

流式细胞术 BrdU/DNA 双染法测定云芝糖肽
诱导的 Molt-4 细胞周期阻滞

刘 佳¹ 杨晓彤^{1△} 杨庆尧²

(1 上海师范大学生命与环境科学学院 上海 200234 2 上海杨杨百草研究所 上海 200234)

摘要 目的 探究云芝糖肽(PSP) 对人急性淋巴母细胞白血病 Molt-4 细胞周期的影响。方法 采用流式细胞术 BrdU/DNA 双染法获得各时相细胞分布状况和细胞周期的动力学参数。结果 0.1 mg/mlPSP 处理 12 h 后 ,G2/M 期细胞百分比由对照组的 11.09 %减少至 3.69 %。DNA 合成时间由 12.10 h 延长至 108.40 h。24 h 处理组中 ,S 期细胞百分比由对照组的 43.29 %增加至 67.26 % ,而 G0/G1 期和 G2/M 期细胞百分比均减少 ,G0/G1 期细胞百分比由对照组的 37.47 %减少至 27.43 % ,G2/M 期细胞百分比由对照组的 19.24 %降低至 5.31 %。DNA 合成时间更是由 11.95 h 延长至 114.52 h。结论 :PSP 对人急性淋巴母细胞白血病 Molt-4 细胞周期的阻滞作用在于 S 期 ,该作用与 DNA 合成抑制有关。

关键词 :云芝糖肽(PSP) 细胞周期 ;Molt-4 流式细胞术 BrdU/DNA 双染法

中图分类号 :R737.7 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2011)20-3826-04

Polysaccharopeptides Derived from Trametes Versicolor Induce Cell Cycle
Retardance on Molt-4 Cells Determined by Flow Cytometry BrdU/DNA
Bivariate Immunostaining Analysis

LIU Jia¹, YANG Xiao-tong^{1△}, YANG Qing-yao²

(1 College of Life and Enviromental Sciences,Shanghai Normal University, 200234, Shanghai, China;

2 Shanghai Yang's Herb Insitute,200234, Shanghai, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the cell cycle inhibition effects of Polysaccharopeptides derived from Trametes versicolor (PSP) on human acute leukemia Molt-4. **Methods:** Flow cytometry BrdU/DNA bivariate immunostaining method was used to detect the distribution of each phase and cell cycle kinetic parameters. **Results:** After treatment by 0.1 mg/ml PSP for 12 h, the percentage of G2/M phase cells were dropped from 11.09% (control) to 3.69%. DNA synthesis time extended from 12.10 h to 108.40 h. In 24 h treatment group , the percentage of S phase cells increased from 43.29 %(control) to 67.26 % , while the percentage of G0/G1 phase and G2/M phase cells were all reduced, G0/G1 phase cells decreased from 37.47 % (control) to 27.43 % , G2/M phase cells reduced from 19.24 % (control) to 5.31 % . DNA synthesis time was prolonged from 11.95 h to 114.52 h. **Conclusions:** PSP induce cell cycle retardance in S phase on human leukemia Molt-4 cells,and related to inhibition of DNA synthesis.

Key words: PSP; cell cycle; Molt-4; BrdU/DNA bivariate immunostaining analysis

Chinese Library Classification(CLC): R737.7 **Document cord:** A

Article ID:1673-6273(2011)20-3826-04

前言

研究抗癌药物对肿瘤细胞周期的影响对于了解药物的抗癌机制以及癌症治疗有重要意义。细胞周期研究的基本方法有同位素^[3H]dThd 标记 DNA 合成前体的放射自显影法和 DNA 特异染料测定总 DNA 含量法。但是这些方法仅能得到间接模糊的数据 ,需要复杂的数学模型计算才能获得细胞周期参数^[1]。BrdU(5'- 溴 -2'- 脱氧尿苷)是尿嘧啶核苷嘧啶环第五位氢原子被溴原子取代后的一种卤代物 ,在 DNA 合成时它能取代尿嘧啶核苷掺入 DNA 中。BrdU 为半抗原 ,抗 BrdU 单克隆抗体可

以与单链 DNA 结合 ,所以 BrdU 在 DNA 中出现的数量和时间能充分体现 DNA 的合成过程。另外 ,碘化丙啶 (PI) 与双链 DNA 结合得到总 DNA 的含量^[2]。流式细胞术 BrdU/DNA 双染法可以直观地显示出群体各时相细胞分布状况和各时相细胞比例。对标记后不同时间取样所得的一系列数据分析 ,可以快速获得细胞周期的动力学参数和 DNA 合成速度。

