



论文

短时间低浓度紫杉醇处理能够诱导非中心体依赖性的多极纺锤体组装和非整倍体细胞的产生

边明磊^①, 傅静雁^①, 阎言^①, 陈强^①, 杨超^②, 史清华^②, 蒋青^①, 张传茂^{①*}^① 北京大学生命科学学院, 生物膜与生物膜工程国家重点实验室, 细胞增殖与分化教育部重点实验室, 北京 100871;^② 中国科技大学生命科学学院, 合肥微尺度物质科学国家实验室, 合肥 230026

* 联系人, E-mail: zhangcm@pku.edu.cn

收稿日期: 2010-06-15; 接受日期: 2010-08-19

国家自然科学基金(批准号: 31071188, 31030044, 30721064, 30900726 和 90913021)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2010CB833705, 2006CB910101 和 2007CB914502)资助项目

摘要 紫杉醇是一种能够与微管相结合的药物, 被广泛应用于肿瘤的治疗. 本研究发
发现, 应用短时间低浓度的紫杉醇处理细胞, 能诱导有丝分裂期细胞发生非中心体依赖性的
的多极纺锤体组装. 将细胞内的 TPX2 去除或在细胞内过量表达 Aurora-A 激酶, 能够减少
紫杉醇诱导的多极纺锤体的产生. 通过缩时电影活细胞示踪观察发现, 经紫杉醇短时间
处理的部分细胞可以完成多极细胞分裂, 产生多个子细胞; 其中部分子代细胞还可以再
进行至少一个周期, 产生新的子细胞. 通过软琼脂板长时间培养实验显示, 紫杉醇处理后
存活下来的细胞可以形成具有不同于母代细胞染色体数目的子代细胞克隆. 由以上结果
可知, 短时间低浓度紫杉醇处理能诱导非整倍体子细胞的产生.

关键词

紫杉醇

TPX2

Aurora-A 激酶

多极细胞分裂

非整倍体

细胞非整倍体化被认为是肿瘤产生的途径之一^[1,2]. 关于中心体过度复制导致纺锤体异常和非整倍体细胞产生的研究一直是相关领域的研究热点. 在细胞增殖过程中, 如果中心体过度复制, 会导致纺锤体极的数目增加, 并组装多极纺锤体^[3,4], 细胞因而可能会发生有丝分裂异常, 并最终产生非整倍体子代细胞^[1,2,5-9]. 研究表明, CDK1, CDK2, Aurora 激酶, PLK 激酶及一些中心体外周基质蛋白都对中心体的复制过程和纺锤体组装过程起重要的调控作用^[10-12]; 一些微管结合蛋白, 如 NuMA 和 TPX2 在纺锤体组装过程也起重要的调节作用^[13,14]. 但也有研究发现, 中心体并不是纺锤体极组装所必需的, 在某些种类细胞, 如植物细

胞中, 并不存在中心体, 但是纺锤体却可以正常组装; 在爪蟾卵非细胞体系中, 纺锤体同样可以在不存在中心体的情况下正常组装^[15]. 目前, 还不清楚在中心体缺失的情况下纺锤体极是如何组织并建立的. 先前有研究报道, NuMA 是在这一过程中发挥重要功能的因子之一, 在经过紫杉醇处理的细胞中, NuMA 可以募集微管并组织微管形成微管生长中心^[16]. 该研究提示, 微管结合因子可能在非中心体依赖性的纺锤体极组装中起重要作用.

紫杉醇是一种被广泛使用的能够与微管相结合的药物, 同时也是肿瘤治疗的常用药物. 通过流式细胞术对紫杉醇处理的细胞进行分析发现, 受处理细

胞会发生纺锤体组装异常, 细胞被阻滞在 G2/M 期, 并最终发生细胞凋亡^[16-21]. 在临床治疗过程中, 通常会使用高浓度大剂量的紫杉醇注射; 但是随着人体新陈代谢过程, 紫杉醇在体内的浓度会很快降低. 有文献表明, 当处理细胞的紫杉醇浓度降低到一定程度时, 部分被处理细胞可以超越细胞有丝分裂期检验点, 并完成分裂过程^[16]. 若用浓度降低至 10~30 nmol/L 的紫杉醇处理同步化至有丝分裂间期的细胞 16 h, 再通过流式细胞术检测, 可以看到部分细胞摆脱了 G2/M 期阻滞, 产生了基因组在二倍体到四倍体之间的子代细胞^[16,18,21]. 现在还不清楚这些子代细胞是如何在紫杉醇处理中存活下来的, 及这些子代细胞最终的命运如何.

本实验将紫杉醇的浓度控制在极低水平, 以模拟在临床使用时紫杉醇的药物残留剂量对细胞的影响. 通过处理永生化细胞系或原代培养细胞, 发现低浓度短时间紫杉醇处理会诱导细胞非中心体依赖性的纺锤体极产生, 进而发生多极纺锤体组装和异常的细胞分裂. 通过缩时电影活细胞示踪观察发现, 低浓度短时间紫杉醇处理后, 细胞发生多极分裂, 并且部分经多极分裂产生的子细胞可以再完成至少一个细胞周期而继续增殖. 母细胞发生多极细胞分裂, 会使子代细胞无法获得完整的基因组. 因为多极分裂过程中染色体被随机分配到各个子代细胞中, 最终, 子细胞群落拥有与母细胞不同数目的染色体. 同时发现, 在紫杉醇诱导的非中心体依赖性纺锤体极组装过程中 TPX2 起关键作用, 而 Aurora-A 激酶也对该过程起调控作用. 本研究认为, 低浓度紫杉醇短时间处理细胞所诱导的非中心体依赖性纺锤体极组装及由此引发的多极细胞分裂, 很可能是非整倍体细胞产生的一条途径.

