

甲醛导致细胞周期异常的浓度选择性*

苗君叶^{1, 2)} 卢 静^{1, 3)} 张子剑^{1, 2)} 童志前¹⁾ 赫荣乔^{1, 3)**}

¹⁾ 脑与认知科学国家重点实验室, 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049;

³⁾ The University of Queensland, Queensland Brain Institute, Qld 4072, Australia

摘要 一定浓度的甲醛可以引起蛋白质的异常修饰、功能丧失、细胞死亡。虽然甲醛的细胞毒性已见报道, 但甲醛影响神经细胞周期及其分子机制等尚不明确。本文采用不同浓度甲醛与神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 共孵育, 观察到甲醛对细胞周期的影响取决于甲醛的浓度。当甲醛浓度([FA]) ≤ 0.1 mmol/L(细胞培养 48 h), 细胞周期与对照相比, 无显著性差异。当甲醛浓度增加($0.1 \text{ mmol/L} < [\text{FA}] \leq 0.2 \text{ mmol/L}$), S 期和 G2/M 期细胞比例显著增加; 当 $[\text{FA}] = 0.3 \text{ mmol/L}$ 时, 细胞增殖被显著抑制, 大量细胞滞留在 S 期(46.28%), G2/M 期细胞仅占 16.05%。将细胞同步到 G2/M 期, 用 0.1~0.3 mmol/L 甲醛孵育, 尽管 G2/M 期细胞都有一定程度的减少, 但 S 期细胞显著增加; 将细胞同步化到 S 期, 与 0.1 mmol/L 甲醛孵育, 则 G2/M 期细胞有一定程度的减少; 与 0.3 mmol/L 甲醛孵育, 表现为 G2/M 细胞显著减少, S 期细胞极度增加。在相同条件下, Sprague-Dawley (SD) 大鼠原代皮层神经元, 也表现出 G2/M 期细胞比例随甲醛浓度升高而降低, S 期细胞比例随之增加的现象。当 $0.1 \text{ mmol/L} \leq [\text{FA}] \leq 0.2 \text{ mmol/L}$ 时, 细胞出现明显的早期或晚期凋亡; 当 $[\text{FA}] \geq 0.3 \text{ mmol/L}$ 时, DNA 损伤明显, 细胞出现凋亡和部分坏死。以上结果提示, 低浓度甲醛($0.1 \text{ mmol/L} \leq [\text{FA}] \leq 0.2 \text{ mmol/L}$)主要通过引起 DNA 超甲基化而抑制 S 期 DNA 的合成, 高浓度甲醛($[\text{FA}] \geq 0.3 \text{ mmol/L}$)则造成 DNA 的损伤, 从而影响细胞周期的进程。

关键词 甲醛, 细胞周期, 细胞增殖, 细胞凋亡, DNA 断裂, 甲醛清除剂

学科分类号 Q2, Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00079

甲醛是最简单的醛类分子(HCHO), 不但以气态形式也以溶解态或者结合态形式广泛分布于生命体的内外环境中^[1-2]。在动物体内, DNA 和组蛋白脱甲基、胺类物质的酶解、脂质过氧化等, 都会生成甲醛^[3-8]。然而, 甲醛在体内蓄积过量, 则会产生细胞毒性, 导致多种器官损伤, 包括中枢神经系统和认知功能损伤^[9-11]。临床调研表明, 随着人的年龄(>65 岁)增长, 内源(尿)甲醛含量逐渐升高; 轻度认知障碍或老年痴呆病人, 其尿甲醛含量显著高于同龄对照组^[12-13]。另有实验表明, 注射过量甲醛的大鼠, 其海马的长时程增强(LTP)被抑制^[14-15]。Tau 蛋白的异常磷酸化是老年痴呆的典型病理特征^[16-19], 甲醛不但可以使细胞活力下降^[20-21], 还能够触发细胞内 Tau 蛋白的过度磷酸化^[22]。真核细胞的增殖建立在有丝分裂的基础之上, 而有丝分裂属于细胞周期进程的一个阶段, 只有细胞周期进程有序执行, 才能保证有丝分裂的正常进行, 使细胞不

断增殖^[23-24]。细胞除了进行增殖, 还会经历凋亡、甚至是坏死^[25-27]。何胡军等^[28]报道了甲醛引起 HeLa 细胞凋亡的现象; 南华大学李瑛等^[29]介绍, 甲醛浓度小于 80 $\mu\text{mol/L}$ 主要造成 PC12 细胞凋亡, 高于该浓度则造成细胞坏死。王春华等^[30]观察了气态甲醛对小鼠睾丸细胞的影响, 随着甲醛浓度的增加, S 期的细胞数增加, 而 G0/G1 和 G2 期细胞百分比下降。

然而, 研究甲醛与细胞周期之间的关系需要将靶细胞进行严格的同步化处理, 即需要最大限度地细胞同步化到一定的阶段, 才能更准确地阐明

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2010CB912303, 2012CB911004)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2013-03-03, 接受日期: 2013-05-15

甲醛与细胞周期、细胞凋亡/坏死之间的关系及其生物学机制。

本文利用不同浓度甲醛与 SH-SY5Y 细胞作用,在细胞周期同步化的基础上,揭示了甲醛浓度与细胞周期、细胞凋亡和坏死之间的关系,探讨了相关生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

材料:人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 来自中国医学科学院基础医学研究所(北京),孕鼠(SD 大鼠)购自维通利华实验动物技术有限公司(北京)。

试剂:甲醛溶液、表没食子儿茶素(epigallocatechin gallate, EGCG)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、白藜芦醇(resveratrol, RES)、地麦冬(dimedone, DMD)、胸腺嘧啶脱氧核苷(胸苷)、诺考达唑、碘化丙啶(PI)、RNase、二氨基联苯胺(DAB)均购自 Sigma 公司(美国);胎牛血清(FBS)购自于 PAA 公司(奥地利);细胞活力检测试剂盒(CCK-8)购自株式会社同仁化学研究所(日本);PI-Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司(中国);DMEM 培养基、Neurobasal 培养基、B27 补体、Gluta MAX 添加剂、TUNEL 试剂盒、biotin 偶联的 anti-BrdU 抗体、HRP 偶联的 anti-biotin 抗体均购自 Invitrogen 公司(美国);乙腈购自 Thermo Fisher 公司(美国);三氯乙酸、2,4-二硝基苯肼、多聚甲醛等均购自北京北化精细化学品有限责任公司(中国)。

1.2 细胞培养、接种与药物处理

1.2.1 SH-SY5Y 细胞. SH-SY5Y 培养于 DMEM 培养基(含有 10% 胎牛血清),37℃,5% CO₂ 培养箱中,每 2 天进行一次传代。细胞活力测定实验,将细胞按照 1×10^5 的密度接种于 96 孔板中并培养 24 h 使其充分贴壁,之后分别加入不同浓度的甲醛(0.01、0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.5、1.0 mmol/L)或者甲醛清除剂(0.01 mmol/L)继续培养,并在指定的时间点(24、48、72 h)对细胞进行拍照、计数、活力测定或在流式细胞仪上进行检测。

1.2.2 大鼠原代神经元. 孕龄 18 天的 SD 大鼠,取其胎鼠皮层细胞,首先用 DMEM 培养基(含有 10% 胎牛血清)接种于 6 孔板中,贴壁 24 h 后,换用 Neurobasal 培养基(含 2% Gluta MAX 添加剂和 1% B27 补体,不含血清)继续培养,每 3 天进行半换液,诱导分化 12 天后得到成熟神经元。之后加