云芝糖肽(Polysaccharopeptide of Trametes versicolor ,PSP) 是从云芝 Cov-1 菌株深层培养菌丝体内提取的结合蛋白多糖^[3]。1998 年云芝糖肽被批准为国家 II 类新药 ,它可以提高癌症患者的免疫力 ,改善生活质量 ,延长寿命 ,也可以用于亚健康人群提高身体免疫力。研究结果表明 ,云芝糖肽对肺癌、胃癌、结肠癌、白血病 ,乳腺癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤都有治疗效果 ,有效抑制肿瘤细胞的生长 ,诱导肿瘤细胞凋亡^[4]。有研究证明 ,将培养时间为 2-10 天得到的 PSP 处理人急性淋巴母细胞白血病 Molt-4 细胞 72 小时 ,通过流式细胞术 PI 单染法分析发

作者简介 :刘佳(1985-) ,女 ,硕士研究生 ,主要研究方向 :生化药物 E-mail:jane_xinjiang@163.com

△通讯作者 杨晓彤 ,研究员 ,电话 :021-64322934 ,

E-mail:xytang2001@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-05-10 接受日期 2011-05-31)

现 PSP 能够将细胞阻滞在 S 期, 而且阻滞在 S 期的细胞数量有 PSP 培养时间依赖性^[5]。另外, 还有实验表明, 在高剂量(0.5 和 1.0 mg/ml)PSP 处理人早幼粒白血病 HL-60 细胞和人单核淋巴瘤白血病 U-937 细胞 72 小时, 发现这两种白血病细胞周期均阻滞在 G0/G1 期, S 期细胞分布减少^[6,7]。但是与 HL-60 细胞不同的是, 在低剂量(0.1 mg/ml) PSP 作用下, U-937 细胞出现 S 期细胞积累而 G0/G1 期细胞减少的现象。于是我们采用流式细胞术 BrdU/DNA 双染法测定低剂量(0.1 mg/ml) PSP 作用下处理 Molt-4 细胞较短时间(12 和 24 小时)细胞周期阻滞的时相和 DNA 合成速度的变化。

1 材料与方法

1.1 试剂

BrdU 由 Sigma 公司生产; 小鼠抗 BrdU 单克隆抗体由 BD pharmingen 公司生产; 山羊抗小鼠 Ig-FITC 抗体购自北京康为世纪生物技术有限公司; 云芝糖肽(PSP)由杨庆尧教授提供; RPMI-1640 培养基、青霉素和链霉素由 Invitrogen 公司生产; 胎牛血清由 PAA 公司生产; FACS Calibur 流式细胞仪 BD pharmingen 公司生产; Winlist 1.04 和 Modfit 5.11 软件为美国 Verity Software House 公司出品。

1.2 PSP 的制备

称取云芝糖肽粉末 680 mg 溶于 6.6 ml 水中, 搅拌 60 min, 离心(4000 rpm, 5 min)取上清, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 分装后 4℃保存。

1.3 细胞培养

人急性淋巴母白血病细胞 Molt-4 由香港大学 Jennifer Wan 博士惠赠, 在 37℃, 5% CO₂ 下培养于完全 RPMI-1640 培养基中, 完全 RPMI-1640 培养基中含有 10%胎牛血清, 100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素。

1.4 实验方法

1.4.1 BrdU 标记 对数生长期的 Molt-4 细胞加入 BrdU 使其终浓度达到 10 M。混匀后置于 37℃水浴中短期标记 20 min。温热的 RPMI 培养基离心洗涤两次(500g, 5min), 以除去未被结合的 BrdU, 重悬细胞后重新接种于细胞培养瓶中, 加入 CRP-MI 培养基和 PSP, 使终浓度分别为 0 和 0.1 mg/ml, 继续置 CO₂ 培养箱中孵育 12h 和 24h。

1.4.2 乙醇固定和 HCl 处理 达到设定时间后, 使用预冷的 PBS 离心洗涤两次(500g, 5 min, 4℃), 滴加 5 ml 75%冰冷的乙醇固定过夜。PBS 离心洗涤两次(2000 rpm, 5 min)除去乙醇, 滴加 1ml 2 M HCl 处理 30 min, 用于打开 DNA 双螺旋链。

