

肿瘤细胞周期测定方法研究

高世勇^{1,3}, 谢明宏^{1,3}, 谭慧心^{2*}, 李丹^{1,3}, 李琳^{1,3}, 吴爽^{1,3}, 安娜^{1,3}

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心药物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 哈尔滨医科大学附属第四医院 药学部, 黑龙江 哈尔滨 150001

3. 黑龙江省肿瘤预防与抗肿瘤药物研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 肿瘤是一类与细胞周期密切相关的疾病。流式细胞术对肿瘤细胞周期的分析可以观察到肿瘤细胞倍体的变化, 有助于肿瘤的早期发现和治疗。区分肿瘤细胞所处的细胞周期, 明确地了解每个时相所占细胞周期的比例, 对于肿瘤药物的研发具有重要意义。该文着重对 G₀ 期和 G₁ 期, G₂ 期和 M 期, 以及 S 期细胞的测定方法进行归纳、总结, 并对这些方法的优缺点及适用条件进行阐述和总结, 为肿瘤药物的研发及基础研究等方面的科研工作提供参考。

关键词: 肿瘤; 细胞周期; 测定方法

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)08-1374-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.08.002

Study on the method of tumor cell cycle determination

GAO Shiyong^{1,3}, XIE Minghong^{1,3}, TAN Huixin², LI Dan^{1,3}, LI Lin^{1,3}, WU Shuang^{1,3}, AN Na^{1,3}

1. Institute of Materia Medica of Harbin Commerce University, Harbin 150076, China

2. Department of Pharmacy, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

3. Key Laboratory for Cancer Prevention and Anticancer Drug Research of Heilongjiang, Harbin 150076, China

Abstract: Tumor is a kind of disease that is closely related to cell cycle. The analysis of tumor cell cycle by flow cytometry can observe the change of tumor cell ploidy, which is helpful for early detection and treatment of tumor. It is of great significance to distinguish the cell cycle of tumor cells and to understand the proportion of cell cycle in each phase. In this paper, the determination methods on the G₀ and G₁ phase, the G₂ and M, and S phase are summarized, and at the same time we expounds the advantages and disadvantages of these methods and the suitable conditions., which provide an reference for cancer drug research and pharmacological research.

Key words: tumor; cell cycle; determination method

有资料表明肿瘤是一类细胞周期性疾病^[1], 因此在肿瘤生物学及肿瘤药理学领域对肿瘤细胞周期的分析对肿瘤生物学特征及肿瘤药物作用机制的研究具有重要的意义。流式细胞术是目前分析细胞周期较常用且较先进的技术, 可以对肿瘤细胞的周期进行分析, 通过 DNA 含量和异倍体细胞的存在与否来了解肿瘤细胞组织的恶性程度和发展趋势以及药物对肿瘤的影响。但流式细胞术通过 DNA 含量

分析只能将细胞周期分为 3 个细胞群体, 即 G₀/G₁ 期细胞、S 期细胞、G₂/M 期细胞, 无法将处于 G₀ 期细胞和 G₁ 期细胞以及 G₂ 期细胞和 M 期细胞进行区分, 而在相关的科研工作中, 研究任意一个细胞周期细胞的比例对于深入研究肿瘤的发生、发展以及治疗具有重要意义的。因此基于这样一个现状和认识, 本文整理了细胞周期不同的测定方法, 有吖啶橙(AO)法、双参数二维流式细胞术法、M 期

收稿日期: 2018-05-04

基金项目: 哈尔滨商业大学研究生创新科研资金项目(YJSCX2017-456HSD); 黑龙江省卫生计生委科研课题(2017-132); 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(2017RAXXJ085); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541571); 黑龙江省高等学校创新团队建设计划项目(2014TD009); 哈尔滨商业大学科研团队计划项目(2016TD002); 黑龙江省级领军人才梯队后备带头人资助项目

