



# 宫颈癌 HeLa 细胞株高纯度同步化模型的建立与分析

奚银银<sup>1</sup>, 任磊<sup>2</sup>, 赵雪芹<sup>1</sup>

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

**摘要:** 利用药物抑制法, 采用胸苷、含羞草素、秋水仙碱和羟基脲阻断或两种试剂共同阻断 HeLa 细胞, 去除药物后正常培养细胞, 根据流式细胞术确认细胞在不同时间点的细胞周期情况, 建立宫颈癌 HeLa 细胞株 G<sub>1</sub>、S 和 G<sub>2</sub>/M 期高纯度的同步化模型。药物阻断实验结果表明: 胸苷和羟基脲顺序阻断后释放可获得 90.0% 以上 S 期细胞; 胸苷和秋水仙碱顺序阻断后释放可获得 96.0% 的 G<sub>1</sub> 期和 99.0% 的 G<sub>2</sub>/M 细胞; 胸苷单阻断也可获得持续 8 h 高于 85.0% 的 G<sub>1</sub> 同步率。此外, 细胞种植密度从 10<sup>5</sup> 个/mL 提高到 10<sup>7</sup> 个/mL, G<sub>1</sub> 期百分比也由 50.0% 提高至 75.0%。宫颈癌 HeLa 细胞株高同步率模型可以通过以下方式建立: 高 S 期细胞可通过胸苷和羟基脲顺序阻断实现; G<sub>2</sub>/M 细胞可通过胸苷和秋水仙碱顺序阻断后释放获得; 高 G<sub>1</sub> 期细胞可通过胸苷和秋水仙碱顺序阻断或胸苷单阻断实现, 接触抑制对提高 G<sub>1</sub> 期的比率影响要大于血清饥饿。

**关键词:** 宫颈癌 HeLa 细胞; 细胞周期; 同步化; 羟基脲; 秋水仙碱

中图分类号: TS195.644

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2019)05-0387-06

## Establishment and analysis of high-purity synchronization model of HeLa cell strain

XI Yinyin<sup>1</sup>, REN Lei<sup>2</sup>, ZHAO Xueqin<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;  
2. College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** One or two of reagents (thymidine, hydroxyurea, L-mimosine and colchicine) were used to interdict HeLa cells by drug inhibition method. Then, the cells were cultured normally after the drug removed. Cell cycle at different time was tested by flow cytometry, and high-purity synchronization model of HeLa cell strain in the phases of G<sub>1</sub>, S and G<sub>2</sub>/M was established. The results showed that above 90.0% of cells in S phase could be obtained by thymidine and hydroxyurea interdiction sequentially. 96.0% of cells in G<sub>1</sub> phase and can 99.0% of cells in G<sub>2</sub>/M phase could be obtained by thymidine and cochicine interdiction sequentially. In addition, over 85.0% of G<sub>1</sub> synchronous rate which could last for 8 h could be gained only by thymidine interdiction. Besides, cell seeding density increased to 10<sup>7</sup>/mL from 10<sup>5</sup>/mL, and the percentage of G<sub>1</sub> phase also rose to 75.0% from 50.0%. High-purity synchronization model of HeLa cell strain can be established through the following method: the cells in S phase could be achieved through thymidine and hydroxyurea interdiction; the cells in G<sub>2</sub>/M phases could be achieved by thymidine and cochicine interdiction sequentially. The cells in G<sub>1</sub> phase could be achieved by thymidine and cochicine interdiction sequentially or single thymidine interdiction. The influence of contact inhibition on improvement of G<sub>1</sub> phase was greater than that of serum starvation.

