

· 基础研究 ·

光敏剂亚细胞定位研究方法的应用比较

戴维德 李晓松 曾晶 丁新民 刘凡光 顾瑛

【摘要】 目的 探讨不同光敏剂亚细胞定位方法的应用特点。**方法** 应用电感耦合器材 (CCD) 荧光显微成像系统, 选择细胞器荧光探针 BODIPY 标记细胞内高尔基体。分别采用直接观察法、伪彩色融合法、波形比较法、相关系数法及细胞器-细胞荧光强度比值法, 对光敏剂血卟啉单甲醚 (HMME) 进行细胞内分布的定性与定量研究。**结果** 采用直接观察法比较光敏剂和细胞器探针荧光图像, 发现 HMME 和 BODIPY 的荧光分布模式有相似之处, 采用伪彩色融合法得到的二者融合图像, 显示存在黄色的空间重叠区域。应用波形比较法发现, 直线路径上所有像素在 HMME 荧光图像与 BODIPY 荧光图像中的灰度值相对空间坐标的曲线波形相似。应用相关系数法得出, 各像素的 HMME 荧光灰度值与细胞器探针荧光灰度值之间的相关系数值为 0.602 4。采用细胞器-细胞荧光强度比值法发现, 随着参数 m 的增大, 即细胞器聚集程度的降低, 高尔基体聚集区域的平均荧光强度比值 (J_1/J_2) 呈下降趋势, 二者具有明显的相关性 ($P < 0.05$)。**结论** 通过直接观察、伪彩色融合及波形比较的方法, 基本可以判定 HMME 在高尔基体聚集区域有分布; 采用相关系数法, 尤其是细胞器-细胞荧光强度比值法能得到更为精确的量化结果, 以弥补定性方法的不足。

【关键词】 方法; 光敏剂; 亚细胞定位

Comparison of techniques to determine the subcellular localization of photosensitizers DAI Wei-de, LI Xiao-song, ZENG Jing, DING Xin-min, LIU Fan-guang, GU Ying. Department of Laser, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To compare and evaluate Organelle-cell fluorescence intensity ratio analysis established in this study with other techniques to determine the subcellular localization of photosensitizers. **Methods** CCD fluorescence microscopy imaging system was applied and a kind of special organelle probe BODIPY was selected to label Golgi body. Directly observing, pseudo-color fusing, wave-shape comparing, correlation coefficient calculating and Organelle-cell fluorescence intensity ratio analysis were adopted, respectively, to study the intracellular distribution of domestic photosensitizer Hematoporphyrin monomethyl ether (HMME). **Results** Fluorescence distributing modes of HMME and BODIPY were similar with each other. There were yellow space-overlap areas in the fusion image. Wave body of changing curve of gray scale value of all pixels in the straight line in two images corresponding to space coordinate was similar with each other. Correlation coefficient in each pixel between fluorescence intensity of HMME and that of BODIPY was 0.602 4. With increasing of parameter m , namely degree of organelles congregated reducing, the average fluorescence intensity ratio (J_1/J_2) of Golgi complex was decreasing, the two parameters possessed obvious relativity. $P < 0.05$ was got by One way ANOVA test. **Conclusion** By Directly observing, pseudo-color fusing, wave-shape comparing, HMME distributing in Golgi complex clustered areas is presumed determined; correlation coefficient calculating and Organelle-cell fluorescence intensity ratio analysis can gain much more accurate quantitative results, which can make up qualitative techniques.

【Key words】 Technique; Photosensitizer; Subcellular localization

研究光敏剂亚细胞分布定位的主要方法是应用荧光显微成像技术及细胞器荧光探针标记技术, 采集和观察细胞中光敏剂和荧光探针各自的荧光图像, 所采集的图像用图像锐化、边缘检测与提取、图像分割和图像融合等技术处理后进行亚细胞定位的定性及定量分析^[1]。本研究采用细胞器-细胞荧光强度比值法研究光敏剂血卟啉单甲醚 (hematoporphyrin monomethyl e-

ther, HMME) 亚细胞定位, 并与目前已有的几种定性、定量方法进行比较。

材料与方法

一、仪器与试剂

(一) 实验系统

Olympus IX71 型倒置生物荧光显微镜, 荧光激发源为 100 W 超高压汞灯, 可加各种中性衰减片调节激发光强度, 以避免强光对细胞的损伤, 放大倍率为 60 (数值孔径 0.7)。美国 Diagnostic 公司产 SPOT RT color 型致冷电感耦合器材 (charge-coupled device,

