

肿瘤细胞细胞周期的光谱检测

林晓钢 高 潮 郭永彩

(重庆大学光电技术及系统教育部重点实验室, 重庆 400030)

摘要 通过对肿瘤细胞生长过程中的光谱变化进行研究, 寻求反应其生长变化过程的光学检测方法。根据 Beer-Lambert 定律推知, 在肿瘤细胞的生长变化过程中, 细胞内的蛋白质、核酸等物质的浓度变化会导致其吸收光谱的强度变化。于是采用紫外-可见光分光光度法对肿瘤细胞进行测量, 获取细胞周期各个阶段细胞内部组成成分的光谱表现形式。在获取的紫外-可见光光谱数据中, 可以找到光谱特征峰值随细胞周期的变化规律。实验结果说明紫外可见光光谱方法能够检测到肿瘤细胞细胞周期变化过程中的细胞内特定分子的变化, 为细胞周期的研究提供了新思路。

关键词 医用光学与生物技术; 紫外-可见光光谱; 光谱检测; 肿瘤细胞; 细胞周期

中图分类号 O433.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL200936s2.0227

Spectral Detection on Cell Cycle of Tumor Cells

Lin Xiaogang Gao Chao Guo Yongcai

(*Opto-Electronic Technology and Systems Key Laboratory under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400030, China*)

Abstract The optical detection method which reflects the changes in the tumor cells growth process by researching on their spectra is obtained. According to the Beer-Lambert law, the changes of concentration of molecules such as aromatic amino acid and porphyrin in HeLa cells during the growth process of cell cycle will result in absorption spectra differences. Measuring the ultraviolet and visible absorption spectrum of the tumor cells can obtain the changes of spectrum during the different cell cycle growth phases. The relationship between cell cycle of tumor cells and characteristic peak of spectral curve can be acquired from the ultraviolet and visible absorption spectrum. The changes of intracellular specified molecules during the cell cycle of tumor cells can be detected by UV-visible spectral method. It provides new ideas for cell cycle studies.

Key words medical optics and biotechnology; ultraviolet and visible spectrum; spectral detection; tumor cells; cell cycle

1 引 言

细胞周期是细胞从一次有丝分裂结束开始, 经过物质积累, 到该细胞分裂结束所经历的过程。这一过程周而复始, 可分为几个阶段, 即 G1 期, S 期, G2 期和 M 期。细胞在 G1 期完成必要的蛋白质、脂类、糖类等的合成和准备, S 期完成 DNA 的复制, 在 G2 期为细胞进行有丝分裂做物质和能量的准备, M 期完成细胞的分裂, 将染色体均等地分到两个子细胞中。大量的研究表明细胞周期调控异常是肿瘤发生的主要机制, 因此对细胞周期进行检测分

析, 研究细胞周期的规律对于探索肿瘤发生机制、预防和治疗具有重要的意义。

细胞周期的光学检测方法主要包括光学显微镜观察法, 对 DNA 染色后通过荧光显微镜观察以及流式细胞仪检测法。通过显微镜对细胞的细胞周期进行检测主要是通过观测细胞的形态变化, 从而对细胞周期进行判断。荧光显微镜能够清晰地观察到染色后细胞内 DNA 发出的荧光, 从而对处于细胞周期各阶段的细胞进行判断。利用显微镜观察细胞周期的方法比较直观, 但是费时费力。目前应用最

基金项目: 重庆市自然科学基金(CSTC, 2008BB3159)资助课题。

作者简介: 林晓钢(1975—), 男, 讲师, 博士, 主要从事生命系统相关光学信息测量、分析及机理等方面的研究。

E-mail: xglin@cqu.edu.cn

为广泛的、更为准确且快速的细胞周期分析方法是流式细胞术,它是在对细胞的 DNA 染色后,利用流式细胞仪通过标记物发出荧光的强弱对单个细胞内 DAN 含量的分析,推算出 G0/G1 期(二倍体),S 期(超二倍体),G2/M 期(四倍体)的比例。该方法无法有效地对 G 期和 M 期细胞进行判断,因为细胞在这两期的 DNA 含量都是四倍体。目前在细胞生物学、肿瘤细胞病理分析等领域几乎都采用流式细胞仪进行细胞分析。但是该仪器进行分析不仅价格昂贵,而且调试相当复杂。在对正常生长的细胞进行分析时,后两种方法采用的荧光染剂可能会对细胞造成影响,从而影响测量结果。为了更准确地对生长在自然状态的细胞进行分析,有必要寻求一种对细胞生长过程影响最小,同时又能有效获取细胞在细胞周期不同阶段差异信息的简便高效的光学检测方法。

