

乙二醛诱导细胞凋亡的近红外 表面增强拉曼光谱

唐宏武¹, SMITH D. A.²

(1. 武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072;

2. Institute of Molecular Biophysics, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK)

摘要 将 60 nm 金纳米粒子导入到活的人骨肉瘤细胞中, 用近红外表面增强拉曼散射 (SERS) 技术获取细胞内化学成分的高分辨 SERS 信息. 对正常活性细胞和乙二醛诱导的凋亡细胞的比较研究表明, 对于正常活性的细胞, 金纳米探针主要分布在细胞质内(围绕细胞核), 而凋亡细胞内的金纳米探针的分布较为均匀, 在遍布凋亡细胞内的各个位置包括细胞表面均容易找到 DNA 片段的信息.

关键词 表面增强拉曼散射; 金纳米探针; 骨肉瘤细胞; 细胞凋亡; 细胞成分

中图分类号 O657.37

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)02-0254-04

拉曼光谱作为一种能够提供物质的化学结构信息的重要工具, 近十年来在单细胞分析领域获得了巨大成功^[1,2]. 可是, 单细胞内的化学成分含量极低, 而且由于拉曼散射的灵敏度很低(分子截面仅为 $10^{-30} \sim 10^{-25} \text{ cm}^2/\text{molecule}$), 因此需要使用较强的激光来获取细胞的拉曼信号, 这对于活细胞的拉曼探测极为不利; 此外, 在使用共焦拉曼显微镜分析单细胞时, 一般需要设置较长的 CCD 积分时间来获取足够强度的拉曼信号, 所以要获取一幅单细胞的拉曼强度分布图 (Map) 往往需要数小时时间.

在表面增强拉曼散射 (SERS) 中, 将目标分子吸附于纳米量级的粗糙金属表面, 可使信号增强 6 ~ 10 个数量级, 因此 SERS 的灵敏度极高, 目前已达到单分子检测水平^[3]. 如今, SERS 已被大量应用于生物医学研究的各个方面, 同时, 随着纳米粒子合成技术的发展, 其用于生物分子标记已成为研究热点^[4,5]. 在将 SERS 应用于单细胞分析方面, 贵金属纳米粒子(金和银)探针特别适合于单个活细胞的探测. 由于纳米金具有良好的物理、化学性质及生物相容性而受到特别关注^[6-8]. Kneipp 等^[9] 首先将金纳米粒子用于细胞内的核酸和蛋白质等生物分子的探测, 并将其作为一种纳米传感器成功用于活细胞的细胞器研究^[10]. 此外, 我们采用类似方法, 探测了金纳米粒子在单个癌细胞内的分布情况, 发现金纳米探针不仅能提供细胞内信息, 还能准确提供进入细胞的外来化合物(药物分子)在细胞内的分布情况^[11].

细胞凋亡 (Apoptosis) 又称程序性细胞死亡 (Programmed Cell Death, PCD), 它是指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序死亡^[12]. 它既是细胞对环境的生理性和病理性的刺激信号及环境条件的变化或缓和性损伤产生的应答有序变化的死亡过程, 也是细胞在各种内外信号激活细胞死亡程序后发生的一种自杀行为. 在健康的机体中, 细胞的生成与凋亡处于一个良性的动态平衡中, 破坏这种平衡, 机体就会患病. 如果应该死亡的细胞没有死亡, 就可能导致细胞恶性增长, 进而形成癌症.

目前, 虽然用拉曼光谱技术研究细胞的病理性变化已经成为一个热门课题, 但有关采用此法研究细胞凋亡的报道极少. Krafft 等^[13] 采用常规共焦拉曼显微技术, 对由乙二醛诱导人肺纤维细胞产生的早期和晚期细胞凋亡进行了研究.

本文利用金纳米探针探测用微量乙二醛诱导癌细胞凋亡时细胞内生物分子分布的变化情况, 以建

收稿日期: 2007-09-06.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20475041) 资助.

联系人简介: 唐宏武, 男, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要从事分子发光分析、高灵敏度激光光谱分析和光谱仪器研究.

E-mail: hwtang@whu.edu.cn

立一种高灵敏度的 SERS 方法, 用来探测细胞在发生病理性变化时其重要化学成分的相应变化.

1 实验部分

1.1 细胞培养

通过培养, 使人骨肉瘤细胞(G292 cell line)贴壁生长于用质量分数为 0.01% 的聚赖氨酸(Sigma-Aldrich)处理过的 CaF_2 玻璃片(Crystran 公司)上. 本实验培养基为含有质量分数为 10% 的胎牛血清和 100 IU/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基, 并加入一定量的胶体金溶液(含质量分数为 0.01% 的 HAuCl_4 , Agar 公司, 金纳米粒子直径约 60 nm). 将细胞在温度为 37 °C, CO_2 含量为 5% (体积分数)的 CO_2 细胞培养箱中培养 24 h 后, 或直接做拉曼光谱测定, 或加入适量的乙二醛(Sigma 公司, 乙二醛终浓度为 1 mmol/L)后继续培养 24 h 后做光谱分析. 所有细胞光谱测定均在 pH 7.4 的 PBS 溶液中进行. 胎牛血清的存在可以减轻金纳米粒子在培养液中的聚集, 从而提高金纳米粒子的稳定性.

