

微孔板荧光观察一氧化氮影响癌细胞线粒体膜电位

黄义梅 杨洪钦 陈江旭 王瑜华 郑莉琴 谢树森

(福建师范大学激光与光电子技术研究所, 医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建省光子技术重点实验室, 福建 福州 350007)

摘要 利用微孔板荧光分析仪结合线粒体膜电位特异性荧光探针罗丹明 123 测量了内外源性一氧化氮对癌细胞线粒体膜电位的影响。实验结果显示添加一氧化氮供体后, 荧光强度快速增大, 且在较长的一段时间内保持不变, 而对照组的荧光强度没有明显变化; 此外, 加载荧光探针前用一氧化氮合酶抑制剂和一氧化氮供体孵育 24 h 分别能降低和提高线粒体膜电位。研究结果表明增加内外源性一氧化氮均能提高线粒体膜电位, 这对于在细胞器水平认识一氧化氮参与促进癌细胞增殖与转移的过程具有一定的意义。

关键词 生物光学; 微孔板荧光分析; 一氧化氮; 线粒体膜电位; 癌细胞

中图分类号 TN247; R730.23 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201239.s104002

Determination of Nitric Oxide on Cancer Cell Mitochondria Membrane Potential Based on Microplate Fluorescence

Huang Yimei Yang Hongqin Chen Jiangxu Wang Yuhua Zheng Liqin Xie Shusen

(Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine of Ministry of Education, Fujian Provincial Key Laboratory of Photonic Technology, Institute of Laser and Optoelectronics Technology, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China)

Abstract The effects of endogenous and exogenous nitric oxide on cancer cell mitochondrial membrane potential are studied by combining microplate fluorescence analyzer and special fluorescence probe rhodamine 123. Results show that the fluorescence intensity increases rapidly and keeps at a high level for a quite long period after nitric oxide donor is injected into the cells, while the fluorescence intensity of control group do not change significantly. Moreover, incubation with nitric oxide synthase inhibitor or nitric oxide donor for 24 hours prior rhodamine 123 loading can decrease or increase mitochondrial membrane potential, respectively. These results indicate that the increase of endogenous or exogenous nitric oxide can lift up the potential of mitochondrial membrane. It will be helpful to understand the role of nitric oxide in promoting cancer cell proliferation and metastasis at organelle level.

Key words biotechnology; microplate fluorescence; nitric oxide; mitochondrial membrane potential; cancer cell

OCIS codes 000.1430; 120.1880; 120.4820; 170.6280

1 引 言

据世界卫生组织统计, 癌症是世界首要死因之一, 美国癌症协会最新的统计报告显示在美国每四名死亡的人中就有一人死于癌症^[1]。虽然全世界已有大量的科研力量投入到癌症的相关研究中, 但是目前癌症的治疗手段仍有很大的局限性, 治疗效果

也不尽人意^[1~5]。无法获得良好疗效的原因之一在于人们对癌症的机制了解还不够充分^[6]。因此, 寻求癌细胞的生长和转移机制刻不容缓。近年来, 关于一氧化氮分子参与癌细胞生长和转移机制以及一氧化氮分子用于癌症治疗的研究逐渐成为了癌症研究的一个热点^[7~13]。一氧化氮分子的作用具有两

收稿日期: 2012-02-01; **收到修改稿日期**: 2012-03-01

基金项目: 国家自然科学基金(60978071)和福建省自然科学基金(2010J01322)资助课题。

作者简介: 黄义梅(1978—), 男, 博士研究生, 主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: Ymir.huang@gmail.com

导师简介: 谢树森(1940—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: sssxie@fjnu.edu.cn

(通信联系人)

面性^[7,9,11,12],其作用取决于浓度的高低。当一氧化氮浓度低时,它对癌细胞的生长和转移起促进作用,但是当其浓度高时,则能抑制癌细胞的生长与转移。

低浓度一氧化氮促进癌细胞生长与转移的原因可能有两个方面:1) 一氧化氮促进新生血管的生长,为癌组织提供更多的养分;2) 一氧化氮能抑制免疫系统的活性,使癌细胞逃脱免疫系统的伤害。高浓度一氧化氮抑制癌细胞生长与转移的原因主要是利用高浓度一氧化氮的毒性来杀死癌细胞,阻止其增殖^[7]。虽然人们对一氧化氮参与癌细胞生长与转移的机制有一定的认识,但是在细胞器层面的研究还较少。

