

# 癌细胞细胞周期自体荧光光谱特征

林晓钢 潘英俊 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** 为了研究癌细胞自体荧光光谱在细胞周期变化过程中是否发生变化,对同步化培养的宫颈癌细胞(HeLa)在细胞周期各时相(G<sub>1</sub>期,S期,G<sub>2</sub>期和M期)样品的自体荧光光谱进行了测量。测量结果表明,HeLa细胞在细胞周期变化过程中有自体荧光现象存在,其特征荧光峰位于360 nm和680 nm处,且各时相样品的荧光光谱强度各不相同。这些差异说明HeLa细胞在细胞周期变化过程中细胞内荧光物质(含芳香族氨基酸和卟啉)产生了相应的变化从而导致了不同时相的荧光光谱强度的差异。细胞周期各时相的荧光光谱能够反映细胞生长变化过程中芳香族氨基酸和卟啉的变化,可为采用光谱技术对癌细胞生长周期进行研究提供依据。

**关键词** 医用光学与生物技术; 自体荧光光谱; 细胞周期; HeLa细胞

中图分类号 O434.14 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS20092905.1328

## Study on Autofluorescence Spectral Feature for Cancer Cell in Different Stages of Cell Cycle

Lin Xiaogang Pan Yingjun Guo Yongcai

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

**Abstract** In order to study the autofluorescence spectral changes during cancer cell cycle, the autofluorescence spectrum of synchronically cultured HeLa cell in the G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> and M portions of the cell cycle is measured. The results show that there is autofluorescence phenomenon during the cell cycle and the fluorescence intensity in each stage is different. The fluorescence spectrum exhibits the characteristic peaks at 360 nm and 680 nm. The changes of fluorescent molecules (such as aromatic amino acid and porphyrin) in HeLa cells during the cell cycle result in these differences. The fluorescence spectra of different stages reflect the changes of aromatic amino acid and porphyrin in cell during the cell cycle and can be utilized to study the state of the cancer cell cycle.

**Key words** medical optics and biotechnology; autofluorescence spectra; cell cycle; HeLa cell

### 1 引言

细胞周期是细胞生长和分裂的周期,由G<sub>1</sub>期、S期、G<sub>2</sub>期和M期组成,它是细胞全部生理过程的综合体现,普遍存在于高等生物中。癌症则是细胞增殖、分化和凋亡异常引起的以细胞失控性生长和增殖为主要特征的疾病。癌细胞的增殖周期与正常

细胞相似,都包括G<sub>1</sub>期、S期、G<sub>2</sub>期和M期。有许多疾病的发生与细胞周期的异常有关,而细胞周期调控异常仍是癌症发生的主要机制,因此研究细胞周期的规律与调控机制对于探索肿瘤发生机制、预防和治疗具有重要的指导意义<sup>[1~16]</sup>。

细胞可以看作是一个内部不均匀的多性状的系

收稿日期: 2008-08-29; 收到修改稿日期: 2008-10-20

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(90510020),重庆市自然科学基金(CSTC,2008BB3159)和国家大学生创新性实验计划项目(CQUCX-G-2007-32)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分析及机理、测量系统研制方面的研究。

E-mail: xglin@cqu.edu.cn

导师简介: 潘英俊(1948—),男,教授,硕士,博士生导师,主要从事光电测控与传感技术、信息光学理论与应用、微波治疗技术及仪器研制等方面的研究。E-mail: pyj@cqu.edu.cn

统。在细胞周期不同时相中,细胞内部的荧光生色团可能会随细胞内部的物理化学特性的变化(如 pH 值、介电常数、极性、粘度等)而发生相应的变化<sup>[2,3]</sup>。利用自体荧光技术则能非常精确的对荧光团的变化进行跟踪。然而,天然荧光生物分子的种类极为有限,且荧光强度较弱,人们常常采用荧光染料来对生物分子进行标记来进行荧光研究<sup>[17]</sup>。但是,荧光染料的使用往往会带来一定的副作用。为了验证上述假设,研究癌细胞在细胞周期变化过程中的自体荧光变化过程,采取细胞同步化技术使大多数癌细胞处于其细胞周期的同一时相,探测各时相的活体癌细胞群体自体荧光光谱。对细胞周期过程中的细胞的荧光光谱是否发生变化进行分析研究,深入认识癌细胞增殖的本质、发生机制以及变化规律。

