

# 有丝分裂激酶 Aurora B 对染色体形态变化的影响

王蕾, 宋春林, 张雨晴, 张刚

(青岛大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 山东 青岛 266071)

**[摘要]** 目的 探究有丝分裂激酶 Aurora B 对 HeLa 细胞染色体形态变化影响及其可能的作用机制。方法 在 HeLa 细胞中加入二甲基乙酰胺(DMA), 观察染色体形态的变化; 将 HeLa 细胞分为 A、B 组, 分别加入 DMSO 和 Aurora B 激酶抑制剂处理, 应用 Western blot 检测两组组蛋白 H3 S10 的磷酸化水平, 利用免疫荧光技术、活细胞成像和细胞染色体分离实验检测两组细胞的染色体形态变化; 在 B 组细胞处理的基础上加入磷酸酶抑制剂处理(C 组), 利用免疫荧光技术检测磷酸酶对染色体形态变化的影响; 使用小干扰 RNA(siRNA) 筛选 Aurora B 激酶的底物蛋白。结果 A 组和 B 组细胞中组蛋白 H3 S10 磷酸化水平比较差异有显著性( $t=23.58, P<0.05$ )。B 组加入 Aurora B 激酶抑制剂处理 30、60、90 min 时染色体聚集细胞数量较 A 组显著增多, 差异具有统计学意义( $F=379.28\sim738.73, P<0.05$ ), 抑制 Aurora B 激酶能够促进染色体的聚集。A 组、B 组、C 组染色体聚集的细胞数量差异有显著性( $F=969.20, P<0.05$ ), 其中 C 组明显低于 B 组( $t=22.41, P<0.05$ )。siRNA 筛选结果显示, 染色体上可能存在多种 Aurora B 激酶的底物蛋白影响染色体的形态变化。结论 有丝分裂激酶 Aurora B 通过磷酸化多种底物蛋白使染色体处于分散状态, 而磷酸酶则发挥去磷酸化作用促进染色体的聚集, 两者协同调控有丝分裂染色体的形态变化。

**[关键词]** 极光激酶 B; 有丝分裂; 染色体**[中图分类号]** R345.57 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2023)01-0016-05**doi:** 10.11712/jms.2096-5532.2023.59.010**[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]****[网络出版]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//37.1517.R.20230220.1440.005.html>; 2023-02-21 14:23:42

**EFFECT OF MITOTIC KINASE AURORA B ON MORPHOLOGICAL CHANGES OF CHROMOSOMES** WANG Lei, SONG Chunlin, ZHANG Yuqing, ZHANG Gang (Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the effect of mitotic kinase Aurora B on chromosome morphological changes in HeLa cells and its possible mechanism. **Methods** Dimethylacetamide was added to HeLa cells to observe chromosomal morphological changes. HeLa cells were divided into groups A and B and were treated with DMSO and Aurora B inhibitor, respectively. Western blot was used to measure the phosphorylation level of histone H3 S10, and immunofluorescence assay, live cell imaging, and cell chromosome segregation experiment were used to observe chromosome morphological changes. The cells treated with phosphatase inhibitor in addition to the treatment in group B were set up as group C, and immunofluorescence assay was used to observe the effect of phosphatase on chromosome morphological changes. Small interfering RNA (siRNA) was used to screen out the substrate proteins of Aurora B. **Results** There was a significant difference in the phosphorylation level of histone H3 S10 between groups A and B ( $t=23.58, P<0.05$ ). Compared with group A, group B had a significant increase in the number of chromosome aggregation cells at 30, 60, and 90 minutes of Aurora B inhibitor treatment ( $F=379.28\sim738.73, P<0.05$ ), indicating that inhibition of Aurora B promoted chromosome aggregation. There was a significant difference in the number of chromosome aggregation cells between groups A, B, and C ( $F=969.20, P<0.05$ ), and group C had a significantly lower number than group B ( $t=22.41, P<0.05$ ). The results of siRNA screening showed that there might be multiple Aurora B substrate proteins on chromosomes that influenced chromosome morphological changes. **Conclusion** The mitotic kinase Aurora B makes the chromosomes in a dispersed state by phosphorylating multiple substrate proteins, while phosphatase exerts a dephosphorylation effect to promote the aggregation of chromosomes, thereby regulating the morphological changes of mitotic chromosomes in a synergistic way.

