

近红外光刺激神经细胞钙离子光激活*

耿俊娴# 李少强# 王诗琪 黄春 吕云杰
胡睿 屈军乐† 刘丽炜‡

(深圳大学物理与光电工程学院, 教育部/广东省光电子器件与系统重点实验室, 深圳 518060)

(2020年4月2日收到; 2020年5月1日收到修改稿)

钙离子 (Ca^{2+}) 是细胞的主要信息传输通道, 研究 Ca^{2+} 激活对阐述亚细胞层次生物过程具有重要意义, 光激活是目前研究细胞内 Ca^{2+} 传输和控制的主要方式之一. 本文利用近红外脉冲激光刺激标记有金纳米棒 (gold nanorods, GNRs) 的人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 的 Ca^{2+} 信号传导, 并利用钙离子指示剂 (Fluo-4, AM) 对其进行双光子荧光成像. 实验采用功率为 0.5 mW, 波长为 800 nm 的激发光, 平均 10 s 就可实现 Ca^{2+} 光激活, 标记 GNRs 的神经细胞 Ca^{2+} 释放速度是未标记 GNRs 的 6 倍. 研究结果表明 GNRs 通过局域表面等离子体共振将脉冲激光瞬间转化为热量, 改变膜电容, 使细胞膜去极化并引发动作电位, 使细胞外 Ca^{2+} 流入, 证明了借助 GNRs 来增强神经细胞 Ca^{2+} 激活的可行性, 为神经细胞离子通道研究提供了一种光学手段.

关键词: 神经细胞, 钙离子, 光激活, 双光子激发荧光显微成像

PACS: 87.64.M-, 87.50.W-, 87.50.wf, 87.64.mm

DOI: 10.7498/aps.69.20200489

1 引言

钙离子 (Ca^{2+}) 是细胞内的第二信使, 产生通用的细胞内信号, 控制着细胞内的多种功能. 例如树突和细胞体内的钙浓度变化能调节多种神经细胞的功能, 包括突触信号传导、神经元的可塑性以及调节基因转录^[1], 因此对神经细胞进行 Ca^{2+} 激活、传输研究有十分重要的生物学意义.

神经细胞活性的调节, 通常是利用细胞外环境的局部微小扰动来实现的^[2], 目前主要有电刺激、超声刺激、磁刺激、光刺激以及光遗传学方法等几种刺激方式^[3-6]. 电刺激方法历史悠久, 操作简单且可以精确定量, 但是刺激时需要侵入细胞或者活

体, 空间选择性较差^[7]. 对神经细胞或神经网络进行刺激的光遗传学工具已成为研究神经回路功能成熟且强大的方法之一^[8]. 与电刺激不同, 它利用基因控制要刺激的神经细胞不同亚型的离子通道, 激发或抑制神经细胞活动. 最初的光遗传学方法是利用病毒载体, 将光感基因导入到特定类型的细胞中, 再用特定波长的光照刺激细胞, 使细胞选择性兴奋或抑制, 具有低侵入性和良好的特异性. 但这种方式也存在缺陷, 外源基因的引入会带来潜在风险, 用转染病毒来表达光敏蛋白^[9]在实际操作中也可能存在危险性, 并且考虑到伦理问题, 基因工程和转染人体细胞的过程也可能会削弱光遗传学在相关研究中的应用. 通过光刺激细胞来控制细胞膜活动或细胞内信号已成为神经科学研究的一个主要途

* 国家自然科学基金 (批准号: 61935012, 61722508, 61525503, 61620106016, 61835009, 61961136005)、广东省创新团队 (批准号: 2016KCXTD007, 2014A030312008) 和深圳市自由探索项目 (批准号: JCYJ20180305124902165) 资助的课题.

同等贡献作者.

† 通信作者. E-mail: jlqu@szu.edu.cn

‡ 通信作者. E-mail: liulw@szu.edu.cn

径. 然而, 传统的可见光激发波段在组织中穿透深度有限 ($< 100 \mu\text{m}$), 近红外光在组织中的散射小、穿透深度大, 且空间选择性好^[10,11]. 近些年来, 利用近红外光调节神经细胞活动成为研究热点.

研究表明, 光热效应可以引起细胞膜电容变化, 产生动作电位^[12]. de Boer 等^[13]使用低功率脉冲近红外光证明了小鼠皮层神经细胞的光激活, 还利用这种方法来刺激水螅的个体上皮肌细胞并引起身体收缩. Shapiro 等^[14]的研究表明, 红外光可以改变细胞膜表面离子的分布而引起膜电容的变化. 然而, 进一步实验和建模显示, 利用近红外光对神经细胞直接刺激方法并不十分精准, 且多次刺激同一部位时, 不能获得持续增强的效果, 还会导致细胞损伤. 随着研究的深入, 人们发现借助金纳米棒 (gold nanorods, GNRs) 可以提高细胞刺激效应. 当入射光的波长与 GNRs 共振频率相匹配时, GNRs 可以有效地将吸收的光能转化为热能, 称为局域表面等离子体共振 (localized surface plasmon resonance, LSPR). LSPR 将量子化的电子振荡限制在纳米级的体积内, 从而大幅度提高光刺激的空间选择性. Paviolo 等^[12]报道了对 GNRs 孵育的 NG108-15 神经细胞进行钙成像, 发现在激光照射时, 细胞内的游离钙水平会升高. 同样, João 等^[15]通过照射细胞膜附近的 GNRs 对培养的螺旋神经节神经细胞进行刺激, 结果表明增加了大鼠坐骨神经中复合动作电位的幅度. Flavie 等^[11]利用 800 nm 的脉冲光刺激标记有 GNRs 的神经细胞, 实验显示这种刺激会使神经细胞中游离的 Ca^{2+} 瞬时增加. 通过无损、非侵入性的方式对目标区域进行刺激, 并用相应的 Ca^{2+} 荧光指示剂进行光学成像, 利用 Ca^{2+} 空间动态变化^[16] 来表征局部的 Ca^{2+} 瞬变状态. 这种纳米粒子辅助光学刺激^[11] 的方法为控制神经细胞活动和细胞信号传导提供了一种新方案.