应用自体荧光光谱技术对同步化培养后处于各时相的宫颈癌细胞(HeLa)的荧光光谱变化情况进行了研究,对细胞在细胞周期过程中不同时相细胞内的芳香族氨基酸、核酸及其他聚合物大分子的紫外吸收特性进行了有益的探索。目的在于利用光学手段进行细胞周期研究,寻求活体细胞周期各时相的光谱特征,提供细胞生命活动中的光谱变化信息,为更好的认识细胞生长特征,特别是癌细胞的发展规律提供实验依据。

## 2 材料与实验

### 2.1 实验材料

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 Nocodazole 均购于 Sigma-Aldrich 公司。37 °C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(型号: YCP-200, 上海易亮医疗器械公司生产),荧光分光光度计(型号: RF-540, 日本岛津公司生产)。为得到所需细胞样品。采用药物阻断法进行 HeLa 细胞同步化培养<sup>[15,16]</sup>,将培养所得的各期细胞样品用 PBS 溶液清洗后,用磷酸盐缓冲液 PBS 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 内进行荧光光谱测量。

由于本实验对时效性要求较强,故收获细胞后,将各期细胞分出一部分。采用美国 BD 公司生产的大型流式细胞仪 FACS Vantage SE 对细胞同步化水平进行测量,结果显示 G1 期同步化样品中 G1 细胞达到了 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%。从测量结果可以看出各期细胞在其样品中占到了大多数,可以代表该期细胞的群体行为。

### 2.2 自体荧光光谱测量

分别将周期各时相 HeLa 细胞悬液样品 2 ml (细胞数浓度均为  $2.5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ )用移液器移入石英样品池,放入荧光分光光度计的固定架上。在不加任何荧光标记的情况下,测量同步化后 G1 期、G2 期、S 期和 M 期细胞的自体荧光光谱,激发波长选用 290 nm,发射波长扫描范围 300~700 nm。

## 3 结果与讨论

### 3.1 HeLa 细胞周期各时相的荧光光谱测定结果

滤除噪声影响后的 HeLa 细胞各期同步化细胞样品自发荧光光谱曲线如图 1 所示。测量过程中 HeLa 细胞未添加任何荧光染料且处于活体状态。从图 1 中可以看出,HeLa 细胞在细胞周期变化过程中有自体荧光产生,细胞周期各时相的谱图大致相似,其发射峰值均位于 360 nm 和 680 nm 处。随细胞周期变化各时相细胞相对荧光强度各不相同。其中 G1 期细胞样品荧光最强, M 期次之, G2 期细胞荧光强度最弱。

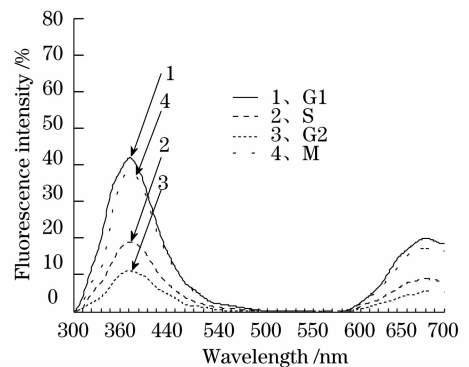


图 1 同步化培养的 HeLa 细胞细胞周期各时相样品荧光谱  
ig. 1 Fluorescence spectra in synchronically cultured HeLa cells in G1 phase, S phase, G2 phase and M phases

### 3.2 讨论

图 1 的光谱曲线说明在 HeLa 细胞的细胞周期变化过程中细胞内的荧光物质产生了自体荧光,其峰值为 360 nm 和 680 nm。360 nm 处荧光峰的存在与色氨酸的 350 nm 的最大峰值相当接近<sup>[5,6]</sup>。其原因可能是 HeLa 细胞内部环境的极性变化造成了峰值的红移,故可判断该峰可能是细胞中含色氨酸的蛋白质造成。正常的细胞成分中几乎没有峰值达到 680 nm 的的荧光物质,故可以判断该处的峰

