1.2.7 TRITC Phalloidin 检测 leukamenin E 对 HeLa 细胞微丝的影响

细胞接种及药物的加入与“1.2.2”所述相同。待细胞培养 48、72 h 后取出细胞爬片,用 PBS (pH7.4)洗 3 次/5 min,加入 4% 甲醛室温下固定 15 min,洗去固定液,PBS (pH7.4)洗 3 次/5 min;避光加入 TRITC Phalloidin,置于湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后用 PBS (pH7.4)洗 3 次,封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.8 间接免疫荧光技术检测 leukamenin E 对 HeLa 细胞微管的影响

细胞接种、药物浓度、细胞爬片及固定与“1.2.2”所述相同。细胞固定后于室温下透化 15 min (PBS 含 0.3% Triton X-100);吸去透化剂,加一抗置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;PBS (pH7.4)洗 3 次后加二抗避光孵育 2 h;用 PBS 洗 3 次后封片,在荧光显微镜下用同样的拍摄参数进行观察、拍照。

1.2.9 间接免疫荧光技术检测 leukamenin E 对 HeLa 细胞角蛋白纤维的影响

细胞接种及药物的加入与“1.2.2”所述相同。药物处理 48、72 h 后,取出细胞爬片,PBS (pH8.0)洗 3 次/5 min;用预冷的甲醇在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 固定 5 min 后用 PBS (pH8.0)洗 3 次/5 min;室温下封闭 1 h (封闭缓冲液:5% 山羊血清,0.3% Triton X-100 的 PBS 液)后,加一抗置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜;PBS (pH8.0)洗 3 次后加二抗避光孵育 2 h,最后 PBS (pH8.0)洗 3 次后封片,在荧光显微镜下用同样的拍摄参数进行观察、拍照。

按照上述相同的细胞接种浓度,用吉姆萨染色、划痕法和免疫荧光技术分别测定了 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ NAC 单独或联合 1.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ leukamenin E 对 HeLa 细胞形态、细胞迁移以及 3 种细胞骨架纤维(微管、微丝和角蛋白纤维)重排的影响。

1.2.10 流式细胞术检测 leukamenin E 对 HeLa 细胞聚合态纤维骨架含量的影响

细胞接种及药物的加入与“1.2.2”所述相同。待细胞培养 48 h 后,消化,用 1 200 rpm 离心 5 min 收集细胞,之后对细胞的处理方法同“1.2.7”“1.2.8”和“1.2.9”。PBS 每次清洗后用 1 200 rpm 离心 5 min 收集细胞。260 目尼龙网过滤,上机检测。

1.2.11 流式细胞术检测 leukamenin E 对 HeLa 细胞内 ROS 水平的影响

取对数生长期的 HeLa 细胞,以 1×10^4 个/mL

密度接种于 6 孔板,不同药物处理后离心收集各组细胞,PBS 清洗后加入 DCFH-DA 荧光探针染色,收集细胞,PBS 清洗去除未进入细胞内的 DCFH-DA,上机检测。

1.2.12 统计学分析

每组处理组随机取 50 个细胞,采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析平均荧光强度。细胞迁移距离采用 Image J 1.52a 软件测量分析。柱形图和折线图使用 Origin 2018 软件制作。实验数据以 mean \pm SD 表示($n = 3$),显著性差异分析用 SPSS 23.0 软件。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 实验结果

2.1 Leukamenin E 导致 HeLa 细胞的周期阻滞及细胞的增殖抑制

不同浓度的 leukamenin E 处理 HeLa 细胞 24、48 h 后,用 MTT 法检测细胞活力(见图 2A)。如图 2A 所示,与对照相比,0.4 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E 对 HeLa 细胞的增殖无明显影响,而 0.6 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E 显示了显著的抑制效应,其最高抑制率为 20% (1.0 $\mu\text{mol/L}$, 48 h)。同样,leukamenin E

对 HeLa 细胞的集落形成能力也有显著的抑制作用。如图 2B 所示,对照组的细胞集落形成数目最多(63.2 ± 3.3),随着药物浓度的依次升高,HeLa 细胞的集落形成能力明显下降,各处理组与对照组相比均具有显著差异。

进一步用流式细胞术检测了 0.4 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E 对 HeLa 细胞周期的影响。如图 2C 所示,leukamenin E 导致明显的 G_1 期阻滞。48 h 对照组 G_1 期细胞比率为 46.9%,0.4、0.6、0.8 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组 G_1 期细胞比率分别为 51.7%、55.5%、57.5% 和 60.1%,分别增加了 4.8%、8.6%、11% 和 13.3%;同时,各处理组的 G_2 期细胞比率也有所增加,而 S 期细胞数出现下降,在 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时下降了 17.9% (见图 2C)。72 h 处理组显示了与 48 h 处理组相似的 G_1 期阻滞效应:与对照组相比,72 h 药物处理组 G_1 期细胞分别增加了 4.9%、6.3%、10.3% 和 11.8%。同时 S 期细胞比率也出现下降,但 G_2 期细胞变化不大(见图 2D)。

上述结果表明 0.6 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E 通过对 HeLa 细胞的 G_1 期阻滞而抑制其增殖。

