

· 论 著 ·

## 羟基脲对体外 HeLa 细胞周期同步化作用的研究

王 昱<sup>1,2</sup>, 卢仲毅<sup>2</sup>, 许 峰<sup>2</sup>, 朱宇迪<sup>3</sup>, 朱宇焘<sup>4,5△</sup>

(1. 第三军医大学西南医院儿科, 重庆 400038; 重庆医科大学; 2. 儿童医院急诊科;

3. 儿童医院药剂科 400014; 4. 附属第一医院肿瘤科 400016; 5. Department of Radiation Oncology &amp; Image-applied, Therapy Kyoto University Graduate School of Medicine, Japan)

**摘要:**目的 探讨利用羟基脲(HU)对 HeLa 细胞进行细胞周期同步化。方法 培养 HeLa 细胞,采用 HU 处理 HeLa 细胞 24 h,然后除去 HU,让 HeLa 细胞进入细胞周期 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>/M 期,通过流式细胞术确认。结果 流式细胞仪检测证实 HeLa 细胞在 HU 祛除后 3.5 h 处于 S 期,8.5 h 处于 G<sub>2</sub>/M 期,18 h 处于 G<sub>1</sub> 期。结论 HU 处理可以有效地将 HeLa 细胞同步化于特定的细胞周期,而且方法简单,易于操作。

**关键词:**羟基脲; HeLa 细胞; 细胞周期; 同步化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.24.012

中图分类号:R329.28;R979.1

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)24-3331-02

## Synchronization of the cell cycle of HeLa cell by hydroxyurea in vitro

WANG Yu<sup>1,2</sup>, LU Zhong-yi<sup>2</sup>, XU Feng<sup>2</sup>, et al.

(1. Department of Pediatric, the Southwest Hospital, the Third military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Department of Emergency, Chongqing Medical University Affiliated Children's Hospital, Chongqing 400014, China;

3. Department of Pharmacology, Chongqing Medical University Affiliated Children's Hospital, Chongqing 400014, China;

4. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

5. Department of Radiation Oncology &amp; Image-applied, Therapy Kyoto University Graduate School of Medicine, Japan)

**Abstract: Objective** To explore the method to synchronize HeLa cell by hydroxyurea. **Methods** Culture HeLa cell, add HU 1 nm to the culture medium, synchronized the HeLa cell for 24 h, then release HU from the culture medium. Design the specific time course for HeLa cell; proved by flow cytometry. **Results** After release HU, 3.5 h later, HeLa cell could be synchronized in S phase, 8.5 h later in G<sub>2</sub>/M phase, and 18 h later in G<sub>1</sub> phase. **Conclusion** HeLa cell can be successfully synchronized in G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M phase by the HU treatment and releasing.

**Key words:** hydroxyurea; hela cell; cell cycle; synchronization

细胞增殖分裂是细胞基本的生理活动,细胞周期的紊乱导致许多疾病<sup>[1]</sup>,各种调控因子通过作用于细胞周期而产生作用<sup>[2]</sup>。肿瘤是严重危害人类健康的疾病之一,从细胞周期的角度出发,探讨不同细胞周期肿瘤细胞在侵袭和转移过程中的细胞生物学特性的变化,可为肿瘤的治疗提供定量的参考依据<sup>[3]</sup>。在体外细胞水平的研究中,将细胞同步化于特定的细胞周期,可以为各种细胞因子、药物、放射的实验提供理想的实验对象<sup>[3]</sup>。为了研究某一相细胞的代谢、增殖、基因表达或凋亡,常需采取一些方法使细胞处于细胞周期的同一时相,即细胞同步化技术<sup>[4-5]</sup>。采用羟基脲(hydroxyurea, HU)这种 DNA 合成抑制剂可逆地抑制 S 期细胞 DNA 合成而不影响其他细胞周期运转,最终可将细胞群体阻断在 G<sub>1</sub>/S 期交界处<sup>[6-7]</sup>,然后将含 HU 的培养基置换出来,释放细胞后继续培养,按照 HeLa 细胞的细胞周期分布在不同的时间段设计时程作流式细胞术检测,以判断细胞所处的周期。作者经过反复实验建立了 HeLa 细胞同步化的方法。

## 1 材料与方 法

**1.1 细胞培养与试剂** HeLa 细胞株(HeLa human cervical epithelial adenocarcinoma cell line)购自 the American Type Culture Collection。于 RPMI1640 培养基(Promega 含 10% 的热灭活小牛血清、100 u/mL 青霉素及 100 u/mL 链霉素)、37

℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养传代。

**1.2 根据 HeLa 细胞的细胞周期设计检测细胞周期的时程** HeLa 细胞的细胞周期分布是 S 期 9 h, G<sub>1</sub> 期 8 h, G<sub>2</sub>/M 4 h。HU 处理后的细胞处于 G<sub>1</sub>/S 期的交界处,故设计时程为:HU 释放后立即以及 3.5、8.5、10、11.5、14、16、18、20、22、24 h。

**1.3 细胞同步化方法**

**1.3.1 一次阻断后释放法** 采取 HU 处理 24 h,阻断后释放的方法。其简要步骤如下:培养 HeLa 细胞至对数生长期、传代、接种入 6 孔培养盘,浓度为 5×10<sup>4</sup>/mL,加入 HU 至其终浓度为 1 mmol/L,在上述条件下培养 24 h。弃去培养液,以 PBS 液清洗细胞后加入新鲜培养液,然后继续培养至各个时间点。

**1.3.2 两次阻断后释放法** 接种 HeLa 细胞入 6 孔培养盘,浓度为 5×10<sup>4</sup>/mL,采取 HU 终浓度为 1 mmol/L 处理 24 h,弃去培养液,以 PBS 液清洗细胞后加入新鲜培养基培养 10 h,然后再用 HU 处理 14 h,然后释放 HeLa 细胞。把未用 HU 处理的样本作为对照。

**1.4 同步率检测**

**1.4.1 收集细胞** 达到时间点后,弃上清液,1×PBS+EDTA 清洗,0.02%EDTA、25%胰蛋白酶消化收集,PBS 液冲洗,以 70%乙醇固定,置 4℃ 冰箱保存备用。

**1.4.2 流式细胞仪检测** 流式细胞术 PI 染色技术,流式细胞

△ 通讯作者, E-mail: zhuyuxi17@hotmail.com。

仪(BD Bioscience)检测各时相中细胞的比例,每次分析  $1 \times 10^4$  个细胞,应用 Cell Quest software(BD Bioscience)分析软件分析。

## 2 结果

分别采用一次阻断和两次阻断法阻断后,测定立即以及 3.5、8.5 h 的结果。结果显示两次阻断法相对于一次阻断法步骤较复杂,处理的时间太长,使细胞容易过度生长。就

