

## • 药理与临床 •

## 对映-贝壳杉烷二萜 wangzaozin A 诱导 A549 细胞骨架重组和迁移抑制的机制研究

杨明惠, 马绍城, 张 会, 李翡翡, 丁 兰\*

西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070

**摘 要:** 目的 研究对映-贝壳杉烷二萜 wangzaozin A 诱导 A549 细胞骨架重组与迁移抑制的机制。方法 采用 MTT、显微镜观察、免疫荧光染色、Western blotting、划痕实验等方法考察 wangzaozin A 对 A549 细胞毒性、细胞形态、细胞骨架、蛋白表达和细胞迁移的影响。结果 Wangzaozin A (0.2~0.8  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 A549 细胞 24、48、72 h 后, 细胞形态显著改变, 细胞伪足增多并拉伸延长; 细胞核扁平呈肾形改变; 微管和角蛋白纤维网络的排布方式显著改变, 表明细胞骨架经历了持续的重组过程。Wangzaozin A 可显著上调细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK)、微管相关蛋白 4 (microtubule-associated protein 4, MAP4) 和角蛋白 8 (keratin 8, K8) 的磷酸化水平 ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), ERK 抑制剂 U0126 可显著抑制 wangzaozin A 诱导的 ERK、MAP4 和 K8 的磷酸化水平上调 ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ )。Wangzaozin A 可显著抑制 A549 细胞的迁移, 呈剂量和时间相关性。结论 Wangzaozin A 可以通过激活 ERK 信号通路, 上调 MAP4 和 K8 磷酸化水平, 增加微管和角蛋白纤维的动态性, 干扰细胞微管动力学过程, 从而抑制 A549 细胞迁移。

**关键词:** 对映-贝壳杉烷二萜; wangzaozin A; A549 细胞; 细胞骨架重组; 细胞迁移

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)24-6229-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.012

Mechanism of wangzaozin A, an *ent*-kaurane diterpene, on cytoskeletal rearrangement and migration inhibition of A549 cells

YANG Ming-hui, MA Shao-cheng, ZHANG Hui, LI Fei-fei, DING Lan

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

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of cytoskeletal recombination and migration inhibition induced by wangzaozin A, *ent*-kaurane diterpenoid, in A549 cells. **Methods** The effects of wangzaozin A on cytotoxicity, cell morphology, cytoskeleton and protein expression as well as cell migration were detected in A549 cells by using MTT, microscope observation, Western blotting, immunofluorescence assay and scratch assay. **Results** Wangzaozin A induced significant changes in cell morphology at 24, 48 and 72 h, including increased pseudopods, stretched pseudopods and flattened nucleus in A549 cells. Moreover, microtubules and keratin fibers networks in A549 cells also showed obvious rearrangement, which indicated the cytoskeleton had gone through a continuous recombination process. Further, wangzaozin A significantly increased the phosphorylation of extracellular regulated protein kinase (ERK), microtubule-associated protein 4 (MAP4), keratin 8 (K8) ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), while wangzaozin A-induced phosphorylation of MAP4 and K8 were suppressed in A549 cells treated with ERK inhibitors U0126 ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ); Wangzaozin A inhibited the migration of A549 cells with a correlation between concentration and time. **Conclusion** Wangzaozin A can upregulate the phosphorylation of MAP4 and K8 by activating ERK signaling pathway, which can significantly increase the dynamics of MTs and KFs, disturb the dynamic balance of the cytoskeleton, and inhibit the migration of A549 cells.

**Key words:** *ent*-kaurane diterpenoid; wangzaozin A; A549 cells; cytoskeletal recombination; cell migration

细胞迁移是多细胞生物体形态发生、组织更新、免疫响应、伤口愈合、癌细胞转移的核心事件<sup>[1-2]</sup>。

细胞迁移是一个极化的细胞过程, 细胞形成突出的前部和回缩的尾部。细胞骨架及其调节蛋白所组成

收稿日期: 2020-06-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31660101); 国家自然科学基金资助项目 (30960464)

作者简介: 杨明惠, 女, 在读硕士, 研究方向为天然产物抗癌分子药理学。E-mail: yangmh0115@163.com

\*通信作者 丁 兰, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为天然产物抗癌分子药理学。E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn

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<sup>[3]</sup>。在此过程中, 微丝介导形成持续的收缩力, 促进细胞前突、黏着、收缩及回缩, 形成细胞的整体位移<sup>[3]</sup>。中等纤维(波形纤维和角蛋白纤维)磷酸化后重组再定位, 与其他骨架结构的协调保持一致<sup>[3]</sup>。微管维持极性信号的传递, 其极化功能依赖于微管动态性与稳定性的不对称调节、微管相关蛋白(microtubule-associated proteins, MAPs)和信号分子的不对称分布和调节<sup>[3-5]</sup>。微管的动态性有利于细胞极化过程的微管重塑, 微管的稳定性促进细胞迁移的前突伪足形成和黏着斑的形成、成熟、解聚<sup>[4]</sup>。MAPs 在细胞极化和微管动态调节中起着关键性作用, MAP1B、MAP4 等关联分子的磷酸化与去磷酸化, 可以调节与微管之间的亲和态, 进而调节微管组装动力学<sup>[6-7]</sup>。MAP1B 主要在神经细胞表达, MAP4 是非神经细胞中表达的关键微管相关蛋白<sup>[8]</sup>。细胞迁移的调控依赖于一系列细胞内外信号的时空协调和整合<sup>[9-10]</sup>。外界刺激如低氧、药物分子等, 可通过干预胞内相关信号通路, 从而调节细胞骨架及其相关蛋白, 影响细胞迁移<sup>[11-12]</sup>。

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 小细胞和非小细胞肺癌分别占比 13% 和 83%, 其中非小细胞肺癌的 5 年存活率仅为 18%<sup>[13]</sup>。非小细胞肺癌的临床治疗主要为早期手术联合化疗、放疗, 中晚期癌变的患者采用靶向药物治疗和化疗<sup>[14]</sup>。细胞癌变恶化的重要标志是迁移浸润, 因此, 筛选抑制非小细胞肺癌细胞迁移的天然小分子化合物并阐释其机制, 对靶向药物的进一步研究具有重要价值。

香茶菜属植物在我国分布 90 余种, 有 30 余种作为抗炎、抗菌、抗癌草药被广泛使用, 其中冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 被收入《中国药典》。香茶菜属植物富含的对映-贝壳杉烷二萜是其主要的活性成分<sup>[15]</sup>, 现已分离鉴定超过 500 种。由于该类化合物较强的细胞毒性, 药理学研究主要集中于抗癌活性及其机制。研究表明, 腺华素(adenanthin)靶向调节过氧化还原蛋白 I/II; 表诺多星(epinodosin)、香奈菜素 B(rabdosin B)、leukamenin E、wangzaozin A 调节还原型辅酶 II 活性, 升高胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS), 诱导白血病细胞分化<sup>[16-20]</sup>; 冬凌草甲素(oridonin)通过靶向白血病融合蛋白 AML1-ETO, 诱导癌细胞凋亡<sup>[21-22]</sup>; 川藏香茶菜甲素(pharicin A)靶向纺锤体组装检查