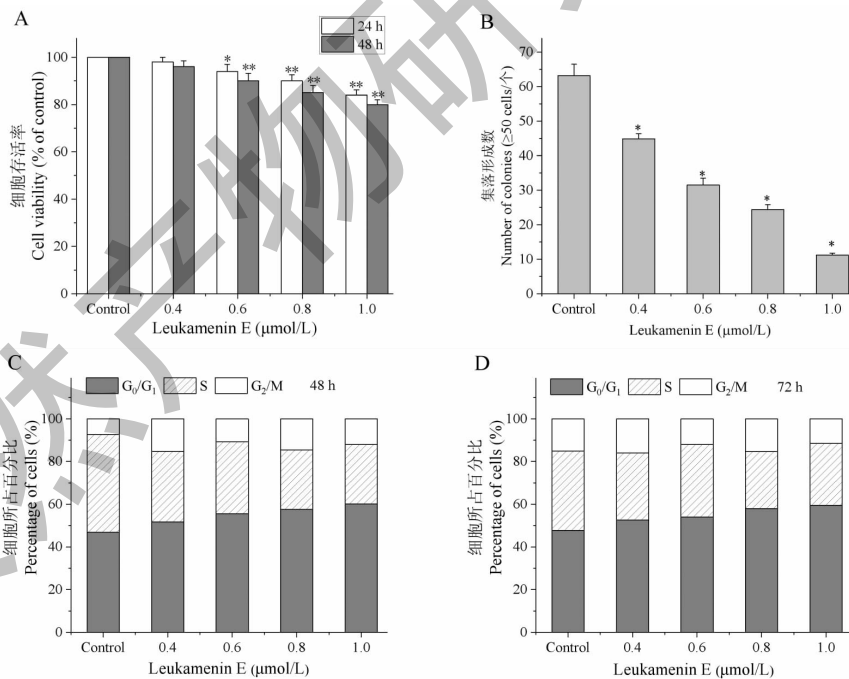


图 2 Leukamenin E 对 HeLa 细胞增殖和细胞周期的影响

Fig. 2 Effects of leukamenin E on HeLa cells proliferation and cell cycle

注:A:Leukamenin E 对 HeLa 细胞的增殖抑制效应;B:Leukamenin E 抑制 HeLa 细胞集落形成能力,与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;C、D:48 h 和 72 h 时 leukamenin E 对 HeLa 细胞周期的影响。Note:A:Leukamenin E inhibits proliferation of HeLa cells;B:Leukamenin E inhibits the colony forming ability of HeLa cells, compared with control,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;C and D:Graph depicts the effects of leukamenin E on HeLa cell cycle at 48 h and 72 h.

2.2 Leukamenin E 诱导 HeLa 细胞及细胞核形态的改变

不同浓度 leukamenin E 处理 HeLa 细胞 48 h 和 72 h 后的细胞形态如图 3A 所示,对照组细胞形态呈不规则多边形,处理组的细胞的整体形态呈现两极伸长,向长条形变化的趋势;细胞伪足呈现减少趋势,较高浓度处理组(0.6 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$)显示了显

著或极显著差异(见图 3C、D)。处理组中某些细胞两端的伪足拉伸延长呈细丝状,尤其在高浓度和长时间处理组中,这类细胞明显增多,还观察到长丝状伪足交织成网状的现象。

进一步通过吉姆萨染色观察细胞核形态的变化。从图 3B 可以看出,对照组的细胞核体积较大,呈圆形或卵圆形,有多个核仁,核浆比值大;当不同

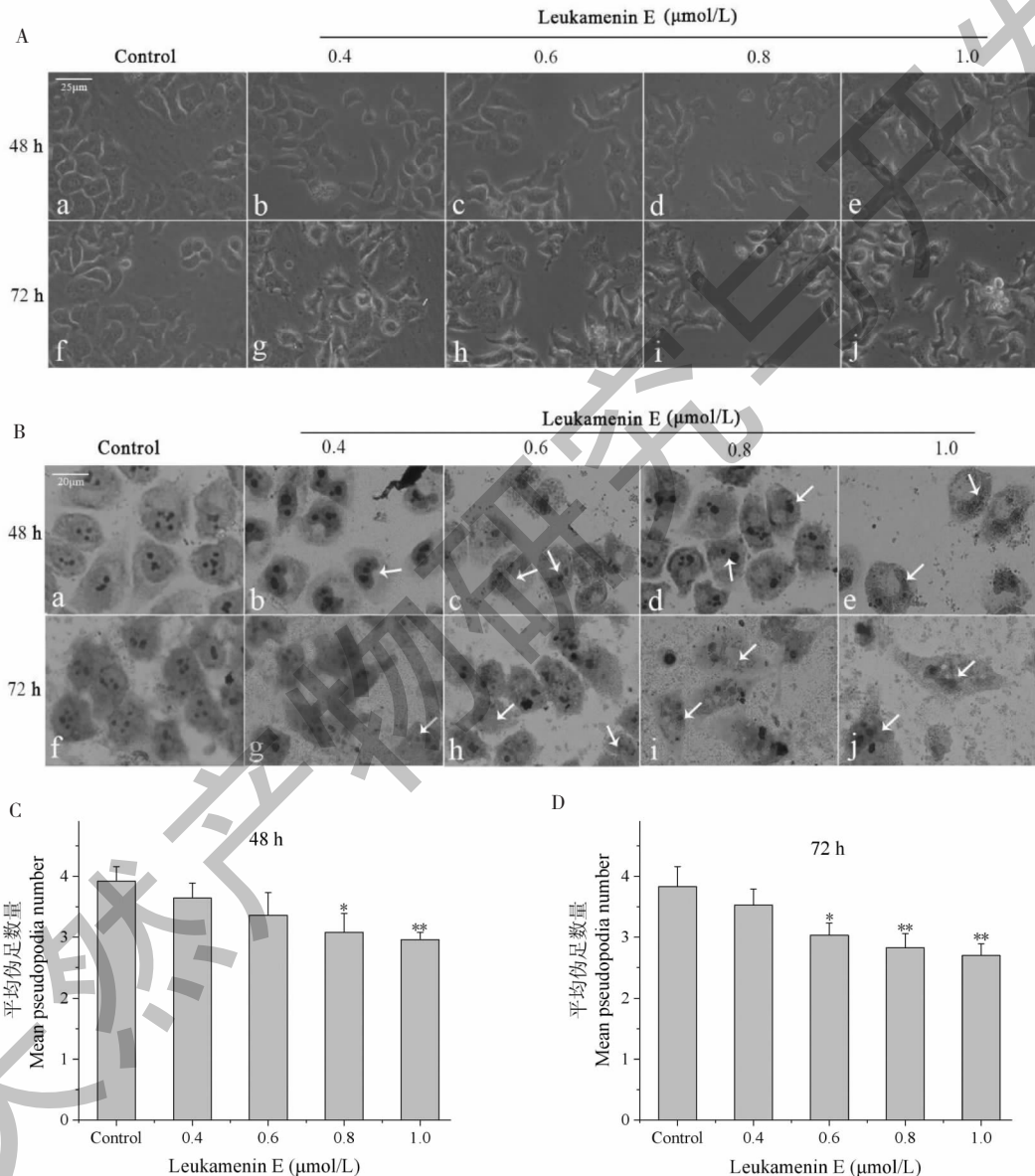


图 3 Leukamenin E 对 HeLa 细胞形态及核形态的影响

Fig. 3 Effects of leukamenin E on HeLa cells morphology and nuclear morphology

注:A:48 h 和 72 h 倒置显微镜下细胞形态的变化;B:48 h 和 72 h 细胞核形态的变化;C、D:Leukamenin E 处理 48 h 和 72 h 后 HeLa 细胞伪足数的定量分析,与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。图中箭头指示细胞核为“肾形核”的细胞。Note:A:Changes of cell morphology under the inverted microscope at 48 h and 72 h;B:Changes in nuclear morphology at 48 h and 72 h;C and D:Quantitative analysis of the pseudopodia number of HeLa cells treated with leukamenin E at 48 h and 72 h, compared with the control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. The arrow in the figure indicates a cell with a "kidney-shaped nucleus".

