

文章编号: 0253-2239(2009)06-1605-04

DHL 细胞中 5-ALA 代谢 PpIX 的定位分析

陈冠楠^{1,2} 黄祖芳² 陈 荣² 林居强² 杨坤涛¹ 李钻芳²

(¹华中科技大学光电子科学与工程学院, 湖北 武汉 430074
²福建师范大学, 医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350007)

摘要 采用共聚焦显微技术中的双光子激发荧光方法获得 DHL 细胞中 5-氨基酮戊酸(5-ALA)代谢原卟啉 IX (PpIX) 荧光图像。结合 Rhodamine123、DioC₆(3) 和 LysoTracker Green 三种细胞器荧光探针的使用, 采用双标的标记方法观察 DHL 细胞中 5-ALA 代谢 PpIX 在 DHL 细胞的定位分布, 进而利用 Matlab 软件对获得的定位的融合荧光图像进行相关系数计算。通过 Matlab 软件编写程序对获得的定位图像进行边缘检测、提取和分割等处理, 计算获得的线粒体相关系数 $r=0.564$; 内质网相关系数 $r=0.465$; 溶酶体相关系数 $r=0.366$; 可以认为 5-ALA 代谢 PpIX 在线粒体、内质网、溶酶体三种细胞器区域均有分布, 但 PpIX 在不同细胞器聚集程度存在比较大的差异, 经过 3 h 的孵育代谢 PpIX 主要积聚于线粒体, 而溶酶体中积聚的最少。研究表明双光子激发荧光可成为定性或定量研究 DHL 细胞中 5-ALA 代谢 PpIX 以及 PpIX 在细胞定位的重要方法。

关键词 医用光学与生物技术; 双光子激发荧光; 5-ALA; PpIX; DHL 细胞; 细胞定位; 定量分析

中图分类号 R730.5 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS20092906.1605

Cellular Localization Analysis of 5-ALA Induced PpIX in DHL Cells

Chen Guannan^{1,2} Huang Zufang² Chen Rong²

Lin Juqiang² Yang Kuntao¹ Li Zuanfang²

(¹ School of Opto-Electronic Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China
² Key Laboratory of Opto-Electronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China)

Abstract Two-photon excited fluorescence based on confocal laser scanning system was used to study the cellular localization of 5-ALA induced PpIX in DHL cells. Fluorescence probes of rhodamine123, DioC₆(3) and LysoTracker Green were used to indicate the cellular localization of 5-ALA induced PpIX with a double-labeling method, and real-time image processing was carried out to detect the image edges, extract and segment the information of fluorescence images. By using the simulation of Matlab software, we calculated the correlation coefficient between fluorescence probe image and 5-ALA induced PpIX image after a 3-hour incubation time, and the results show $r=0.564$ for mitochondria, $r=0.465$ for endoplasmic reticulum and $r=0.366$ for lysosome. It can be seen that 5-ALA induced PpIX mainly distributes in mitochondria, but also in endoplasmic reticulum and lysosome, at least in the lysosome. Two-photon excited fluorescence can be a useful method for quantitative or qualitative cellular localization analysis of 5-ALA induced PpIX.

Key words medical optics and biotechnology; two-photon excited fluorescence; 5-ALA; PpIX; DHL cell; cellular localization; quantitative analysis

收稿日期: 2008-07-09; **收到修改稿日期**: 2008-11-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(60778046), 厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室开放课题和福建省科技项目(2008J0015, 2008J0016)资助。

作者简介: 陈冠楠(1980—), 男, 讲师, 主要从事生物医学图象分析与处理研究。E-mail: edado@163.com

1 引 言

光动力诊断和治疗的效果很大程度上取决于光敏剂的性能^[1]。5-氨基酮戊酸(aminolevulinic acid, 5-ALA)在皮肤疾病、消化道癌和鼻咽癌等各种实体瘤方面的光动力诊断和光动力治疗(PDT)方面取得良好的效果^[2, 3]。白血病自体移植研究中,应用 PDT 方法清除移植中的残余肿瘤细胞的研究更是当前生物医学光学研究的热点之一^[4, 5]。5-ALA 作为光敏剂原卟啉 IX (protoporphyrin IX, PpIX) 的前体,外加的 5-ALA 在血红素的合成通路上转化为 PpIX。由于肿瘤组织和正常组织在血红素合成通路上一些关键酶的活性有显著的不同,通常 PpIX 积聚在肿瘤细胞的浓度与正常细胞相比来得高^[6]。积聚的 PpIX 在可见光辐照下产生光动力效应^[7]。目前白血病体外净化研究方面,应用 5-ALA 体外光动力杀伤 HL60、K562 等白血病细胞,并获得有效的杀伤效果^[8, 9]。