**[KEY WORDS]** Aurora kinase B; mitosis; chromosomes

染色体的准确分离能够确保遗传物质平均分配

到两个子细胞中<sup>[1]</sup>。人源 Aurora B 基因定位于染色体 17 号染色体短臂 13 区<sup>[2]</sup>, 其表达产物参与染色体乘客复合体(CPC)的形成和染色体的调控<sup>[3]</sup>。Aurora B 激酶能够对染色体上多种蛋白质进行磷酸化<sup>[4-5]</sup>并发生自磷酸化<sup>[6]</sup>, 而 PP2A-B56 和 PP1 等

**[收稿日期]** 2022-03-28; **[修订日期]** 2022-07-02**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(31970666)**[第一作者]** 王蕾(1995-), 女, 硕士研究生。**[通信作者]** 张刚(1978-), 男, 博士, 教授, 硕士生导师。E-mail: zhanggang\_sma@qdu.edu.cn。

蛋白磷酸酶可以通过对 Aurora B 激酶底物去磷酸化调控有丝分裂的正常进行<sup>[7-9]</sup>。Hesperadin 是一种 Aurora B 激酶抑制剂,可抑制其底物组蛋白 H3 S10 发生磷酸化<sup>[10]</sup>,而冈田软海绵酸(OA)能够抑制磷酸酶活性。最近的研究表明,染色体表面的多种蛋白质被有丝分裂激酶磷酸化从而影响染色体的形态变化<sup>[11]</sup>。本实验通过免疫荧光技术、活细胞成像等多种实验技术,探究 Aurora B 激酶对有丝分裂染色体形态变化的影响及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

HeLa 细胞购自中国科学院上海生物研究所细胞资源中心。持续表达 H2B-CFP 的 HeLa 细胞系由课题组建立。DMEM 培养液、L-15 培养液(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 HyClone 公司),Thymidine(美国 Sigma 公司),Hesperadin、DMA、OA(美国 Selleck 公司),鼠抗人 Tubulin 单克隆抗体、兔抗人 H3 S10 多克隆抗体(英国 Abcam 公司),鼠抗人 Cyclin B1 单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司),鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(美国 Proteintech 公司),DAPI、荧光二抗 Alexa Fluro Dyes 488(美国 Thermo 公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 将 HeLa 细胞置于添加体积分数 0.10 胎牛血清和 10 g/L 青链霉素溶液的 DMEM 培养液中,在 37 °C、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。

**1.2.2 Western blot 检测组蛋白 H3 S10 的磷酸化水平** 取对数生长期的 HeLa 细胞,以每孔约  $5 \times 10^5$  个细胞的密度铺在 6 孔板中,同时加入 40  $\mu$ L 浓度为 0.6 g/L 的 Thymidine 进行细胞同步化处理。18 h 后将 Thymidine 用 PBS 洗掉,加入 1  $\mu$ L 浓度为 1  $\mu$ g/L 的 DMA 完全培养液过夜。将细胞分为 A、B 组,分别加入 2  $\mu$ L 的二甲基亚砜(DMSO)和 Hesperadin(浓度 50  $\mu$ g/L)处理 1 h,收集细胞并用 RIPA 裂解液提取两组细胞总蛋白。应用 BCA 试剂盒检测蛋白质浓度,加入 10 $\times$ 蛋白上样缓冲液 100 °C 加热 10 min 使蛋白变性。配制 SDS-PAGE 凝胶进行电泳、转膜,加入 50 g/L 的脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 Cyclin B1(1 : 200)、H3 S10(1 : 1 000)和 GAPDH(1 : 1 000)4 °C 摇床孵育过夜。然后使用 TBST 洗膜 3 次,加入相应种属二抗(1 :