1 材料与方 法

1.1 分子克隆及抗体制备

野生型 *centrin2* 基因通过 RT-PCR 方法从 HeLa 细胞中克隆获得, 通过 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切插入 PET28a(Novagen, Darmstadt, Germany)和 PEGFPC2 (Clontech, Mountain View, CA, USA)载体中. 野生型 *TPX2* 基因从爪蟾 cDNA 文库(Clontech)中克隆获得, 通过 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切插入 PET28a 和 PEGFPC2 载体中. 野生型 *Aurora-A* 和 *Aurora-A K162R* 突变体

基因通过 RT-PCR 和定点突变的方法从 HeLa 细胞中克隆获得, 通过 *BamH* I 和 *Xho* I 双酶切插入 PET28a 和 PEGFPC1 载体中. 带有 his 标签的 *centrin2*, *TPX2* 和 *Aurora-A* 蛋白使用 Talon-Resin(BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)纯化. *TPX2*, *Aurora-A* 和 *centrin2* 兔多克隆抗血清由本实验室自行制备并纯化. 鼠单克隆 α -tubulin 抗体购自 Zymed(San Francisco, CA, USA); 兔单克隆 pericentrin 抗体购自 BD; 荧光二抗购自 Zymed; 针对 *Aurora-A* 基因的 siRNA 购自 Dharmacon; 针对 *TPX2* 的 siRNA 按照文献[14]报道的方法设计.

1.2 细胞培养

HeLa 和 LO2 细胞来自中国典型培养物保藏中心. HUVEC 细胞由罗金才老师惠赠(北京大学)^[22]. 细胞转染按照标准磷酸钙转染手册方法. 缩时电影活细胞示踪观察时, 先将细胞培养在底部为玻片的培养皿内, 用带有二氧化碳培养箱及 AxioVision cool CCD 的 Zeiss 200M 荧光显微镜观察. 染色体荧光原位杂交方法参见文献[23].

1.3 免疫荧光标记

在盖玻片上培养细胞. 固定前在 PBS 中蘸洗, 然后用 1 : 1 混合的甲醇丙酮混合液在 4°C 固定 20 min. PBS 洗 3 次, 室温下将细胞在一抗中孵育 1 h. PBS 洗 3 次, 再在室温下将细胞与二抗孵育 45 min. 随后用含有 1 μ g/mL DAPI 的 Mowiol 封片. 通过 Zeiss 200M 荧光显微镜观察, 使用 AxioVision cool CCD (AxioVision image software)拍照.

1.4 药物处理

在盖玻片上培养 HeLa 细胞, 生长 24 h 后换液, 加入含有不同浓度紫杉醇的新鲜细胞培养基, 处理 1.5 h 后取出细胞固定. 紫杉醇购自 Novartis(Swiss).

1.5 染色体计数

50 ng/mL nocodazole 处理细胞 10 h, 使细胞同步化至中期. 将中期细胞收集重悬于 5 mL 0.075 mol/L KCl 中, 37°C 处理 30 min. 离心去除液体后, 加入 3 : 1 混合的甲醇乙酸混合液, 室温固定 60 min, 其中更换 3 次固定液. 最后将固定好的细胞滴到冰预冷的玻片上, 通过 DAPI 染色观察.

1.6 透射电子显微镜观察

单层培养细胞用 2.5%戊二醛(溶于 0.1 mol/L PB 溶液中)室温固定 1 h. 用 PB 洗 5 次, 再用 1%锇酸室温固定 1 h. 用 Epon812 包埋样品, 聚合, 切片. 切片后的样品经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后, 用 JEOL1010 型透射电子显微镜观察.

1.7 实验动物

雄性 6 周 BALB/c 小鼠购自中国医学科学院实验动物中心. 小鼠分笼饲养, 称重后尾静脉注射紫杉醇至 10 nmol/L 浓度. 2 h 后取出肝组织, 室温下在 70% 乙醇中固定 30 min, 染色, 观察.

2 结果

2.1 短时间紫杉醇处理诱导非中心体依赖性的多极纺锤体组装

先前有文献报道, 长时间紫杉醇处理(超过 16 h)可以诱导多极纺锤体组装, 可能是由于中心体过度复制所致^[19,20]. 为了研究低浓度紫杉醇短时间处理对细胞的影响, 选取了 4 nmol/L 紫杉醇处理 1 h 的实

验条件. 将经过紫杉醇处理后的细胞固定, 并标记荧光观察, 发现有 80%分裂期细胞产生了多极纺锤体. 在产生多极纺锤体的细胞中有 50%为四极纺锤体, 30%为三极纺锤体. 为了检测这种多极纺锤体是否是由中心体过度复制所引起的, 将 HeLa 细胞用紫杉醇进行处理, 固定, 标记微管蛋白 α -tubulin 与中心粒结构蛋白 centrin2(图 1(A)). 结果显示, 在 82.1%的多极纺锤体细胞中, 只有 2 个纺锤体极位置有 centrin2 染色, 而其他的极上则没有中心粒. 同样, 用 α -tubulin 和中心体外周基质蛋白 PCM 共同标记细胞(图 1(B)), 发现多个极中只有 2 个极上有 PCM 定位, 这个结果与 centrin2 标记结果相同. 透射电子显微镜检测进一步发现, 将紫杉醇处理产生的多极纺锤体细胞进行连续切片, 只有 2 个极的位置含有中心粒结构(图 1(D)(b)和(c)), 而另一个极的位置则只含有交叉的微管结构, 没有中心体存在(图 1(D)(d)). 以上结果表明, 低浓度紫杉醇短时间处理诱导的新的纺锤体极的组织不依赖于中心体.

