

基于动态光镊技术的卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡检测

张聿全¹ 吴晓静² 王弋嘉² 闵长俊³ 朱思伟^{2*} 袁小聪³

(¹南开大学 现代光学研究所, 天津 300071; ²天津市人民医院, 天津 300191)
³深圳大学 光电工程学院微纳光学研究所, 广东 深圳 518060)

摘要 化学疗法治疗癌症的主要机制是通过药物调控使无限增殖的癌细胞恢复到正常凋亡,因而实时检测用药过程中癌细胞的凋亡情况对于临床治疗具有重要意义。以卵巢癌 SKOV3 细胞作为研究对象,针对治疗药物(顺铂)不同浓度培养液条件下,利用搭建的动态光镊系统在微流控芯片上通过测量捕获效率参数对四组细胞的凋亡情况分别进行检测。实验结果表明,该系统对不同药物浓度培养下 SKOV3 细胞凋亡情况的检测具有良好效果。与传统的检测手段相比,该系统细胞用量小、耗时短、无需标记、并可实现活体细胞检测,因此为细胞凋亡的临床检测提供了重要指导意义。

关键词 生物光学;动态光镊;细胞凋亡检测;SKOV3

中图分类号 O439 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201441.1104001

Monitoring SKOV3 Cell Apoptosis Based on Dynamic Laser Tweezers

Zhang Yuquan¹ Wu Xiaojing² Wang Yijia² Min Changjun³
Zhu Siwei² Yuan Xiacong³

¹Institute of Modern Optics, Nankai University, Tianjin 300071, China

²Tianjin Union Medicine Centre, Tianjin 300121, China

³Institute of Micro & Nano Optics, College of optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

Abstract Mechanism of chemotherapeutics for tumor therapy is to restore infinite proliferous cancer cells to normal apoptosis, therefore, apoptosis monitoring has important guidance for clinical treatment. A novel and robust method for apoptosis monitoring of tumor cells is engineered based on dynamic laser tweezers, using SKOV3 cell line as typical sample. SKOV3 cells are cultured under four gradient concentrations of cisplatin, and trapping efficiency of four groups are measured by proposed system, which presents great advantages of celerity, low consumption, and label-free explorations for living cells without perturbing experimental conditions in combination with classical probes. The proposed technique has great potential in improving cancer treatment by monitoring the objective efficacy of tumor cell killing.

Key words biotechnology; dynamic laser tweezers; cell apoptosis monitoring; SKOV3

OCIS codes 350.4855; 120.4640; 000.1430

1 引 言

癌症是威胁人类生命健康最危险的疾病之一,其产生的根本原因是控制细胞生长增殖机制失常,即与细胞凋亡的异常有关^[1-2]。近年来,研究表明

细胞凋亡是各种抗癌药物引发癌细胞死亡的主要方式^[3-5]。化疗是目前临床上治疗恶性肿瘤的最重要手段之一,大多数化疗药物都能引起其敏感细胞的凋亡,因而对细胞凋亡的检测在临床肿瘤治疗过程

收稿日期: 2014-04-21; 收到修改稿日期: 2014-06-05

基金项目: 国家自然科学基金(61138003, 61377052, 11204141)、天津市自然科学基金(11JCZDJ15200)、高等学校博士学科点专项科研基金(20120031120034)

作者简介: 张聿全(1986—),男,博士研究生,主要从事光镊技术方面的研究。E-mail: nkzhangyuquan@163.com

导师简介: 袁小聪(1963—),男,博士,教授,主要从事微纳光学方面的研究。E-mail: xcyuan@szu.edu.cn

*通信联系人。E-mail: siweiz@medmail.com.cn

本文电子版彩色效果请详见中国光学期刊网 www.opticsjournal.net

中具有十分重要的实际意义。

目前,肿瘤细胞凋亡的检测方法^[6-12]主要有:1)形态学观察法,如光学显微镜、电子显微镜等,但该类方法难于定量分析,且电镜样品制备过程复杂,成本昂贵;2)细胞化学测定法,如流式细胞仪、酶联免疫吸附法、DNA 琼脂电泳等,该类方法虽然可以实现高通量定量检测,但易出现错检漏检以及不能原位检测等缺点;3)活体分子功能成像法,如核素示踪、光学与生物发光等,这些手段需要引入示踪元素或标记物,因而不能实现活体检测。

