

肝、肝癌及肝纤维细胞的荧光光谱及其荧光饱和强度分析

胡悦, 付芸*, 李欣阳, 李永亮

长春理工大学光电工程学院, 吉林 长春 130022

摘要 对肝细胞及肝病变细胞进行荧光光谱特性研究, 能为早期筛查与攻克肝癌提供光谱学依据。实验目的包括, 通过光谱实验获得细胞特异性荧光光谱; 结合流式细胞仪获得最大饱和荧光强度与细胞直径的相关性。实验过程, 首先使用荧光光谱仪来检测肝细胞、肝纤维细胞以及两种肝癌细胞; 采用去拉曼散射的方法消除背景噪声, 获得五种浓度下细胞荧光光谱; 其次, 使用流式细胞仪检测四种细胞直径的大小, 根据双参数散点图分析四种细胞的直径特点; 最后, 利用高斯多峰拟合对比光谱差异, 并且分析细胞直径对荧光饱和强度变化趋势的影响, 得出细胞大小对荧光饱和强度非线性拟合曲线的影响规律。光谱实验发现, 在550~750 nm之间, 肝细胞存在两个特异性荧光峰, 第一个峰值位于592 nm处, 第二个峰位于682 nm处, 且前者明显高于后者; 肝癌, 肝纤维细胞除具备与肝细胞相同位置的两个峰外, 在726 nm处出现第三个特异性荧光峰, 并在592 nm处获得最大激发光强, 在726 nm处的荧光峰高于在682 nm处的第二个荧光峰; 结合高斯多峰拟合法对峰值和各峰位置, 以及峰型展宽进行分析。肝癌细胞和肝纤维细胞三个峰的展宽基本相同, 正常肝细胞最大激发峰展宽略小于另三种细胞, 但是682 nm处的小峰展宽略大于病变细胞; 流式细胞仪实验结果显示, 肝癌细胞直径大于肝纤维细胞大于肝细胞, 同种浓度下荧光强度也是肝癌细胞高于肝纤维细胞高于肝细胞; 利用非线性曲线拟合细胞最大荧光强度随浓度变化曲线, 根据曲线斜率的变化规律, 发现四种细胞的最大荧光强度会随着细胞浓度增大而增强, 但是逐渐呈现荧光饱和状态。随着细胞直径增加, 最大荧光强度饱和趋势更为明显, 单个细胞自激发效率降低。结果显示, 将细胞形态学与光谱学有机的融合, 结合两种分析方式, 能提高细胞判断的准确性和有效性。通过对肝细胞、肝癌细胞以及肝纤维细胞的荧光光谱特性进行研究, 并结合细胞直径分析荧光饱和和变化趋势, 能够为肝病变细胞的研究提供一定的光谱学依据。

关键词 肝细胞; 肝癌细胞; 肝纤维细胞; 自体荧光光谱; 荧光饱和强度

中图分类号: O433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)02-0478-05

引言

肝癌始发于肝部细胞的癌变, 是死亡率最高的恶性肿瘤之一^[1]。肝癌早期症状不明显, 常会发生贻误病机的情况。肝纤维化最早形成是因为肝脏发生炎症而受损, 当肝脏炎症逐渐加剧, 肝纤维化程度增加形成的肝脏瘢痕组织积聚时, 将会大大提高肝癌的发生概率。肝纤维化因其引发原因复杂, 暂无明确检测方式。荧光光谱技术已经应用在多种疾病及肿瘤检测过程中。荧光光谱技术由于其准确性高, 稳定性强, 且方便易测等优势^[2], 已经广泛应用于医学检测领域。细胞病变过程会产生不同代谢产物, 肝纤维及肝癌细胞内光

敏物质受到激发后, 产生不同谱线形状或强度的荧光光谱, 由此分析肝纤维及肝癌细胞内部代谢物质的变化, 这是细胞自体荧光光谱用于生命医学领域的理论基础^[3]。本研究对比肝纤维及两种肝癌细胞的荧光光谱与正常肝细胞的光谱差异, 并结合高斯多峰拟合、流式细胞仪分析以及非线性拟合分析, 对比四种细胞研究了荧光饱和和趋势与细胞直径的关系。目的在于, 为实现肝癌及肝纤维早期筛查工作提供光谱学依据。