浓度药物处理 48 h 后,核体积变小,核浆比值下降,核形态改变成为“肾形”的细胞比率增多,并发现在“肾形核”凹处其细胞质着色较浅,呈小空泡样结构;当药物处理 72 h 后,核体积和核浆比值进一步下降,但“肾形核”比率与 48 h 处理组相比却有所减少,多数细胞核呈较小的椭圆形。核体积和核浆比值下降表明细胞代谢活动有所下降,而“肾形核”增多提示细胞骨架尤其是微管骨架可能有显著重排。

2.3 Leukamenin E 抑制 HeLa 细胞的迁移

划痕实验检测 leukamenin E 对 HeLa 细胞迁移

的变化结果如图 4 所示。在 24 h 处理组中对照组细胞迁移明显,其划痕愈合率为 $51\% \pm 2.0\%$,而 0.6、0.8 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 药物处理组的划痕愈合率分别为 $43.5\% \pm 4.0\%$ 、 $31.4\% \pm 3.0\%$ 和 $23.7\% \pm 3.0\%$ (图 4B),表明 leukamenin E 对细胞的迁移有明显的抑制效应;48 h 后对照组大部分细胞已迁移靠近划痕中线,其划痕愈合率为 $62.7\% \pm 5.0\%$,而 0.6、0.8 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞的迁移受到明显的抑制,其划痕愈合率分别为 $51.0\% \pm 2.0\%$ 、 $36.9\% \pm 3.0\%$ 和 $29.4\% \pm 2.0\%$ (见图 4C)。

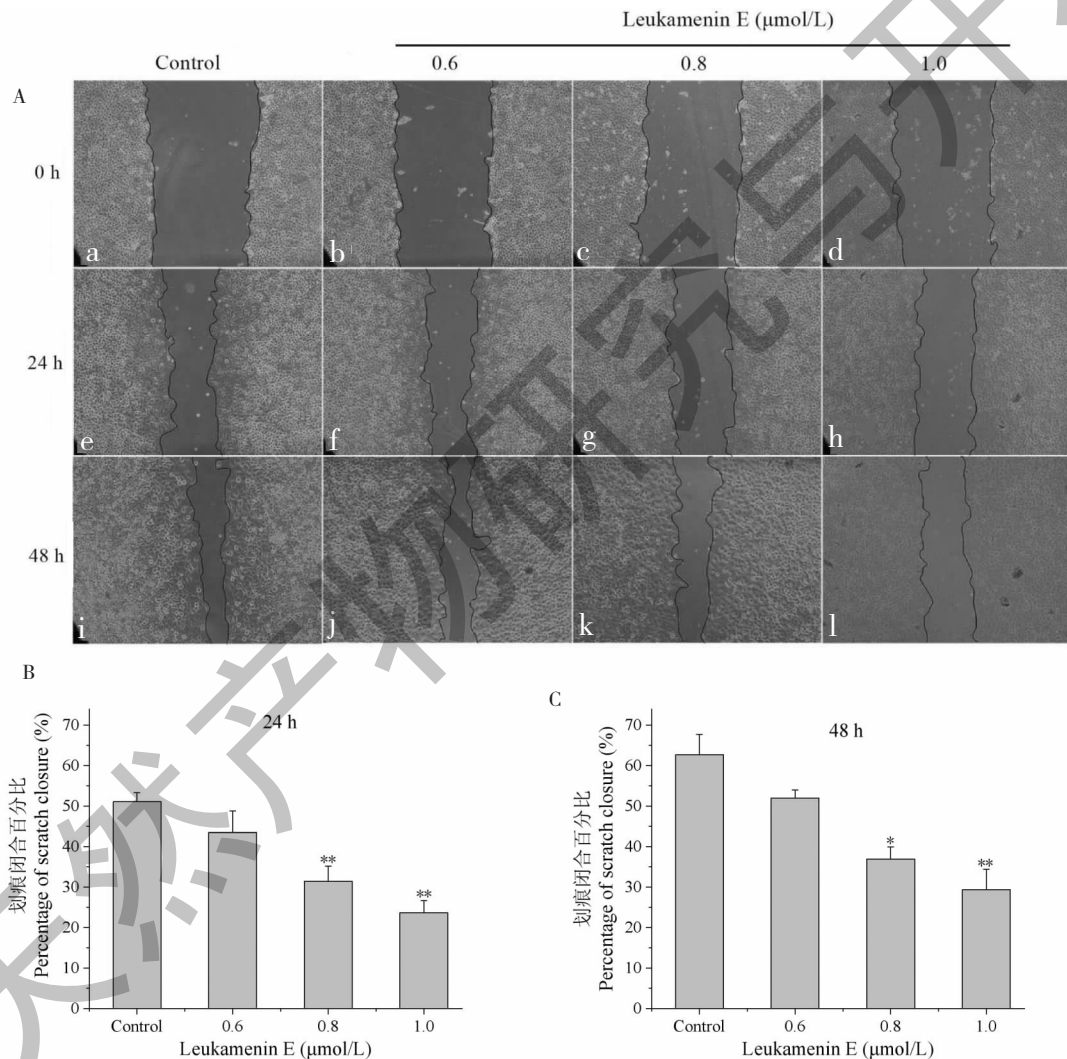


图 4 Leukamenin E 对 HeLa 细胞迁移的影响

Fig. 4 Effects of leukamenin E on HeLa cells migration

注: A: 不同浓度的 leukamenin E 对 HeLa 细胞迁移的抑制作用; B、C: 不同浓度的 leukamenin E 处理 24 h 和 48 h 后 HeLa 细胞的划痕闭合率, 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: A: Inhibition of leukamenin E on HeLa cell migration at the indicated concentrations; B and C: Scratch closure rate of HeLa cells treated with the indicated concentrations of leukamenin E for 24 h and 48 h, compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 Leukamenin E 诱导 HeLa 细胞的微丝、微管及角蛋白纤维的重排