光镊技术自 20 世纪 80 年代发明以来^[13],由于其非接触无损伤的操作方式,在生物医学领域得到了非常广泛的应用^[14-19]。本文提出了一种基于动态光镊系统^[20-21]的细胞凋亡新型检测方法,并以女性常见的卵巢恶性肿瘤细胞为研究对象,研究了化疗药物(顺铂)4 种不同浓度下培养的卵巢癌 SKOV3 细胞的凋亡情况。实验结果表明,该方法可以实现对癌细胞凋亡程度的无标记快速检测,凋亡程度可以通过光镊系统的捕获效率进行量化,因而具有较高的可靠性,可为临床检测提供重要指导意义。

2 实验装置

图 1 所示为用于 SKOV3 细胞凋亡检测的动态光镊系统示意图。由于红外光对生物组织的穿透深度较大且伤害较小,因此系统采用 1070 nm 的近红外光束作为捕获光源。激光首先经透镜 L_1 和 L_2 进行准直,后经透镜 L_3 和 L_4 进行缩束,以跟显微物镜的孔径匹配。图中 GM_1 和 GM_2 为二维振镜系统,两个振镜均可独立做轴向旋转,通过两个振镜配合可以实现激光沿二维平面内任意轨迹的扫描,实验

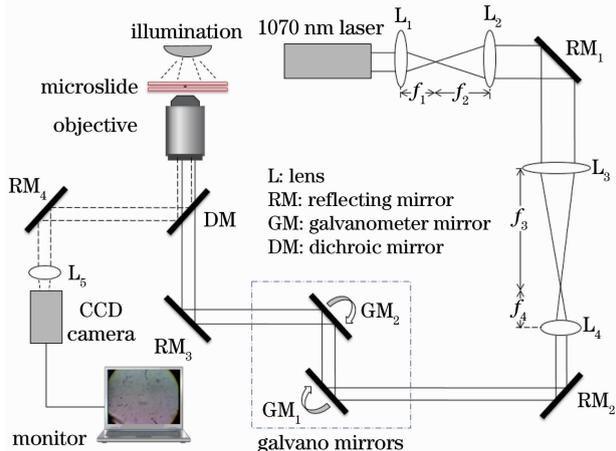


图 1 动态光镊系统结构示意图

Fig. 1 Schematic of the dynamic laser tweezers system

选择以光轴为圆心的圆周运动轨迹。随后,激光经倒置显微物镜聚焦进而实现对细胞的捕获,捕获细胞的动态操纵通过软件控制振镜系统的振幅及速度实现。最后,通过白光光源照射实验微流控芯片,经物镜及透镜 L_5 成像到电荷耦合器件(CCD)上,经显示器实时监测细胞的运动状态。

该动态光镊系统中对细胞的动态操纵是在微流控芯片中进行的,如图 2 所示。首先利用聚二甲基硅氧烷(PDMS)制作微流通道,然后将其粘到载玻片上。芯片中心为边长为 5 mm 的正方形样品池,两侧为长为 8 mm,宽为 1 mm 的微流通道,样品池和通道高度均为 $100 \mu\text{m}$,输入及输出管道的内径为 $320 \mu\text{m}$,因此相对于直径只有 $10\sim 20 \mu\text{m}$ 的细胞来说,可以顺利流经微流控芯片。细胞样品经微泵系统泵入样品池,聚焦的激光即可对细胞进行捕获及动态操纵。实验时,微泵系统停止运转,因而细胞所处液体环境可近似认为静止的水环境,测量结束后可通过微泵系统泵入新的样品,重新捕获新的样品细胞继续实验。

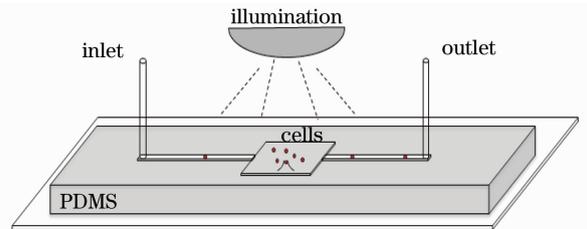


图 2 操纵细胞的微流控芯片结构示意图

Fig. 2 Structural distribution of microfluidic chip manipulating cells

3 实验方法

实验中使用的 $100\times$ 物镜的工作距离约为 0.2 mm ,此处使用载玻片厚度约为 $180 \mu\text{m}$,因而被捕获细胞距离样品池上下表面及样品池壁保持有至少几十微米的距离,细胞可近似为处于自由水环境中。实验过程中,细胞沿直径约 $45 \mu\text{m}$ 的圆周轨道低速运动;同时,由于细胞内部的骨架结构也有维持细胞特定形态的功能,因此将细胞形态简化为球形。而球形物体在液体环境中运动时,将不可避免地受到来自液体的粘滞阻力,即斯托克斯力,可表示为

$$F_{\text{drag}} = 6\pi\eta av, \quad (1)$$

式中 η 为液体的粘滞系数, a 为球的半径, v 为球相对于液体的运动速度。实验中,细胞样品首先经生理盐水稀释 50 倍,因而周围水环境的折射率粘滞系数可认为是常数,SKOV3 细胞半径介于 $6\sim 10 \mu\text{m}$