入不同浓度的甲醛(0.05、0.1、0.2、0.3 mmol/L)培养,并进行后续实验。

1.3 细胞显微拍照、计数与活力测定

培养于 6 孔板中的细胞经药物处理后,置于显微镜下观察并拍照(Olympus IX71, 10×物镜),之后用胰酶(0.25%,含 0.025% EDTA-2Na)消化并用血球计数板计数。培养于 96 孔板中的细胞经药物处理后,用 CCK-8 方法于酶标仪(BioRad Benchmark Plus, 450 nm)测定其活力。

1.4 细胞凋亡检测

1.4.1 TUNEL 试剂盒检测. 经不同浓度甲醛孵育 48 h 的 SH-SY5Y 细胞,用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min,之后用 0.01% TritonX-100 室温透膜 10 min. 用 TUNEL 试剂盒中提供的缓冲液对上述细胞进行孵育,室温 10 min,再用混合好的反应试剂[含末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)和 5-溴脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(BrdUTP)]于 37℃ 孵育细胞 1 h. 之后用血清进行封闭,加入 biotin 偶联的 anti-BrdU 抗体进行孵育,清洗之后,再加入 HRP 偶联的 anti-biotin 抗体孵育,最后用 DAB 显色,并在显微镜下(Nikon FAX, 20×物镜)观察拍照。用 DNase I 处理的细胞作为阳性对照。

1.4.2 PI-Annexin V 试剂盒检测. 经药物处理后的 SH-SY5Y 细胞用胰酶(0.25%,不含 EDTA)消化收集。用含有 5 μ l PI 和 5 μ l Annexin V-FITC 的结合缓冲液 500 μ l 对收集后的细胞进行重悬,并于室温避光孵育 15 min. 之后于流式细胞仪(BD FACS Calibur, 488nm)上用第一和第二荧光检测器采集荧光值。

1.5 细胞周期同步化

1.5.1 G2/M 期细胞的同步化. 向接种于 6 孔板中的 SH-SY5Y 细胞中加入终浓度为 50 μ g/L 的诺考达唑孵育 12 h,此时细胞会漂浮起来,将漂浮的细胞收集后以 1×10^5 的密度重新接种于 6 孔板中,待细胞贴壁以后即可进行后续实验。

1.5.2 S 期细胞的同步化. 向接种于 6 孔板中的 SH-SY5Y 细胞中加入终浓度为 2.5 mmol/L 胸苷,孵育 20 h 后用 PBS 洗 3 次,换用新鲜的 DMEM (含 10% 胎牛血清)继续培养 9 h 进行释放,之后向培养基中再次加入终浓度为 2.5 mmol/L 的胸苷进行第二次阻断,时间为 4 h,用 PBS 洗 3 次后即可进行后续实验。

1.6 细胞周期检测

接种于 6 孔板中的 SH-SY5Y 细胞和大鼠原代

神经元经胰酶(0.25%, 不含 EDTA)消化收集, 并用 75%乙醇于 -20°C 固定过夜, 离心弃上清, 用 PBS 洗涤细胞 1 次, 再次离心弃上清后, 于细胞沉淀中加入 500 μl 含有 20 mg/L PI 和 1 g/L RNase 的 PBS, 室温避光孵育 1 h. 经流式细胞仪(BD, FACS Calibur)测定细胞周期.

1.7 甲醛含量测定

1.7.1 细胞分泌甲醛的测定. 培养 SH-SY5Y 细胞, 并分别在 24、48、72 h 收集上清液. 取上清液 500 μl , 加入 500 μl 的 10% TCA 溶液, 震荡混匀. 12 000 r/min, 离心 30 min, 收集上清, 并取该上清 450 μl , 加入浓度为 1g/L 的 2, 4-二硝基苯肼 50 μl 和 500 μl 乙腈, 离心混匀, 60°C 水浴 30 min. 水浴结束后, 将样品离心混匀, 用 0.22 μm 滤膜过滤后, 用 65%的乙腈作为流动相, HPLC 仪器测定 365 nm 下的吸收.

1.7.2 甲醛清除剂与甲醛含量的测定. 配制 10 mmol/L 的表没食子儿茶素、白藜芦醇、还原型

谷胱甘肽和地麦冬溶液, 并将这些溶液按照 1:100 的比例加入到 3 g/L 甲醛溶液中, 于 37°C 温育 40 min, 之后按照 1.7.1 中所述方法测定上述溶液中的甲醛含量.

1.8 数据分析

用 SPSS 16.0 和 Origin 8.0 软件对获得的数据进行 one-way ANOVA 统计分析并作图. 所有结果至少重复 3 次.

2 结 果

2.1 甲醛显著抑制细胞的增殖

在 SH-SY5Y 细胞的培养基中加入不同终浓度甲醛(0.0、0.1、0.5、1.0 mmol/L)与细胞孵育, 24、48、72 h 后进行观察. 当甲醛浓度 $[\text{FA}] \geq 0.1$ mmol/L 时, 细胞形态较对照组出现显著变化. 可以看到, 细胞皱缩、突起回缩(图 1a), 并且随着甲醛浓度的增高, 细胞数目显著下降(图 1b).

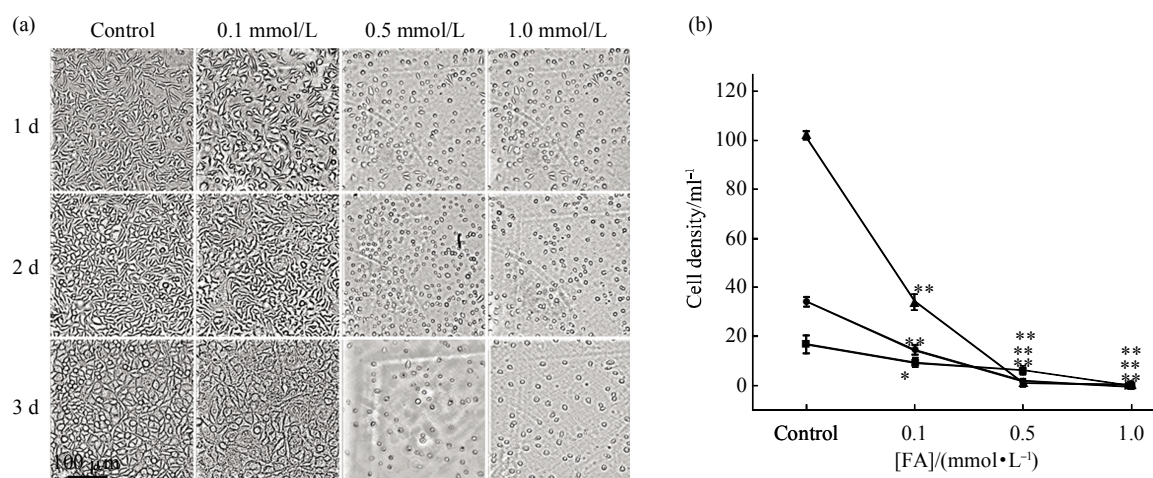


Fig. 1 Effect of exogenous formaldehyde on cell morphology and proliferation

Microscopic images of SH-SY5Y under the treatment of formaldehyde at indicated concentrations and time points are shown in panel (a). Changes in cell viability under the same experimental conditions are shown in panel (b). Cells without the treatment of formaldehyde are used as control ($n = 3$; $\bar{x} \pm s$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). ■—■: 1d; ●—●: 2d; ▲—▲: 3d.