1.2 拉曼光谱测量

拉曼光谱测量用 Renishaw RM 1000 型共焦拉曼显微镜完成, 所用激光波长为 785 nm, 实际测量时用 100 倍的水浸物镜(N. A. 1.20)将激光聚焦形成直径约 1 μm 的光斑(功率 3 mW), 并用同一物镜收集源于试样的拉曼信号. 系统的光谱分辨率为 3 cm^{-1} . 在采集表面增强拉曼信号时, CCD 的积分时间一般设为 1 s. 在获取单细胞试样的拉曼强度分布图(Map)时, 设置 x, y 维步长均为 1 μm .

2 结果与讨论

2.1 活细胞的 SERS Map 及光谱

由于活细胞的吞噬作用, 金纳米粒子有可能采用以下方式进入活细胞^[8]: (1) 进入细胞, 然后通过细胞分泌作用而被排出; (2) 进入细胞并不断接近核膜; (3) 进入细胞后顺利通过核孔, 进入细胞核. 实验发现, 金纳米粒子在细胞内的分布是不均匀的, 而且不同细胞间的个体差异很大; 如果金纳米粒子小于核孔, 则进入细胞核的可能性较大. 实验选用金纳米粒子尺寸为 60 nm, 与核孔的尺寸较为接近, 因此可以预期进入细胞核的金纳米粒子将会很少. 图 1(A) 为一典型的吞入了大量金纳米粒子的活的骨肉瘤细胞照片(用 50 倍物镜获得), 可见细胞内金纳米粒子聚集成为一个有趣的环状图案. 图 1(B) 显示的是图 1(A) 方框部分为用 1800 cm^{-1} 处的强度构建的拉曼强度的分布图(分辨率为 51 \times 51 像素, 每一像素点的尺寸约为 1 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$, 和激光光斑的尺寸相当). 虽然在 1800 cm^{-1} 附近没有出现拉曼峰, 但此处的背景强度较准确地反映了金纳米粒子分布的情况, 即金纳米粒子聚集越多, SERS 背景越强.

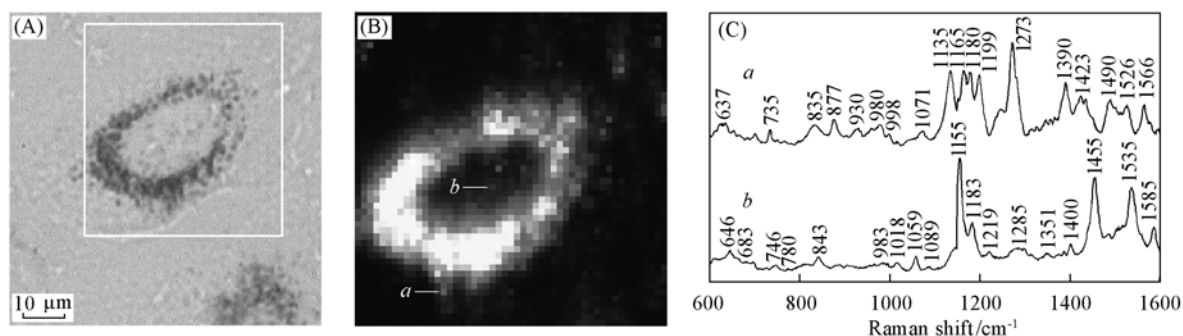


Fig. 1 Optical microscope image and raman map showing the gold nanoparticles distribution within a viable cell in PBS and typical SERS spectra at two different points within the cell

(A) Optical transmission image; (B) SERS map at 1800 cm^{-1} for the rectangle box region in (A); (C) unprocessed SERS spectra collected from points *a* and *b*, respectively.

图 1(C) 为该细胞内的两点 *a* 和 *b* (分别位于环状区域内外) 的 SERS 光谱, 为讨论这两点的光谱差异, 表 1 列出了两组光谱峰值的归属. 由表 1 可知, 光谱 *a* 主要为蛋白质和氨基酸的信息, 而光谱 *b* 除了提供蛋白质信息外, 还提供了丰富的 DNA 骨架及核苷酸信息. 这说明: (1) *a* 和 *b* 分别位于细胞质

和细胞核中; (2) 有少量金纳米粒子进入了细胞核; (3) 该细胞保持了活细胞的形态, 其细胞膜和核膜都很完整.