2.2 TPX2 是紫杉醇诱导非中心体依赖性纺锤体极产生所必需的因子

为了研究非中心体依赖性纺锤体极是如何组

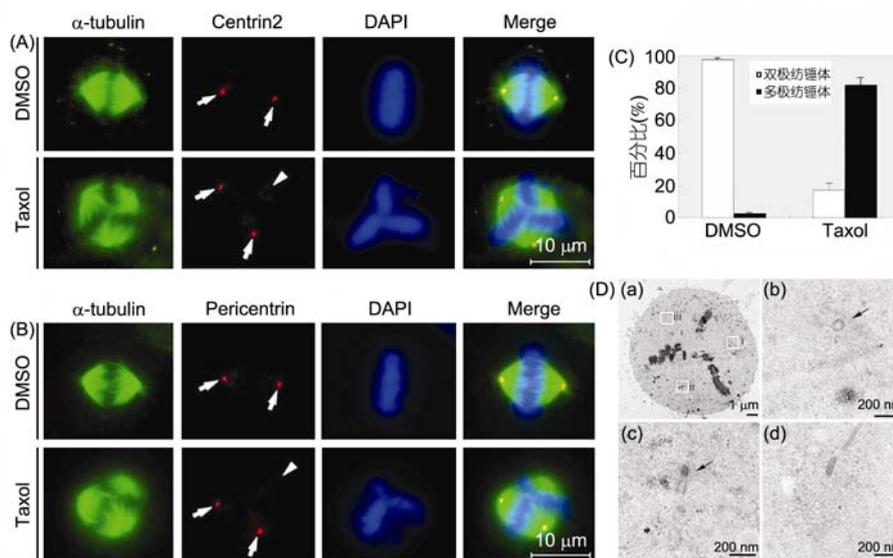


图 1 短时间、低浓度紫杉醇处理诱导的多极纺锤体组装不依赖于中心体过度复制

(A)和(B) 紫杉醇处理分裂期 HeLa 细胞. (A) α -tubulin(绿色), centrin2(红色), DNA(蓝色), merge(三色叠加); (B) α -tubulin(绿色), pericentrin(红色), DNA(蓝色), merge(三色叠加). 其中箭头所指极的位置无中心体; (C) 紫杉醇处理分裂期 HeLa 细胞 1 h, 统计双极纺锤体和多极纺锤体细胞比例. 每个统计数据重复实验 3 次, 每次统计 300 个细胞($P < 0.01$); (D) 将紫杉醇处理产生的三极纺锤体细胞固定制样、连续切片和透射电子显微镜观察. (b)和(c)中各可见一对中心粒结构, (d)中则无中心体, 表明未发生中心体过度复制

织的, 检验了相关微管结合蛋白在这一过程中的作用. TPX2 是一个重要的微管组织因子, 它可以在体外组织微管并形成微管组织中心, 组装星体结构^[24]. 本实验将 GFP-TPX2 转染 HeLa 细胞, 再用紫杉醇对细胞进行处理, 通过荧光显微镜对处理后的分裂期细胞进行跟踪观察. 在紫杉醇加入后几分钟内即可观察到新的纺锤体极形成, 随着 TPX2 重新分布, 新纺锤体极逐渐增大, 并最终形成与原有极大小类似的不依赖于中心体的纺锤体极(图 2(A)). 同样, 对内源 TPX2 定位的变化进行了跟踪观察, 发现内源 TPX2 也有一部分随着紫杉醇的处理逐渐聚集到不依赖于中心体的新极上. 接下来, 用小 RNA 干扰的方法将 HeLa 细胞中的 TPX2 去除, 通过跟踪 GFP- α -

tubulin 来观察紫杉醇处理的效果(图 2(B)和(D)). 在转染了 nonsilencing RNA 的对照细胞中, 20 min 内即可观察到新纺锤体极的产生. 而在 TPX2 去除的细胞中, 与先前报道类似的是, 加入紫杉醇处理之前即有 27% 的分裂期细胞形成多极纺锤体, 这是由于 TPX2 去除后 Eg5 活性提高, 使中心粒异常分离^[14]. 但是, 去除 TPX2 后再加入紫杉醇处理的细胞, 在 1 h 内都没有新极产生. 统计数据也表明, 去除 TPX2 后紫杉醇诱导产生的多极纺锤体比例比未处理时提高 30% (图 2(C)), 远低于未去除 TPX2 时的比例(80%), 说明 TPX2 是紫杉醇诱导非中心体依赖性极产生所必需的一个因子.