**Key words:** HeLa cell; cell cycle; synchronization; hydroxyurea; colchicine

收稿日期: 2019-01-11 网络出版日期: 2019-03-30

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY18C100002); 国家自然科学基金项目(81171448)

作者简介: 奚银银(1993-), 女, 安徽霍山人, 硕士研究生, 主要从事生物材料方面的研究。

通信作者: 赵雪芹, E-mail: zhaoxueqin2004@163.com

## 0 引言

肿瘤恶性程度与细胞周期密切相关,并且不同周期时相的肿瘤细胞对药物和环境条件的敏感程度也不同<sup>[1]</sup>。如喜树碱、阿糖胞苷和丝裂霉素等主要诱导S期细胞凋亡,氮芥、高温引起G<sub>1</sub>期细胞凋亡,而γ射线主要诱导G<sub>2</sub>/M期细胞凋亡<sup>[2]</sup>。基因转染效率以及物质的内吞作用也与不同周期时相的细胞的敏感性有关<sup>[3-4]</sup>。如S期的CHO细胞有助于提高聚乙烯亚胺的转染效率<sup>[5]</sup>;逆转录病毒在分裂期胃癌细胞株SGC-7901的转染效率可达100.0%<sup>[6]</sup>;纳米二氧化钛、量子点也在分裂期细胞内转化效率较高<sup>[7-8]</sup>。因此,制备高度同步化肿瘤细胞模型,可为研究肿瘤周期治疗以及纳米材料毒理学评估提供实验依据。

由于肿瘤组织中的细胞是处于不同的生长时期,对细胞进行同步化可以使组织中的细胞处于同一时期,进而可以更为有效的治疗肿瘤<sup>[9]</sup>。细胞同步化是研究肿瘤机理与治疗的基础。细胞的增殖分裂是其最基本的生理活动。处于不同周期的细胞,其生化、形态、机械特征均不同<sup>[10]</sup>。经同步化处理后可以收集处于特定时相的细胞,并且可以进一步研究处于特定时相细胞的基因表达谱、生化和代谢特点<sup>[11]</sup>。良好的细胞同步化模型,是深入研究细胞周期发生变化及调控机理的关键环节。体外培养的人工同步化细胞已广泛应用于细胞动力学以及药物对细胞周期阻滞等方面的研究<sup>[12]</sup>。药物抑制法是常用的细胞同步化方法,既要求阻断药物能获得同步化水平较高的各期细胞,又要对细胞损伤小<sup>[13]</sup>。

宫颈鳞状细胞癌是常见于发展中国家妇女的恶性肿瘤。人宫颈癌HeLa细胞株是普遍使用的实验细胞。目前主要采用胸苷<sup>[14]</sup>、羟基脲<sup>[15]</sup>、诺考达唑等药物阻断以及血清饥饿法对其进行同步化<sup>[16-17]</sup>。无血清培养44h虽可获得90.0%以上高纯度G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞,但凋亡细胞达10.0%~20.0%<sup>[18]</sup>。而诺考达唑对G<sub>2</sub>/M期同步率低于60.0%<sup>[19]</sup>,胸苷与羟基脲阻断也都存在着S期细胞纯度不高的问题。

本课题组采用含羞草素对肝癌细胞QGY-7703细胞周期进行阻断,发现含羞草素期阻滞,且可获得G<sub>1</sub>期高同步率(80.0%以上)持续10h,并可使S期延后6h,可应用于耗时较长的生物物理方面的研究<sup>[20]</sup>。本文采用一种或两种试剂进行顺序阻断细胞周期,以人宫颈癌HeLa细胞株为研究对象,含羞

草素、胸苷和秋水仙碱、羟基脲进行细胞周期阻断,对比各方案下的同步效率,优化同步细胞培养条件,建立HeLa细胞株高同步率模型为人宫颈癌治疗的相关细胞周期研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

DMEM高糖培养基、南美胎牛血清、青霉素/链霉素和胰酶细胞消化液均为美国Hyclone公司产品。胸苷(Thymidine, TdR)、秋水仙碱(Colchicine)、羟基脲(Hydroxyurea, HU)、碘化丙啶(PI)和胰核糖核酸酶(Rnase A)为美国Sigma公司产品。含羞草素(L-Mimosine)购于美国Acros Organic公司。HeLa细胞株为本室保存,来源于上海细胞库的细胞。

### 1.2 主要仪器

流式细胞仪(FACSVantage SE型, BD公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养

HeLa细胞于液氮罐中取出复苏后接种于含10.0%南美胎牛血清及含1.0%青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 U/mL)的DMEM高糖培养基中,于37℃、5.0%CO<sub>2</sub>条件下培养传代。

#### 1.3.2 细胞同步化方法

##### a) 胸苷阻断

单阻断(T法):选取对数期生长的细胞,以含250 μmol/L的TdR的培养液培养24h后,弃去旧培养基,用PBS清洗2遍,正常培养使细胞从药物阻滞中释放至设定时间收获。