2 细胞周期光谱检测原理

2.1 生物细胞与光的相互作用

光谱技术是将光学手段与医学生物研究相结合的有力工具,它可以对细胞物质结构进行高灵敏度和高分辨率分析^[1]。光谱检测方法是利用光和物质的相互作用对物质成分进行定性分析和物质在溶液中的浓度进行定量测量。在光谱测量中能够通过谱线的频率位置、强度提供物质分子内部的变化信息,其吸收光频率的变化范围从紫外光到红外光。相应地就可以通过紫外-可见光谱、红外光谱进行相关的分析检测。光谱检测方法灵敏度高、特异性好的特点,使其广泛应用于生物医学、药物分析、食品卫生以及环境检测等诸多领域^[2]。

生物细胞与光的相互作用能够引起光的散射和吸收,在这个作用过程中光被生物细胞的吸收是最主要的事件。生物细胞中,光吸收主要由细胞内的蛋白质、核酸和水分子引起。蛋白质是生物细胞中含量最多的化学物质,构成蛋白质的各种大分子对光有着各自的吸收特性,如芳香族氨基酸对于 240 nm 以上波长的光具有强烈的吸收特性,色素在 280,420,540 和 580 nm 左右吸收峰值波长,蛋白质中的多肽键、二硫化键对光也有吸收。构成核酸的嘌呤和嘧啶的吸收光谱范围在 230~300 nm 之间^[3]。而在光谱红外区的吸收则主要是水分子引起的。

2.2 光谱检测原理

生物细胞在细胞周期的变化过程中,细胞内部的氨基酸、蛋白质、酶和辅酶、核酸等物质都将随着

细胞的生长变化发生巨大的变化^[4]。在细胞周期的不同阶段细胞内部特定蛋白质和核酸的含量肯定会有所差异,灵敏的光谱检测方法可以体现出这种细微的差异。根据上述分析,细胞内部大分子的特征吸收波长大都集中在紫外-可见光波段,于是采用紫外-可见光吸收光谱来对细胞周期不同阶段的样品进行检测。

肿瘤细胞的增殖周期与正常细胞相似,都包括 G1 期,S 期,G2 期和 M 期,其中 S,G2,M 期较短,周期的长短也随 G1 期而异。在细胞周期过程中,G1 期是细胞生长的主要阶段,此期细胞的主要生化活动是合成细胞生长所需要各种蛋白质、糖类、脂质等,为细胞进入 S 期进行必要的物质准备。在 S 期,细胞内主要进行 DNA 的复制、组蛋白和非组蛋白等染色体蛋白的合成。G2 期的主要任务是为 M 期的细胞结构变化做准备,在这个时期细胞合成一定的蛋白质和 RNA。M 期占用的时间最短,但细胞的形态及结构变化最大,这一时相细胞的主要生化特点是 RNA 合成停止、蛋白质合成减少以及染色体高度螺旋化。

从细胞周期变化过程中的生化活动及物质准备情况可以看出在细胞周期各阶段中细胞内蛋白质、脂类以及 RNA 等物质的活动在 S 期达到最高峰,G1 期次之,M 期则最低。根据 Beer-Lambert 定律^[3,5]

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon c l}$$

式中 I_0 和 I 分别为入射光强度和透射光强度, c 表示溶质的浓度, l 表示光程, ϵ 称为摩尔消光系数,以 $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 为单位。由该定律可以推断出 S 期细胞样品的紫外吸收光谱最强,因为在该时相细胞的氨基酸、蛋白质活动表现最为强烈,浓度最大,G1 期次之,M 期最低。

