蚌埠医学院学报
Journal of Bengbu Medical College

叶酸缺乏对L02细胞增殖、凋亡及纺锤体组装检查点相关蛋白表达的影响

任欢欢， 杨瑜， 徐洪宝， 王忠迈， 程宗， 梁猛， 王春景， 廖亚平

引用本文:
任欢欢, 杨瑜, 徐洪宝, 等. 叶酸缺乏对L02细胞增殖、凋亡及纺锤体组装检查点相关蛋白表达的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2021, 46(5): 561-565.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.05.001

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

淫羊藿通过miR-19a-3p对高糖高脂诱导的胰岛β细胞损伤的影响及机制研究

Effects of Epimedium herb through miR-19a-3p on islet β cells damage induced by high glucose and lipid and its mechanism

蚌埠医学院学报. 2020, 45(6): 725-730 https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.06.007

萝卜硫素调控TGF-β1/Smad信号通路抑制结肠癌HT-29细胞增殖的机制研究

Sulforaphane inhibits proliferation of colon cancer HT-29 cells via regulating TGF β1/Smad signaling pathway

蚌埠医学院学报. 2020, 45(3): 311-314 https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.03.007

全反式维A酸对肺腺癌H1299细胞放射敏感性研究

Effect of all-trans retinoic acid on radiosensitivity of lung adenocarcinoma H1299 cells

蚌埠医学院学报. 2021, 46(3): 281-285 https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.03.001

奥沙利铂通过p53信号通路抑制肝癌细胞增殖的机制研究

The mechanism of oxaliplatin inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cell through p53 signaling pathway

蚌埠医学院学报. 2018, 43(8): 984-988 https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.08.002

LncRNA PCBP1-AS1对口腔鳞癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

Effect of LncRNA PCBP1-AS1 on the proliferation, invasion and apoptosis of oral squamous carcinoma cells

蚌埠医学院学报. 2021, 46(2): 154-158 https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.02.004

[文章编号] 1000-2200(2021)05-0561-05 ·基础医学·

叶酸缺乏对 L02 细胞增殖、凋亡及纺锤体组装检查点相关蛋白表达的影响

任欢欢[1,2],杨 瑜[1],徐洪宝[1],王忠迈[1],程 宗[1],梁 猛[1],王春景[1],廖亚平[1]

[摘要] **目的**:探讨叶酸缺乏对 L02 细胞增殖、凋亡以及纺锤体组装检查点相关蛋白基因表达的影响及其机制。**方法**:用不同浓度的叶酸(200 nmol/L、20 nmol/L、0 nmol/L)培养 L02 细胞 2 周后,用倒置显微镜观察 L02 细胞形态;流式细胞术检测细胞周期与凋亡;CCK8 测定细胞增殖情况;qRT-PCR 检测 Mad2、Bub1、BubR1 mRNA 的表达;Western blotting 检测相关蛋白 Mad2、Bub1、BubR1 的表达。**结果**:与正常对照组相比,叶酸缺乏使 L02 细胞出现细胞体积变大、形态不规则现象;叶酸缺乏可降低 L02 细胞活性($P<0.01$),诱导细胞发生 S 期阻滞($P<0.05$),促进细胞凋亡($P<0.05$),上调 Mad2、Bub1、BubR1 mRNA 及蛋白水平($P<0.01$)。**结论**:在 L02 细胞培养中,叶酸浓度为 200 nmol/L 时导致叶酸缺乏,SAC 功能受损,细胞增殖异常,严重缺乏时导致细胞发生凋亡。

[关键词] 叶酸;细胞周期;纺锤体组装检查点;非整倍体

[中图法分类号] R 329.28 [文献标志码] A **DOI**:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.05.001

Effects of folate deficiency on proliferation, apoptosis and expression of spindle assembly checkpoint-related proteins in L02 cells

REN Huan-huan[1,2], YANG Yu[1], XU Hong-bao[1], WANG Zhong-mai[1], CHENG Zong[1], LIANG Meng[1], WANG Chun-jing[1], LIAO Ya-ping[1]

(*1. School of Life Sciences, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;*

