

含羞草素对肝癌细胞 QGY-7703 周期同步化的作用

赵雪芹¹,任磊²,王大巾¹,张永明¹,陶斯杰¹

(1. 浙江理工大学生命科学院,杭州 310018;2. 厦门大学材料学院,福建厦门 361005)

摘要:恶性肿瘤是严重威胁人类健康的疾病之一。肿瘤的发生发展本质上就是细胞无限制的周期性生长、增殖和分化的失调。细胞同步化是研究肿瘤发生发展及治疗的基础。实验以人肝癌 QGY-7703 细胞株为研究对象,考察含羞草素阻断对周期同步化的作用。并与胸腺嘧啶脱氧核苷阻断法相对照,研究含羞草素阻断去除后对 QGY-7703 细胞周期的影响。结果显示:QGY-7703 细胞在含羞草素阻断后释放的第 10 h 进入 S 期,第 20 h 进入 G2/M 期,且最高同步率分别为 G1 期 94.6%,S 期 86.0%。含羞草素能较好地使肝癌细胞株 QGY-7703 同步化于 G1 期和 S 期。

关键词:含羞草素;肝癌细胞;细胞周期;同步化

中图分类号:TS195.644 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-3851(2016)04-0620-05 **引用页码:**070701

0 引言

肝癌是全球最常见的五种恶性肿瘤之一。我国原发性肝癌发病人数占全球的 55%,死亡人数占 45%。虽然目前以外科手术、放疗、化疗为主的肝癌基本治疗手段取得了一定发展,但由于肿瘤细胞对化、放疗耐受等问题,其疗效甚微。研究发现,肿瘤组织中生长着不同周期时相的肿瘤细胞。绝大多数化疗药物与放疗手段对肿瘤细胞的杀伤作用依赖于细胞周期特异性。喜树碱、丝裂霉素、氮芥、氟尿嘧啶为 S 期特异性^[1-3],而长春新碱、泰素和放疗具有 G2/M 期特异性^[4]。如何安排放、化疗的时程,最大化治疗效果,仍是临床上有待解决的问题。

细胞同步化是研究肿瘤发生发展及治疗的基础。同步化后再使用放疗或化疗药物作用于肿瘤,能够起到协同增效作用。沙利度胺能够增强 X 射线对胶质瘤 U251 细胞敏感性^[5]。姜黄素显著提高人前列腺癌、胃癌细胞株 SGC-7901 与直肠癌的放疗敏感性^[6-8]。曲智锋等^[9]利用多西他赛联合奥沙利铂同步化放疗局部晚期非小细胞肺癌,提高了

临床治疗效果。此外,王雪卿等^[10]发现同步化能加强紫杉醇对肿瘤细胞的作用效果以及逆转其耐药性。故此,利用同步化试剂,合理安排放疗、化疗的时程,能达到最佳治疗效果。

含羞草素(L-mimosine)是从含羞草或银合欢中提炼的植物氨基酸。它具有与胸腺嘧啶高度相似的化学结构,可竞争性地与腺嘌呤结合^[11-12],从而阻碍 DNA 的合成,使细胞阻滞在 G1/S 点。研究表明含羞草素能将 PC-3 细胞阻滞在 G1 期,LNCaP 细胞阻滞在 S 期^[13]。同时,含羞草能够抑制 K562,7402 等多种肿瘤细胞生长,并可其诱导凋亡^[14-15]。鉴于此,本研究以含羞草素作为 DNA 合成抑制剂,从细胞周期角度出发,探讨肝癌细胞 QGY-7703 对含羞草素的敏感性,并对比胸腺嘧啶脱氧核苷(简称胸苷)阻断法,研究含羞草素阻断去除后对 QGY-7703 细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

RPMI-1640 培养基、胎牛血清、双抗和胰酶为美国 Hyclone 公司产品。含羞草素(L-mimosine,

收稿日期:2015-09-07

基金项目:国家自然科学基金项目(31400797);浙江省自然科学基金项目(LQ14C100001);浙江省科技厅分析测试项目(2015C37031)

作者简介:赵雪芹(1983-),女,河南平顶山人,博士,主要从事肿瘤治疗方面的研究。

AR)购于美国 Acros Organic 公司。胸腺嘧啶脱氧核苷(TdR, AR)、碘化丙啶(PI, AR)、曲拉通 X-100 (Triton X-100, AR)和胰核糖核酸酶(RNaseA)为美国 Sigma 公司产品。流式细胞仪为美国 BD 公司 FACS Vantage SE 型产品。QGY-7703 细胞株为本室保存的,来源于上海细胞库的细胞。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养

