

BODIPY 型 NO 探针的制备及对巨噬细胞内一氧化氮检测的初步观察

李生富 袁小林 肖义 于海波 张春雷 李小欢 杨真 张青 崔益芬

【摘要】 目的 对 BODIPY 型一氧化氮探针检测巨噬细胞内一氧化氮的效果进行初步验证。方法 采用免疫荧光染色和共聚焦显微镜对小鼠腹腔渗出液中的巨噬细胞的含量进行测定;采用 BODIPY 型探针检测巨噬细胞内一氧化氮进行荧光染色,并激光扫描共聚焦显微镜对细胞内的荧光强度进行测定。结果 液状石蜡诱导小鼠腹腔渗出细胞的 CD14 与 CD68 阳性细胞率分别为 $(32.33 \pm 7.27)\%$ 与 $(93.83 \pm 4.25)\%$, 巨噬细胞为优势细胞;LPS 刺激组与对照组细胞的荧光强度与面积比值分别为 57.23 ± 18.65 和 24.57 ± 10.25 , LPS 刺激巨噬细胞的荧光强度与面积比值明显高于对照组细胞 ($P < 0.01$)。结论 BODIPY 型一氧化氮探针可用于细胞一氧化氮荧光成像和巨噬细胞内一氧化氮检测。

【关键词】 巨噬细胞; 一氧化氮; BODIPY 型一氧化氮探针

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞之一,具有吞噬、抗原提呈和分泌多种细胞因子的功能,在机体免疫调节、适应性免疫反应的诱发过程中起关键作用^[1]。一氧化氮(nitric oxide, NO)是巨噬细胞的主要效应成分之一,参与细菌与肿瘤细胞的非特异性杀伤。同时,NO合成是巨噬细胞活化的重要标志^[2]。由于NO的半衰期短、反应活性高,在细胞内极不稳定,通常通过对分泌于细胞外的NO水平测定来间接推断细胞内NO的合成情况,细胞内NO的直接测定困难较大。本研究采用氟硼二吡咯(Boron-dipyrromethene, BODIPY)荧光团与邻苯二胺制备了BODIPY型NO荧光探针,并对巨噬细胞内NO进行了测定。结果如下。

一、材料与方法

1. 实验动物:昆明小鼠:6~8周龄,由大连大学实验动物中心提供。

2. 试剂与仪器:RPMI-1640培养基(Gibco,美国);小鼠淋巴细胞分离液(密度:1.092 g/ml,天津灏洋生物科技公司);优级胎牛血清(天津灏洋生物科技公司);羊抗小鼠CD68(m-20)单克隆抗体(Santa Cruz,美国);FITC标记兔抗山羊IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司进口分装);PE荧光素标记抗小鼠CD14(eBio-science,美国);共聚焦显微镜(日本Nikon)。

3. BODIPY 型 NO 探针制备: BODIPY 型 NO 探针以 BODIPY 荧光团为母体结构,邻苯二胺作为受体设计合成。

利用邻苯二胺可以与 NO 反应形成苯并三唑,可以专一识别 NO。其检测原理主要是基于光致电子转移机制(photoinduced electron transfer, PET)^[3]。与 NO 反应前邻苯二胺氮原子上的孤对电子转移到荧光团上,荧光淬灭;与 NO 反应时,BODIPY-NO

转换 BODIPY-NO-T,抑制了 PET 作用,表现出强的荧光(图1)。BODIPY 型 NO 探针具有较高的摩尔消光系数和荧光量子产率,荧光光谱半峰宽较窄。对硝普钠(NO供体)选择性强,灵敏度高,不易受溶剂极性和 pH 值(pH=4~11不敏感)的影响(图2)。

4. 小鼠腹腔巨噬细胞的收集与激活方法:取8周龄小鼠腹腔注射6ml液状石蜡,3d后脱颈处死,于75%酒精中浸泡5min,无菌剖开小鼠腹腔,用预冷的无菌PBS液冲洗小鼠腹腔,收集冲洗液于离心管中,1000 r/min×5 min离心,弃上清,PBS清洗两次,RPMI-1640全基(含10% FBS、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素)调整细胞浓度为 2×10^6 /ml,分别加入到96孔板中,100 μl/孔。实验孔加入LPS(终浓度20 ng/ml),对照组加入等体积的RPMI-1640全基,37℃、5% CO₂条件下培养24 h。