本文利用微孔板荧光技术结合线粒体膜电位特异性荧光探针观察内外源一氧化氮对癌细胞线粒体膜电位的影响。和其他众多的光学检测技术相比^[14~16],微孔板荧光技术具有准确、便捷、高通量动态检测的优点。此外,之所以选择线粒体膜电位作为一氧化氮作用的表征是基于以下原因:癌细胞快速增殖的方式必然需要大量的能量供应,而线粒体作为细胞内最主要的能量来源,其膜电位可以反映出细胞的生理状态^[17,18]。

2 材料与方法

2.1 HeLa 细胞培养

HeLa 细胞由福建师范大学生命科学院友情提供。HeLa 细胞经过复苏,加入含 10% 胎牛血清的达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM),并置于 37 °C,5% CO₂ 的孵育箱中培养,两天全量换液。经过 2~3 次传代,以 10000 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中。接种 24 h 后用于实验^[19]。

2.2 线粒体膜电位荧光探针加载

线粒体膜电位特异性荧光探针罗丹明 123 的浓度配置为 1 μM (μmol/L)^[17]。每孔加入 100 μL 荧光探针溶液,并置于 37 °C,5% CO₂ 的孵育箱中培养 30 min。然后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 遍,每遍 5 min。最后每孔加入 90 μL 的台氏液。台氏液的配置如下:150 mM NaCl,5 mM KCl,2 mM CaCl₂,2 mM MgCl₂ · 6H₂O,10 mM 葡萄糖,10 mM HEPES,用 NaOH 将 pH 值调整到 7.4。

2.3 微孔板荧光检测

实验中采用的微孔板荧光分析仪的光路如图 1 所示。一个卤钨灯作为光源,经过一个激发滤光片 (F485) 后形成窄带通的激发光源,在双色镜的作用下入射到样品上。荧光探针分子受激后产生荧光信

号,通过发射滤光片 (F535) 后进入光电倍增管 (PMT),并转化成电信号。

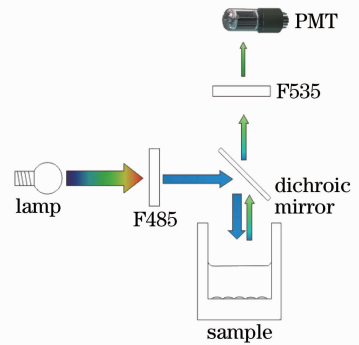


图 1 微孔板荧光分析仪光路示意图

Fig. 1 Schematic of microplate fluorescence analyzer

为了获得添加一氧化氮供体 (SNP) 后荧光强度的动态变化,实验采用荧光重复测量模式,并采用自动进样器每孔注入 10 μL 的 SNP。同时,采用自动进样器每孔注入 10 μL 台氏液到另一组细胞中,以消除自动进样所引起的测量误差,并将该组细胞作为对照组。

3 结果与讨论

3.1 线粒体膜电位对外源性一氧化氮的动态响应

通过设置荧光重复测量模式以及自动进样器,获得了线粒体膜电位对外源性一氧化氮的动态响应。当外源性 SNP 注入后,所检测到的荧光强度增大,且保持在一个稳定状态,而对照组的荧光强度则未见明显变化,如图 2 所示。在第 5 个循环开始前进行自动进样 10 μL 的 SNP (100 μM),最终的 SNP 浓度为 10 μM。测试所用的参数为:Counting time, 0.1 s; lamp energy, 5000; cycle time, 14.6 s; excitation filter, F485; emission filter, F535。图中纵坐标为荧光强度比率值,即荧光强度值除以初始荧光强度值。数据统计显示注入 SNP 后,两组数据有显著差异 ($p < 0.01$)。线粒体膜电位特异性荧光探针罗丹明 123 是一种亲脂性阳离子化合物,而线粒体膜是一种双层磷脂结构,其跨膜电位为内负外正。因此,当线粒体膜电位 (绝对值) 增大时,由于电场的作用,更多的荧光探针分子聚集在线粒体中,从而使线粒体中的荧光探针浓度增大,使荧光强度也增大。所以荧光强度的增大表明了线粒体膜电位的增大。图 2 显示当外源性一氧化氮进入细胞后,荧光强度增强。这表明了在外源性一氧化氮的作用下,线粒体膜电位增加。一氧化氮引起线粒体膜电位的增加可能与一氧化氮影响线粒体呼吸链相关。有文献报道一氧