5 000)室温孵育 1 h,重复上述洗膜步骤 3 次;配制 ECL 化学发光液显影,检测两组细胞 Aurora B 激酶底物 H3 S10 的磷酸化水平。以 GAPDH 条带结果为内参照,使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以 H3 S10 灰度值/GAPDH 灰度值计算两组细胞 H3 S10 蛋白相对表达量。实验重复 3 次,结果取均值。

**1.2.3 免疫荧光实验检测染色体的形态变化** 6 孔板中每孔分别放入 1 个爬片,按照 1.2.2 的方法处理和分组,每组设 3 个孔。分别在药物处理 30、60、90 min 时弃掉培养液,PBS 洗 2 次。每孔分别加入 2 mL 的 40 g/L 多聚甲醛,室温固定细胞 20 min。使用体积分数 0.005 Triton X-100/PBS 给细胞膜打孔 10 min,以 PBST 洗涤细胞 2 次,每次 5 min。用镊子将爬片取出放到湿盒中,加入体积分数 0.03 BSA/PBST 室温封闭 1 h。吸掉封闭液,在爬片上滴加一抗 Tubulin(1 : 400),室温孵育 3 h 或者 4 °C 过夜。将爬片置于 PBST 中洗 3 次,每次 5 min。使用 DAPI(1 : 1 000)和荧光二抗 Alexa Fluro Dyes 488(1 : 1 000)室温染色 1 h,重复上述洗片步骤。待爬片干燥后,滴加 5  $\mu$ L 封片剂封片。使用徕卡 Thunder 高分辨率显微成像系统观察图像,计数两组细胞中染色体环状结构的细胞数量。

**1.2.4 高分辨率活细胞成像实验观察染色体动态变化** 将稳定表达 H2B-CFP 的 HeLa 细胞系细胞接种在 6 孔板并进行同步化处理,24 h 后消化细胞并按照 7 : 1 的比例铺在含有新鲜培养液的活细胞培养皿中,12 h 后加入 DMA 处理 12 h。检测前将两组细胞培养液换为分别添加 DMSO 或 Hesperadin 的 L-15 培养液,将加入药物前记为“0”时刻。使用 40 倍物镜连续采集图像 30 min,间隔 5 min 记录一次 CFP 信号,分析并提取所需要的静态图像。

**1.2.5 细胞染色体分离实验检测细胞染色体聚集** 将两组细胞培养液中分别加入 DMSO 或者 Hesperadin 处理 1 h,将收集的有丝分裂细胞用 PBS 洗 1 遍并进行细胞计数。将细胞稀释到 10<sup>9</sup>/L,加入低渗缓冲液 37 °C 处理 10 min。在涂片机中放入载玻片和 200  $\mu$ L 细胞悬液,1 300 r/min 离心 10 min。滴加 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 15 min,随后加入体积分数 0.005 Triton X-100/PBS 细胞打孔 5 min。DAPI 染色,显微成像系统中使用 100 倍物镜拍摄图片,观察抑制 Aurora B 激酶对染色体形态的影响。

**1.2.6 免疫荧光实验检测蛋白磷酸酶对染色体形态**

变化的影响 将同步化处理后的 HeLa 细胞分为 A 组、B 组以及 C 组并加入 DMA 过夜处理。A 组和 B 组细胞按 1.2.2 方法进行处理,C 组细胞同时加入 Hesperadin 和 OA,90 min 后固定细胞进行免疫荧光染色,观察抑制磷酸酶对染色体聚集细胞的影响。

**1.2.7 siRNA 筛选 Aurora B 激酶的底物蛋白** 根据相关研究结果选择 30 个 Aurora B 激酶可能的相互作用蛋白<sup>[10]</sup>(大部分已被证明与染色体相关),由上海吉玛基因公司合成针对不同蛋白的 siRNA oligo。在 HeLa 细胞中分别转染 Luciferase 和不同的 siRNA,加入 Hesperadin 处理 1 h,固定细胞并使用 DAPI 和 Tubulin 抗体染色,荧光显微镜下计数染色体环状结构细胞数量。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 22.0、Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组数据比较采用 *t* 检验;多组数据比较采用析因设计方差分析及单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

