

## 6- 溴异香兰素 BVAN08 诱发肝癌细胞 HepG2 纺锤体损伤和有丝分裂灾难死亡

张博 王林 王豫 徐勤枝 张士猛 周平坤\*

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 放射毒理与放射肿瘤学研究室, 北京 100850)

**摘要** 研究香兰素衍生物中的 6- 溴异香兰素(BVAN08)对细胞纺锤体结构的影响及诱发灾难死亡的相关机制, 为开发该化合物为新的抗癌药物提供理论依据。通过光学显微镜观察 BVAN08 作用后细胞形态学变化, 流式细胞术检测细胞周期, 纺锤体功能检测点实验和原位免疫荧光杂交实验分析细胞有丝分裂进程和纺锤体结构, Western 印记检测 BVAN08 作用后相关蛋白质的变化。结果表明 20 ~ 60  $\mu\text{mol/L}$  BVAN08 作用后, HepG2 细胞变圆不再贴壁生长、随后脱落死亡, 具有浓度依赖性量效关系; 明显诱导细胞  $G_2/M$  期阻滞、导致细胞有丝分裂指数升高, 并出现大量的非二倍体和多倍体细胞; 破坏细胞纺锤体的结构, 多中心体细胞显著增加; 该化合物促使细胞周期转录调节因子 FoxM1 及其下游靶分子细胞周期蛋白 B1 和 Cdk1 的降解、阻止有丝分裂过程而导致有丝分裂灾难死亡。研究揭示 BVAN08 通过破坏纺锤体结构、诱发 M 期阻滞, 导致细胞有丝分裂灾难死亡, FoxM1 失活可能参与其作用机制。

**关键词** 有丝分裂灾难; 纺锤体结构; FoxM1; 周期阻滞

恶性肿瘤是危害人类健康的重大疾病, 寻找有效的预防和治疗性药物是肿瘤防治中所面临的主要任务。目前化疗仍是肿瘤治疗的主要手段, 但癌细胞对化疗药物的抗性是临床上肿瘤治疗失败的重要原因之一。化疗药物是通过不同机制诱发癌细胞死亡, 如损伤 DNA 分子、抑制 DNA 合成、破坏细胞纺锤体结构、阻断细胞增殖信号通路等, 过去研究最多的细胞死亡途径是细胞凋亡和坏死。近年来通过更为精细的细胞形态学和生物化学等技术手段, 揭示了细胞死亡的一些新的现象, 其中就包括细胞有丝分裂灾难死亡(mitotic catastrophe)<sup>[1]</sup>, 为研发新的抗肿瘤药物、特别是对现有化疗药物产生抗性的肿瘤治疗药物提供了新的思路。6- 溴异香兰素(BVAN08)是我们实验室从一系列香兰素衍生物中筛选出来的抗癌细胞增殖的新化合物<sup>[2]</sup>, 前期研究显示该化合物既能诱发细胞 DNA 双链和单链损伤, 又能抑制 DNA 修复蛋白 DNA-PKcs 的表达, 进而下调 Akt 的磷酸化及相应的信号途径, 并诱发细胞  $G_2/M$  期阻滞, 但细胞凋亡发生率又有很大的差异表明存在其他形式的细胞死亡, 包括细胞自吞噬死亡<sup>[3]</sup>, 但是否与 M 期灾难死亡相关尚不清楚。本研究主要探讨 BVAN08 对肝癌细胞纺锤体结构的影响及诱发相关的细胞有丝分裂灾难死亡, 为该化合物的开发和临床应用提供进

一步的实验和理论依据, 同时也以此探讨细胞有丝分裂灾难死亡的一些现象特征和机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞培养

正常人肝细胞 LO2 和肝癌细胞 HepG2 在 10% 胎牛血清的 DMEM(Gibco 公司)中、5% 二氧化碳培养箱、饱和湿度和 37 °C 恒温培养。

#### 1.2 试剂和材料

$\alpha$  微管蛋白抗体购自北京中杉公司(鼠抗人, ZM0438),  $\beta$ - 肌动蛋白抗体购自 Santa Cruz 公司(sc1616), FoxM1 抗体购自 Abcam 公司(ab14758), 细胞周期蛋白 B1 抗体购自 NeoMarkers (MS868), Cdk1 抗体购自 NeoMarkers (MS110), 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗购自北京中杉公司(ZB2305), 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗购自北京中杉公司(ZB2301), FITC 荧光标记山羊抗小鼠二抗购自北京中杉公司(ZF0312)。6- 溴异香兰素(6- 溴 -5- 羟基 -4-