1.4.3 免疫荧光抗体孵育 5 ml PBST 离心洗涤两次除去 HCl 后, 加入 50 μ l 小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(1:50 稀释)25℃下孵育二小时。5 ml PBST 离心洗涤两次后, 加入 100 μ l 山羊抗小鼠 Ig-FITC 抗体(1:2000 稀释)25℃下黑暗房间内孵育两小时。

1.4.4 DNA 染色 10 ml PBST 离心洗涤后用 300 μ l 碘化丙啶(PI) 染液(11.21 g/L Tris, 584 mg/L NaCl, 50 mg/L PI, 10 mg/L RNase, 1 ml/L Nonidet P-40 (pH 8.0))重悬细胞, 黑暗中室温下染色 30 min。

1.4.5 流式细胞仪检测和数据处理 FACS Calibur 流式细胞仪进行检测, 收集 10000 个细胞, 收集 PI 荧光的面积信号和宽度

信号, 通过设门去除粘连细胞, 使用 Winlist 1.04 和 Modfit 5.11 软件进行数据处理。

2 结果

0.1 mg/ml PSP 处理被 BrdU 短暂标记的对数生长期 Molt-4 细胞 12 h 和 24 h, 收集到的细胞经 DNA 部分变性后, 用被荧光素标记的抗 BrdU 抗体和 DNA 染料同时染色, 然后通过流式细胞仪检测两种荧光, 得到 BrdU 相对于总 DNA 的双参数直方图^[8]。在对照直方图(图 1A1)中, G0/G1 期、S 期、G2/M 期的总 DNA 含量依次升高。只有 S 期细胞才合成 DNA 掺入 BrdU, 所以 S 期细胞 BrdU 的含最高。12 h 的直方图(图 1A2)中, 被 BrdU 标记的 S 期细胞细胞分裂后进入 G0/G1 期, 这部分细胞表示为 Ld, 在各周期时相细胞分布百分比计算中归入 G0/G1 期细胞。未被 BrdU 标记的 G0/G1 期细胞进入 S 期, 这部分细胞表示为 S-, 在各周期时相细胞分布百分比计算中归入 S 期细胞。

BrdU/DNA 双参数直方图通过软件处理和数据统计得到各时相细胞比例的变化。在 PSP 处理 12 h 后, G2/M 期细胞百分比由对照组的 11.09%减少至 3.69%。PSP 处理 24 h 后, G2/M 期细胞百分比发生极其显著的减少, 由对照组的 19.24%减少至 5.31%, 降幅达到约 75%。PSP 处理 24h 后, S 期细胞百分比发生非常显著的增加, 由对照组的 43.29%增加至 67.26%, 而 G0/G1 期细胞百分比由对照组的 37.47%减少至 27.43%。这说明 PSP 影响了 Molt-4 细胞的分裂和增殖, 并且 Molt-4 细胞的细胞周期被 PSP 水提物阻滞在 S 期而不是 G0/G1 期。

对 BrdU 标记后 12 h 和 24 h 取样所得的双参数直方图分析发现 PSP 诱导 Molt-4 细胞的 DNA 合成时间显著延长。PSP 处理 12h 后, DNA 合成时间由 12.10h 延长至 108.40h, 增加了 8.96 倍。而在 PSP 处理 24 h 后, DNA 合成时间更是由 11.95h 延长至 114.52h, 增加了 9.58 倍。

3 讨论

肿瘤细胞有别于正常细胞的标志是失控增殖, 而且几乎所有肿瘤都存在细胞周期调控缺陷, 所以肿瘤被认为是一种细胞周期疾病。由于肿瘤细胞的细胞周期限制点和细胞周期检验点的破坏等产生的细胞周期缺陷促使细胞增殖和使细胞对 DNA 损伤不应答, 从而诱导癌变^[9,10]。多种抗癌药物通过诱导肿瘤细胞周期特异性凋亡发挥抗肿瘤作用。这种细胞周期特异性是抗癌药物的重要属性之一, 被广泛应用于基础研究和临床肿瘤治疗^[11]。