光敏剂在光辐照下产生活性氧物质^[10],引起细胞内结构损伤,其寿命极短只能对几十纳米范围内的生物分子起作用,从而决定了光敏剂在细胞内的作用范围被限制在其亚细胞分布位点。光敏剂在紫外和可见光的照射过程中可能引起光敏剂的再分布甚至在成像过程中对观察细胞的光损伤作用。双光子激发和吸收的非线性决定了双光子荧光显微镜中使用的双光子激发将光漂白和光损伤局限于激发光的焦点区域。相关研究表明,光敏剂在细胞中的定位形式与其产生光动力效果和光敏剂作用机理(光敏剂作用点)是相关的^[11]。因而获得白血病(follicular lymphoma, DHL)细胞内 5-ALA 代谢 PpIX 的定位对于进一步开展光动力杀伤实验研究具有重

要的指导作用。DHL 细胞是白血病细胞系中的滤泡性淋巴瘤白血病细胞。本文尝试利用双光子激发的方法,研究 5-ALA 对 DHL 细胞的敏感性,即光敏剂 5-ALA 代谢产物 PpIX 在 DHL 细胞的定位分布情况。

2 材料与方 法

2.1 化学试剂与细胞培养

5-氨基酮戊酸(5-ALA), RPMI-1640 购买于 Sigma 公司;其中 5-ALA 样品溶液配制在暗室条件下并使用无血清 RPMI-1640 培养液,溶液均为当天配制,使用前保存于 4 ℃ 冰箱中。线粒体探针(Rhodamine123),内质网探针[DioC₆(3)],溶酶体探针(LysoTracker Green)三种荧光探针购于 Molecular Probes 公司。其他试剂均为分析纯。

滤泡性淋巴瘤细胞(Su-DHL-4 细胞)由福建协和医院血液研究所提供,DHL 细胞用 RPMI-1640 培养基培养,并往其中加入 10% 灭活胎牛血清,100 IU/ml 的青霉素和 50 mg/ml 的链霉素,置于 37 ℃, 5% CO₂, 饱和湿度培养箱中培养,每周换液三次,并保持指数增长。

2.2 PpIX 亚细胞定位

2.2.1 光敏剂和探针的配制

5-ALA 和荧光探针准备如表 1 所示。细胞器特异性结合探针包括线粒体探针,内质网探针,溶酶体探针。将 5-ALA 与 DHL 细胞共同孵育 3 h,离心并吸弃上清,重悬细胞并加入探针。之后放入细胞培养箱中继续孵育 0.5 h。最终用冰的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞,上机前重悬 DHL 细胞准备实验。

表 1 DHL 细胞定位成像参数表

Table 1 Experimental parameters for imaging of localization in DHL cell

Photosensitizer /probe	Concentration	Incubation time /h	Excitation wavelength /nm	Filter
5-ALA	4 mmol/L	3	820	KP650 nm
Rhodamine123 (mitochondrial probe)	10 μg/ml	0.5	488	BP500—550
LysoTracker Green (lysosomal probe)	100 nM	0.5	488	BP500—530
DioC ₆ (3)(endoplasmic reticulum probe)	2 μg/ml	0.5	488	BP500—530

2.2.2 光敏剂 PpIX 细胞定位观察

本实验的实验装置如图 1。图中 488 nm 氩离子激光以及 820 nm 飞秒脉冲激光分别从上方与右方进入二色波组合器 DBC,再经过主二色光镜 MDBS,与物镜 Object,到达待观察细胞。而来自细胞的荧光信号,沿原路返回,经过次二向色镜分光,最终到达探测器。激发探针使用输出波长为

488 nm 的氩离子激光器,并根据表 1 选择设置滤色片(发射滤光片的选择参考 Invitrogen 公司提供荧光探针的光谱数据)。使用波长为 820 nm 的飞秒脉冲激光激发 DHL 细胞中 5-ALA 代谢的 PpIX。使用 Plan-Apochromat 63×(NA=1.4)的油镜来聚焦激发光和收集来自细胞样品的后向反射荧光信号。扫描时先激发荧光探针,获得探针的荧光图像