1 实验部分

1.1 仪器

收稿日期: 2019-01-04, 修订日期: 2019-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(61675935), 吉林省重点科技计划项目(20170204015GX, 20180201049YY)资助

作者简介: 胡悦, 女, 1992年生, 长春理工大学光电工程学院硕士研究生 e-mail: 444129906@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: linda_fy@cust.edu.cn

荧光光谱仪选用 FL6500 测量细胞悬浮液, 狭缝的光谱带宽为 10.0 nm, 激发波长 488 nm, 发射波长 530~750 nm, 激发波长间隔 1 nm, 平均时间 0.1 s, 扫描速度 $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。比色皿规格选择 0.9 mL, 每次检测后用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 清洗去除比色皿内残余样液。流式细胞仪选择 BD Accuri C6 型号, 激发光源 488 nm, 通道选择 FSC-H, SSC-H。

1.2 样品制备

选用四种细胞分别为: 肝细胞 HL-7702[L-02]; 肝纤维细胞 LX-2; 肝癌细胞 HepG-2; 肝癌细胞 SMMC-7721(均采购于上海富衡细胞库)。培养体系选择加入 10% 新生牛血清、1% 双抗的 RPMI-1640 培养基, 置于 37°C , 5% CO_2 饱和湿度的无菌培养箱。防止细胞生长代数影响, 选择培养至一定数量的相同代数细胞。对四种细胞分别计数, 配置细胞浓度为 1.25×10^5 , 2.5×10^5 , 5.0×10^5 , 1×10^6 和 $2 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞悬浮液, 每种浓度 3 组。三组不添加细胞的 PBS 溶液, 用于去拉曼散射。每种细胞分别配置 $200 \mu\text{m}$ 细胞数为 $1 \times 10^5 \text{ cells}$ 的细胞悬浮液, 重复 3 组, 用于流式细胞实验。

1.3 荧光数据处理

在对细胞悬浮液进行检测时, 会受到很多因素的影响, 包括温度、细胞活性、pH 值等。除此之外, 细胞悬浮液中的 PBS 在激发光作用下会发射出拉曼光, 产生背景噪声^[4]。为了获得细胞的荧光光谱, 需要去除 PBS 的发射谱影响, 如图 1 所示, 细胞浓度是 $1.25 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时拉曼散射对荧光光谱的影响。

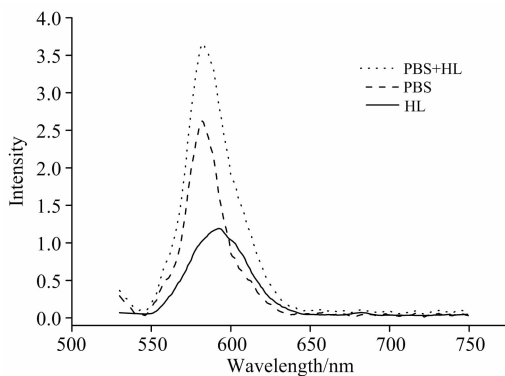


图 1 拉曼散射对荧光光谱的影响

Fig. 1 The influence of Raman scattering during fluorescence spectra measurement

对获得的荧光光谱结果, 均需要去除拉曼光的影响, 如图 2 所示, 图 2(a—d) 分别为去除拉曼光谱影响后, 五种浓度下肝细胞、两种肝癌细胞、肝纤维细胞的自体荧光光谱。

1.4 高斯多峰拟合

高斯多峰拟合法能够精确给出荧光峰的位置, 每个单峰的展宽和强度值, 适用于对荧光光谱图进行精确分析。还可以结合高斯多峰拟合的相应数值来判断代谢物质含量差异, 并根据获得的最大峰值, 分析细胞荧光饱和和强度趋势变化。图 3(a—d) 分别是对 $5.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下四种细胞的高斯多峰拟合结果。表 1, 表 2, 表 3, 表 4 分别为四种细