本文利用和 GNRs 共振吸收峰波长相匹配的 800 nm 近红外脉冲光, 激发标记有 GNRs 和 Fluo-4, AM 的神经细胞中的 Ca^{2+} . 并且采用双光子激发荧光共聚焦显微镜 (two photon excited fluorescence confocal microscope, TPEFCM) 对 Ca^{2+} 激活进行成像研究. 由于神经细胞在体外难以培养且不能无限增殖, 因此选用同种细胞系的电生理类型的人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y)^[17] 进行实验研究. 利用 1.5 mW 的激光功率对整个视场进

行重复扫描 (大约 50 个细胞, 2 个培养皿), 在 SH-SY5Y 细胞中引起大范围的 Ca^{2+} 荧光强度的变化, 在这种激光强度下, 可以引起细胞中 Ca^{2+} 的反复振荡. 在功率为 3.2 mW 的激光刺激下, 可观察到瞬态 Ca^{2+} 激活现象. 对未标记 GNRs 的 SH-SY5Y 细胞进行同等条件下的光激活, 结果表明未标记 GNRs 的 SH-SY5Y 细胞 Ca^{2+} 的激活现象相对较弱, 且与标记 GNRs 的 SH-SY5Y 细胞相比, 平均出现光激活的时间是 60 s. 实验结果表明, GNRs 对神经细胞 Ca^{2+} 激活起到增强和促进作用. 研究工作证明了借助 GNRs 增强神经细胞 Ca^{2+} 光激活的可行性, 阐述了光刺激引起离子通道变化的亚细胞生物机制.

2 实验方法

2.1 GNRs 的表面功能化修饰

将 GNRs (西安瑞禧生物) 置于 4 °C 冰箱半小时, 通过离心 (Eppendorf 公司 5417R 型, 30 min, 12500 r/min, 4 °C) 将过量的 CTAB 除去, 并添加 10 μL 的链霉抗生物素蛋白 Streptavidin (SA) (#85881, Sigma-Aldrich, MO, USA) 溶液, 37 °C 搅拌 24 h 过夜, 通过离心 (Eppendorf 公司 5417R 型, 30 min, 12500 r/min, 4 °C) 从修饰的 GNRs-SA 中除去未反应的过量 SA, 然后倾析上清液并重新分散在 500 μL 水中. GNRs-SA 分散液在 200 μL 的 100 $\mu\text{mol/L}$ 伴刀豆球蛋白 A (Concanavalin A, Con A) (#C5275, Sigma-Aldrich, MO, USA) 水溶液中孵育 30 min, 备后续实验使用.

2.2 试剂和药物

Ca^{2+} 指示剂 (Fluo-4, AM) 购自赛默飞世尔科技 (美国纽约州格兰德岛), 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液以及氯化钙 (CaCl_2) 购自西格玛奥德里奇 (美国密苏里州圣路易斯), Pluronic F-127 粉末购自上海翊圣生物科技有限公司, Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA-AM 购自大连美仑生物技术有限公司.

2.3 细胞培养

将人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) (武汉普诺赛公司) 在含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 链霉素、青霉素溶液的 DMEM 高糖培养基 (Gibco, Invitrogen, NY, USA) 中, 于 37 °C,

5% CO₂ 的潮湿培养箱中进行培养. 为了进行细胞成像, 将 SH-SY5Y 细胞以 1:12 的传代比率种在 35 mm 玻璃培养皿中.

2.4 双光子激发荧光共聚焦显微成像系统

利用尼康双光子激发共聚焦显微镜装置 (A1R MP, 尼康, 日本), 使用 60 × 油镜 ($NA=1.4$, 尼康, 日本) 来采集荧光图像 [18,19] (系统光路如图 1 所示). 共聚焦显微成像由多色连续波 (continuous wave, CW) 激光器和相应的解扫描检测单元组成, 双光子激发荧光显微成像采用自动可调谐超快激光器, 脉冲宽度 100 fs 左右, 重复频率 80 MHz, 波长可调范围为 700—1300 nm. 实验中利用共聚焦系统 488 nm CW 激光来检测 Fluo-4, AM 荧光, 并进行明场成像, 同时选用 GNRs 的等离子体共振吸收峰 800 nm 处的脉冲光来照射 GNRs, 引起细胞膜温度的快速变化, 瞬间改变细胞膜电容, 产生去极化电流使细胞膜去极化, 从而打开 Ca²⁺ 通道产生动作电位 [20,21], 并对 Fluo-4, AM 进行双光

子成像, 462—638 nm 的带通滤波片用于收集发射光. 由于 GNRs 没有发射, 故不存在串扰等问题. 获得的图像视场大小为 211.63 μm × 211.63 μm. 采用 4 幅图平均, 并对调色盘 LUTS (look up tables) 调整进行图像拍摄.

2.5 神经细胞内 Ca²⁺ 消耗

通过 KOH 将 BAPTA-AM 缓冲液的 pH 值调节至 7.4, 实验过程中加入最终浓度为 200 μmol/L 的 BAPTA-AM 进行细胞内 Ca²⁺ 的消耗.

2.6 相对荧光强度 $\Delta F/F$ 分析

在静息电位时, 细胞内 Ca²⁺ 浓度通常为 50—100 nmol/L, 但当神经细胞活动时, 细胞内 Ca²⁺ 浓度能上升 10—100 倍. 也就是说, 神经细胞中的 Ca²⁺ 浓度与生理活动息息相关, 利用 Ca²⁺ 指示剂的荧光强度与细胞中的 Ca²⁺ 浓度的对应关系, 可以对神经细胞活动进行检测. 使用尼康软件 NIS-Elements AR 对 Ca²⁺ 的荧光强度进行测量及数据导出, 并在 Image J 中调整亮度/对比度来优化图像, Ca²⁺ 的相对荧光强度用 $\Delta F/F$ 表示, 其中 $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$ 为荧光强度的变化量, $F - F_0$ 为荧光强度的变化量, F_0 为初始 Ca²⁺ 的荧光强度.