以避免光敏剂在激发光照射下造成对其定位的细胞器的损伤。使用两个独立的通道,分别用于接收细胞器荧光探针信号和 5-ALA 代谢 PpIX 的荧光信号。同时分别调整各自通道下对应的系统参数:激光强度,探测器增益,放大偏移,以获得最佳的图像效果。为避免荧光探针的发射荧光的相互干扰,三种不同的荧光探针分不同组加入孵育有 5-ALA 的 DHL 细胞中。META 探测通道光谱范围设置为 586~714 nm 用于收集 PpIX 的发射荧光。

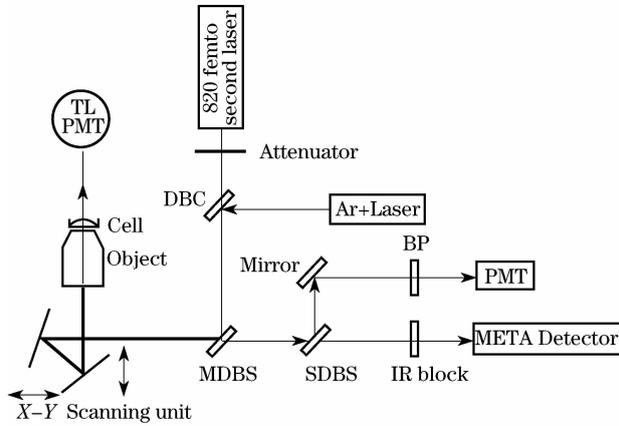


图 1 实验光路示意图

Fig. 1 Light path of two-channel mode in two-photon microscope

3 DHL 细胞中 PpIX 定位图像的定量分析

在扫描共聚焦显微系统中观察经 5-ALA 孵育和荧光探针染色的 DHL 细胞,获得包含多个 DHL 细胞的 512 pixel×512 pixel 图像;PpIX 的荧光图像通过红色分量显示,Rhodamine123;DioC₆(3) 以及 LysoTracker Green 细胞器探针的荧光图像通过绿色分量显示。红色和绿色分量的亮度均为 0~255。由于图像包含噪声,需对图像去噪。针对荧光图像均为单个分量的图像,根据所获取多幅图像的平均亮度进行估计,以 25 作为图像中噪声的门限,各个颜色分量中亮度低于 25 的像素认为是背景,并通过处理使之变为 0。PpIX 的荧光图像和细胞组织荧光图像分别用红色和绿色分量表示且去除噪声后,由两幅图像对应像素点共同决定重叠图像。当两幅图像对应像素点同时具有红色和绿色分量时,重叠图像中该点显示为黄色。如果两幅图像对应像素点只具有红色或者绿色中一种分量,则重叠图像中该点保持原先的红色或者绿色。在激光扫描显微镜中观察经 5-ALA 和荧光探针共同孵育的 DHL 细胞,PpIX

的荧光图像和 Rhodamine123, DioC₆(3) 以及 LysoTracker Green 细胞器探针的荧光图像的相关性通过互相关系数来表示。即计算同一个细胞内各像素的 PpIX 荧光灰度值与细胞器荧光探针荧光灰度值之间的相关系数。具体计算关系公式如下

$$r = \frac{\sum (Y_g - \bar{Y}_g)(X_r - \bar{X}_r)}{\sqrt{\sum (Y_g - \bar{Y}_g)^2 \sum (X_r - \bar{X}_r)^2}}, \quad (1)$$

其中 X_r 表示 PpIX 的荧光图像中红色分量的亮度, Y_g 表示 Rhodamine123, DioC₆(3) 或 LysoTracker Green 细胞器探针的荧光图像中绿色分量的亮度, \bar{X}_r 与 \bar{Y}_g 分别为两种颜色分量的平均亮度。 r 越大相关性越强,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。如果相关系数 $r=1$,表示 X_r 与 Y_g 具有理想的线性关系。相反如果相关系数 $r=0$,表示 X_r 与 Y_g 不具线性关系。通过使用相关系数 r ,能够合理表示两幅图像的重叠程度。即如果两幅图像重叠的像素点越多,则 r 越大,表明 X_r 与 Y_g 越具线性相关性。同时,该相关系数与两幅图片的亮度无关,即两幅图像的亮度改变不影响该相关系数。