双阻断(TT法)法参考文献<sup>[21]</sup>,具体如下:选取对数期生长的细胞,进行一次TdR阻断后,弃去旧培养基清洗药物,正常培养10h,再加入含250 μmol/L的TdR的培养基培养16h,弃去旧培养基清洗药物,正常培养至设定时间收获。

##### b) 含羞草素阻断

含羞草素阻断方法参考文献<sup>[20]</sup>,具体如下:选取对数期生长的细胞,以含300 μmol/L的L-Mimosine的培养基培养24h后,弃去旧培养基,用PBS清洗2次除去残余药物,正常培养使细胞从药物阻滞中释放至设定时间收获。

##### c) 胸苷和秋水仙碱顺序阻断

选取对数期生长的细胞,进行一次TdR阻断后,弃去旧培养基清洗药物,正常培养5h后,加入含1 μg/mL秋水仙碱的培养液培养4h。弃去旧培养基清洗药物,正常培养至设定时间收获。

d) 胸苷和羟基脲顺序阻断

选取对数期生长的细胞,进行一次 TdR 阻断后,弃去旧培养基清洗药物,正常培养 10 h 后,加入含 2 mmol/L 的 HU 的培养基培养 16 h。弃去旧培养基清洗药物,正常培养至 4 h 后收获。

1.3.3 周期检测

各实验组细胞经 0.25%胰酶细胞消化液消化,离心(1200 r/min,10 min)后清洗,加 70.0%预冷乙醇固定。检测前,离心去乙醇,加入 0.5 mL 碘化丙啶染料(50 mg/mL PI,100 mg/mL RNase A,0.20% Trixon-100),室温避光染色 30 min,用流式细胞仪进行测试。各周期时相由 CellQuest 或 ModFit 软件分析获得。

2 结果与讨论

2.1 胸苷单阻断

胸苷、羟基脲、5-氟脱氧尿嘧啶和氨甲蝶呤等可抑制 DNA 的合成,阻滞细胞于 G<sub>1</sub>/S 点。其中高浓度胸苷毒性小,是 DNA 合成抑制法常用试剂,适用于任何培养体系<sup>[9]</sup>。用胸苷处理细胞 24 h 后,PBS 清洗去除胸苷,此时收获记为 0 h。各释放时点周期分布如图 1 所示。由图 1 可知,0 h 时,G<sub>1</sub> 期与 S 期细胞比率占细胞总数的 95.1%,细胞基本被阻断在 G<sub>1</sub> 期末;细胞 S 期比例升高,最大值出现第 4 h,同步率为 60.4%,且可持续 60.0%以上的同步率至少 2 h;G<sub>2</sub>/M 期增加,8 h 时达到峰值,同步率为 46.0%;G<sub>1</sub> 期细胞增加,峰值出现在第 20 h,同步率为 88.2%,且在 14~22 h 的 8 h 内同步率均稳定在 85.0%以上。从细胞 G<sub>1</sub> 期峰值间隔判断,胸苷阻断后细胞周期总长约 22 h,胸苷可能不影响 HeLa 细胞周期时长。未处理的 HeLa 细胞,其各周期时相的百分比分别为:G<sub>1</sub> 为 64.3%,S 为 23.6%,G<sub>2</sub>/M 为 12.1%。通过计算可得出:G<sub>1</sub> 期时长 14.1 h,S 期时长 5.2 h,G<sub>2</sub>/M 期时长 2.7 h。HeLa 细胞 G<sub>1</sub> 期长于已报道的 10 h<sup>[15]</sup>,而 S 期缩短 2 h,其原因可能是细胞数目增多引起接触抑制<sup>[22]</sup>。因此胸苷能较好同步化 HeLa 细胞。

2.2 胸苷双阻断

为了进一步提高同步率,本文测试胸苷双阻断方案,各释放时点周期分布见图 2。由图 2 知,G<sub>1</sub> 期细胞同步率最大值出现在阻断结束第 0 h,同步率最大值为 96.9%,大于胸苷单阻断方案,说明细胞基本被阻断在 G<sub>1</sub>/S 点。S 期细胞在释放 2 h 达到其最大值 77.6%;G<sub>2</sub>/M 期细胞在第 8 h 达到其最