第一作者: 高世勇, 男, 研究员, 研究方向为抗肿瘤中药研究。E-mail:sygao2002@163.com

***通信作者:** 谭慧心, 女, 主管药师, 研究方向为抗肿瘤中药研究。E-mail:thxydsy@163.com

阳性标志物 p-H3 蛋白标记的方法、激光共聚焦扫描显微术法、Western blot 法、光谱法等, 希望以此能够对细胞周期测定的相关研究提供一定的参考和借鉴。

1 区分 G_0/G_1 期细胞的方法

由于 G_0 期与 G_1 期的 DNA 含量相同, 目前常用碘化丙啶^[2] (propidium, PI)、苏木精-伊红^[3] (hematoxylin-eosin, HE)、4, 6-联脒-2 苯基吲哚^[4] (4, 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 等染料进行标记 DNA, 通过被标记 DNA 的荧光强度采用流式细胞仪判定细胞周期, 只能确定细胞处于 G_0/G_1 期, 而不能明确细胞是在 G_0 期还是 G_1 期, 更不能更细致的区分是 G_1 早期还是 G_1 晚期^[5]。经过整理发现, 将 G_0 期细胞和 G_1 期细胞能够区分开的方法主要有以下几种。

1.1 吖啶橙 (AO) 法

AO 法是通过 AO 与 DNA 和 RNA 结合后颜色的不同来区分 G_0/G_1 期细胞的, AO 与 DNA 结合后发出绿色荧光, 而与 RNA 结合后发出红色荧光^[6]。细胞在 G_0 期不合成 RNA, 在 G_1 期合成 RNA, 因此根据 RNA 被 AO 染成绿色的数量区分 G_0 期和 G_1 期细胞, 同时能够对二者进行定量。魏文等^[5]研究了青蒿琥酯钠体内给药后小鼠骨髓细胞周期的变化, 通过双参数二维等高图显示 DNA-RNA 的含量, 用 AO 法确定了青蒿琥酯钠可以阻滞小鼠正常骨髓细胞在 G_0 期。因此采用此法可将 G_0 期和 G_1 期细胞分开。

AO 法作用于活细胞效果较好^[7], 即细胞无需固定即可在培养液内直接染色, 省去了固定的步骤。可以同时测定 DNA 和 RNA 两个参数, 无需分别检测。可以观察细胞周期的动态变化, 能测定不同周期时相细胞的 RNA 含量^[8], 最主要的是其能通过与 RNA 结合来区分 G_0 期和 G_1 期细胞^[9]。但 AO 染色法也存在一些不足, 比如 AO 染料比较黏着, 容易残留在流式细胞仪管道内, 并且不易清洗, 造成应用其他染料时受到干扰, 因此应用此法检测时需要准备一套专用的流式细胞仪样品管和喷嘴。另外, 试剂的高酸性也容易造成流式细胞仪样品管的堵塞, 这些问题造成了 AO 染色法应用和发展受到了一定的限制^[10], 而且相对 PI 染色法而言, AO 染色法染色步骤比较繁琐, 不如 PI 染色法操作简便^[5]。

1.2 cyclin E/DNA 二维流式细胞术法

cyclin E 为 G_1 期细胞周期特异性蛋白, 通过

cyclin E/DNA 双参数流式细胞术分析, 根据 cyclin E 表达的有无, 将 G_0/G_1 期区分开, 再根据 cyclin E 在 G_1 期由低到高的变化特点可以进一步将 G_1 期细胞分为 G_1 早期和 G_1 晚期细胞^[11-12]。Zhang 等^[13]通过流式 cyclin E/DNA 双染法, 对人脑胶质瘤细胞 U251 进行细胞周期分析, 结果如图 1 所示, G_0 期细胞不表达 cyclin E, 因此在最下方; G_1 早期细胞为 cyclin E 弱阳性, 在中部; 而 G_1 晚期细胞为强阳性, 在上方。王尊等^[14]采用 Cyclin E/DNA 双参数分析法测定了紫外线照射后的 MOLT-4 急性淋巴细胞白血病细胞所处的细胞周期, 证明了凋亡发生在特异性细胞的 G_1 晚期。

cyclin/DNA 二维流式细胞术是通过抗体与细胞周期蛋白特异性结合, 观察二维等高图 cyclin 蛋白表达情况来区分细胞周期的。其可以避免对细胞使用同步化, 因此能检测特征相同的细胞, 也能检测不同特征的单个或多个细胞。但是单个 cyclin/DNA 分析不能同时区分一个样本中细胞的各个周期。此法的不足在于操作较复杂, 并且成本较高, 所以在应用上会受到一定的限制。