点蛋白 BubR1, 使白血病细胞 Jurkat 和 Raji 阻滞于有丝分裂期<sup>[23]</sup>; leukamenin E 可特异性抑制癌细胞角蛋白纤维组装<sup>[24]</sup>。这些化合物作用靶点和药理作用多样, 具有一定的应用前景。课题组前期对总序香茶菜 *Isodon racemesa* (Hemsl.) Hara 中分离的对映-贝壳杉烷二萜 wangzaozin A 的抗癌活性进行了系列研究报道<sup>[20,25-27]</sup>, 发现 wangzaozin A 在较低浓度体系下可通过诱导 HeLa 细胞的胞质骨架重组, 导致细胞形态显著改变, 但其机制尚不清楚。本研究通过 MTT 法、免疫荧光技术、Western blotting 技术和划痕实验等检测了 wangzaozin A 对 A549 细胞毒性、细胞及核形态改变、微管和角蛋白纤维骨架重组、微管相关蛋白 4(microtubule-associated protein 4, MAP4)和角蛋白 8(keratin 8, K8)表达的影响, 为进一步揭示 wangzaozin A 抑制癌细胞增殖和细胞迁移的分子机制提供科学依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 细胞

人非小细胞肺癌 A549 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

### 1.2 试剂

DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 总蛋白提取试剂盒购自 BestBio 公司; BCA 蛋白定量试剂盒和抗体稀释液购自 TaKaRa 公司; U0126 (ERK 抑制剂) 购自 Sigma 公司; 台盼蓝、MTT 购自 Solarbio 公司; 丝裂霉素购自 AbMole 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物公司; PVDF 膜购自 Merck 公司; 脱脂奶粉、DAPI 购自 BioForxx 公司; Triton X-100 购自 Sangon Biotech 公司;  $\alpha$ -Tubulin、Pan-Keratin、细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)、phospho-ERK (Thr202/Tyr204) 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; MAP4、K8 (phospho S431) 抗体购自 Abcam 公司; phospho-MAP4 (Ser696) 抗体购自 Affinity Biosciences 公司; 磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、ZB-2305 山羊抗小鼠 IgG 抗体购自 ZSGB-BIO 公司; HRP-conjugated affinipure 山羊抗兔 IgG、Alexa fluor 594-conjugated 山羊抗兔 IgG、FITC-conjugated affinipure 驴抗小鼠 IgG 抗体购自 Proteintech 公司。

### 1.3 药品

wangzaozin A 单体(质量分数 $\geq 99.5\%$ )为本课题组从总序香茶菜中分离得到, 并采用红外、质谱、核磁共振、X-单晶衍射对结构进行确定<sup>[28]</sup>(图 1),

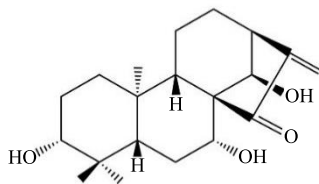


图 1 Wangzaozin A 分子结构式

Fig. 1 Chemical structure of wangzaozin A

wangzaozin A 溶解于 DMSO 配制成 10 mmol/L 母液。细胞松弛素 B (批号 101M4043V, 质量分数  $\geq 98\%$ )、秋水仙素 (批号 505A039, 质量分数 95%) 购自 Sigma 公司; 紫杉醇 (批号 519B022, 质量分数  $\geq 98\%$ ) 购自 Solarbio 公司。细胞松弛素 B 溶于 DMSO 制成 1 mg/mL 母液, 秋水仙素溶于蒸馏水中制成 1  $\mu\text{g/mL}$  母液, 紫杉醇溶于 DMSO 制成 10  $\mu\text{g/mL}$  母液。药品均于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。本研究中 DMSO 终浓度不超过 0.04% (抑制剂不超过 0.2%), 对细胞生长无影响。

#### 1.4 仪器

$\text{CO}_2$  培养箱 (Heal Force 公司); 酶标仪、电泳仪、转印槽 (Bio-Rad 公司); CKX41SF 倒置显微镜 (Olympus 公司); DMI4000B 荧光显微镜 (Leica 公司); Allegra 64R 离心机 (Beckman Coulter 公司); MM-3 型微量振荡仪 (姜堰市沈高康健生化器具厂)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

A549 细胞以 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (含 100 U/mL 青霉素、100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素), 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的恒温培养箱中培养。

### 2.2 wangzaozin A 对 A549 细胞活性的影响

A549 细胞以  $5 \times 10^4/\text{mL}$  接种于 96 孔板, 24 h 后加入 wangzaozin A (0.2、0.4、0.8、1.6、2.0  $\mu\text{mol/L}$ ), 对照组加入不含药物的培养基, 继续培养 24 h 或 48 h, 弃去培养基, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT (5 mg/mL), 37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 4 h。弃去培养液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 置振荡仪上低速振荡 10 min 使结晶物充分溶解, 使用酶标仪于 490 nm 处测量各孔的吸光度。

A549 细胞加入不同浓度的 wangzaozin A 孵育 24 h 后, 加入台盼蓝染色, 将细胞悬液滴加在细胞计数板上, 于显微镜下观察并计数死细胞。

### 2.3 wangzaozin A 对 A549 细胞形态及核形态影响

A549 细胞以  $5 \times 10^4/\text{mL}$  接种于 6 孔板中爬片, 24 h 后加入 wangzaozin A (0.2、0.4、0.8  $\mu\text{mol/L}$ )、细胞松弛素 B (400 nmol/L)、秋水仙素 (0.63

nmol/L)、紫杉醇 (3 nmol/L), 对照组加入不含药物的培养基, 孵育 48 h 或 72 h, 于倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。PBS 洗涤 3 次后, 以 4% 甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次后加入含 0.3% Triton X-100 的 PBS 透化 30 min, 加入 DAPI (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 染色 5 min 并用蒸馏水冲洗干净, 封片, 于荧光显微镜下观察拍照。细胞核横纵比大于 1.5 的细胞记作拟肾形核细胞, 每组统计细胞数量为 150 个。

### 2.4 wangzaozin A 对 A549 细胞微管和角蛋白纤维的影响

A549 细胞以  $5 \times 10^4/\text{mL}$  接种于 6 孔板中爬片, 24 h 后加入 wangzaozin A (0.2、0.4、0.8  $\mu\text{mol/L}$ ), 对照组加入不含药物的培养基, 孵育 48 h 或 72 h。

**2.4.1 wangzaozin A 对 A549 细胞微管的影响** 细胞爬片用 PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 每 5 分钟 1 次, 加入 4% 甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次后加入含 0.3% Triton X-100 的 PBS 透化 30 min, 弃通透液后加入一抗, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, 加入二抗, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, 加入 DAPI (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 染色 5 min 并用蒸馏水冲洗干净, 封片, 于荧光显微镜下观察拍照。