分别用 0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 leukamenin E 处理 HeLa 细胞 48 h、72 h, 通过 TRITC Phalloidin 染色微丝或者免疫荧光染色微管和角蛋白纤维后观察其变化, 结果如图 5 所示。从图 5A 可以看出, 对照组细胞胞质中可见清晰的平行束状应力纤维(微丝), 贯穿于整个细胞胞质, 数量较多。0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 leukamenin E 对 HeLa 细胞中应力纤维的影响与对照组相比没有显著变化, 而 0.6 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 leukamenin E 显著减少胞质中的应力纤维数量, 并显示了浓度依赖性(见图 5A、B)。另外, 表示胞质中微丝含量的细胞的平均荧光强度也随 leukamenin E 的浓度增加而降低, 较高浓度处理组细胞显示了显著性或极显著差异(图 5D), 表明 leukamenin E 本文实验条件下可减少微丝数量, 主要减少应力纤维的数量。

利用间接免疫荧光技术对微管染色, 结果如图 5A 所示。对照组细胞中的微管网络在胞质中呈致密的均匀分布; 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞的微管网络与对照组细胞相比没有发生明显变化, 而在 0.6、0.8 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 药物处理组细胞中的微管分布有明显改变: 核周出呈现较强的荧光斑, 表明微管在此有聚集, 且随着处理药物浓度的升高和时间的延长, 这种现象更为明显。经 Image Pro Plus 6.0 软件分析显示, 处理组细胞中微管的平均荧光强度与对照组细胞相比显著增加(见图 5E), 表明 leukamenin E 可增加 HeLa 细胞微管数量, 主要刺激核周区域微管的聚集。

对角蛋白中间纤维进行免疫荧光染色, 其观察结果如图 5B 所示。对照组细胞的角蛋白纤维呈致密的网状结构, 且均匀分布; 0.4 和 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞在 48 h 和 72 h 时其角蛋白纤维的分布与对照相比无明显变化, 但核周角蛋白纤维的荧光强度有增加趋势, 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 处理组(48 h 和 72 h)角蛋白纤维的平均荧光强度均具有显著性上升; 0.8 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞与对照相比其角蛋白纤维分布明显改变, 在核周有聚集的趋势, 尤其是 48 h 处理组细胞在核周出现较强的荧光区域, 纤维变粗, 而 72 h 处理组细胞核周荧光区与 48 h 处理组细胞比却有显著的减弱。

如前所述(见图 3A), 较高浓度药物和较长时间处理组的细胞形成伸长的丝状伪足, 经免疫荧光

染色后, 发现这些伪足中含有丰富的微管和角蛋白纤维, 清晰可见其平行束状排列(见图 5C)。但在微丝的染色中未见这些长丝状伪足中有应力纤维分布。从上述这些现象可知, 药物处理后微管和角蛋白纤维的重排明显, 最明显特征是核周及伪足处聚合度明显增加。

2.5 Leukamenin E 引起 HeLa 细胞微丝、微管及角蛋白纤维的聚合度改变

细胞经免疫荧光染色后用流式细胞术测量胞内微丝、微管和角蛋白纤维的含量。由于样品处理过程使细胞内可溶性蛋白流出(低聚合的骨架纤维也有流失), 因而, 此方法所检出数据表示聚合态纤维骨架含量。

用 0.4 和 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 的 leukamenin E 处理 HeLa 细胞 48 h 后用流式细胞仪检测细胞中 3 种骨架纤维含量, 评估其聚合特性, 结果如图 6 所示。从图 6 可以看出, 与对照组相比, 高浓度处理组(0.8 $\mu\text{mol/L}$)细胞的聚合态微丝含量显著减少, 而聚合态微管的含量却显著增多, 其中 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞中聚合态微管与对照组相比分别增加了 204.1% 和 383.4%, 并显示了浓度依赖性, 同时, 处理组细胞中聚合态角蛋白纤维含量有较小幅增加, 达到显著性或极显著差异(见图 6)。

2.6 Leukamenin E 引起 HeLa 细胞内 ROS 的变化

DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate) 可穿过细胞膜, 在细胞内酯酶作用下水解生成无荧光的 DCFH, 细胞内的 ROS 可以进一步氧化 DCFH 生成具有荧光的 DCF(2',7'-dichlorofluorescein), 其荧光强度即可反映细胞内 ROS 水平。本实验中, 不同浓度的 leukamenin E 处理 HeLa 细胞 6、12 和 24 h 后, 运用流式细胞仪检测细胞内 ROS 的变化, 其结果如图 7 所示。从图可以看出, 0.6 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 在相同浓度条件下, 随着处理时间的延长, ROS 含量降低; 相同处理时间条件下, 随着药物浓度的升高 ROS 的含量明显升高。与对照组相比, 在 0.6、0.8 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时显示了显著性差异, 表明 leukamenin E 可在较短时间内较大幅度提高胞内 ROS 水平。

2.7 Leukamenin E 联合 NAC 对 HeLa 细胞形态、迁移以及 3 种细胞骨架形态的影响

为了求证 leukamenin E 诱导的 ROS 升高与 HeLa 细胞骨架重排、细胞形态以及细胞迁移的改变是否相关联, 将抗氧化剂 NAC(可清除活性氧)和 1.0