胞的高斯多峰拟合参数。

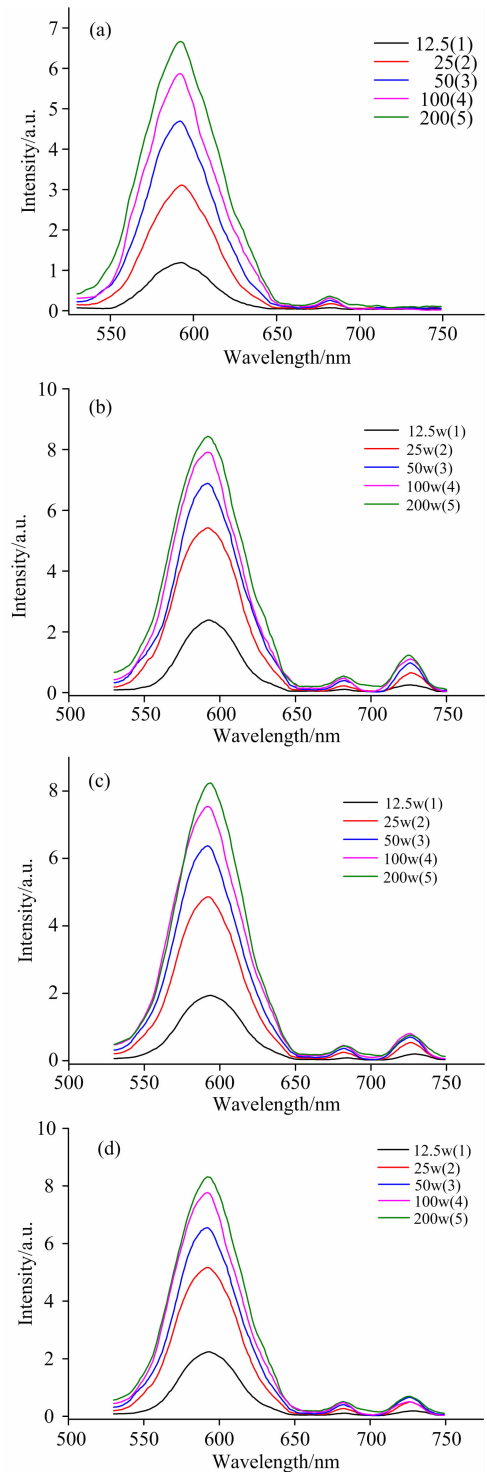


图 2 5 种细胞 5 个不同浓度的自体荧光光谱

(a): 肝细胞 HL-7702[L-02]; (b): 肝癌细胞 HepG-2;
(c): 肝纤维细胞 LX-2; (d): 肝癌细胞 SMMC-7721

Fig. 2 Autofluorescence spectratrosopy of four cells at five cell fives concentrations different

(a): hepatic cell HL-7702 [L-02] (b): hepatoma carcinoma cell HepG-2; (c): Hepatic fibrosis cell LX-2; (d): hepatoma carcinoma cell SMMC-7721