收稿日期: 2008-04-10 接收日期: 2008-06-11

国家自然科学基金(No.30772592)和国家重点基础研究发展规划(973 计划)(No.2007CB914603)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 010-66931217, Fax: 01068183899, E-mail: zhoupk@nic.bmi.ac.cn

甲氧基苯甲醛, BVAN08, bromovanin)由本所药物化学研究室王林博士研究员合成, 纯度大于98%。

### 1.3 培养细胞形态学观察

HepG2 细胞培养至对数生长期加入不同浓度 BVAN08 (0、20、40 和 60  $\mu\text{mol/L}$ )作用 24 h 后普通光学显微镜观察并拍照。

### 1.4 流式细胞术检测细胞周期

取对数生长期的 HepG2 细胞不同浓度 BVAN08 (0、20、30、40 和 60  $\mu\text{mol/L}$ )作用 24 h 和 48 h 后收取细胞, 70% 乙醇  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  固定 24 h, 4 000 g 离心 4 min, PBS 重悬浮加入 RNA 酶 A 后  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  作用 20 min, 加入 PI 染色 20 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

### 1.5 纺锤体检测点分析

细胞生长到约 60% 的接触密度时加入 BVAN08 至 40  $\mu\text{mol/L}$  的终浓度, 继续培养 4~24 h 后收集细胞。细胞经 0.075  $\mu\text{mol/L}$  KCl  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  低渗处理后用甲醇: 冰醋酸溶液(3:1)固定。离心收集细胞后, 加入 0.5 ml 固定液分散细胞, 将细胞悬液滴在冰水浸泡的载玻片上, 自然干燥。用 1% 吉姆萨溶液染色, 显微镜下观察 1 000 个细胞, 识别并计数有丝分裂相细胞。

### 1.6 免疫荧光观察细胞纺锤体结构

HepG2 细胞接种到 35 mm 平皿, 使细胞以均匀的贴壁在平皿中的玻片上, 待细胞长至对数生长期后加 BVAN08, 使其终浓度为 40  $\mu\text{mol/L}$ ; 4~24 h 后收集细胞, 然后依次用  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  预冷的甲醇固定、0.1% Triton-X 100 室温孵育、1% BSA(用 PBS 配置)封闭。加入  $\alpha$  微管蛋白一抗(PBS 以 1:100 稀释)过夜; 漂洗后加入 FITC 标记的荧光二抗(PBS 以 1:200 稀释)温育 1 h; 漂洗后用 5  $\mu\text{g/ml}$  的 Hoechst33258 染液(以 PBS 稀释)染核; 漂洗 3 次将玻片倒放在载玻片的树脂滴上封片。TCS SP2 激光共聚焦扫描显微镜(德国 Leica)及时观察并拍照。

### 1.7 Western 印迹检测 FoxM1 及细胞周期蛋白 B1、Cdk1 的表达变化

HepG2 细胞接种在培养面积 75  $\text{cm}^2$  培养瓶中, 在对数生长期时加入 BVAN08, 使其终浓度为 40

$\mu\text{mol/L}$  培养 12~48 h 后, 分别收集各组细胞, 提取细胞总蛋白, 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质浓度。取 100  $\mu\text{g}$  总蛋白上样, 经 SDS-PAGE 后将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 与鼠抗人 FoxM1 抗体(1:1 000)作用 1 h, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温作用 1 h 后显影。取对数生长期的 HepG2 细胞不同浓度 BVAN08 (0、20、30、40 和 60  $\mu\text{mol/L}$ )作用 24 h 后检测细胞周期蛋白 B1 与 Cdk1 表达同上。 $\beta$ - 肌动蛋白作为蛋白质上样量的标定。

## 2 结果

### 2.1 光学显微镜下观察 BVAN08 作用细胞的形态学变化

将 HepG2 细胞接种于 60 mm 平皿, 当细胞长至对数生长期时加入不同浓度 BVAN08 (0、20、40 和 60  $\mu\text{mol/L}$ )作用 24 h, 直接在倒置光学显微镜下观察细胞形态学上的变化并拍照。结果表明不同药物浓度作用 24 h 后, 部分细胞开始变圆, 细胞透亮, 细胞不再贴壁生长(图 1), 且药物浓度越高变圆的细胞越多, 并逐渐脱落。当药物浓度达到 60  $\mu\text{mol/L}$  时, 90% 以上的细胞在 48 h 内脱落并且死亡。