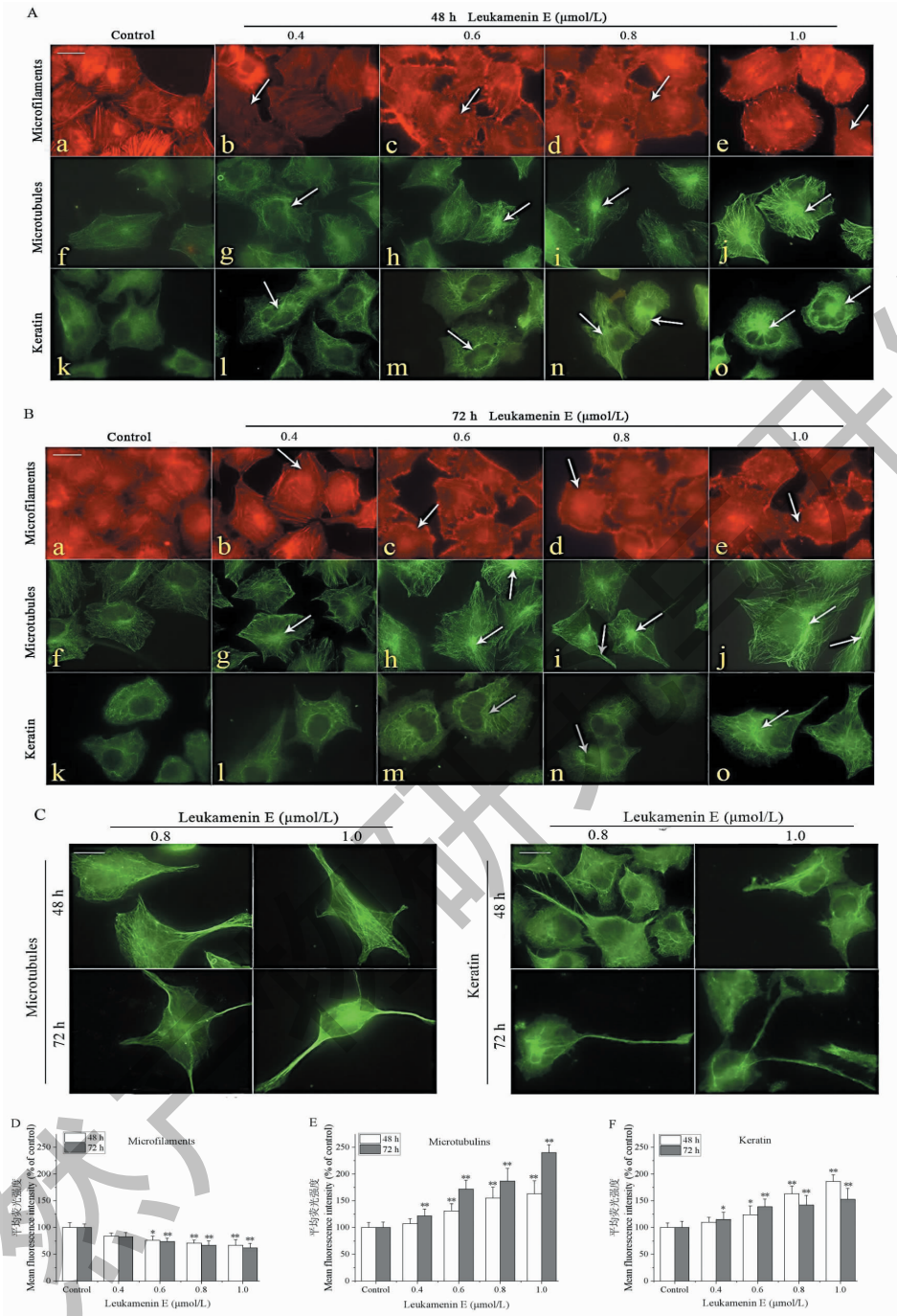


图5 Leukamenin E 对 HeLa 细胞 3 种胞质骨架分布的影响

Fig. 5 Effects of leukamenin E on the distribution of three cytoskeleton in HeLa cells

注:A:48 h 处理组细胞内微管、微丝和角蛋白纤维的荧光显微镜图像;B:72 h 处理组细胞内微管、微丝和角蛋白纤维的荧光显微镜图像;C:具有长丝状伪足细胞的微管和角蛋白纤维的荧光显微镜图像;D~F:不同处理组细胞的微丝、微管和角蛋白纤维的平均荧光强度值,分别与 48 h 或 72 h 的对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。白色箭头指细胞骨架的排列发生显著改变的胞质区域,标尺 10 μm 。Note:A:Fluorescence microscope images of intracellular microtubules, microfilaments and keratin filaments in treated cells at 48 h; B:Fluorescence microscope images of intracellular microtubules, microfilaments and keratin filaments in treated cells at 72 h; C:Fluorescence microscope images of microtubules and keratin filaments in cells with cytoplasmic elongation. D-F: The average fluorescence intensity values of microfilaments, microtubules and keratin filaments of cells in different treatment groups, respectively compared with the control group of 48 h or 72 h, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; The white arrow points to the cytoplasmic area where the arrangement of the cytoskeleton has changed significantly, and the scale is 10 μm .

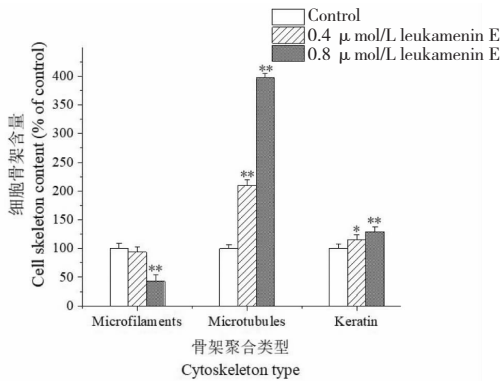


图6 Leukamenin E对HeLa细胞3种骨架聚合的影响

Fig. 6 Effects of leukamenin E on the aggregation of three cytoskeleton in HeLa cells

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

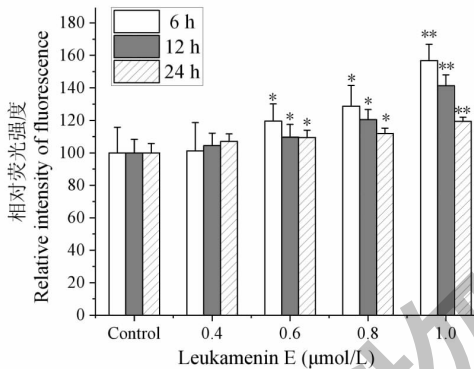


图7 Leukamenin E对HeLa细胞内ROS的影响

Fig. 7 Effects of leukamenin E on ROS in HeLa cells

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

$\mu\text{mol/L}$ leukamenin E加入培养基中,共孵育HeLa细胞24、48和72 h后,检测细胞形态、细胞迁移以及3种细胞骨架分布的变化,其结果如图8所示。从图8A可以看出,1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E单独处理组细胞的形态与对照组细胞相比其伸长变形的细胞有明显的增加(见图8A:c和g),细胞伪足数量比对照组有显著减少(见图8D);300 $\mu\text{mol/L}$ NAC对细胞形态没有明显的影响(见图8A:b和f),而NAC联合leukamenin E处理组(300 $\mu\text{mol/L}$ NAC + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E)的细胞形态与对照组细胞相比也未见明显改变(见图8A:d和h),表明leukamenin E诱导细胞内ROS的产生与细胞形态的伸长改变相关联。

