

DHL 细胞中 5-ALA 代谢 PpIX 的双光子荧光光谱

黄祖芳¹, 陈 荣^{1*}, 李永增¹, 陈冠楠¹, 陈显凌², 冯尚源¹, 贾培敏³

1 福建师范大学, 医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350007

2 福建医科大学附属协和医院血液研究所, 福建 福州 350001

3 上海第二医科大学附属瑞金医院, 上海血液学研究所, 上海 200025

摘 要 双光子激发生物组织荧光, 激发光仅作用于焦点区域, 对生物样品的光漂白性和光毒性都很小, 因而双光子荧光显微技术已成为细胞生物学研究的一种新技术。文章采用波长为 820 nm 飞秒激光激发孵育有 5-ALA 的 DHL 细胞, 在激光扫描显微镜的 Lambda 模式中获得单个 DHL 细胞的双光子荧光光谱, 并测量 DHL 细胞内积聚的卟啉九(PpIX) 特征荧光值。获得了浓度分别为 2, 4 和 10 mmol · L⁻¹ 的 5-ALA 溶液中, 细胞代谢的 PpIX 含量随孵育时间的变化情况。DHL 细胞内积聚的 PpIX 处于动态变化过程, 并呈现出两阶段性的特点: 细胞内积聚的 PpIX 含量随着孵育时间增长而增加, 在 3 h 附近达到最大值, 随后随着孵育时间增长反而下降。结果表明, 基于激光扫描显微的双光子荧光光谱可成为 DHL 细胞等白血病细胞摄取 5-ALA 并生成 PpIX 的动力学研究的有效方法。

关键词 双光子激发荧光光谱; 5-氨基酮戊酸; 卟啉九; DHL 细胞

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)11-2636-04

引 言

细胞内摄取并积聚的光敏剂含量及其随时间的变化, 即细胞药代动力学, 是 PDT 研究的关键问题。光敏剂在细胞中代谢规律, 以往研究主要是利用荧光分光光度计测量在不同孵育时间, 细胞内积聚的光敏剂特征荧光峰强度值, 然后对比标准曲线间接获得细胞中的光敏剂含量。此类方法的缺点是操作烦琐^[1], 而且并不能直接测量出单个细胞的实际光敏剂含量, 误差较大。

双光子激发扫描显微术是细胞生物学研究采用的技术, 由于激发光源采用超快飞秒红外激光器, 具有非常高的峰值功率和较低的平均功率, 且对于双光子非线性激发, 它仅作用于 1 μm 左右的区域^[2], 与常规荧光激发技术相比具有对样品的光漂白区域和光毒性小, 高信噪比和成像亮度。因此更适合于细胞和生物组织活体的观察与研究^[3]。

5-ALA(5-aminolevulinic acid, ALA) 是一种内源性光动力诊断和治疗药物, 它对白血病系肿瘤细胞有特殊的亲和性^[4]。对 ALA-PDT 杀伤 K562 细胞和 HL60 细胞的实验^[5, 6]表明, 在 ALA-PDT 中 ALA 在细胞内合成具有光敏性物质的 PpIX, 而 PpIX 与铁离子结合, 在一系列酶的作用

下又会被转化合成血红素, 即细胞内合成的 PpIX 处于动态平衡, 因此细胞中加入 5-ALA 后的孵育时间是影响 PpIX 积聚的重要考虑因素。本文尝试用双光子激发孵育有 5-ALA 的 DHL 细胞, 获得 DHL 细胞的荧光光谱, 希望研究孵育有不同浓度 5-ALA 的 DHL 细胞中, 代谢产物 PpIX 含量随时间的变化情况, 并寻找研究细胞药代动力学的新方法。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

5-氨基酮戊酸(5-aminolevulinic acid, ALA) 购于 sigma 公司; RPMI 1640 培养基购于 Gibco 公司; 胎牛血清购于四季青公司。其他试剂均为分析纯。

激光扫描共聚焦显微镜(Carl Zeiss LSM 510); 双光子激发光源: Mira900 F 钛宝石飞秒激光器(Coherent, USA) 波长可调范围: 700~980 nm, 重复频率 76 MHz, 脉宽 110 fs; CO₂ 培养箱; 离心机。

1.2 溶液配制和细胞培养

DHL 细胞是滤泡性淋巴瘤细胞株(由福建协和医院血液研究所提供)在 RPMI 1640 培养液(灭活胎牛血清含 100 mL · L⁻¹, 青霉素 100 ku · L⁻¹, 链霉素 50 g · L⁻¹)中培养, 并

收稿日期: 2006-11-18, 修订日期: 2007-03-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(60778046), 厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室以及半导体材料应用福建省重点实验室开放课题资助