此方法在操作时需注意由于不同细胞膜受体表达量不同, 造成细胞周期特异性凋亡的最佳时间点不同, 如果作用时间过长会产生细胞碎片, 并且细胞的代谢产物对培养环境会造成影响, 如果出现旁观者效应则会影响结果的分析^[15]。

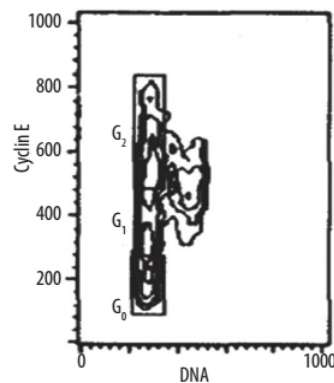


图1 cyclinE 二维等高图

Fig. 1 Two-dimensional contour map of cyclinE

2 S 期细胞的鉴定方法

鉴定 S 期最常用的方法为 PI 染色法, 通过流式细胞术获得直方图后, 经流式细胞仪数据处理软件处理即可确定 S 期细胞的比例。其原理是根据细胞周期各时相的 DNA 含量不同, S 期的含量介于二倍

体和四倍体之间, PI 可以和 DNA 结合, 通过其荧光强度直接反应细胞内的 DNA 含量。高默杰等^[16]通过流式二维直方图证实硅巴因和华蟾毒配基均可引起 HepG2 细胞发生 S 期阻滞。

另外一个分析 S 细胞比例的方法是 Dolbeare 等^[17]于 1983 年报道的 BrdU 与 DNA 同步分析细胞增殖周期的方法。这个方法的测定原理是 BrdU 为胸腺嘧啶脱氧核苷类似物, BrdU 暴露出来能够被抗 BrdU 单抗识别, 如果将 DNA 双链打开变成两个单链核酸, BrdU 能够竞争性地与 S 期细胞新合成的 DNA 结合, 通过免疫荧光技术对增殖细胞进行标记, 从而实现 S 期的分析^[18]。Sasaki 等^[19]发现在培养细胞过程中掺入 BrdU, 并分别于连续增长的时间点收集细胞, 经处理后通过流式细胞术可测定 S 期的细胞含量。

近年来, EdU 标记方法在细胞增殖实验中使用越来越广泛。EdU 标记方法的原理是 S 期细胞在增殖的过程中, EdU 作为底物结合到正在复制的 DNA 链中, 再通过偶联把所有含有新合成 DNA 链的 DNA 标记上特殊荧光。这样就可以通过检测荧光的情况, 检测细胞的增殖和周期。Zeng 等^[20]用 EdU 标记法研究动物神经细胞的增殖, 并与 BrdU 标记的方法结果进行比较, 从而证实了 EdU 标记法检测细胞增殖是可行的。

另外, 还有一些方法可以将 S 期进行更详细划分的方法, 比如增殖细胞核抗原 (PCNA) /DNA 流式细胞术^[21], 可以将 S 期分为不同的 S 亚期^[22]。

BrdU 标记法使用过程中, 在 BrdU 与抗体结合前, 首先要将 DNA 变性, DNA 变性会导致 DNA 的双链结构被破坏, 从而影响其他染料的结合, 因此存在导致准确性降低等问题。而由于 EdU 的相对分子质量小于 BrdU, 更容易在细胞内扩散, 另外不需要对样品进行严格的变性处理, 从而有效地避免样品损伤, 因此具有更高的灵敏度和更快的检测速度。缺点是 EdU 也有一定的毒性, 会对 DNA 产生一定的损伤^[23]。应用最广泛的还是 PI 染色法, 操作方便, 实验快速, 可进行定量, 最主要的是其实验成本低, 无需使用抗体即可检测出 S 期细胞, 适合大样本量的预实验和新药筛选。而 PCNA/DNA 流式细胞术则是应用在要求更精准的实验中, 因此可针对不同的实验要求来选择实验方法。