Table 1 SERS peaks and tentative assignments of major vibrational bands in the spectra in Fig. 1 (C)

Point <i>a</i> peak/cm ⁻¹	Protein assignment	Nucleic acid assignment	Point <i>b</i> peak/cm ⁻¹	Protein assignment	Nucleic acid assignment
637	Tyr		646	Tyr	G
735		A	683		G
835	Tyr		746		T
877	Pro		780		C, T, U
930	C—C stretching mode of Pro and Val		843	Tyr	*
998	Phe ring vib.		983	C—H in-plane bending mode of Phe	**
1071	Protein C—N stretching		1018		**
1135	Protein C—N stretching		1059		**
1165	C—H in-plane bending mode of tyrosine		1089		***
1199	Trp, Phe		1155	Protein C—N stretching	
1273	Tyr ring vib. or protein C—N stretching		1183	Tyr, Phe, ring vib.	
1390		A, T	1219	Protein (amide III band)	
1423		G, A	1285	Protein (amide III band)	
1490		G, A	1351	Protein C—H deformation	
1526		G	1400		G
1566	Trp		1455	Lipid, protein (CH ₂ deformation)	
			1535		G, C
			1585		G, A

* DNA PO₂ stretching; ** DNA backbone; C—O stretching; *** DNA PO₂ symmetric stretching.

2.2 凋亡细胞的 SERS Map 及光谱

乙二醛对细胞的毒性表现为阻止 DNA 的复制和蛋白质的合成^[14]. 在本实验中, 对于用纳米金处理过的活细胞, 如果用 1 mmol/L 乙二醛处理, 大部分细胞在 24 h 内的形态发生了明显变化, 细胞形态逐渐变得模糊不清, 一些细胞萎缩成圆形, 并有少量细胞脱落, 这说明由乙二醛诱导产生的细胞凋亡现象是较为明显的.

图 2(A) 为一处于凋亡晚期的骨肉瘤细胞显微照片, 图 2(B) 为其在 1800 cm⁻¹ 处的 SERS 强度分布图 (26 × 26 像素). 该细胞已完全萎缩成圆形, 细胞内含有大量的纳米金, 和正常活性细胞不同的是, 凋亡细胞内纳米金的分布较为均匀. 图 2(C) 表明了该细胞拉曼强度分布图上任意选择的不同像素处的 SERS 光谱: 像素 39, 326, 365, 383 和 579 分别位于细胞的下端、中心、左侧、右侧和上端等 5 个不同位置, 除像素 326 在细胞中心外, 其余 4 个点均位于接近细胞表面的位置. 在图 2(C) 中, #39 光谱的标识峰值均为与 DNA 有关的信息, 诸如 655 和 691 cm⁻¹ 表明了 G 的存在, 794, 899, 1060 和 1091 cm⁻¹ 4 个峰值代表 DNA 骨架信息等. 表明在该细胞的下端边缘含有丰富的核酸. 在细胞中心, #326 光谱的标识峰值同样显示有大量核酸存

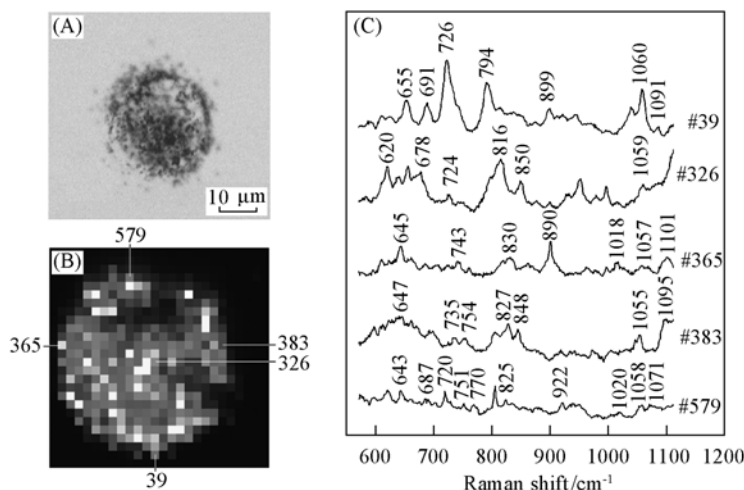


Fig. 2 Optical microscope image and SERS map showing the gold nanoparticles distribution within an osteosarcoma cell during a later stage of apoptosis in PBS and typical SERS spectra from three different positions within the cell

(A) Optical transmission image; (B) 26 × 26 points SERS map at 1800 cm⁻¹ indicating uniform distribution of the gold nanoprobe within the cell; (C) unprocessed SERS spectra collected from five different points within the cell.