2. Department of Clinical Laboratory, Fuyang Fifth People's Hospital, Fuyang Anhui 236015, China)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effect of folate deficiency on the proliferation, apoptosis, expression of spindle assembly checkpoint-related proteins, and its mechanism in L02 cells. **Methods**: L02 cells were cultured with different concentrations of folate (2 000, 200, 20, 0 nmol/L) for 2 weeks. Then the morphology of L02 cells was observed by inverted microscope, the cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry, cell proliferation was measured by CCK8, the expressions of Mad2, Bub1, BubR1 mRNA were detected by fluorescence quantitative PCR, and the expressions of Mad2, Bub1, BubR1 protein were analyzed by Western blotting. **Results**: Compared with the normal control group, folate deficiency made L02 cells to become larger and irregular in shape, reduced the cell viability ($P<0.01$), induced S-phase block ($P<0.05$), promoted apoptosis ($P<0.05$), and upregulated the mRNA and protein expressions of Mad2, Bub1, BubR1 in L02 cells ($P<0.01$). **Conclusions**: In the culture L02 cells, it induces folate deficiency at 200 nmol/L folate, which causes impaired spindle assembly checkpoint function, abnormal cell proliferation, and even apoptosis in severe deficiency.

[**Key words**] cell cycle; folate; spindle assembly checkpoint; aneuploidy

纺锤体组装检查点(spindle assembly checkpoint, SAC)是细胞周期调控中的众多检查点之一,有助于维持细胞有丝分裂期间基因组稳定性,SAC 结构功能异常是导致染色体不稳定性与非整倍体的重要原因之一,Mad2、Bub1、BubR1 是 SAC 中的关键组分。

叶酸是一碳代谢循环中重要的甲基供体,在 DNA 合成、稳定性及修复中起关键作用。其缺乏会导致 DNA 损伤、染色体和基因组不稳定等。叶酸缺乏会对损坏 SAC 网络,从而致使细胞发生有丝分裂异常与非整倍性[1],但是非整倍体发生的机制尚不明确且叶酸缺乏对 SAC 影响的报道较少。本研究通过探索不同浓度叶酸对 L02 细胞增殖、凋亡及 Mad2、Bub1、BubR1 mRNA 及蛋白水平的影响,并讨论可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂 L02 细胞(武汉普诺赛细胞库);

[收稿日期] 2019-10-30 [修回日期] 2020-09-01

[基金项目] 国家级大学生创新训练项目(201910367047);安徽省大学生创新训练项目(201810367033);蚌埠医学院研究生创新项目(Byycxz1802)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 生命科学学院,安徽 蚌埠 233030;2. 安徽省阜阳市第五人民医院 检验科,236015

[作者简介] 任欢欢(1994-),女,硕士研究生,检验技师.

[通信作者] 廖亚平,硕士研究生导师,教授. E-mail: liaoyaping2003@sina.com

无叶酸 RPMI-1640 培养基、胎牛血清(Gibco 公司);叶酸粉末(Sigma 公司);Annexin V-FITC/PI 试剂盒、细胞周期试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、PMSF(江苏碧云天生物有限公司);Mad2、Bub1、BubR1 抗体(美国 Bethyl 公司);β-actin 抗体(Cell Signaling Technology 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(武汉博士德生物工程有限公司);荧光定量 PCR 试剂盒(Takara 公司);Mad2、Bub1、BubR1 引物(上海生工生物有限公司)。

1.2 *方法*

1.2.1 细胞分组及处理 将 L02 细胞培养于含 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中。将细胞分为正常对照组和不同浓度叶酸组(分别给予 200 nmol/L、20 nmol/L 和 0 nmol/L 叶酸处理 2 周)。

1.2.2 倒置显微镜下观察细胞形态 倒置显微镜下观察不同浓度叶酸培养 2 周后的 L02 细胞形态。

1.2.3 CCK8 法检测细胞活性 将培养第 12 天的 L02 细胞按 3.0×10^3 个/孔接种于 96 孔板,各组 3 孔,过夜贴壁后,每孔加入 10 μL CCK8 试剂后置于培养箱中培养 2 h,并于 450 mm 处检测吸光度(OD)值。

1.2.4 细胞周期试剂盒检测细胞周期 将培养 2 周的 L02 细胞以 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,收集细胞;按照说明书进行 PI 染色,流式细胞仪上机检测。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 试剂盒检测细胞凋亡 将培养 2 周的 L02 细胞以 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,收集细胞;按照说明书进行 Annexin V-FITC/PI 进行染色,流式细胞仪上机检测。