2.3 过量表达 Aurora-A 可以减少紫杉醇处理诱导的多极纺锤体组装

先前有报道, 在细胞内过量表达 Aurora-A 可以提高细胞在紫杉醇处理中的细胞存活能力^[25]. Aurora-A 是与 TPX2 作用密切相关, 对纺锤体组装起调控作用的蛋白^[26,27]. 为了研究 Aurora-A 在非中心体依赖性纺锤体极生成过程中的作用, 首先对低浓度紫杉醇短时间处理的细胞进行 Aurora-A 染色观察, 发现 Aurora-A 在多极纺锤体所有的极上有定位(图 3(A)). 接下来, 对 HeLa 细胞分别转染 GFP-Aurora-A, Aurora-A 激酶活性缺失型突变体 GFP-K162R(KR)或 Aurora-A siRNA, 然后用紫杉醇处理该细胞, 观察并统计多极纺锤体比例差异(图 3(B)~(D)). 统计结果表明, 在过量表达 Aurora-A 的细胞中, 紫杉醇处理诱导的多极纺锤体比例与对照细胞相比明显下降, 而形成双极纺锤体的细胞比例提高了 24%; 但过表达 K162R 突变体或去除 Aurora-A 的细胞都无此结果. 该结果表明, Aurora-A 对于紫杉醇诱导的多极纺锤体组装过程具有抑制作用, 而这种抑制作用依赖于 Aurora-A 自身的激酶活性.

2.4 部分形成多极纺锤体的细胞可以完成分裂, 形成的子细胞可以再完成至少一个细胞周期

为了研究形成多极纺锤体的 HeLa 细胞是否可以超越周期检验点完成细胞分裂过程, 首先检测了动粒结构是否完成装配, 是否被微管正常捕捉. 通过低浓度紫杉醇短时间处理 HeLa 细胞, 经固定后进行荧光标记, 发现所有的动粒都被微管捕捉(图 4(A)); 进

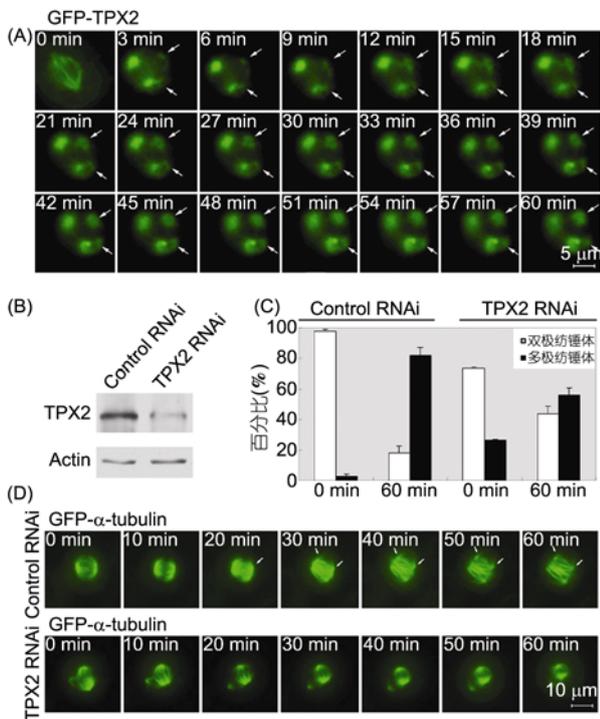


图 2 TPX2 是紫杉醇诱导非中心体依赖性极产生的必需因子

(A) 将 HeLa 细胞转染 GFP-TPX2, 加入 4 nmol/L 紫杉醇处理, 跟踪观察. TPX2 逐渐定位到非中心体依赖性的极上(箭头所示); (B) 检测小 RNA 干涉后细胞内 TPX2 蛋白水平; (C) HeLa 细胞分别转染小 RNA 干涉 TPX2 表达, 48 h 后用紫杉醇处理, 观察统计双极纺锤体和多极纺锤体细胞各自所占比例. 每个统计数据重复实验 3 次, 每次统计 250 个细胞($P < 0.01$); (D) 将稳定表达 GFP- α -tubulin 的 HeLa 细胞转染针对 TPX2 的干涉小 RNA, 再加入紫杉醇处理, 跟踪观察. 由此可见, 当 TPX2 被 RNAi 干涉去除后, 紫杉醇处理不能诱导新的纺锤体极产生

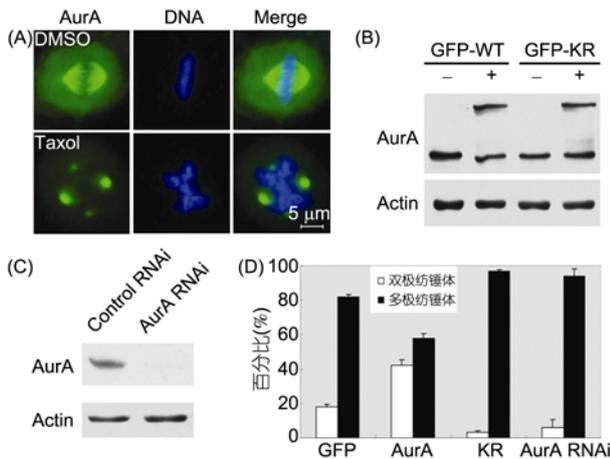


图3 过量表达 Aurora-A 可降低紫杉醇诱导的多极纺锤体组装

(A) 用 4 nmol/L 紫杉醇处理分裂期 HeLa 细胞, 免疫荧光标记 Aurora-A(绿色)和 DNA(蓝色). Aurora-A 同时定位于所有纺锤体极的位置; (B) HeLa 细胞分别转染 GFP, GFP-Aurora-A 或 GFP-KR, Western blotting 检测外源蛋白表达水平; (C) HeLa 细胞转染针对 Aurora-A 的干扰小 RNA, 48 h 后检测 Aurora-A 蛋白水平; (D) HeLa 细胞分别转染 GFP, GFP-Aurora-A, GFP-KR 或针对 Aurora-A 的干扰小 RNA, 再用 4 nmol/L 紫杉醇处理 1 h, 固定观察统计双极纺锤体和多极纺锤体细胞比例. 每个统计数据重复实验 3 次, 每次统计 300 个细胞($P<0.01$)

