

## · 基础研究 ·

# 激光共聚焦显微成像技术对亚细胞位点光动力损伤的动态观察

戴维德 李晓松 曾晶 刘凡光 顾瑛

**【摘要】目的** 探讨应用激光共聚焦显微成像技术对光动力效应所致亚细胞位点损伤进行动态观察的可行性。**方法** 实验分为 HMME + Rhodamine-123 组、单加 HMME 组、单加 Rhodamine-123 组和单纯细胞组,后 3 组作为对照组。传代培养鼠肺毛细血管内皮细胞,将血卟啉单甲醚(HMME)与内皮细胞共同孵育 24 h 后,加入细胞探针 Rhodamine-123 对线粒体进行染色。应用激光共聚焦显微镜并采用细胞器-细胞荧光强度比值法对 HMME 进行亚细胞定位,随后采集 Rhodamine-123 的荧光图像动态序列。**结果** HMME + Rhodamine-123 组的 Rhodamine-123 荧光图像在光照过程中逐渐发生变化:典型的线粒体形态特征逐渐消失,并伴有荧光强度下降,荧光在胞浆内趋于弥散分布,细胞核内出现 Rhodamine-123 的荧光;而单加 Rhodamine-123 组的 Rhodamine-123 荧光图像未发生明显变化。**结论** 应用激光共聚焦显微成像技术能实现亚细胞水平光敏损伤位点的动态光学检测,线粒体和核膜可能是 HMME 介导的光动力损伤亚细胞位点。

**【关键词】** 激光共聚焦显微成像; 光动力损伤; 亚细胞; 动态

## Adopting laser scanning confocal microscopy in dynamic observation of photodamage of subcellular sites

DAI Wei-de, LI Xiao-song, ZENG Jing, LIU Fan-guang, GU Ying. Department of Laser Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

**【Abstract】Objective** To dynamically observe photodamage of subcellular sites by use of laser scanning confocal microscopy (LSCM). **Methods** The samples were divided into four groups. Murine lung endothelial cells were subcultured and incubated with HMME for 24 hours. Then the cells were stained with rhodamine-123 for demonstration of mitochondria. LSCM was applied and organelle-cell fluorescence intensity ratio analysis was adopted to study the intracellular distribution of HMME. Then dynamic fluorescence images sequence of rhodamine-123 was collected. **Results** Rhodamine-123's fluorescence images of cell sample with HMME was changed gradually during irradiation; the typical characteristic of mitochondria disappeared gradually with decreasing fluorescence intensity. The fluorescence of rhodamine-123 was diffused and distributed in nuclear, while rhodamine-123's fluorescence images of cell sample without HMME was not changed. **Conclusion** Mitochondria and nucleus are photodamage sites by HMME-PDT; LSCM can be applied in dynamic observation of photodamage of subcellular sites.

**【Key words】** Laser scanning confocal microscopy; Photodamage; Subcellular; Dynamic observation

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)至今已有 20 余年的发展历史,对其作用机制的研究不断取得进展<sup>[1]</sup>。对光动力损伤位点的研究多采用电镜观察(普通光镜极限分辨率为 200 nm,而电镜分辨率可达到 0.1 nm),可清晰地观察到光动力损伤后细胞超微结构的变化<sup>[2]</sup>。但其不足之处在于标本制作复杂,难度较大,周期长,费用昂贵,观察时间滞后。本研究采用荧光探针特异性标记细胞器,并以激光共聚焦显微成像系统(laser scanning confocal microscopy, LSCM)的荧光激发光源作为光敏剂光动力效应的激发光,通过观察单细胞在光照过程中细胞器探针荧光形态特征的动态变化,实现了亚细胞水平光敏损伤位点的动态光

学检测,现报道如下。

## 材料与方法

### 一、主要仪器和试剂

实验系统采用美国 Bio-Rad 公司产 Radiance 2100TM 型激光共聚焦显微成像系统; Nikon TE300 型倒置显微镜,以 100 倍油镜观察;光电倍增管(photo-multiplier tube)接收图像并输入计算机进行分析,结果图像像素为 512 × 512,灰度级为 8 位,灰度范围为 0 ~ 255。

血卟啉单甲醚(hematoporphyrin monomethyl ether, HMME)由第二军医大学药物化学研究所提供,规格为 10 mg/ml; Gibicol life 公司产改良的 Eagle's 培养基(Dulbecco modified eagle's medium, DMEM)、胎牛血清;美国 Sigma 公司产胰酶、线粒体荧光探针 Rhoda-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 60078021)