**2.4.2 wangzaozin A 对 A549 细胞角蛋白纤维的影响** 细胞爬片用 PBS (pH 8.0) 洗涤 3 次, 用预冷的甲醇于 -20  $^{\circ}\text{C}$  固定 5 min, 吸掉固定液, PBS 洗涤 3 次, 加入含 5% 山羊血清、0.3% Triton X-100 的封闭液于室温孵育 1 h。弃掉封闭液, 加入一抗, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 加入二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, 加入 DAPI (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 染色 5 min 并用蒸馏水冲洗干净, 封片后于荧光显微镜下观察拍照。

### 2.5 wangzaozin A 对 A549 细胞磷酸化 ERK、MAP4、K8 蛋白表达的影响

A549 细胞以  $5 \times 10^4/\text{mL}$  接种于培养皿中, 24 h 后加入 wangzaozin A (0.2、0.4、0.8  $\mu\text{mol/L}$ ) 孵育 24 h, ERK 抑制剂组加入 U0126 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理 1 h, 对照组加入不含药物的培养基。弃去培养液用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的裂解液裂解细胞 15 min, 收集细胞于预冷的离心管中, 14 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min。取上清液进行蛋白质定量, 加入上样缓冲液于 100  $^{\circ}\text{C}$  变性。蛋白样品经 8%~10% SDS-PAGE 电泳分离, 并转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉 (以 1 $\times$  TBST 溶解) 室温封闭 1 h, TBST 洗 3 次, 加入一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵

育过夜。以 TBST 洗涤 3 次,加入二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次。加入 HRP 化学发光液显影后拍照。

## 2.6 wangzaozin A 对 A549 细胞迁移的影响

采用 Gao 等<sup>[29]</sup>的方法, A549 细胞以  $2 \times 10^5/\text{mL}$  接种于 12 孔板,待细胞铺满后,用丝裂霉素 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 1 h。用移液管吸头划痕后,洗涤刮掉的细胞,加入 wangzaozin A ( $0.2$ 、 $0.4$ 、 $0.8 \mu\text{mol}/\text{L}$ ),对照组加入不含药物的培养基,分别在孵育 0、12、24 h 时拍照,测量细胞运动前后边缘距离,并计算不同时间细胞迁移率。

细胞迁移率 = (迁移前细胞前缘距离 - 迁移后细胞前缘距离) / 迁移前细胞前缘距离

## 2.7 数据统计

细胞核长宽度、Western blotting 条带和细胞迁移距离采用 Image J 1.52 a 软件测量分析。所有实验

重复 3 次。所有柱形图均在 GraphPad Prism 5.01 软件中生成。采用 SPSS 24.0 软件单因素方差 (ANOVA) 分析各组内差异。

## 3 实验结果

### 3.1 wangzaozin A 对 A549 细胞活性的影响

如图 2-A 所示, 24 h 时 wangzaozin A 对细胞活性有较小的抑制作用, 最大抑制率仅为 12%; 48 h 时 wangzaozin A 对细胞活性的抑制率增加, 最大抑制率达到 40.7%。Wangzaozin A ( $0.2 \sim 0.4 \mu\text{mol}/\text{L}$ ) 孵育 24、48 h 后, 与对照组相比细胞活性无显著差异; wangzaozin A ( $0.8 \sim 2.0 \mu\text{mol}/\text{L}$ ) 孵育 24、48 h 后, 细胞活性显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。台盼蓝染色结果如图 2-B 所示, wangzaozin A ( $0.2 \sim 2.0 \mu\text{mol}/\text{L}$ ) 处理 A549 细胞 48 h 后, 对细胞仅有增殖抑制作用, 各组细胞死亡率均不超过 1.0%。

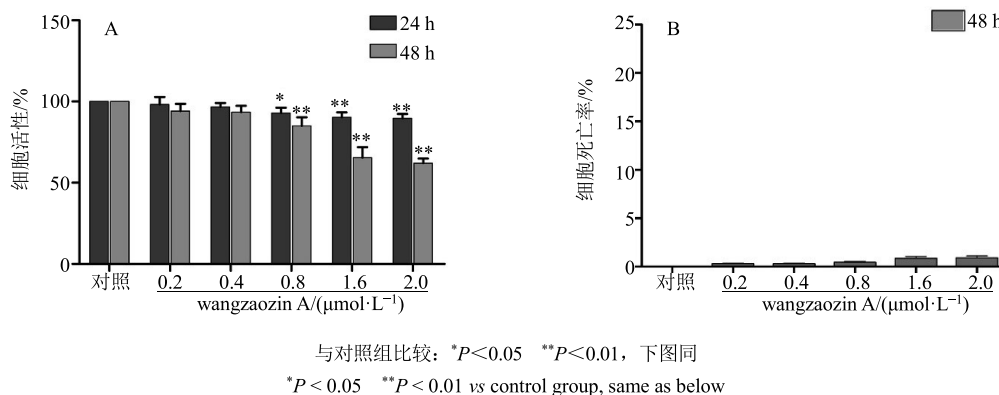


图 2 Wangzaozin A 对 A549 细胞增殖 (A) 和细胞死亡 (B) 的影响

Fig. 2 Effect of wangzaozin A on proliferation (A) and death (B) in A549 cells

### 3.2 wangzaozin A 对 A549 细胞及核形态的影响

细胞质骨架最重要的功能之一是维持细胞形态, 细胞形态的改变与细胞骨架的动力学变化密切相关<sup>[30]</sup>; 细胞核形态维持与微管、中等纤维 (角蛋白纤维、核纤层等) 密切相关<sup>[31-32]</sup>。

如图 3-A~E 所示, 对照组细胞为不对称长条形, wangzaozin A ( $0.2$ 、 $0.4$ 、 $0.8 \mu\text{mol}/\text{L}$ ) 处理 24 h 后大部分细胞形态有明显的变化, 表现为伪足显著增多并向不同方向延展 ( $P < 0.01$ ); 48 h 后, 细胞伪足数量进一步增多, 伪足长度进一步延长 ( $P < 0.01$ ); 与 24、48 h 相比, 72 h 组细胞的伪足有所减少, 绝大部分细胞呈现出有 3 个长伪足的三角形。24、48、72 h 时,  $0.4$ 、 $0.8 \mu\text{mol}/\text{L}$  wangzaozin A 组细胞伪足数量基本相同, 无剂量相关性。