3 G₂/M 期的区分方法

由于 G₂ 期和 M 期的 DNA 含量相同, 目前常

用碘化丙啶^[24]等染料标记, 流式细胞仪测定细胞周期的方法, 只能确定细胞处于 G₂/M 期, 而不能明确细胞是在 G₂ 期还是 M 期。经过整理发现, 目前区分 G₂ 期和 M 期的方法主要有以下几种。

3.1 M 期阳性标志物 p-H3 蛋白标记的方法

磷酸化组蛋白 H₃ (p-H3) 是细胞有丝分裂的标志性受体, 只出现在有丝分裂的染色体上, 因此 M 期细胞 p-H3 表达呈阳性, 而 G₂ 期细胞 p-H3 表达呈阴性^[25]。Oleksandr Pastukhov 等^[26]发现神经酰胺激酶抑制剂 (NVP-231) 能分别阻滞肺癌和胃癌细胞在细胞的 M 期, 加入一抗 p-H3 和 Alexa 488 荧光标记的二抗, 采用流式细胞术, 通过 p-H3 抗体标记细胞的数量来代表 M 期的细胞数, 计算 M 期细胞占有所有细胞的百分比 (即有丝分裂指数), 通过百分比的增加可以证实细胞被阻滞在 M 期, 并进一步通过 western blot 法检测 M 期标志性蛋白 p-H3 组蛋白的表达情况^[26], 证实 NVP-231 能将细胞阻滞在 M 期而不是 G₂/M 期的边缘, 证实 p-H3 抗体标记法测定 M 期细胞的可行性。廖菁等^[27]通过免疫荧光显微镜观察细胞有丝分裂情况, 用双重免疫荧光染色, 加入 p-H3 抗体, 再用 FITC 标记的兔二抗与其结合染成绿色, 最后加入 Hoechst33342 染色液对所有细胞进行染色染成蓝色, 确定 M 期细胞的数量。

通过荧光显微镜, 流式细胞术和 western blot 法分别能检测出 M 期阳性标志物 p-H3 的表达情况, 荧光显微镜和 western blot 法可以对 M 期的细胞进行定性分析, 流式细胞术可以对其进行定量分析, 因 p-H3 为有丝分裂期的特异性蛋白, 可采用多种方法对其检测, 来验证实验的准确性。

3.2 激光共聚焦扫描显微术测定法

激光共聚焦扫描显微镜通过 G₂ 期和 M 期的细胞形态的差异可以将 G₂ 期和 M 期细胞加以区分。G₂ 期细胞体积大, 细胞核丰富呈大圆形、马蹄形、肾形或分叶状, 但无明显极性并且不存在分裂相。M 期细胞已经开始分裂, 染色体沿赤道板开始一分为二的分裂, 从分裂早、中、晚期呈现一系列明显的极向性特征。形态特征表现为细胞膜首先向一端或两端突出, 细胞形状出现梨形、榔头形等不规则变化, 随后细胞核呈靴形、花生形、哑铃状等不规则形变化。钟以胜等^[28]利用甲安吡啶和长春花碱作用于 MOLT-4 急性淋巴细胞白血病细胞, 通过共聚焦扫描显微镜发现甲安吡啶能诱导细胞产生 G₂ 期阻滞, 而长春花碱能诱导细胞产生 M 期阻滞形态

特征。

激光共聚焦显微镜是继流式细胞术分析后,能通过细胞形态区分细胞周期的又一使用较广泛的仪器,它的应用始于20世纪80年代,可以对组织细胞内的多种生化成分进行定性、定量、定位的检测。此方法在区分细胞周期实验方面具有操作简便,分辨力较高,能对活细胞进行动态监测,断层扫描和三维图像重建等优点,但其是通过不同细胞周期所处的形态进行分析,因此只能对结果进行定性分析,并且需要借助流式细胞术来确定大致的细胞周期后,再对细胞周期进行细致的区分。