3 理论分析

3.1 近红外光刺激 GNRs 热扩散模型

为了分析 GNRs 对神经细胞光激活信号的增强作用, 理论上对 GNRs 增强光热效应改变膜电容进行分析. GNRs 在与吸收光谱匹配的光源激发下会产生 LSPR [22], LSPR 弛豫过程通常在 0.1—1 ps, 之后在 100 ps—10 ns 的时间范围内通过热传导迅速将产生的热传递到周围环境 [23]. 首先, 对激光刺激定位到细胞膜上的 GNRs 产生的热量及其扩散到细胞内过程进行了热力学分析, 并使用 Matlab 对所建立的模型进行求解. 当入射光的频率与 GNRs 等离子体共振频率匹配时, 使用 Gans 理论计算 GNRs 的吸收截面. Gans 理论将 Mie 理论应用到球形纳米颗粒 [24], 假设 GNR 为球形, 来模拟 GNR 的纵向表面等离子体共振. GNRs 产生的热 (Q_{GNR}) 用单位体积时间的能量来表示 [25]:

$$Q_{GNR} = \frac{C_{abs} I_{laser}}{V}, \quad (1)$$

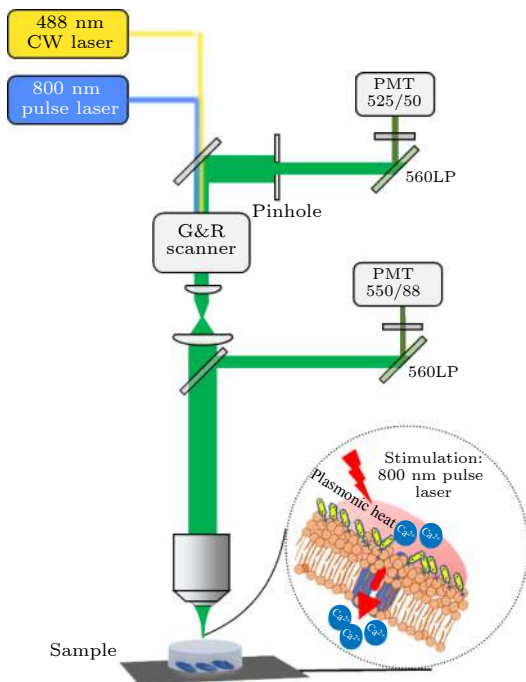


图 1 双光子激发荧光共聚焦显微系统光路示意图 (G&R Scanner 为振镜扫描仪, LP 为长通滤波片, PMT 为光电倍增管)

Fig. 1. Schematic diagram of two-photon excited fluorescence confocal microscopy system. The abbreviations in the figure are as follows: G&R Scanner is a Galvo-resonance scanner, LP is a long-pass filter, and PMT is a photomultiplier tube.

这里 C_{abs} 是单个 GNR 的吸收截面面积, 由 Gans 理论确定; I_{laser} 是激光强度 ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$); V 是 GNR 的体积. 假设 GNR 是短轴为 20.1 nm、长轴为 81.3 nm 的椭球型, 则

$$C_{\text{ext}} = \frac{2\pi V \varepsilon_{\text{m}}^{3/2}}{3\lambda} \sum_j^3 \frac{\left(\frac{1}{P_j}\right)^2 \varepsilon_2}{\left(\varepsilon_1 + \frac{1-P_j}{P_j} \varepsilon_{\text{m}}\right)^2 + \varepsilon_2^2}, \quad (2)$$

$$C_{\text{sca}} = \frac{8\pi^3 V \varepsilon_{\text{m}}^2}{3\lambda^4} \sum_j^3 \frac{\left(\frac{1}{P_j}\right)^2 [(\varepsilon_1 - \varepsilon_{\text{m}})^2 + \varepsilon_2^2]}{\left(\varepsilon_1 + \frac{1-P_j}{P_j} \varepsilon_{\text{m}}\right)^2 + \varepsilon_2^2}, \quad (3)$$

$$C_{\text{ext}} = C_{\text{abs}} + C_{\text{sca}}, \quad (4)$$

其中 ε_{m} 是周围介质的介电常数; λ 是激发光的波长; ε_1 和 ε_2 是 GNRs 介电常数的实部和虚部; C_{ext} 是消光横截面积; C_{sca} 是散射横截面积; P_j 是 A, B, C 三轴的去极化因子 ($A > B = C$),

$$P_j = \frac{1-e^2}{e^2} \left[\frac{1}{2e} \ln \left(\frac{1+e}{1-e} \right) - 1 \right],$$

$$e = \sqrt{1 - \left(\frac{B}{A}\right)^2},$$

$$P_B = P_C = \frac{1-P_A}{2}.$$

GNR 产生的热量扩散增加了细胞膜的温度. 在模拟细胞膜的温度分布之前, 假定以下条件:

1) GNR 作为单层均匀分布, 与细胞膜之间的距离为 100 nm;

2) 从宏观上看, GNR 产生的热量沿 GNR 层均匀分布;

3) GNR 产生热量, 被视为恒定热源;

4) 热量沿垂直于细胞膜的 Z 轴从恒定热源流出.

基于这些假设, 可以使用下面的一维热扩散方程式^[26] 计算温度分布:

$$\frac{1}{\alpha} \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{cQ_{\text{GNR}}}{k}, \quad (5)$$

其中, α 表示常温时水的热扩散系数, $\alpha = 1.48 \times 10^{-7} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$; k 是导热系数, $k = 0.57 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$; 外部热量来源 Q_{GNR} ; x 是 GNR 与细胞中心的距离; t 是时间; $T(x, t)$ 是温度随时间和距离的变化; c 是单层 GNRs 的覆盖范围. 利用 Matlab 对热扩散方程进行求解, 结果如图 2 所示, 温度 t 随着距离 x 的增加而衰减, 这意味着 GNR 产生的热量主要流向细胞膜. 仿真结果与实验数据进行比较发现, 当刺激细胞的脉冲激光功率增加超过 20 mW 时, 会因温度太高而引起细胞破裂, 与仿真结果一致. 但在实际情况中, GNRs 并非均匀分布, 并且真实情况应为三维热扩散, 此模型假设的是一维条件下的热扩散, 故在实际情况中, 温度应该小于计算的温度. 利用此模型在相同激发条件下对水直接加热的热扩散模型进行模拟, 结果表明没有 GNRs 的溶液中不会发生明显的温度变化.

