

文章编号: 1007-4627(2014)01-0096-05

应用量子点探针观察粒子辐射细胞损伤动态过程

杨林芳¹, 鲁逸林¹, 闫婧雯¹, 吴李君¹, 黄青^{1, 2}

(1. 中国科学院合肥物质科学研究院, 合肥 230031;

2. 中国科学技术大学, 合肥 230026)

摘要: 荧光量子点由于具有发射荧光效率高、光稳定性好、无光漂白等优良特性, 因此在生物学研究中得到广泛应用。用量子点标记细胞, 通过量子点荧光可以对细胞进行长时程观察, 实现活细胞动态示踪。利用量子点和 DiO 荧光染料对 A549 细胞膜双染, 直观展示了量子点优于有机荧光染料的抗光漂白特性, 并阐述了一种利用量子点对细胞 A549 进行标记并观测在 α 粒子辐照下细胞损伤动态变化过程的方法, 这种方法对于阐明粒子辐射作用细胞的过程、了解辐射损伤的机理有一定的优势。

关键词: 荧光量子点; A549 细胞; 粒子辐射

中图分类号: Q691, Q331 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.31.01.096

1 引言

粒子辐射在自然界广泛存在, 并且可与生物体发生作用而产生各种生物学效应。离子束生物工程就是利用粒子辐射作用于生物体而开发起来的一种有用的技术, 其应用研究包括: 植物育种、微生物品种改良、基因工程、动物细胞遗传改良、生命起源研究和环境低剂量暴露与健康等^[1]。粒子辐射作用于生物体在时间上可分为物理阶段、物理化学阶段、化学阶段以及生物阶段等过程, 在作用空间上可从微观生物分子的损伤到宏观生物性状的改变。以往对辐射引起质粒 DNA 断裂、细胞染色体畸变、胞内蛋白含量和酶活影响的研究较多, 检测生物损伤终点的手段包括分子生物学实验、流式细胞技术等, 但对辐射损伤其动态过程可视化研究涉及较少, 主要是因为大部分荧光探针(如: 有机荧光染料)有光漂白现象, 一般不适宜在荧光显微镜下进行长时间观测。

自 20 世纪 80 年代发明荧光量子点材料以来, 量子点技术迅速发展起来并在生物学研究中得到广泛应用^[2]。荧光量子点一般是由 II-IV 族或 III-V 族元素的半导体纳米材料组成, 直径在 1 ~ 100 nm 之间。与

有机荧光染料相比, 它们有如下特性: 激发谱宽且连续, 发射谱窄而发射效率大, 荧光强度高; 发射波长与尺寸相关, 可以用不同尺寸的量子点实现同时多色成像; 光稳定性强无光漂白现象等^[3-4]。利用量子点的这些优点可对细胞的生命过程进行长时间观察。例如: 研究人员利用量子点标记胞内蛋白质(如驱动蛋白、肌球蛋白)、DNA 分子、细胞器等, 对它们的运动及细胞在受到外界干扰和刺激(如病毒侵染、热刺激等)下的响应进行观测^[5-8]。

本文工作利用量子点对 A549 细胞进行标记, 并对粒子辐照条件下的细胞损伤的微观过程进行长时间的观测, 建立和展示了一种运用荧光量子点技术有效进行辐射生物学研究的方法。

2 材料与方法

2.1 细胞爬片

普通 20 mm × 20 mm 盖玻片超声清洗 15 min, 在 75% 乙醇中浸泡 2 h, 超净工作台内将盖玻片置于无菌的直径 35 mm 培养皿中, 无菌 PBS 缓冲液冲洗 3 遍。本实验采用人非小细胞肺癌细胞 A549,

收稿日期: 2013-03-02; 修改日期: 2013-05-09

基金项目: 中国科学院百人计划项目(Y09BR12241); 教育部留学回国人员启动基金项目; 国家自然科学基金资助项目(11175204); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KJCX2-YW-N34); 国家重点基础研究发展计划项目(973计划)(2013CB934304)

作者简介: 杨林芳(1985-), 女, 湖北荆州人, 硕士生, 从事生物光谱与核技术应用方面研究; E-mail: ylf8849@163.com

通信作者: 黄青, E-mail: huangq@ipp.ac.cn.