5. CD14、CD68免疫荧光染色方法:吸弃培养于96孔板的细胞的培养上清,PBS洗2次,10%甲醛固定10 min,吸弃甲醛液,PBS洗两次,破膜剂(1:10稀释)作用10 min,PBS洗两次。PE标记抗小鼠CD14单克隆抗体,37℃孵育60 min,PBS洗3次,加入抗小鼠CD68单克隆抗体,37℃孵育60 min,PBS洗3次。加入FITC标记二抗,37℃孵育45 min,PBS洗3次,加入50 μl PBS,采用共聚焦显微镜测定巨噬细胞阳性率、荧光强度(OD值)、面积,计算荧光强度面积比值并拍摄照片。

6. 细胞内 NO 含量的检测方法:吸弃96孔板中培养细胞上清液,加入NO探针终浓度为 5×10^{-5} mol/L,37℃孵育30 min,激光扫描共聚焦显微镜下检测,用相应的EZ-C1软件分析每个细胞单位面积的平均荧光强度,进行统计学分析。

7. 统计学处理:计量资料采用方差分析,两组均值t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. CD14/CD68的免疫荧光染色结果(图3):液状石蜡诱

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.20.090

基金项目:大连市科技计划项目(2011-20135)

作者单位:116000 大连大学附属中山医院中心实验室(李生富、袁小林、张春雷、李小欢、杨真、张青、崔益芬),大连理工大学化工学院(肖义、于海波)

通讯作者:袁小林,Email: daiwoguo@sina.com

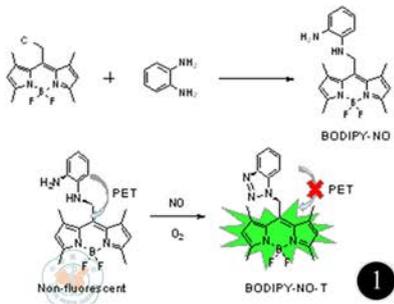


图1 NO探针的合成及作用原理

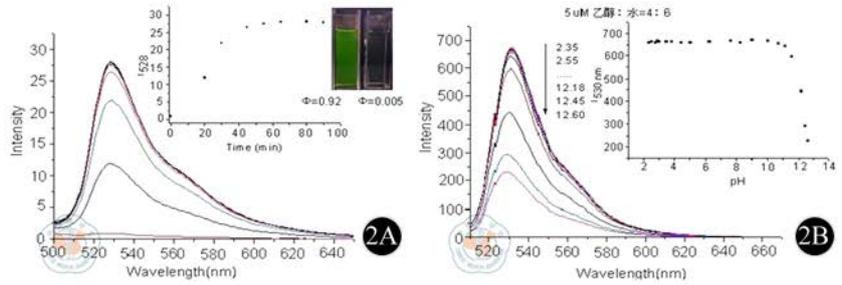


图2 BODPIY-NO探针对NO及pH响应; 2A: BODPIY-NO对硝普钠的响应; 2B: BODPIY-NO-T的pH响应

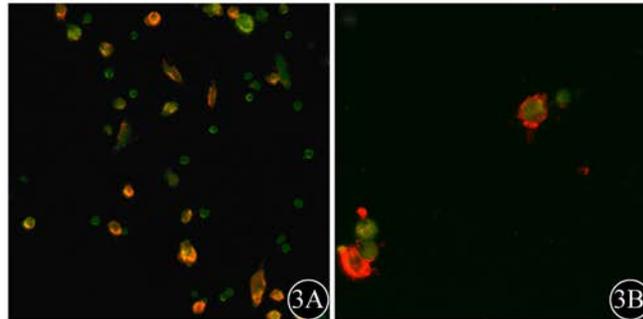


图3 液体石蜡诱发腹腔渗出细胞CD14与CD68免疫荧光染色结果。3A: CD14与CD68免疫荧光染色结果 (×200); 3B: CD14与CD68免疫荧光染色结果 (×600)。PE标记抗CD14单克隆抗体(直标)、FITC标记抗CD68单克隆抗体(间标)

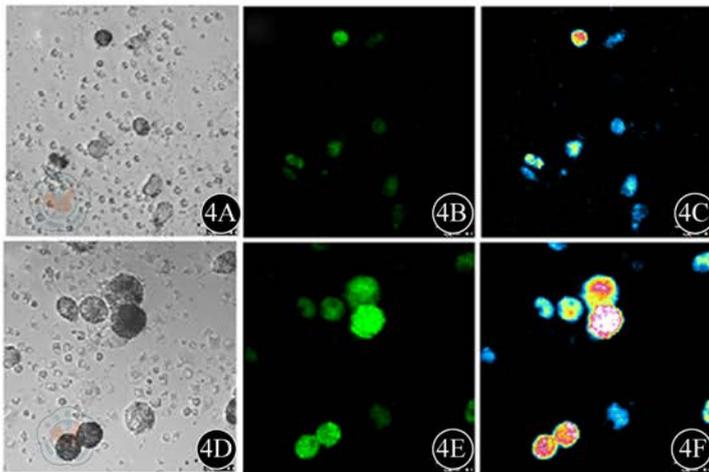
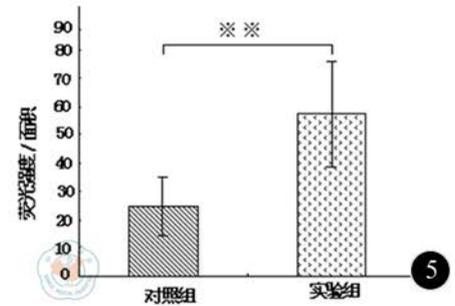