3 实验材料与方法

单个细胞在细胞周期各时相的变化可以在显微镜下进行观测,但是要获取其光谱的变化是相当困难的。本文采用细胞周期同步化的方式将大批细胞同步化于细胞周期的各个时相(G1 期,S 期,G2 期和 M 期),即通过这种方式放大单个细胞内的物质变化,从而通过光谱检测获取处于各时相的细胞群体的光谱表现。

3.1 实验材料

癌细胞:子宫颈癌细胞株(HeLa)购于北京北方伟业公司,由重庆医科大学基础医学研究所负责传

代培养。培养基:RPMI 1640 培养基。试剂:胸苷(Thymidine)和诺考达唑(Nocodazole)均购于Sigma-Aldrich 公司。仪器:37 ℃,5 %CO₂细胞培养箱(型号:YCP2200,上海易亮医疗器械公司生产),双光束紫外可见分光光度计(型号:UV22450,日本岛津公司生产)。所需细胞周期各时相细胞样品采用药物同步化方法获取^[6,7],将培养所得的各期细胞样品用磷酸盐缓冲(PBS)溶液清洗后,用PBS溶液稀释成实验所需浓度。为了保证细胞的活性,在收集完细胞1 h内进行紫外-可见光谱测量。

收获各期细胞后,用美国BD公司生产的大型流式细胞仪FACSVantage SE对各组样品的细胞同步化水平进行测量。测量结果显示正常培养的HeLa细胞中各期细胞的比例为:G1期61.63%,S期27.38%,G2/M期11.00%。同步化培养的各期细胞同步化水平分别为:G1期同步化样品中G1期细胞为85%,S期同步化样品中S期细胞为63.4%,G2期同步化样品中G2期细胞为51.83%,M期同步化样品中M期细胞为48.96%。同正常生长的HeLa细胞进行对比,可以看到,各期样品中该期细胞已占到大多数,能够代表该时相细胞的群体行为。

3.2 紫外-可见光谱测量

分别将各周期Hela细胞悬液样品2 mL(浓度均为 $2.5 \times 10^6/\text{mL}^{-1}$)用移液器移入石英比色皿内,在另一相同的比色皿内装入同量的PBS溶液作为空白,用UV22450分光光度计分别测量同步化后G1期,G2期,S期和M期细胞的吸收光谱,光谱范围190~800 nm,扫描步长1 nm,整个实验过程在室温下进行。

4 分析与讨论

4.1 Hela细胞周期各时相样品的紫外-可见光谱测定

在测定条件完全一致的情况下,测得了Hela细胞各细胞周期样品的紫外-可见光吸收光谱,因细胞样品在400~800 nm范围内无特征峰产生,故在此仅给出190~400 nm光谱,如图1所示。

4.2 讨论

由测量结果可以看出,各周期紫外吸收光谱曲线在190~310 nm波段变化较大,吸收峰主要集中在这一波段,但各周期间存在一定的差别。各周期同步化细胞的光谱曲线的差别主要体现在其吸光度上,其中S期细胞吸光度最强,G1期次之,G2和M

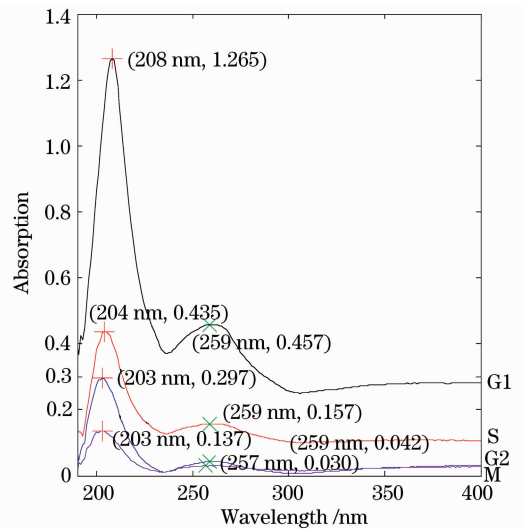


图1 HeLa细胞周期各时相的紫外吸收光谱
Fig.1 UV absorption spectra of HeLa cell in the G1,S,G2 and M phases