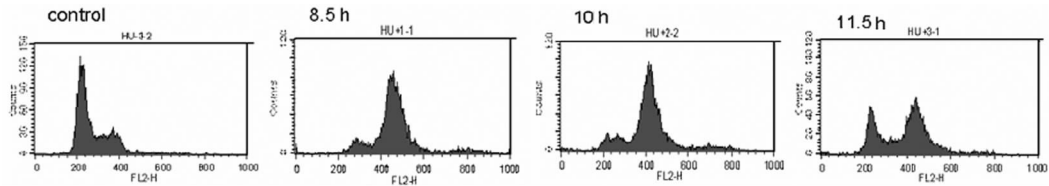


图 1 HU 一次阻断法+8.5、10、11.5 h

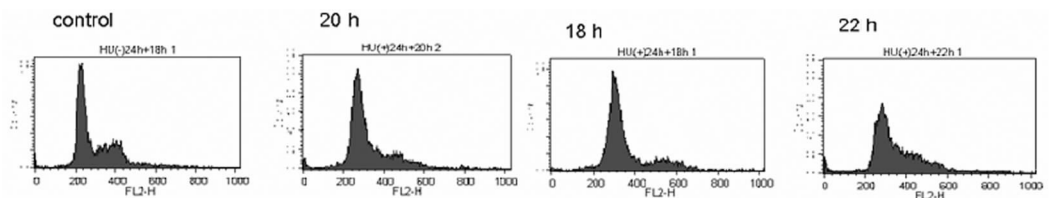


图 2 HU 一次阻断法+18、20、22 h

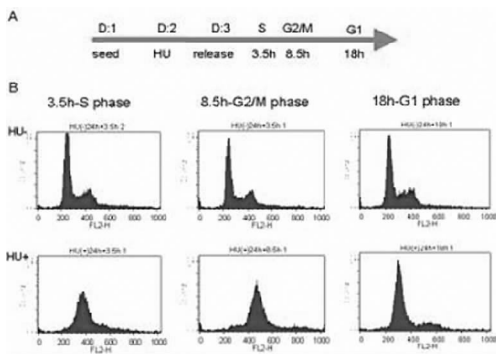


图 3 HU 处理同步 HeLa 细胞于 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>/M 期

## 3 讨论

细胞的增殖分裂受生长因子、激素及癌基因产物影响,从而影响着细胞周期的运行。当调控因子造成细胞周期的快速运行,将导致良性或恶性的增生;而细胞周期停滞不前则导致细胞衰老、凋亡。因此,观察各种调控因子对细胞周期运转的影响和从细胞周期的角度来观察调控运转对细胞的增殖、分裂、凋亡等行为的影响非常重要。体外培养细胞同步化法是重要的研究细胞周期的方法,其基本原理是使细胞停止在细胞周期的某一时相,目前已广泛应用于细胞动力学、人类高分辨染色体、成熟前积聚染色体以及细胞不同时相对药物敏感性等方面的研究。哺乳动物细胞和人体细胞的同步化方法,包括温度休克、照射、胰酶消化、药物抑制、机械振动收集分裂细胞等,且常常需要几种方法联合应用,以同步细胞到特定的细胞周期。

细胞周期特异性的抗癌药物抑制细胞周期的机制是特异性阻断细胞周期的特定阶段,例如阻断 S 期的 HU、甲氨蝶呤等;阻断 M 期的有紫杉醇、秋水仙素等。HU 是尿素的羟基化产物,相对分子质量为 76 u,是用于临床的核糖核苷酸还原酶抑制剂类抗肿瘤药物,可以阻止核苷酸还原为脱氧核苷酸,因而选择性地抑制 DNA 的合成,并能直接损伤 DNA。因本品作

FACS 的结果来说 HU 一次阻断法后细胞周期的阻断效果好,因此就采用一次阻断法继续研究。一次阻断法后 8.5、10、11.5 h 3 个时间点的细胞周期分布见图 1。两次阻断法后 18、20、22 h 3 个时间点的细胞周期分布。18 h 时间点,细胞主要在 G<sub>1</sub> 期(图 2)。综合各个时间点的流式细胞仪分析,3.5、8.5、18 h 3 个时间点,细胞主要在 S 期、G<sub>2</sub>/M 期和 G<sub>1</sub> 期(图 3)。

用于 S 期,并能使部分细胞阻滞在 G<sub>1</sub>/S 期的边缘,故可用作使肿瘤细胞部分同步化或放射增敏的药物<sup>[8]</sup>。本研究采用 HU 阻断 HeLa 细胞的细胞周期,然后释放,HeLa 细胞就随着释放后的时程,进入各个细胞周期,经过多次重复的实验,细胞的同步率均能稳定,细胞的同步水平几乎不会改变,表明这一同步化法能够满足实验条件的要求。

HU 作为临床上治疗慢粒、真性红细胞增多症的主要用药之一<sup>[9]</sup>,对头颈部原发性鳞癌、复发性转移性卵巢癌等亦有一定疗效<sup>[10]</sup>,还可作为放射增敏剂增加放疗对头颈部肿瘤的疗效<sup>[11-12]</sup>。目前在临床上,放、化疗的时程安排仍然是有待解决的问题。放疗对 G<sub>2</sub>/M 期细胞敏感,对 S 期细胞不敏感,如果时程安排不当,可能造成放、化疗的作用相拮抗<sup>[13-14]</sup>,从而降低治疗肿瘤的疗效。如何才能达到最佳的协同效果,合理安排放、化疗的时程非常重要<sup>[15]</sup>。将 HU 作用于肿瘤细胞(HeLa 细胞)24 h,然后系统地用流式细胞仪观察其对 HeLa 细胞周期的影响,对于安排放、化疗时程能够起到参考作用。本课题下一步就将就 HU 同步化动物在体实验进行研究,以为临床治疗提供更有价值的依据和指导。

## 参考文献:

- [1] Morris LG, Veeriah S, Chan TA. Genetic determinants at the interface of cancer and neurodegenerative disease[J]. *Oncogene*, 2010, 29(24):3453.
- [2] O' Donovan PJ, Livingston DM. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(6):961.
- [3] Bianchi MM. Collective behavior in gene regulation: metabolic clocks and cross-talking [J]. *FEBS J*, 2008, 275(10):2356.
- [4] Wesierska-Gadek J, Wandl S, Kramer MP, (下转第 3335 页)