2.2 甲醛对细胞周期的影响

将 SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔板(密度: 1×10^5), 培养 24 h 使其充分贴壁. 在培养基中分别加入不同终浓度甲醛(0.05、0.1、0.15、0.2、0.3 mmol/L), 继续培养 48 h, 收集细胞, 经 PI 染色, 采用流式细胞仪进行细胞周期检测. 当甲醛浓度 $[\text{FA}] \leq 0.1$ mmol/L 时, 细胞周期变化不显著; 当 $[\text{FA}] = 0.15$ mmol/L 时, S 期的细胞数目增加, 且随甲醛

浓度的升高而显著递增(图 2a). 当 $[\text{FA}] \leq 0.1$ mmol/L 时, G2/M 期细胞百分比变化不明显, 当 $[\text{FA}] = 0.2$ mmol/L, G2/M 比例显著增加(37.4%); 但当 $[\text{FA}] = 0.3$ mmol/L 时, G2/M 细胞比例显著变少(图 2b). 以上结果表明, 甲醛能够使细胞停留在 S 期, 从而影响细胞增殖. 值得注意的是, 不同浓度的甲醛对细胞 G2/M 期的影响不同.

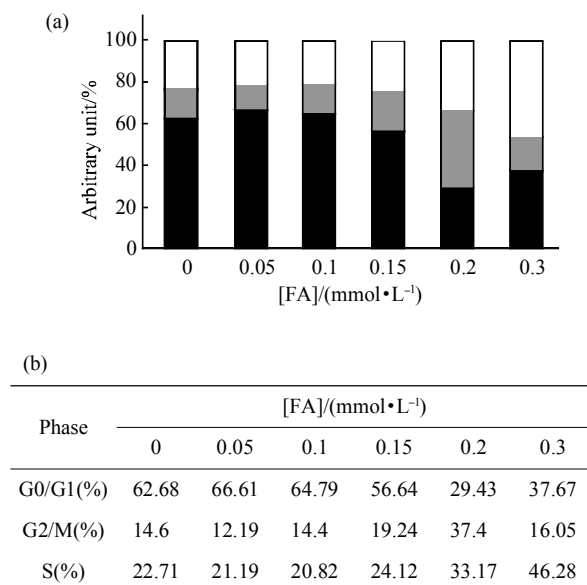


Fig. 2 Effect of formaldehyde on cell cycle of unsynchronized SH-SY5Y cells

SH-SY5Y cells were treated with different concentrations of formaldehyde as indicated for 48 h. (a) Graph in bar charts shows percentages of cells in S phase (white), G2/M phase (grey) and G0/G1 phase (black) examined by flow cytometry. □: S; ■: G2/M; ■: G0/G1. (b) The same data collected from graph in panel (a).

2.3 甲醛使细胞停滞于 S 期

为了进一步论证 2.2 中的结果，作者对 SH-SY5Y 细胞进行了周期同步化处理，使细胞处于相同的细胞周期。待去除同步化药物并释放 4 h 后，再与不同终浓度甲醛(0.0、0.1、0.3 mmol/L)孵育，对细胞周期进行测定。

将细胞同步化到 G2/M 期(图 3a)，0.1 mmol/L 甲醛就能使 S 期细胞比例明显增加，G2/M 期细胞比例减少。0.3 mmol/L 甲醛使处于 S 期的细胞比例增加更为显著，但与 0.1 mmol/L 甲醛的结果相比，G2/M 期细胞比例的降低相对不明显。

将细胞同步化到 S 期，当 [FA] = 0.3 mmol/L，有超过 50% ($P < 0.001$) 的细胞处于 S 期，约为对照组的 2 倍(图 3b)，处于 G2/M 期的细胞比例的减少也极为显著(仅占总细胞的 5% 左右， $P < 0.001$)。尽管 0.1 mmol/L 甲醛能够部分降低 G2/M 期细胞

的比例，但 S 期细胞比例的降低并不显著。也就是说，甲醛通过影响 S 期，从而间接减少了 G2/M 期的细胞数目。

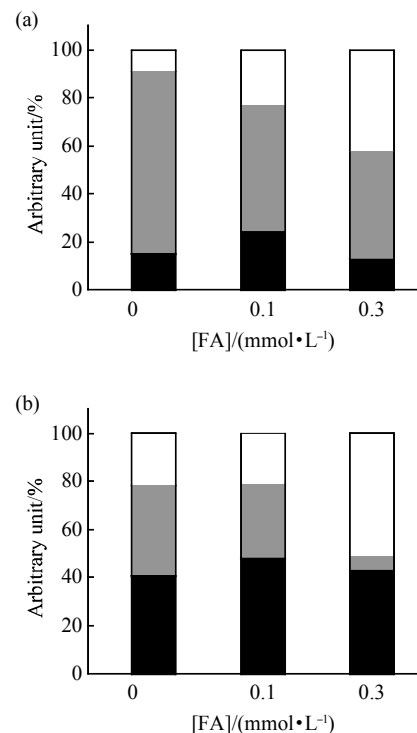


Fig. 3 Effects of formaldehyde on cell cycle of synchronized SH-SY5Y cells

SH-SY5Y cells were treated with formaldehyde at indicated concentrations for 48 h and then collected for flow cytometry. Bar charts show percentages of cells in S phase (white), G2/M phase (grey) and G0/G1 phase (black). Cells were synchronized at G2/M phase (a) and S phase (b) before the treatment of formaldehyde, respectively. □: S; ■: G2/M; ■: G0/G1.

在生理条件下，大多数原代神经元为分化成熟的细胞，不再进行分裂增殖，处于静止期(G0/G1)。在相同条件下，采用不同浓度甲醛处理 SD 大鼠皮层神经元，经流式细胞仪检测，结果显示，绝大多数细胞(约 87%~88%)处于 G0/G1 期，处于 S 期的细胞仅占 6%~7%。尽管大多数神经元已经脱离了细胞周期，但是依然可以观察到在甲醛的作用下，处于 S 期的细胞比例随甲醛浓度的升高而增加，处于 G2/M 期的细胞比例有所降低(图 4)。这与处在活跃增殖过程中的细胞系(SH-SY5Y)的结果一致。

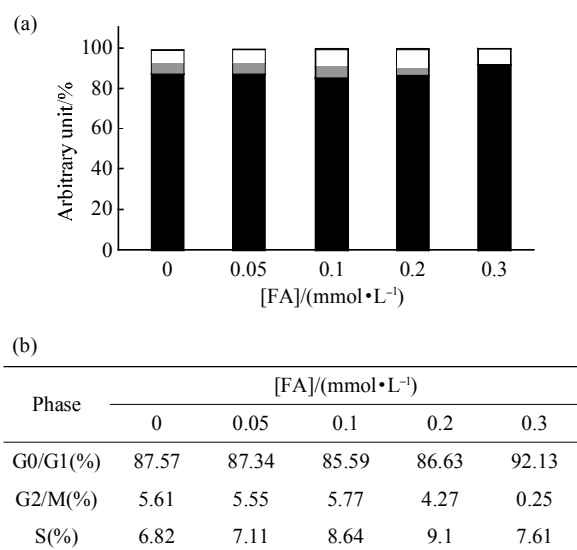


Fig. 4 Effects of formaldehyde on cell cycle of SD rat primary neurons

SD rat primary neurons were treated with formaldehyde at indicated concentrations for 48 h and then collected for flow cytometry. (a) Bar charts show percentages of cells in S phase (white), G2/M phase (grey) and G0/G1 phase (black). □: S; ▒: G2/M; ■: G0/G1. (b) The same data collected from graph in panel (a).