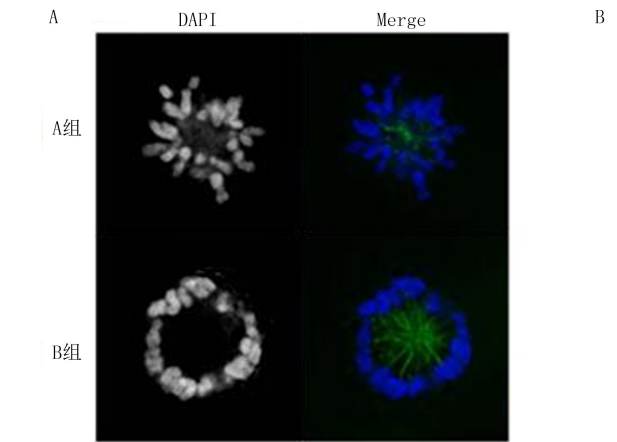
2 结 果

2.1 抑制 Aurora B 激酶活性对组蛋白 H3 S10 磷酸化水平影响

Western blot 检测显示,A 组、B 组 H3 S10 蛋白磷酸化水平分别为  $1.14 \pm 0.06$ 、 $0.22 \pm 0.04$ ,两组比较差异有显著性( $t = 23.58, P < 0.05$ )。见图 1。

2.2 抑制 Aurora B 激酶对细胞有丝分裂染色体形态的影响

2.2.1 两组染色体聚集细胞数量比较 免疫荧光



A:两组细胞染色体的静态图片。DAPI 染色呈蓝色,Tubulin 染色呈绿色,100 倍。B:两组细胞不同时间染色体环状结构细胞数量比较。与 A 组相比,\*  $P < 0.05$ 。

染色显示,A 组细胞染色体排列分散,在未分离的中心体周围呈玫瑰花环状圆形结构;B 组有丝分裂细胞染色体聚集,堆叠在一起形成特异性环状结构(图 2A)。析因设计方差分析显示,时间、组别及二者交互作用对染色体聚集细胞数量影响差异均有统计学意义( $F_{\text{组别}} = 1\ 657.56, F_{\text{时间}} = 17.48, F_{\text{时间} \times \text{组别}} = 14.94, P < 0.05$ )。单独效应结果显示,A 组不同时间点染色体聚集细胞数量差异无统计学意义( $F = 0.053, P > 0.05$ ),B 组不同时间点染色体聚集细胞数量差异有统计学意义( $F = 32.36, P < 0.05$ )。与 A 组相比,B 组在 30、60 和 90 min 时染色体聚集细胞数量显著增多,差异有统计学意义( $F = 379.28 \sim 738.73, P < 0.05$ )。组内比较结果显示,B 组在 60、90 min 染色体聚集细胞数量较 30 min 明显增多( $P < 0.05$ )(图 2B)。