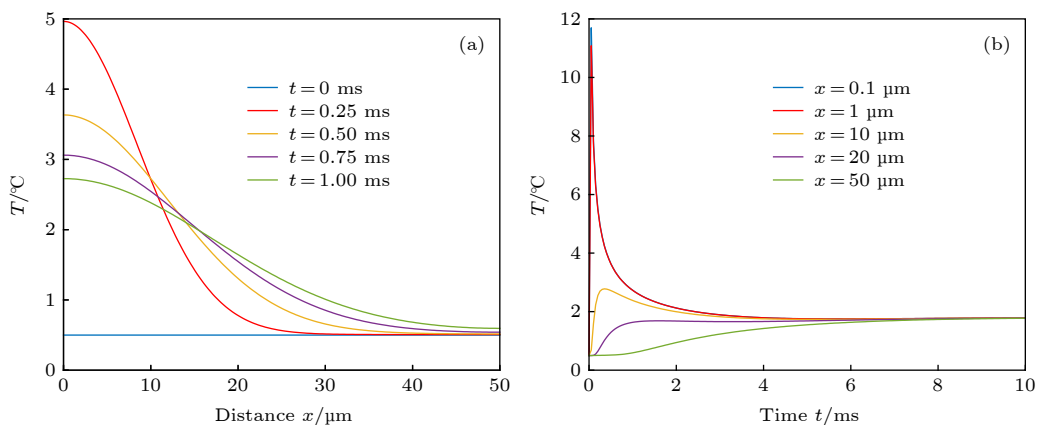


图 2 温度随时间 t 和距离 x 变化的函数 (a) 时间一定时, 温度随着距离的增加而衰减; (b) 距离一定时, 温度随着时间的增加而衰减; 在此模型中, 选用 $520 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 间隔为 0.5 ms 的矩形脉冲作为激发光源

Fig. 2. Temperature as a function of time t and distance x : (a) When the distance is constant, the temperature decays with increasing time; (b) when the time is constant, the temperature decays with increasing distance. In this model, a rectangular pulse of $520 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ with an interval of 0.5 ms is selected as the excitation light source.

3.2 光热效应改变细胞膜电容电流原理

根据细胞膜的等效电路模型^[27]可知: 磷脂双分子层是个绝缘体, 即它是一个不让电流通过且电阻无限大的电阻器, 细胞膜不是个完美的绝缘体——即使在静息状态, 离子也可以通过特定的通道流过细胞膜. 这些离子通道可以通过平行的电流来模拟, 这些通道可以看作一个个平行的电流通路模型, 每一个通路都包含一个特定电阻的电阻器, 电压等于离子平衡电位的电池. 电容效应与经典理论一致, 电解质溶液中脂质膜的总电容反映了磷脂双分子层的核心电容和膜两侧双层膜离子的串联电容的组合, 利用 Gouy-Chapman-Stern (GCS) 关于双分子层电容理论^[14]——建立总电容模型, 从泊松方程推导出, 模拟带电表面与电解质溶液的接触, 将相关的介电常数和离子组成考虑在内, GCS 通过平衡电力和热力, 影响带电表面附近的离子空间分布, 计算了系统的电容. 使用 GCS 模型, 模拟由温度相关的电容变化产生的电流^[26], 使用耦合方程 (6) 和 (7), 对磷脂双分子层两侧的表面势 φ_o 和 $(\varphi_i - V_m)$, 即膜电位与温度的函数求解, 计算即可求得净膜电容.

$$\left\{ \sigma_o + \frac{\varepsilon_b}{\delta_b} (\varphi_i - \varphi_o) \right\}^2 = 2\varepsilon_T^{sol} RT \sum_{j=1}^n c_j^0(\infty) \times \left\{ \exp \left[-\frac{z_j^0 F}{RT} (\varphi_o - \Delta\varphi_s^0) \right] - 1 \right\}, \quad (6)$$

$$\left\{ \sigma_i - \frac{\varepsilon_b}{\delta_b} (\varphi_i - \varphi_o) \right\}^2 = 2\varepsilon_T^{sol} RT \sum_{k=1}^n c_k^i(-\infty) \times \left(\exp \left\{ -\frac{z_k^i F}{RT} [(\varphi_i - V_m) - \Delta\varphi_s^i] \right\} - 1 \right), \quad (7)$$

其中 σ_o 为细胞膜外层的本征电荷密度, σ_i 为细胞膜内层的本征电荷密度, φ_i 为细胞内双分子层的表面电势, φ_o 为细胞外双分子层的表面电势, ε_b 为磷脂双分子层的介电常数, δ_b 为磷脂双分子层的宽度, ε_T^{sol} 是温度为 T 时水溶液的介电常数, $c_j^0(\infty)$ 为外缓冲液中第 j 种离子的浓度, $c_k^i(-\infty)$ 为内缓冲液中第 k 种离子的浓度, z_j^0 为外缓冲液中第 j 种离子的价态, z_k^i 为内缓冲液中第 k 种离子的价态. 因为耦合方程跟温度有关, 所以温度变化会引起膜电位的变化, 由此假设 GNRs 的光热效应引起的温度变化改变细胞膜电容电流, 引起电压门控

Ca^{2+} 通道开放, 使细胞外的 Ca^{2+} 流入, 导致细胞内 Ca^{2+} 的相对荧光强度增加.

4 实验结果与讨论

4.1 GNRs 表面功能化修饰及表征

为了降低 GNRs 的毒性以及将其定位到 SH-SY5Y 细胞膜上, 利用 SA 来实现 GNRs 的表面功能化修饰. 图 3 为未修饰和已修饰 SA 的 GNRs 的可见吸收光谱和透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 图像. 可知, 表面功能化后, GNRs 在 820 nm 处的吸收峰发生 20 nm 的蓝移, 这种偏移是局部介电常数和 GNRs 表面上吸收层的有效厚度变化的结果^[28]. GNRs 表面功能化前后的粒径分别为 90.98 和 151.73 nm.