一步电子显微镜检测结果显示, 动粒结构装配正常, 且外层与一束微管直接相连(图 4(B)). 统计数据表明, 在低浓度紫杉醇处理下, 所有进入后期的细胞中有 31% 发生了多极细胞分裂(图 4(C)).

同时研究了多极细胞分裂中染色体是如何分配的. 将 LO2 细胞用紫杉醇处理, 经固定后用特定染色体探针进行荧光原位杂交. LO2 细胞为三倍体细胞, 更有利于对多极分裂中染色体向多个子细胞的分配情况进行统计. 结果表明, 在低浓度紫杉醇短时间处理诱导的多极分裂过程中, 染色体向各个子细胞中的分配是一个完全随机的过程(图 4(D)和(E)).

为了研究多极分裂产生的子细胞是否可以继续增殖, 将稳定表达 GFP- α -tubulin 的 HeLa 细胞进行低浓度紫杉醇处理, 1 h 后释放细胞, 并通过缩时电影活细胞示踪技术对这些细胞进行连续观察. 结果显示, 有 60% 的子细胞可以存活并完成下一个细胞周期(图 5(A)). 以上结果表明, 部分被低浓度紫杉醇短时间处理过的细胞可以完成多极细胞分裂, 产生多个子细胞, 染色体遗传物质被随机分配到各个子细胞中; 而部分子细胞可以继续存活并完成至少一个

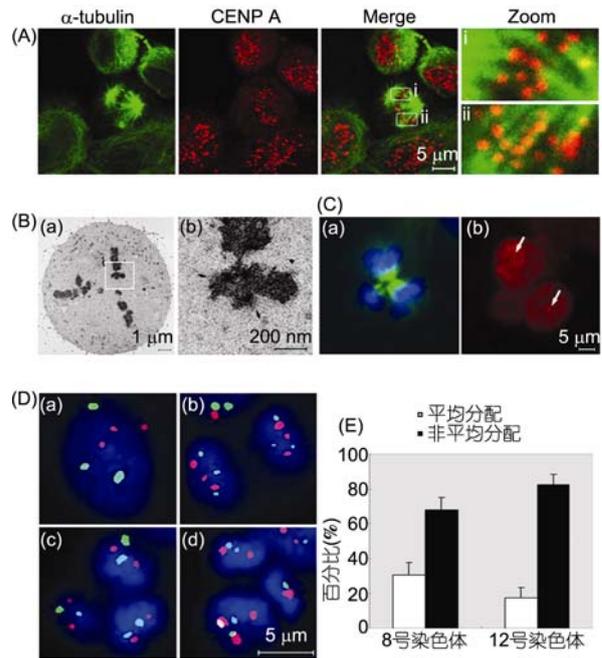


图4 部分紫杉醇处理细胞可完成多极分裂

(A) 紫杉醇处理 HeLa 细胞, 免疫荧光标记 α -tubulin(绿色)和 CENP A(红色). 通过二色叠加(merge)和局部放大(zoom), 可见所有动粒都被微管捕捉; (B) 透射电子显微镜检测三极纺锤体细胞的动粒结构. (a)为低倍观察; (b)为高倍观察. 可见完整的 3 层动粒结构, 并且动粒被微管捕捉; (C) 紫杉醇处理的 HeLa 细胞完成三极细胞分裂. 免疫荧光标记 α -tubulin(绿色), centrin2(红色)和 DNA(蓝色). 在 3 个子细胞中, 只有 2 个含有中心体结构; (D)和(E) 荧光原位杂交检测 LO2 细胞的 8 和 12 号染色体分配情况. (D) 用 4 nmol/L 紫杉醇处理 LO2 细胞 1.5 h, 固定和染色标记 8 号(红色)和 12 号(绿色)染色体特异性探针. 在 DMSO 处理的对照细胞中((a)和(b)), 染色体平均分配到子细胞中; 在紫杉醇处理后产生的三极分裂细胞中((c)和(d)); (E) 30.9% 的 8 号染色体和 17.4% 的 12 号染色体平均分配到 3 个子细胞中; 而 68.1% 的 8 号染色体和 82.6% 的 12 号染色体则是随机分配到各个子细胞中. 表明多极细胞分裂中染色体是随机分配到各个子细胞中的. 每个统计数据重复实验 3 次, 每次统计 250 个细胞($P<0.01$)

细胞分裂周期, 产生新的子代.