### 2.2 BVAN08 对 HepG2 细胞周期的影响

流式细胞术检测 BVAN08 不同浓度(0、20、30、40、60  $\mu\text{mol/L}$ )作用 24 h 对 HepG2 细胞周期的影响规律。结果表明 BVAN08 诱发 HepG2 细胞  $G_2/M$  期阻滞, 且表现出明显的剂量依赖性(图 2), 其中 60  $\mu\text{mol/L}$  作用 24 h 后  $G_2/M$  期阻滞率达 80% 以上(图 2A 和图 2B)。药物作用 48 h 后, 随着剂量的增加, 非二倍体细胞比例显著增多, 并且在 60  $\mu\text{mol/L}$  的相对高浓度作用下, 产生大量的亚二倍体细胞和多倍体细胞(图 2A)。

### 2.3 BVAN08 诱发细胞 M 期阻滞

40  $\mu\text{mol/L}$  BVAN08 分别作用 LO2 细胞和 HepG2 细胞 4、8、12、24 h 后, 经吉姆萨溶液染色, 普通光学显微镜观察有丝分裂相细胞, 可见 HepG2 细胞处于有丝分裂相比比例显著增高, 表明细胞启动纺锤体损伤反应机制, 暂时停止细胞姐妹染色体的分离和细

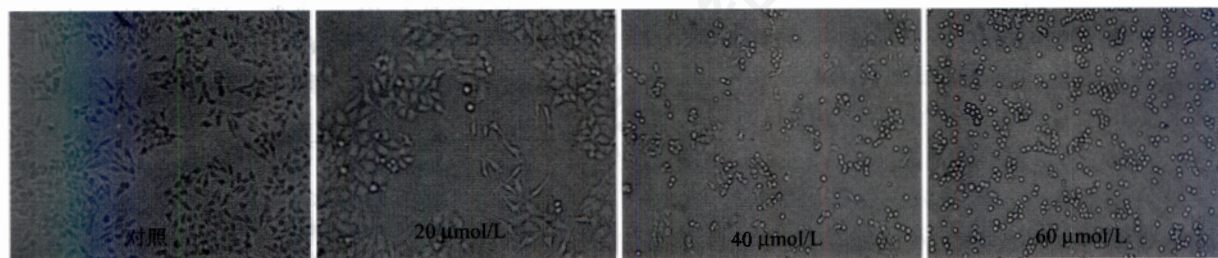


图 1 光学显微镜下观察 BVAN08 作用后细胞的形态学变化

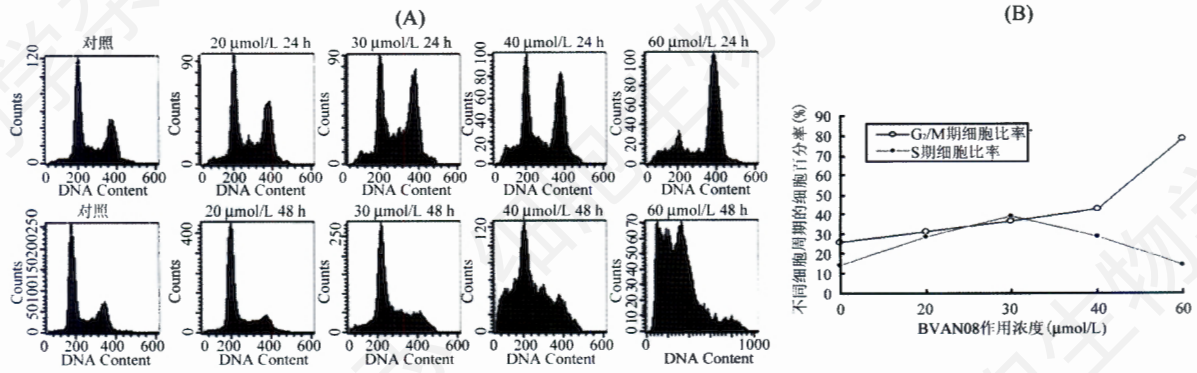


图2 BVAN08作用 HepG2 细胞的 G<sub>2</sub>/M 阻滞

A: BVAN08 分别作用 24 h 和 48 h 后细胞周期的变化; B: BVAN08 分别作用 24 h 后 G<sub>2</sub>/M 期细胞比率和 S 期细胞比率变化的剂量效应关系。