作者单位:100853 北京,解放军总医院激光医学科(戴维德现在北京大学临床肿瘤学院从事博士后研究工作)

mine-123(激发波长为 505 nm,发射波长为 534 nm)。

## 二、方法

1. 实验分组:分为 HMME + Rhodamine-123 组、单加 HMME 组、单加 Rhodamine-123 组和单纯细胞组,后 3 组作为对照组。各组细胞培养方法均相同。

2. 细胞培养、HMME 孵育及荧光探针染色方法:鼠肺毛细血管内皮细胞(1H11 细胞系)由上海复旦张江生物医药公司提供,细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/ml,采用直径为 35 mm 特制培养皿,每皿加入含 20% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基 2 ml,传代培养 24 h。HMME + Rhodamine-123 组在细胞完全贴壁后,于培养皿内加入 HMME,调节终浓度为 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,与细胞共同孵育 24 h。然后在完全避光的条件下,将 Rhodamine-123 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )与细胞共同孵育 0.5 h,用 PBS 洗 3 遍。单加 HMME 组不进行 Rhodamine-123 探针染色,单加 Rhodamine-123 组细胞不加 HMME,单纯细胞组仅进行传代培养。

3. 图像采集:选择 HMME + Rhodamine-123 组的靶细胞于 LSCM 下观察,采用 100 倍油镜,数值孔径为 1.4,由光电倍增管接收信号并输入计算机成像。(1)激发顺序:采用氩离子激光器(激光能量 49.3%,增益 33.60),先以波长 488 nm 的激光激发 Rhodamine-123 荧光,再以 405 nm 的激光激发 HMME 荧光;(2)采用配置有 530/60-G 发射滤光片的通道 1 探测细胞探针 Rhodamine-123 的绿色荧光,采用配置有 E600 LP-R 发射滤光片的通道 2 探测 HMME 的红色荧光;(3)细胞器探针荧光图像与 HMME 荧光图像分别显示为绿色与红色的伪彩色输出。单加 HMME 组采用 Rhodamine-123 的荧光激发条件(波长 = 488 nm)、单加 Rhodamine-123 组采用 HMME 的荧光激发条件(波长 = 405 nm)分别采集图像,而单纯细胞组分别采用两种荧光激发条件采集图像。

4. 光照过程中细胞器探针荧光形态特征的动态变化观察:应用 LSCM 系统氩离子激光器,以波长为 488 nm 的激光激发 Rhodamine-123 荧光,波长为 405 nm 的激光激发 HMME 荧光。对同一单细胞连续采集 Rhodamine-123 的动态序列荧光图像,每 2 幅图像的采集间隔 2 s。观察单加 Rhodamine-123 组与 HMME + Rhodamine-123 组的 Rhodamine-123 荧光在光照过程中发生的形态特征变化。

5. HMME 的亚细胞定位及定量分析:于 HMME + Rhodamine-123 组中选取 10 个细胞。每个细胞分别采集 2 幅图,包括探针荧光图和光敏剂荧光图。图像为 8 位 TIF 格式,灰度范围为 0 ~ 255。根据探针荧光强度来确定探针荧光图中探针所标记的细胞器位置。具体方法参考文献[3]:(1)设定参数  $m$ ,将探针荧光图中

细胞内各像素点按灰度的大小由高到低排列,取灰度最高的前  $m$  像素作为细胞器位置所在像素。 $m$  值的大小反映细胞器聚集程度的高低, $m$  值越高,细胞器聚集程度越低。(2)参照上一步分割出的细胞器像素,计算光敏剂荧光图中相应位置像素的灰度均值,得到细胞器中光敏剂荧光的平均灰度  $J_1$ 。(3)应用图像锐化、边缘检测与提取、图像分割等图像处理技术,从图像背景中分割出细胞的形态轮廓。(4)根据所分割出的细胞轮廓,计算光敏剂荧光图中此轮廓范围内像素的灰度强度均值,得到细胞内光敏剂荧光的平均灰度强度值  $J_2$ 。(5) $J_1/J_2$  为细胞器中光敏剂荧光的平均灰度强度与细胞中光敏剂荧光的平均灰度强度之比,反映细胞器结合光敏剂能力的强弱。(6)分别计算  $m$  为 5%、10%、15%、20%、25% 和 30% 时的  $J_1/J_2$ ,观察细胞器聚集程度不同时,细胞器结合光敏剂的能力强弱变化趋势,二者的相关性作为判定 HMME 在该细胞器内分布与否的依据。