化氮可通过抑制线粒体呼吸链中复合体IV引起线粒体膜电位增大^[20~23]。

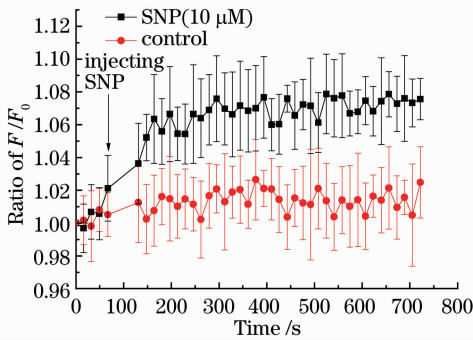


图2 添加一氧化氮供体对线粒体膜电位的影响
Fig. 2 Effect of SNP on mitochondrial membrane potential

3.2 内外源性一氧化氮对线粒体膜电位的影响

为了研究内外源性一氧化氮对线粒体膜电位的影响,分别采用一氧化氮合酶抑制剂(L-NMMA)以及SNP在加载线粒体荧光探针前24 h 孵育 HeLa 细胞。实验发现添加 L-NMMA 组的荧光强度最低,而添加 SNP 组的荧光强度最高,如图 3 所示。为了验证这 3 组荧光强度值的差异是否由细胞密度差异引起的,实验采用光学显微镜观察了 3 组细胞的密度,发现 3 组细胞的密度无显著差异。因此,这 3 组荧光强度值的差异表明了内外源性一氧化氮的增加均能引起线粒体膜电位增大。有研究表明线粒体膜电位的大小与细胞增殖速率之间具有一定的相关性^[24,25]。Hu 等^[24]采用氮泵激光器辐照黑色素瘤细胞株 A2058 细胞,发现激光辐照后细胞的线粒体膜电位增大,而且细胞增殖速率也同时增大。但是当添加了促使线粒体膜电位降低的解偶联剂(CCCP)

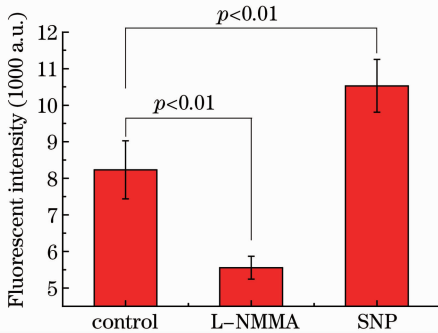


图3 一氧化氮合酶抑制剂和一氧化氮供体对线粒体膜电位的作用, LNMMA 和 SNP 的浓度分别为 1 mM 和 10 μM

Fig. 3 Role of L-NMMA and SNP on the mitochondrial membrane potential. The concentration of L-NMMA and SNP are 1 mM and 10 μM, respectively

时,激光辐照就无法增大细胞增殖速率。因此,一氧化氮促使线粒体膜电位增大可能是一氧化氮促进癌细胞增殖^[7]的原因之一。

4 结 论

利用微孔板荧光技术观察了一氧化氮对 HeLa 细胞线粒体膜电位的影响。发现内外源性一氧化氮的增加均能引起线粒体膜电位的增加。这种特性或许是癌细胞能快速增殖的原因之一。深入开展相关研究有助于提高癌细胞增殖、转移的认识,并对癌症的治疗有所裨益。