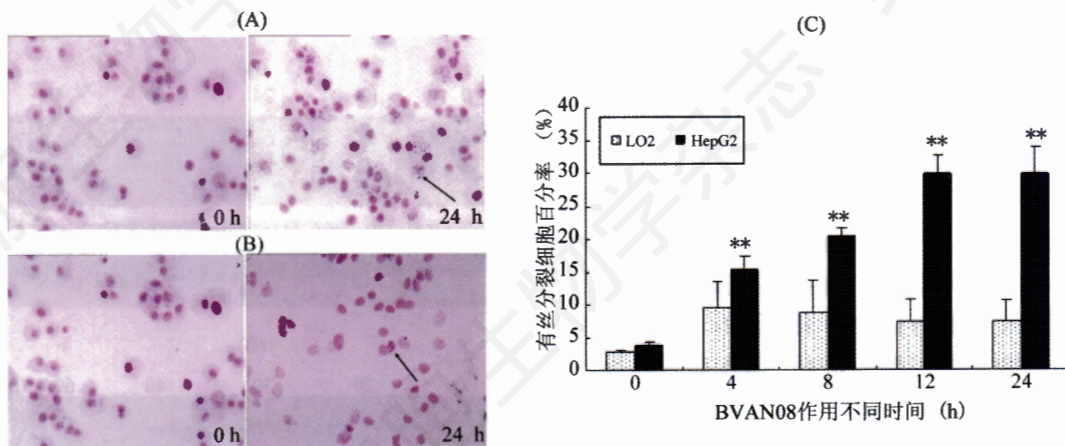


图3 BVAN08 诱发细胞有丝分裂阻滞分析

A: 40 μmol/L 作用 HepG2 细胞的有丝分裂相观察; B: 40 μmol/L 作用 LO2 细胞的有丝分裂相观察; C: 40 μmol/L 作用不同时间细胞的有丝分裂指数 (MI, %), 与 0 h 时间点的 HepG2 细胞相比, \*\* $P < 0.01$ 。