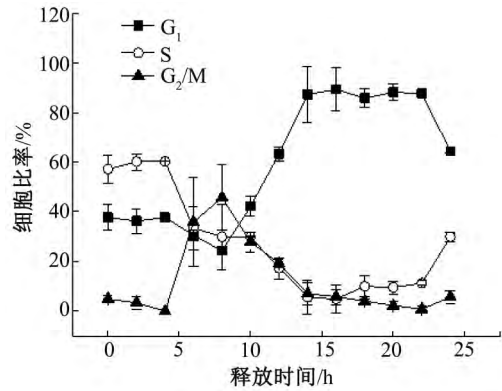


图 1 胸苷单阻断后释放的各时点周期分布

大值 54.4%,也高于单阻断的同步率;G<sub>1</sub> 期细胞开始增加,在释放第 12~24 h 的 12 h 内其同步率均稳定在 80.0%以上。

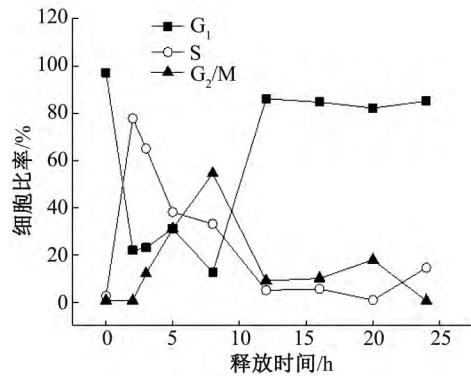


图 2 胸苷双阻断后释放的各时点周期分布

2.3 含羞草素阻断

含羞草素与胸腺嘧啶具有高度相似的化学结构,可竞争性地与腺嘌呤结合<sup>[23-24]</sup>。含羞草素能将 PC-3 细胞阻滞在 G<sub>1</sub> 期以及 LNCaP 细胞的阻滞在 S 期<sup>[25]</sup>。含羞草素阻断后释放,各时间点细胞周期分布如图 3 所示。由图 3 可知,阻断结束后 0 h,G<sub>1</sub> 期达到 95.0%的高同步率,细胞基本被阻断在 G<sub>1</sub> 期末,表明含羞草素可以实现 HeLa 细胞的同步化;10 h 内,G<sub>1</sub> 期细胞减少,S 期细胞增加;第 10 h,S 期细胞达到 50.4%的最大值;第 18 h,G<sub>2</sub>/M 期细胞达到峰值,同步率为 64.9%;此后 G<sub>1</sub> 期细胞增加,在第 20 h 出现 47.7%的峰值。含羞草素也可以实现对 HeLa 细胞的同步化,但其各时相峰值整体低于胸苷。比较图 2 与图 3,可发现含羞草素阻断后,S 期的峰值延后 6 h;含羞草素可使 HeLa 细胞 S 早期延后 4 h,与含羞草素阻滞 DNA 合成开始有关<sup>[26]</sup>。G<sub>1</sub> 期的最高值 95.0%与最低值 12.4%相差 14 h 出现,与无药物处理的 G<sub>1</sub> 期时长基本相同。三条曲线在 20 h 处,均出现拐点,因此含羞草素未影响 HeLa 细胞周期总长。