图4 巨噬细胞NO探针染色结果。4A~4C: 对照组巨噬细胞NO探针标记荧光染色; 4D~4F: 为LPS刺激巨噬细胞NO探针标记荧光染色 (×400) 图5 NO探针检测荧光强度比较, ***代表P<0.01



生小鼠腹腔渗出细胞的免疫荧光染色结果显示, CD14 与 CD68 阳性细胞率分别为 (32.33±7.27)% 与 (93.83±4.25)%, 表明液状石蜡诱生的腹腔渗出细胞以巨噬细胞为优势细胞。

2. NO 探针检测结果 (图 4, 5): NO 探针与细胞内的 NO 特异性结合, 加入 NO 探针孵育 30 min 后进行激光扫描共聚焦显微镜检查, 结果显示对照组与 LPS 刺激组的荧光强度与面积比值分别为 24.57±10.25 和 57.23±18.65, LPS 刺激细胞的荧光强度与面积比值明显高于对照组细胞 (P<0.01)。

三、讨论

巨噬细胞是机体重要的免疫效应细胞, 具有吞噬功能和抗原递呈作用, 能分泌 NO 及多种细胞因子的作用。活化的巨噬细胞在细菌、病毒或内毒素、TNF-α、IFN-γ、IL-1 等细胞因子的刺激下, 巨噬细胞内 iNOS 表达显著增高, 利用 L-精氨酸通

过 iNOS 途径合成并释放大量的 NO^[2,4]。NO 是生物体内一种分子量小, 结构简单但功能强大的自由基, 能够快速在细胞和组织中扩散并调节人体一系列的生理功能及病理过程, 具有生物信使分子和细胞毒分子的双重作用^[5-6], NO 是巨噬细胞杀灭病原微生物和肿瘤细胞的主要效应分子^[4,7]。NO 性质活泼、易扩散、半衰期短、极易通透细胞生物膜扩散, 目前还没有一种很成熟的测定细胞内 NO 的方法。

目前多采用分光光度法、化学发光法、电化学法、色谱法、质谱法、顺磁法等^[8]检测血液、组织和细胞培养液等细胞外的 NO, 而细胞内的 NO 困难较大, 如目前实验室检测最常用的方法 Griss 法, 通过测定释放于细胞外 NO 的氧化产物 NO₂⁻来间接反映 NO 的含量, 此方法简便, 应用范围广, 但是特异性差, 受干扰因素多, 不能准确测定 NO 的含量, 其他方法也大多如

此, 只能间接反映一部分细胞释放于细胞外 NO 的整体水平, 这极大限制了研究 NO 具体的生物学机制的进展。为了实现细胞中产生的 NO 进行实时原位的检测, 荧光探针检测法显现出了独特优势^[9], 由于荧光探针具有高灵敏度, 实时监测、对活细胞生理功能影响较小的优势, 可通过与荧光显微镜结合对 NO 实现原位的检测^[10]。目前对 NO 进行检测的荧光团主要有荧光素类、罗明丹类、氟硼二吡咯类、菁类染料等, 其中荧光素类和罗明丹类是目前在生物医学领域内检测细胞 NO 应用最广泛应用的荧光团。李连祥等^[11]利用 NO 荧光探针 DAF-2/DA 联合激光共聚焦电镜成功观察到负载后的细胞内 NO 荧光强度。孙爱珍等^[12]借助 DAF-FMDA 荧光染料对 NO 分子进行特异性识别, 然后利用荧光探针分子成像及激光共聚焦扫描显微镜技术在位、实时观察脂多糖诱导下原生质体产生 NO 的动态过程。但它们存在着易产生光漂白, 灵敏度较低以及对环境因素如 pH 值、温度等很敏感, 特别是 pH 值等缺点。与荧光素和罗明丹类荧光团相比 BODIPY 荧光团发展较晚, 但性能优越。BODIPY 荧光团的光谱一般不易受到溶剂极性和 pH 值的影响, 具有较高的摩尔消光系数和荧光量子产率, 水溶液中也会保持很高的量子产率, 荧光光谱半峰宽较窄, 有较高的检测灵敏度, 分子质量小且细胞毒性低, 易于修饰等优点^[13-14], 近年来受到广泛的重视。