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)

CCD), 通过标准 C 型接口与荧光显微镜侧面光口连接, 面阵像素数为 $1\ 600 \times 1\ 200$, 单位像素面积为 $7.4\ \mu\text{m} \times 7.4\ \mu\text{m}$ 。16 位灰度面阵图像经控制卡进行 12 位 A/D 转换量化, 输入计算机处理和分析。

(二) 试剂

HMME 由第二军医大学药物化学研究所提供, 规格为 10 mg/ml; Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基 (Dulbecco modified eagle's medium, DMEM)、胎牛血清由 Gibicol Life 公司生产; 胰蛋白酶、细胞内高尔基体特异性荧光探针 BODIPY 为美国 Sigma 公司产品。

二、实验方法

(一) 实验分组

将细胞分为 4 组, 分别为 HMME + BODIPY 组、单加 HMME 组、单加 BODIPY 组和单纯细胞组, 各组细胞孵育条件完全相同。

(二) 细胞培养、HMME 孵育及荧光探针染色

鼠肺内皮细胞由上海复旦张江生物公司提供。细胞接种于含 20% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基中, 细胞密度为 5×10^4 个/ml; 传代培养 24 h 使细胞完全贴壁。HMME + BODIPY 组和单加 HMME 组培养皿内加入 HMME, 调整其终浓度至 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 孵育 24 h 后用于实验。HMME + BODIPY 组和单加 BODIPY 组培养皿中加入 BODIPY (150 ng/ml), 在完全避光的条件下孵育 0.5 h。单纯细胞组培养皿内不加 HMME 与 BODIPY, 孵育 24 h 后用于实验。

(三) 图像采集

1. HMME 荧光图像的采集: 取 HMME + BODIPY 组细胞, 选择激发滤色镜 (规格为 BP400-410)、吸收滤色镜 (规格为 BA455) 和分光镜 (规格为 DM455), 另加一红通道液晶滤光片, 激发出 HMME 的荧光, CCD 采集图像并输入计算机。单加 BODIPY 组和单纯细胞组也应用同样的荧光激发和采集条件。

2. 高尔基体探针 BODIPY 荧光图像的采集: 上一图像采集完成后, 仍选择同一视野内靶细胞, 选择激发滤色镜 (规格为 BP460-490), 吸收滤色镜 (规格为 BA515), 分光镜 (规格为 DM500), 另加一绿通道液晶滤光片, 激发出 BODIPY 的荧光, CCD 采集图像并储存于计算机中。

(四) 光敏剂亚细胞定位方法

1. 直接观察法: 直接观察同一单细胞的 HMME 和 BODIPY 荧光图像, 比较细胞内 HMME 的空间分布与细胞器位点空间分布的相似性。

2. 伪彩色融合法: 将 HMME 荧光图像与 BODIPY 荧光图像融合为一幅 RGB (红黄绿) 格式的真彩色图像。将 HMME 荧光图像数据输入 RGB 图像的 R 通道, 将 BODIPY 荧光图像数据输入 RGB 图像的 G 通

道。红色的高灰度区域表示 HMME 分布区域, 绿色的高灰度区域表示 BODIPY 分布区域。融合后的 RGB 图像中, 红色亮区与绿色亮区重叠的区域显示为黄色亮区, 即 HMME 与 BODIPY 的空间重叠区域。通过观察是否存在黄色亮区及其大小, 可了解 HMME 与 BODIPY 的结合情况。

3. 波形比较法: 在细胞内部任意画一条直线路径, 描绘出这条路径上所有像素在 HMME 与 BODIPY 荧光图像中的灰度值相对空间坐标的变化起伏曲线, 观察和比较 2 条曲线之间的相似程度和相关性。