作者简介: 黄祖芳, 1981 年生, 福建师范大学物理与光电信息科技学院硕士生 * 通讯联系人 e-mail: chenr@fjnu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

置于 CO_2 培养箱中, 37°C , 5% 的 CO_2 , 饱和湿度条件。细胞隔天换液, 取对数生长期的细胞用于实验。

光敏剂溶液配制在暗室环境下进行, 溶剂为无血清的 RPMI 1640 培养液^[7], 并用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 配制浓度为 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液。并在无菌的条件下, 将母液浓度分别稀释成 2, 4 和 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 5-ALA 溶液均为当天配制, 使用前保存于 4°C 冰箱中。不同浓度的 5-ALA 与 DHL 细胞共同孵育时间为 0~7 h, 时间间隔为 1 h。孵育过程在 CO_2 培养箱中进行。

1.3 双光子荧光光谱

用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 洗涤 DHL 细胞 3 次, 取 DHL 细胞微量滴放在 Petri 皿上进行显微观察。采用 40×0.75 物镜, 通过 HFT KP 650 滤片检测激发出的荧光, 针孔大小为 $1\,000\mu\text{m}$, 探测器增益为 900, 放大增益 1.00, 扫描图像大小为 512×512 像素, 扫描总时间为 1.57 s, 飞秒激光器激发波长调节为 820 nm, 激发功率为 $43\% \times 72\text{ mW}$ 。在实验过程中利用软件自带参数设置的“Reuse”功能, 始终保持激发的功率不变。DHL 细胞内积聚的 PpIX 含量通过共聚焦扫描显微镜自带的软件 (LSM5 software, Version 3.2) 来间接测量, 在 Lambda 模式下获得 20~30 个细胞的荧光光谱图, 通过软件附带的圈选工具, 测量细胞中某个横断面的荧光强度值, 并统计细胞的平均荧光强度 (MFI)。

2 实验结果

图 1 为在 Lambda 扫描模式下, 激发波长为 820 nm, 在 418~719 nm 范围内扫描获得的单个 DHL 细胞的荧光光谱, 光谱中有 3 个荧光峰, 分别为: 499, 543, 632 nm。其中 499 和 543 nm 可能为细胞内脂类的荧光光谱^[8], 632 nm 为 PpIX 的特征荧光峰。而在 Lambda 扫描模式下, 双光子激发荧光光谱中并未出现 PpIX 的另一个荧光峰 673 nm^[9]。

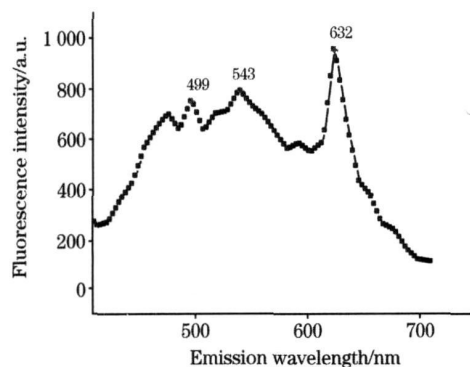


Fig 1 Two-photon fluorescence spectrum of DHL cell incubated with 5-ALA excited by 820 nm femtosecond laser

通过对 PpIX 特征荧光峰值 (632 nm) 进行测量, 获得在 2, 4 和 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-ALA 浓度下, 0~7 h 的孵育时间段, DHL 细胞某一截面荧光的平均强度值, 并统计 20~30 个细胞的平均荧光强度。测量时间间隔为 1 h, 所得的荧光强度随时间变化曲线, 如图 2 所示。