以 1×10^4 个/mL的细胞浓度将细胞接种于有盖玻片的培养皿中。细胞培养于含10%胎牛血清(灏洋生物制品科技有限责任公司)、青霉素100 U和链霉素100 mg/L(生工生物工程(上海)股份有限公司)的培养基中,置于5% CO₂、37 °C恒温培养箱中。

2.2 荧光标记

2.2.1 A549细胞活细胞膜特异性染色

DiO荧光染料(3, 3'-diocadecyloxycarbocyanine perchlorate)(碧云天公司)是一种常见的细胞膜荧光探针,进入细胞膜之前荧光非常弱,当与膜上脂类结合后,能在蓝光激发下发出绿色荧光。利用DiO荧光染料对A549细胞的染色具体步骤如下:(1)将10 mg的DiO溶于5 ml无水乙醇中储存,储存液浓度为2 mg/ml;(2)用Tyrode缓冲液将DiO稀释至工作液浓度10 μmol/L;(3)当细胞爬片上的细胞密度达到70%~80%时,用DiO工作液孵育30 min;(4)Tyrode缓冲液清洗细胞爬片3次,每次5 min。

A549细胞膜上表达凝集素(lectin),利用biotin-WGA(Vector)和QD-SA(武汉珈源公司,连接了链酶亲和素的量子点超敏荧光试剂盒QK605S)对细胞膜特异性染色。具体步骤如下:(1)当细胞爬片上的细胞密度达到70%~80%时,PBS缓冲液清洗细胞爬片;(2)biotin-WGA在Tyrode缓冲液中以1:250稀释,4 °C孵育10 min;Tyrode缓冲液清洗细胞爬片3次,每次5 min;(3)QD-SA在Tyrode缓冲液中以1:200稀释,4 °C孵育10 min;(4)Tyrode缓冲液清洗细胞爬片3次,每次5 min。

2.2.2 A549细胞活细胞示踪

量子点活细胞示踪试剂(武汉珈源公司量子点活细胞示踪试剂盒QK605CT)是利用穿膜肽与量子点在体外非共价结合后,穿膜肽附着在核壳结构的量子点外周,使穿膜肽能较容易介导量子点进入细胞膜,同时量子点荧光性质不受影响。具体步骤如下:(1)将试剂组分A(量子点)和组分B(导肽)微量室温混合5 min;(2)混合物以1:100倍稀释于完全培养基中;(3)长有A549细胞的爬片用完全培养基清洗两次;(4)将混合物与细胞孵育4~5 h。

Hoechst33342(碧云天公司)复染细胞核,统计10000个细胞中经辐照后的细胞核异常率,实验重复3次。具体步骤如下:5 μg/mL的Hoechst33342与细胞37 °C孵育30 min;Tyrode缓冲液清洗细胞爬片3次,每次5 min。

2.3 α粒子辐照

本实验所用辐照设备为中国科学院离子束生物工程重点实验室的旋转可调α-放射源装置^[9]。参数如下:放射源²⁴¹Am,出射α粒子能量为5.5 MeV,活度:7.4 MBq,剂量率约为1.11 cGy/s。辐射窗口出射的α粒子经过Mylar膜(厚度3.5 μm)到达细胞样品,达到细胞时平均能量为3.3 MeV,在细胞中射程大约20 μm。α粒子辐照细胞时,将细胞爬片表面仅保留一薄层培养基,倒扣在辐射源出射口,辐照剂量为30 cGy,辐照完成后将细胞爬片重新置于含有培养基的培养皿中。根据CR-39检测本实验中α粒子到达细胞表面的剩余能量,计算得出爬片周边区域所受的剂量高于中间区域(水层厚薄的影响),对照组细胞同辐照组一样经过倒扣等处理方法,观察爬片周边区域的细胞变化过程,实验重复5次。