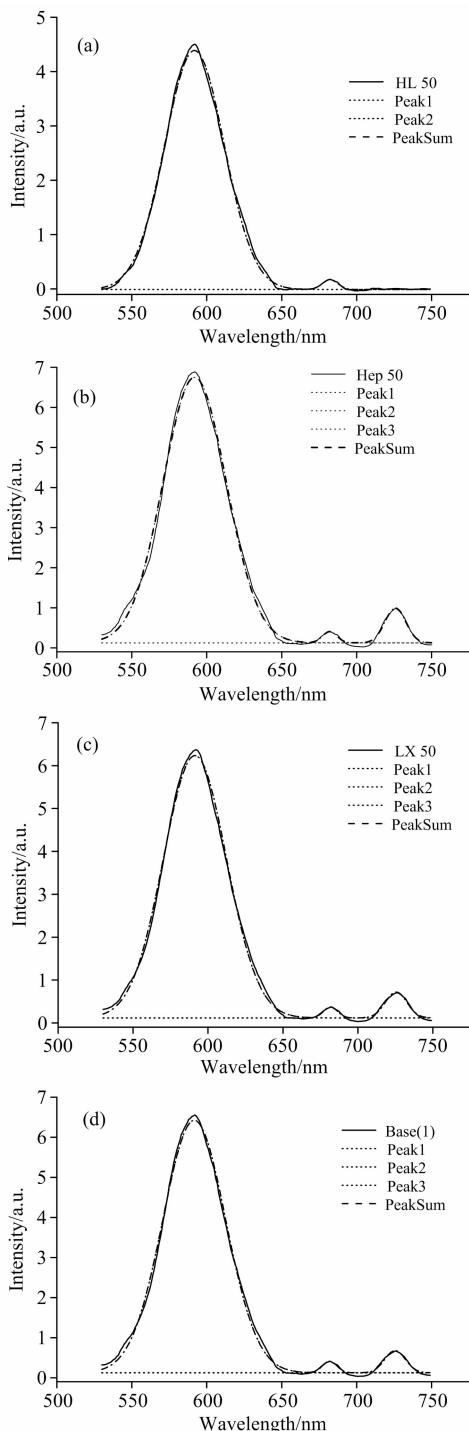


图 3 (a): HL 的高斯多峰拟合; (b): Hep 的高斯多峰拟合; (c): Lx 的高斯多峰拟合; (d): SMMC 的高斯多峰拟合

Fig. 3 (a): Gauss multi-peak fitting of HL; (b): Gauss multi-peak fitting of Hep; (c): Gauss multi-peak fitting of LX; (d): Gauss multi-peak fitting of SMMC

1.5 流式数据处理

利用流式细胞仪分析肝纤维、肝癌细胞及正常肝细胞，能够获得前向角散射光和侧向角散射光双参数散点图，如图

4 所示，为肝癌细胞 Hep 的流式细胞结果图。前向散射角与细胞直径平方密切相关，选择 FSC 作为阈值可以排除样品碎片以及鞘液中小液滴的干扰^[5]。利用图像辅助流式细胞仪，可以一次观察大数量细胞情况，图中每个点均代表一个细胞，通过分析横轴 SSC-H、纵轴 FSC-H 细胞群落分布及聚集状态，可以分析四种细胞直径特点^[6]。

表 1 HL 的高斯多峰拟合参数

Table 1 Gauss multi-peak fitting parameter of HL

	Area	Center	Width	Height
1	218.823 8	591.798	39.707 6	4.397 10
2	2.359 5	682.340	10.118 3	0.186 06

表 2 Hep 的高斯多峰拟合参数

Table 2 Gauss multi-peak fitting parameter of Hep

	Area	Center	Width	Height
1	350.733 0	591.919 7	42.211 0	6.628 94
2	3.353 0	682.145 9	9.428 3	0.283 74
3	15.034 5	725.870 1	13.797 0	0.869 31

表 3 LX 的高斯多峰拟合参数

Table 3 Gauss multi-peak fitting parameter of Lx

	Area	Center	Width	Height
1	323.639 40	591.285 4	42.202 10	6.118 80
2	2.991 53	681.781 1	9.347 15	0.255 36
3	10.813 41	725.507 2	14.312 10	0.602 83

表 4 SMMC 的高斯多峰拟合参数

Table 4 Gauss multi-peak fitting parameter of SMMC

	Area	Center	Width	Height
1	331.588 5	591.661 8	41.977 10	6.302 71
2	3.448 62	682.048 1	9.501 74	0.289 59
3	9.514 00	725.656 7	13.696 50	0.554 23