2.4 细胞 DNA 的损伤取决于甲醛浓度

为了阐明甲醛对细胞周期的作用, 作者观察了不同浓度甲醛对 SH-SY5Y 细胞 DNA 的影响. 实验条件与 2.2 中所述一致, 但细胞不经消化收集, 而是用 4% 多聚甲醛固定, 用 TUNEL 试剂盒进行染色在显微镜下观察细胞 DNA 的变化. 如图 5 所示: 当 $0.05 \text{ mmol/L} \leq [\text{FA}] \leq 0.1 \text{ mmol/L}$ 时, SH-SY5Y 细胞形态发生变化, 细胞突起萎缩、细胞着色有所加深; 当 $[\text{FA}] = 0.3 \text{ mmol/L}$ 时, 细胞皱缩、部分细胞核固缩且着色明显加深(DNA 受损断裂); 当 $[\text{FA}] = 1.0 \text{ mmol/L}$ 时, 细胞核固缩且呈现很深的着色(DNA 损伤严重). 以上结果表明, 甲醛浓度越高, 细胞 DNA 损伤越严重. 该结果提示, 高浓度甲醛可以直接破坏 DNA, 使细胞停留在静止期(G0 期), 阻碍细胞进行有丝分裂.

2.5 细胞的凋亡和坏死具有甲醛浓度依赖性

在甲醛作用下, S 期细胞增多, G2/M 期细胞减少; DNA 损伤, 细胞死亡. 为了揭示不同浓度甲醛引起细胞死亡的方式, 本文将 SH-SY5Y 细胞 (1×10^5 的密度) 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 使细胞

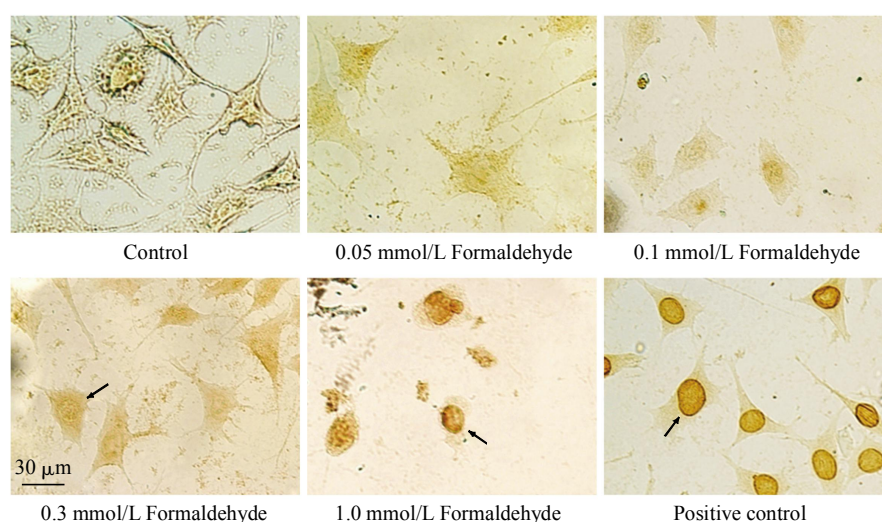


Fig. 5 Different concentrations of formaldehyde cause impairment of DNA in SH-SY5Y cells

Microscopic images under bright field show DNA fragments in SH-SY5Y cells detected by TUNEL assay. Concentrations of formaldehyde were as indicated. Cells in the absence of formaldehyde and treated with DNase I were used as negative and positive control, respectively.

充分贴壁, 再加入不同终浓度甲醛(0.01、0.05、0.1、0.2、0.3 mmol/L)(图 6b~f, a 为对照), 培养 48 h, 收集细胞并用 PI-Annexin V 试剂盒染色, 通过流式细胞仪进行检测. 当 $[\text{FA}] = 0.05 \text{ mmol/L}$ 时, 细胞开始出现早 / 晚期凋亡; 当甲醛浓度继续升高

时($0.1 \text{ mmol/L} \leq [\text{FA}] \leq 0.2 \text{ mmol/L}$), 除早期凋亡外, 晚期凋亡的细胞数目也明显增多; 当 $[\text{FA}] = 0.3 \text{ mmol/L}$, 除发生细胞凋亡外, 还出现细胞坏死. 结果表明, 细胞发生凋亡还是坏死, 取决于甲醛的浓度.

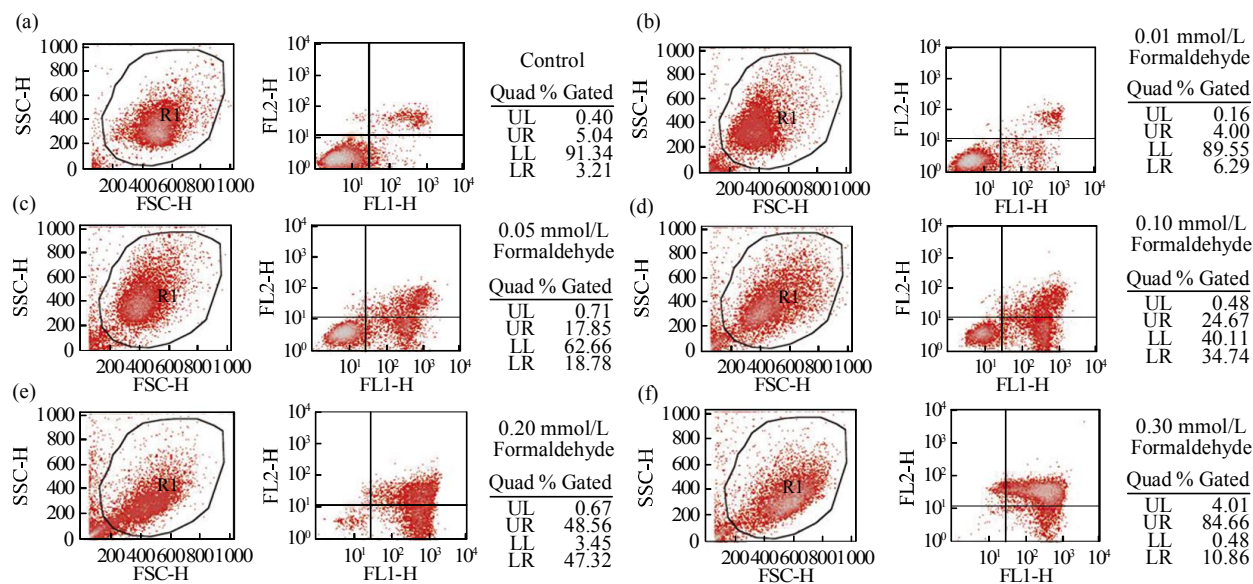


Fig. 6 Excess formaldehyde promotes apoptosis and necrosis in SH-SY5Y cells

Representative cytograms of SH-SY5Y cells were detected by flow cytometry. Cells were treated with indicated concentrations of formaldehyde for 48 h and then stained with annexin V-FITC and PI before detected. LL, viable cells; LR, cells with early apoptosis; UR, cells with late apoptosis and necrosis. (a) Control, cells without the treatment of formaldehyde. (b) [FA]=0.01 mmol/L. (c) [FA]=0.05 mmol/L. (d) [FA]=0.1 mmol/L. (e) [FA]=0.2 mmol/L. (f) [FA]=0.3 mmol/L.