值是癌细胞中所特有的<sup>[7~14]</sup>。肿瘤组织中的自体荧光现象是1924年Policard首先在实验中观察到的,并认为这种现象是肿瘤内的内源性卟啉化合物引起,这一现象为许多研究者所证实。Maria Helena Bellini等通过肾细胞癌自体荧光测量,在630 nm和680 nm附近探测到癌细胞的特征荧光峰,认为其自体荧光是癌组织内的内源性卟啉化合物受激发产生<sup>[3,5]</sup>。杨远龙等认为癌组织的特征荧光峰是由生物体内的内源性卟啉产生,并已在630 nm及690 nm附近测得癌细胞荧光峰,与卟啉的特征荧光峰符合,而正常组织中则没有这种波长的荧光峰<sup>[13,14]</sup>。郑蔚、谢树森等<sup>[12]</sup>也在癌组织中测得过685 nm的荧光峰,D. M. Harris等<sup>[4]</sup>认为该荧光峰的出现可能与因癌组织的新陈代谢变化或微生物合成而产生的内源性卟啉有关。连少辉等<sup>[7,8]</sup>通过光导纤维直接对宫颈癌进行扫描探测,测得宫颈癌在420 nm和630 nm左右出现两个特异荧光峰,认为宫颈癌的发光与卟啉有关。连少辉等<sup>[9]</sup>还采取模拟方法,用337和365 nm波长光,激发在紫外发荧光的牛血清白蛋白(BSA)和原叶琳(PP)复合物的溶液,观测到BSA-PP复合物的敏化荧光特性与曾堃等<sup>[10]</sup>选择420 nm左右和640 nm左右为诊断癌的特征峰基本相符。在365 nm光激发下,与杨远龙等所选择630 nm和690 nm左右为诊断癌的特征峰也基本相符。根据以上叙述,由于HeLa细胞也是子宫颈癌细胞,故在680 nm处的荧光峰可能是由HeLa细胞内的内源性卟啉引起。由以上讨论可知,细胞样品的两个特征峰值充分说明HeLa细胞的荧光可能是卟啉和蛋白的复合物的荧光,其中蛋白的荧光主要是由色氨酸引起。

图1中HeLa细胞不同时相的样品的自体荧光强度上存在差别,其中G1期细胞样品荧光最强,M期次之,S期细胞荧光强度最弱。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。故在该阶段细胞内荧光物质(色氨酸蛋白质、卟啉)浓度最高,使其荧光强度最强;G2期的主要任务是为M期的细胞结构变化做准备,在这个时期细胞内的蛋白质形成以及相应的生化反应导致了荧光的淬灭,使该期样品的荧光强度最低;M期占用的时间最短,细胞开始分裂为两个子细胞,子细胞内部组成基本稳定,这一时相细胞的自体荧光强度接近G1期水平。根据以上分析,细胞周期各时相样品的荧光强度变化与细胞生长周期造成的荧光物

质浓度变化基本符合,其峰值变化趋势如图2所示。从G1期到G2期荧光峰值逐渐降低,到M期荧光峰值强度又逐渐增加。在360 nm和680 nm处荧光峰值强度均按此规律变化,该规律反映了HeLa细胞在细胞周期变化过程中细胞内荧光物质的变化趋势。

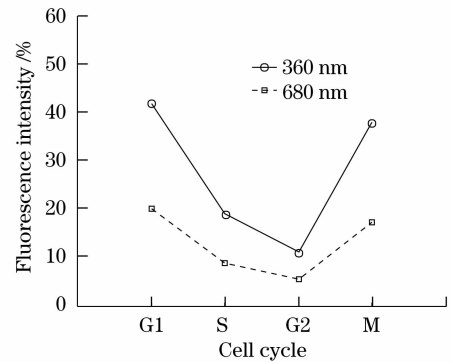


图2 HeLa细胞周期与其荧光光谱峰值关系  
Fig. 2 Relationship between cell cycle and peak value of fluorescence spectra

## 4 结 论

子宫颈癌细胞HeLa在细胞周期变化过程中有自体荧光产生,且细胞周期各时相的自体荧光特性差异反应了细胞内色氨酸和卟啉的相应变化。因此可以通过HeLa细胞自体荧光光谱的吸收峰和吸光度特征对HeLa细胞的生长过程进行分析研究,对细胞周期进行深入的了解。本文的实验提供了癌细胞细胞周期各时相中荧光物质变化的光谱表现,将光谱技术和细胞生命活动结合起来,提供了一种简便准确研究细胞周期新方法。