流式细胞术 BrdU/DNA 双染法的方法被用来研究 PSP 诱导 Molt-4 细胞周期的动力学变化。BrdU/DNA 双染法通过流式细胞仪直接测定出处于 DNA 合成期的细胞比例, 更好的反应细胞的 DNA 合成期情况, 同时可以观察到细胞周期的动态变化。本研究表明经过流式细胞术 BrdU/DNA 双染法测定低剂量 PSP 和较短时间作用下 Molt-4 细胞的细胞周期阻滞在 S 期。DNA 合成时间的结果说明 PSP 是通过延长 Molt-4 细胞的 DNA 合成时间来诱导 S 期阻滞的。

本实验结果与流式细胞术 PI 单染法观察到的不同培养时间得到的 PSP 处理 Molt-4 细胞 72 小时, 还有低剂量 PSP 作用

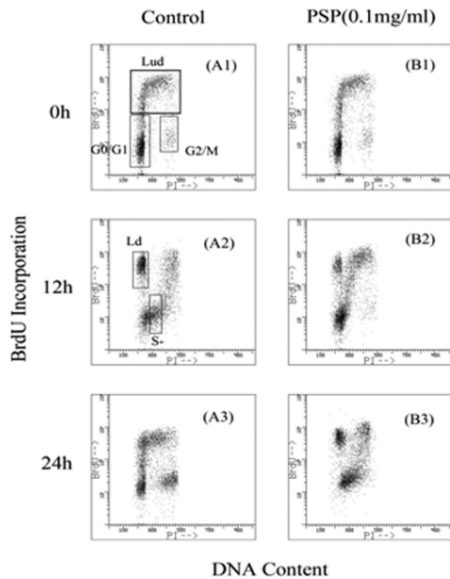


图1 流式细胞术 BrdU/DNA 双染法得到的 BrdU/DNA 双参数直方图

Fig.1 BrdU/DNA histogram measured by bivariate BrdU/DNA flow cytometry

BrdU/DNA 双参数直方图表示的是 PSP 0.1 mg/ml 处理 12h 和 24h 后 Molt-4 细胞的各周期时相细胞分布。被 BrdU 标记的 S 期细胞位于 DNA 含量为 2N (G0/G1) 和 4N (G2/M) 之间, 这部分未分裂的细胞表示为 Lud。12h 的直方图中, 被 BrdU 标记的 S 期细胞细胞分裂后进入 G0/G1 期, 这部分细胞表示为 Ld, 未被 BrdU 标记的 G0/G1 期细胞进入 S 期, 这部分细胞表示为

S-histogram of bivariate BrdU/DNA flow cytometry distribution of the Molt-4 cells without or with PSP (0.1mg/ml) treatment for 12 h and 24h respectively. The S phase cells situated in between 2N (G0/G1) and 4N (G2/M) labeled positively with BrdUrd, and this population of cells were undivided and expressed as labeled undivided cells (Lud). The 12-h histogram shows that some S phase cells incorporated with BrdU had progressed through the G2/M phase, further divided and appeared in G0/G1 as daughter cells or labeled divided cells (Ld), the G0/G1 cells without BrdU incorporation entered into S phase were expressed as S-cells.

U-937 细胞 72 小时的实验结果都相似。另外, 还有研究表明, 将 25 和 50 g/mlPSP 处理 HL-60 和 ZR-75-30 细胞 1 和 6 小时, 两种细胞均被阻滞在 S 期和 G2/M 期, DNA 合成时间显著延长^[12-14]。并且在 PSP 与 DOXO, VP-16 和 CPT 等 S 期特异性药物共同作用于细胞后, 发现 PSP 可以增强 S 期特异性药物对细胞 S 期的阻滞效果, 且诱导 S 期细胞发生凋亡。因此我们猜测 PSP 对 Molt-4 的抑制作用是通过使周期时相阻滞在 S 期进而发生凋亡而实现的。

总之, 流式细胞术 BrdU/DNA 双染法测定云芝糖肽诱导的 Molt-4 细胞周期阻滞在 S 期, 且 DNA 合成抑制是云芝糖肽导致 S 期积累的机制之一。

参考文献(References)

[1] Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, et al. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983, 80(18): 5573-5577