2.5 低浓度紫杉醇处理可以诱导正常二倍体细胞发生多极细胞分裂

为了扩大本实验结论的适用范围, 同时检测了低浓度紫杉醇短时间处理对原代培养二倍体细胞 HUVEC(3~7 代)的作用. 将 HUVEC 用 4 nmol/L 紫杉醇处理 1 h, 免疫荧光染色观察, 结果显示有 30% 分裂期 HUVEC 细胞形成了多极纺锤体, 其中部分细胞可以完成多极分裂, 产生多个子细胞, 而在该过程中并未发生中心体过度复制. 同时, 进一步检测了紫杉

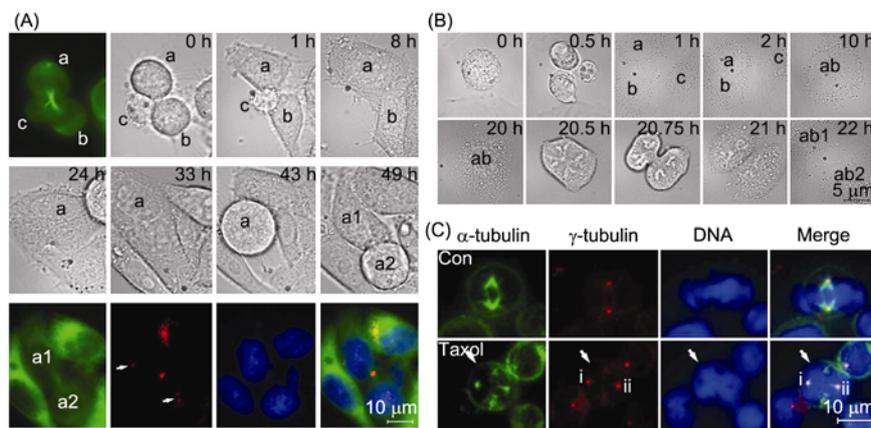


图5 部分多极分裂产生的子细胞可再完成至少一个周期的细胞分裂过程

(A) 用4 nmol/L紫杉醇处理稳定表达GFP- α -tubulin的HeLa细胞1 h, 然后释放, 跟踪拍照. 将多极分裂产生的3个子细胞标记为a, b和c. 释放49 h后, a细胞再次完成分裂, 产生a1和a2. 将细胞固定, 免疫荧光标记centrin2(红色)和DNA(蓝色). 可见a1和a2都含有中心体结构(箭头所示); (B) 用4 nmol/L紫杉醇处理分裂期HUVEC细胞1 h, 然后释放, 跟踪拍照. 将分裂产生的3个子代细胞标记为a, b和c. 释放2 h后a和b细胞发生融合, 标记为ab. 22 h后, 细胞ab完成下一次细胞分裂周期, 形成ab1和ab2; (C) 将紫杉醇注射到BALB/c小鼠体内, 终浓度10 nmol/L. 2 h后检测小鼠肝细胞, 固定标记 α -tubulin(绿色), γ -tubulin(红色)和DNA(蓝色). 箭头所指细胞形成了四极纺锤体, 但只有2个极的位置含有中心体(i和ii). 表明部分小鼠肝细胞纺锤体组装发生了异常

醇诱导多极分裂产生的子代HUVEC细胞的存活能力. 经缩时电影活细胞示踪观察显示, 有14%子代细胞可以完成至少一个细胞分裂周期(图5(B)). 在子代细胞增殖过程中, 2个子代细胞之间可能发生细胞融合, 之后再行细胞周期活动. 以上结果表明, 短时间低浓度紫杉醇处理同样可以诱导正常二倍体细胞发生多极纺锤体组装, 进而引发多极细胞分裂, 产生可存活的子代细胞.

通过低浓度紫杉醇短时间处理动物个体, 检测其体内细胞是否会像体外培养细胞那样对紫杉醇做出反应. 通常情况下, 临床使用的紫杉醇剂量约为 $1.6 \mu\text{mol/L}$ (175 mg/m^2), 其半衰期为1.3~1.6 h. 本研究中, 将紫杉醇通过尾静脉注射到BALB/c小鼠体内, 使其终浓度为10 nmol/L. 2 h后对小鼠肝组织细胞进行固定和免疫荧光检测(图5(C)). 在注射了DMSO的对照组中, 没有发现细胞分裂异常. 而在注射了紫杉醇的小鼠肝细胞中, 观察到有1.3%分裂期细胞形成了多极纺锤体, 而未观察到中心体过度复制现象. 表明紫杉醇可能对动物体内的细胞产生与体外培养细胞类似的影响.

2.6 紫杉醇处理中存活的部分细胞有着不同于母代细胞的染色体数目

为了确定紫杉醇处理细胞的最终结果, 将处于分裂期的HUVEC细胞用4 nmol/L紫杉醇处理1 h,

释放后继续正常培养4天, 然后收取细胞并检测染色体数目. 对于DMSO处理的对照细胞组, 细胞染色体数目为正常二倍体的数目(46条), 而在紫杉醇处理组中, 有20%的细胞染色体数目发生了变化(图6(A)和(B)). 该结果从另一方面验证了之前的结果, 低浓度紫杉醇短时间处理正常二倍体细胞, 会引发多极细胞分裂, 并产生非整倍体子代.

对紫杉醇处理的永生化细胞的细胞命运进行了观察. 将分裂期HeLa细胞用低浓度紫杉醇短时间处理后释放, 培养在含0.3%软琼脂的细胞培养板上, 2周后对存活的大于100个细胞的细胞克隆进行染色体数目检测. 在对照组培养板上, 长满了细胞克隆; 而紫杉醇处理过的细胞形成的克隆数则显著少于前者. 虽然HeLa细胞本身不是正常二倍体细胞, 但其染色体数目相对稳定, 为80条. 在对照组中, 92%细胞的染色体数目均为80; 而在紫杉醇处理后形成的细胞克隆中, 85%细胞染色体数目少于80, 15%细胞染色体数大于80(图6(C)和(D)). 以上结果表明, 部分细胞可以从低浓度紫杉醇处理中存活下来, 并形成与母代染色体数目不同的子代细胞群落.