1.2.6 qRT-PCR 检测 Mad2、Bub1、BubR1 mRNA 的表达量 收集各组细胞,TRIzol 法提取细胞总 RNA,按照 Takara 的反转录试剂盒合成 cDNA,PCR 扩增 Mad2、Bub1、BubR1。根据 GenBank 上公布的人类 Mad2、Bub1、BubR1 序列,应用 Primer Primer5 软件设计引物,由上海生工生物工程公司合成(见表 1)。同一标本 β-actin 作为内参照,采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法进行相对定量分析。qRT-PCR 的反应条件:95 ℃ 15 s,60 ℃ 34 s,72 ℃ 30 s,40 个循环。

1.2.7 Western blotting 检测 Mad2、Bub1、BubR1 的蛋白表达水平 收集各组细胞,用 RIPA 裂解液进行裂解,BCA 蛋白定量后调整蛋白浓度,取适量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。电转到 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶封闭室温封闭 2 h。室温孵育一抗 Mad2、Bub1 和 BubR1(1∶1 000 稀释)1 h,洗膜 3 次,室温孵育相应二抗 1 h,细洗膜 3 次。ECL 显色后置于凝胶成像仪中曝光,Image J 进行灰度值分析。

表 1 引物序列

名称	引物序列
β-actin	Forward:AAT CTG GCA CCA CAC CT TCT A
	Reverse:ATA GCA CAG CCT GGA TAG CAA
Mad2	Forward:CGT GCT GCG TCG TTA CTT TT
	Reverse:GCC GAA TGA GAA GAA CTC GG
Bub1	Forward:TGT CCT TCA ATA CAT ACA GTG GGT
	Reverse:AGG TCA CTG TTG TAC TCA GCA A
BubR1	Forward:TCA GCG GCT TTC GGA CTG
	Reverse:ACA ATT CAC CAT CTT TTA GCT CAG

1.3 *统计学方法* 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

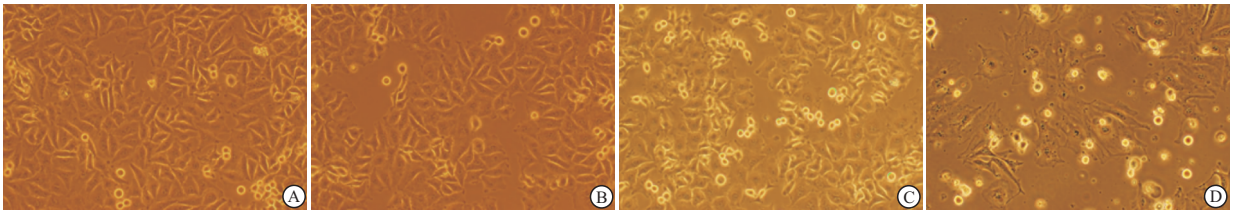
2.1 *叶酸对 L02 细胞形态学的影响* 与正常对照组相比,20 nmol/L 与 0 nmol/L 叶酸培养 2 周后,细胞体积增大、形态不规则,0 nmol/L 叶酸组现象更加显著(见图 1)。

2.2 *叶酸对 L02 细胞增殖活性的影响* 与正常对照组相比,200 nmol/L、20 nmol/L 组与 0 nmol/L 细胞活性明显降低($P<0.01$);与 200 nmol/L 相比,20 nmol/L 与 0 nmol/L 组细胞活性明显降低($P<0.01$)(见表 2)。

2.3 *叶酸对 L02 细胞周期的影响* 与正常对照组相比,200 nmol/L 组细胞 G1/G0 期、S 期均值差异无统计学意义($P>0.05$);20 nmol/L 组和 0 nmol/L 组细胞 G1/G0 期明显降低($P<0.01$)、S 期明显升高($P<0.01$)。与 200 nmol/L 相比,20 nmol/L 组和 0 nmol/L组细胞 G1/G0 期明显降低($P<0.01$)、S 期明显升高($P<0.01$)。与 20 nmol/L 组相比,0 nmol/L 组 S 期明显增加、G1/G0 期明显减少($P<0.01$)(见表 3)。