通过 Matlab 软件编写程序对获得的定位图像进行边缘检测、提取和分割^[12,13]等处理,计算获得的线粒体相关系数 $r=0.564$,内质网相关系数 $r=0.465$,溶酶体相关系数 $r=0.366$ 。可以认为 5-ALA 代谢 PpIX 在线粒体、内质网、溶酶体三种细胞器区域均有分布,但 PpIX 在不同细胞器聚集程度存在比较大的差异,经过 3h 的孵育代谢 PpIX 主要积聚于线粒体,而溶酶体中积聚的最少。

光敏剂的亚细胞定位是决定 PDT 效率的重要因素。研究表明光敏剂定位在不同的细胞器产生的损伤特点和杀伤效果不一样^[14],而且研究光敏剂在细胞中的定位有利于确定光动力初始杀伤细胞的作用点,进而对于深入了解 PDT 损伤机制有重要的意义。5-ALA 在线粒体代谢产生高浓度的 PpIX^[15],5-ALA 代谢后的 PpIX 主要积聚于线粒体中;而且相比于膜束缚的外源性的 PpIX,具有更高的 PDT 效率^[16]。但应该注意到细胞中光敏剂的初始定位跟光敏剂的浓度和光敏剂以及细胞的类型有关^[17]。为确定 5-ALA 在 DHL 细胞的分布情况,本文使用光敏剂和荧光探针同时标记的方法^[18]。发现 DHL 细胞与 5-ALA 孵育 3 h 后,5-ALA 代谢的 PpIX 主要积聚在 DHL 细胞的线粒体和内质网中。此外也少量的定位于溶酶体中,但相比于前两者更弱一些,如图 2 所示。

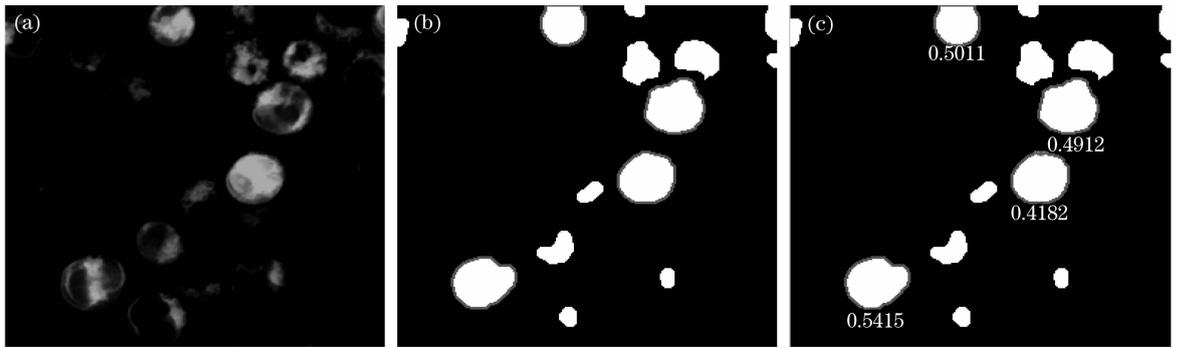


图 2 DHL 细胞定位图像的定量分析(a)原始图像,(b)分割后图像,(c)定量分析结果

Fig.2 Quantitative analysis for imaging of localization in DHL cell (a) original image (b) segmentation of image (c) results of quantitative analysis

4 结 论

通过对两种颜色分量的荧光图像去噪、分割,标记各个细胞的边界并对各个分割出的细胞,计算对应位置覆盖的原始两种颜色分量的荧光图像的相关性,获得 PpIX 在细胞器的分布关系为:线粒体中的 > 内质网中的 > 溶酶体中的。光敏剂在细胞内的最终定位分布情况可能会随着孵育时间不同而变化,而且细胞中的光敏剂在光的分次照射后,在细胞内的分布位置也会发生相应的变化,并最终对光动力效果产生影响,进一步的研究正在开展之中。