在, 如 G(620, 678 cm^{-1}), A(724 cm^{-1}) 以及 DNA 骨架信息(816, 850, 1059 cm^{-1}). 此外, 在其它 3 个边缘位置也显示了丰富的核酸光谱信息. 像素 365: G(645 cm^{-1}), T(743 cm^{-1}), DNA 骨架(830, 899, 1018, 1057, 1101 cm^{-1}); 像素 383: G(647 cm^{-1}), A(735 cm^{-1}), T(754 cm^{-1}), DNA 骨架(827, 848, 1055, 1095 cm^{-1}); 像素 579: G(643, 687 cm^{-1}), A(720 cm^{-1}), T(751 cm^{-1}), DNA 骨架(770, 825, 1020, 1058 cm^{-1}), 脱氧核糖(922 cm^{-1}), 染色体核小体核心颗粒(1071 cm^{-1}).

在该晚期凋亡细胞内核酸的分布十分广泛, 在细胞的上端边缘(像素 579)还出现了染色体信息. 图 2(C)的 5 组光谱中的未标识峰值主要为蛋白质、氨基酸和脂类的信息. 与正常活细胞相比, 晚期凋亡细胞内未发现明显的细胞核区域, 且导入的金纳米探针在细胞内分布比较均匀. 此外, 晚期凋亡细胞不仅在形态上发生了显著变化, 其内部化学物质的组成和分布均有明显变化, 主要体现在凋亡细胞所在的任意区域都容易观察到核酸信息, 甚至是 DNA 骨架的存在. 这是因为在细胞凋亡的晚期, 细胞核破裂, DNA 降解, 使细胞凋亡前吞入的金纳米粒子在细胞凋亡过程中在细胞内重新分布, 因此有较多机会接触断裂的 DNA 片段. 此外, 凋亡细胞通过出芽的方式形成许多凋亡小体, 凋亡小体内部有结构完整的细胞器, 还有凝缩的染色体, 因此在凋亡细胞的表面也可以获得丰富的核酸信息.

参 考 文 献

- [1] Puppels G. J., de Mul F. F. M., Otto C., *et al.*. Nature[J], 1990, **347**: 301—303
- [2] Chan J. W., Taylor D. S., Zwerdling T., *et al.*. Biophys. J. [J], 2006, **90**: 648—656
- [3] Nie S., Emory S. R.. Science[J], 1997, **275**: 1102—1106
- [4] Rosi N. L., Mirkin C. A.. Chem. Rev. [J], 2005, **105**: 1547—1562
- [5] Daniel M. C., Astruc D.. Chem. Rev. [J], 2004, **104**: 293—346
- [6] Chithrani B. D., Ghazani A. A., Chan W. C. W.. Nano Letters[J], 2006, **6**(4): 662—668
- [7] Chithrani B. D., Chan W. C. W.. Nano Letters[J], 2007, **7**(6): 1542—1550
- [8] Tkachenko A. G., Xie H., Liu Y. L., *et al.*. Bioconjugate Chem. [J], 2004, **15**: 482—490
- [9] Kneipp K., Wang Y., Dasari R. R., *et al.*. Appl. Spectrosc. [J], 1995, **49**: 780—784
- [10] Kneipp J., Kneipp H., McLaughlin M., *et al.*. Nano Letters[J], 2006, **6**(10): 2225—2231
- [11] Tang H. W., Yang X. B., Kirkham J., *et al.*. Anal. Chem. [J], 2007, **79**: 3646—3653
- [12] Majno G., Joris I.. Am. J. Pathol. [J], 1995, **146**: 3—16
- [13] Krafft C., Knetschke T., Funk R. H. W., *et al.*. Anal. Chem. [J], 2006, **78**: 4424—4429
- [14] Klammerth O. L.. Biochim. Biophys. Acta[J], 1968, **155**: 271—279

Glyoxal Induced Apoptosis Studied by Near-infrared Surface-enhanced Raman Scattering

TANG Hong-Wu^{1*}, SMITH D. A.²

(1. College of Chemistry and Molecular Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. Institute of Molecular Biophysics, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK)

Abstract We report on the capabilities of near-infrared surface-enhanced Raman scattering(SERS) by introducing 60 nm gold nanoparticles into live human osteosarcoma cells to obtain detailed chemical information with a high spatial resolution from these cells. A comparative study between viable and glyoxal induced apoptotic cells indicates that most of the gold nanoparticles enter the living cell reside in the cytoplasm and around the nucleus, whereas apoptotic cell shows relatively uniform distribution of gold nanoparticles and interestingly, DNA fragments can be easily found throughout the cell including the cell surface. The ability to acquire very sensitive SERS inside single cells indicates the potential of this technique as a useful tool in biomedicine.

Keywords Surface-enhanced raman scattering(SERS); Gold nanoprobe; Osteosarcoma cell; Apoptosis; Cellular component

(Ed. : V, I)