之间,对于确定细胞来说其所受到的液体阻力与其运动的速度成正比。

光镊对球形微粒产生的捕获力,可表示为^[22]

$$F_{\text{trap}} = nQP/c, \quad (2)$$

式中 n 为周围液体的折射率, P 为捕获激光的功率, c 为光速, Q 为光镊系统对微颗粒的捕获效率。 Q 是一个无量纲参量,对于确定的捕获对象来说,光镊系统的捕获效率是一个常量^[20]。

动态光镊捕获微颗粒在液体中做低速圆周运动时,光镊力大于粘滞阻力;而当颗粒运动速度增大到一定数值时,其所受的光镊力与来自液体的阻力将达到平衡;继续增大光镊的移动速度,微颗粒将脱离光镊的捕获而逃逸,这里将该临界逃逸速度定义为 v_{critical} 。此时有

$$F_{\text{drag}} = 6\pi a\eta v_{\text{critical}} = F_{\text{trap}} = nQP/c. \quad (3)$$

由此,可以得到关于光镊捕获效率的表达式

$$Q = 6\pi\eta a c v_{\text{critical}} / (nP), \quad (4)$$

即在平衡状态下,光镊的捕获效率取决于细胞的半径 a ,周围液体的折射率 n ,粘度 η ,捕获功率 P ,以及逃逸速度 v_{critical} 。

实验中,环境温度控制在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,捕获功率限制在 $6\sim 20\text{ mW}$ 以尽量降低光热效应的影响,细胞样品用生理盐水稀释 50 倍,因而细胞周围水环境折射率近似为 1.33、粘度近似取 $1.0\times 10^{-3}\text{ N}\cdot\text{s}/\text{m}^2$,捕获细胞的半径则进行三个方向测量取均值以减小误差。前期的工作表明,微粒尺寸对系统捕获效率基

本没有影响^[21],因此通过每次测量的捕获细胞尺寸以及记录的细胞临界速度,即可根据(4)式得到对应的捕获效率 Q 。

4 实验结果及讨论

人卵巢癌细胞株 SKOV3 源于卵巢癌患者腹水,对于顺铂药物具有较高的敏感性,顺铂的中心以二价铂离子同两个氯原子和氨分子结合,铂通过与 DNA 碱基配位以及 DNA 链交联,抑制癌细胞的 DNA 复制并使之发生细胞凋亡^[23]。实验中,将 SKOV3 细胞株分为 4 组,在含有 10% (体积分数) 小牛血清 (FBS)、100 u/mL 青霉素 (penicillin-G) 以及 100 mg/mL 链霉素的 McCoy's 5A 培养液中培养,4 组分别加入不同浓度的顺铂 (0, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,最后用 0.25% (质量分数) 的胰酶消化并过滤制成单细胞悬液。实验所用细胞购自中科院上海细胞库。

图 3 所示为动态光镊操纵 SKOV3 细胞作圆周运动的实验截图,图中虚线所示为操纵路径,该路径及运动速度均通过软件 (EzCad2, 金橙子公司) 控制振镜系统进行调控。实验中,每种浓度药物下培养的细胞各随机选择 20~40 个进行实验,分别测量每个细胞的直径 (3 次测量取均值,误差小于 5%) 并记录捕获功率及对应的临界速度,然后根据(4)式计算得到捕获效率 Q 。

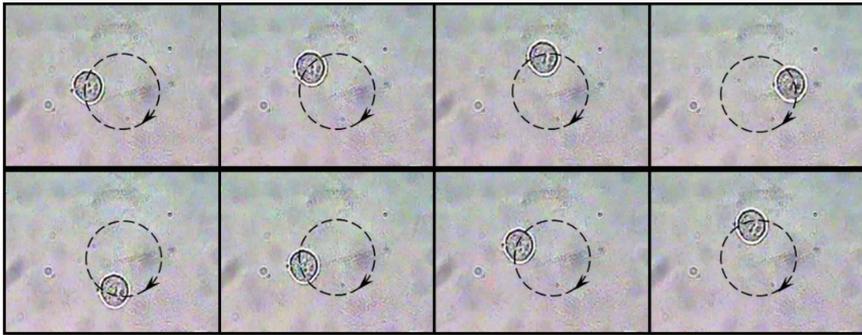


图 3 动态光镊系统顺时针操纵 SKOV3 细胞实验截图

Fig. 3 Successive frames of a video recording, which show a single SKOV3 cell rotating along a clockwise circumference trace