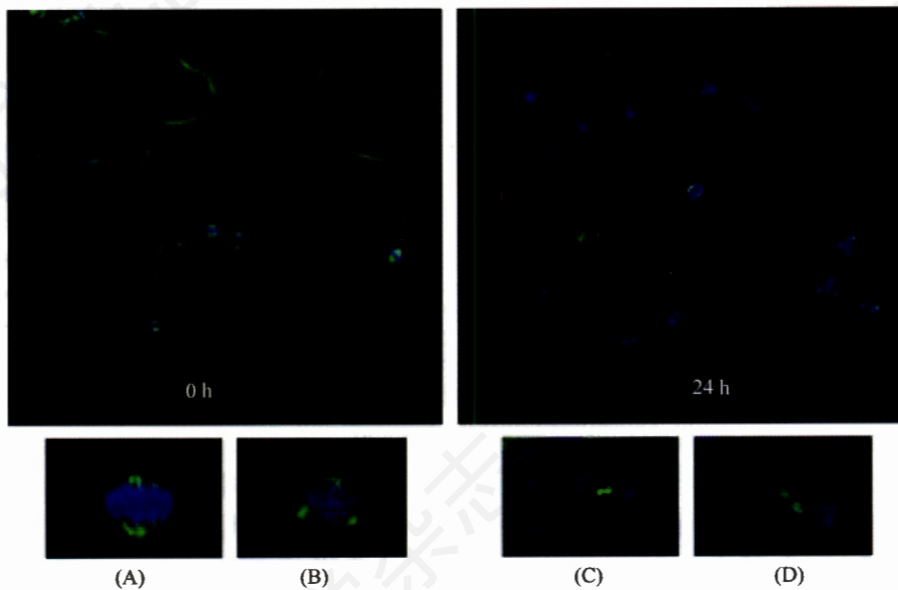


图4 BVAN08 破坏 HepG2 细胞的纺锤体结构

A: 正常有丝分裂前期细胞; B: 药物处理后的异常有丝分裂前期细胞; C: 正常有丝分裂末期细胞; D: 药物处理后的异常有丝分裂末期。

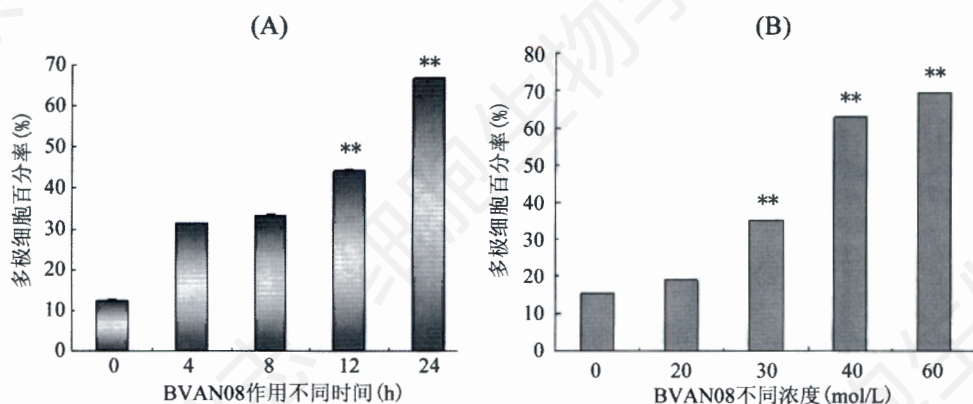


图5 BVAN08作用HepG2细胞的多极体发生率

A: BVAN08作用不同时间后多极细胞比率的剂量效应关系。与0 h对照相比, \*\* $P < 0.01$ 。B: BVAN08不同浓度作用24 h后多极细胞比率的剂量效应关系。与0 h对照相比, \*\* $P < 0.01$ 。

胞分裂, 细胞阻滞在有丝分裂期(图3A和图3C)。而药物对LO2细胞无显著影响, 有丝分裂相细胞增加不明显(图3B)。普通光学显微镜观察有丝分裂相细胞, 计数1 000个细胞中有丝分裂相细胞数, 对有丝分裂指数(MI)统计如图3C。可以看出癌细胞HepG2细胞与未加药HepG2细胞相比有丝分裂指数显著增高( $P < 0.01$ ), 而正常肝细胞LO2与未加药的对照LO2细胞相比有丝分裂指数也略有增高, 但无显著差异。

#### 2.4 免疫荧光观察BVAN08作用细胞的纺锤体结构变化

用FITC荧光标记二抗进行 $\alpha$ 微管蛋白的免疫荧光原位杂交检测, 观察细胞纺锤体结构。结果表明, 相对正常培养的对照细胞, 40  $\mu\text{mol/L}$  BVAN08作用HepG2细胞24 h后, 处于有丝分裂相的细胞比例明显升高(图4), 由此进一步表明细胞是阻滞在有丝分裂期。更重要的是经药物处理后, 大量细胞出现多中心体, 并且部分细胞中心体模糊, 细胞形态改变。图中我们可以看到细胞有丝分裂异常, 出现多核细胞和核区碎裂现象, 表明BVAN08破坏细胞纺锤体结构, 并将细胞阻滞在有丝分裂中期, 而长时间的阻滞导致细胞发生有丝分裂期特有的灾难死亡(图4D)。

通过在荧光显微镜下观察1 000个细胞并计数多极体细胞, 并对多极体细胞进行统计分析, 计数多极体分裂的细胞数, 可以看出随着药物作用时间延长可以诱导更多的细胞产生多中心体, 双核或多核的细胞数增多, 而形成的双核甚至多核细胞由于被阻滞在有丝分裂期, 最终会发生有丝分裂过程特有的灾难死亡(图5A)。40  $\mu\text{mol/L}$  BVAN08作用12 h后有丝分裂相细胞数与未加药细胞相比显著增加( $P < 0.01$ ), 并且30  $\mu\text{mol/L}$  BVAN08作用24 h后有丝分裂相细胞数与未加药细胞相比也显著增加( $P < 0.01$ )。不同浓度(0、