2.6 培养基中甲醛的降低能够提升细胞活力

一些还原剂, 如表没食子儿茶素、白藜芦醇、还原型谷胱甘肽、地麦冬分别与一定浓度的甲醛共孵育(37°C 温育 40 min), 并测定溶液中的甲醛浓度. 如图 7a 所示, 除还原型谷胱甘肽外, 其余药物均能有效降低甲醛浓度, 起到清除甲醛的作用.

将上述药物(终浓度为 0.01 mmol/L)分别加入到含有 0.2 mmol/L formaldehyde 的细胞培养基中,

培养细胞 24 h, 用 CCK-8 法测定细胞活力. 如图 7b 所示, 与甲醛对照组相比, 除还原型谷胱甘肽外, 其余药物均能在一定程度上提升细胞活力($P < 0.01$). 结果表明, 表没食子儿茶素、白藜芦醇、地麦冬这些药物能够抵抗甲醛对细胞造成的损伤. 该结果为进一步探索甲醛导致 DNA 损伤、细胞周期改变以及细胞死亡的机制打下了基础.

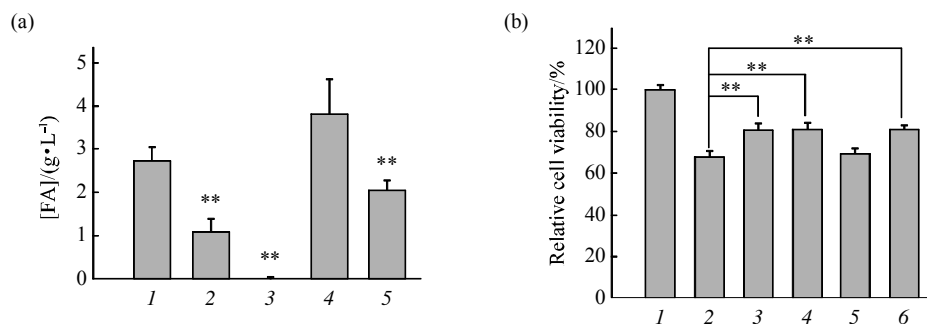


Fig. 7 Formaldehyde scavenger can rescue SH-SY5Y cells in the presence of formaldehyde

(a) Formaldehyde solution was incubated with EGCG(2), RES(3), GSH(4) and DMD(5) (final concentration was 0.01 mmol/L for each reagent) for 40 min, respectively, and then formaldehyde concentration was detected by HPLC. Formaldehyde (3 g/L) without any scavengers (1) was used as control ($n = 3$; $\bar{x} \pm s$; ** $P < 0.01$). (b) Cell viability examined with CCK-8 assay. Cells were under the treatment with 0.2 mmol/L FA and EGCG, RES, GSH and DMD (final concentration 0.01 mmol/L for each agent) for 24 h, respectively. 1: Cells without treatment of formaldehyde as a blank control; 2: Cells only treated with 0.2 mmol/L formaldehyde as a negative control; 3: Cells treated with formaldehyde and EGCG; 4: Cells treated with formaldehyde and RES; 5: Cells treated with formaldehyde and GSH; 6: Cells treated with formaldehyde and DMD. ($n = 3$; $\bar{x} \pm s$; ** $P < 0.01$).

3 讨 论

本文观察了不同浓度甲醛对神经来源细胞系 SH-SY5Y 增殖及细胞周期的影响. 对于非同步化细胞: 当 $[FA] \leq 0.1 \text{ mmol/L}$, 细胞增殖虽然受到抑制, 但其细胞分布于各个周期的比例变化并不显著; 当 $0.1 \text{ mmol/L} < [FA] \leq 0.2 \text{ mmol/L}$ 时, 细胞增殖受到抑制, 停留在 S 期和 G2/M 期的细胞比例增加, 显示细胞合成 DNA 以及有丝分裂被抑制; 当 $[FA] = 0.3 \text{ mmol/L}$, S 期细胞数目明显增加, G2/M 期细胞显著减少, 说明由于 DNA 的合成被阻止, 细胞难以进入分裂期, 有丝分裂受到抑制.

3.1 周期同步化的细胞对甲醛应激更敏感

首先, G2/M 期同步化细胞在含有 0.1 mmol/L 甲醛的培养基中, S 期细胞增加, G2/M 期细胞减少, 在相同条件下非同步细胞的周期变化则不明显. 这是因为非同步化细胞所处的周期不一致, 甲醛对细胞周期的影响不能同步表现出来. 当细胞被同步化以后, 甲醛对周期的影响便更加明显地表现出来. 当 G2/M 期同步化的细胞受到 0.3 mmol/L 甲醛作用时, 处于 S 期的细胞比例显著增加(约占 40%). 由于 G2/M 期同步化试剂诺考达唑的作用机制是破坏微管系统、抑制纺锤丝的形成^[31-32], 因此, G2/M 期同步化的细胞, 其纺锤丝的形成被抑制, 当诺考达唑撤除后, 甲醛可以继续破坏微管系统、妨碍纺锤丝的形成, 同时还能抑制 DNA 的复制与合成, 甚至造成 DNA 的损伤, 从而使细胞阻滞于 S 期, 阻止其向 G2/M 期过渡, 表现为 S 期细胞比例增加, 而 G2/M 期细胞减少.

其次, S 期同步化细胞在 0.1 mmol/L 甲醛作用下, 处于 S 期的细胞比例增加并不明显, 而 G2/M 期的细胞比例明显下降, 在 0.3 mmol/L 甲醛中, S 期细胞数目增加极为显著, 所占比例达到约 50%, 而 G2/M 期的细胞比例减少到约 5%. 根据这个现象, 作者认为, 由于 S 期的同步化试剂胸苷的作用是抑制 DNA 的合成, 使细胞同步化于 S 期^[33-34], 此时由于大部分细胞 DNA 合成已经受阻, 所以 0.1 mmol/L 甲醛对 DNA 合成的抑制效果便不能表现出来, 但能够部分阻止细胞进入 G2/M 期. 当甲醛浓度达到 0.3 mmol/L 时, 甲醛不但能够进一步阻止 DNA 合成, 甚至造成 DNA 的损伤、断裂, 使大量细胞停滞在 S 期, 而不能进入 G2/M 期.

此外, 作者通过 TUNNEL 实验对以上结果进行了证实. 当 $[FA] \geq 0.3 \text{ mmol/L}$ 时, 能明显观察到

DNA 断裂所呈现出的阳性着色. 说明一定浓度的甲醛($0.1 \text{ mmol/L} \leq [FA] < 0.3 \text{ mmol/L}$)对 DNA 造成的损伤有限, 但较高浓度的甲醛($[FA] \geq 0.3 \text{ mmol/L}$), 会引起 DNA 严重损伤, 甚至断裂.