4. 相关系数法: 计算同一单细胞内各像素的 HMME 荧光灰度值与细胞器探针荧光灰度值之间的相关系数。图像 A 与图像 B 的相关系数定义如下。

$$r = \frac{\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})(B_{mn} - \bar{B})}{\sqrt{(\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})^2)(\sum_m \sum_n (B_{mn} - \bar{B})^2)}}$$

$$\text{其中, } \bar{A} = \frac{1}{mn} \sum_m \sum_n A_{mn}, \bar{B} = \frac{1}{mn} \sum_m \sum_n B_{mn}。$$

r 表示 HMME 分布与细胞器分布的线性相关性, r 值越接近 1, 相关性越强; HMME 分布与细胞器分布的重叠程度越大, 细胞器内光敏剂含量越高。

5. 细胞器-细胞荧光强度比值法: 根据探针荧光强度, 在探针荧光图中确定探针所标记的细胞器位置, 具体方法如下: ①设定参数 m , 将探针荧光图中细胞内各像素点按灰度大小由高到低排列, 取灰度最高的前 m 像素作为细胞器位置所在像素, m 的大小反映了细胞器聚集程度的高低; ②根据①中分割出的细胞器像素, 计算 HMME 荧光图中相应位置像素的灰度均值, 得到细胞器中 HMME 荧光的平均灰度 J_1 ; ③应用图像处理技术, 从图像背景中分割出细胞的形态轮廓; ④计算光敏剂荧光图中细胞轮廓范围内像素的灰度均值, 得到细胞内 HMME 荧光的平均灰度 J_2 ; ⑤分别计算 m 取值不同时的 J_1/J_2 值, 该值反映 HMME 在细胞器内聚集程度不同时, 细胞器结合 HMME 能力的强弱变化趋势。

三、统计学分析

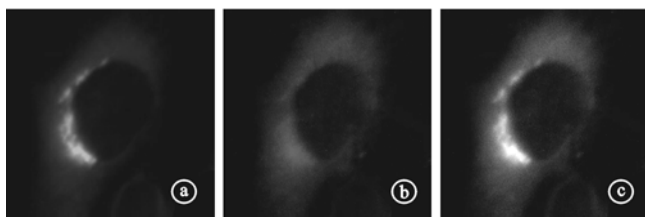
实验数据应用 SPSS 11.0 统计软件处理, 细胞及高尔基体平均灰度比值比较采用单因素方差检验。

结 果

一、直接观察法及伪彩色融合法

单纯细胞组在激发 BODIPY 和 HMME 荧光条件下均未检测到自发荧光; 单加 HMME 组的内皮细胞在激发 BODIPY 荧光条件下仅检测到背景噪声; 单加 BODIPY 组的内皮细胞在激发 HMME 荧光条件下也仅检测到背景噪声, 说明 BODIPY 与 HMME 分别被激发出的荧光在光谱上能明显区分。直接观察和比较

HMME + BODIPY 组同一细胞 HMME 与荧光探针荧光图像,发现其荧光分布模式相似,而二者的融合图像显示存在黄色的空间重叠区域(图 1)。



a. BODIPY 荧光图像 b. HMME 荧光图像 c. a、b 融合荧光图像

图 1 HMME + BODIPY 组同一细胞的 BODIPY 和 HMME 荧光图像

二、波形比较法

从图 2 可以看出,所画直线路径上所有像素在 HMME 荧光图像与 BODIPY 荧光图像中的灰度值相对空间坐标变化起伏的两条曲线波形相似。

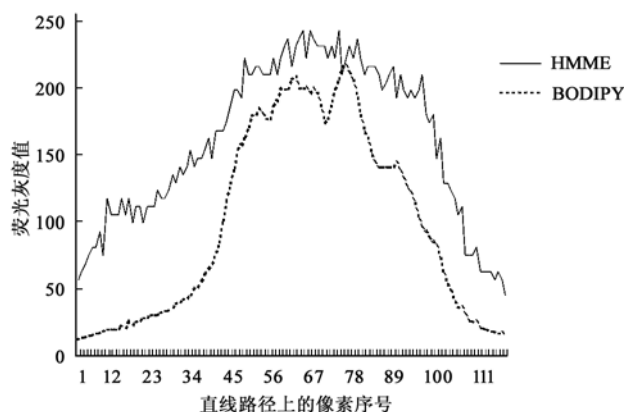


图 2 HMME 和 BODIPY 荧光图像中的灰度值相对空间坐标的变化曲线

三、相关系数法

应用前述相关系数求值公式求得高尔基体区域相关系数 $r = 0.6024$ 。

四、细胞器-细胞荧光强度比值法

随着 m 值的增大,高尔基体聚集程度降低,曲线也呈单调下降趋势,即高尔基体结合 HMME 的能力呈下降趋势。提示高尔基体聚集程度与高尔基体结合 HMME 的能力呈明显正相关(图 3)。