2.4 *叶酸对 L02 细胞凋亡的影响* 与正常对照组相比,200 nmol/L 组细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$);20 nmol/L 组细胞发生凋亡($P<0.05$),0 nmol/L组细胞明显发生凋亡($P<0.01$)。与 200 nmol/L 相比,20 nmol/L 组细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$),0 nmol/L 组凋亡率明显增加($P<0.01$)。与 20 nmol/L 组相比,0 nmol/L 组

凋亡率明显增加($P<0.01$)(见图 2、表 4)。



A：对照组；B:200 nmol/L组；C：20 nmol/L组；D：0 nmol/L组

图1 倒置显微镜下各组细胞形态

表 2 不同浓度叶酸培养 2 周后对细胞增殖能力(OD450 值)的影响($\bar{x}\pm s$)

分组	n	第 13 天 OD 值	第 14 天 OD 值	第 15 天 OD 值	F	P	$MS_{组内}$
对照组	3	0.26 ±0.01	0.42 ±0.04	1.22 ±0.06	449.439	<0.01	0.000
200 nmol/L 组	3	0.23 ±0.01 *	0.40 ±0.04	0.85 ±0.04 * *	272.126	<0.01	0.000
20 nmol/L 组	3	0.21 ±0.01 * *##	0.36 ±0.01 *	0.68 ±0.07 * *##	96.650	<0.01	0.002
0 nmol/L 组	3	0.19 ±0.01 * *##△	0.28 ±0.01 * *##△	0.50 ±0.03 * *##△△	242.502	<0.01	0.000
F	—	31.77	11.96	104.21	—	—	—
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—
$MS_{组内}$	—	0.000	0.001	0.003	—	—	—

q 检验：与对照组比较 * $P<0.05$，* * $P<0.01$；与 200 nmol/L 组比较##$P<0.01$；与 20 nmol/L 组比较△$P<0.05$，△△$P<0.01$

表 3 不同浓度叶酸培养 2 周后对细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$;%)

分组	n	G0/G1 期	S 期
对照组	3	65.13 ±2.25	31.39 ±0.84
200 nmol/L 组	3	63.23 ±2.56	34.29 ±2.50
20 nmol/L 组	3	57.50 ±0.79 * *##	39.01 ±0.16 * *##
0 nmol/L 组	3	50.03 ±1.39 * *##△△	48.52 ±1.70 * *##△△
F	—	39.07	68.55
P	—	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	—	3.539	2.464

q 检验：与对照组比较 * * $P<0.01$；与 200 nmol/L 组比较##$P<0.01$；与 20 nmol/L 组比较△△$P<0.01$

表 4 不同浓度叶酸培养 2 周后对细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$;%)

分组	n	细胞凋亡率
对照组	3	6.34 ±0.72
200 nmol/L 组	3	7.78 ±1.39
20 nmol/L 组	3	10.25 ±1.44 *
0 nmol/L 组	3	16.16 ±4.13 * *##△△
F	—	23.64
P	—	<0.01
$MS_{组内}$	—	2.382

q 检验：与对照组比较 * $P<0.05$，* * $P<0.01$；与 200 nmol/L 组比较##$P<0.01$；与 20 nmol/L 组比较△△$P<0.01$

2.5 叶酸对 L02 细胞 Mad2、Bub1、BubR1 mRNA 的表达量的影响 与正常对照组相比，叶酸浓度为 200 nmol/L 时，Bub1 mRNA 的表达量增加($P<0.05$)，Mad2 和 BubR1 mRNA 的表达量明显增加($P<0.01$)；叶酸浓度为 20 nmol/L 及 0 nmol/L 时，Mad2、Bub1、BubR1 mRNA 的表达量均明显增加($P<0.01$)(见表 5)。