最后将计算得到的 Q 进行数值拟合,如图 4 所示。柱状图所示为测量所得到的 SKOV3 细胞的捕获效率 Q 的归一化分布,红色曲线为对应不加顺铂条件下的拟合曲线,蓝色、绿色和黑色曲线分别为 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三种质量浓度下捕获效率的拟合曲线。其中,图中横坐标为捕获效率,纵坐标为对应捕获效率在所有测量值中所占比例的归一化分布。

不难看出,对于 4 种条件下的 SKOV3 细胞,其测得的捕获效率均近似符合正态分布,拟合得到的高斯曲线跟实测结果吻合良好。

实验是将整个细胞作为研究对象,而细胞凋亡是一个复杂的生物过程,顺铂通过与 DNA 交联等一系列作用可进一步影响细胞内蛋白的表达以及分布,反映到细胞个体上就会使其整体折射率发生变

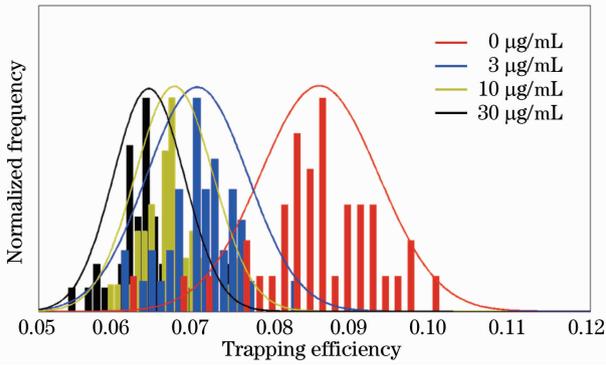


图 4 动态光镊系统对 SKOV3 细胞株在不同浓度顺铂作用下的捕获效率分布和高斯拟合曲线

Fig. 4 Distribution and fitted Gaussian curves of measured trapping efficiency of SKOV3 cell for different cisplatin concentrations

化,进而导致对应的捕获效率 Q 发生变化。通过对四组浓度下测得细胞捕获效率的拟合曲线可以看出,低浓度的顺铂即可使光镊对 SKOV3 细胞的捕获效率发生锐减,而对于较高浓度顺铂下培养的细胞,光镊对其捕获效率下降平缓。为了验证该结果的准确性,对相邻顺铂浓度下测量得到的细胞的捕获效率进行了 T 检验。结果表明,低顺铂浓度下 ($0 \sim 3 \mu\text{g/mL}$) $p = 5.283 \times 10^{-6}$,而高浓度下 ($10 \sim 30 \mu\text{g/mL}$) $p = 0.0724$,因此低顺铂浓度作用的细胞凋亡程度具有明显差异。从生物学角度说,低浓度的顺铂即可对 SKOV3 细胞的生存状态产生很大影响,这与顺铂临床用于卵巢癌的治疗一脉相通。

通过动态光镊操纵细胞进行凋亡检测的方法,需要细胞数量少,完成单个细胞测量只需几分钟时间,并且避免了传统检测手段成本高、需要荧光标记等弊端,更重要的是可以实现活体操作而对细胞不产生任何损伤。实验结果表明,该方法可以对细胞凋亡程度准确量化,对于细胞凋亡的检测具有足够高的灵敏度,因而可通过与传统方法对比结合,对肿瘤临床治疗过程中癌细胞凋亡情况的检测产生重要指导意义。同时,由于该方法是将细胞整体作为研究对象,因而具有较高普适性,适用于任何引起细胞整体折射率参数改变的生物学现象检测,不仅仅局限于细胞凋亡的研究^[21]。

5 结 论

细胞凋亡的检测在癌症临床治疗中具有重要的意义,提出了一种基于动态光镊操纵活体细胞检测其凋亡程度的新方法。通过对在不同顺铂浓度下培

养卵巢癌 SKOV3 细胞的凋亡情况的检测,验证了该方法的有效性。与传统方法相比,该方法具有成本低、微用量、速度快、无标记、可活体检测等优势。同时,由于该方法将细胞整体作为研究对象,具有较高普适性,其研究对象可以拓展到任何引起细胞凋亡的抗癌药物,而不局限于所述细胞和药物。接下来的工作将与临床治疗结合,通过与传统检测方法对比和结合,对肿瘤的临床治疗有重要指导意义。