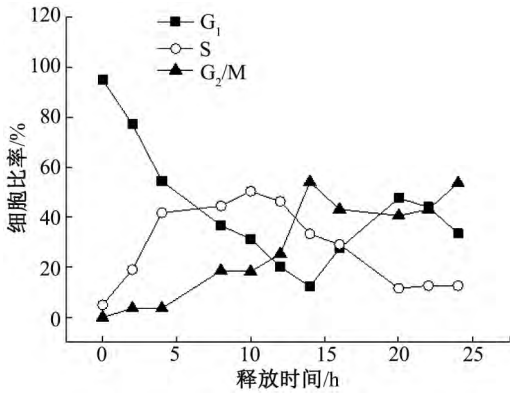


图3 含羞草素阻断后释放的各时点周期分布

2.4 胸苷/秋水仙碱阻断

秋水仙碱通过与微管结合,干扰纺锤体的形成,阻断细胞于G<sub>2</sub>/M期,微管破坏剂持续存在,所有哺乳动物细胞将退出有丝分裂<sup>[27]</sup>。当剂量低,作用时间短时,关卡功能完备的细胞将有机会修复微管,继续周期进程<sup>[28]</sup>。为减弱秋水仙碱对细胞纺锤体损害,本文将作用时间缩短为4h,同时采用胸苷预阻断。药物去除后各时间点周期分布如表1所示,表1显示,阻断结束后0h,G<sub>2</sub>/M期达到98.5%的高同步率。G<sub>1</sub>期细胞在第9h达到最大值96.8%,且可持续90.0%以上的同步率5h。S期细胞在第14h达到最大值,其同步率为93.6%。此后,G<sub>2</sub>/M期细胞开始增加,同步率在第17~20h稳定在85.0%以上。各曲线的最大值均在90.0%以上,因此胸苷/秋水仙碱阻断法可实现对HeLa细胞的高同步化。

表1 TC阻断后释放的细胞周期分布

释放时间/h	G <sub>1</sub> /%	S/%	G <sub>2</sub> /M/%
0	0.0	1.5	98.5
4	94.4	1.0	4.6
9	96.8	1.3	1.9
12	52.9	47.1	0.0
14	1.4	93.6	5.0
17	0.9	11.5	87.6
20	5.4	0.0	94.6
24	25.6	0.0	74.4

2.5 胸苷/羟基脲阻断

羟基脲是尿素羟基化产物,可阻止核苷酸还原为脱氧核苷酸,阻滞细胞在G<sub>1</sub>/S点<sup>[29]</sup>。先采用胸苷预阻断,后用羟基脲进行阻断。胸苷/羟基脲阻断和胸苷双阻断后释放4h流式细胞图如图4所示:胸苷双阻断后释放第4h,G<sub>1</sub>期同步率为22.5%,G<sub>2</sub>/M期同步率为10.6%,S期同步率为66.9%。采用不同试剂HU进行二次阻断,其G<sub>1</sub>期同步率

为3.6%,G<sub>2</sub>/M期同步率为5.5%,而S期同步率可达90.9%。该同步率虽低于T/C法(93.6%),但避免秋水仙碱的使用,提高细胞数量。

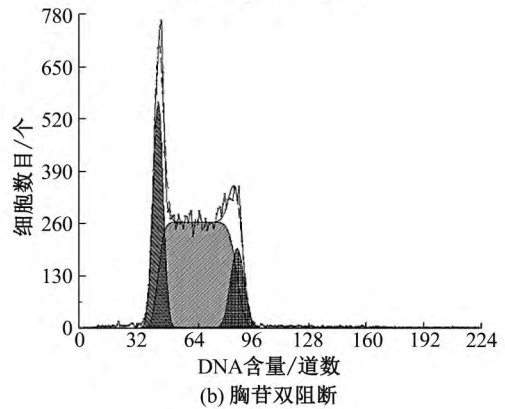
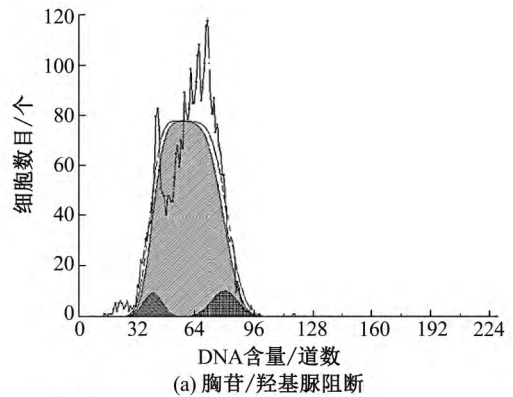


图4 胸苷/羟基脲阻断和胸苷双阻断后释放4h流式细胞图

2.6 影响因素

2.6.1 血清

血清饥饿法可获得多种G<sub>0</sub>期动物细胞,G<sub>0</sub>期细胞在恢复培养后,可进入G<sub>1</sub>期<sup>[30-31]</sup>。本文考察血清浓度对HeLa细胞周期的影响,结果表2所示。由表2可知,血清饥饿36h提高G<sub>1</sub>期细胞比例,但不能获得较高的G<sub>1</sub>期,其原因可能由于癌细胞恶性程度高,对血清的依赖程度不高造成。