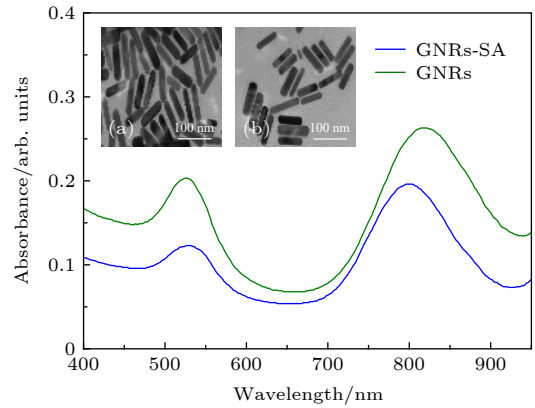


图 3 GNRs 与 GNRs-SA 的 (a) 可见近红外吸收光谱以及 (b) TEM 图 (比例尺: 100 nm; 近红外区 GNRs\GNRs-SA 的吸收峰分别在 820 和 800 nm)

Fig. 3. (a) Visible near-infrared absorption spectra and (b) TEM images of GNRs and GNRs-SA, scale bar: 100 nm. the absorption peaks of GNRs\GNRs-SA in the near infrared region were at 820 nm and 800 nm, respectively.

4.2 GNRs 增强 Ca^{2+} 光激活

将 GNRs-SA, ConA, Fluo-4, AM 和 SH-SY5Y 细胞共同孵育 20 min, 使 GNRs 定位到 SH-SY5Y 细胞膜上, 同时选用 488 nm 的 CW 激光器, 利用二向色镜 (495 nm 长通) 结合带通滤光片 (500—550 nm) 对 Fluo-4, AM 标记的 SH-SY5Y 细胞进行了 Ca^{2+} 成像. 为了用 800 nm 的脉冲光在神经细胞上产生 GNRs 的等离子体共振激发, 首先以 0.5 mW 的飞秒激光扫描整个视野, 同时监测 Fluo-4, AM 的荧光. 对整个视场进行重复扫描会在

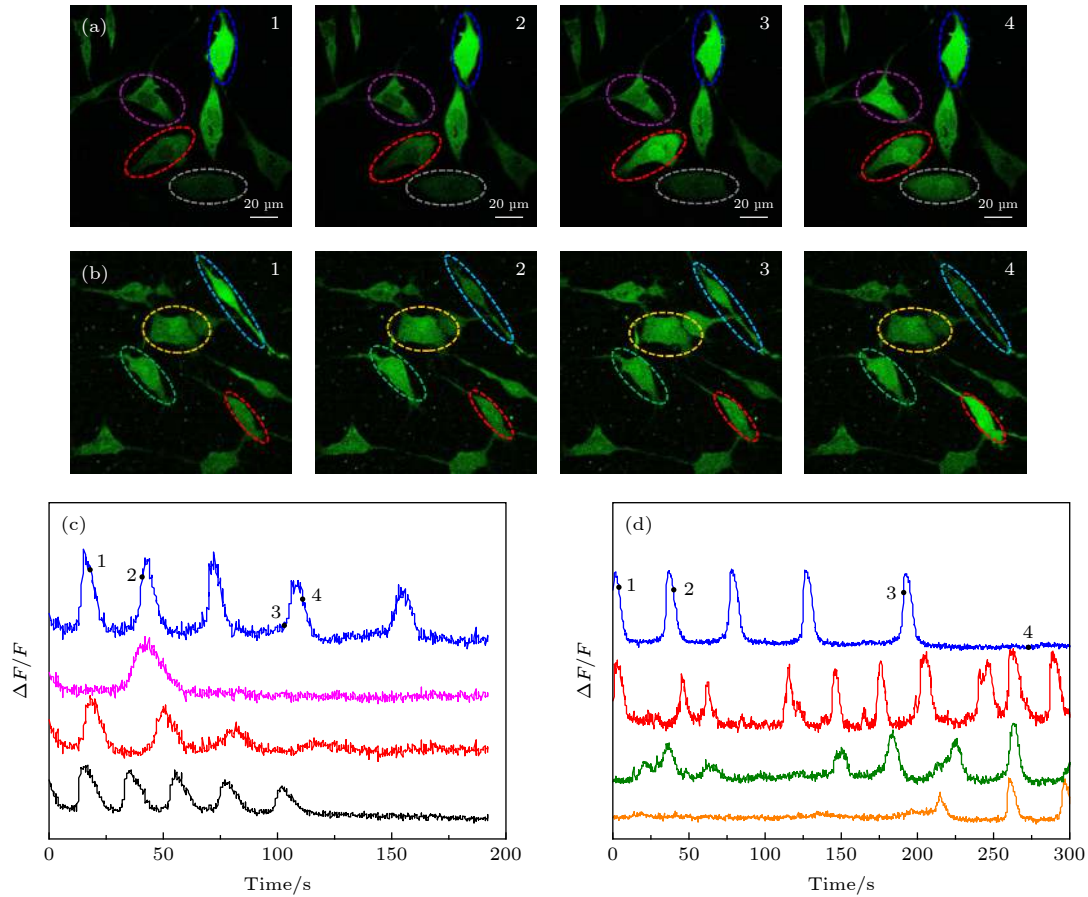


图 4 仅 Fluo-4, AM 标记与 Fluo-4, AM, Con A 和 GNRs-SA 同时标记的 SH-SY5Y 细胞光激活成像 (a) Fluo-4, AM, Con A 和 GNRs-SA 标记的 SH-SY5Y 不同时刻的荧光图像; (b) Fluo-4, AM 标记的 SH-SY5Y 不同时刻的荧光图像; (c) Fluo-4, AM, Con A 和 GNRs-SA 标记的 SH-SY5Y 相对荧光强度随时间变化的曲线, 数字“1, 2, 3, 4”跟 (a) 中图像的时间点 (25 s, 54 s, 99 s, 116 s) 相对应, 四条曲线对应 (a) 中不同颜色圈出的细胞; (d) Fluo-4, AM 标记的 SH-SY5Y 相对荧光强度随时间变化的曲线, 数字“1, 2, 3, 4”跟 (b) 中图像的时间点 (1 s, 32 s, 127 s, 187 s) 相对应, 四条曲线对应 (b) 中不同颜色圈出的细胞

Fig. 4. Photoactivation SH-SY5Y cells imaging of only Fluo-4 labeled and labeled with Fluo-4, AM, Con A and GNRs-SA. (a) The fluorescence images of Fluo-4, AM and GNRs-SA labeled SH-SY5Y cells at different times. (b) the fluorescence images of Fluo-4, AM labeled SH-SY5Y cells at different times. (c) the changing of relative fluorescence intensity of Fluo-4, AM, Con A and GNRs-SA labeled SH-SY5Y cells with time. the numbers “1, 2, 3, 4” correspond to the time points (25 s, 54 s, 99 s, 116 s) of the image in (a), and the four curves correspond to the cells circled in different colors in (a). (d) The changing of relative fluorescence intensity of Fluo-4, AM labeled SH-SY5Y cells with time. the numbers “1, 2, 3, 4” correspond to the time points (1 s, 32 s, 127 s, 187 s) of the image in (b). four curves correspond to cells circled in different colors in (b).