2.4 荧光成像

A549细胞爬片置于有培养基的培养皿中,荧光显微镜(奥林巴斯TH4-200),20倍物镜观察,DiO的激发波长488 nm,Hoechst33342受紫外激发,量子点可用紫外和蓝光激发。荧光观测在室温下进行。

3 结果与讨论

3.1 量子点和DiO对A549细胞膜的双染(活体)荧光观测实验

量子点用于细胞染色对于长时间观测比传统有机染料具有明显优势。图1是用量子点和DiO对A549细胞膜的双染图。从图1可看出,量子点在长时间的激发光激发下,荧光没有减弱,相反荧光强度会有一些的上升。而DiO荧光染料的荧光在激发光激发下,荧光强度不断下降,在30 min后荧光已经很弱,到45 min时已经基本消失了,直观展示了量子点具有优于有机荧光染料的抗淬灭性质。

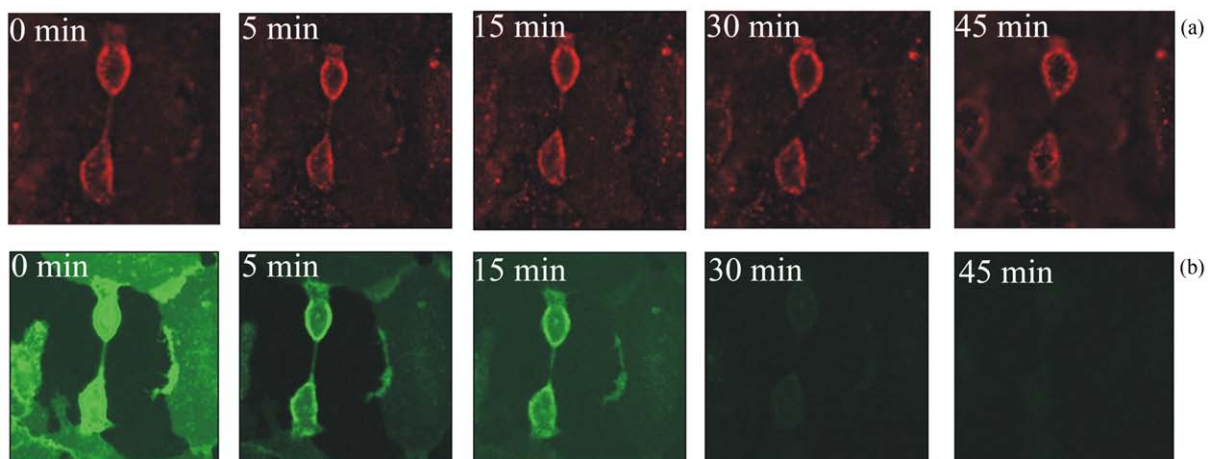


图 1 (在线彩图)量子点 QD-SA 和 DiO 对活细胞 A549 细胞膜的双染图
(a) 是紫外激发下, 量子点的红色荧光; (b) 是蓝光激发下, DiO 荧光染料的绿色荧光。

3.2 用量子点标记细胞并观测 α 粒子辐照作用后细胞的变化过程

细胞在受到粒子辐照后, 会出现细胞凋亡、坏死和自噬等现象。细胞坏死的特点是: 膜通透性增高, 细胞肿胀, 细胞器肿大, 最后细胞破裂。细胞凋亡的特点是: 染色质固缩、细胞胞间连接减少, 细胞变圆, 其中胞膜空泡化是细胞凋亡的最独特的性质, 空泡作为凋亡小体的前体, 呈小的、近似圆形的胞质碎片包裹在细胞膜内^[10]。

图 2(a) 中显示了胞吞了量子点的 A549 细胞在经

过 30 cGy 的 α 粒子辐照后随时间的变化过程 (亮色区域是量子点荧光)。从图中可以看出, A549 细胞在受到 α 粒子辐照后, 在 25 min 时发现细胞已经开始皱缩, 50 min 时可见细胞中量子点聚集, 胞膜出现空泡, 75 min 时细胞皱缩严重, 量子点在细胞中有一定程度的弥散, 并且有的细胞明显发生胞膜空泡化 (如图中箭头所示)。以上特点说明这些细胞有可能进入凋亡途径。图 2(b) 中是对照组的细胞形态, 可见在观测时间范围内细胞的质膜结构和量子点在胞内的分布没有明显的变化。