表2 不同血清含量培养36h细胞周期分布

组别	G <sub>1</sub> /%	S/%	G <sub>2</sub> /M/%
0.2% FCS	68.6	31.4	0.0
0.5% FCS	69.2	30.8	0.0
5.0% FCS	75.9	16.8	7.3
10.0% FCS	60.9	29.8	9.3

2.6.2 接触抑制

由于对照组细胞G<sub>1</sub>期比例偏高,本文进一步考察细胞间的接触抑制作用对HeLa细胞周期的影响,结果如表3所示。由表3知,随着细胞密度的增

加,  $G_1$  期所占比例不同程度的增加, 因此获得高  $G_1$  期细胞可通过提高种板细胞密度来实现。

表 3 不同种植密度下细胞培养 24 h 后周期分布

细胞浓度/(个·mL <sup>-1</sup> )	$G_1$ /%	S/%	$G_2$ /M/%
$1 \times 10^5$	50.4	45.8	3.8
$2 \times 10^5$	53.2	21.6	25.2
$5 \times 10^5$	61.5	16.8	21.7
$1 \times 10^6$	64.3	23.6	12.1
$5 \times 10^6$	71.4	25.7	2.9
$1 \times 10^7$	75.1	15.2	9.7

### 3 结 论

本文中采用胸苷、含羞草素、秋水仙碱和羟基脲或两种试剂共同对 HeLa 细胞进行药物阻断, 在清除药物后正常培养细胞, 根据流式细胞术对经处理后的细胞周期检测结果来建立宫颈癌 HeLa 细胞株  $G_1$ 、S 和  $G_2$ /M 期高纯度的同步化模型, 主要结论如下:

a) 胸苷双阻断 HeLa 细胞对比单次胸苷阻断的  $G_1$  期曲线, 可发现在第 14~22 h, 单阻断可持续 85.0% 以上的同步率长达 8 h。长时间胸苷作用将造成不均等生长, 故高同步率的  $G_1$  期细胞可采用胸苷单阻断后释放 14~22 h 获得。

b) 胸苷/羟基脲阻断法可获得高同步率的 S 期 HeLa 细胞。

c) 以胸苷进行初次阻断后, 采用秋水仙碱作用 4 h 后释放,  $G_2$ /M 同步率便可达 80.0% 以上, 且可持续 4 h, 同时, 细胞数量也增加约为 3 倍。

d) 含羞草素延长 HeLa 细胞 S 期时长, 阻断细胞于  $G_1$  期, 且初始同步率不低于胸苷双阻断, 然而后续各时相峰值均低于胸苷阻断。

综上所述, HeLa 细胞的  $G_1$  期细胞可通过胸苷单阻断实现高同步率, 高同步率的 S 期细胞可通过胸苷和羟基脲顺序阻断来实现,  $G_2$ /M 期细胞可通过胸苷和秋水仙碱顺序阻断后释放获得, 接触抑制对提高  $G_1$  期的比率影响要大于血清饥饿。由此, 可建立具有高同步率的 HeLa 细胞模型, 为宫颈癌周期治疗策略提供实验依据。

#### 参考文献:

[1] 刘宏, 王庆伟, 章晓梅, 等. 体外胆管癌细胞 X 线照射后细胞周期及放射敏感性变化[J]. 中国现代普通外科进展, 2003, 6(3):156-158.

[2] 高志清, 海春旭, 梁欣, 等. 过氧化氢诱导同步化 HepG2 细胞 DNA 损伤和凋亡的敏感时相研究[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(8):744-748.

[3] Pellegrin P, Fernandez A, Lamb, N J, et al. Macromolecular uptake is a spontaneous event during mitosis in cultured fibroblasts; Implications for vector-dependent plasmid transfection[J]. Molecular Biology of the Cell, 2002, 13(2):570-578.

[4] Tacheva-Grigorova S K, Santos A, Boucrot E, et al. Clathrin - mediated endocytosis persists during unperturbed mitosis [J]. Cell Reports, 2013, 4(4):659-668.