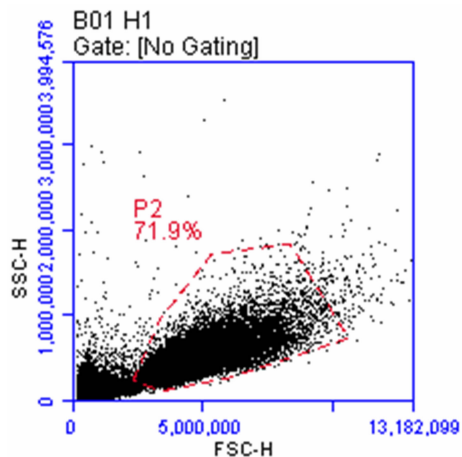


图 4 Hep 的流式细胞散点图

Fig. 4 Flow cytometry scatter plot of Hep

2 结果与讨论

2.1 自体荧光光谱分析

对细胞悬浮液进行荧光光谱检测时, 需要考虑到 PBS 溶液拉曼散射的干扰, 如图 1 所示, 需对结果进行去拉曼散射处理。

四种细胞悬浮液在 488 nm 波长的光激发下, 获得特异性荧光发射谱。3 组平行实验的结果近乎相同, 造成差异的原因可能是细胞悬浮液配置不均匀造成, 实验先后顺序不同, 此外, 细胞状态有略微差异也会干扰实验结果, 但结果具有可靠性。如图 2 所示, 为五种浓度细胞悬浮液的荧光光谱。可以发现, 如图 2(a) 所示, 肝细胞在 550~750 nm 之间存在两个特异性荧光峰, 第一个峰值明显高于第二个峰; 如图 2(b) 和 (d) 所示, 肝癌细胞在 550~750 nm 之间存在三个特异性荧光峰, 第一个峰值最高, 第三个峰高于第二个峰; 如图 2(c) 所示, 肝纤维细胞在 550~750 nm 之间存在三个特异性荧光峰, 第一个峰值最高, 第三个峰其次, 走势和两种肝癌细胞相似。对比结果, 同种浓度下肝癌细胞最大荧光强度高于肝纤维细胞高于肝细胞。

结合高斯多峰拟合结果, 如图 3 所示, 高斯多峰拟合效果贴近实验所得谱线, 能够对结果进行精确分析。结合高斯多峰拟合参数, 如表 1 所示, 肝细胞第一个峰值位于 592 nm 处, 第二个峰位于 682 nm 处; 如表 2, 表 3, 表 4 所示, 肝癌, 肝纤维细胞除具有与肝细胞相同位置的两个峰外, 在 726 nm 处存在第三个特异性荧光峰。肝癌细胞和肝纤维细胞三个峰的展宽基本相同, 正常肝细胞最大激发峰展宽略小于另外三种细胞, 但是 682 nm 处的小峰展宽略大于病变细胞。相同浓度下, 肝细胞两个峰的荧光强度均低于另外三种细胞; 肝癌细胞三个峰的荧光强度略高于肝纤维细胞; 两种肝癌细胞谱形相似, Hep 的最大荧光强度略大于 SMMC, 且 726 nm 处的荧光峰明显高于 SMMC。

结果说明, 肝癌和肝纤维细胞在代谢过程中, 产生了同种激发峰的代谢产物, 而正常肝细胞并不具备。发生病变的细胞在代谢过程中, 不仅代谢物质种类发生变异, 物质含量变化也十分明显。

细胞由于内源性荧光物质的差异, 荧光光谱形状也会改变。蛋白质是细胞主要组成物质, 占细胞干重的一半以上, 能够在 300~350 nm 范围显示出强荧光^[7]。细胞中的脂褐素的激发波长为 340~395 nm, 最大发射波长为 540~640 nm。内源性卟啉是一种大共轭环状结构的金属有机化合物, 具有很强的荧光, 原卟啉粉末在红光区有三个荧光峰, 分别位于 628, 727 和 762 nm 附近^[8]。荧光光谱检测结果显示, 肝病细胞与健康细胞的光谱差异可能与卟啉或卟啉类结合物的产生有关。