进一步比较 wangzaozin A 与骨架化合物细胞松弛素 B、秋水仙素以及紫杉醇对 A549 细胞及核形

态影响, 发现 wangzaozin A 所引起的细胞形态变化与秋水仙素和紫杉醇对细胞形态的改变相似, 主要表现为细胞拉长以及伪足数量增加, 而细胞松弛素 B 使细胞铺展面积增加, 细胞从多边形变成圆形。紫杉醇对细胞核的影响与 wangzaozin A 相似, 表现为肾形核细胞增多, 而细胞松弛素 B 由于可抑制胞质分裂, 使部分细胞成为双核细胞; 秋水仙素处理后由于细胞内微管解聚, 对核形态影响不大。因此, 推测 wangzaozin A 诱导的细胞骨架重组模式与紫杉醇的诱导模式比较相似。

如图 4-A 所示, wangzaozin A 组细胞核扁化。如图 4-B、C 所示, 48、72 h 时不同浓度 ( $0.2$ 、 $0.4$ 、 $0.8 \mu\text{mol}/\text{L}$ ) wangzaozin A 组细胞核形态扁化, 形似肾形的细胞数随剂量增加而增加, 并随时间延长而增多。72 h 时,  $0.8 \mu\text{mol}/\text{L}$  wangzaozin A 组细胞的拟肾形核比例达到 56%。表明 wangzaozin A 处理的

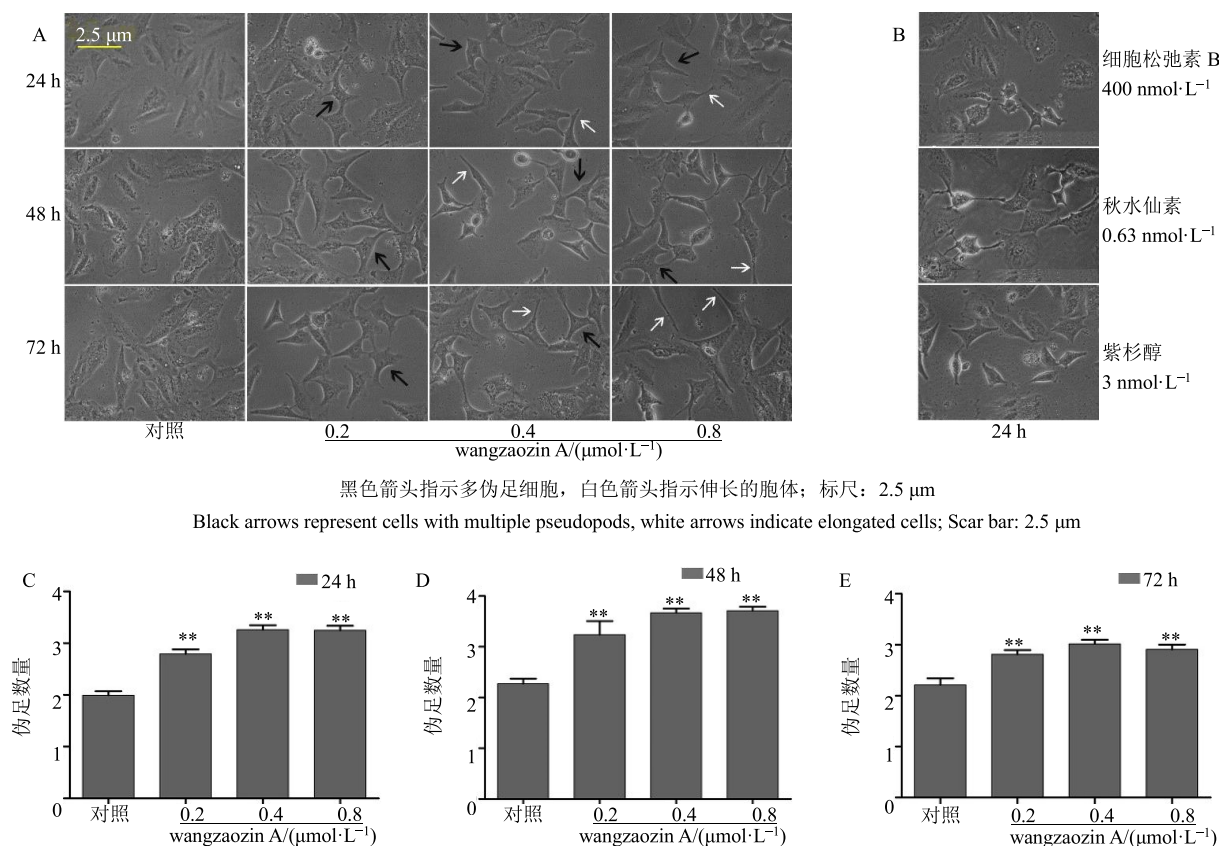


图 3 Wangzaozin A 对 A549 细胞形态 (A、B)、伪足数量 (C~E) 的影响

Fig. 3 Morphology changes (A and B) and number of pseudopods (C—E) of A549 cells induced by wangzaozin A

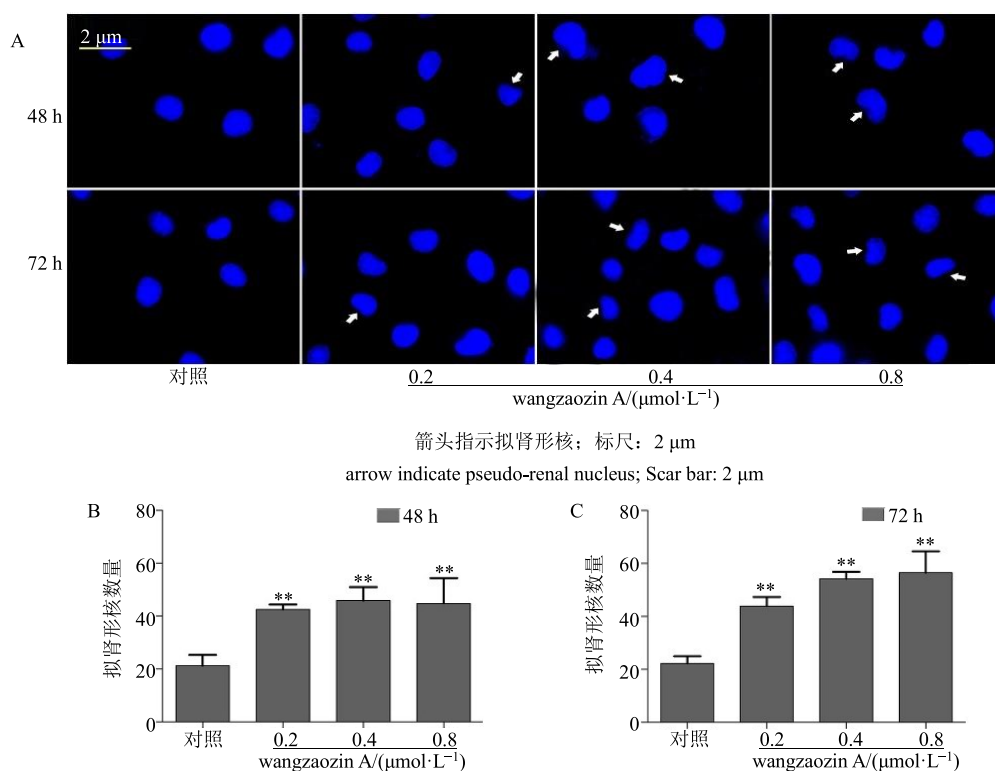


图 4 Wangzaozin A 对 A549 细胞核形态 (A) 和拟肾形核数量 (B、C) 的影响

Fig. 4 Nucleus morphology (A), number of pseudo-renal nucleus (B and C) of A549 cells induced by wangzaozin A