参 考 文 献

- 1 R. Siegel, E. Ward, O. Brawley *et al.*. Cancer statistics, 2011 [J]. *CA: A Cancer J. Clin.*, 2011, **61**(4): 212~236
- 2 A. Jemal, R. Siegel, J. Q. Xu *et al.*. Cancer statistics, 2010 [J]. *CA: A Cancer J. Clin.*, 2010, **60**(5): 277~300
- 3 A. Jemal, R. Siegel, E. Ward *et al.*. Cancer statistics, 2009 [J]. *CA: A Cancer J. Clin.*, 2009, **59**(4): 225~249
- 4 B. K. Edwards, E. Ward, B. A. Kohler *et al.*. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates[J]. *Cancer*, 2010, **116**(3): 544~573
- 5 A. Jemal, F. Bray, M. M. Center *et al.*. Global cancer statistics[J]. *CA: A Cancer J. Clin.*, 2011, **61**(2): 69~90
- 6 H. H. Q. Heng, J. B. Stevens, S. W. Bremer *et al.*. The evolutionary mechanism of cancer[J]. *J. Cell. Biochem.*, 2010, **109**(6): 1072~1084
- 7 D. Fukumura, S. Kashiwagi, R. K. Jain. The role of nitric oxide in tumour progression[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, **6**(7): 521~534
- 8 S. Singh, A. K. Gupta. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies [J]. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2011, **67**(6): 1211~1224
- 9 S. Mocellin, V. Bronte, D. Nitti. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities [J]. *Med. Res. Rev.*, 2007, **27**(3): 317~352
- 10 D. Hirst, T. Robson. Targeting nitric oxide for cancer therapy [J]. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2007, **59**(1): 3~13
- 11 S. Mocellin. Nitric oxide: cancer target or anticancer agent? [J]. *Curr. Cancer Drug Targets.*, 2009, **9**(2): 214~236
- 12 V. Prabhu, C. Gurusvayoorappan. Nitric oxide: pros and cons in tumor progression [J]. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2010, **32**(3): 387~392
- 13 W. M. Xu, L. Z. Liu, M. Loizidou *et al.*. The role of nitric oxide in cancer[J]. *Cell Res.*, 2002, **12**(5-6): 311~320
- 14 Xu Dong, Xiang Liangzhong, Ji Xuanrong. Photoacoustic imaging system based on multi-channel parallel acquisition[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(2): 0204002
- 15 许 栋, 向良忠, 纪轩荣. 基于多通道并行采集的光声成像系统 [J]. *中国激光*, 2011, **38**(2): 0204002
- 16 Yang Liu, Wang Chuan, Ding Zhihua *et al.*. Image reconstruction in dioptric media for spectral domain optical coherence tomography [J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(5): 0504001
- 17 杨 柳, 王 川, 丁志华等. 屈光介质中谱域光学相干层析成像的重构[J]. *中国激光*, 2011, **38**(5): 0504001

- 16 Wang Yan, Zhao Lingling, Chen Tongsheng *et al.*. Study on cell cycle using fluorescence lifetime imaging microscopic system based on a streak camera[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(3): 0304002
王 岩, 赵羚伶, 陈同生等. 利用基于扫描相机的荧光寿命成像显微技术研究细胞周期[J]. *中国激光*, 2011, **38**(3): 0304002
- 17 S. W. Perry, J. P. Norman, J. Barbieri *et al.*. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide[J]. *Bio. Techniques*, 2011, **50**(2): 98~115
- 18 X. Q. Ye, G. H. Wang, G. J. Huang *et al.*. Heterogeneity of mitochondrial membrane potential: a novel tool to isolate and identify cancer stem cells from a tumor mass? [J]. *Stem Cell Rev. and Rep.*, 2011, **7**(1): 153~160
- 19 L. Zhang, Z. Xiong, Z. J. Li *et al.*. Effects of red light emitting diode on apoptosis of HeLa cells and suppression of implanted HeLa cells growth in mice[J]. *J. Radiat. Res.*, 2009, **50**(2): 109~117
- 20 S. Moncada, J. D. Erusalimsky. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? [J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, **3**(3): 214~220
- 21 S. L. Pennec, D. M. Prunier, N. B. Bouzamondo *et al.*. Nitric oxide and calcium participate in the fine regulation of mitochondrial biogenesis in follicular thyroid carcinoma cells[J]. *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**(20): 18229~18239
- 22 G. C. Brown. Nitric oxide and mitochondrial respiration [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1411**(2-3): 351~369
- 23 G. C. Brown. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1504**(1): 46~57
- 24 W. P. Hu, J. J. Wang, C. L. Yu *et al.*. Helium-Neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria [J]. *J. Invest. Dermatol.*, 2007, **127**(8): 2048~2057
- 25 E. Holmuhamedov, L. Lewis, M. Bienengraeber *et al.*. Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting [J]. *FASEB J.*, 2002, **16**(9): 1010~1016

栏目编辑: 韩 峰