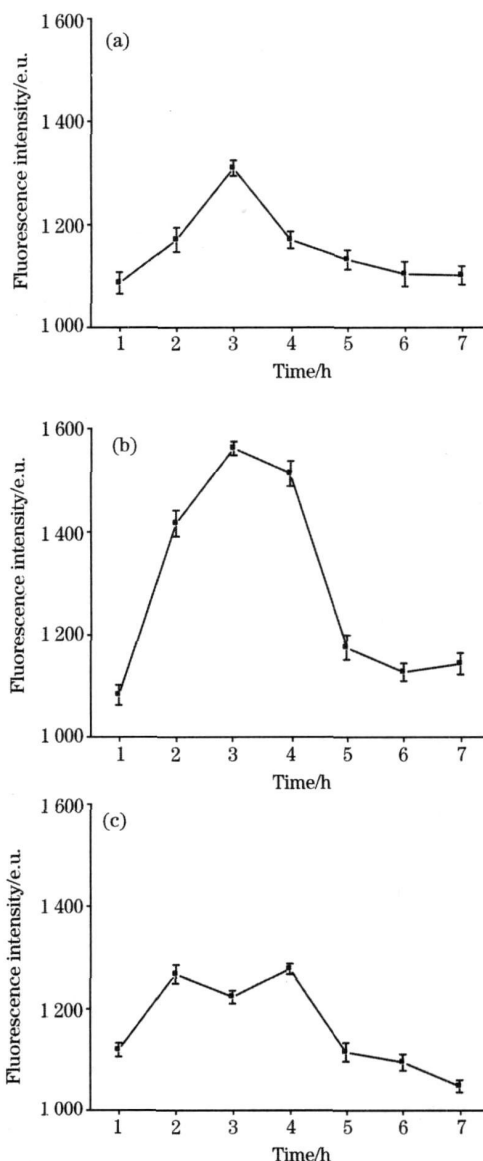


Fig 2 Alterations of PpIX fluorescence intensity in DHL cell (incubated with various concentration of 5-ALA solution)

- (a): Incubated with $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of 5-ALA solution;
- (b): Incubated with $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of 5-ALA solution;
- (c): Incubated with $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of 5-ALA solution

在测试的光敏剂浓度中, DHL 细胞内 PpIX 含量的变化呈现两阶段性的分布特点。在前 3 h 时间内, 浓度为 2 和 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-ALA, 代谢的 PpIX 荧光强度随孵育时间的增加而增强。在 3 h 处达到最高值, 分别为 1 310 和 1 562 e.u. (e.u. 为软件自带的单位) 之后随着孵育时间的增加, 逐渐下降。对于 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度, 荧光强度在 4 h 处达到 1 278 e.u. 的强度最高值, 次之分别为 2 和 3 h 处。在 4 h 后随孵育时间的增加而逐渐下降。尽管浓度差异较大, 但荧光强度的最大值差异不是很大, 而且荧光强度并未与孵育的光敏剂浓度呈正比关系。

3 讨 论

研究光敏剂在细胞内的代谢规律对于光动力体外净化白血病细胞是十分重要的, 选择合适的光敏剂浓度和合适的孵育时间是取得好的光动力效果的前提。虽然 5-ALA 本身并不是光敏剂, 但相比于正常细胞具有跟肿瘤细胞更高的亲合性, 进而在细胞内转化为光敏性物质 PpIX。PpIX 的主要吸收峰在 410 nm 左右^[10], 因此实验中将飞秒脉冲激光器波长调为 820 nm, 从而产生双光子激发细胞中的 PpIX。实验过程中保持激发光功率、扫描模式和扫描面积等参数不变。在 Lambda 模式下, 扫描获得单个 DHL 细胞的一定截面厚度层面上产生的荧光强度值(PpIX 特征峰, 632 nm)。虽然不是整个细胞所激发出来的所有荧光值, 但通过选取多个细胞仍具有统计意义。

肿瘤细胞内 5-ALA 代谢 PpIX 的过程是处于动态变化的过程, 主要包含: 5-ALA 在线粒体内经过一系列的化学反应过程合成 PpIX^[10], 同时由于 PpIX 与铁离子等结合生成血红素从而消耗了部分 PpIX。不同的肿瘤细胞系, 5-ALA 跨膜进入细胞的能力和所受的影响因素不同^[11], 对于同种细胞影响细胞内积聚的 PpIX 的主要因素有 5-ALA 的浓度和培养液中血清的浓度^[12], 其他的因素有细胞密度、周围微环境的 pH 值^[13]等。细胞外部加入较高浓度的 5-ALA 通常被认为有利于加快 5-ALA 合成 PpIX, 有利于 PpIX 在细胞内的积聚。实验中我们发现 DHL 细胞在与浓度分别为 2, 4 和 10 mmol·L⁻¹ 的 5-ALA 溶液共同孵育过程中, 细胞内积聚的

PpIX 并未与 5-ALA 浓度成线性的关系, 相反当 5-ALA 浓度达到 10 mmol·L⁻¹ 时, DHL 细胞内 PpIX 含量反而比浓度为 2 和 4 mmol·L⁻¹ 时的含量来得低。其中可能的原因是由于高浓度的 5-ALA 影响到细胞的活性, 使得细胞中线粒体合成 PpIX 的活性降低^[10], 影响 PpIX 的合成; 也可能是 5-ALA 浓度增加的同时 PBGD 的活性并未增强, 而铁红素酶的活性增强, 从而加快消耗细胞内积聚的 PpIX。具体的原因以及对于本次实验 DHL 细胞密度的选择是否在 5-ALA 浓度为 4 和 10 mmol·L⁻¹ 之间存在某个饱和浓度值, 还有待于进一步研究。