2.2 荧光饱和和强度分析

在以往研究中发现细胞最大荧光强度的饱和现象与细胞大小相关。图 4 是利用流式细胞仪分析, 获得的荧光信号分布图, 图上每一个点均代表一个细胞。结果显示四种细胞直径比较集中, 肝细胞直径明显小于病变细胞, 肝癌细胞直径

最大, Hep 细胞略大于 SMMC 细胞。

为了研究肝细胞、肝癌细胞及肝纤维细胞的饱和程度趋势, 可以通过高斯多峰拟合结果, 获得每组细胞最大荧光强度, 并通过非线性拟合, 获得最大荧光强度随浓度变化曲线。通过 Origin 8.0 软件进行数据分析处理, 系统比较了多个非线性拟合方程, 调整参数, 对比结果, 最终选择了具有最佳非线性拟合效果的 Exponential-exp3p1, 结果显示 Adj. R-Square 值高达 0.996, 拟合效果与预期相符。

对比细胞最大荧光强度随浓度变化曲线, 如图 5 所示, 横轴表示不同浓度梯度, 纵轴表示不同浓度下的最大荧光强度, 对拟合曲线图进行分析, 结果发现四种细胞的最大荧光强度随着细胞浓度增大而增强, 但是逐渐会呈现荧光饱和和状态, 单个细胞自激发荧光效率降低。相比另外三种细胞, 肝细胞荧光饱和和强度随着浓度增大荧光强度增速降低, 明显呈现出饱和趋势, 但是饱和度相对较小。两种肝癌细胞和肝纤维细胞趋势相近, 肝癌细胞荧光饱和程度高于肝纤维细胞, 饱和趋势也更为明显。结合流式细胞结果, 细胞直径越大, 荧光强度越大, 越容易呈现出荧光强度饱和的趋势。

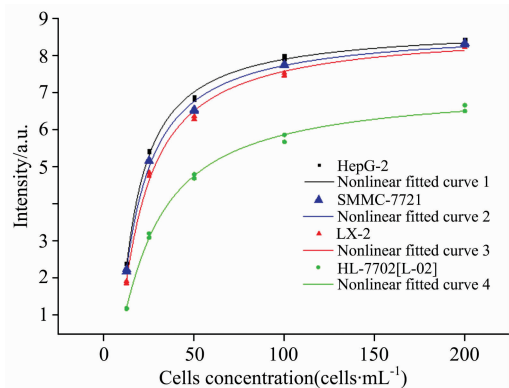


图 5 荧光饱和和趋势分析

Fig. 5 Fluorescence saturation intensity trend analysis

3 结论

对细胞悬浮液检测时, 需除去拉曼散射对光谱的影响。肝癌, 肝纤维细胞除具备与肝细胞相同位置的两个峰外, 在 726 nm 处存在第三个特异性荧光峰。同种浓度下两种肝癌细胞荧光强度均高于肝纤维细胞高于肝细胞。肝癌细胞直径大于肝纤维细胞, 肝细胞直径最小。随着浓度增加荧光强度增速降低, 逐渐呈现出明显的饱和趋势, 单个细胞自激发效率降低等现象。并且细胞直径越大, 同种浓度下获得的最大荧光强度越大, 呈现出荧光饱和和趋势更为明显。本工作不仅探索了肝、肝癌、肝纤维细胞的荧光光谱特性, 还对比了细胞的直径, 分析了荧光饱和和强度变化趋势, 为研究肝部病变的早期诊断和筛查提供了光谱学依据。

致谢: 感谢长春理工大学付芸老师的指导; 感谢吉林大学张平老师提供细胞培养环境, 以及细胞培养过程的帮助和指导; 感谢长春应化所化学生物实验室高楠老师提供荧光光谱实验指导。