**2.2.2 两组细胞染色体动态变化比较** A 组细胞有丝分裂过程中染色体排列分散,围绕中心体呈玫瑰花环状圆形结构;B 组细胞加入 Hesperadin 后,染色体逐渐聚集,呈特异性环状结构(图 3)。

**2.2.3 两组细胞染色体分离情况比较** 荧光显微镜下观察显示,A 组细胞整体与放大图片染色体排列较为分散;B 组细胞染色体整体较为聚集,局部放

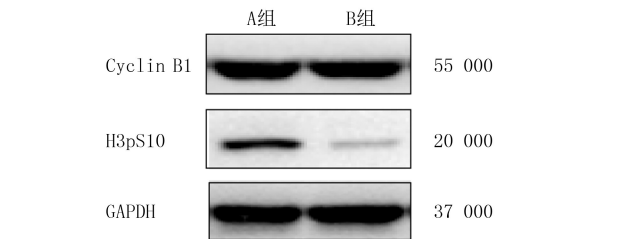


图 1 Western blot 方法检测两组 H3 S10 的磷酸化水平

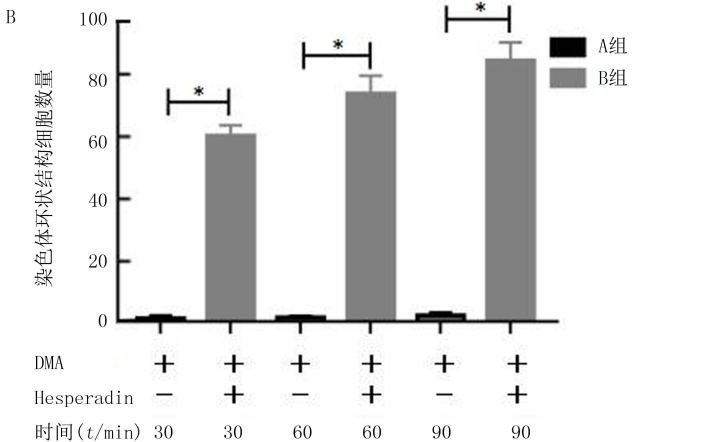


图 2 免疫荧光实验检测两组细胞染色体形态变化

大观察发现,染色体之间出现黏连现象(图 4)。

2.3 抑制蛋白磷酸酶对染色体聚集的影响

免疫荧光检测显示,A 组、B 组和 C 组染色体聚集细胞数量分别为(1.33±0.57)、(82.67±2.52)、(32.00±3.00)个,各组间比较差异有显著性( $n=100$ , $F=969.2$ , $P<0.05$ )。两两比较显示,C 组染色体聚集的细胞数量明显低于 B 组( $P<0.05$ ),高于 A 组( $P<0.05$ ),说明抑制 Aurora B 激酶会导致

磷酸酶发挥去磷酸化作用,促进染色体的聚集。

2.4 Aurora B 激酶底物蛋白筛选

免疫荧光结果显示,MCM7 组与 Luciferase 组染色体聚集细胞数量分别为  $77.33 \pm 1.20$ 、 $16.33 \pm 0.88$ ,两组比较差异有显著统计学意义( $t=40.92$ , $P<0.05$ ),表明 MCM7 蛋白被 RNA 干扰后,抑制 Aurora B 激酶导致染色体聚集细胞数量明显减少(图 5)。

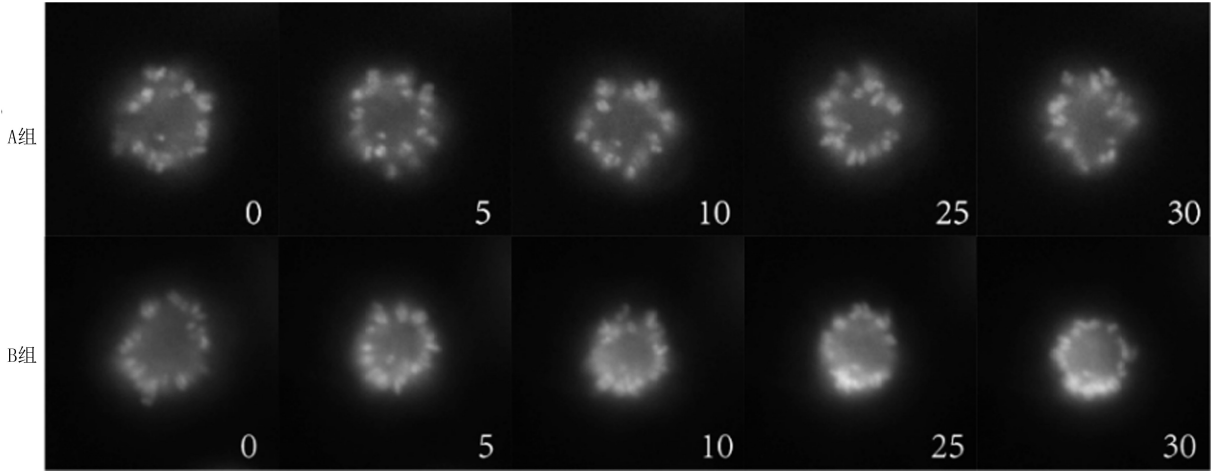
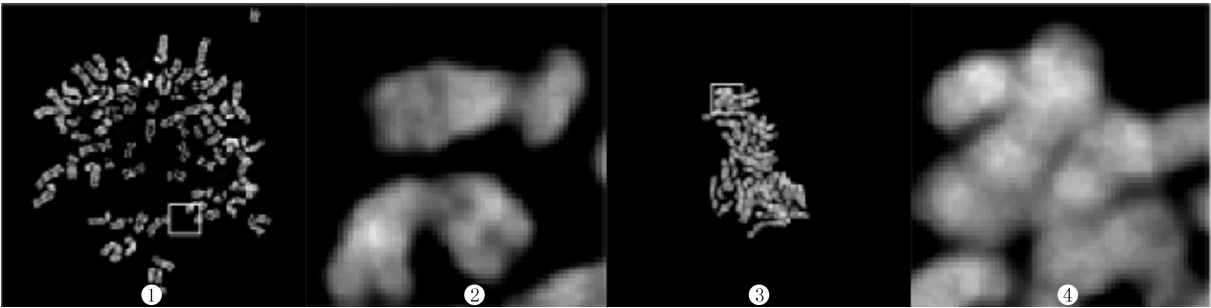