## 三、统计学分析

应用 SPSS 11.0 统计软件,采用单因素方差检验进行细胞及细胞器平均灰度比值的分析。

## 结 果

### 一、各组荧光探测结果

单纯细胞组在激发 HMME 或 Rhodamine 123 荧光条件下均未探测到自体荧光;单加 HMME 组细胞在激发 Rhodamine 123 荧光条件下仅探测到背景噪音;单加 Rhodamine-123 组细胞在激发 HMME 荧光条件下也仅探测到背景噪音。这说明 Rhodamine-123 激发出的荧光在光谱上能和 HMME 荧光明显区分。

### 二、LSCM 下 Rhodamine-123 动态荧光图像

HMME + Rhodamine-123 组的 Rhodamine 123 动态荧光图像序列中可观察到 Rhodamine 123 荧光形态特征的动态变化过程。图 1 显示,随着照射时间的延长,Rhodamine 123 标记的典型线粒体形态特征逐渐消失,并伴有荧光强度下降,荧光在胞浆内趋于弥散分布;同时,细胞核内逐渐出现绿色荧光,提示 Rhodamine-123 进入细胞核。在光照过程中,单加 Rhodamine-123 组的 Rhodamine 123 荧光始终保持正常的形态特征(图 2),与 HMME + Rhodamine-123 组形成鲜明对比。

### 三、HMME + Rhodamine-123 组线粒体区 HMME 的分布

从图 3 可以看出:随着  $m$  值的增大,即细胞器聚集程度的降低,线粒体分布区域的  $J_1/J_2$  呈现下降的趋势,二者具有一定的相关性。提示 HMME 分布于线粒体区。