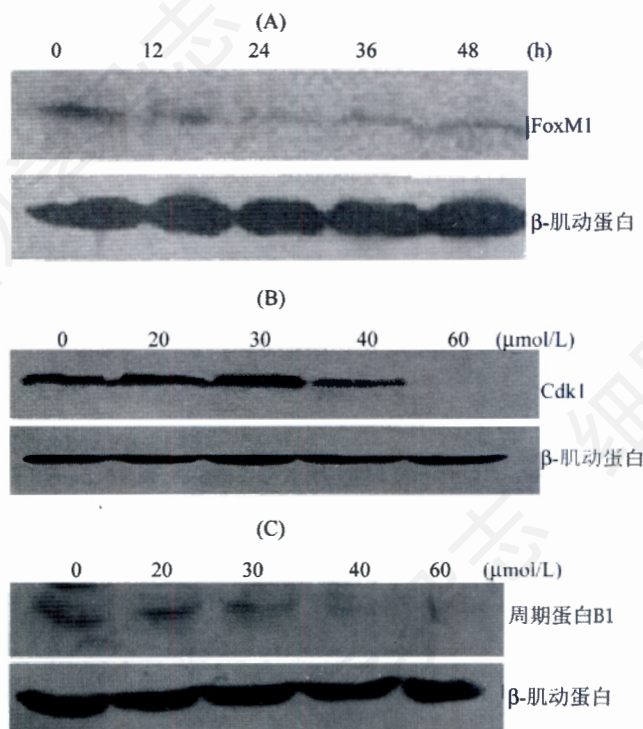


图6 Western印迹检测BVAN08作用HepG2细胞中有关蛋白质的表达变化

A: Western印迹检测BVAN08作用HepG2细胞中FoxM1表达变化; B: Western印迹检测BVAN08作用HepG2细胞中Cdk1表达变化; C: Western印迹检测BVAN08作用HepG2细胞中细胞周期蛋白B1表达变化。

20、30、40、60  $\mu\text{mol/L}$ ) BVAN08作用24 h后的多极体细胞百分率与浓度成正剂量依赖关系(图5B)。

#### 2.5 Western印迹分析检测细胞周期相关蛋白的表达变化

我们用Western印迹来检测HepG2细胞中FoxM1的表达, 结果显示40  $\mu\text{mol/L}$  BVAN08作用HepG2细胞24 h后, 细胞中FoxM1的表达水平降低(图6A)。

而不同浓度 BVAN08 作用 HepG2 细胞 24 h 后, 可以看出随着药物浓度增加, 细胞中 Cdk1 蛋白的表达也明显降低(图 6B), 并且作用 HepG2 细胞 24 h 后细胞周期蛋白 B1 表达水平也明显降低(图 6C)。

### 3 讨论

DNA 是生命活动中最重要的遗传物质, 保持其分子结构的完整性对于细胞至关重要。DNA 损伤直接影响复制、转录和蛋白质合成, 进而影响细胞遗传、发育、生长和代谢等生命活动。在细胞周期的各阶段, 细胞分别进行着 DNA 复制、蛋白质合成及细胞分裂等重要的生理活动。细胞周期是一个复杂而又精细调节的过程, 在此过程中  $G_1/S$ 、 $G_2/M$  和纺锤体等检测点机制监控着细胞周期有序进行, 它们在维持细胞染色体数目和基因组结构稳定性中发挥着重要的作用, 同时也与细胞死亡机制有密切联系<sup>[4,5]</sup>。细胞只有完成前一阶段的生理活动后, 才能通过细胞周期检测点进入下一周期。一些突发事件如 DNA 损伤引发的细胞反应能影响驱动细胞周期前进的因子, 从而使细胞周期停滞在检测点, 造成细胞周期阻滞。而  $G_2/M$  期检测点在肿瘤细胞耐药中发挥着重要作用, 原发性耐药的肿瘤细胞本身就具有阻滞在  $G_2/M$  期的能力<sup>[6]</sup>。因此, 人们试图开发出能通过凋亡途径以外的死亡方式诱导癌细胞死亡的药物, 以克服单一死亡机制带来的肿瘤耐药性问题。有丝分裂灾难死亡是最近几年来才被认识的一种死亡方式, 成为抗癌新药研发的新思路和热点。