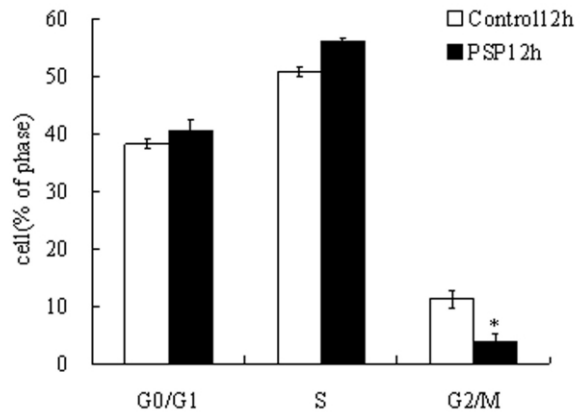


图2 PSP 0.1 mg/ml 处理 Molt-4 细胞 12h 各周期时相细胞分布百分比的变化

Fig.2 Cell cycle phase distribution changes in Molt-4 cells treated with 0.1 mg/ml PSP for 12h

数据表示为 mean $\pm$ SEM(n=2), *, **: P<0.05, 0.01 vs 对照。

All data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=2). *, **: P<0.05, 0.01 vs control.

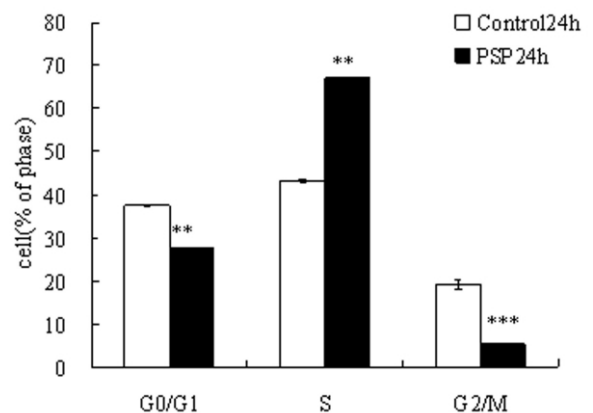


图3 PSP 0.1 mg/ml 处理 Molt-4 细胞 24h 各周期时相细胞分布百分比的变化

Fig.3 cell cycle phase distribution changes in Molt-4 cells treated with 0.1 mg/ml PSP for 24h

数据表示为 mean $\pm$ SEM(n=2), *, **: p<0.05, 0.01 vs 对照

All data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=2). *, **: p<0.05, 0.01 vs control

[2] Begg AC, McNally NJ, Shrieve DC, et al. A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample[J]. Cytometry, 1985, 6(6): 620-626

[3] Cui J, Chisti Y. Polysaccharopeptides of Coriolus versicolor: physiological activity, uses, and production [J]. Biotechnol Adv, 2003, 21(2): 109-122

[4] Ng TB. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom Coriolus versicolor (Basidiomycetes: Polyporaceae)[J]. Gen Pharmacol, 1998, 30(1): 1-4

[5] Lee C, Yang X, Wan JM. The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharopeptide derived from Coriolus versicolor [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(1-2): 14-21

[6] Hsieh TC, Kunicki J, Darzynkiewicz Z, et al. Effects of extracts of Coriolus versicolor (I'm-Yunity) on cell-cycle progression and

表 1 PSP 对 Molt-4 细胞周期相对移动参数和 DNA 合成时间的影响
Table 1 The effect of PSP on relative movement and DNA synthesis time of the Molt-4 cells

	Time(h)	RM	Ts
Control	12	1.05± 0.01	12.10± 0.58
PSP(0.1 mg/ml)	12	0.61± 0.00*	108.40± 0.22*
Control	24	1.55± 0.01	11.95± 0.43
PSP(0.1 mg/ml)	24	0.65± 0.00*	114.52± 0.31*

数据表示为 mean ± SEM(n=2) ,*,**: P<0.05, 0.01 vs 对照。相对移动参数 $RM(t) = (Flud(t) - FG0/G1)/(FG2/M - FG0/G1)$ Flud(t), FG0/G1 和 FG2/M 分别为 BrdU 标记 t 小时后被 BrdU 标记的未分裂的 S 期细胞(lud) ,G0/G1 期细胞和 G2/M 期细胞的 PI 参数的平均荧光强度(DNA 含量)。DNA 合成时间 $Ts = 0.5 \times t/(RM(t) - RM(0))$ RM(0)和 RM(t) 是 BrdU 标记 t 小时后的相对移动参数 RM(0)设为 0.55。
All data are expressed as mean ± SEM (n=2). *,**: P<0.05, 0.01 vs control. RM, relative movement, $RM(t) = (Flud(t) - FG0/G1)/(FG2/M - FG0/G1)$. Where Flud(t), FG0/G1 and FG2/M are the mean PI fluorescence (DNA content) of the BrdU labelled undivided cells, the G0/G1 and G2/M population at time (t) (hour) after BrdU pulsing. Ts, DNA synthesis time, $Ts = 0.5 \times t/(RM(t) - RM(0))$.RM(0) and RM(t) are the relative movement values at time 0 and t (hour) after BrdU pulsing respectively, RM(0) is estimated to be 0.55.

