

基于紫外吸收光谱的癌细胞模型研究

林晓钢, 潘英俊, 郭永彩, 张 玮, 赵一石

重庆大学光电技术及系统教育部重点实验室, 重庆 400030

摘 要 细胞周期是生命起源最基本也最重要的过程, 是细胞全部生理过程的综合体现, 文章从紫外吸收光谱随其细胞周期的变化入手, 以一种简单且能准确反映癌细胞的生长变化过程的方式建模。通过人工诱导细胞同步化方法对子宫颈癌细胞进行处理, 获取了处于G1期、S期、G2期和M期的同步化细胞样品, 通过测量这些样品的紫外-可见光光谱, 对不同周期细胞紫外-可见光光谱的吸光度随细胞周期中芳香族氨基酸、蛋白质及核酸等物质的变化规律进行了分析。根据细胞周期中不同阶段样品对应紫外-可见光光谱在204和260 nm处的吸光度和时间点的关系, 利用分段线性回归法建立了子宫颈癌细胞紫外吸收光谱模型。可对细胞周期进行判断, 为对细胞周期进行分析研究提供了新的依据, 也为细胞建模提供了新思路。

关键词 紫外-吸收光谱; 细胞模型; 细胞周期; 子宫颈癌细胞

中图分类号: O434.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)09-2547-04

引 言

细胞分裂是一切有机生命体最基本也最重要的生命过程。细胞生长和细胞分裂的周期即为细胞增殖周期简称细胞周期, 真核细胞的细胞周期由G1期、S期、G2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。大量的研究表明, 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乃是肿瘤发生的主要机制, 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、抗癌药物的设计和作用机制具有重要的指导意义^[1]。要建立符合细胞生长规律的细胞光谱模型, 就应深入了解细胞在细胞周期中的物质变化, 对这些时相细胞进行分子水平的分析。而研究这些相关过程的一个基本的、首要的任务就是使细胞同步于细胞周期的某一时相, 研究细胞群体在该时相的变化。

目前对细胞的建模主要是从细胞形态及其内部的生物大分子功能入手, 采用弹性模型、液滴模型、流体动力学模型、计算机仿真以及考虑生化刺激的固液耦合有丝分裂模型等^[2], 这些模型都力求从不同的角度反映真实的细胞的结构和活动过程, 但这些过程都存在复杂的建模过程且仅能反映真实细胞的部分功能。本文将细胞看作一个微型的“黑匣子”, 研究其在生化活动表现出来的光谱学信息, 利用紫外

吸收光谱可灵敏地跟踪细胞内部的氨基酸、蛋白质、酶和辅酶、嘌呤、嘧啶、核酸等物质将随着细胞的生长发生的微量变化的特性^[2-5], 建立细胞的紫外吸收光谱模型以精确反映其生长变化过程。

本文应用紫外-吸收分光光度技术对同步化培养后处于各时相的Hela细胞群体的紫外吸收光谱进行研究, 研究Hela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吸收特性, 并建立了对应的细胞紫外光谱模型。1951年Hela细胞株被George Gey分送给众研究单位, 用作癌症研究而广为流传, 至今已被视为“不死的”, 故采用Hela细胞进行癌细胞周期紫外光谱模型的研究。以Hela细胞为例利用光学手段进行细胞周期研究, 提供细胞生命活动中的光谱变化信息, 为更好地认识细胞生长特征, 特别是癌细胞的发展规律提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

宫颈癌细胞(Hela)购于北京北方伟业公司, 平时用液氮低温保存, 由重庆医科大学基础医学研究所负责传代培养; RPMI 1640培养基, 含10%小牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和100 mg·mL⁻¹链霉素; 胸苷(Thymidine)和Nocodazole均购于Sigma-Aldrich公司。37℃ 5% CO₂细胞培养箱(YCP-

收稿日期: 2008-03-29, 修订日期: 2008-07-02

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(90510020), 国家大学生创新性实验计划课题项目(CQUCX-G-2007-32)和重庆市科委自然科学基金计划项目(CSTC, 2008BB3159)资助