将肝癌细胞株 QGY-7703 接种于 RPMI-1640 培养基(含 100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素和 10%胎牛血清)。于 37℃,5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养。48~72h 传代 1 次。

1.2.2 细胞同步化方法

a) 含羞草素阻断法:用含 300 μM 含羞草素的培养液培养 24h,弃去培养液,PBS 清洗 2 次除去残余药物,换正常培养基继续培养若干小时,以流式细胞术(FCM)检测药物去除后细胞的同步化程度。

b) 胸苷单阻断法:加入含 2 mM 胸苷的 1640 培养液处理 24h 后,除去培养液,PBS 清洗数次,再将细胞放在含有 10%小牛血清的 1640 培养液中继续培养设定时间。每隔 2h 收集细胞。收集的细胞用 PBS 洗涤后以预冷的 70%乙醇固定细胞,放置于 4℃冰箱过夜。

1.2.3 细胞周期检测

用 FCM 检测 QGY-7703 细胞不同时相的 DNA 含量。向收集的各组样本中,加入 2 mL 预冷的 70%乙醇固定细胞过夜。检测前,离心去乙醇,PBS 清洗后加入 0.5 mL 碘化丙啶染料(50 μg/mL PI, 100 μg/mL RNaseA, 0.2% Triton-100),室温避光染色 30 min,收集碘化丙啶荧光信号。使用 CellQuest 软件分析细胞各周期时相比率。

2 结果分析

2.1 含羞草素作用后细胞同步化结果

本实验将含羞草素作用于人肝癌 QGY-7703 细胞株,研究其对 QGY-7703 细胞株的同步化作用效果。以 FCM 检测 DNA 荧光标识细胞各时相的变化。

单次含羞草素阻断后各时点的流式图见图 1。从图 1 可看出:含羞草素同步化处理后的绝大部分细胞被阻断在预期的时相,而未加药物处理的对照组细胞中处于预期时相的细胞比例较低,大多数处于非同步化生长状态。又由图 1(a)知,未同步化的 QGY-7703 细胞各时相分别为 G1 期占 65.8%,S 期占 20.7%,G2/M 期占 12.7%。通过计算可得出:细胞 G1 期时长为 13.2 h, S 期为 4.1 h, G2/M 期为 2.5 h。