A549 细胞骨架发生重组, 影响细胞迁移运动。Wangzaozin A ( $0.2 \sim 0.8 \mu\text{mol/L}$ ) 对 A549 细胞活性具有较低的抑制作用, 因而选择 wangzaozin A ( $0.2 \sim 0.8 \mu\text{mol/L}$ ) 进行后续实验。

### 3.3 wangzaozin A 对 A549 细胞微管和角蛋白纤维重组的影响

细胞迁移需要细胞骨架的重塑, 在此过程中微丝主导伪足的形成<sup>[3]</sup>; 微管主导迁移方向的维持<sup>[4]</sup>; 上皮型细胞的角蛋白纤维重塑可增加细胞的黏弹性<sup>[33]</sup>。如图 5 所示, 对照组细胞的微管从核周向胞质周边

发出, 呈较均匀的网状结构; 48 h 时 wangzaozin A 组细胞微管排布变化较明显, 72 h 时多数细胞的微管骨架重组更为显著, 核周微管从中心粒处发出呈放射状排列的细胞增多, 在核周的中心粒周围区域荧光强度升高, 表明此处微管密度增加; 随 wangzaozin A 浓度增加, 伪足拉长, 延伸的伪足内微管成平行的束状排列。重组的角蛋白的排布特点与微管的排布相类似, 角蛋白纤维从细胞核周发出, 朝向伪足延伸, 核周荧光强度升高; 延伸的伪足内角蛋白纤维束状并同向排列, 少有网络状分布。

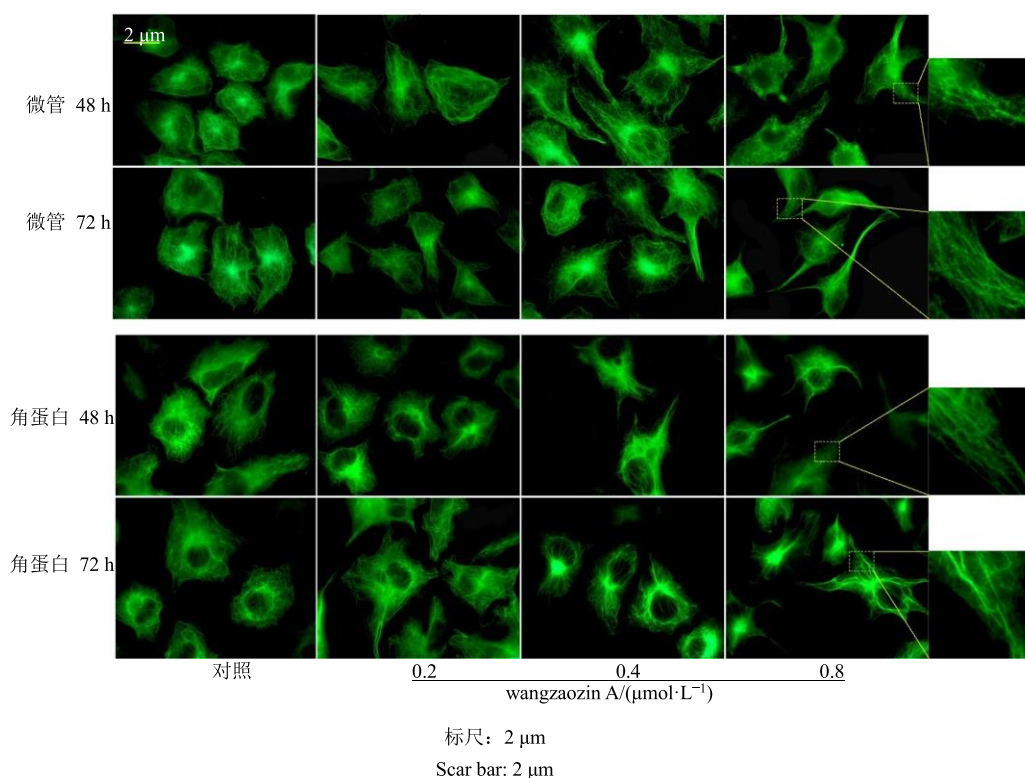


图 5 Wangzaozin A 对 A549 细胞微管和角蛋白纤维网络重组的影响

Fig. 5 Effect of wangzaozin A on arrangement of microtubules and keratin fiber networks in A549 cells

### 3.4 wangzaozin A 对 A549 细胞 ERK、MAP4、K8 蛋白磷酸化水平的影响

微管相关蛋白 MAP4 具有稳定微管的作用, 磷酸化 MAP4 可致微管失稳, 促进微管的动力学过程, 利于微管骨架网络的重塑<sup>[5]</sup>。角蛋白 K8-431 位点的磷酸化可增加 K8 的可溶性, 利于角蛋白纤维网络重组<sup>[34]</sup>。如图 6 所示, wangzaozin A 显著上调 ERK、微管相关蛋白 MAP4-S696、角蛋白 K8-S431 的磷酸化水平 ( $P < 0.01$ ), 显著下调 MAP4 蛋白表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 呈剂量相关性。如图 7 所示, ERK 抑制剂 U0126 可显著抑制 wangzaozin A 诱导的 MAP4-S696 和 K8-431 磷酸化 ( $P < 0.05$ 、

$0.01$ )。表明 wangzaozin A 通过激活 A549 细胞 ERK 通路, 诱导 MAP4 和角蛋白磷酸化, 并下调 MAP4 表达, 调节微管和角蛋白动力学, 促进微管和角蛋白网络重塑。

### 3.5 wangzaozin A 对 A549 细胞迁移的影响

如图 8 所示, wangzaozin A 显著抑制 A549 细胞迁移 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 呈剂量相关性。12 h 时, 对照组细胞迁移率为 43.7%, 0.2、0.4、0.8  $\mu\text{mol/L}$  wangzaozin A 组细胞迁移率分别为 36.5%、19.7%、17.6%; 24 h 时, 对照组细胞迁移率为 71.8%, wangzaozin A (0.2、0.4、0.8  $\mu\text{mol/L}$ ) 组细胞迁移率分别为 58.1%、23.6%、25.3%, 呈时间相关性。