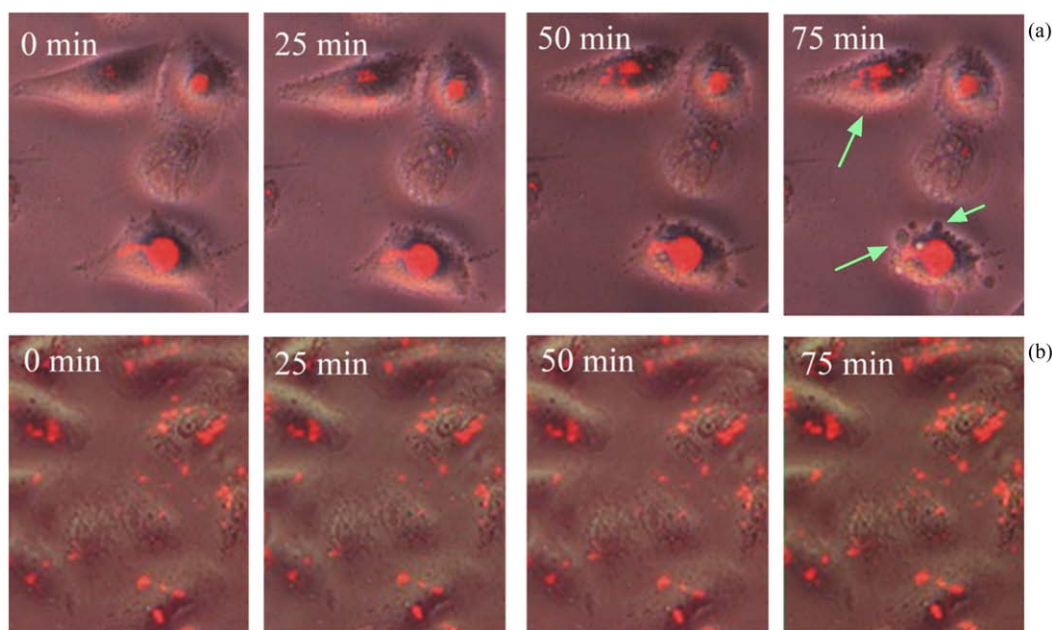


图 2 (在线彩图)实时观测胞吞了量子点的 A549 在接受 30 cGy α 粒子辐照后的细胞变化过程
(a) 为 30 cGy 辐照组; (b) 是未经 α 粒子辐照的对照组。

另外, 我们还对 α 粒子辐照过的A549细胞在培养24 h后用Hoechst33342染色观测A549细胞中细胞核损伤情况, 如图3所示。观测双染的A549细胞细胞核的形态, 统计核凸出、核质内凹、核碎裂、不等缢裂、双核细胞和微核细胞在总细胞中所占的比例。30 cGy α 粒子辐照后的核异常率明显增加, 其中主要表现为核变形, 总核异常率为13.9%, 而对照组的总核异常率为5.7%。以前也有研究人员对不同剂量 γ 射线引起人体外周血淋巴细胞核损伤作了统计研究^[11], 发现辐照后的细胞其核变形率(核凸出、核质内凹等)明显增加。这里, 我们使用量子点和Hoechst33342双染细胞的方法, 可以通过量子点在胞内的分布以及细胞核的形态来判断细胞受辐照后的核异常率, 这样的判断方法可能更为准确。