参 考 文 献

- Ron R Allison, Gordon H Downie, Rosa Cuenca *et al.*. Photosensitizers in clinical PDT [J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, **1**:27~42
- M. R. Stringer, C. J. Kelty, R. Ackroyd *et al.*. Light dosimetry measurements during ALA-PDT of Barrett's oesophagus [J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2006, **3**(1): 19~26
- Hongcharu W, Taylor CR, Chang Y *et al.*. Topical ALA-Photodynamic Therapy for the Treatment of Acne Vulgaris[J]. *J Invest Dermatol*, 2000, **115**(2):183~192
- Han Xiaofeng, Cao Lanfang, Zhu Jing *et al.*. Experimental research of ALA-PDT on resistant leukemia HL-60/ADR cell line [J]. *Appl. Laser*, 2008, **28**(1): 70~74
韩晓凤,曹兰芳,朱 菁 等. ALA-PDT 在耐药白血病细胞株 HL-60/ADR 中的实验研究[J]. *应用激光*, 2008, **28**(1): 70~74
- K. Okamoto, H. Kamano, I. Sakata. Development of a novel LED apparatus for photodynamic purging of leukemia cells in hematopoietic stem-cell transplantation [C]. *Transplantation Proc.*, 2000, **32**:2444~2446
- Kennedy J C, Pottier R H, Pross D C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experiences[J]. *J Photochem Photobiol B Biol*, 1990, **6**(1~2): 143~148
- Michael H. 5-Aminolevulinic Acid in Photodynamic Therapy-an Exciting Future[M]. *US Dermatol Rev*, 2006, 81~84
- Han Xiaofeng, Cao Lanfang, Zhong Jihua *et al.*. Apoptosis of HL60 cell induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy[J]. *China Oncology*, 2007, **17**(10): 779~783
韩晓凤,曹兰芳,钟济华 等. ALA-PDT 诱导白血病细胞株 HL-60 凋亡[J]. *中国激光医学杂志*, 2007, **17**(10): 779~783
- Zhang Baoqin, Miao Lixia, Zhang Zhenxi *et al.*. An experimental study on destruction of K562 and HL60 induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy [J]. *J. Biomedical Eng.*, 2005, **22**(3): 525~529
张宝琴,苗丽霞,张镇西 等. ALA-PDT 对 K562、HL60 细胞株破坏的实验研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2005, **22**(3): 525~529
- Cheng Gang, Zhong Qiuhai, Liu Fanguang *et al.*. Modeling and simulation of the acting factors on vascular selectivity of photodynamic therapy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2005, **32**(6): 864~868
程 刚,钟秋海,刘凡光 等. 鲜红斑痣光动力治疗的模型仿真初步研究[J]. *中国激光*, 2005, **32**(6): 864~868
- Cheng Gang, Zhong Qiuhai, Huang Naiyan *et al.*. Mathematics modeling and clinic experiment of photodynamic therapy for port wine stain [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(6): 857~862
程 刚,钟秋海,黄乃艳 等. 鲜红斑痣光动力治疗数学模型及临床验证[J]. *中国激光*, 2006, **33**(6): 857~862
- Milan Sonka, Vaclav Hlavac, Roger Boyle. *Image Processing, Analysis, and Machine Vision (2Ed)* [M]. London: Brooks/Cole Publishing, 1999
- Nie Shouping, Wang Ming. Algorithm study of image segmentation and parameters calculation for spherical overlapping region image[J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(11): 1036~1040
聂守平,王 鸣. 球状重叠区域图像分割与参数统计算法研究[J]. *中国激光*, 2003, **30**(11): 1036~1040
- Hang H, Shin D S, Lee Y E *et al.*. Subcellular phototoxicity of 5-aminolevulinic acid (ALA)[J]. *Lasers Surg. Med.*, 1998, **22**(1): 14~24
- Kennedy J C, Pottier R H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy[J]. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 1992, **14**(4): 275~292
- Zhen Y J, Yang G, Vasovic V *et al.*. Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic efficiency of human carcinoma and normal cell lines [J]. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 2006, **84**: 213~220
- Xue LY, He J, Oleinick N L. Rapid tyrosine phosphorylation of HSI in the response of mouse lymphoma L5178Y-R cells to photodynamic treatment sensitized by the phthalocyanine Pc4[J]. *Photochem. Photobiol.*, 1997, **66**(1): 105~113
- Wilson B C, Olivo M, Singh G. Subcellular localization of photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic crossresistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy [J]. *Photochem. Photobiol.*, 1997, **65**(1): 166~176