本实验合成并使用的探针是以 BODIPY 荧光团 8 号位碳原子与邻苯二胺的氨基结合而合成的一种新的检测细胞内 NO 荧光探针, 本探针在 pH 值为 4~11 范围内荧光信号非常稳定。相比其他荧光探针 pH 值范围更大, 水溶液中也会保持很高的量子产率, 容易进入细胞且在细胞滞留时间增长, 反应产物能快速排出细胞, 减少背景荧光的产生, 提高了探针的灵敏度而且光稳定性好。邻苯二胺作为 NO 最普遍的识别基团, 对 NO 有很强的捕捉能力的, 同时也调节荧光团的荧光信号^[15]。它的检测主要是基于光致电子转移机制 (PET)。与 NO 反应前, 邻苯二胺氮原子上的孤对电子转移到荧光团上, 荧光淬灭; 与 NO 反应时, 形成苯并三唑结构, BODIPY-NO 转换 BODIPY-NO-T, 抑制了 PET 作用, 荧光得以恢复, 此时化合物会释放强的荧光。本实验用 LPS 能够诱导腹腔渗出细胞中的靶细胞分化为巨噬细胞, 同时使分化的巨噬细胞活化, 分泌释放大量 NO。然后用 NO 荧光探针氟硼吡咯染料混于细胞外液中, 终浓度为 5×10^{-5} mol/L, 在二氧化碳培养箱中孵育 30 min 后在激光扫描共聚焦显微镜下观察细胞内的 NO 探针荧光强度, 与对照组细

胞的 NO 荧光强度对比 LPS 诱导的分化细胞的 NO 荧光强度明显增强。

本项研究以 BODIPY 荧光团为母体结构、邻苯二胺作为受体, 设计合成检测细胞内 NO 的荧光探针, 结果证实该探针能够实现巨噬细胞内 NO 测定。该探针可为巨噬细胞 NO 的合成功能及活化状态的检测提供新的手段。

参 考 文 献

- [1] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 958-969.
- [2] Rahat MA, Hemmerlein B. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. *Front Physiol*, 2013, 4: 144.
- [3] Martínez-Máñez R, Sancenón F. Fluorogenic and chromogenic chemosensors and reagents for anions. *Chem Rev*, 2003, 103: 4419-4476.
- [4] 褚夫江, 朱家勇, 金小宝. 一氧化氮在微生物感染中的双向作用. *中国感染控制杂志*, 2008, 7: 216-219.
- [5] Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, et al. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology*, 2005, 208: 177-192.
- [6] 田茂友, 金作衡. 一氧化氮的性质及其生理学作用. *四川生理科学杂志*, 2006, 28: 121-122.
- [7] 彭金娥, 潘敬新. 一氧化氮在肿瘤治疗中的多重作用. *肿瘤*, 2012, 32: 70-73.
- [8] 张正斌, 任春艳, 刘春颖, 等. 对一氧化氮作用的新认识及其检测方法. *青岛海洋大学学报*, 2003, 33: 425-432.
- [9] Zhang XX, Wang Z, Yue X, et al. pH-Sensitive Fluorescent Dyes: Are They Really pH-Sensitive in Cells? *Mol Pharm*, 2013, 10: 1910-1917.
- [10] Nagano T. Bioimaging Probes for Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species. *J Clin Biochem Nutr*, 2009, 45: 111-124.
- [11] 李连祥, 张洪亮, 王义宝. 缓激肽对胶质瘤 C6 细胞 NO 释放的影响及意义. *山东医药*, 2010, 50: 3-5.
- [12] 孙爱珍, 邢达. 脂多糖诱导植物细胞产生 NO 的光学分子成像检测. *激光生物学报*, 2010, 19: 285-290.
- [13] Guo HM, Jing YY, Yuan XL, et al. Highly selective fluorescent OFF-ON thiol probes based on dyads of BODIPY and potent intramolecular electron sink 2, 4-dinitrobenzenesulfonyl subunits. *Org Biomol Chem*, 2011, 9: 3844-3853.
- [14] 洪雪华, 生瑜. BODIPY 类荧光染料的研究进展. *广州化工*, 2012, 40: 65-68.
- [15] McQuade LE, Lippard SJ. Fluorescent probes to investigate nitric oxide and other reactive nitrogen species in biology (truncated form: fluorescent probes of reactive nitrogen species). *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14: 43-49.

(收稿日期: 2013-09-02)

(本文编辑: 戚红丹)