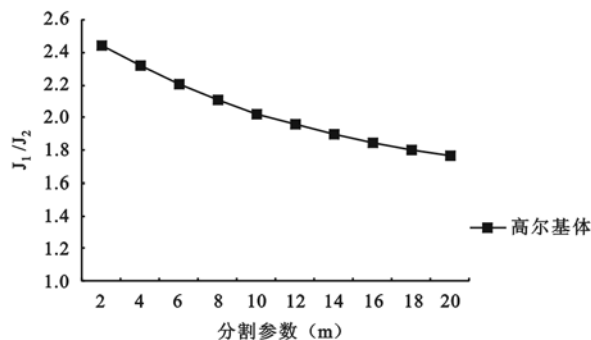


图 3 高尔基体聚集区域平均荧光强度比值变化曲线

讨 论

光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是通过静脉或局部给予光敏剂,利用可见光或近红外光的照射吸收光子能量,在有氧状态下产生细胞毒性物质,如氧自由基^[2]。这些物质能和细胞内成分发生反应而造成细胞损伤。激发态的单线态分子氧寿命极短,在细胞内扩散不超过 10 ~ 20 nm,因此靶细胞光动力损伤的主要位点同光敏剂的亚细胞分布紧密相关^[3]。有研究发现,由于细胞光敏损伤位点不同,其损伤特点及后果也不同^[4,5]。光敏剂亚细胞定位研究是当前光动力疗法的研究热点之一。

目前,国外大多数亚细胞定位研究对单细胞光敏剂和细胞器探针的荧光图像均采用定性分析方法^[6,7],主要有以下三种:(1)直接观察比较法;(2)伪彩色融合法;(3)波形比较法。这些定性分析方法主观性强,缺少精确的量化结果,特别是用于非特异性分布的光敏剂时,信息特征不够鲜明,难以推断结果。尤其对于具有弥散分布特性的光敏剂,单纯的定性观察往往不易或无法捕捉到超过人眼分辨力且具有重要意义的信息。而定量分析方法可有效地弥补上述缺憾,深入挖掘图像中蕴含的有用信息特征和动态变化。但采用定量分析的研究报道极少。相关系数法通过计算同一单细胞内各像素的光敏剂荧光灰度值与细胞器探针荧光灰度值间的相关系数,来研究光敏剂分布与细胞器分布的线性相关性;其相关系数越接近 1,相关性越强,光敏剂分布与细胞器分布的重叠程度就越大,细胞器内光敏剂含量也就越高^[8]。

本研究同时采用细胞器-细胞荧光强度比值法对 HMME 亚细胞分布进行了定量分析。此方法的应用原理在于:(1)光敏剂荧光图像中各像素的灰度反映细胞内各位置的光敏剂含量;(2)探针荧光图像的灰度分布反映探针所标记细胞器的分布,高灰度像素为细胞器聚集区域;(3)探针荧光高灰度像素范围内的光敏剂荧光平均灰度与细胞所占像素范围内的光敏剂荧光平均灰度之比,反映细胞器聚集区域与细胞区域的光敏剂浓度之比,因此可用于代表细胞器聚集区域的光敏剂相对浓度^[9]。

我们通过划定细胞器聚集区域来确定探针荧光高灰度像素范围的分割阈值;根据细胞器聚集区域的分割参数 m 来细分细胞器聚集区域,其聚集程度随 m 增大而降低, J_1/J_2 随 m 的变化而变化,可全面反映细胞器不同程度聚集区域的光敏剂相对浓度,因此可作为考察光敏剂亚细胞定位情况的量化指标。我们发现在不同的聚集程度下,所取像素点位置的平均荧光强度比值与细胞平均荧光强度比值比较,差异均有统计学