expression of interleukins-1 beta,-6, and -8 in promyelocytic HL-60 leukemic cells and mitogenically stimulated and nonstimulated human lymphocytes [J]. J Altern Complement Med, 2002, 8 (5): 591-602

[7] Hsieh TC, Wu P, Park S, et al. Induction of cell cycle changes and modulation of apoptogenic/anti-apoptotic and extracellular signaling regulatory protein expression by water extracts of I'm-Yunity (PSP) [J]. BMC Complement Altern Med, 2006, 6: 30

[8] Fogt F, Wan J, O'Hara C, et al. Flow cytometric measurement of cell cycle kinetics in rat Walker-256 carcinoma following in vivo and in vitro pulse labelling with bromodeoxyuridine[J]. Cytometry, 1991, 12 (1): 33-41

[9] 马晓方, 杜晓光, 辛现良, 等. 肿瘤细胞恶性增殖和细胞周期调控改变的分子机制[J]. 现代生物医学进展, 2009(05): 950-953
MA Xiao-fang, DU Xiao-guang, XIN Xian-liang, et al. Molecular mechanism of tumor cell proliferation and cell cycle regulation[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009(05): 950-953

[10] Sears RCAJ. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate[J]. J. Biol. Chem, 2002, 277: 11617-11620

[11] Nimmagadda S, Shields AF. The role of DNA synthesis imaging in cancer in the era of targeted therapeutics [J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(4): 575-587

[12] Wan JM, Sit WH, Louie JC. Polysaccharopeptide enhances the anticancer activity of doxorubicin and etoposide on human breast cancer cells ZR-75-30[J]. Int J Oncol, 2008, 32(3): 689-699

[13] Hui KP, Sit WH, Wan JM. Induction of S phase cell arrest and caspase activation by polysaccharide peptide isolated from Coriolus versicolor enhanced the cell cycle dependent activity and apoptotic cell death of doxorubicin and etoposide, but not cytarabine in HL-60 cells[J]. Oncol Rep, 2005, 14(1): 145-155

[14] Wan JM, Sit WH, Yang X, et al. Polysaccharopeptides derived from Coriolus versicolor potentiate the S-phase specific cytotoxicity of Camptothecin (CPT) on human leukemia HL-60 cells[J]. Chin Med, 2010, 5: 16-21

(上接第 3837 页)

[13] Desagher S, Astrid S, Nicols A, et al. Bid induced conformational changes of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis[J]. J Cell Biol, 1999, 144(5): 891-901

[14] Niquet J, Wasterlain CG. Bim, Bad, and Bax: a deadly combination in epileptic seizures[J]. J Clin Invest, 2004, 113: 960-962

[15] Corvera S, Czech MP. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction [J]. Trends Cell Biol, 1998, 8: 442-446

[16] Datta SR, Katsov A, Hu L, et al. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation [J]. MolCell, 2000, 6(1): 41-51

[17] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1998, 281(5381): 1309-1312

[18] Jung JJ, Lim SS, Choi HJ, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells [J]. JNutr Biochem, 2006, 17(10): 689-696

[19] Kim BC, Mamura M, Choi KS, et al. Transforming growth factor beta1 induces apoptosis through cleavage of BAD in a Smad3-dependent mechanism in FaO hepatoma cells [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(5): 1369-1378

[20] Ranta F, Avram D, Berchtold S, et al. Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells an effect reversed by exendin-4 [J]. Diabetes, 2006, 55(5): 1380-1390

[21] Grethe S, Cohella N, Di Renzo MF, et al. p38 MAPK downregulates phosphorylation of Bad in doxorubicin-induced endothelial apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347(3): 781-790

[22] Xiao D, Singh SV. Diallyl trisulfide, a constituent of processed garlic, inactivates Akt to trigger mitochondrial translocation of BAD and caspase-mediated apoptosis in human prostate cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2006, 27: 533-540