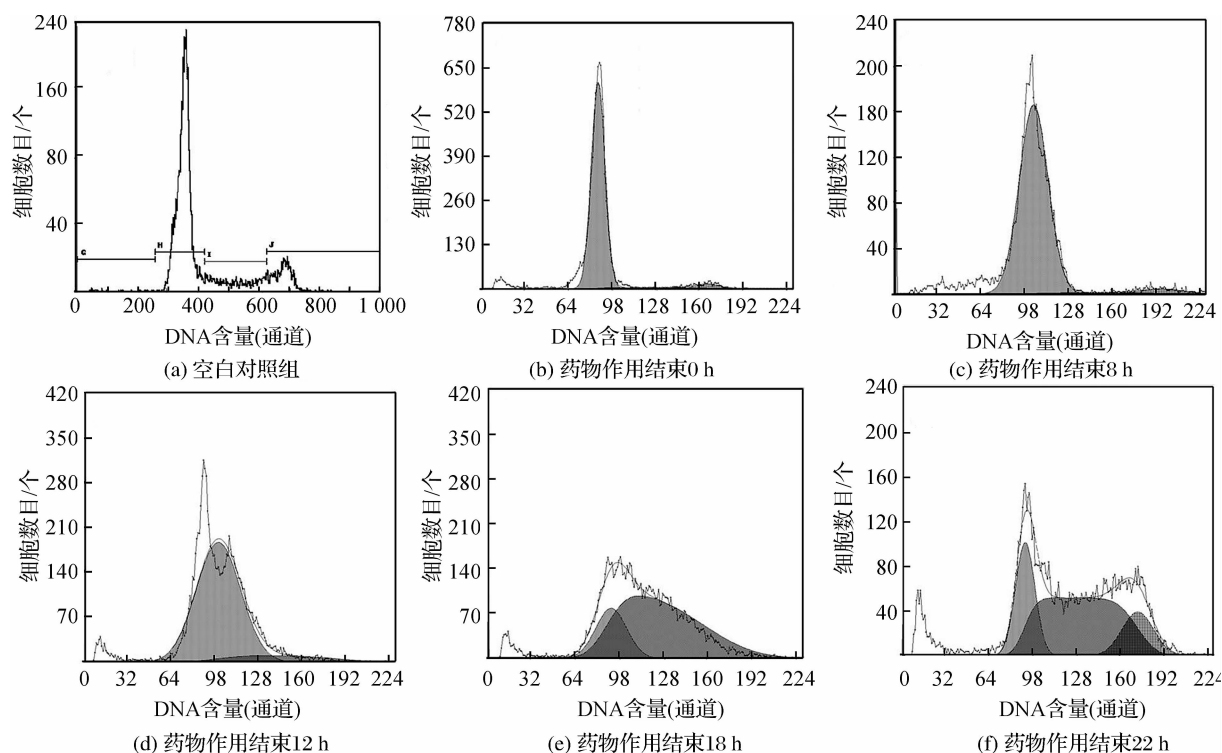


图1 含羞草素作用 QGY-7703 细胞后不同时点的流式周期分布

为了便于观察各周期时相的变化规律,将多次同步化结果汇总成图 2。可发现:含羞草素处理细

胞 24h 后,各周期时相所占的百分率依次由少量向高峰过渡。在含羞草素作用结束后的第 0h, G1 期

与S期细胞比率占到总数的90%,这说明大多数QGY-7703细胞被阻断在G1期末(图1(b));继续培养8h后,G1期细胞逐渐减少,S期细胞逐渐增多,第8h细胞G1期达到最大值,为96.4%(图1(c)),并在第0~10h内保持80%以上同步率;第20h细胞S期达到最大值为82.9%;随后G2/M期细胞逐渐增加。这表明含羞草素能够可逆的作用于QGY-7703细胞,并可获得同步化效果较好的G1期和S期细胞。此外,由含羞草素处理后的G1期曲线可发现,G1期最高值94.6%与最低值7.9%分别出现在去除药物后的第8h和第20h,相差12h,与未同步化的G1期时长(13.2h)相似。并且,各曲线在20h处,均出现拐点,推测含羞草素基本不影响QGY-7703细胞周期总时长。

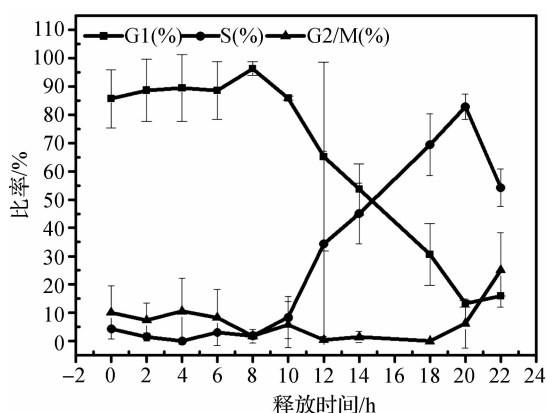


图2 含羞草素阻断后细胞周期分布

2.2 胸苷作用后细胞同步化结果

胸苷是DNA的特异前体,氚标记胸苷渗入法是目前常用的细胞增殖检测方法。故此,本研究采用胸苷阻断后QGY-7703细胞各时相的变化来对比研究含羞草素的作用效果。

胸苷处理后(图3),在前8h内G1期细胞逐渐减少,S期细胞逐渐增多,第8h细胞G1期达到最

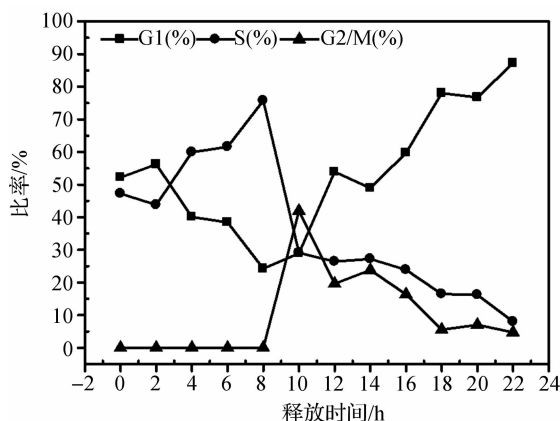


图3 胸腺嘧啶脱氧核苷阻断细胞周期分布

小值29.0%,S期达到最大值75.7%;随后G2/M期细胞逐渐增加,第10h细胞G2/M期达到最大值为41.9%。此外,细胞G1期的两个峰值分别为2h的52.2%和22h的87.2%,两峰值间隔20h,表明实验条件下该细胞周期约为20h。G2/M期曲线8~12h出现峰,推测G2/M期时长4h。S期曲线2~10h出现峰,推测S期时长8h。与按空白细胞推测的各期时间长度不同(图1a),可能是细胞种植密度过大,接触抑制造成G1期延长。