3.2 甲醛将细胞滞留于 S 期的生物学机制

首先, 甲醛可以使 DNA 羟甲基化和甲基化, 导致基因沉默. 根据 Bohnuud 等^[35]报道, 甲醛可以使 DNA 中的嘧啶碱基发生羟甲基化, 并通过氧化转变成甲基. Lu 等^[36]发现甲醛可以与 DNA 进行反应, 产生甲基化 DNA. DNA 甲基化可以使基因沉默, 抑制细胞 DNA 的合成^[37-38]. 这可能是甲醛使得更多的细胞处于 S 期的原因之一. 因此, 当浓度升高时, 甲醛作用于核 DNA, 使 DNA 甲基化程度加剧, 进而抑制 DNA 的解链、复制与合成, 从而抑制了细胞从 DNA 合成期进入下一个时期, 使细胞被阻滞在 S 期. 因此, 作者观察到 S 期的细胞数目明显增加.

其次, 甲醛使蛋白质羟甲基化与甲基化, 引起蛋白质结构与功能改变. 甲醛能够与 α 氨基以及赖氨酸残基的 α 氨基发生反应, 形成不稳定的中间产物 Schiff's 碱, 继而羟甲基化, 最后形成甲基化蛋白. 被修饰的蛋白质发现结构与功能的改变, 影响在细胞内的功能^[39]. 当甲醛浓度升高, 过度修饰的蛋白错误折叠, 分子聚集, 细胞功能失调^[4].

再次, 甲醛通过触发神经 Tau 蛋白超磷酸化从而抑制有丝分裂. 卢静等^[20]发现, 甲醛可以触发微管相关蛋白 Tau 过度磷酸化, 过度磷酸化使 Tau 蛋白与微管解离, 导致微管解聚^[40-41]. 作为纺锤丝的主要成分, 微管的解聚影响了纺锤丝的正常形成, 从而阻碍了有丝分裂^[42]. 因此, 在甲醛的作用下, 细胞难以进行有丝分裂, 便停滞在了 G2/M 期, 使得该时期的细胞数目增加.

值得注意的是, 当甲醛浓度继续升高至 0.3 mmol/L 时, 处于 S 期的细胞数目继续显著增加(约占 50%), 然而, 处于 G2/M 期的细胞比例反而减少. 对此, 作者认为, 由于甲醛是生物大分子的交联剂, 高浓度甲醛可以使得 DNA 与蛋白质以及其他分子发生交联, 形成 DNA-蛋白质等共价聚积物, 导致 DNA 与蛋白质的结构改变和功能丧失^[43-44]. 另外, 过度磷酸化除能导致 Tau 蛋白与微管解离外, 还能够引起 Tau 蛋白与 DNA 解聚, 使 DNA 失去 Tau 蛋白的保护作用, 因此, DNA 很容易受到自由基的攻击而损伤断裂^[22, 45]. 此时, 大量细胞无法完成 DNA 的合成, 停滞在 S 期, 不能继

续向 G2/M 期过渡, 因此表现为 S 期细胞比例显著增加, 而 G2/M 期细胞比例减少。

除利用 SH-SY5Y 细胞系作为实验对象外, 作者还研究了甲醛对原代神经元的影响, 其结果与细胞系的结果一致, 从而进一步证实了上述推断。

最后, 甲醛能够与细胞膜上的蛋白质发生反应, 如图 1a 所示, 直接导致细胞结构发生改变, 从而影响细胞的生物学功能。因此, 当甲醛浓度升高时, 对细胞的影响是多方面的, 只不过在对细胞周期的影响中表现得比较明显的是: DNA 的合成被抑制、DNA 分子结构被破坏、细胞骨架结构被破坏、纺锤体的形成被抑制等。

3.3 细胞周期受甲醛的影响具有浓度依赖性

如图 8 所示: 一定浓度的甲醛可导致 Tau 蛋白过度磷酸化, 使 Tau 蛋白从微管上解离, 造成微管解聚, 影响纺锤丝的正常形成, 从而使细胞停滞于有丝分裂期, 表现为 G2/M 期细胞比例增加; 当甲

醛浓度继续升高时, 其不但可以抑制纺锤丝的形成, 还能够作用于核 DNA, 使 DNA 甲基化程度加剧, 阻碍 DNA 解链、复制, 从而抑制 DNA 合成, 使部分细胞停滞于 S 期, 因此出现 G2/M 期与 S 期细胞比例均增加的现象; 当甲醛浓度再度升高, 一方面可以导致 DNA 发生交联, 另一方面还可以产生氧化应激作用, 使 DNA 遭受自由基的攻击, 从而发生断裂。由于 DNA 被破坏, 细胞无法完成 DNA 合成, 便无法进入下一个时期, 因此表现为 S 期细胞比例显著增加, 而 G2/M 期细胞比例显著减少。对于本实验条件下的同步化细胞而言, 甲醛对于细胞周期的影响主要通过作用于 DNA 来实现。对同步化于 G2/M 期的细胞, 甲醛主要干扰 DNA 的合成或使 DNA 受到破坏; 对同步化于 S 期的细胞, 高浓度甲醛除阻止 DNA 的合成外, 还会造成 DNA 严重受损、乃至断裂。

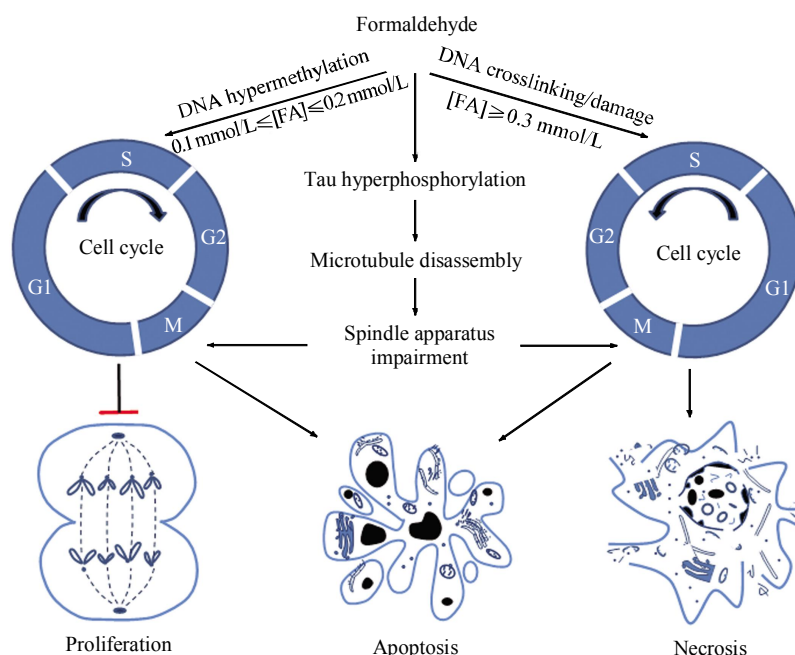


Fig. 8 Formaldehyde inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis and necrosis via its effect on cell cycle

Excess formaldehyde induces hyperphosphorylation of Tau protein, resulting in disassembly of microtubule and damage of spindle apparatus, so that cells are restricted in G2/M phase. Excess formaldehyde also has an aberrant impact on nuclear DNA. When $0.1 \text{ mmol/L} \leq [\text{FA}] \leq 0.2 \text{ mmol/L}$, formaldehyde induces hypermethylation of DNA, while $[\text{FA}] \geq 0.3 \text{ mmol/L}$, it causes crosslinking or damage of DNA, keeping cells staying at S phase and restraining cells from entering G2/M phase. Since normal cell cycle is impaired and proliferation is inhibited, cells undergo apoptosis and even necrosis as the concentration of formaldehyde increases.