意义,说明该方法在细胞器聚集程度的不同水平上得出的结论具有普遍性和有效性。能够推断出细胞器内平均荧光强度高于细胞平均强度,即确定细胞器内有光敏剂的分布。本研究还发现,高尔基体聚集区域的 J_1/J_2 随 m 的增大呈递减趋势,说明随着细胞器聚集程度的减小,其光敏剂含量也随之降低,二者存在明显的相关性。这进一步证明了光敏剂在高尔基体聚集区域有分布。

本研究所建立的细胞器-细胞荧光强度比值定量分析方法,可有效地应用于光敏剂亚细胞定位研究,弥补定性方法的不足,获得更为精确的量化结果。特别是用于非特异性分布的光敏剂(如 HMME)研究时,能深入有效地挖掘图像中的有用信息,而这些信息特征由于超过人眼分辨力,单靠定性观察是不容易或无法获得的^[10]。

总之,应用直接观察、伪彩色融合及波形比较等定性方法,基本可以判定 HMME 在高尔基体区有分布,但相关系数法,尤其是细胞器-细胞荧光强度比值法能得到更为精确的量化结果,弥补上述定性方法的不足。

参 考 文 献

- 1 戴维德,刘凡光,顾瑛,等. 荧光显微成像技术在光敏剂亚细胞定位及损伤研究中的应用. 中国激光医学杂志,2003,12:247-250.
- 2 Sharman H, Allen CM, Van L, et al. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol*, 2000, 319:376-400.
- 3 Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*, 1991, 53:549-553.
- 4 Kessel D, Yu L, Deng Y, et al. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 1997, 65:422-426.
- 5 戴维德,刘凡光,顾瑛. 细胞光敏损伤位点的研究进展. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:120-122.
- 6 Hsieh YJ, Wu CC, Chang CJ, et al. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol*, 2003, 194:363-375.
- 7 Leung WN, Sun X, Mak NK, et al. Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. *Photochem Photobiol*, 2002, 75: 406-411.
- 8 Trivedi NS, Wang HW, Nieminen AL, et al. Quantitative analysis of Pc 4 localization in mouse lymphoma (LY-R) cells via double-label confocal fluorescence microscopy. *Photochem Photobiol*, 2000, 71:634-639.
- 9 戴维德,王雷,刘凡光,等. 应用激光共聚焦显微成像技术研究光敏剂亚细胞定位. 中国激光医学杂志,2004,13:12-17.
- 10 Hanselman D. 精通 MATLAB 6. 北京:清华大学出版社,2002. 15-30.

(修回日期:2005-06-13)

(本文编辑:吴倩)

· 消息 ·

第六届“中风病人运动再学习方案”学习班通知 (国家级继续教育项目)

北京大学第一医院物理医学康复科自 1999 年以来已成功举办 5 届“中风病人运动再学习方案”学习班,并曾两次邀请到悉尼大学的 J. H. Carr 和 R. Shepherd 教授亲自主讲。第 5 届学习班由《A Motor Relearning Programme for Stroke》(即《中风病人的运动再学习方案》)一书的译者(职称在副主任医师以上)和经验丰富的治疗师承担授课和带实习,在认真整理、汇总前 4 届授课内容(尤其是 Carr 和 Shepherd 教授主讲部分)的基础上,系统地介绍了中风病人运动再学习方案,理论与实践相结合,并融入多年的临床经验和体会,得到学员的一致好评。应广大同行的要求,今年举办的第 6 届学习班授课方式不变,具有丰富的技术含量。

参加对象:主要针对已开展或准备开展中风康复的康复、理疗、针灸推拿及神经内外科的医、护、技术人员,有一定康复治疗基础更好。名额 50 人左右。

学费及学分:学费 800 元,资料费 50 元。食宿统一安排,费用自理。考试合格者授予国家级继续教育学分 13 分及北京大学国家级继续教育结业证(带一寸免冠相片 1 张)。

时间:2005 年 10 月 23 ~ 28 日。(23 日全天报到)。

报到地点:北京市西城区大红罗厂街 1 号,北大医院(北京大学第一医院)第二住院部新楼一层 A 区物理医学康复科。恕不接站。

联系方式:请于 9 月 30 日前将回执寄到:北京大学第一医院物理医学康复科,邮编 100034;联系人:黄真;E-mail: huang-zhen6313@yahoo. com. cn;电话:010-66551122-2455。