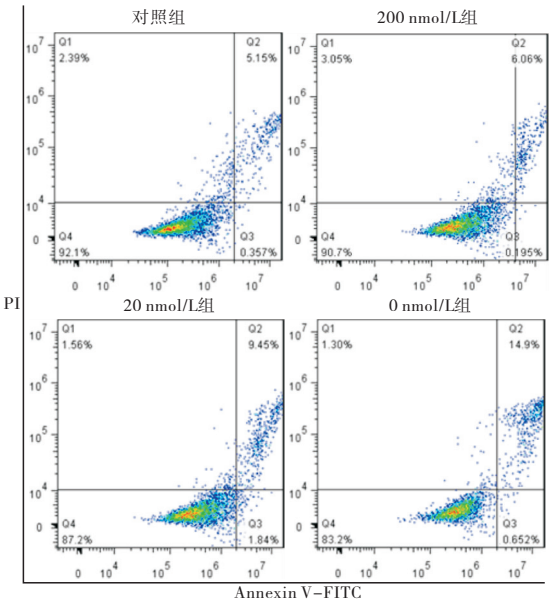


图2 各组细胞凋亡情况

2.6 叶酸对 L02 细胞 Mad2、Bub1、BubR1 蛋白表达的影响 与正常对照组相比，200 nmol/L 组 Bub1 蛋白表达量增加($P<0.05$)，20 nmol/L、0 nmol/L 组 Bub1 蛋白表达量明显增加($P<0.01$)；

200 nmol/L、20 nmol/L 和 0 nmol/L 组 Mad2 和 BubR1 蛋白表达量均明显增加($P<0.01$)(见图 3、表 6)。

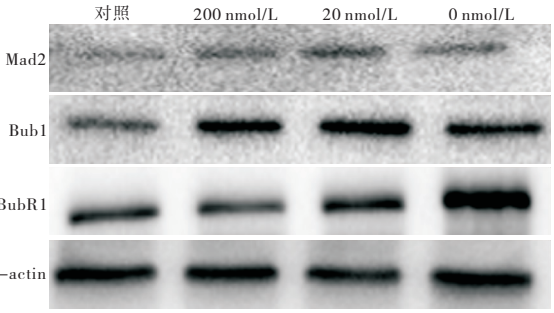


图3 不同浓度叶酸培养2周后对SAC蛋白表达的影响

表 5 不同浓度叶酸培养 2 周后对 SAC 相关基因表达的影响($\bar{x}\pm s$)

分组	n	Mad2	Bub1	BubR1
对照组	3	1.00±0.01	1.00±0.01	1.02±0.03
200 nmol/L 组	3	1.54±0.13**	1.48±0.09*	3.5±0.84**
20 nmol/L 组	3	2.59±0.23**##	2.10±0.42**#	4.02±0.53**
0 nmol/L 组	3	3.28±0.26**##	2.22±0.23**##	4.62±0.41**#
F	—	91.23	16.32	26.01
P	—	<0.01	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	—	0.034	0.059	0.289

q 检验:与对照组比较 *$P<0.05$, **$P<0.01$;与 200 nmol/L 组比较#$P<0.05$, ##$P<0.01$

表 6 不同浓度叶酸培养 2 周后对 SAC 相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

分组	n	Mad2	Bub1	BubR1
对照组	3	0.54±0.03	0.77±0.06	0.54±0.03
200 nmol/L 组	3	0.90±0.07**	1.23±0.09*	1.06±0.07**
20 nmol/L 组	3	1.05±0.06**#	1.37±0.17**	1.13±0.11**
0 nmol/L 组	3	0.97±0.06**	1.38±0.30**	1.35±0.16**#△
F	—	48.80	7.44	31.99
P	—	<0.01	<0.05	<0.01
$MS_{组内}$	—	0.003	0.033	0.011

q 检验:与对照组比较 *$P<0.05$, **$P<0.01$;与 200 nmol/L 组比较#$P<0.05$;与 20 nmol/L组比较△$P<0.05$