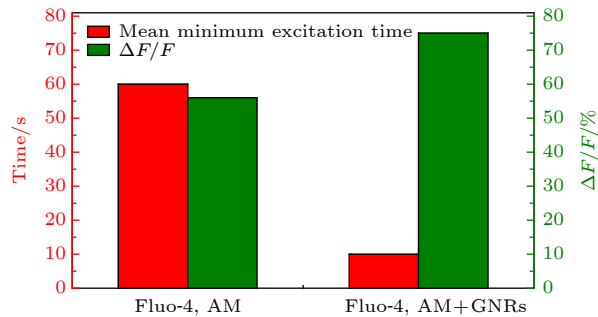


图 5 仅 Fluo-4, AM 标记和 Fluo-4, AM, Con A 和 GNRs-SA 同时标记的 SH-SY5Y 细胞光刺激的平均 (细胞数 $n = 300$) 最小激发时间以及光激活引起相对荧光强度的变化值

Fig. 5. For Fluo-4, AM labeled and Fluo-4, AM, Con A and GNRs-SA labeled SH-SY5Y cells at the same time, the average photoactivation (cell number $n = 300$) minimum excitation time and the changes in relative fluorescence intensity caused by photoactivation.

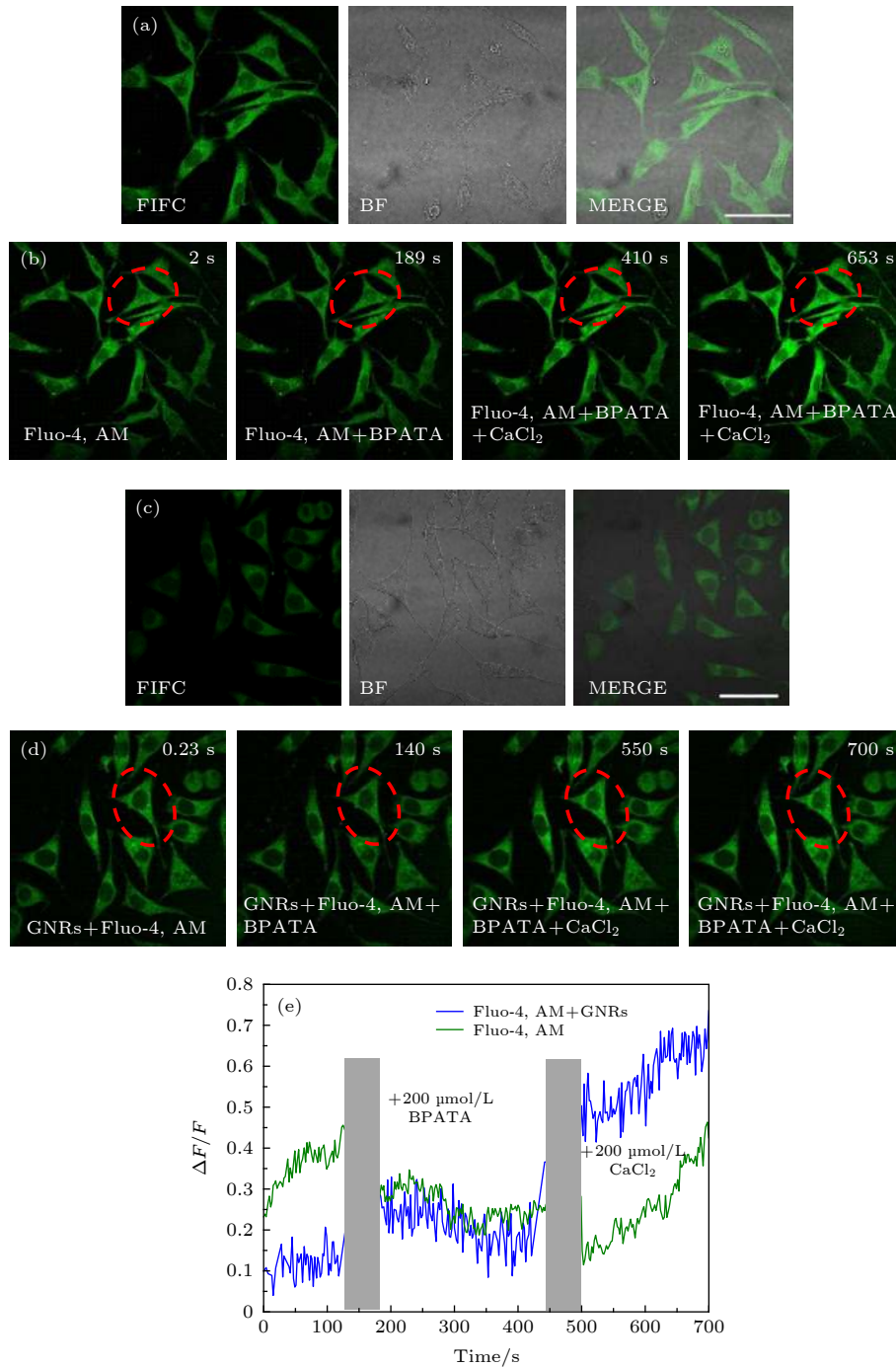


图 6 验证光激活时 Ca^{2+} 的变化来源 (其中 FITC 表示使用 500—550 nm 的带通滤波片来采集荧光, BF 表示透射成像, Merge 表示两通道的叠加图) (a) Fluo-4, AM 染色后 SH-SY5Y 细胞的荧光图像和透射光图像 (比例尺: 50 μm); (b) Fluo-4, AM 染色后 SH-SY5Y 细胞不同时刻的双光子荧光图像; (c) Fluo-4, AM 与 2 $\mu\text{mol/L}$ Con A, GNRs-SA 孵育后 SH-SY5Y 细胞的荧光图像和透射光图像 (比例尺: 50 μm); (d) Fluo-4, AM 与 2 $\mu\text{mol/L}$ Con A, GNRs-SA 孵育后 SH-SY5Y 细胞不同时刻的双光子荧光图像; (e) 图 (b) 和 (d) 中红色虚线所圈区域的 $\Delta F/F$ 在相继添加 200 $\mu\text{mol/L}$ BPATA 与 200 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂ 后的变化曲线