图 3 活细胞成像实验观察两组细胞染色体动态变化



①、②为 A 组,③、④为 B 组,①、③放大 100 倍,②、④放大 200 倍。  
图 4 两组细胞染色体分离观察

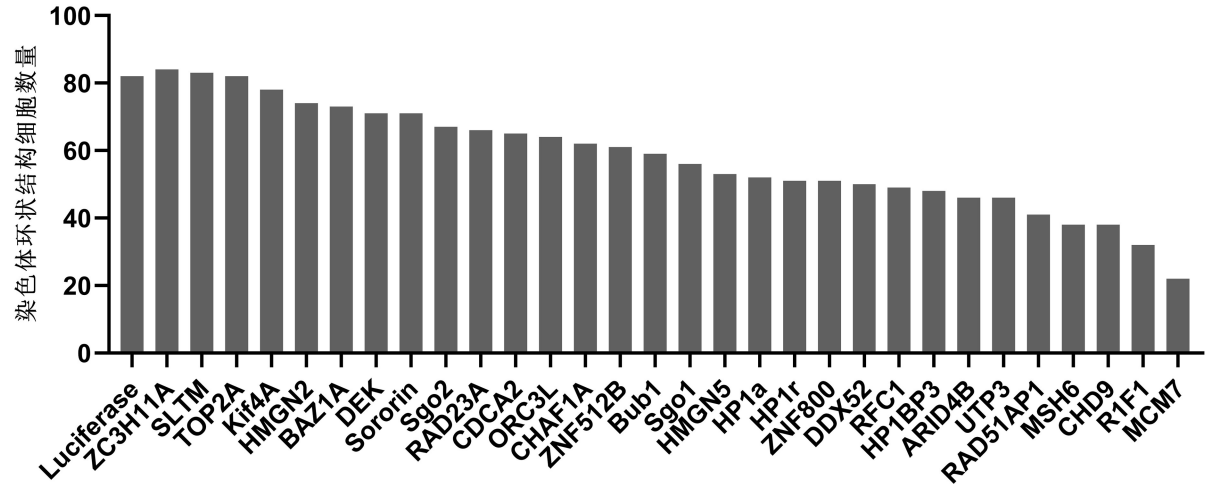


图 5 siRNA 筛选 Aurora B 激酶影响染色体形态变化的底物蛋白

### 3 讨 论

细胞有丝分裂的正常进行是保证染色体准确分离的前提<sup>[12]</sup>。一系列的丝氨酸/苏氨酸激酶在有丝分裂过程中发挥重要作用,其异常表达可能会导致乳腺癌以及其他癌症的发生和发展<sup>[13-14]</sup>。近年来的研究表明,Aurora B 激酶过度表达与肿瘤的发生发展有关,并被认为是一种潜在的生物标志物<sup>[15]</sup>。由于 Aurora B 激酶调控有丝分裂的分子机制目前尚不完全清楚,因此,探讨 Aurora B 激酶影响染色体分离的分子机制对于肿瘤的诊断、靶向治疗具有重要意义。