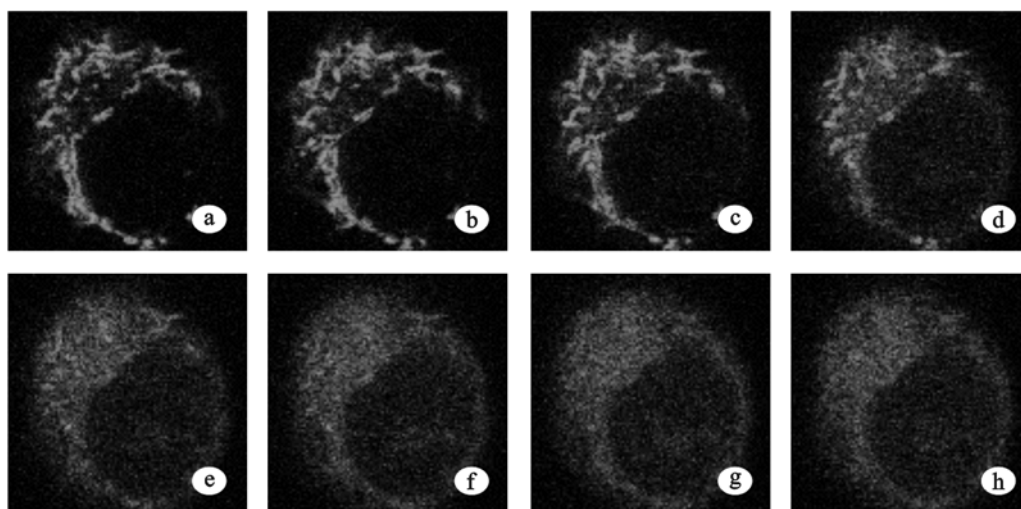


图 1 HMME + Rhodamine-123 组的 Rhodamine-123 荧光动态序列图

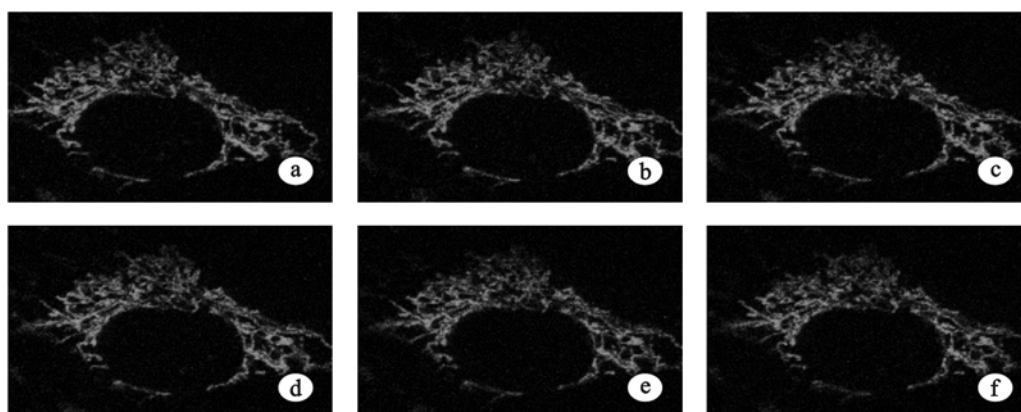
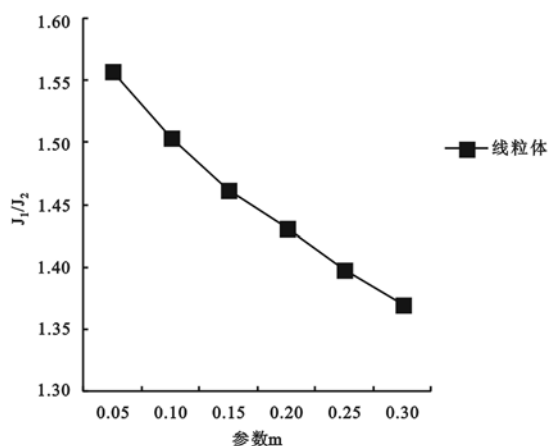


图 2 单加 Rhodamine-123 组的 Rhodamine-123 荧光动态序列图

图 3 线粒体区  $J_1/J_2$  值变化趋势

## 讨 论

LSCM 是 20 世纪 80 年代迅速发展并应用于细胞学分析的新型仪器<sup>[4]</sup>, 该仪器使用多激光系统激光光源, 其大功率氩离子激光器是紫外光和可见光混合激光器, 分为紫外光、蓝光和绿光。LSCM 的优点是各谱

线激光单独发射, 不存在谱线竞争的干扰, 调节方便。有学者在 PDT 研究中利用 LSCM 的荧光激发光源作为 PDT 效应的激发光源。1996 年, König 等<sup>[5]</sup> 首次利用 LSCM 的微束激光来研究光动力作用引起的细胞损伤, 将光敏剂与人及鸡红细胞共同孵育后, 以 488 nm 激光微量照射 (15 mW), 通过激光扫描共聚焦荧光显微镜观察到由此引起的溶血反应, 认为红细胞是光动力损伤的重要攻击目标之一。Liang 等<sup>[6]</sup> 在研究光敏剂 5-氨基酮戊酸 (5-ALA) 的亚细胞损伤时, 采用了在 LSCM 下对单个靶细胞进行分区照射的方法, 照射区域分别为核中心、核周胞浆及外围胞浆等。结果显示细胞核是 PDT 最敏感区域, 其次为核周胞浆和外围胞浆。

本研究所应用的国产新型光敏剂 HMME 的荧光效率较低, 而 LSCM 对微弱荧光的探测灵敏度有限, 所以进行亚细胞定位研究时, 必须提高光敏剂孵育浓度、增大激发光强度和针孔尺寸、延长扫描时间及增加扫描累加次数<sup>[7]</sup>。但这些措施在降低系统分辨率的同时, 不利于抑制 HMME 的光动力效应, 从而会导致细胞光敏损伤, 使光敏剂发生光漂白, 在一定程度上影响

细胞的正常生理状态。应用 LSCM 采集双标记荧光探针图像时,传统方法是在单次扫描成像过程中,对每一像素同时或交替激发,并采集 HMME 与细胞器探针的荧光图像,一次扫描即获得 2 幅荧光图像。而较高浓度的光敏剂受激发光作用后会发生光敏化反应,细胞的正常生理状态发生改变,最后无法采集到荧光探针标记细胞器的正常形态特征。因此,在研究光敏剂亚细胞定位时,必须尽量避免荧光激发光对光敏剂光动力效应的激发作用。

为此,我们舍弃了传统的“同时或交替激发法”,而采取“先后激发法”<sup>[8]</sup>,即分别进行 2 次扫描,第 1 次仅激发和采集细胞器探针的荧光图像,第 2 次仅激发和采集光敏剂的荧光图像。第 1 次扫描过程中,细胞器探针的激发光由于远离光敏剂吸收峰,对光敏剂的影响很小,甚至可以忽略,消除了光动力效应的干扰,可采集到正常的细胞器荧光探针的特征性荧光图像。这样,就能保证在尽量排除光动力效应干扰的情况下,采集到最接近正常状态的单细胞光敏剂和细胞器探针荧光图像,确保定性和定量分析结果的正确。而在进行单细胞光敏损伤位点检测研究时,则可以利用 LSCM 同时或交替激发所引起细胞光敏损伤的特点,以 LSCM 的荧光激发光源同时作为光敏剂光动力效应的激发光源,对单细胞进行照射,并在产生光动力效应的过程中实现实时荧光显微成像,研究单细胞光动力效应。