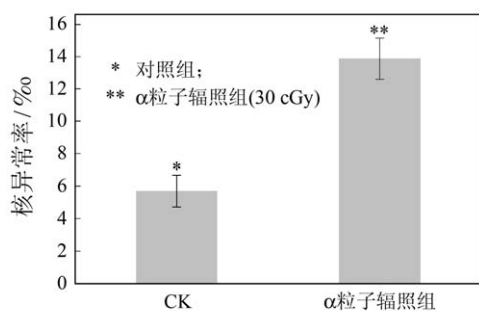


图3 A549细胞辐照后的细胞核异常率

通过以上实验和分析, 我们展示了应用量子点技术可以有效实时跟踪细胞在受粒子辐射作用后其损伤、凋亡或坏死等变化的动态情况。

4 结论

本文利用量子点活细胞示踪技术, 对经 α 粒子辐照的细胞进行长时间观测, 观察到细胞内量子点在胞

内的分布及细胞的形态的变化, 实时示踪了细胞在受重离子辐照后的变化过程。从连续的荧光图拍摄中, 发现有些细胞发生皱缩、胞膜出现空泡、量子点聚集或进入细胞核区等细胞损伤的动态过程。通过这项工作, 我们建立了一种利用量子点染色对细胞粒子辐射效应进行实时检测的方法, 展示了应用荧光量子点技术可以对辐射生物学有关问题进行研究。

致谢 感谢中国科学院合肥物质科学研究院强磁场中心为本实验荧光观测提供的帮助。

参考文献:

- [1] YU Zengliang. Introduction to Ion Beam Biotechnology[M]. New York: Springer. 2006.
- [2] MICHALET X, PINAUD F F, BENTOLILA L A, *et al.* Science, 2005, **307**: 538.
- [3] CHAN W C, NIE S. Science, 1998, **281**: 2016.
- [4] ALIVISATOS P. Nature Biotechnology, 2004, **22**: 47.
- [5] LU H L, KENNEDY G G, WARSHAW D M, *et al.* J. Biol Chem, 2010, **285**: 42068.
- [6] LIU Y, ZHANG M X, ZHANG Z L, *et al.* Front Biosci, 2008, **13**: 923.
- [7] LI F, ZHANG Z P, PENG J, *et al.* Small, 2009, **5**: 718.
- [8] DRESSLER C, MINET O, BEUTHAN J. *et al.* J. Biomed Opt, 2005, **10**: 041209.
- [9] HU B, WU J, HAN W, *et al.* Nuclear Science and Techniques, 2005, **16**(2): 102.
- [10] CHAABANE W, USER S D, ELGAZZAH M, *et al.* Arch Immunol Ther Exp, 2013, **61**: 43.
- [11] XUE K X, WANG S, ZHOU P, *et al.* Acta Genetica Sinica, 1990, **17**(1): 70.(in Chinese)
(薛开先, 王苏, 周平, 等. 遗传学报, 1990, **17**(1): 70.)

Quantum Dots as a Probe to Observe the Process of Cell Damage Induced by Particle Irradiation

YANG Linfang¹, LU Yilin¹, YAN Jingwen¹, WU Lijun¹, HUANG Qing^{1, 2}

(1. Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Institute of Biotechnology and Agriculture Engineering, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

2. University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: Owing to the excellent optical properties such as high quantum yield of emission, photo-stability and anti-photobleaching, fluorescent quantum dots(QDs) now have been extensively applied in bioscience research. Labeling cells by quantum dots allow long-term observation of the cellular processes. In this paper, we employed both QDs and DiO dye to label cells and thus showed the superior anti-photobleaching property of QDs directly, and also reported the method of application of QDs in observing the damage process of A549 cells induced by α particle irradiation, demonstrating the advantage of application of QDs in the radiobiology research.

Key words: quantum dot; A549 cell; particle radiation

Received date: 2 Mar. 2013; **Revised date:** 9 May 2013

Foundation item: Hundred Talents Program of Chinese Academy of Sciences (Y09BR12241); Scientific Research Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars by State Education Ministry; Key Knowledge Innovative Project of Chinese Academy of Sciences (KJCX2-YW-N34); National Natural Science Foundation of China (11175204); National Basic Research Program of China(973 Program)(2013CB834402)

Corresponding author: HUANG Qing, E-mail: huangq@ipp.ac.cn.

<http://www.npr.ac.cn>