3 讨论

本实验建立了一个在一定程度上模拟紫杉醇临床使用时的药物残留剂量的实验体系, 并使用该体

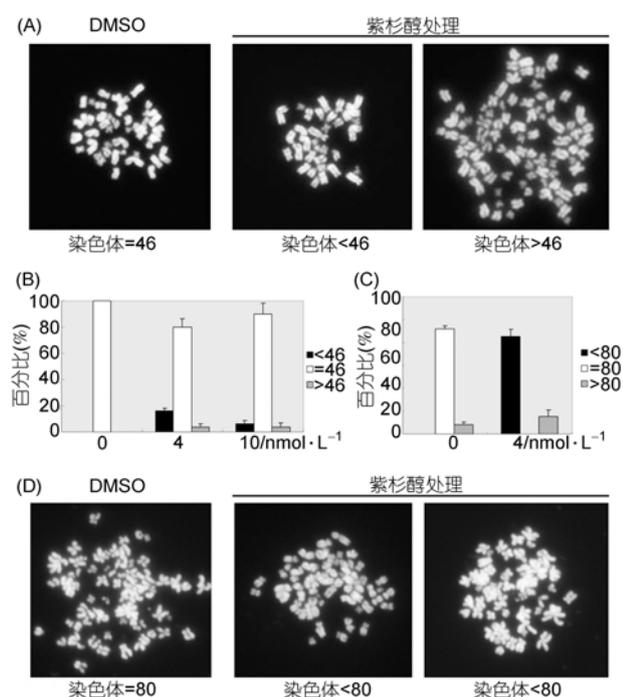


图6 从紫杉醇处理中存活下来的细胞群落含有与母代不同的染色体数目

(A) 将分裂期 HUVEC 细胞用低浓度紫杉醇处理 1 h, 释放后继续培养 4 天, 之后对存活细胞进行染色体计数; (B) 为(A)实验的统计数据. 每个统计数据重复实验 3 次, 每次统计 100 个细胞 ($P<0.01$); (C)为(D)实验的统计数据. 每个统计数据重复实验 3 次, 每次统计 100 个细胞 ($P<0.01$); (D) 将分裂期 HeLa 细胞用低浓度紫杉醇处理 1 h, 释放后转移到 0.3%软琼脂板上进行培养, 2 周后收取存活细胞克隆进行染色体计数

系研究了紫杉醇对细胞的影响. 该实验体系与之前报道过的一些文献所采用的大剂量或长时间的实验条件均不相同^[16,20,28,29]. 结果显示, 低浓度短时间紫杉醇处理会诱导非中心体依赖性的多极纺锤体组装, 在该过程中, TPX2 对不依赖于中心体的纺锤体极的组装是必需的, 而过量表达 Aurora-A 激酶则可以减少紫杉醇处理诱导的多极纺锤体形成. 经紫杉醇处理诱导产生多极纺锤体的部分细胞还可以完成多极细胞分裂, 并进入下一个细胞周期, 甚至进行多次的细胞分裂, 形成与母代细胞染色体数不同的子代细胞.

之前有研究认为, 紫杉醇处理抑制了 NuMA 向正常纺锤体极的转运过程, 引起了微管的重新排布并在核膜破裂之前形成异常的星体结构^[29]. 本研究着重探讨了紫杉醇对分裂期纺锤体结构的影响, 主

要包括非中心体依赖性极的产生、纺锤体整体结构的改变以及随之发生的遗传物质异常分配现象. 在非中心体依赖性极的形成过程中, 发现有两种情况, 一是直接从已有的极上分离出新极, 另一种则是在微管交叉位置形成新的微管组织中心. 实验中发现, 有 2 个因子对于紫杉醇处理的结果起重要作用. TPX2 是一个在染色体诱导微管组织和纺锤体组装过程中发挥作用的微管结合因子, 对于非中心体依赖性纺锤体极的产生是必需的. 去除 TPX2 虽然会使细胞由于 Eg5 活性提高而形成多极纺锤体^[14], 但也会减少经紫杉醇处理诱导产生多极纺锤体的细胞比例. 去除 TPX2 使紫杉醇诱导多极纺锤体产生的作用降低, 有可能是由于细胞缺少了这个重要的微管组织因子. 此外, 本研究还发现在细胞内过量表达 Aurora-A 激酶可以减少紫杉醇诱导产生的多极纺锤体, 而 Aurora-A 的激酶活性在该过程中是必需的. 因此推测, 在紫杉醇作用下, TPX2 可能定位到非中心体依赖性极的位置, 进而募集 Aurora-A, Aurora-A 又可以募集许多纺锤体极组织相关因子, 如 γ -tubulin, centrosomin 和 TACC/MAP215^[12], 从而进一步促进新极的产生. 而另一方面, Aurora-A 在中心体附近的定位是不依赖于 TPX2 的^[26]. 当过量表达 Aurora-A 时, 可能有更多的 Aurora-A 聚集到中心体周围, 加强中心体极的形成, 因此抑制了非中心体依赖性极的产生过程.