有丝分裂灾难死亡, 是指细胞在有丝分裂过程中死亡的现象, 是一种发生在细胞有丝分裂期, 由于异常的细胞分裂而导致细胞的死亡, 它常常伴随着细胞周期检测点的异常和基因组或纺锤体结构的损伤而发生<sup>[1,7-9]</sup>。有丝分裂灾难死亡的典型特征是: 有丝分裂异常, 细胞体积变大; 中心体异常复制, 出现多中心体; 出现多核细胞或核割裂现象; DNA 出现多倍化; 琼脂糖电泳时 DNA 弥散分布等<sup>[8]</sup>。从一系列有丝分裂灾难死亡的特征来看有丝分裂灾难死亡可能在细胞分裂的不同时期发生, 长时间的中期阻滞能引起有丝分裂灾难, 如果纺锤体监测点发生异常, 出现损伤的遗传物质异常分配形成多核后, 也能启动有丝分裂灾难死亡通路<sup>[8,9]</sup>。

BVAN08 的前期研究结果显示该化合物既能诱发细胞 DNA 双链和单链损伤, 又能抑制 DNA 修复蛋白 DNA-PKcs 的表达, 进而下调 Akt 的磷酸化及相应的信号途径, 但细胞凋亡发生率又有很大差异表明

存在其他形式的细胞死亡, 如细胞有丝分裂灾难和细胞自吞噬死亡。通过光学显微镜我们观察到 BVAN08 作用后使细胞变圆, 而且不再贴壁生长、随后脱落死亡。并且通过流式细胞术我们观察到 BVAN08 作用 HepG2 细胞可以明显的诱导细胞  $G_2/M$  期阻滞, 24 h 后阻滞率达 80% 以上, 作用 48 h 后出现大量的非二倍体和多倍体细胞。实验中我们还观察到 40  $\mu\text{mol/L}$  BVAN08 浓度可以导致 HepG2 细胞有丝分裂指数升高, 表明细胞可能启动细胞周期检测点机制, 将细胞阻滞在有丝分裂期, 而 LO2 细胞有丝分裂指数也略有增高, 但没有明显作用, 可能是由于正常的细胞存在完善的修复与检测点机制, 暂时阻止细胞周期进程会被很快修复。通过免疫荧光原位杂交检测细胞纺锤体结构结合细胞核荧光染色, 发现 40  $\mu\text{mol/L}$  BVAN08 作用后, 细胞形态改变, 核区碎裂, 出现多核细胞, 并且细胞纺锤体结构破坏。细胞会启动某种尚不清楚的机制阻止细胞质分离, 并导致有丝分裂灾难死亡。当药物达到 60  $\mu\text{mol/L}$  以上的高浓度时, 细胞可能会同时以凋亡的方式死亡(流式细胞术检测到亚二倍体细胞,  $< 2n$ )。

FoxM1 作为转录调节因子对于  $G_1/S$ 、 $G_2/M$  的转换十分重要, 调节纺锤体的装配并且保证染色体数目的稳定性和有丝分裂期姐妹染色体的正确分离<sup>[10]</sup>。FoxM1 缺失的胚胎成纤维细胞, 通过 RNAi 抑制 FoxM1 表达的骨肉瘤 U2O2 细胞都表现出 DNA 断裂增加<sup>[11]</sup>、 $G_2/M$  期转换受阻, 如染色体错误排列、胞质分裂异常产生多倍体和亚倍体细胞<sup>[12]</sup>, 类似于我们所观察到的结果。有文献报道 FoxM1 在肝癌细胞和基底细胞癌中高表达, 而 FoxM1 缺失则导致有丝分裂纺锤体缺陷, 细胞有丝分裂延迟, 发生有丝分裂灾难死亡, 因此, FoxM1 也为肿瘤治疗提供了靶点<sup>[13,14]</sup>。我们的研究发现 BVAN08 可以抑制肝癌细胞 FoxM1 的表达, 可能与细胞阻滞在有丝分裂期、启动有丝分裂灾难死亡机制相关。细胞在  $G_2-M$  期转换时需要细胞周期蛋白 B1/Cdk1 复合物的激活, 在细胞核内有丝分裂的早期和中期, 它们将持续激活, 细胞进入后期需要细胞周期蛋白 B1/Cdk1 复合物活力突然降低<sup>[15]</sup>, 而且在某些状态下, 细胞周期蛋白 B1 是 FoxM1 直接调节的靶分子。因此我们又检测了细胞周期蛋白 B1 和 Cdk1 的表达, 发现细胞周期蛋白 B1 和 Cdk1 蛋白的表达均下降, 而细胞退出有丝分裂也须要抑制或降解细胞周期蛋白 B1/Cdk1, 但是流式细胞术结果显示 24 h 仍有很高的  $G_2/M$  期阻滞, 表明细胞有可能发生灾难死亡而不是进入下一个细胞周期。而有些