同样,1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E单独处理组对

HeLa细胞3种细胞骨架的分布与对照组相比有明显改变,具体细节与前面2.4中所述结果一致:胞质应力纤维显著减少(见图8C:c);微管向核周聚集,而其他胞质区域的微管分布减少(见图8C:g);角蛋白也呈现不均匀分布也在核周聚集,纤维变粗(见图8C:k)。而NAC与leukamenin E联合处理(300 $\mu\text{mol/L}$ NAC + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E)显著抑制了leukamenin E对HeLa细胞3种骨架形态的改变:与1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E单独处理组诱导的改变相比,联合处理组细胞的应力纤维在中央区域有所减少,但细胞周边的应力纤维清晰可见(见图8C:d);微管和角蛋白纤维分布较为均匀,核周荧光强度相对较低,未见明显的核周聚集现象(见图8C:h和l)。进一步的荧光强度分析显示,NAC在培养中的加入的确减弱了leukamenin E诱导的微丝、微管和角蛋白纤维的改变,表明leukamenin E诱导细胞内ROS的产生与HeLa细胞3种骨架的改变(重排)特征相关联。

随后,划痕实验检测了NAC联合leukamenin E使用时HeLa细胞的迁移变化,发现300 $\mu\text{mol/L}$ NAC单独处理HeLa细胞24 h后对细胞迁移显示了一定的促进效应,但在48 h后其细胞迁移促进效应减弱,未显示显著性差异(见图8B:b、f、j),而NAC联合leukamenin E使用后(300 $\mu\text{mol/L}$ NAC + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E)显著减弱了1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E单独处理对HeLa细胞的迁移抑制效应(见图8B:d、h、l),表明leukamenin E诱导细胞内ROS的产生与细胞迁移抑制效应相关。

3 讨论与结论

近年来,对映-贝壳杉烷二萜的抗癌药理活性引起了研究者的广泛兴趣,不同分子构型的该类化合物的抗癌机制的研究报道逐年增多^[9,10,12,13,16],发现该类化合物对细胞生命过程的影响是多方面的,在分子水平也显示了多靶点效应。例如,通过多种细胞信号途径诱导细胞凋亡和细胞分化^[10,16-19];靶向作用于过氧化物还原酶I和II、BubR1蛋白以及癌蛋白AML1-ETO^[9,16],并可调节NADPH氧化酶活性和诱导角蛋白磷酸化^[10,12,13,17]。我们课题组相继报道了对映-贝壳杉烷二萜对细胞骨架系统的影响:leukamenin E可诱导细胞角蛋白K8和K18磷酸化而抑制角蛋白的组装^[13];epinodosin和wangzaozin A可分别影响HL-60和HeLa细胞骨架动态组装,引起胞质骨架重排,改变微丝、微管和中间纤维骨架纤