3 讨论

相关实验研究显示[2]叶酸浓度为 120 nmol/L 时便可维持人淋巴细胞基因组结构稳定,因此本实验选取略高于基因组稳定的叶酸浓度即 200 nmol/L、20 nmol/L、0 nmol/L 作为实验组。CCK8 结果显示叶酸浓度为 200 nmol/L、20 nmol/L、0 nmol/L 时叶酸增殖受到了明显抑制,细胞周期与凋亡结果显示,叶酸浓度为 200 nmol/L 时,L02 细胞 G1/G0 期、S 期及凋亡率均值与正常对照组差异无统计学意义。叶酸浓度为 20 nmol/L、0 nmol/L 细胞发生 S 期阻滞,凋亡数量增多,且叶酸浓度越低 S 期阻滞越明显、细胞凋亡数量越多。COURTEMANCHE 等[3]的研究显示叶酸缺乏可以降低细胞增殖,诱导凋亡和细胞周期阻滞,本研究与上述研究结果相符合。LIANG 等[4-5]研究表明叶酸缺乏诱导细胞发生 G1/G0 期阻滞,从而导致细胞发生凋亡,在 G1/G0 期阻滞与凋亡之间建立了联系。HUANG 等[6]研究结果显示在叶酸缺乏的培养基中 HepG2 细胞叶酸浓度较低,细胞在 S 期积累随后发生 G2/M 期阻滞,进而诱导细胞发生凋亡。低叶酸缺诱导的 DNA 的损伤程度具有凋亡反应,这是叶酸缺乏引起细胞凋亡的原因之一。本研究中,当叶酸浓度为 20 nmol/L、0 nmol/L 时细胞发生 S 期阻滞,进而诱导细胞发生凋亡。本研究与上述研究结果有所不同,本研究结果显示叶酸缺乏时细胞发生 S 期阻滞,我们认为差生差异的原因可能是由于所用细胞系、培养细胞时间不同造成的。

SAC 作为细胞周期检查点对于维持细胞周期正常进行至关重要,Bub1 参与染色体排列,Mad2 和 BubR1 通过结合底物 CDC20,阻止 CDC20 激活 APC/C 以达到抑制 APC/C 的效果,防止细胞提前进入后期。SAC 作为细胞周期的监控机制,其某些成分的异常表达会使 SAC 功能发生改变,导致染色体不稳定和非整倍体。对果蝇和小鼠的研究均证实了 SAC 在维持染色体稳定方面的重要性[7-11],在 SAC 发生突变的细胞中,有丝分裂错误的发生率很高,导致非整倍体细胞的比例急剧增加[11-12]。在一项宫颈癌研究中[13]发现,下调 Mad2 和 BubR1 可以促进 SiHa 细胞增长,增强细胞侵袭和迁移能力,抑制细胞凋亡,降低药物治疗作用[13]。并且下调 Mad2 可以通过调控磷酸化 survivin 的活化,调控胃癌细胞周期,增加增殖,提高胃癌细胞的耐药性[14]。另一项对乳腺癌研究[15]中,与 KrasG12D 或 Her2 同时在成年小鼠乳腺中过表达有丝分裂检查点蛋白 Mad2,会导致有丝分裂检查点过度激活,过早的 Mad2 表达会导致强烈的有丝分裂停止和细胞死亡增加。用特异性的小干扰 RNA 敲低纺锤体检查点蛋白 BubR1 或 Mad2,可显著减少 6,7-二甲氧基-3-(3-甲氧基苯基)异喹啉-1-胺(CWJ-082)诱导的有丝分裂细胞积累和凋亡[16]。印度的一项药物研究[17]也显示,过表达的 Mad2 通过恢复适当的后期启动和维持更多的细胞存活,部分地挽救了药物的有害

作用。在肝细胞性癌组织和细胞中,miR-490-5p 的过表达或 Bub1 的过表达抑制了肝细胞性癌细胞的增殖、迁移、侵袭,增加了凋亡率[18]。缺少 Bub1 的小鼠胚胎成纤维细胞不能使其染色体对齐或维持 SAC 功能[19]。本研究结果显示,叶酸浓度为 200 nmol/L、20 nmol/L 和 0 nmol/L 时 Mad2、Bub1、BubR1 mRNA 的表达量明显增加,Western blotting 检测也显示在蛋白水平上 Mad2、Bub1、BubR1 表达量明显增加。

结合上述研究和实验结果我们得出这样一个结论:对于 SAC 来说叶酸浓度为 200 nmol/L 已经达到一种缺乏状态,Mad2、Bub1、BubR1 的高表达用于增加 SAC 的活性,可以维持细胞有丝分裂进行,避免细胞发生凋亡。当叶酸极度缺乏时(20 nmol/L 和 0 nmol/L),SAC 功能活性受到了严重损害,Mad2、Bub1、BubR1 的高表达不足以维持其正常活性,有丝分裂出现异常,可能导致非整倍体及染色体不稳定的发生,使得细胞增殖受到抑制,细胞周期发生阻滞,诱导细胞发生凋亡。综上所述,本研究结果显示,对于 L02 细胞来说叶酸浓度为 200 nmol/L 时已经达到一种缺乏状态,叶酸缺乏时 SAC 功能异常,可能是阻碍细胞增殖、诱导凋亡的原因。

[参 考 文 献]

[1] GUO X, NI J, ZHU Y, *et al*. Folate deficiency induces mitotic aberrations and chromosomal instability by compromising the spindle assembly checkpoint in cultured human colon cells[J]. Mutagenesis, 2017, 32(6): 547.