[5] 李春艳, 张莹, 薛晓霞, 等. 流式细胞仪分选非染色 S 期 CHO 细胞有助于提高聚乙烯亚胺的转染效率[J]. 解剖科学进展, 2009, 15(2):156-160.

[6] 杨金亮, 房殿春, 张海荣, 等. 细胞同步化能显著提高逆转录病毒载体的转染效率[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(1):34-34.

[7] Medina-Reyes E I, Bucio-Lopez L, Freyre-Fonseca V, et al. Cell cycle synchronization reveals greater  $G_2$ /M-phase accumulation of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(5):3976-3982.

[8] 郑神. 细胞内荧光量子点的双光子吸收截面及摄取率等的相关研究[D]. 上海: 复旦大学, 2011:54-65.

[9] 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.

[10] 孔宁. Marc-145 细胞周期同步化及 PRRSV 细胞受体表达与病毒感染的关系 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2013:4-47.

[11] 孔德钦. 百草枯引起非同步化与同步化细胞氧化、凋亡损伤效应的比较研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2016:23-61.

[12] 高志清. 同步化肿瘤细胞氧化损伤机理的初步研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2004:13-49.

[13] Yoshizawa-Sugata N, Masai H. Cell Cycle Synchronization and Flow Cytometry Analysis of Mammalian Cells [M]. New York: Humana Press, 2014, 1170:279-293.

[14] 方娟, 王珺, 龚坚, 等. hFAM92A1 在人宫颈癌细胞不同周期时相的表达 [J]. 贵阳医学院学报, 2015(3):304-306.

[15] 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(24):3331-3332.

[16] Ma H T, Poon R Y. Synchronization of HeLa Cells [M]. New York: Humana Press, 2011, 761:151-161.

- [17] Pedrali-Noy G, Spadari S, Miller-Faurès A, et al. Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(2):377-387.
- [18] 张凤秋, 杨战国. 血清浓度及饥饿时间在 HeLa 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期同步化中的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(9):928-929.
- [19] 徐秋芳, 余克花, 易婷, 等. 不同浓度 Nocodazole 对 HeLa 细胞 G<sub>2</sub>/M 期同步化的调节作用[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2010, 30(3):284-287.
- [20] 赵雪芹, 任磊, 王大巾, 等. 含羞草素对肝癌细胞 QGY-7703 周期同步化的作用[J]. *浙江理工大学学报*, 2016, 35(4):620-624.
- [21] 黄蕾, 江千令, 阙云超, 等. 家蚕 BmN 细胞 S 期同步化体系建立[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(2):39-44.
- [22] Wu F, Buckley S, Bui K C, et al. Cell cycle arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase by contact inhibition and TGF-beta 1 in mink Mv1Lu lung epithelial cells[J]. *American Journal of Physiology*, 1996, 270(5):L879-L888.
- [23] Galgano P J, Schildkraut C L. G<sub>1</sub>/S phase synchronization using mimosine arrest[J]. *Cold Spring Harbor Protocol*, 2006(4):869-870.
- [24] Mladenov E, Anachkova B. DNA breaks induction by mimosine[J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2014, 58(9/10):732-735.
- [25] 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.
- [26] Soon-Young P, Jun-Sub I, Sung-Ryeet P, 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 $\alpha$  activation in HeLa cells[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(4):761-766.
- [27] Zu H L, Zhang B L, Yu M R, et al. Effect of phytohaemagglutinin and concanavalin A in different stimulants on mitosis metaphase of cashmere goat lymphocyte [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(10):118-122.
- [28] 姜彦杰, 刘兆鹏. 微管蛋白聚合抑制剂秋水仙碱衍生物的研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2017, 27(2):138-151.
- [29] Vankayala S L, Hargis J C, Woodcock H L. Unlocking the binding and reaction mechanism of hydroxyurea substrates as biological nitric oxide donors [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52(5):1288-1297.
- [30] 宋春娇, 吕冰洁, 张小玲, 等. 血清饥饿法用于细胞周期同步化的方法学研究[J]. *中国地方病学杂志*, 2003, 22(4):362-364.
- [31] Aghababazadeh M, Kerachian M A. Cell fasting: Cellular response and application of serum starvation [J]. *Journal of Fasting & Health*, 2014, 2(4):147-150.

(责任编辑:唐志荣)