本研究首次探究了 Aurora B 激酶对有丝分裂染色体形态变化的影响。Western blot 实验结果显示,在细胞有丝分裂期,抑制 Aurora B 激酶活性可引起组蛋白 H3 S10 磷酸化水平降低;免疫荧光实验和活细胞成像以及染色体分离实验结果表明,抑制 Aurora B 激酶能够促进染色体的聚集。为进一步探究 Aurora B 激酶调控染色体形态变化的分子机制,本研究在抑制 Aurora B 激酶的基础上同时加入磷酸酶抑制剂观察染色体形态变化,结果显示抑制 Aurora B 激酶会导致磷酸酶发挥去磷酸化作用,促进染色体的聚集;进一步通过 siRNA 筛选发现,染色体上可能存在 MCM7 等多种 Aurora B 激酶的底物蛋白影响染色体的形态变化。

综上所述,有丝分裂激酶 Aurora B 与蛋白磷酸酶协同调控有丝分裂染色体的形态变化。本课题下一步将通过免疫共沉淀等多种实验方法,鉴定本文筛选出的蛋白是否为有丝分裂激酶 Aurora B 的底物,并进一步探究其作用位点和具体的分子机制,以了解染色体发生形态变化的生理意义,为肿瘤的临床诊断和靶点治疗提供理论基础。

### 【参考文献】

- [1] KITAGAWA M, LEE S H. The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2015,3:14.
- [2] KOMAKI S, TAKEUCHI H, HAMAMURA Y, et al. Functional analysis of the plant chromosomal passenger complex [J]. *Plant Physiology*, 2020,183(4):1586-1599.
- [3] SALIMIAN K J, BALLISTER E R, SMOAK E M, et al. Feedback control in sensing chromosome biorientation by the Aurora B kinase[J]. *Current Biology: CB*, 2011,21(13):1158-1165.
- [4] SHIMADA M, GOSHIMA T, MATSUO H, et al. Essential role of autoactivation circuitry on aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis[J]. *Nature Communications*, 2016,7:12059.
- [5] MANZIONE M G, ROMBOUTS J, STEKLOV M, et al. Co-regulation of the antagonistic RepoMan: Aurora-B pair in proliferating cells[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2020,31(6):419-438.
- [6] YASUI Y, URANO T, KAWAJIRI A, et al. Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004,279(13):12997-13003.
- [7] LIU D, VLEUGEL M, BACKER C B, et al. Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2010,188(6):809-820.
- [8] NASA I, RUSIN S F, KETTENBACH A N, et al. Aurora B opposes PP1 function in mitosis by phosphorylating the conserved PP1-binding RVxF motif in PP1 regulatory proteins[J]. *Science Signaling*, 2018,11(530): eaai8669.
- [9] HAUF S, COLE R W, LATERRA S, et al. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003,161(2):281-294.
- [10] HENGVELD R C, HERTZ N T, VROMANS M J, et al. Development of a chemical genetic approach for human aurora B kinase identifies novel substrates of the chromosomal passenger complex[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2012,11(5):47-59.
- [11] GARTNER M, SUNDER-PLOSSMANN N, SEILER J, et al. Development and biological evaluation of potent and specific inhibitors of mitotic Kinesin Eg5 [J]. *ChemBioChem: a European Journal of Chemical Biology*, 2005,6(7):1173-1177.
- [12] SHAKEEL I, BASHEER N, HASAN G M, et al. Polo-like Kinase 1 as an emerging drug target: structure, function and therapeutic implications[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2021,29(2):168-184.
- [13] HONMA K, NAKANISHI R, NAKANOKO T, et al. Contribution of Aurora-A and -B expression to DNA aneuploidy in gastric cancers[J]. *Surgery Today*, 2014,44(3):454-461.
- [14] WU X, LIU J M, SONG H H, et al. Aurora-B knockdown inhibits osteosarcoma metastasis by inducing autophagy via the mTOR/ULK1 pathway[J]. *Cancer Cell International*, 2020,20(1):575.
- [15] GALETTA D, CORTES-DERICKS L. Promising therapy in lung cancer: spotlight on aurora kinases[J]. *Cancers*, 2020,12(11):E3371.

(本文编辑 黄建乡)