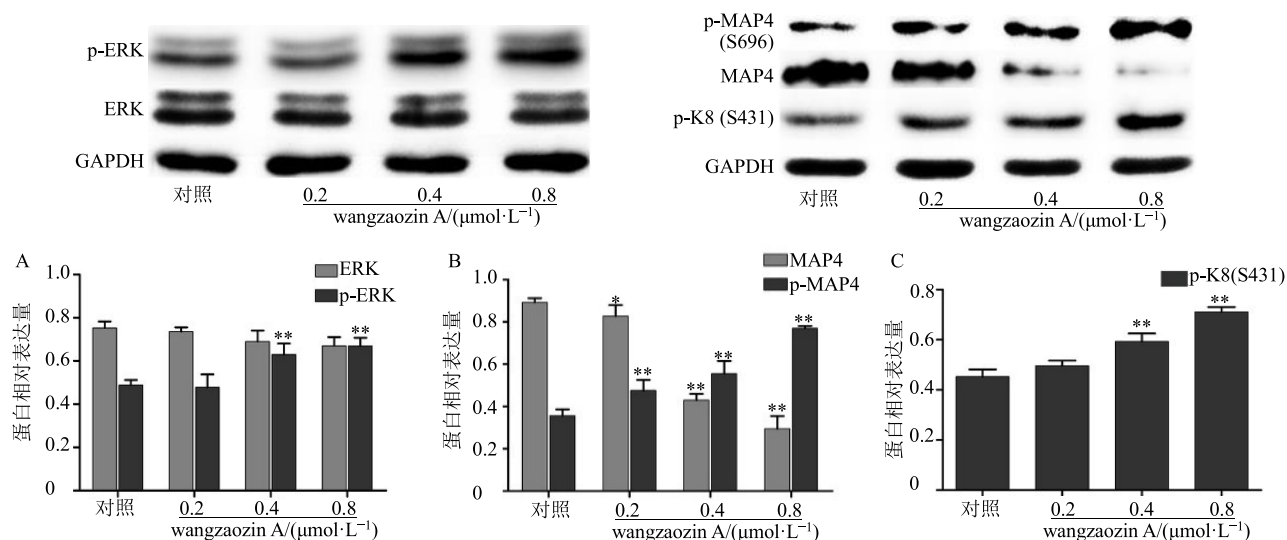


图 6 Wangzaozin A 对 A549 细胞 ERK (A)、MAP4 (B)、K8 (C) 磷酸化水平的影响

Fig. 6 Effect of wangzaozin A on expressions of ERK (A), MAP4 (B) and K8 (C) in A549 cells

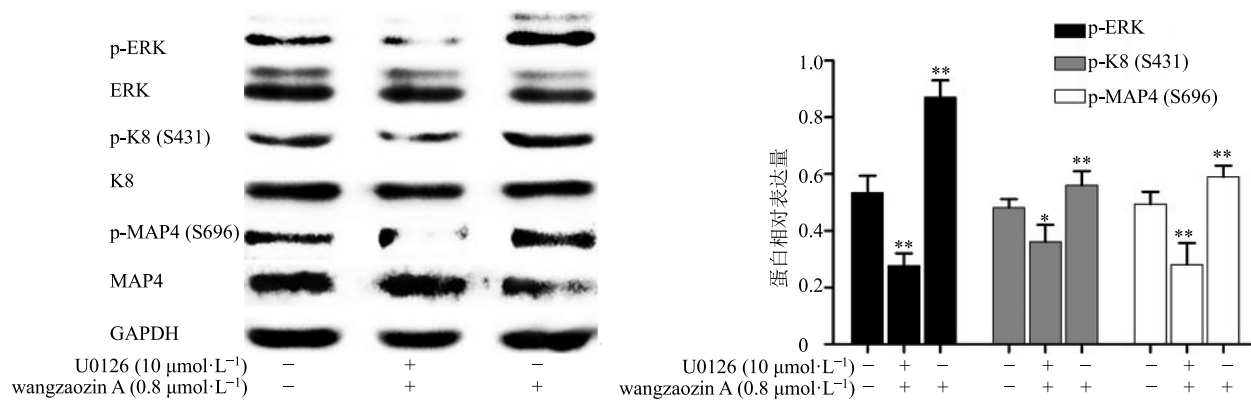


图 7 U0126 对 A549 细胞 ERK、MAP4、K8 磷酸化水平的影响

Fig. 7 Effect of U0126 on expressions of ERK, MAP4 and K8 in A549 cells

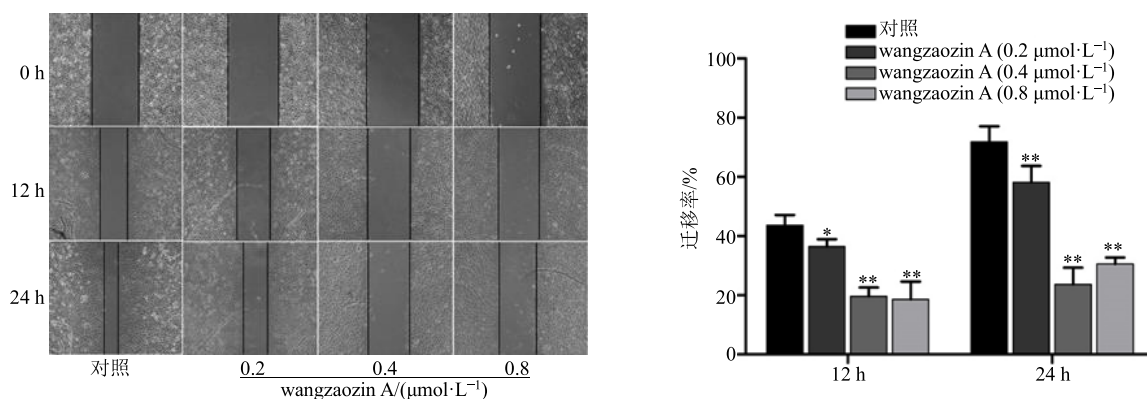


图 8 Wangzaozin A 对 A549 细胞迁移的影响

Fig. 8 Effect of wangzaozin A on migration of A549 cells

#### 4 讨论

课题组前期研究表明, wangzaozin A (0.8~2.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 可诱导 HeLa 细胞形态显著变化, 微管骨架

和角蛋白纤维在核周重组明显, 核周区域的纤维密度增加<sup>[27]</sup>。wangzaozin A 可能干预了细胞骨架的动力学过程, 导致骨架失稳并重塑。本研究通过考察

微管相关蛋白 MAP4 和角蛋白 K8 的磷酸化,阐释了 wangzaozin A 对 A549 细胞骨架重组的可能机制。

Wangzaozin A (0.2~0.8  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 A549 细胞毒性较小, 24、48 h 时细胞活性抑制率分别不超过 8%和 15%, 且细胞形态的改变与在 HeLa 细胞中观察到的现象基本一致。Wangzaozin A 对细胞的诱导效应与特异性骨架药物秋水仙素和紫杉醇的作用相似, 但本研究所用 3 种骨架化合物能仅在纳摩尔级浓度比 wangzaozin A 更快地诱导细胞形态改变, 浓度相差约 1 000 倍, 表明 wangzaozin A 调节细胞骨架重组的机制可能与上述经典骨架化合物不同。免疫荧光实验进一步证实了细胞微管和角蛋白纤维网络的重组最为明显。