本文首次开展了 DHL 细胞中 5-ALA 代谢 PpIX 光动力学研究, 实验中首次采用波长为 820 nm 飞秒激光激发孵育有 5-ALA 的 DHL 细胞, 在激光扫描显微镜的 Lambda 模式中获得单个 DHL 细胞的双光子荧光光谱, 并测量 DHL 细胞内积聚的 PpIX 特征荧光值。获得了浓度分别为 2, 4 和 10 mmol·L⁻¹ 的 5-ALA 溶液, 细胞代谢的 PpIX 含量随孵育时间的变化情况, DHL 细胞内积聚的 PpIX 处于动态变化过程, 并呈现出两阶段性的特点: 细胞内积聚的 PpIX 含量随着孵育时间增长而增加, 在 3 h 附近达到最大值, 随后随着孵育时间增长反而下降。实验表明, 基于激光扫描显微的双光子荧光光谱方法具有实时、快速和无损地获得单个活体细胞内积聚的 PpIX 荧光强度值的特点, 因此它可成为 5-ALA 在 DHL 细胞等白血病细胞光动力体外净化研究中的一个有效方法。

致谢: 本研究得到福建医科大学附属协和医院血液研究所的陈元仲教授和黄慧芳博士的帮助, 在此表示致谢。

参 考 文 献

- [1] XIE Bao gang, HUANG Hui fang, HUANG Jian dong, et al(谢宝刚, 黄慧芳, 黄剑东, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(11): 1415.
- [2] Denk W, Piston D W, Webb W W. Handbook of Biological Confocal Microscopy. New York: Plenum Press, 1995. 445.
- [3] YUAN Lan(袁 兰). Confocal Laser Scanning Microscope Tutorial(激光扫描共聚焦显微技术教程). Beijing: Peking University Medical Press(北京: 北京大学医学出版社), 2004. 4.
- [4] Bartosova J, Hrkal Z. Comp. Biochem. Physiol., 2000, 126(3): 245.
- [5] ZHANG Bao qin, MIAO Li xia, ZHANG Zhen xi, et al(张宝琴, 苗立霞, 张镇西, 等). J. Biomed. Eng.(生物医学工程学杂志), 2005, 22(3): 525.
- [6] ZHANG Bao qin, XIAO Mi, ZHANG Zhen xi, et al(张宝琴, 肖 谧, 张镇西, 等). Laser Journal(激光杂志), 2005, 26(2): 85.
- [7] Oystein Bech Gadmar, Johan Moan. Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology, 2002, 67: 187.
- [8] CHEN Guo zhen, HUANG Xian zhi, ZHENG Zhu rui, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱粹, 等). Fluorescence Analysis Method(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 223.
- [9] Rebecca L Goyan, David T. Photochemistry and Photobiology, 2000, 72(6): 821.
- [10] Coohill T P, Valenzeno D P. In Photobiology for the 21st Century. USA Kansas: Valemar Publishing Company, 2001. 165.
- [11] Rene C, Krieg, Dominik Uihlein, et al. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 2006, 47: 618.
- [12] Hanania J, Malik Z. Cancer Lett, 1992, 65: 127.
- [13] Fuchs C, Riesenberger R, Siegert J, et al. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 1997, 40(1): 49.

Two Photon Excitation Fluorescence of 5-ALA Induced PpIX in DHL Cells

HUANG Zu fang¹, CHEN Rong^{1*}, LI Yong zeng¹, CHEN Guo nan¹, CHEN Xiann ling², FENG Shang yuan¹,
JIA Pei min³

1. Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China
2. Fujian Institute of Hematology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China
3. Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China

Abstract Two-photon fluorescence microscopy is a novel imaging technique, which is primarily sensitive to a specimen's response coming from an in-focus plane, thus has low photo-bleaching and photo-damage to biological samples. 5-ALA induced production of PpIX in DHL cells was excited by 820 nm femtosecond laser; two-photon excitation fluorescence of single cell was obtained in Lambda mode of laser scanning confocal microscope. The specific fluorescence intensity of PpIX which accumulated in DHL cells was measured at 2, 4 and 10 mmol · L⁻¹ concentration of 5-ALA with different incubation time, which reflected the kinetics of 5-ALA accumulated in DHL cells. Accumulation of PpIX in DHL cells was a dynamic change process. Biphasic alterations of PpIX accumulation were noted: PpIX content enhanced with the increasing time and reached the maximal value around 3 h, however PpIX content decreased in the subsequent incubation time. Results indicate that two-photon fluorescence based on laser scanning microscope can be a useful technology for studying the kinetics of 5-ALA induced PpIX production in DHL cells and other leukemia cells.

Keywords Two-photon excitation fluorescence; 5-aminolevulinic acid; Protoporphyrin IX; DHL cells

(Received Nov. 18, 2006; accepted Mar. 9, 2007)

* Corresponding author