# 单细胞拉曼光谱研究游离脂肪酸对 NIT-1 胰岛β细胞生理的影响<sup>①</sup>

钱小晓 刘 红<sup>22</sup> 黄庶识"

(广西医科大学第一附属医院老年内分泌科 南宁市双拥路6号 530021) a(广西科学院生物物理实验室 南宁市大学大岭路98号 530003)

摘 要 运用激光镊子拉曼光谱技术探讨高浓度游离脂肪酸对 NIT-1 胰岛 β 细胞生理的影响。实验 组细胞以含 0.25mmol/L 棕榈酸培养 12,24,48h,平行对照组中不含任何脂肪酸。通过扫描形式收集各组 细胞的拉曼光谱后,使用 Hoechs33342 /PI 荧光染色保留活细胞的光谱,并在 OriginPro 8.0 系统中比较各 组平均光谱的差异。结果显示对照组间的拉曼光谱无明显差异;高脂组光谱在 780、1124、1092cm<sup>-1</sup>及 1172cm<sup>-1</sup>发生拉曼位移,且 780、1172、855cm<sup>-1</sup>及 873cm<sup>-1</sup>峰值强度降低。这些变化的光谱峰在分子归属上 指认为细胞内 DNA 和蛋白质。由此推断高浓度游离脂肪诱导 NIT-1 细胞损伤在光谱表现为细胞内 DNA 及蛋白质的结构、含量改变,且该变化与细胞的调亡有着密切联系。在实验中激光光镊拉曼系统对观察细 胞早期损伤有着积极作用。

关键词 拉曼光谱;游离脂肪酸;NIT-1 胰岛β细胞;早期损伤

中图分类号: 0 657.37 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2011) 03-1455-05

1 引言

脂毒性是指进入胰岛  $\beta$  细胞的游离脂肪酸(Free Fatty Acid, FFA) 超过了其对脂肪酸氧化的 能力,导致过多的脂质在细胞内的堆积,从而引起胰岛  $\beta$  细胞功能紊乱甚至凋亡。游离脂肪酸不仅 在 2 型糖尿病胰岛素抵抗发生中具有重要作用,而且还可能通过诱导  $\beta$  细胞凋亡使  $\beta$  细胞数量减 少、功能减退,最终导致  $\beta$  细胞功能衰竭<sup>[1]</sup>。

目前对单个胰岛 β 细胞的研究中,方法相对有限且无发从整体上反映作用因素对单个胰岛细胞的影响。激光镊子拉曼光谱技术(LTRS)作为一种优越的分析技术在单个细胞研究方面有独特的优势,在过去的 10 年中已应用于生物医学的研究,包括病原菌的快速鉴别筛选、线粒体功能研究<sup>[2]</sup>、癌症诊断<sup>[3]</sup>、干细胞研究<sup>[4]</sup>等。LTRS 是将光学囚禁与拉曼光谱分析联用并应用于悬浮单个细胞研究的一项新的生物光子技术,不同类型的细胞或不同生理阶段之间的细胞包含不同的分子组份,因而反映出不同的拉曼光谱特征,所以,通过测定细胞的光谱,分析其特征峰位置、强度和线宽,可以反映出细胞内的分子结构及其代谢状况。由于不同的作用物质对活细胞所产生诱导作用也各不相同,而且由此引起细胞内所含物质在量及结构的变化也存在一定的时间依赖性<sup>[5,6]</sup>。因此,实时记录单个细胞在不同处理条件下的拉曼光谱,运用化学计量学方法分析这些特征拉曼光谱与细胞内部的生物大分子之间的内在联系,以及与这些生物大分子变化过程的关联性,可以找到不同诱

收稿目期?2011203101,接受目前2014m3i2Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.

① 广西科学基金资助项目(桂科回 0991006)

② 联系人, 电话: (0771) 5356598; (0771) 2503990; E-mail: hongmm@ 163. net

作者简介:钱小晓(1984-),女,重庆市人,在读硕士,主要从事胰岛素抵抗及胰岛细胞功能工作。

导因素诱导下所产生的胞内整体生理生化变化的拉曼光谱 指纹信息",在生化水平和分子水平上解析其作用机理。本文应用LTRS技术分析经FFA诱导处理后的胰岛NIT-1细胞,以期揭示光谱学变化所反映的生物学内涵,促进脂毒性引起的细胞生理过程的深入理解。

2 实验部分

# 2.1 试剂与设备

NIT-1 细胞株(广西医科大夏宁教授惠赠);棕榈酸(美国 Sigma 公司);标准胎牛血清(南宁皓 泰生物科技有限公司);HyQ 改良型 RPIM1640 培养液;0.25%胰酶(美国 Hyclone 公司); Hoechst 33342 染色液(杭州碧云天生物技术研究所);碘化丙啶(PI,美国 Sigma 公司);实验所用试 剂均为分析纯。激光镊子拉曼光谱系统(LTRS,广西科学院生物物理实验室)。

#### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 细胞培养及分组

根据文献[7]中的方法配制含棕榈酸(Palmitic Acid, PA)0.25mmol/L RPIM1640 培养液。将 NIT-1 细胞以 4×10<sup>5</sup> 个/L 接种于 6 孔板中,按培养基中是否含 PA 分为对照组和实验组,培养 0、12、24、48h。

2.2.2 拉曼光谱系统及光谱收集

激光镊子拉曼光谱系统系为一束波长为 785 nm 的半导体激光(美国 Thorlabs 公司)经过滤波 后进入一台 TE2000U 尼康倒置生物显微镜(日本 Nikon 公司),并在 100 倍物镜头的下面进行拉 曼光谱测量。为了获得单个细胞的整体光谱,实验采用激光点动态扫描模式,激光点在一个周期内 以分别向 *x* 轴横向和 *y* 轴纵向运动。实验中, *x* 方向设定的频率为 8Hz,即 1s 扫描 8 次, *y* 方向设定 的频率为 0. 3Hz; X 和 Y 方向电压都设定为 2.6V。每个细胞的扫描时间为 40s<sup>[8]</sup>。

收集实验中各组细胞拉曼光谱并经 Hochest33342 染色液(10mg/mL)/PI(10mg/mL)(混合液 按1:1体积配比)染色,避光反应 15min,置于荧光显微镜下,在波长为 365nm 的紫外光下观察后 留取活细胞的数据。每组收集 20 个细胞拉曼光谱。

## 2.3 数据处理及分析

本实验仅留取 Hochest 33342/ PI 染色为活细胞的拉曼光谱做分析。光谱数据在 Matlab7.0 程序中进行,每个细胞测得的光谱减背景得到实际光谱,再依次经过两次 5 点移动平均平滑、归一化及多点基线校正等预处理后,可运用 Origin 8.0 进行各组减光谱强度及位移做的差异分析<sup>[7]</sup>。

3 结果与讨论

#### 3.1 NIT-1 细胞的 Hochest33342/ PI 染色结果

Hochest 33342/ PI 在荧光显微镜下观察:活细胞的细胞核为蓝色,呈弥漫均匀蓝色荧光,细胞结构完整;凋亡的细胞体积变小,细胞膜完整但出现发泡现象,核碎裂,染色呈浓聚的亮蓝色荧光;死亡细胞的胞膜完整性被破坏,染色后为红色。

#### 3.2 各组细胞的平均拉曼光谱

对照组及实验组培养48h 后各组细胞的平均拉曼光谱如图1和图2中所示,各峰的归属<sup>[5,8]</sup>见表1。图1和图2显示,在对照组中0h与12、24、48h 各组间无明显改变,由此说明本次实验中各组峰的变化可基本认定为高浓度的脂肪酸(含PA0.25mmol/L)长期作用所致;经PA培养的各实验组的平均光谱较0h 其峰的强度及位置主要有6 处出现明显变化贯变化存在15 定的时间依赖性(图)...

2,表2)。这6处峰分别代表的是:780cm<sup>-1</sup>(核酸O—P—O伸缩振动U、C、T环呼吸振动)、855cm<sup>-1</sup> (Tyr呼吸振动)、873cm<sup>-1</sup>(Trp呼吸振动)、1092cm<sup>-1</sup>(DNA骨架中PO<sup>-2</sup>伸缩振动)、1172cm<sup>-1</sup>(蛋白质CH2变形振动模)及1124cm<sup>-1</sup>(蛋白质C—N伸缩振动)。其中780cm<sup>-1</sup>和1092cm<sup>-1</sup>归属为DNA;其余的855、873、1172cm<sup>-1</sup>及1124cm<sup>-1</sup>归属为蛋白质改变。

表 1 NIT-1 细胞拉曼光谱中各峰的归属

峰位置(cm <sup>-1</sup> )	归属	
670	碱基 T,G	
716	C—S,反式	
780	核酸 O—P— O 伸缩振动 U、C、T 环呼吸振动	
855	Tyr 呼吸振动	
873	Trp 呼吸振动	
1002	Phe 呼吸振动	
1092	DNA 骨架中 PO-2伸缩振动	
1124	蛋白质 C一N 伸缩振动	
1172	蛋白质 CH2 变形振动模	
1443	脂类CH2/CH3变形振动模	
1656	酰胺 Ι, α-螺旋	

程度/a.u.