微管相关蛋白 (MAPs) 承担着微管动力学调节的功能, 并通过翻译后修饰 (磷酸化) 调节与微管结合的亲和性及其在胞内的定位, 调控微管网络的排布方式<sup>[5]</sup>。非磷酸化的 MAP4 与微管具有高亲和性, 具有增强微管整体稳定性的作用。MAP4 通过 2 种方式稳定微管, 一是绑定微管, 并与微丝和中等纤维交互连接, 以阻抗外力使微管失稳; 二是使交联微管成束, 阻挡微管失稳蛋白与微管结合而致微管失稳<sup>[5,35]</sup>。MAP4 磷酸化后与微管的亲和性降低, 从微管上解离, 增加微管动态性。MAP4 的 Ser696 位点被认为是调节其与微管的亲和性的关键残基之一, Ser696 位点的磷酸化可增加微管的不稳定性<sup>[5,36-37]</sup>。本研究结果显示, wangzaozin A 可显著上调 A549 细胞 MAP4-Ser696 的磷酸化水平, 显著下调 MAP4 总蛋白表达, 呈剂量相关性。由于 MAP4 具有磷酸化依赖的降解特点<sup>[38]</sup>, 推测 wangzaozin A 可能通过持续磷酸化 MAP4-Ser696, 导致 MAP4 降解, 使其总蛋白表达降低, 大量 MAP4 从微管上解离并被降解, 使 A549 细胞微管严重失稳并重塑。ERK 抑制剂 U0126 可抑制 wangzaozin A 诱导的 MAP4-Ser696 磷酸化。本研究首次发现 ERK 信号通路调控 MAP4-Ser696 磷酸化。免疫荧光实验显示, wangzaozin A 使 A549 细胞微管骨架重组, 对照组细胞中微管的排布呈网状, wangzaozin A 组细胞内微管从细胞核周发出, 朝向各伪足方向呈平行束状排布。

K8 与 K18 在细胞内成对组装形成角蛋白纤维, 是 A549 等单纯性上皮细胞的主要中等纤维, 其最重要功能之一是机械支撑, 包括对细胞核形态的维持作用<sup>[39-40]</sup>。不同类型的角蛋白可通过头部和尾部的多个丝氨酸位点的磷酸化作用实现对功能的调节

作用, 如角蛋白某些位点的磷酸化使其可溶性增加, 调节角蛋白纤维组装-解组装动态平衡<sup>[41]</sup>。研究表明, SPC (sphingosylphosphorylcholine)、leukotriene B、TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 可诱导 Panc-1 细胞 K8-Ser431 磷酸化, 使角蛋白纤维重组, 增加细胞黏弹性, 并促进 Panc-1 细胞迁移<sup>[35,42]</sup>。本研究结果显示, wangzaozin A 可显著上调 A549 细胞 K8-Ser431 磷酸化水平, 使 A549 细胞角蛋白纤维重组。角蛋白的排布特点与微管的排布相类似, 从细胞核周发出, 多成束状, 朝向伪足延伸。ERK 抑制剂 U0126 可抑制 wangzaozin A 诱导的 K8-Ser431 磷酸化, 与 Park 等<sup>[43]</sup>报道的 SPC 诱导 Panc-1 细胞 K8-Ser431 磷酸化相一致。

细胞迁移是一个极为复杂的过程, 涉及了不同细胞骨架成分的协同移动。该过程不仅包括几种骨架纤维, 还涉及到几十种骨架相关蛋白。人永生角质形成细胞 (HaCaT) 在低氧和高氧环境中迁移速度增加<sup>[44]</sup>; 低氧可通过 p38 信号途径诱导人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 和人皮肤毛细血管内皮细胞 (HDMECs) 的微管相关蛋白 MAP4 磷酸化水平升高, 非磷酸化 MAP4 表达没有明显改变, 并促进 HUVECs 和 HDMECs 细胞迁移<sup>[12]</sup>。SPC 诱导 Panc-1 细胞 K8-Ser431 磷酸化导致角蛋白核周重组并促进 Panc-1 细胞迁移。本研究中 wangzaozin A (0.2~0.8  $\mu\text{mol/L}$ ) 显著上调 A549 细胞 MAP4 和 K8-Ser431 磷酸化水平, 显著降低非磷酸化 MAP4 表达, 诱导角蛋白重组, 但并未观察到 wangzaozin A 对 A549 细胞迁移的促进作用, 相反 wangzaozin A 显著抑制 A549 细胞迁移。推测 wangzaozin A 可能上调 MAP4 的磷酸化水平, 使 MAP4 从微管上解离, 降低微管稳定性, 同时磷酸化的 MAP4 可能进一步被降解, MAP4 大量减少, 进一步增加了微管的动态性; K8-Ser431 磷酸化水平升高也增加了角蛋白的动态性, 两者的加和作用可能导致了细胞骨架超动态性, 这种状态下的骨架重组干扰了迁移中微管骨架与其他骨架成分协同平衡, 不利于细胞的迁移运动, 反而抑制迁移。此外, wangzaozin A 使细胞的胞体和伪足的过度拉长、细胞核被挤压变形成肾形也可作为细胞骨架重组中动态失衡的佐证。

本研究以细胞骨架的 2 个调节位点, 微管相关蛋白 MAP4 和角蛋白 K8 为基础, 首次报道 wangzaozin A 通过激活 ERK 信号通路, 上调 MAP4-Ser696 和 K8-Ser431 的磷酸化水平, 引起微管失稳

和角蛋白 K8 可溶性增加, 干扰 A549 细胞细胞骨架动态平衡, 导致微管和角蛋白纤维重组, 并抑制 A549 细胞迁移。由于细胞迁移运动的复杂性, 这 2 个位点的调节是否直接抑制 A549 细胞迁移仍尚需进一步研究。wangzaozin A 可调节细胞骨架相关信号通路, 诱导骨架重组并干扰 A549 细胞迁移, 表明 wangzaozin A 具有抗癌先导化合物的潜在价值, 值得持续关注和深入研究。