含羞草素与胸苷都是通过调控细胞G1/S时点将细胞阻滞于G1期末,但由图3、图2中的G1期曲线可发现:胸苷组在第2h开始减少(图3,G1期2h处);而含羞草素处理的在第8h开始减少(图2,G1期8h处),相较于胸苷组延后6h。同样,对比两种药物处理组的S期曲线,可发现:胸苷组在第8h开始减少(图3,S期8h处);而含羞草素处理的在第20h开始减少(图2,G1期20h处),相较于胸苷组延后12h。则含羞草素使QGY-7703细胞S期延后6h。Park等^[16]发现含羞草素可使人宫颈癌Hela细胞株的S早期延后4h。故此推测,本实验条件下QGY-7703细胞对含羞草素的作用敏感,用药后细胞进入正常周期的时间延后6h,且S早期也延后6h。

3 讨论

肿瘤的发生发展本质上是细胞周期的失调。大部分抗肿瘤药物具有细胞周期特异性。同步化是研究细胞周期调控与药物特异性作用最重要的方法。

细胞分裂是细胞最基本的生理活动。细胞周期的运行遵循着严格的时相次序。体外培养细胞根据细胞来源不同选用不同阻断方法是细胞停止在细胞周期的某一时相。目前报道的主要有血清饥饿、药物抑制、低温、照射、机械振动收集分裂细胞等^[17]。其中,药物阻断法是体外培养细胞人工同步化最常用的方法。该阻断法要求对细胞周期的阻断是可逆的,即去除药物加入培养基后细胞仍可正常生长。

目前应用最多的合成抑制剂是胸苷^[16-17]。白瑞霞等^[18]通过胸苷阻断人肝癌细胞株HepG2获得了同步率60%以上的G1期和G2期。胸苷阻断法的优点是细胞同步化效率高,且适用于任何体外培养的细胞体系,缺点是容易造成细胞的不均等生长。含羞草素与胸腺嘧啶具有高度相似性化学结构,可竞争性地与腺嘌呤结合,将细胞同步于G1晚期,并且研究表明含羞草素对多种肿瘤细胞有抑制作用,可作为放

射增敏剂增加对肿瘤的疗效^[19-22]。本实验条件下,含羞草素不仅能同步肝癌细胞 QGY-7703,而且获得的高 G1 期同步率(80%以上)能够持续 10h,这将便于应用于耗时较长的生物物理方面的研究。

4 结 论

a)QGY-7703 细胞在阻断结束后第 0~10h 内 G1 期的同步率均维持在 80%以上,第 10h 进入 S 期,第 20h 进入 G2/M 期。

b)可实现的 G1、S 期最高同步率分别为 94.6% 和 86.0%。且同步率稳定可靠。

c)含羞草素能造成 QGY-7703 细胞 G1 期阻滞,并可使 S 期延后 6 h。

参考文献:

- [1] GORCZYCA W, GONG J, ARDELT B, et al. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents[J]. *Cancer Research*, 1993, 53(13): 3186-3192.
- [2] 罗贤雯,刘仁刚,周洁萍,等.高温阻滞 HeLa 细胞于 G1 期并引起 G1 期细胞凋亡[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2005, 34(1): 17-19.
- [3] 王昱,卢仲毅,许峰,等.羟基脲对体外 HeLa 细胞周期同步化作用的研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39: 3331-3332.
- [4] 张鹏.化疗药物细胞周期特异性的重新评估[D].武汉:华中科技大学,2006.
- [5] 于静萍,孙美玲,孙苏平,等.沙利度胺增强 X 射线对胶质瘤 U251 细胞辐射敏感性机制的研究[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2010, 6: 368-372.
- [6] ZHU H P, ZHANG Q A, MU S U, et al. Experimental study on sensibility of radiotherapy for human prostate cancer cell lines PC-3 with curcumin[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2014, 24(18): 27-30.
- [7] 吴宏,闫国诚,王双全,等.姜黄素对胃癌细胞放疗增敏作用的研究[J]. *陕西医学杂志*, 2014(2): 137-139.
- [8] 王东,裘建明,杨关根,等.姜黄素对直肠癌细胞放疗增敏的机制研究[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2015, 18(6): 602-605.
- [9] 曲智锋,王培,穆双锋,等.多西他赛联合奥沙利铂同步化放疗治疗局部晚期非小细胞肺癌临床观察[J]. *医药论坛杂志*, 2010, 18: 40-42.
- [10] 王雪卿,尹婕,毛宁,等.细胞周期同步化逆转卵巢癌对紫杉醇耐药的研究[J]. *现代妇产科进展*, 2009, 18(2): 109-112.
- [11] KUBOTA S, FUKUMOTO Y, ISHIBASHI K, et al. Activation of the pre-replication complex is blocked by mimosine through reactive oxygen species-activated ATM without DNA damage[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(9): 5730-5746.
- [12] MLADENOV E, ANACHKOVA B. DNA breaks induction by mimosine [J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2014, 58(9-10): 732-735.
- [13] CHUNG L C, TSUI K H, FENG T H, et al. L-Mimosine blocks cell proliferation via upregulation of B-cell translocation gene 2 and N-myc downstream regulated gene 1 in prostate carcinoma cells [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2012, 302(4): C676-C685.
- [14] HE X J, GONG J P, SHEN Y, et al. Roles of roscovitine and minosine in Fas-mediated leukemia cell apoptosis and the possible mechanism [J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2008, 15(5): 464-469.
- [15] QIAO S, MURAKAMI K, ZHAO Q, et al. Mimosine-induced apoptosis in C6 glioma cells requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and p38, JNK activation [J]. *Neurochemical Research*, 2012, 37(2): 417-427.
- [16] PARK S Y, IM J S, PARK S R, et al. Mimosine arrests the cell Cycle prior to the onset of DNA replication by preventing the binding of human Ctf4/And-1 to chromatin via Hif-1 α activation in HeLa cells [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(4): 761-766.
- [17] 高世勇,曲笑莹.细胞周期同步化研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(1): 17-21.
- [18] 白瑞霞,王文礼,李丽梅. TdR 诱导肝癌细胞株 HepG2 细胞周期同步化的效果[J]. *科学技术与工程*, 2008, 8(1): 164-165.
- [19] VACKOVÁ I, ENGELOVÁ M, MARINOV I, et al. Cell cycle synchronization of porcine granulosa cells in G1 stage with mimosine [J]. *Animal Reproduction Science*, 2003, 77(3-4): 235-245.
- [20] LI H, ZHAO W, SHI Y, et al. Retinoic acid amide inhibits JAK/STAT pathway in lung cancer which leads to apoptosis [J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(11): 8671-8678.
- [21] ZALATNAI A. Review: potential role of cell cycle synchronizing agents in combination treatment modalities of malignant tumors [J]. *Vivo*, 2005, 19(1): 85-91.
- [22] DIPEV V, GOTARDO A T, HARAGUCHI M, et al. Mimosine and cyclophosphamide: a potential new combination therapy used to prevent tumor development [J]. *Brazilian Archives of Biology & Technology*, 2012, 55(6): 871-876.

Cycle Synchronization of Human Hepatoma Cell QGY-7703 Induced by L-mimosine

ZHAO Xueqin¹, REN Lei², WANG Dajin¹, ZHANG Yongming¹, TAO Sijie¹

(1. College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Cancer is one of diseases which severely threaten human health. In essence, tumorigenesis and tumor progression result from a disorder of unlimited periodic growth, proliferation and differentiation of cells. Cell synchronization is the foundation of researches on tumorigenesis, tumor progression and treatment. Here, we investigated the effect of L-mimosine blocking on cycle synchronization by taking human hepatoma cell QGY-7703. Furthermore, compared with thymidine blocking, the effect of L-mimosine blocking removal on cell cycle of QGY-7703 cells was investigated. The results show that QGY-7703 cells enter Sphase at the 10th hour and enter G2/M phase at the 20th hour after release from the L-mimosine. The highest synchronization rate is 94.6% in G1 phase and 86.0% in S phase cells. In conclusion, QGY-7703 cell can be successfully synchronized in G1 phase and S phase by the L-mimosine treatment.

Key words: L-mimosine; human hepatoma cell; cell cycle; synchronization

(责任编辑: 许惠儿)