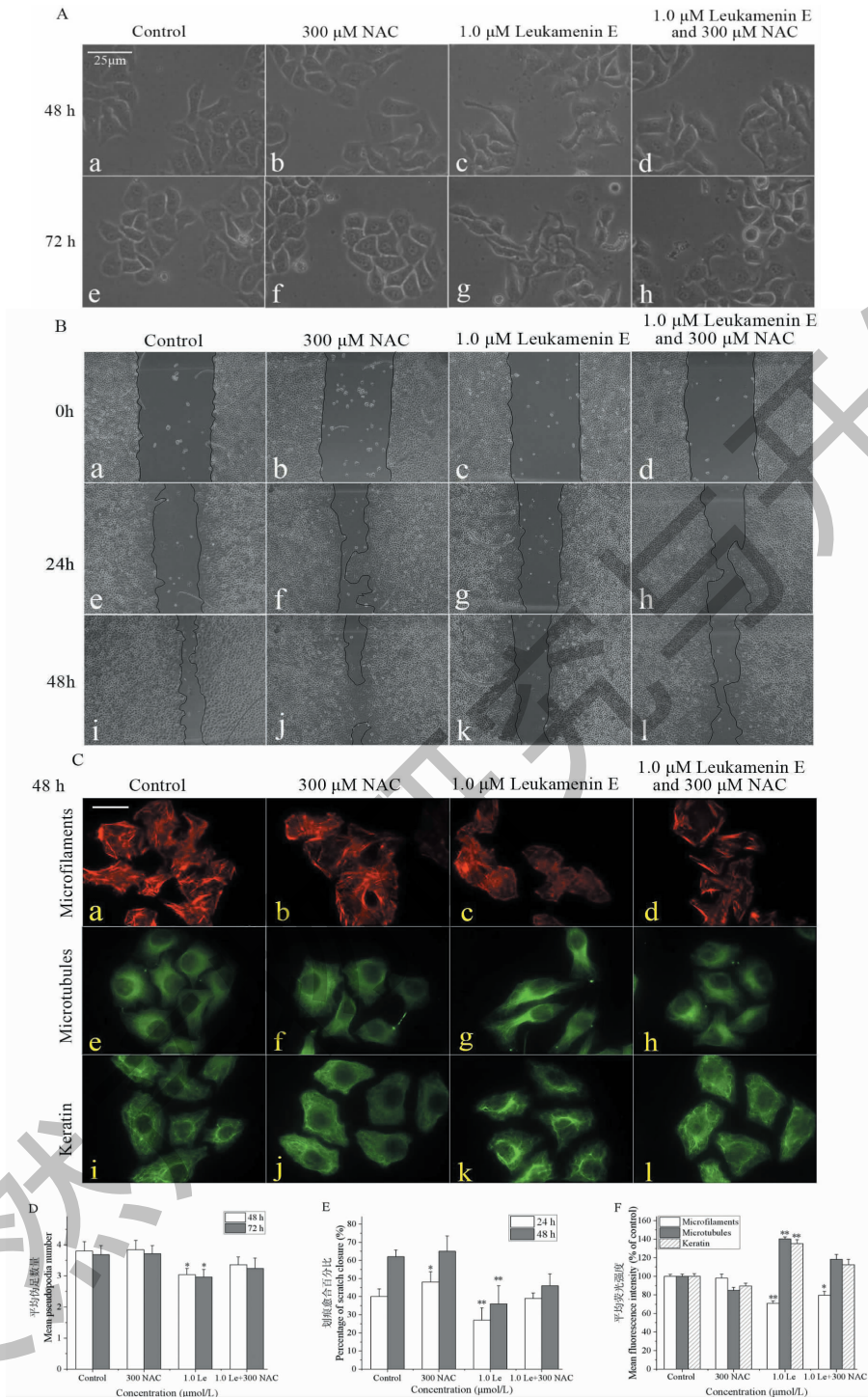


图 8 NAC 联合 leukamenin E 使用对 HeLa 细胞形态、细胞迁移以及 3 种胞质骨架重排的影响

Fig. 8 Effects of NAC combined with leukamenin E on cell morphology, cell migration and three cytoskeletal rearrangement in HeLa cells

注: A: NAC 减弱了 leukamenin E 诱导 HeLa 细胞形态的改变; B: NAC 减弱了 leukamenin E 诱导的细胞迁移的抑制效应; C: NAC 减弱了 leukamenin E 诱导 3 种胞质骨架的重排, 标尺 10 μm; D~F: Leukamenin E 联合 NAC 使用对 HeLa 细胞形态、细胞迁移和胞质骨架重排的定量分析, 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Le: Leukamenin E。Note: A: NAC reduced leukamenin E-induced changes of cell morphology; B: NAC reduced leukamenin E-induced inhibition of cell migration; C: NAC reduced leukamenin E-induced changes of the three cytoskeletal distribution in HeLa cells, scale 10 μm; D-F: Quantitative analysis of cell morphology, cell migration and cytoskeletal rearrangement in HeLa cells treated by leukamenin E combined with NAC. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Le: Leukamenin E。

维的分布,干扰胞质骨架系统的稳态^[10,11],但其作用机制不甚清楚。

本文中我们首先研究了低浓度 leukamenin E (0.4 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$) 诱导 HeLa 细胞骨架重排的特征。低浓度 leukamenin E 在较长时间(48 h 和 72 h) 处理细胞后使细胞形态显著变化,细胞形成长条状,伪足数量显著减少,伪足拉长,同时,核形态也发生明显变化,“肾形核”数量增多。众所周知,微丝、微管和中等纤维 3 种细胞骨架均具有维持细胞及其核形态的功能,因此这些变化提示 leukamenin E 可能干扰细胞骨架的动态平衡,诱导了细胞骨架的重排。进一步的荧光染色检测证实了这一推测:胞质应力纤维数量减少,微管以及角蛋白纤维在核周聚集,微管和角蛋白中间纤维的排布明显改变,某些微管和角蛋白中间纤维增粗(见图 5)。流式细胞术检测也证实了 HeLa 细胞内聚合态微丝减少,聚合态的微管增加显著以及角蛋白纤维聚合小幅上升(见图 6)。该结果与我们之前报道的对映-贝壳杉烷二萜 wangzaozin A 对 HeLa 细胞骨架重排的诱导作用相类似^[11]。但 leukamenin E 在高浓度(2.0 ~ 4.0 $\mu\text{mol/L}$) 条件下处理 HepG2、H1299、PLC 和 HUVEC 细胞 24 h,其细胞形态变化较小,与低浓度处理后的变化模式完全不同^[12,13]。我们发现高浓度 leukamenin E 可激活细胞 ERK 信号通路,诱导 K8-S431/73 和 K18-S52 磷酸化,抑制角蛋白纤维组装,减少角蛋白纤维数量^[13]。这表明不同浓度的 leukamenin E 可参与调节细胞不同的信号通路,引起不同的细胞响应事件。

细胞骨架深度参与了细胞分裂和迁移的细胞功能,与细胞癌变及恶化密切相关。细胞骨架极其调节蛋白所组成的动态纤维网络参与了细胞迁移的过程,表现为连续的细胞形态改变,细胞骨架重组并驱动细胞定向运动^[20]。以细胞骨架为靶点的化合物(细胞松弛素类、秋水仙素和长春新碱等)通过影响细胞骨架组装阻止细胞增殖和迁移。我们的研究表明,0.8 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ leukamenin E 可通过干扰 HeLa 细胞骨架的动态平衡,引起胞质骨架显著重排,抑制细胞迁移,并通过阻滞细胞周期运转降低细胞增殖速率,说明 leukamenin E 对于抗癌新药的研究和发现具有重要价值。

ROS 是生物体内产生的一类比分子氧化学活性更活跃的含氧自由基,如 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 等。在正常生理条件下,ROS 作为第二信使,在决定细

胞命运和修饰各种信号分子方面有着重要作用。研究证实,ROS 参与细胞骨架重构的信号通路,直接修饰细胞骨架或与细胞骨架相关的蛋白质,是参与细胞骨架结构与功能的重要调节因子^[5]。之前我们报道了 leukamenin E 可通过调节 HL-60 细胞的 NADPH 氧化酶活性增加胞内 ROS 水平,诱导 HL-60 细胞向成熟粒细胞分化^[18]。在本研究中,0.4 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 leukamenin E 处理 HeLa 细胞也可以显著升高胞内 ROS 水平,并且随药物浓度的升高和处理时间的延长,ROS 含量显著升高(见图 7)。我们推测 ROS 可能是 leukamenin E 诱导的细胞形态改变、细胞迁移抑制以及细胞骨架重排的上游事件,leukamenin E 可能通过 ROS 信号通路调节细胞骨架重排进而导致细胞形态改变以及细胞迁移抑制。进一步的实验证实了上述推测:NAC 的加入对 leukamenin E 诱导的细胞形态变化(向长条形转变以及细长伪足减少)有明显的抑制效应,同时观察到 NAC 减弱了 leukamenin E 对细胞应力纤维减少的诱导作用,并使微管和角蛋白纤维在核周的聚集减少。这些现象均表明 leukamenin E 导致的细胞骨架重排和细胞形态改变与 ROS 水平升高相关联。有研究显示,ROS 参与了微丝的聚合和解聚的动力学过程^[21],在人关节原始软骨细胞中 ROS 升高会促进 Rac1 的氧化修饰,诱导肌动蛋白细胞骨架结构改变^[22];ROS 通过 ERK 途径破坏睾丸支持细胞(SC)应力纤维网及其他微丝束^[23]。此外,ROS 也显著影响微管的动态不稳定性,调节微管蛋白细胞骨架组织,并诱导微管蛋白修饰^[24]。关于 ROS 与角蛋白纤维聚合的关联性及其机制还未见相关报道。由此我们推测 leukamenin E 导致细胞骨架重排是通过 ROS 水平上升激活细胞骨架重排相关信号通路而引起,但具体途径尚需进一步研究证实。Lai 等^[25]报道了柚皮素诱导 HeLa 细胞 ROS 水平升高激活 ROS/JNK/Bcl2 通路,抑制细胞增殖和迁移。我们的研究证实了 ROS 可作为信号分子通过作用于细胞骨架系统,干扰细胞运动过程中细胞骨架的协调重组过程,导致细胞的迁移抑制。至于 leukamenin E 抑制细胞增殖的信号途径尚需要进一步的深入研究。