参 考 文 献

- 1 Rebecca C Taylor, Sean P Cullen, Seamus J Martin. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(3): 231-241.
- 2 Lowe S W, Lin A W. Apoptosis in cancer[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(3): 485-95.
- 3 Shailaja Kasibhatla, Ben Tseng. Why target apoptosis in cancer treatment[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(6): 573-580.
- 4 Fang Cheng, Chen Junhui. Apoptosis and cancer therapy[J]. Chinese J Biochemical Pharmaceutics, 2000, 21(6): 313-315. 方成,陈钧辉. 细胞凋亡与癌症治疗[J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(6): 313-315.
- 5 Robert Gerl, David L. Vaux. Apoptosis in the development and treatment of cancer[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(2): 263-270.
- 6 Xunbin Wei, Yuan Tan, Yun Chen, et al.. Monitoring circulating apoptotic cells by *in-vivo* flow cytometry[C]. SPIE, 2008, 6857: 68570A.
- 7 V Ntziachristos, E A Schellenberger, J Ripoll, et al.. Visualization of antitumor treatment by means of fluorescence molecular tomography with an annexin V-Cy5.5 conjugate[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(33): 12294-12299.
- 8 Green A M, Steinmetz N D. Monitoring apoptosis in real time [J]. Cancer J, 2002, 8(2): 82-92.
- 9 Tobias J Moritz, Douglas S Taylor, Denise M Krol, et al.. Detection of doxorubicin - induced apoptosis of leukemic T-lymphocytes by laser tweezers Raman spectroscopy[J]. Bio Opt Express, 2010, 1(4): 1138-1147.
- 10 Gao Chao, Hua Zichun. Progress on detection of apoptosis[J]. Chinese J Cell Biology, 2011, 33(5): 564-569. 高超,华子春. 细胞凋亡检测方法新进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(5): 564-569.
- 11 Cui Wei, Tang Binghua, Wang Shuoren. Investigate on the methodology of detecting apoptosis[J]. Chinese J Cell Biology, 2007, 29(5): 777-782. 崔巍,唐炳华,王硕仁. 细胞凋亡检测方法探讨[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(5): 777-782.
- 12 Li Qin, Yu Xin, Hu Xinqi, et al.. Ultra-high sensitivity fluorescence microscope and its application in biology[J]. Acta Optica Sinica, 2000, 20(4): 533-537. 李勤,俞信,胡新奇,等. 超高灵敏度荧光显微镜及其在生物学中的应用[J]. 光学学报, 2000, 20(4): 533-537.
- 13 A Ashkin, J M Dziedzic, J E Bjorkholm, et al.. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles[J]. Opt Lett, 1986, 11(5): 288-290.
- 14 Pei Yu Chiou, Aaron T Ohta, Ming C Wu. Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images[J]. Nature, 2005, 436(7049): 370-372.
- 15 Furqan M Fazal, Steven M Block. Optical tweezers study life under tension[J]. Nat Pho, 2011, 5(6): 318-321.

- 16 Jie Yu, Xunliang Tong, Chengbin Li, *et al.*. Using optical tweezers to investigate the specific single-interaction between apoA-I molecule and ABCA1 on living cells[J]. *Chin Opt Lett*, 2013, 11(9): 091701.
- 17 Wang Ruili, Shang Heling, Ou Jiaming, *et al.*. Optical trapping and manipulation of microbe using laser tweezers[J]. *Chinese J Lasers*, 2000, 27(10): 921–926.
王瑞丽, 尚鹤龄, 欧家鸣, 等. 激光光镊对生物体的光操纵研究[J]. *中国激光*, 2000, 27(10): 921–926.
- 18 M Gu, S Kuriakose, X Gan. A single beam near-field laser trap for optical stretching, folding and rotation of erythrocytes[J]. *Opt Express*, 2007, 15(3): 1369–1375.
- 19 S K Mohanty, A Uppal, P K Gupta. Self-rotation of red blood cells in optical tweezers: prospects for high throughput malaria diagnosis[J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(12): 971–974.
- 20 Yuan X, Zhang Y, Cao R, *et al.*. Dynamic steering beams for efficient force measurement in optical manipulation[J]. *Chin Opt Lett*, 2011, 9(3): 031201.
- 21 X Wu, Y Zhang, C Min, *et al.*. Dynamic laser tweezers based assay for monitoring early drug resistance[J]. *Laser Phys Lett*, 2013, 10(6): 065604.
- 22 Ashkin A. Forces of a single beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime[J]. *Biophys J*, 1992, 61(2): 569–582.
- 23 J Reedijk, P H M Lohman. Cisplatin: synthesis, antitumour activity and mechanism of action. [J] *Pharmaceutisch Weekblad*, 1985, 7(5): 173–180.

栏目编辑：韩 峰