作者简介: 林晓钢, 1975年生, 重庆大学光电工程学院讲师 e-mail: xglin@cqu.edu.cn

200, 上海易亮医疗器械公司生产); 日本岛津 UV-2450 紫外-可见分光光度计, 大型流式细胞仪(美国 BD 公司 FACS Vantage SE)。

1.2 样品制备

为得到所需同步化细胞样品, 在正常培养的 HeLa 细胞达到大约 50%~70% 的覆盖率后, 采用药物阻断的方法进行同步化处理^[6-9], 按细胞周期进展时间获取以下 7 组样品: G1 期(0h)、G1 期(2h)、G1 期(4h)、G1 期(8h)、S 期、G2 期、M 期, 以较全面的观察细胞周期中细胞光谱的变化情况, 将细胞用 PBS 溶液固定后, 使细胞暂时停留在其所处细胞周期, 并在 1 h 内进行紫外-可见光吸收光谱测量。

1.3 实验方法

将用 PBS 溶液配制好的各周期 HeLa 细胞悬液样品 2 mL (浓度均为 2.5×10^6 个 \cdot mL⁻¹) 装入石英比色皿内, 在另一相同的石英比色皿内装入同量的 PBS 溶液作为空白, 用 UV-2450 分光光度计分别测量吸收光谱, 光谱范围 190~400 nm, 扫描步长 1 nm, 整个实验过程在生理温度下进行。

2 实验结果及分析建模

2.1 HeLa 细胞周期各时相样品的紫外吸收光谱及分析

在测定条件完全一致的情况下, 通过双光束紫外-可见分光光度计测得了 HeLa 细胞各细胞周期样品的紫外吸收光谱, 测量结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出, 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 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。

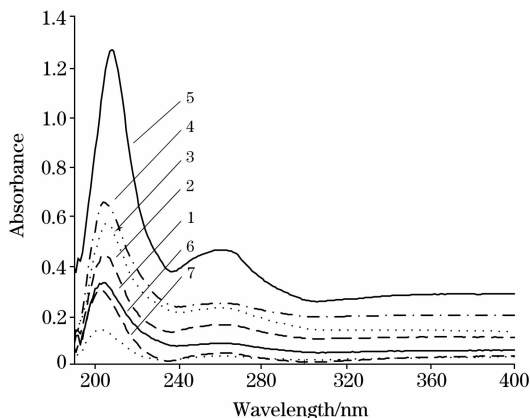


Fig. 1 UV absorption spectra of HeLa cell during the cell cycle

1: G1 phase(0 h); 2: G1 phase(2 h); 3: G1 phase(4 h);
4: G1 phase(8 h); 5: S phase; 6: G2 phase; 7: M phase

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^[1, 10-14]。

从图 1 可以看出, HeLa 细胞各时相的光谱变化基本反映了上述细胞周期的物质变化过程。在 204 nm 附近有一较强的吸收峰, 该吸收峰随细胞周期的变化其峰强也在不断变化。S 期细胞样品吸光度最大为 1.265, 且峰位红移为 208 nm; G1 期细胞样品随着其取样时间不同吸光度逐渐增加(从 0.327 增加到 0.648), 在最接近 S 期取样的样品吸光度最高; G2 期和 M 期最低。因为天然蛋白质组分的 20 种氨基酸在 230~310 nm 波长范围内大都没有吸收, 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 间也有吸收峰^[3], 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。故可以判断 204 nm 附近的吸收峰可能是由芳香族氨基酸引起。

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形成了相应的助色团, 使得生色团的峰位红移, 并增加了其强度。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 期几乎没有蛋白质合成。所以光谱测量结果进一步说明了 HeLa 细胞周期 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, 该吸收峰可能是由 HeLa 细胞中的芳香族氨基酸造成。

第二个吸收峰(260nm 附近)也反映了同样的变化趋势。S 期细胞的吸光度最高为 0.457, G1 期次之, M 期最低为 0.030。因芳香族氨基酸的最大光吸收波长为 275, 258 和 280 nm, 核酸中的嘌呤和嘧啶衍生物具有共轭双键系统, 在 260~290 nm 范围有强烈的吸收^[2, 3]。蛋白质和核酸是构成细胞内原生质的主要成分, 所以 HeLa 细胞各周期样品吸收波长 260 nm 是两者综合吸收的结果。说明了 HeLa 细胞生长过程还可能与嘌呤和嘧啶衍生物具有密切关系, 且嘌呤和嘧