参考文献

- 1 Chen SM, Meng LH, Ding J. New microtubule-inhibiting anticancer agents[J]. *Expert Opin Inv Drug*, 2010, 19:329-343.
- 2 Marzo I, Naval J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy:

- promises and pitfalls[J]. *Biochem Pharmacol*,2013,86:703-710.
- 3 Liu GA, Jin YD, Ran MM, et al. Curcumin inducing apoptosis of U87 cells by promoting ROS production[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2020,32:541-548.
 - 4 Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer[J]. *Semin Cell Dev Biol*,2017,80:50-64.
 - 5 Valdivia A, Duran C, San MA. The role of Nox-mediated oxidation in the regulation of cytoskeletal dynamics [J]. *Curr Pharm Des*,2015,21:6009-6022.
 - 6 Huang CK, Zhang W, Gan DK, et al. Nox-mediated oxidation in the regulation of cytoskeleton-related activities[J]. *Chin J Cell Biol*(中国细胞生物学学报),2018,40:269-274.
 - 7 Sun HD. Diterpenoids of *Isodon* species(香茶菜属植物二萜化合物)[M]. Beijing: Science Press, 2001.
 - 8 Sarwar MS, Xia YX, Liang ZM, et al. Mechanistic pathways and molecular targets of plant-derived anticancer *ent*-kaurane diterpenes[J]. *Biomolecules*,2020,10(1):144.
 - 9 Xu HZ, Huang Y, Wu YL, et al. Pharicin A, a novel natural *ent*-kaurene diterpenoid, induces mitotic arrest and mitotic catastrophe of cancer cells by interfering with BubR1 function[J]. *Cell Cycle*,2010,9:2969-2979.
 - 10 Ding L, Chen ZR, Chen P, et al. NADPH oxidase-derived ROS mediated the differentiation and reorganization of cytoskeleton induced by epinodosin in HL-60 cells[J]. *Chin J Cell Biol*(中国细胞生物学学报),2016,38:273-284.
 - 11 Liu Y, Ding L, Zhu JH, et al. Cytoskeletal rearrangement and proliferation inhibition in wangzaozin A-treated HeLa cells [J]. *Chin J Cell Biol*(中国细胞生物学学报),2018,40:1159-1170.
 - 12 Zhu JH, Chen YP, Chen ZR, et al. Leukamenin E, an *ent*-kaurane diterpenoid, is a novel and potential keratin intermediate filament inhibitor[J]. *Eur J Pharmacol*,2019,846:86-99.
 - 13 Xia B, Zhang H, Yang MH, et al. Leukamenin E induces k8/18 phosphorylation and blocks the assembly of keratin filament networks through ERK activation[J]. *Int J Mol Sci*,2020,21(9):3164.
 - 14 Ding L, Liu GA, Wang L, et al. Cytotoxic *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon racemosa*(Hemsl) Hara[J]. *Cheminform*,2006,37:548-551.
 - 15 Lee CC, Cheng YC, Chang CY, et al. Alpha-tubulin acetyltransferase/MEC-17 regulates cancer cell migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition suppression and cell polarity disruption[J]. *Sci Rep-UK*,2018,8:1-15.
 - 16 Liu CX, Yin QQ, Zhou HC, et al. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells [J]. *Nat Chem Biol*,2012,8:486-493.
 - 17 Ding L, Chen YP, Liu GA, et al. Wangzaozin A regulates NADPH oxidase-derived reactive oxygen species to induce the differentiation of HL-60 cells [J]. *J Huazhong Norm Univ: Nat Sci*(华中师范大学学报:自科版),2015,49:252-260.
 - 18 Ding L, Li PW, Kong HQ, et al. Induction effects of *ent*-kaurane diterpene leukamenin E on the differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells[J]. *China Pharm*(中国药房),2016,27:1771-1774.
 - 19 Wei JX, Ding L, Liu Y, et al. Induction effects of rabdosin B on differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2018,49:2591-2600.
 - 20 Tang DD, Gerlach BD. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration[J]. *Respir Res*,2017,18(1):54.
 - 21 Dalledonne I, Milzani A, Colombo R. H₂O₂-treated actin: assembly and polymer interactions with cross-linking proteins [J]. *Biophys J*,1995,69:2710-2719.
 - 22 Hobbs GA, Mitchell LE, Arrington ME, et al. Redox regulation of Rac1 by thiol oxidation[J]. *Free Radical Bio Med*,2015,79:237-250.
 - 23 Wang XZ, Yuan XL, Wu JY, et al. The effect of reactive oxygen species on sertoli cell microfilaments of piglets[J]. *Acta Vet Zootech Sin*(畜牧兽医学报),2009(9):1297-1302.
 - 24 Islam MS, Kabir AMR, Inoue D, et al. Enhanced dynamic instability of microtubules in a ROS free inert environment [J]. *Biophys Chem*,2016,211:1-8.
 - 25 Lai YX, Wang MR, Yang HL, et al. Naringenin inhibits cervical cancer HeLa cell proliferation and migration via the ROS/JNK/Bcl2 signaling pathway[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床),2018,34(1):40-43.