[2] WANG X, FENECH M. A comparison of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate for prevention of DNA damage and cell death in human lymphocytes in vitro[J]. Mutagenesis, 2003, 18(1): 81.

[3] COURTEMANCHE C, HUANG A, ELSON-SCHWAB I, *et al*. Folate deficiency and ionizing radiation cause DNA breaks in primary human lymphocytes: a comparison[J]. FASEB J, 2004, 18(1): 209.

[4] LIANG Y, LI Y, LI Z, *et al*. Mechanism of folate deficiency-induced apoptosis in mouse embryonic stem cells: Cell cycle arrest/apoptosis in G1/G0 mediated by microRNA-302a and tumor suppressor gene Lats2[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(11): 1750.

[5] YANG Y, LI X, SUN Q, *et al*. Folate deprivation induces cell cycle arrest at G0/G1 phase and apoptosis in hippocampal neuron cells through down-regulation of IGF-1 signaling pathway[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 79: 222.

[6] ALARCON-VARGAS D, RONAI Z. P53-Mdm2-the affair that never ends[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(4): 541.

[7] MICHEL L, LIBERAL V, CHATTERJEE A, *et al*. MAD2 haplo insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cell[J]. Nature, 2001, 409(6818): 355.

[8] BABU JR, JEGANATHAN KB, BAKER DJ, *et al*. Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation[J]. J Cell Biol, 2003, 160(3): 341.

[9] BASU J, BOUSBAA H, LOGARINHO E, *et al*. Mutations in the essential spindle checkpoint gene bub1 cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in Drosophlia[J]. Cell Biol, 1999, 146(1): 13.

[10] DOBLES M, LIBERAL V, SCOTT M, *et al*. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein mad2[J]. Cell, 2000, 101(6): 635.

[11] BAKER DJ, JEGANATHAN KB, CAMERON JD, *et al*. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice[J]. Nat Genet, 2004, 36(7): 744.

[12] SCHLIEKELMAN M, COWLEY DO, O'QUINN R, *et al*. Impaired Bub1 function in vivo compromises tension-dependent checkpoint function leading to aneuploidy and tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2009, 69(1): 45.

[13] WANG L, WANG J, JIN Y, *et al*. Downregulation of Mad2 and BubR1 increase the malignant potential and nocodazole resistance by compromising spindle assembly checkpoint signaling pathway in cervical carcinogenesis[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2019, 45(12): 2407.

[14] WANG L, YIN F, DU Y, *et al*. Depression of MAD2 inhibits apoptosis and increases proliferation and multidrug resistance in gastric cancer cells by regulating the activation of phosphorylated survivin[J]. Tumour Biol, 2010, 31(3): 225.

[15] ROWALD K, MANTOVAN M, PASSOS J, *et al*. Negative selection and chromosome instability induced by mad2 overexpression delay breast cancer but facilitate oncogene-independent outgrowth[J]. Cell Rep, 2016, 15(12): 2679.

[16] CHUNG K, CHOI H, SHIN J, *et al*. 6, 7-Dimethoxy-3-(3-methoxyphenyl) isoquinolin-1-amine induces mitotic arrest and apoptotic cell death through the activation of spindle assembly checkpoint in human cervical cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(8): 1852.

[17] DAS T, ROY KS, CHAKRABARTI T, *et al*. Withaferin A modulates the Spindle assembly checkpoint by degradation of Mad2-Cdc20 complex in colorectal cancer cell lines[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 91(1): 31.

[18] XU B, XU T, LIU H, *et al*. MiR-490-5p suppresses cell proliferation and invasion by targeting bub1 in hepatocellular carcinoma cells[J]. Pharmacology, 2017, 100(5/6): 269.

[19] TILSTON V, TAYLOR SS, PERERA D. Inactivating the spindle checkpoint kinase Bub1 during embryonic development results in a global shutdown of proliferation[J]. BMC Res Notes, 2009, 2: 190.

(本文编辑 刘畅)