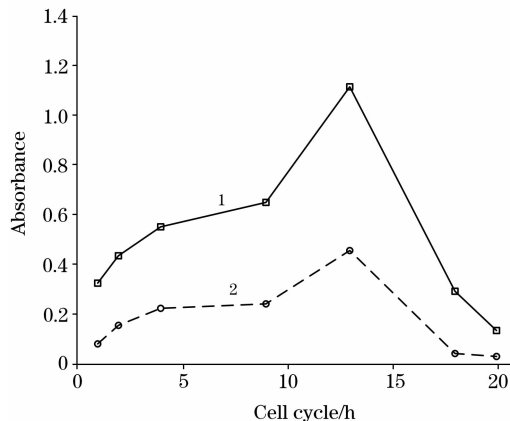


Fig. 2 Relationship between cell cycle and the peak value of UV spectrum

1: 204 nm; 2: 260 nm

啶衍生物的变化过程与芳香族氨基酸类似。

2.2 Helal 细胞紫外吸收光谱模型的建立

从 2.1 节的分析可知, Helal 细胞周期各时相变化过程中, 细胞内的蛋白质和核酸含量变化与细胞周期内相应的生化活动基本符合。于是可根据 Helal 细胞在细胞周期变化过程中蛋白质和核酸的紫外光谱吸光度差异建立 Helal 细胞的紫外光谱模型。

由图 2 可以看出, Helal 细胞从 G1 期到 S 期的变化过程中, 其细胞中蛋白质、嘌呤和嘧啶的特征紫外光谱吸收峰峰

值强度呈上升趋势; 从 S 期到 M 期的变化过程中, 由于蛋白质合成以及 DNA 活动的减弱, 使得其在 204 和 260 nm 的吸收峰强度大大降低。根据这种规律, 考虑以 S 期为分界点, 分段建立 Helal 细胞紫外光谱模型, 如表 1 所示。

表中 R^2 称为测定系数, 表示拟合优度的大小, R^2 越大说明自变量对因变量的解释程度越高。从表中可以看出 R^2 的值均在 0.9 以上, 故可判断 Helal 细胞各周期样品的紫外吸收光谱的吸收峰值与细胞周期的时间之间关系密切。

Table 1 Subsection linear regression model of cell UV absorption spectrum

	吸收峰波长	线性回归方程	测定系数 R^2
G1 期→S 期回归模型 $0 \text{ h} \leq x \leq 17 \text{ h}$	$\lambda = 204 \text{ nm}$	$y = 0.0574x + 0.2838$	0.9122
	$\lambda = 260 \text{ nm}$	$y = 0.0269x + 0.0826$	0.9293
S 期→M 期回归模型 $17 \text{ h} < x \leq 21 \text{ h}$	$\lambda = 204 \text{ nm}$	$y = -0.1448x + 2.9757$	0.9826
	$\lambda = 260 \text{ nm}$	$y = +0.0652x + 1.2853$	0.9357

2.3 模型的验证

为验证该模型是否能判断样品中大多数细胞所处细胞周期, 将多组对某一周期做了同步化处理的样本带入该模型进行验证。Helal 细胞周期时间为 21 h, 其中 G1 期 10 h, S 期 7 h, G2 期 3 h, M 期 1 h。将吸收峰的吸光度 y 带入其对应波长的线性回归模型可计算出其所处细胞周期时间 x 。

在模型验证中, 对 G1 期→S 期回归模型进行验证的 8

组样本, 其中 7 组样品均判断正确, 判断正确的第 7 样本的 204 和 260 nm 线性回归方程计算出其细胞周期时间 x 均为负值, 即可判断样本处于 G2/M 期。第 6 组样本两个线性回归方程判断出现不一致, 204 nm 线性回归方程判断其处于 G1 期, 260 nm 线性回归方程判断其处于 G2/M 期, 主要是因为该 G2 期样本吸收峰值和 G1 期样非常接近导致误判。计算结果如表 2 所示。

Table 2 Verification results of regression model(G1→S)

样本	1	2	3	4	5	6	7	8
样本周期	G1 期	G1 期	G1 期	G1 期	S 期	G2 期	M 期	G1 期
204 nm 吸光度	0.327	0.435	0.554	0.692	1.116	0.292	0.136	0.592
计算结果	0.75 G1 期	2.63 G1 期	4.71 G1 期	7.11 G1 期	14.50 S 期	0.14 G1 期	-2.57 G2/M 期	5.37 G1 期
判断结果	√	√	√	√	√	×	√	√
260 nm 吸光度	0.082	0.157	0.225	0.293	0.457	0.042	0.03	0.194
计算结果	-0.02 G1 期	2.77 G1 期	5.29 G1 期	7.82 G1 期	13.92 S 期	-1.51 G2/M 期	-1.96 G2/M 期	4.14 G1 期
判断结果	√	√	√	√	√	√	√	√