研究表明,细胞周期蛋白B1/Cdk1复合物的活化是一个复杂的调节过程,Chk1可以负调控细胞周期蛋白B1的活性,同时Chk1活性又受到BRCA1的调节;而Cdk1的活性主要受Wee1、Myt1、Cdc25的调节<sup>[16]</sup>。细胞周期调控是既复杂又精细的过程,BVAN08作用后是否存在其他因素导致细胞发生灾变死亡?我们推测细胞可能通过影响修复蛋白DNA-PKcs以及下游靶分子影响细胞周期,也可能通过DNA损伤信号通路如ATM及其下游chk2等影响细胞周期,但具体机制还需进一步研究。

我们的研究表明BVAN08能破坏肝癌细胞纺锤体结构、诱发细胞G<sub>2</sub>/M期阻滞,并且抑制肝癌细胞中FoxM1的表达,诱发癌细胞有丝分裂灾变死亡,为该化合物或同类衍生物的开发和临床应用提供实验基础和理论依据。

## 参考文献(References)

- [1] 张博等。细胞生物学杂志, 2007, 29: 849
- [2] Yan YQ *et al.* *Int J Oncol*, 2006, 29: 1167
- [3] Yan YQ *et al.* *Cancer Lett*, 2007, 252: 280
- [4] Tsai YS *et al.* *IUBMB Life*, 2005, 57: 583
- [5] Stark GR *et al.* *Methods Mol Biol*, 2004, 280: 51
- [6] Goldwasser F *et al.* *Cancer Res*, 1996, 56: 4430
- [7] Castedo M *et al.* *Oncogene*, 2004, 23: 2825
- [8] Eom Y W *et al.* *Oncogene*, 2005, 24: 4765
- [9] Huang X *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 1065
- [10] Costa RH. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 108
- [11] Tan Y *et al.* *Mol and Cell Biol*, 2007, 27: 1007
- [12] Laoukili J *et al.* *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 126
- [13] Wonsey DR *et al.* *Cancer Res*, 2005, 65: 5181
- [14] Adami GR *et al.* *Future Oncol*, 2007, 3: 1
- [15] Smits VA *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1519: 1
- [16] Niida H *et al.* *J Biol Chem*, 2005, 280: 39246

## The Spindle Damage and Mitotic Catastrophe in Hepato-carcinoma HepG2 Cells Induced by Bromovanin BVAN08

Bo Zhang, Lin Wang, Yu Wang, Qin-Zhi Xu, Shi-Meng Zhang, Ping-Kun Zhou \*

(Department of Radiation Toxicology and Oncology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

**Abstract** To investigate the induction of bromovanin (6-bromine-5-hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde, BVAN08) on the spindle damage and mitotic catastrophe of cancer cells and its related mechanism, and to provide more solid evidence and experimental data for exploring bromovanin as anticancer new drug. Cellular morphology changes after bromovanin treatment were observed by light microscope, flow cytometry was used to detect cell cycle, spindle checkpoint analysis and immunostaining experiment were performed to investigate the effect of bromovanin on process of mitotic division and spindle structure. Western blot analysis was used to determine protein expression changes. The results demonstrated that HepG2 cells were become rounding and detached quickly after treated with 20–60 μmol/L of bromovanin, and at last dead in a dose-dependent manner. Bromovanin treatment resulted in a G<sub>2</sub>/M arrest, increased mitotic index and considerable ratio of non-diploid or polyploidy cells. Our result also demonstrated the destruction of spindle structure as expressed by multiple centrosome. FoxM1, a cell cycle control associated transcription regulation factor and its downstream target molecules cyclinB1 and Cdk1 were down-regulated, and accompanying with the mitotic catastrophe. This study demonstrated that bromovanin destroyed spindle structure, induced mitotic arrest and catastrophe. Inactivation of FoxM1 protein could involve in the effective mechanism of bromovanin.

**Key words** mitotic catastrophe; spindle structure; cell cycle checkpoint; FoxM1

Received: April 10, 2008 Accepted: June 11, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30772592) and National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2007CB914603)

\*Corresponding author. Tel: 86-10-66931217, Fax: 86-1068183899, E-mail: zhoupk@nic.bmi.ac.cn