600



图 1 对照组 NIT -1 细胞平均光谱

图 2 实验组 NIT-1 细胞平均光谱

1400

拉曼位移/cm-1

1800

 $(cm^{-1})$ 

1000

				(cm))
拉曼频移	0	12	24	48
780	780	783	784	785
1092	1092	1089	1088	1087
1124	1224	1126	1128	1228
1172	1172	1173	1175	1176

随着 **P** A 作用时间改变的拉曼移位

## 3.3 不同作用时间对细胞 DNA、蛋白质影响的分析

## 3.3.1 DNA 相关峰值改变

DNA 拉曼峰主要来自于其磷酸骨架基团和各种碱基的振动。780cm<sup>-1</sup>不仅代表核酸 O—P—O 伸缩振动在构象上是灵敏的,还表示 C,T,U 碱基的含量。当该峰向后位移时,表明 DNA 双螺旋结构变为无序<sup>[8]</sup>,其强度的下降,也表明了细胞内 DNA 有单、双链的断裂及含氮碱基含量的下降。同时根据表 2 及图 3*A*显示:在 PA 作用后至 12h时,峰的位置发生了明显的移动,由 0h时的 780cm<sup>-1</sup>后移至 783cm<sup>-1</sup>,强度也减少为 0h时的 82.76%,这说明此时 DNA 的完整性已经遭到了破坏。随着 PA 作用时间的延长,峰的位置继续向后位移,24h和 48h时峰位分别位移到了 784cm<sup>-1</sup>、785cm<sup>-1</sup>;同时,峰的强度也进一步降低了近 25%。峰位和强度随 PA 的作用时间的变化,提示对 DNA 骨架的损伤效应,与 PA 的作用时间呈正相关性。另外,属于 DNA 骨架 PO<sup>-2</sup>伸缩振动的 1092cm<sup>0</sup>, 虽然它是构象术灵敏的谱线所在<sup>COP</sup>,但在本实验中,峰的强度虽然没有明显改变,



图 3 PA 培养 0, 12, 24, 48h 后在峰值强度的改变 A — 780cm<sup>-1</sup>; B — 1172cm<sup>-1</sup>; C — 855cm<sup>-1</sup>; D — 873cm<sup>-1</sup>。

但是峰位也由 0h 时的 1092cm<sup>-1</sup>位移至了 1087cm<sup>-1</sup>, 同样反映了 DNA 结构的改变。 3.3.2 蛋白质侧链变 化

在拉曼系统中蛋白质的侧链构象是主要研究与酶的活性密切相关的一些集团的谱线。蛋白质 是由 20 种氨基酸中的若干种组成,在拉曼系统中蛋白质的侧链可通过苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸 这 3 种氨基酸中的某些基团出现的特征谱带。在本实验中,胰岛 NIT -1 细胞的拉曼图谱中同样存 在上述 3 中蛋白质的特征谱带:  $1002_{cm}^{-1}$ 是苯丙氨酸的特征谱带,  $855_{cm}^{-1}$ 是酪氨酸的特征谱带,  $1586_{cm}^{-1}$ 是色氨酸的特征谱带.但在本实验中,仅有归属酪氨酸的  $855_{cm}^{-1}$ 峰的强度(图 3C)随着 PA 作用时间的延长而降低。同时有而其他归属于蛋白质的峰面,如  $873_{cm}^{-1}$ 及  $1172_{cm}^{-1}$ 峰的强度 (图  $3B_{v}D$ )也随之降低,而且  $1172_{cm}^{-1}$ 和  $1124_{cm}^{-1}$ 的峰位均向后移位了  $4_{cm}^{-1}$ ,这提示细胞内的蛋 白质含量的降低及结构的改变<sup>10</sup>。

上述峰值的变化与目前对游离脂肪酸(Free Fatty Acid, FFA)造成胰岛细胞功能损害的认识存在一致性。有大量实验结果显示,胰岛细胞外 FFA 浓度过高时不仅能通过氧化应激作用直接破坏细胞内能 DNA、蛋白质,还能引起胰岛细胞某些蛋白质的降解<sup>[10,11]</sup>。由于不同的蛋白质内所含的氨基酸种类和量差异很大,因此 FFA 到底引起了哪些蛋白的变化,是如何作用的仍有待进一步的验证。

# 4 结论

随着棕榈酸作用时间的延长,细胞内 DNA 和蛋白质的谱峰发生了一系列变化,而这些变化的 峰值均来自 Hoechs33342 / PI 染色后未显示凋亡的细胞。同时,有研究显示,细胞内的这些 DNA 与 蛋白质所发生的变化与其凋亡密切<sup>[10,11]</sup>。这表明游离脂肪酸对胰岛 NIT -1 细胞功能的影响与其之 后诱导细胞的凋亡存在一定的相关性。由此可见,激光光镊拉曼光谱系统作为一种分析分子结构的 有用工具,不仅能提供生物细胞内物质变化的丰富信息,同时也是实时检测细胞结构改变有效手 段,以及反应有害因素作用造成早期损伤。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c