期更低,M期细胞吸光度最弱。在190~380 nm波段各细胞周期吸光度强弱也基本按这个顺序排列。这个结果与前面的推断结果基本符合。

从整个光谱来看,HeLa细胞各时相的样品的紫外吸收光谱的吸收峰主要在200~310 nm范围内,由于为天然蛋白质组分的二十种氨基酸在230~310 nm波长范围内大多没有吸收,只有芳香族氨基酸——色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸的吸收光谱在190~220 nm间有一强吸收峰,在250~300 nm间还有吸收峰^[5],这两个范围的吸收峰在各时相的细胞样品吸收光谱中均有体现^[8]。故可以判断204 nm和260 nm附近吸收峰可能是由芳香族氨基酸引起的。

在细胞周期变化过程中S期完成组蛋白和非组蛋白等染色体蛋白的合成,而蛋白质的结构单元是氨基酸。说明HeLa细胞在S期蛋白质的合成过程中形成了相应的助色团,助色团使得生色团的峰位红移,并增加了它们的强度。因为细胞分裂所需的大量蛋白质都是在G1期和S期合成,在G2期仅有少量的蛋白质合成,M期蛋白质合成几乎没有,所以这4个时相的吸收光谱的峰位及吸光度也明确地体现了细胞周期中蛋白质的变化情况。由于在M期细胞的形态和结构变化最大,但从图1的光谱曲线中并未体现出相应的变化,于是可判定吸收光谱几乎不受细胞形态变化的影响。

5 结论

由上述分析可知,HeLa细胞周期各时相变化过程中,细胞内的氨基酸含量变化与细胞周期内相应的

生化活动基本符合,与细胞形态变化几乎无关。子宫颈癌细胞在细胞周期变化过程中蛋白质的紫外可见光吸收特性差异反映了芳香族氨基酸的相应变化,在细胞周期的不同阶段,特征峰的峰值有所不同,其变化规律符合 Beer-Lambert 定律,因此可以通过紫外-可见光谱法来对细胞周期进行检测分析。

参 考 文 献

- 1 Zhao Nanming, Zhou Haimeng. Biophysics [M]. Beijing: Higher Education Press; Heidelberg: Springer Press, 2007
赵南明, 周海梦. 生物物理学[M]. 北京: 高等教育出版社; 海德堡: 施普林格出版社, 2007
- 2 Zhang Zhenxi. Biomedical Photonics New Technology and Application[M]. Beijing: Science Press, 2008. 33~40
张镇西. 生物医学光子学新技术及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2008. 33~40
- 3 Paras N. Prasad. Introduction to Biophotonics[M]. He Sailing Transl. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2006. 138
Paras N. Prasad 著, 何赛灵等译. 生物光子学导论[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2006. 138
- 4 S. Boydston White, T. Gopen, S. Houser *et al.*. Infrared spectroscopy of human tissue. V. Infrared spectroscopic studies of myeloid leukemia (ML-1) cells at different phases of the cell cycle[J]. *Biospectroscopy*, 1999, **5**: 219~227
- 5 Guo Yaojun. Technique of Spectral Photometer and Its Application in Biochemistry [M]. Beijing: Science Press, 1987
郭尧君编著. 分光光度技术及其在生物化学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1987
- 6 M. Pagano. Cell Cycle-Materials and Methods [M]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.
- 7 Gui Jianfang. The RNA Machining and Cell Cycle Control[M]. Beijing: Science Press, 1998. 88
桂建芳. RNA 加工与细胞周期调控[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 88
- 8 Lin Xiaogang, Pan Yingjun, Guo Yongcai *et al.*. UV absorption characteristics of cervical cancer cells cell cycle [J]. *J. Optoelectronics • Laser*, 2009, **20** (1): 130~132
林晓钢, 潘英俊, 郭永彩 等. 癌细胞细胞周期的紫外吸收光谱特性[J]. 光电子 • 激光, 2009, **20**(1): 130~132