Fig. 6. Verify the changing of the source of Ca^{2+} during photoactivation. Among them, FITC indicates the use of a 500—550 nm band-pass filter to collect fluorescence, BF indicates transmission imaging, and Merge indicates an overlay of two channels. (a) Fluorescence and TD image of SH-SY5Y cells with Fluo-4, AM staining (scale bar: 50 μm). (b) Two-photon fluorescence images of SH-SY5Y cells labeled with Fluo-4, AM at different times. (c) Fluorescence and TD images of SH-SY5Y cells with Fluo-4, AM staining after adding 2 $\mu\text{mol/L}$ Con A, GNRs-SA (scale bar: 50 μm). (d) Time-series two-photon fluorescence images of SH-SY5Y cells labeled with Fluo-4, AM staining after adding 2 $\mu\text{mol/L}$ Con A, GNRs-SA. (e) The change curves of the $\Delta F/F$ of the red virtual circle areas in panel (b) and (d) after adding 200 $\mu\text{mol/L}$ BPATA and 200 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂.

神经细胞中引起局部 Ca^{2+} 升高, 连续扫描 15 min, 检测到有 Ca^{2+} 动态变化 (如图 4(a) 和图 4(c)). 在此激光强度下, 会引起重复刺激. 再对未与 GNRs-SA 一起孵育的神经元的整个区域进行飞秒激光的重复扫描, 在 0.5 mW 的功率扫描下, 未观察到神经细胞中明显的 Ca^{2+} 升高. 当激光功率提高到 1.5 mW 时, 观察到 Ca^{2+} 荧光的增加 (如图 4(b) 和图 4(d)), 这些结果表明, 使用 800 nm 的脉冲光刺激定位到 SHSH5Y 细胞膜上的 GNRs 可以在神经细胞中增强诱导 Ca^{2+} 瞬变. 经过多次重复实验 (大约 300 个细胞, 30 个培养皿) 的结果如图 5 所示, 红色表示平均最小激发时间, 绿色表示平均相对荧光强度的最大变化值. 可以看出, 不加 GNRs 时平均激发时间需要 60 s, 神经细胞被光激活后的 Ca^{2+} 的 $\Delta F/F$ 的平均值为 56%, 而加了 GNRs 之后的平均激发时间只需 10 s, 且细胞被光激活之后的 Ca^{2+} 的 $\Delta F/F$ 的平均值为 75%, 这表明, GNRs 标记细胞膜有光激活增强的作用.

在光激活 Ca^{2+} 过程中, 神经细胞内外的 Ca^{2+} 会有交换, 为了确定光激活 Ca^{2+} 的动态变化是源自细胞内钙还是细胞外钙, 使用 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 BPATA 钙离子螯合剂进行处理, 其中图 6(a) 和图 6(c) 的 FITC 通道表示 488 nm CW 激光激发, 500—550 nm 的带通滤波片收集, BF 表示正常明场成像, Merge 代表两通道的叠加图. 如图 6(e) 所示, 在 BPATA 处理后 1 min 内, 细胞内的钙浓度逐渐降低, 5 min 后加入 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ca^{2+} 溶液, 在 Ca^{2+} 处理的几十秒内, 细胞内钙浓度显著增加, 结果表明, 在不加 Con A, GNRs-SA 的情况下, 加入 Ca^{2+} 溶液后, $\Delta F/F$ 达到 44%, 而在先加 Con A, GNRs-SA 再加入 Ca^{2+} 溶液后, $\Delta F/F$ 达到 72%. 因此证明 GNRs 确实能使细胞外的 Ca^{2+} 流入细胞内, 引起钙内流, 起到增强神经细胞钙离子光激活的作用. 与红外光直接刺激细胞进行光激活相比, GNRs 辅助的光学刺激方法显著降低了光激活所需的辐射暴露程度, 利用近红外光来代替容易被水吸收的红外光, 很大程度上能够减小由于加热导致的组织损伤^[20].

5 结 论

利用近红外脉冲激光刺激标记有 Con A, GNRs-SA 和 Fluo-4, AM 的神经细胞, 并且对神

经细胞内 Ca^{2+} 光激活进行双光子显微成像研究, 在 800 nm 激发下, GNRs 通过 LSPR 导致细胞外 Ca^{2+} 流入, 实现了对神经细胞的光激活增强效果, 证明了 GNRs 辅助近红外光刺激增强神经细胞光激活的可行性, 表明在生物成像中使用 GNRs 可以提供一种无毒的、非遗传的, 并且可用于增强神经细胞光激活的常用光学方法, 与其他使用膜片钳的研究方法相比, 用 $\Delta F/F$ 可以定量表示出 GNRs 对神经细胞光激活的强度, 在操作上更为简单但是精确度较低. 这种方法可以作为控制神经细胞活动以及细胞信号传导等光刺激方法的补充, 用于神经科学的基础研究.