3.3 cyclin A/DNA 二维流式细胞术

cyclin A 在 G_2 期表达阳性,而在 M 期表达阴性。在 cyclin A/DNA 的流式细胞仪的二维等高图上,可以通过 cyclin A 的表达情况将同为四倍体的 G_2 期和 M 期细胞区分开来,以 DNA 的含量为横坐标, cyclin A 表达的荧光强度为纵坐标, cyclin A 在 M 期为阴性,而在 G_2 期为 cyclin A 阳性^[10],如图 2。Gong 等^[11]采用多参数流式细胞术利用长春花碱作用急性淋巴细胞白血病 MOLT-4 细胞,发现同为四倍体的 G_2 期和 M 期细胞可以通过 cyclin A 荧光强度表达的强弱对细胞周期进行区分。

此法的适用范围及操作注意事项同 1.2。

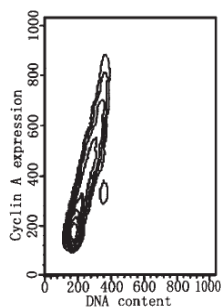


图2 cyclinA 二维等高图

Fig. 2 Two-dimensional contour map of cyclin A

3.4 Western blot 法

某些抗肿瘤药物作用于肿瘤细胞后,通过激活相应检验点的相关蛋白,触发信号传导级联反应,激活由共济失调-毛细血管扩张突变基因(ATM)及 ATM 和 Rad-3 相关蛋白(ATR)调节的网络系统,将损伤信号传递至 G_2 /M 期检测点的核心因子 Cdk1^[29]。Cdk1 作为催化亚基与 cyclinB1 组成高度保守的蛋白激酶复合物-细胞成熟促进因子(MPF),MPF 是真核细胞有丝分裂 G_2 /M 期转换所必须的蛋

白激酶,是 G_2 期进入 M 期的必要条件,MPF 的激活有赖于 cyclinB1 的表达,因此如果 cyclinB1 的表达有所升高,表明 MPF 被激活,细胞进入 M 期; Cdk1 在 G_2 晚期表达,如果表达有所下降则表明细胞进入了 M 期。OleksandrPastukhov 等^[26]通过实验证实 cyclinB1 在 Ser133 磷酸化位点浓度相关性上调; Cdk1 在 Tyr15 磷酸化位点下调,都证实了细胞阻滞在 M 期而不是 G_2 期,因此通过 cyclinB1 和 Cdk1 的表达可以区分 G_2 期和 M 期细胞。

Western blot 法是测定肿瘤细胞周期应用非常广泛的方法,通过一系列细胞周期蛋白的级联反应来确定细胞所处的周期,但此法只能是对细胞周期进行定性分析而非定量分析。此法不能单独作为鉴定细胞周期的方法,需与其他方法联用会更有说服力。

3.5 吖啶橙(AO)法

AO 是非特异性阳离子染料,利用流式细胞术和 AO 多向性染色的特点,可以鉴别原位 DNA 对酸的敏感性。M 期细胞染色质较密, DNA 对酸敏感且易变性而被染成红色,所以变性细胞即 M 期细胞,而 G_2 期细胞 DNA 对酸不敏感, DNA 不易变性,经 AO 染色呈绿色。褚嘉佑等^[6]应用吖啶橙酸变性染色法流式细胞术检测,用 5-氟脱氧尿嘧啶核苷同步化技术处理肺癌细胞系 GLC-82 和 HAC-84,应用吖啶橙酸变性染色法流式细胞术检测发现细胞 M 期比例明显增加。

此法的适用范围如 1.1 所述。

3.6 光谱法

光谱法分为细胞自发荧光光谱法和紫外光谱法。其原理是细胞在分裂过程中的 G_1 、S、 G_2 、M 期等不同细胞周期变化过程中,细胞内的氨基酸、核酸、蛋白质等胞内荧光物质会不断的发生变化,从而造成荧光光谱的峰位、峰强等峰谱信息的变化,因此找出这些参数变化与细胞各个周期的关系,建立特定周期细胞的荧光光谱或者紫外光谱模型,即可实现对细胞所处的具体细胞周期进行定性研究。林晓钢等^[30]采用紫外光谱法测量 HeLa 细胞周期,对 G_2 期和 M 期的细胞进行了较好的区分,提供了一个除了采用流式细胞仪对细胞周期进行测定以外的有一个较好的细胞周期测定方法。