一个加剧因素,有待进一步研究探讨。

#### 参考文献:

- [1] Engstrom G, Hedblad B, Janzon L, et al. Fatality of acute coronary events in relation to hypertension and low-grade inflammation; a population-based cohort study[J]. *J Hum Hypertension*, 2006, 20(8): 581.
- [2] Wexler RK. Treatment of hypertension critical in reducing morbidity and mortality[J]. *JABFM*, 2007, 20(3): 322.
- [3] 冯正平. 血管紧张素与肾小球硬化的研究进展[J]. *重庆医学*, 1998, 27(2): 75.
- [4] 彭献代, 张建儒, 曾祥明, 等. 慢性血液透析患者血浆肾素-血管紧张素及醛固酮的变化[J]. *重庆医学*, 1995, 24(10): 29.
- [5] Sil vestrov VP, Kovalenko EA, Krysin IUS. Pulsed hypoxia in the treatment of obstructive lung diseases[J]. *Ter Arkh*, 1993, 65(3): 9.
- [6] 缪琪蕾. 高原气候降低居室尘埃螨过敏性哮喘小儿的周围血 T 淋巴细胞活性、嗜曙红细胞增多和支气管阻塞[J]. *高原医学杂志*, 1995, 5(3): 35.
- [7] Fagan KA. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia[J]. *J Appl Physiol*, 2001, 90(6): 502.
- [8] Fike CD, Slaughter JC, Kaplowitz MR, et al. Reactive oxygen species from NADPH oxidase contribute to altered pulmonary vascular responses in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(5): L881.
- [9] 李南方, 杨婷, 祖菲亚, 等. 男子高血压患者长期饮酒与阻塞性睡眠呼吸暂停综合征[J]. *中华高血压杂志*, 2007, 15(10): 817.
- [10] Mazza A, Zamboni S, Cuppini S, et al. Internal carotid artery fibromuscular dysplasia in arterial hypertension: management in clinical practice[J]. *Blood*, 2008, 17(5): 274.
- [11] 叶自林, 何作云, 袁发焕, 等. 血管紧张素-(1-7)对二肾一夹高血压大鼠肾保护作用及机制探讨[J]. *重庆医学*, 2004, 33(4): 557.
- [12] 杨天德, 陶军, 吴悦维, 等. 42 例麻醉期间心跳、呼吸骤停的原因与救治[J]. *重庆医学*, 2007, 36(16): 1064.
- [13] 衣香明, 郭涛, 杜彦辉, 等. ACE 基因多态性与中青年缺血性脑卒中关系的探讨[J]. *重庆医学*, 2006, 35(10): 916.
- (收稿日期: 2010-07-08 修回日期: 2010-08-05)
- 
- (上接第 3332 页)
- et al. Roscovitine up-regulates p53 protein and induces apoptosis in human HeLaS(3) cervix carcinoma cells[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 105(5): 1161.
- [5] Takita M, Furuya T, Sugita T, et al. An analysis of changes in the expression of cyclins A and B1 by the cell array system during the cell cycle; comparison between cell synchronization methods[J]. *Cytometry A*, 2003, 55(1): 24.
- [6] Kurose A, Tanaka T, Huang X, et al. Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage[J]. *Cell Prolif*, 2006, 39(3): 231.
- [7] Takita M, Furuya T, Sugita T, An analysis of changes in the expression of cyclins A and B1 by the cell array system during the cell cycle; comparison between cell synchronization methods[J]. *Cytometry A*, 2003, 55(1): 24.
- [8] Shewach DS, Lawrence TS. Antimetabolite radiosensitizers[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(26): 4043.
- [9] Cohen EE, Haraf DJ, Kunnavakkam R, et al. Epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib added to chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(20): 3336.
- [10] Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Advances in meningioma therapy[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2009, 9(3): 231.
- [11] Seiwert TY, Haref DJ, Cohen EE, et al. Phase I study of bevacizumab added to fluorouracil and hydroxyurea-based concomitant chemoradiotherapy for poor-prognosis head and neck cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(10): 1732
- [12] Janot F, de Raucourt D, Benhamou E, et al. Randomized trial of postoperative reirradiation combined with chemotherapy after salvage surgery compared with salvage surgery alone in head and neck carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(34): 5518.
- [13] González-Cortijo L, Carballo N, González-Martín A, et al. Novel chemotherapy approaches in chemoradiation protocols[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(3 Suppl 2): S45.
- [14] Rose PG, Ali S, Watkins E, et al. Long-term follow-up of a randomized trial comparing concurrent single agent cisplatin, cisplatin-based combination chemotherapy, or hydroxyurea during pelvic irradiation for locally advanced cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group Study[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(19): 2804.
- [15] 朱宇熹, 陈绪元, 陈晓品. 同步放、化疗治疗Ⅲ期非小细胞肺癌的研究进展[J]. *重庆医学*, 2002, 31(10): 1000.
- (收稿日期: 2010-06-23 修回日期: 2010-08-25)