## 参 考 文 献

- Song Jindan. *Medical Cellular Biology*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004, 259~283  
宋今丹. *医学细胞生物学*[M]. 北京:人民卫生出版社,2004. 259~283
- L Cercek, B Cercek, C H Ockey. Fluorescein excitation and emission polarization spectra in living cells; changes during the cell cycle[J]. *Biophysical J.*, 1978, **23**: 395~405
- Maria Helena Bellini, Enia Lúcia Coutinho, Lilia Coronato Courrol *et al.*. Correlation between autofluorescence intensity and tumor area in mice bearing renal cell carcinoma[J]. *J. Fluorescence*, 2008, **18**(6):1163~1168
- D. M. Harris, J. Weekhaven. Endogenous porphyrin fluorescence in tumours[J]. *Lasers Surg. Med.*, 1987, **7**:467~472
- Ramanujam N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues[J]. *Neoplasia*, 2000, **2**(1-2):89~117
- Guo Yaojun. *Technique of Spectral Photometer and Its Application in Biochemistry*[M]. Beijing: Science Press, 1987, 123~133

- 郭尧君. 荧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, 123~133
- 7 Lian Shaohui, Yang Shizhen, Lin Wei *et al.*. Preliminary study of the cancerous autofluorescence of uterine cervix and its molecular base[J]. *Chin. J. Quant. Electron.*, 1995, **12**(2): 174~177
- 连少辉, 杨士珍, 林威等. 宫颈癌固有荧光及其分子基础探讨研究[J]. 量子电子学报, 1995, **12**(2): 174~177
- 8 Lian Shaohui, Yang Shizhen, Lin Wei *et al.*. Studies on the interaction between proteins and porphyrins approach to the shining mechanism of malignant tumors[J]. *J. Optoelectronics • Laser*, 1999, **10**(2): 145~147
- 连少辉, 杨士珍, 林威等. 蛋白质与卟啉相互作用的研究—肿瘤发光机理的探讨[J]. 光电子·激光, 1999, **10**(2): 145~147
- 9 Lian Saohui, Jiang Shoupin, Zhang Yu. Energy transfer between protein and porphyrin—study on autofluorescence of malignant tumours [J]. *Chinese J. Lasers*, 1990, **17**(4): 241~245
- 连少辉, 江寿平, 张宇. 蛋白质和卟啉之间的能量转移—癌固有荧光的研究[J]. 中国激光, 1990, **17**(4): 241~245
- 10 Zeng Kun, Yu Zhenfen, Wu Jinrong *et al.*. The information of electrons, photons and cancer[J]. *Nature Magazine*, 1989, **12**(7): 522~528
- 曾堃, 虞震芬, 吴金荣等. 电子、光子与癌的信息[J]. 自然杂志, 1989, **12**(7): 522~528
- 11 Chen Xiaodong, Yu Daoyin, Xie Hongbo *et al.*. Reconstruction of tissue autofluorescence spectra by monte-carlo modeling[J]. *Acta Optica Sinica*, 2003, **23**(5): 612~615
- 陈晓冬, 郁道银, 谢洪波等. 蒙特卡罗模拟重建组织的自体荧光光谱[J]. 光学学报, 2003, **23**(5): 612~615
- 12 Zheng Wei, Huang Zhiwei, Xie Shusen *et al.*. Intrinsic microscopic fluorescence and imaging of human lung tissues[J]. *Chinese J. Lasers*, 2001, **A28**(7): 669~672
- 郑蔚, 黄志伟, 谢树森等. 人肺组织内源性显微荧光特性研究[J]. 中国激光, 2001, **A28**(7): 669~672
- 13 LI Zhongming, WANG Meiwan. Fluorescence spectrum technique and their applications in cancer tumor diagnosis[J]. *J. Xianning Teachers College*, 2003, **23**(6): 84~88
- 李忠明, 汪美完. 荧光光谱技术及其在癌肿瘤诊断中的应用[J]. 咸宁学院学报, 2003, **23**(6): 84~88
- 14 Yang Yuaniong, Ye Yanming, Li Yufen *et al.*. Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and the exploration of its origin[J]. *J. Fudan University*, 1986, **25**(1): 90~95
- 杨远龙, 叶衍铭, 李郁芬等. 恶性肿瘤特征自体荧光的来源以及在诊断中的应用[J]. 复旦学报(自然科学版), 1986, **25**(1): 90~95
- 15 M. Pagano. *Cell Cycle-Materials and Methods*[M]. Zhang Shifu Transl. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996, 85~100
- 帕格鲁. 细胞周期-材料和方法[M]. 张世馥译. 北京: 人民卫生出版社, 1996, 85~100
- 16 Gui Jianfang. *The RNA Machining and Cell Cycle Contral*[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
- 17 Liu Aiping. *Fluorescence Principles and Practice for Cell Biology*[M]. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 2007, 15~17
- 刘爱平. 细胞生物学荧光技术原理和应用[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2007, 15~17