References

- [1] LÜ Gui-shuai, CHEN Lei, WANG Hong-yang(吕桂帅, 陈磊, 王红阳). Chinese Bulletin of Life Sciences(生命科学), 2015, 27(3): 237.
- [2] DU En-fu, XU-Lin, ZHOU Xuan-min, et al(杜恩辅, 徐霖, 周选民, 等). Laboratory Medicine and Clinic(检验医学与临床), 2018, 15(11): 1583.
- [3] Pontremoli C, Barbero N, Viscardi G, et al. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2018, 8(1): 37.
- [4] Xie Y, Yang L, Sun X, et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 161: 58.
- [5] Karen H, Jerry T, David A, et al. Methods, 2015, 82(5): 38.
- [6] Grimwade L F, Fuller K A, Erber W N. Methods, 2016, 23(6): 103.
- [7] Sahin Z, Akkoc S, Neeleman R, et al. Vaccine, 2017, 35(23): 3026.
- [8] Battisti A, Morici P, Ghetti F, et al. Biophysical Chemistry, 2017, 229: 19.

Fluorescence Spectra and Fluorescence Saturation Intensity Analysis of Hepatic Cell, Hepatoma Carcinoma Cell and Hepatic Fibrosis Cell

HU Yue, FU Yun*, LI Xin-yang, LI Yong-liang

School of Electro-Optical Engineering, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China

Abstract Researched the fluorescence spectral characteristics of hepatic cell, hepatoma carcinoma cell and hepatic fibrosis cell to provide spectroscopy basis for early screening of liver cancer. The purpose of the experiment included the detection of cells by fluorescence spectrometer to acquire specific fluorescence spectra; eliminate background noise by de-Raman scattering to acquire fluorescence spectra of five cell concentrations; the cell diameter was detected by flow cytometry, analysis of the diameter characteristics of four cells based on two-parameter scatterplot; combined with Gauss multi-peak fitting parameter analysis results. The experimental process began as hepatic cell, hepatic fibrosis cell and two hepatoma carcinoma cell were detected by fluorescence spectroscopy and analyzed by flow cytometry as well. Then, Gauss multi-peak was used to fit the fluorescence spectrum differences, and the difference among the cells was analyzed. Finally, the fluorescence saturation intensity nonlinear fitting curve was compared to analyze the effect of cell size on it. The results showed that there were two specific fluorescence peaks in the hepatic cell between 550 and 750 nm. Combined with Gaussian multi-peak fitting, the peak height, peak center and peak width were analyzed. The results showed, the first peak was at 592 nm and the second peak was at 682 nm, and the former was significantly higher than the latter. In hepatoma carcinoma cell and hepatic fibrosis cell there was a third specific fluorescence peak at 726 nm except for two peaks at the same position as hepatic cell, and the maximum excitation intensity was obtained at 592 nm, and the fluorescence peak at 726 nm was higher than the second peak at 682 nm. The width of hepatoma carcinoma cell and hepatic fibrosis cell were basically the same. The maximum excitation peak width of hepatic cell was slightly smaller than that of the other two cells, but the small peak width at 682 nm was slightly larger than that of the diseased cells. The results of flow cytometry showed that the diameter of hepatoma carcinoma cell was the largest diameter, and hepatic fibrosis cell was larger than hepatic cell. Through fitting the curve of the fluorescence saturation intensity trend of the cell with the concentration curve by the nonlinear curve and analyzing the slope of the curve, the results showed that the fluorescence saturation intensity trend of the four cells increased with the increase of the cell concentration, but gradually showed the fluorescence saturation state. As the cell diameter increased, the trend of maximum fluorescence saturation intensity was more obvious, and auto fluorescence spectrum efficiency of single cells decreased. The results showed that the rational combination of cell morphology and spectroscopy, combined with two methods of analysis, improved the accuracy and effectiveness of cell judgment. By studying the fluorescence spectrum characteristics of hepatic cell, hepatoma carcinoma cell, hepatic fibrosis cell, and analyzing the fluorescence saturation intensity in combination with cell diameter, it can provide a certain spectral basis for the study of liver disease cells.

Keywords Hepatic cell; Hepatoma carcinoma cell; Hepatic fibrosis cell; Auto fluorescence spectrum; Fluorescence saturation intensity

* Corresponding author

(Received Jan. 4, 2019; accepted Apr. 27, 2019)