参考文献

- [1] Michael J H, Bernardo L S 2008 *Neuron* **59** 902
- [2] Richard D F, Dong H W, Peter J B 2015 *Neuron* **86** 374
- [3] John C W, Emilia E 2015 *Biophys. J.* **108** 1934
- [4] Camilo R, Mariateresa T, Paolo M, Attilio M, Gianni C, Sergio M, Roberto R 2018 *J. Neural Eng.* **15** 036016
- [5] Jean D, Luis H, Katrien M, Dries B, Dimiter P 2017 *Front. Neurosci.* **11** 663
- [6] Lu C B, Wu X L, Ma H Z, Wang Q C, Wang Y K, Luo Y, Li C, Xu H 2019 *Neural Plast.* **2019** 5271573
- [7] Robert K S, Joel V, Owen B, David A X N 2018 *J. Neural Eng.* **15** 041004
- [8] Jacob G B, Edward S B 2011 *Trends Cogn. Sci.* **15** 592
- [9] Yao J P, Hou W S, Yin Z Q 2012 *Int J Ophthalmol.* **5** 517
- [10] Sonny G, Terence S L, Clare E E, Ilias T 2014 *Biomed. Opt. Express* **5** 2896
- [11] Flavie L C, Charleen S, Éric B, Michel M, Paul D K 2016 *Sci. Rep.* **6** 1
- [12] Paviolo C, Thompson A C, Yong J, Brown W G, Stoddart P R 2014 *J. Neural Eng.* **11** 065002
- [13] de Boer W.D.A.M, Hirtz J J, Capretti A, Gregorkiewicz T, Izquierdo-Serra M, Han S, Dupre C, Shymkiv Y, Yuste R 2018 *Light Sci. Appl.* **7** 100
- [14] Shapiro M G, Homma K, Villarreal S, Richter C P, Bezanilla F 2012 *Nat. Commun.* **3** 736
- [15] João L C D S, Jeremy S T, Bobo D, Stephen B H K, David R P, Francisco B 2015 *Neuron* **86** 207
- [16] Morven C, Orsolya K, John W M, Jonathan T, Paul P B, André V S, Yossi B 2016 *PLoS One* **11** e0155468
- [17] Silvia S, Aniello S M, Vito D M 2014 *Gen. Physiol. Biophys.* **33** 121
- [18] Shen B L, Yan J S, Wang S Q, Zhou F F, Zhao Y H, Hu R, Qu J L, Liu L W 2020 *Theranostics* **10** 1849
- [19] Lin F R, Pintu D, Zhao Y H, Shen B L, Hu R, Zhou F F, Liu L W, Qu J L 2020 *Biomed. Opt. Express* **11** 149
- [20] Kyungsik E, Kyung M B, Sang B J, Sung J K, Jonghwan L 2018 *Biophys. J.* **115** 1481
- [21] João L C D S, Okhil K N, Eunkeu Oh, Alan L H, Igor V, David R P, Francisco B, James B, Delehanty 2019 *ACS Chem. Neurosci.* **10** 1478
- [22] Michael B R, Chad A M, George C S 2016 *J. Phys. Chem. C* **120** 816
- [23] Vincenzo A, Roberto P, Marco F, Onofrio M M, Maria A I

- 2017 *J. Phys. Condens. Matter* **29** 203002
 [24] Ni W H, Kou X S, Yang Z, Wang J F 2008 *ACS Nano* **2** 677
 [25] Sassaroli E, Li K C P, O'Neill B E 2009 *Phys. Med. Biol.* **54** 5541
 [26] Ekici O, Harrison R K, Durr N J, Eversole D S, Lee M, Yakar A B 2008 *J. Phys. D* **41** 185501
 [27] Luo L Q 2015 *Principles of Neurobiology* (New York: Garland Science) pp40–43
 [28] Roberta D A, Pasquale P, Giuseppe S 2017 *Beilstein J. Nanotechnol.* **8** 1

Stimulating Ca^{2+} photoactivation of nerve cells by near-infrared light*

Geng Jun-Xian[#] Li Shao-Qiang[#] Wang Shi-Qi Huang Chun Lü Yun-Jie
 Hu Rui Qu Jun-Le[†] Liu Li-Wei[‡]

(Ministry of Education/Guangdong Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

(Received 2 April 2020; revised manuscript received 1 May 2020)

Abstract

Calcium ions (Ca^{2+}) play a key role of the nerve cells generating universal intracellular signals and controlling important functions. Ca^{2+} activation is of great significance for explaining the subcellular-level biological process. Light stimulated nerve cells to control intracellular signals and membrane activities has become a main method in neuroscience, and the photoactivation is one of the main ways to study intracellular Ca^{2+} transmission. Nerve cells can be directly stimulated by light to produce action potentials, but such techniques are inaccurate in the delivered light energy. To improve this, here in this work we show that gold nanorods (GNRs) can be conjugated to ligands to bound to human neuroblast cells (SH-SY5Y), and introduce an optical method of stimulating and monitoring Ca^{2+} signal in nerve cells in which the plasmonic excitation of GNRs is used. In this paper, we use confocal microscopy to display the 488 nm continuous wave laser irradiating SH-SY5Y cells with Ca^{2+} indicator (Fluo-4, AM) to check fluorescence. Near-infrared pulsed light at the plasmon resonance absorption peak of GNRs is used to stimulate Ca^{2+} signal transduction in SH-SY5Y labeled with GNRs, and Fluo-4, AM is used for two-photon excited fluorescence imaging. In addition, we use the pulsed laser with power of 0.5 mW and a wavelength of 800 nm. The Ca^{2+} activation can be achieved in 10 s on average. The release rate of Ca^{2+} from SH-SY5Y cells labeled with GNRs is 6 times that without GNRs. Next, in order to determine the source of changes in Ca^{2+} , we use the BPATA to deplete the intracellular Ca^{2+} , after 5 min, 200 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} solution is added, and its $\Delta F/F$ is found to be more than 1.5 times that without GNRs. Thus, we believe that GNRs could enhance photoactivation through local surface plasmon resonance induced membrane depolarization and generate an action potential. The results prove the feasibility of using GNRs to enhance the activation of Ca^{2+} in nerve cells, and provide an optical means of lower photodamage and more precise for studying nerve cell ion channels. Our study demonstrates that enhancing photoactivation by GNRs could provide an outlook of basic research in neuroscience.

Keywords: nerve cell, calcium ion, photoactivation, two-photon excited fluorescence

PACS: 87.64.M–, 87.50.W–, 87.50.wf, 87.64.mn

DOI: 10.7498/aps.69.20200489

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61935012, 61722508, 61525503, 61620106016, 61835009, 61961136005), the Guangdong Innovation Team, China (Grant Nos. 2016KCXTD007, 2014A030312008), and the Shenzhen Free Exploration Project, China (Grant No. JCYJ20180305124902165).

[#] These authors contributed equally.

[†] Corresponding author. E-mail: jlqu@szu.edu.cn

[‡] Corresponding author. E-mail: liulw@szu.edu.cn