先前研究大多使用流式细胞术来检测药物处理后的细胞命运^[16,28], 而本实验则试图更为深入地研究药物处理后细胞的存活及分裂情况. 通过显微镜活细胞示踪观察, 跟踪了受紫杉醇处理的细胞在 2 个细胞周期内的变化, 发现部分细胞可以完成多极分裂过程, 产生多个子细胞. 这些子细胞还可以至少完成一个细胞周期, 生成更多异常的子代细胞. 而通过长时间软琼脂板细胞培养实验, 发现紫杉醇处理后存活下来的子细胞可以形成不同于母代细胞染色体数的子代细胞群落. 该结果与显微镜活细胞示踪观察到的多极分裂过程一致. 荧光原位杂交结果也显示, 多极分裂导致染色体随机分布, 改变细胞的染色体组成, 形成非整倍体细胞. 当多极分裂产生的子细胞随机获得足够存活的基因组信息后, 就可能继续分裂, 存活下来^[30,31], 这些存活的细胞可能会进一步形成非整倍体细胞群落. 总之, 本研究揭示了短时间低浓度紫杉醇处理可以诱导非中心体依赖性的多极纺锤体组装, 进而发生多极细胞分

裂, 导致遗传物质非正常分配, 最终形成不同于母代染色体数的子代群落. 本研究结果揭示了一种不依赖于中心体的纺锤体极的产生机制, 并可能提出了一条新的非整倍体细胞的形成途径.

参考文献

- 1 Boveri T B. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fischer, Jena, Germany, 1914
- 2 Brinkley B R. Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol*, 2001, 11: 18—21
- 3 Saunders W S, Shuster M, Huang X, et al. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 303—308
- 4 Quintyne N J, Reing J E, Hoffelder D R, et al. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science*, 2005, 307: 127—129
- 5 Pihan G A, Purohit A, Wallace J, et al. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res*, 1998, 58: 3974—3985
- 6 Pihan G A, Purohit A, Wallace J, et al. Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res*, 2001, 61: 2212—2219
- 7 Pihan G A, Wallace J, Zhou Y, et al. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res*, 2003, 63: 1398—1404
- 8 Sluder G, Nordberg J J. The good, the bad and the ugly: the practical consequences of centrosome amplification. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16: 49—54
- 9 Doxsey S, Zimmerman W, Mikule K. Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol*, 2005, 15: 303—311
- 10 Hinchcliffe E H, Sluder G. "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev*, 2001, 15: 1167—1181
- 11 Scholey J M, Brust-Mascher I, Mogilner A. Cell division. *Nature*, 2003, 422: 746—752
- 12 Fu J, Bian M, Jiang Q, et al. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res*, 2007, 5: 1—10
- 13 Cleveland D W. NuMA: a protein involved in nuclear structure, spindle assembly, and nuclear re-formation. *Trends Cell Biol*, 1995, 5: 60—64
- 14 Garrett S, Auer K, Compton D A, et al. hTPX2 is required for normal spindle morphology and centrosome integrity during vertebrate cell division. *Curr Biol*, 2002, 12: 2055—2059
- 15 Karsenti E, Vernos I. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science*, 2001, 294: 543—547
- 16 Paoletti A, Giocanti N, Favaudon V, et al. Pulse treatment of interphasic HeLa cells with nanomolar doses of docetaxel affects centrosome organization and leads to catastrophic exit of mitosis. *J Cell Sci*, 1997, 110: 2403—2415
- 17 De Brabander M, Geuens G, Nuydens R, et al. Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 5608—5612
- 18 Jordan M A, Toso R J, Thrower D, et al. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 9552—9556
- 19 Jordan M A, Wendell K, Gardiner S, et al. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res*, 1996, 56: 816—825
- 20 Chen J G, Horwitz S B. Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs. *Cancer Res*, 2002, 62: 1935—1938
- 21 Ikui A E, Yang C P, Matsumoto T, et al. Low concentrations of taxol cause mitotic delay followed by premature dissociation of p55CDC from Mad2 and BubR1 and abrogation of the spindle checkpoint, leading to aneuploidy. *Cell Cycle*, 2005, 4: 1385—1388
- 22 Xiong Y, Huo Y, Chen C, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 tyrosine 1175 signaling controls VEGF-induced von Willebrand factor release from endothelial cells via phospholipase C-gamma 1- and protein kinase A-dependent pathways. *J Biol Chem*, 2009, 284: 23217—23224
- 23 Shi Q, King R W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*, 2005, 437: 1038—1042
- 24 Schatz C A, Santarella R, Hoenger A, et al. Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *Embo J*, 2003, 22: 2060—2070
- 25 Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman A R. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*, 2003, 3: 51—62

- 26 Kufer T A, Sillje H H, Korner R, et al. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol*, 2002, 158: 617—623
- 27 Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A: a guardian of poles. *Nature reviews*, 2005, 5: 42—50
- 28 Torres K, Horwitz S B. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res*, 1998, 58: 3620—3626
- 29 Hornick J E, Bader J R, Tribble E K, et al. Live-cell analysis of mitotic spindle formation in taxol-treated cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2008, 65: 595—613
- 30 Sotillo R, Hernando E, Diaz-Rodriguez E, et al. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell*, 2007, 11: 9—23
- 31 Weaver B A, Silk A D, Montagna C, et al. Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell*, 2007, 11: 25—36