将对 G1 期→S 期回归模型进行验证的后 4 组样本用 S 期→M 期回归模型验证, 结果如表 3 所示。可以看出该模型可以区分 S 期、G2 期和 M 期细胞, 但对 G1 期样本进行判断时会将其认为是 S 期或是 G2 期样本, 故还需对其作进一步优化。

Table 3 Verification results of regression model(S→M)

样本	5	6	7	8
样本周期	S 期	G2 期	M 期	G1 期
204 nm 吸光度	1.116	0.292	0.136	0.592
计算结果	12.84	18.53	19.61	16.46
判断结果	√	√	√	×
260 nm 吸光度	0.457	0.042	0.03	0.194
计算结果	12.70	19.07	19.25	16.74
判断结果	√	√	√	×

由以上验证结果可以看出, 该紫外吸收光谱模型对 Helal 细胞的细胞周期进行判断具备一定的可行性。由于生物细胞的多样性, 还需要在进一步进行大量的实验以对模型进一步优化, 以提高模型的准确性。

3 结 论

本文根据 Helal 细胞中的芳香族氨基酸、嘌呤以及嘧啶在细胞分裂过程中的相应变化引起的光谱变化建立了 Helal 细胞的紫外吸收光谱模型, 并且可以通过该光谱模型判读出 Helal 群体大致处于细胞周期的哪一时相, 判断结果说明该模型若进一步优化, 不仅可以对细胞周期进行判断, 更重要的是可以通过该模型对细胞的生理活动进行描述, 提供细胞生长过程中的紫外吸收光谱信息。

参 考 文 献

- [1] SONG Jin-dan(宋今丹). *Medical Cellular Biology(医学细胞生物学)*. Beijing: People's Medical Publishing House(北京: 人民卫生出版社), 2004. 259.
- [2] Collier J R, Mcinerney D, Schnell S, et al. *Journal of Theoretical Biology*, 2000, 207: 305.
- [3] GUO Yao-jun(郭尧君). *Technique of Spectral Photometer and Its Application in Biochemistry(分光光度技术及其在生物化学中的应用)*. Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1987. 224.
- [4] Boydston-White S, Gopen T, Houser S, et al. *Biospectroscopy*, 1999, 5: 219.
- [5] Susie Boydston-White, Melissa Romeo, Tatyana Chernenko, et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1758: 908.
- [6] Pagano M. *Cell Cycle—Materials and Methods*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1996.
- [7] Lew D J, Dulic V, Reed S I. *Cell*, 1991, 66: 1197.
- [8] Gui Jianfang, William S Lane, Fu Xiangdong. *Nature*, 1994, 369: 678.
- [9] GUI Jian-fang(桂建芳). *The RNA Machining and Cell Cycle Contrl(RNA 加工与细胞周期调控)*. Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1998. 88.
- [10] Azzedine Hammiche, Matthew J German, Rebecca Hewitt, et al. *Biophysical Journal*, 2005, 88: 3699.
- [11] Brian Mohlenhoff, Melissa Romeo, Max Diem, et al. *Biophys J.*, 2005, 88(5): 3635.
- [12] Azzedine Hammiche, Matthew J German, Rebecca Hewitt, et al. *Biophys J.* 2005, 88(5): 3699.
- [13] Mourant J R, Yamada Y R, Carpenter S, et al. *Biophys. J.*, 2003, 85(3): 1938.
- [14] Tokuko Haraguchi, Toru Kaneda, Yasushi Hiraoka. *Genes to Cells*, 1997, 2: 369.

The Study of Cervical Cancer Cells Model Based on UV Absorption Spectrum

LIN Xiao-gang, PAN Ying-jun, GUO Yong-cai, ZHANG Wei, ZHAO Yi-shi

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

Abstract Cell cycle is the most important process in life, and embodies all the physiological processes in the cell. In order to reflect the process of cell growth simply and accurately, the authors took cell cycle into account when the HeLa cell spectral model was designed. The artificially induced cell synchronization method was employed to make HeLa cell in G1, S, G2 and M phases of the cell cycle. The UV absorption spectra of these HeLa cell samples were measured. The absorbability of aromatic amino acid, protein and nucleic acid in different stages of the cell cycle showed the changes in cell cycle. The subsection linear regression model of cell UV absorption spectrum was designed according to the relationship between the stage and the absorbance of samples in different phase at 204 and 260 nm. The models can be used to estimate the cell cycle after experimental verification and provide a new method for analyzing cell cycle and building cell model.

Keywords UV absorption spectrum; Cervical cancer cell; Cell spectral model; Cell cycle

(Received Mar. 29, 2008; accepted Jul. 2, 2008)