# 参考文献

- [1] Umpierrez G E, Smiley D, Robalino G et al. Lack of Lipotoxicity Effect on β-Cell Dysfunction in Ketosis-Prone Type 2 Diabetes
  [J]. Diabetes Care, 2010, 3(3): 626-631.
- [2] Lieber C A, Majumder S K, Billheimer D et al. Raman Microspectroscopy for Skin Cancer Detection in Vitro[J]. Biomedical Optics, 2008, 13(2): 024013.
- [3] Huang Y S, Karashima T, Yamamoto M et al. Molecular-Level Investigation of the Structure, Transformation, and Bioactivity of Single Living Fission Yeast Cells by Time- and Space-Resolved Raman Spectroscopy [J]. Biochemistry, 2005, 44 (30): 10009-10019.
- [4] Chan J W, Lieu D K, Huser T et al. Label-Free Separation of Human Embryonic Stem Cells and Their Cardiac Derivatives Using Raman Spectroscopy[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(4): 1324–1331.
- [5] Shah N C, Lyandres O, Walsh J T J et al. Lactate and Sequential Lactate-Glucose Sensing Using Surface-Enhanced Raman[J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(18): 6832-6927.
- [6] 崔巍,黄葶,刘均利等. 棕榈酸抑制胰岛 MIN6 8 细胞生长的分子机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(3): 219-221.
- [7] Mannie M D, McConnell T J, Xie C et al. Activation-Dependent Phases of T Cells Distinguished by Use of Optical Tweezers and Near Infrared Raman Spectroscopy[J]. Immunological Methods, 2005, 297(1-2): 53-60.
- [8] Xu Y M, Zhao H X, Zhang Z Y. Raman Spectroscopic Study of Microcosmic and Photosensitive Damage on the Liposomes of the Mixed Phospholipids Sensitized by Hypocrellin and Its Derivatives [J]. Photochem & Photobiol B: Boil, 1998, 43(5): 41-46.
- [9] 刘婉华,刘建, 习振琦等. 两种卟啉类光敏剂对 SMMC-7721 细胞敏化损伤的拉曼光谱分析[J]. 激光与红外, 2010, 40(6): 604-608.
- [10] Rhodes C J.T ype 2 Diabetes-a M atter of Beta-Cell Life and Death[J]. Science, 2005, 307(1): 380-384.
- [11] Mohanty S, Spinas G A, Maedler K et al. Over Expression of IRS<sup>2</sup> in Isolated Pancreatic Islets Causes Proliferation and Protects Human Beta-Cells from Hyperglycemia-Induced Apoptosis[J]. Experimental Cell Research, 2005, 303(2): 68-78.

# Effect of Free Fatty Acids on NIT–1 Pancreas Islet $\beta$ Cell Physiological Changes by the Single Raman Spectrum

QIAN Xiao-Xiao LIU Hong HUANG Shu-Shi<sup>a</sup>

(Department of Geriatric Endocrinology, First Affiliated Hospital, Guang xi Medical University, Nanning 530021, P. R. China) a(Lab of Biophysics, Guang xi A cademy of Science, Nanning 530003, P. R. China)

Abstract The possible physiological impacts of NIT-l pancreas islet  $\beta$  cell attributing to high concentration free fatty acids was explored by laser tweezers raman spectroscopic technique. Cells were cultured with 0. 25m mol/L palmacid for 12, 24, 48h respectively, and one group of cells served as control and the cells were incubated without any free fatty acid. Raman were obtained by the mean of scanning, then live cells' spectra were kept by fluorescent staining with Hoechs 33342/PI. The spectral difference was analyzed by OriginPro 8.0 system. The shift changes of Raman peaks for high-fat group at 780, 1124, 1092cm<sup>-1</sup> and 1172cm<sup>-1</sup> were observed and the peaks intensity declined at 780, 1172, 855cm<sup>-1</sup> and 873cm<sup>-1</sup>, while there was no obvious difference between control groups. These above peaks mainly correspond to intracelluar DNA and protein. The above results suggested high concentration free fatty acids can impair the NIT-l cell by changing the structure or content of DNA and protein, which highly relate with apoptosis. In this experiment, Raman spectra have the advantage of observing cellular structure changes in early period.

**Key words** Raman Spectrum; Free Fatty Acids; NIT-1 Pancreas Islet  $\beta$  Cell; Early Damage  $\odot$  1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c