采用光谱法测定细胞周期方法的主要优点有制样程序简单,操作方法简便,仪器设备普及率较高,测定准确性高,测量速度快等诸多的优点,应用细

胞吸收峰强度随细胞周期变化的关系,可很方便地对细胞周期进行判断,有利于在生物医学研究过程中推广应用^[31]。

4 结语

测定细胞周期应用最广泛的技术为流式细胞术,本文主要介绍将细胞周期进行详细划分研究的方法,为肿瘤生物学及肿瘤药理学研究提供参考。

目前细胞周期测定的方法中,PI染色法的应用最广泛,但其不能对细胞周期进行详细的区分,并且其检测结果的重复性不是很好,其原因就在于实验研究过程中每个批次的细胞在周期运行时处于不同的时相的比例是不同的,为了避免这个问题可以采用细胞周期同步化的方法对目标细胞进行同步化预处理^[32]。而cyclin/DNA二维流式细胞术则不需要对细胞进行同步化,使得操作步骤简化,但因为其使用成本较高,因此未得到广泛的应用。另外M期阳性标志物p-H3蛋白标记方法区分G₂/M期细胞也是由于成本较高造成应用受限。AO法是很早应用的检测方法,但因其操作的局限性,应用收到了一定限制。Western blot法是较为常用的技术,但其只能对细胞周期进行定性分析,因此在准确度方面有所欠缺。光谱法操作方便,仪器设备要求不高,因此在今后的生物学研究中会得到广泛的应用。

不同的方法有不同的特点和适用范围,在实验过程中,可根据实验室实验条件、实验结果的精准度来选择,以及实验的具体目标来选择适合的方法进行,以期达到理想的效果。

参考文献

- [1] Sherr C J. Cancer cell cycle [J]. Science, 1996, 274: 1672-1677.
- [2] 颜克强. 小檗碱对膀胱癌的抑制作用及其机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [3] 史艳宇. 西洋参有效部位诱导肿瘤细胞凋亡及其分子机制研究 [D]. 吉林大学, 2006.
- [4] 麦丽萍, 钟诗龙, 杨敏, 等. 两种不同染色法在流式细胞术中检测细胞周期的探讨 [J]. 热带医学杂志, 2011, 11(12): 1363-1366, 1480.
- [5] 魏文, 冯宇霞, 张双喜, 等. 吡啶橙与碘化丙啶检测细胞DNA方法的比较 [J]. 中华物理医学杂志, 1994(03): 166-169.
- [6] 褚嘉佑, 吴旻, 魏文, 等. 应用流式细胞术检测同步化处理的肺癌细胞系细胞周期 [J]. 张家口医学院学报, 1994(3): 15-17+105-106.
- [7] Darzynkiewicz Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cell and isolated cell nuclei with acridineorange [M]. //Darzynkiewicz Z, Crissman H A, eds. Flow Cytometry. San Diego: Academic Press, 1990: 285-298.
- [8] 宋平根, 李素文, 薛绍白, 等. 用双参数流式细胞光度术(FCM)研究阿克拉霉素对L1210白血病细胞周期的影响 [J]. 生物物理学报, 1987(2): 112-119.
- [9] Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, et al. Lymphocyte stimulation: A rapid multiparameter analysis [J]. Proc Natl AcadSci USA, 1976(8): 2881.
- [10] 覃吉超, 陶德定, 舒丹, 等. 一种新的细胞周期分析方法 [J]. 癌症, 2001(2): 206-210.
- [11] Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Discrimination of G₂ and mitotic cells by flow cytometry based on different expression of cyclins A and B1 [J]. Exp Cell Res, 1995, 220(1): 226-231.
- [12] Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Growth imbalance and altered expression of cyclin B1, A, E and D3 in MOLT-4 cells synchronized in the cell cycle by inhibitors of DNA replication [J]. Cell Growth Differ, 1995, 6(11): 1485-1493.
- [13] Zhang L, Liang P, Zhang R et al. Impact of mitochondria-mediated apoptosis in U251 cell cycle arrest in G₁ stage and caspase activation [J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 3629-3633.
- [14] 王尊, 黄丹, 葛军娜, 等. 分选后晚G₁期凋亡细胞Cyclin E表达分析 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2009, 38(01): 36-38, 48.
- [15] 杨长永, 陈传波, 陶德定, 等. 双参数流式细胞术检测Molt-4和Jurkat细胞膜受体途径凋亡的始动位点 [J]. 郑州大学学报: 医版, 2010, 45(2): 195-198.
- [16] 高默杰, 徐忠伟, 王凤梅, 等. 钠钾泵抑制剂通过调节细胞周期相关蛋白的生成介导肝癌HepG2细胞周期S期阻滞与凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(4): 452-456.
- [17] Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini M G, et al. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine [J]. Proc Natl AcadSci USA, 1983, 80: 5573-5577.
- [18] Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation [J]. Brain Res Rev, 2007, 53(1): 198-241.
- [19] Sasaki K, Murakimi T, Takahashi M. A rapid and simple estimation of cell cycle parameters by continuous labeling with bromodeoxyuridine [J]. Cytometry, 1987, 8(5): 526-528.
- [20] Zeng C, Pan F, Jones LA, et al. Evaluation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult

- nervous system [J]. Brain Res, 2010, 1319: 21-32.
- [21] Celis J E, Madsen P, Nieslen S. Nuclear patterns of cyclin (PCNA) antigen distribution subsivide S-phase in cultured cell some applications of PCNA antibodies [J]. Leuk Res, 1986, 10: 237-249.
- [22] Julio E, Celis, Peder Madsen, et al. Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase δ) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division) [J]. Fed Eur Biochem Soc, 1987, 220: 4.
- [23] 罗 涛, 王彤敏, 李力燕. EdU 与 BrdU 在检测细胞增殖中的特点及应用进展 [J]. 重庆医学, 2015, 44(32): 4581-4583.
- [24] 柳 星. 大蒜素对人胃癌细胞 SGC-7901 及 BGC-823 G₂/M 期阻滞作用及其调节机制的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2005.
- [25] KOheiOkuyama, Atsushi Kaida, Yoshiki Hayashi, et al. KPU-300, a novel Benzophenone-Diketopiperazine-Type anti-microtubule agent with a 2-Pyridyl Structure, is a potent radiosensitizer that synchronizes the cell cycle in early M phase [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0145995.
- [26] OleksandrPastukhov, Stephanie Schwalm, Uwe Zangemeister-Wittke, et al. The ceramide kinase inhibitor NVP-231 inhibits breast and lung cancer cell proliferation by inducing M phase arrest and subsequent cell death [J]. Brit J Pharmacol, 2014, 171, 5833.
- [27] 廖 菁, 胥 琴, 杨宗元, 等. 低浓度紫杉醇诱导卵巢癌 SKOV3 细胞有丝分裂阻滞及细胞凋亡的机制研究 [J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(15): 2422-2426.
- [28] 钟以胜, 潘长穿, 金昌男, 等. 流式细胞术联合共聚焦显微镜对 G₂ 和 M 期作用位点的鉴别意义 [J]. 中国实验血液学杂志, 2009(4): 965-968.
- [29] 韦祖巧. 白屈来碱对人胃癌细胞 SGC-7901 的 G₂/M 期阻滞作用及机制研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2011.
- [30] 林晓钢, 潘英俊, 郭永彩, 等. 利用紫外光谱法测定细胞周期的方法 [P]. 中国: CN101329270, 2008-12-24.
- [31] 林晓钢, 潘英俊, 郭永彩, 等. 利用细胞自发荧光光谱测定细胞周期的方法 [P]. 中国: CN101363836, 2009-02-11.
- [32] 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(01): 17-21.