3.4 甲醛导致细胞死亡的方式具有浓度依赖性

随着甲醛浓度的升高, 细胞最先进入凋亡阶

段, 表明当受到甲醛的刺激时, 细胞发生应激, 启动程序性死亡(细胞凋亡)途径, 将受损的细胞清

除, 以维持其余细胞的正常生存环境, 使这些细胞继续存活; 但当甲醛浓度持续升高时, 细胞已无法应对这种强烈应激, 于是便出现坏死现象. 至于过量的甲醛究竟启动了哪些凋亡通路从而导致了细胞凋亡的发生, 还需要后续的实验继续深入研究. 综上所述, 高浓度甲醛除了能够通过影响正常的细胞周期进程而使细胞增殖受阻外, 还能够通过细胞凋亡和坏死途径导致细胞死亡. 甲醛抑制细胞周期进程和导致细胞死亡的作用均具有浓度依赖性.

对于甲醛导致细胞凋亡的现象, 本文通过 TUNEL 和 PI-Annexin V 方法进行了检测. 为了增强结果的可靠性与严谨性, 还应采用凝胶电泳方法检测 DNA ladder, 同时, 在电镜下观察染色体碎片、细胞器皱缩、生物膜空泡及凋亡小体等, 这些将在后续工作中进一步探索.

表没食子儿茶素、白藜芦醇、地麦冬不但能够有效清除甲醛, 还能够缓解甲醛的细胞毒性, 提高细胞活力. 然而, 还原型谷胱甘肽并不能降解培养基中的甲醛, 从而也不能起到保护细胞的作用. 这充分证明, 能够有效降低甲醛浓度的药物, 便能够提升细胞活力. 此外, 这些药物还可以有效清除由过量甲醛诱导生成的自由基, 从而缓解甲醛对于细胞造成的氧化应激, 保护 DNA 免遭破坏, 使细胞正常存活. 这些药物是如何降低甲醛浓度, 如何抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、恢复细胞活力的机制, 都是值得进一步研究的.

本文揭示了过量外源甲醛抑制细胞增殖、导致细胞死亡的机制. 随着年龄的增长, 老年人体内甲醛浓度自然升高, 由此推测, 随着老龄化进程, 中枢神经系统内过度积累的内源性甲醛导致神经细胞凋亡、坏死, 从而影响了正常的认知功能, 甚至导致退行性病变. 这些对于研究认知功能损伤的早期事件, 如: 甲醛在脑内的代谢平衡失调, 导致神经细胞功能损伤等的机制, 具有一定的启示作用^[45]. 然而, 体内过度蓄积的甲醛导致机体功能障碍、动物认知功能损伤的神经机制还需要进一步的研究. 另一方面, 甲醛清除药物能够保护细胞的初步结果, 为治疗由甲醛引起的认知功能损伤, 如老年痴呆等提供了潜在的药物靶点和候选药物.

致谢 感谢中国科学院生物物理研究所科学技术平台的刘春春老师和贾俊英老师在流式细胞术方面给予的指导, 感谢本实验室的莫炜川博士在细胞周期同步化实验方面给予的帮助.

参 考 文 献

- [1] 童志前, 韩禅帅, 苗君叶, 等. 内源性甲醛异常蓄积与记忆衰退. 生物化学与生物物理进展, 2011, **38**(6): 575-579
Tong Z Q, Han C S, Miao J Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2011, **38**(6): 575-579
- [2] Kalasz H. Biological role of formaldehyde, and cycles related to methylation, demethylation, and formaldehyde production. Mini Rev Med Chem, 2003, **3**(3): 175-192
- [3] Gerken T, Girard C A, Tung Y C, *et al.* The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. Science, 2007, **318**(5855): 1469-1472
- [4] Roy T W, Bhagwat A S. Kinetic studies of *Escherichia coli* AlkB using a new fluorescence-based assay for DNA demethylation. Nucleic Acids Res, 2007, **35**(21): e147
- [5] Treweek S C, Henshaw T F, Hausinger R P, *et al.* Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. Nature, 2002, **419**(6903): 174-178
- [6] Yi C, Yang C G, He C. A non-heme iron-mediated chemical demethylation in DNA and RNA. Acc Chem Res, 2009, **42**(4): 519-529
- [7] 童志前, 万 有, 罗文鸿, 等. 内源性甲醛及其相关人类重大疾病. 自然科学进展, 2008, **18**(11): 1201-1211
Tong Z Q, Wan Y, Luo W H, *et al.* Prog Nat Sci, 2008, **18**(11): 1201-1211
- [8] Zou L, Huang Q, Li A, *et al.* A genome-wide association study of Alzheimer's disease using random forests and enrichment analysis. Sci China Life Sci, 2012, **55**(7): 618-625
- [9] Kilburn K H, Warshaw R, Thornton J C. Formaldehyde impairs memory, equilibrium, and dexterity in histology technicians: effects which persist for days after exposure. Arch Environ Health, 1987, **42**(2): 117-120
- [10] Aslan H, Songur A, Tunc A T, *et al.* Effects of formaldehyde exposure on granule cell number and volume of dentate gyrus: a histopathological and stereological study. Brain Res, 2006, **1122**(1): 191-200
- [11] Lovschall H, Eiskjaer M, Arenholt-Bindslev D. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. Toxicol In Vitro, 2002, **16**(1): 63-69
- [12] Tong Z, Zhang J, Luo W, *et al.* Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in senile dementia. Neurobiol Aging, 2011, **32**(1): 31-41
- [13] Lu J, Miao J, Su T, *et al.* Formaldehyde induces hyperphosphorylation and polymerization of Tau protein both *in vitro* and *in vivo*. Biochim Biophys Acta, 2013, **1830**(8): 4102-4116
- [14] Tong Z, Han C, Luo W, *et al.* Accumulated hippocampal formaldehyde induces age-dependent memory decline. Age (Dordr), 2012, **35**(3): 583-596
- [15] Tong Z, Han C, Luo W, *et al.* Aging-associated excess formaldehyde leads to spatial memory deficits. Sci Rep, 2013, **3**: 1807 (doi:10.1038/srep 01807)
- [16] Binder L I, Guillozet-Bongaarts A L, Garcia-Sierra F, *et al.* Tau,

- tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1739**(2-3): 216-223
- [17] Hardy J. A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron*, 2006, **52**(1): 3-13
- [18] Feng W, Feng Y. MicroRNAs in neural cell development and brain diseases. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(12): 1103-1112
- [19] Supnet C, Bezprozvanny I. Presenilins as endoplasmic reticulum calcium leak channels and Alzheimer's disease pathogenesis. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(8): 744-751
- [20] Kuo H, Jian G, Chen C, *et al.* White blood cell count as an indicator of formaldehyde exposure. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1997, **59**(2): 261-267
- [21] Sandikci M, Seyrek K, Aksit H, *et al.* Inhalation of formaldehyde and xylene induces apoptotic cell death in the lung tissue. *Toxicol Ind Health*, 2009, **25**(7): 455-461
- [22] 卢 静, 苗君叶, 潘 荣, 等. 甲醛诱导的磷酸化减弱 Tau 蛋白与 DNA 相互作用. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(12): 1113-1120
- Lu J, Miao J Y, Pan R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(12): 1113-1120
- [23] Rubin H. The logic of the Membrane, Magnesium, Mitosis (MMM) model for the regulation of animal cell proliferation. *Arch Biochem Biophys*, 2007, **458**(1): 16-23
- [24] Chakroborty S, Stutzmann G E. Early calcium dysregulation in Alzheimer's disease: setting the stage for synaptic dysfunction. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(8): 752-762
- [25] 吴正治, 李明, 张盛薇, 等. 不同舌苔舌上皮细胞的凋亡及相关基因分子机理研究. *中国中西医结合杂志*, 2005, **25**(11): 986-988
- Wu Z Z, Li M, Sheng W. *Chin J Integrated Traditional and Western Medicine*, 2005, **25**(11): 986-988
- [26] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, 2012, **45**(6): 487-498
- [27] Luo Y, Zhang J, Liu N, *et al.* Copper ions influence the toxicity of beta-amyloid (1-42) in a concentration-dependent manner in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(6): 527-534
- [28] 何胡军, 徐 钱, 丁书茂, 等. 甲醛诱导 HeLa 细胞凋亡的研究. *生态毒理学报*, 2006, **1**(3): 214-220
- He H J, Xu Q, Ding S M, *et al.* *Asian J Ecotoxicology*, 2006, **1**(3): 214-220
- [29] 李 瑛. 甲醛诱导 PC12 细胞凋亡及坏死的研究[D]. [出版地不详]: 华南大学, 2007
- Li Y. Apoptosis and necrosis of PC12 cells induces by formaldehyde. [S.l.]: Huanan University, 2007
- [30] 王春华, 叶琳, 隋春生, 等. 甲醛对小鼠睾丸细胞凋亡和细胞周期的影响. *吉林大学学报(医学版)*, 2009, **35**(3): 448-450
- Wang C H, Ye L, Sui C S, *et al.* *J Jilin Univ(Medicine Edition)*, 2009, **35**(3): 448-450
- [31] Musa H, Orton C, Morrison E E, *et al.* Microtubule assembly in cultured myoblasts and myotubes following nocodazole induced microtubule depolymerisation. *J Muscle Res Cell Motil*, 2003, **24**(4-6): 301-308
- [32] Baudoin J P, Alvarez C, Gaspar P, *et al.* Nocodazole-induced changes in microtubule dynamics impair the morphology and directionality of migrating medial ganglionic eminence cells. *Dev Neurosci*, 2008, **30**(1-3): 132-143
- [33] Churchill J R, Studzinski G P. Thymidine as synchronizing agent. III. Persistence of cell cycle patterns of phosphatase activities and elevation of nuclease activity during inhibition of DNA synthesis. *J Cell Physiol*, 1970, **75**(3): 297-303
- [34] Darzynkiewicz Z, Halicka H D, Zhao H, *et al.* Cell synchronization by inhibitors of DNA replication induces replication stress and DNA damage response: analysis by flow cytometry. *Methods Mol Biol*, 2011, **761**: 85-96
- [35] Bohnuud T, Beglov D, Ngan C H, *et al.* Computational mapping reveals dramatic effect of Hoogsteen breathing on duplex DNA reactivity with formaldehyde. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(16): 7644-7652
- [36] Lu K, Craft S, Nakamura J, *et al.* Use of LC-MS/MS and stable isotopes to differentiate hydroxymethyl and methyl DNA adducts from formaldehyde and nitrosodimethylamine. *Chem Res Toxicol*, 2012, **25**(3): 664-675
- [37] Moore L D, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 2013, **38**(1): 23-38
- [38] Richardson B C. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. *J Nutr*, 2002, **132**(8 Suppl): 2401S-2405S
- [39] Trezl L, Hullan L, Jaszay Z M, *et al.* Antagonistic reactions of arginine and lysine against formaldehyde and their relation to cell proliferation, apoptosis, folate cycle and photosynthesis. *Mol Cell Biochem*, 2003, **244**(1-2): 167-176
- [40] Gong C X, Iqbal K. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem*, 2008, **15**(23): 2321-2328
- [41] Yan Y, Peng D, Tian J, *et al.* Essential sequence of the N-terminal cytoplasmic localization-related domain of huntingtin and its effect on huntingtin aggregates. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(4): 342-350
- [42] Inoue S, Salmon E D. Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol Biol Cell*, 1995, **6**(12): 1619-1640
- [43] Nie C L, Wei Y, Chen X, *et al.* Formaldehyde at low concentration induces protein tau into globular amyloid-like aggregates *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 2007, **2**(7): e629
- [44] Nie C L, Wang X S, Liu Y, *et al.* Amyloid-like aggregates of neuronal tau induced by formaldehyde promote apoptosis of neuronal cells. *BMC Neurosci*, 2007, **8**: 9
- [45] Hua Q, He R Q. Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept Lett*, 2002, **9**(4): 349-357

The Effect of Formaldehyde on Cell Cycle Is in a Concentration-dependent Manner*

MIAO Jun-Ye^{1,2)}, LU Jing^{1,3)}, ZHANG Zi-Jian^{1,2)}, TONG Zhi-Qian¹⁾, HE Rong-Qiao^{1,3)**}

¹⁾ State Key Laboratory of Brain and Cognitive Sciences, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³⁾ The University of Queensland, Queensland Brain Institute, Qld 4072, Australia)

Abstract A certain concentration of formaldehyde can cause protein misfolding, cell death and biological dysfunction. Though it has been reported that formaldehyde has cytotoxicity, how formaldehyde affects cell cycle of neural cells and the molecular mechanism still needs to be clarified. In this study, neuroblastoma cell line SH-SY5Y was utilized to incubate with formaldehyde and the effect of formaldehyde on cell cycle was in formaldehyde concentration-dependent manner. No significant changes in cell cycle could be detected when $[FA] \leq 0.1$ mmol/L (cells were incubated for 48 h), while the percentages of cells in S phase and G2/M phase were markedly increased with the elevation of formaldehyde concentration ($0.1 \text{ mmol/L} < [FA] \leq 0.2 \text{ mmol/L}$). In the medium with 0.3 mmol/L formaldehyde, 46.28% of cells were in S phase while only 16.05% of them were in G2/M phase, that is, cell proliferation was obviously inhibited under the conditions. When cells were synchronized at G2/M phase, formaldehyde ($0.1 \sim 0.3$ mmol/L) could markedly increase the number of cells in S phase, though, to some extent, the number of cells in G2/M phase decreased. When cells were synchronized at S phase, 0.1 mmol/L formaldehyde could decrease the number of cells in G2/M phase, while 0.3 mmol/L formaldehyde could markedly decrease the number of cells in G2/M phase and significantly increase that in S phase. In the presence of formaldehyde, primary neurons of SD rat exhibited similar changes in cell cycle as that in SH-SY5Y cells. Furthermore, early and late apoptosis was markedly observed when $0.1 \text{ mmol/L} \leq [FA] \leq 0.2 \text{ mmol/L}$, while DNA were obviously damaged and most cells were apoptosis and some of them underwent necrosis when $[FA] \geq 0.3 \text{ mmol/L}$. In sum, formaldehyde at a low concentration ($0.1 \text{ mmol/L} \leq [FA] \leq 0.2 \text{ mmol/L}$) mainly suppresses DNA synthesis in S phase *via* hypermethylation of global DNA, while formaldehyde at a higher concentration ($[FA] \geq 0.3 \text{ mmol/L}$) causes DNA damage, both of them lead to the aberrant effects on cell cycle.

Key words formaldehyde, cell cycle, cell proliferation, cell apoptosis, DNA fracture, formaldehyde scavenger

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00079

*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (973)(2010CB912303, 2012CB911004).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

Received: March 3, 2013 Accepted: May 15, 2013