利用荧光探针特异性地结合于细胞器,在适当波长的光照激发下能发出一定波长荧光的特点,可以考察某一细胞器区域光敏剂的分布情况<sup>[9]</sup>。由于 PDT 产生的活性氧物质主要为单线态氧,其半衰期极短,不到 60  $\mu$ s,在细胞内的作用半径不超过 40 nm,只能破坏临近的细胞结构。因此,光敏剂在细胞内的亚细胞分布一定程度上决定着光敏化作用的亚细胞损伤位点<sup>[10]</sup>。HMME 分布于线粒体是其发生光动力损伤的重要依据。线粒体内膜呈负电位,Rhodamine-123 作为一种阳离子探针而易被其吸附<sup>[11]</sup>。线粒体损伤后,内膜电位差被破坏,不能提供足够的电位梯度使 Rhodamine-123 吸附和保留于线粒体上,荧光发生弥散,其强

度也随之下降。我们的研究发现,Rhodamine-123 在光照前特异性地结合于胞浆中的线粒体,在光照过程中其荧光分布模式发生了显著的变化,胞核内出现较弱的绿色荧光。而单加 Rhodamine-123 的对照组在相同条件下未发生以上改变。原因可能在于卟啉类光敏剂通常分布于细胞的膜性结构,包括核膜,核膜受损后,Rhodamine-123 可进入细胞核,我们推测核膜也可能是 PDT 损伤位点。

总之,我们发现线粒体和核膜可能是 HMME 介导的光动力损伤亚细胞位点,应用 LSCM 可实现亚细胞水平光敏损伤位点的动态光学检测,为进一步研究细胞的光动力损伤机制提供了新的思路 and 手段。

### 参 考 文 献

- 1 Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. Photodynamic therapy. J Natl Cancer Inst, 1998, 90:889-905.
- 2 杨勇骥. 实用生物医学电子显微镜技术. 上海:第二军医大学出版社, 2003. 1-5.
- 3 戴维德, 李晓松, 曾晶, 等. 光敏剂亚细胞定位研究方法的应用比较. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27:513-516.
- 4 李楠. 激光扫描共聚焦显微术. 北京:人民军医出版社, 1997. 3-8.
- 5 Konig K, Kimel S, Berns MW, et al. Photodynamic effects on human and chicken erythrocytes studied with microirradiation and confocal laser scanning microscopy. Lasers Surg Med, 1996, 19:284-298.
- 6 Liang H, Shin DS, Lee YE, et al. Subcellular phototoxicity of 5-Aminolaevulinic Acid (ALA). Lasers Surg Med, 1998, 22:14-24.
- 7 陈文晖, 吴激, 许德余, 等. 正交实验设计优选血卟啉单甲醚的制备反应条件. 第二军医大学学报, 1996, 17:393-395.
- 8 戴维德, 王雷, 刘凡光, 等. 应用激光共聚焦显微成像术研究光敏剂亚细胞定位. 中国激光医学杂志, 2004, 13:12-17.
- 9 李楠, 王凤翔, 周春喜. 荧光探针应用技术. 北京:军事医学科学出版社, 1998. 5-10.
- 10 Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. Meth Enzymol, 2000, 319:376-400.
- 11 Chiu SM, Oleinick NL. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome C release during apoptosis induced by photodynamic therapy. Br J Cancer, 2001, 84:1099-1106.

(修回日期:2005-06-27)

(本文编辑:吴 倩)

· 消息 ·

## 全国理疗康复大专《专业证书》班招生通知

受卫生部委托,全国理疗康复医师培训部将继续举办第二十五届全国理疗康复医师进修班及第十一届全国高等教育理疗康复针推大专专业证书班。学期 1 年,学习专业包括物理医学、康复医学、针灸、按摩等。学费 3 200 元,含住宿费、实习费及学费。本班面向全国各级医疗单位、部队及个体从医者招生,由本人报名或由单位推荐,详情请与培训基地联系。学习期满且考试合格者,由国家卫生部教育司及辽宁中医学院职业技术学院颁发大专专业证书。

联系地址:114048 辽宁省鞍山市汤岗子医院、全国理疗康复医师培训部;电话:0412-2410228;联系人:王先生、唐女士。