#### 参考文献

- [1] Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(7): 445-457.
- [2] Bravo-Cordero J J, Hodgson L, Condeelis J. Directed cell invasion and migration during metastasis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, 24(2): 277-283.
- [3] Tang D D, Gerlach B D. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration [J]. *Resp Res*, 2017, 18(1): 54.
- [4] Etienne-Manneville S. Microtubules in cell migration [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013, 29: 471-499.
- [5] Ramkumar A, Jong B Y, Ori-Mckenney K M. ReMAPping the microtubule landscape: How phosphorylation dictates the activities of microtubule-associated proteins [J]. *Dev Dyn*, 2018, 247(1): 138-155.
- [6] Siegrist S E, Doe C Q. Microtubule-induced cortical cell polarity [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(5): 483-496.
- [7] Etienne-Manneville S. From signaling pathways to microtubule dynamics: The key players [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(1): 104-111.
- [8] Webster D R, Bratcher J M. Developmental regulation of cardiac MAP4 protein expression [J]. *Cell Motil Cytoskel*, 2006, 63(8): 512-522.
- [9] Ridley A J. Cell migration: Integrating signals from front to back [J]. *Science*, 2003, 302(5651): 1704-1709.
- [10] Devreotes P N, Bhattacharya S, Edwards M, et al. Excitable signal transduction networks in directed cell migration [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33(1): 103-125.
- [11] Boguslawski G, Lyons D, Harvey K A, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces endothelial cell migration and morphogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272(2): 603-609.
- [12] Zhang J H, Li L F, Zhang Q, et al. Phosphorylation of microtubule-associated protein 4 promotes hypoxic endothelial cell migration and proliferation [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 368.
- [13] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [14] Miller K D, Nogueira L, Mariotto A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(5): 363-385.
- [15] 杨明惠, 姜北, 赵勤实, 等. 黄花香茶菜的二萜成分研究 [J]. *中草药*, 2001, 32(5): 397-398.
- [16] Liu C X, Yin Q Q, Zhou H C, et al. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells [J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(5): 486-493.
- [17] 丁兰, 陈宗儒, 陈平, 等. NADPH 氧化酶源性活性氧介导 epinodosin 诱导 HL-60 细胞分化及细胞骨架重组 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(3): 273-284.
- [18] 丁兰, 李佩蔚, 孔花青, 等. 对映-贝壳杉烷型二萜 leukamenin E 对人早幼粒白血病 HL-60 细胞分化的诱导作用 [J]. *中国药房*, 2016, 27(13): 1771-1774.
- [19] 魏婧昕, 丁兰, 刘扬, 等. Rabdosin B 对急性早幼粒白血病细胞 HL-60 分化的诱导作用 [J]. *中草药*, 2018, 49(11): 2591-2600.
- [20] 丁兰, 陈祎平, 刘国安, 等. Wangzaozin A 调节 NADPH 氧化酶源性活性氧诱导 HL-60 细胞分化 [J]. *华中师范大学学报: 自然科学版*, 2015, 49(2): 252-260.
- [21] Zhou G B, Kang H, Wang L, et al. Oridonin, a diterpenoid extracted from medicinal herbs, targets AML1-ETO fusion protein and shows potent antitumor activity with low adverse effects on t(8;21) leukemia *in vitro* and *in vivo* [J]. *Blood*, 2007, 109(8): 3441-3450.
- [22] Sun K W. Oridonin induces apoptosis in gastric cancer through Apaf-1, cytochrome c and caspase-3 signaling pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(48): 7166.
- [23] Xu H Z, Huang Y, Wu Y L, 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(14): 2897-2907.
- [24] Zhu J H, Chen Y P, Chen Z R, 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.
- [25] 丁兰, 第五佳丽, 田继东, 等. 对映-贝壳杉烷型二萜化合物 wangzaozin A 对人早幼粒白血病 HL-60 细胞生长抑制和凋亡诱导的作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(8): 727-732.
- [26] 丁兰, 张世栋, 刘国安, 等. 对映-贝壳杉烷二萜化合物 wangzaozin A 对人胃癌癌细胞 SGC-7901 生长的影响 [J]. *西北师范大学学报: 自然科学版*, 2006, 42(3): 70-73.
- [27] 刘扬, 丁兰, 朱金辉, 等. Wangzaozin A 诱导人宫

- 颈癌 HeLa 细胞胞质骨架重排及细胞增殖抑制 [J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(7): 1159-1170.
- [28] 丁 兰, 郁开北, 刘国安. 细胞毒活性二萜 wangzaozin A 的晶体结构 [J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(8): 1455-1458.
- [29] Gao H X, Chen X J, Du X N, *et al.* EGF enhances the migration of cancer cells by up-regulation of TRPM7 [J]. *Cell Calcium*, 2011, 50(6): 559-568.
- [30] Fletcher D A, Mullins R D. Cell mechanics and the cytoskeleton [J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 485-492.
- [31] Lee C H, Kim M S, Chung B M, *et al.* Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(7): 707-715.
- [32] Tariq Z, Zhang H Y, Chia-Liu A, *et al.* Lamin A and microtubules collaborate to maintain nuclear morphology [J]. *Nucleus*, 2017, 8(4): 433-446.
- [33] Beil M, Micoulet A, Von Wichert G, *et al.* Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(9): 803-811.
- [34] Busch T, Armacki M, Eiseler T, *et al.* Keratin 8 phosphorylation regulates keratin reorganization and migration of epithelial tumor cells [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(9): 2148-2159.
- [35] Matsushima K, Tokuraku K, Hasan M R, *et al.* Microtubule-associated protein 4 binds to actin filaments and modulates their properties [J]. *J Biochem*, 2012, 151(1): 99-108.
- [36] Mori A, Aizawa H, Saido T C, *et al.* Site-specific phosphorylation by protein kinase C inhibits assembly-promoting activity of microtubule-associated protein 4 [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(38): 9341-9346.
- [37] Srsen V, Kitazawa H, Sugita M, *et al.* Serum-dependent phosphorylation of human MAP4 at Ser696 in cultured mammalian cells [J]. *Cell Struct Funct*, 1999, 24(5): 321-327.
- [38] Guo Y, Zhang X J, Xu Q B, *et al.* Human papillomavirus 16 oncoprotein E7 retards mitotic progression by blocking Mps1-MAP4 signaling cascade [J]. *Oncogene*, 2019, 38(31): 5959-5970.
- [39] Maniotis A J, Chen C S, Ingber D E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure [J]. *PNAS*, 1997, 94(3): 849-854.
- [40] Fois G, Weimer M, Busch T, *et al.* Effects of keratin phosphorylation on the mechanical properties of keratin filaments in living cells [J]. *FASEB J*, 2013, 27(4): 1322-1329.
- [41] Sawant M S, Leube R E. Consequences of keratin phosphorylation for cytoskeletal organization and epithelial functions [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2017, 330: 171-225.
- [42] Lee E J, Park M K, Kim H J, *et al.* 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces keratin 8 phosphorylation and reorganization via expression of transglutaminase-2 [J]. *Biomol Ther*, 2014, 22(2): 122-128.
- [43] Park M K, Lee H J, Shin J, *et al.* Novel participation of transglutaminase-2 through c-Jun N-terminal kinase activation in sphingosylphosphorylcholine-induced keratin reorganization of PANC-1 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1811(12): 1021-1029.
- [44] Chen X, Zhou X, Mao T C, *et al.* Effect of microtubule-associated protein-4 on epidermal cell migration under different oxygen concentrations [J]. *J Dermatol*, 2016, 43(6): 674-681.