

双光子及共聚焦激光扫描显微术研究天花粉蛋白对人绒癌细胞的作用机制*

张春阳¹⁾ 贡宜萱²⁾ 马辉^{1)**} 安成才²⁾ 陈颀延¹⁾

¹⁾清华大学物理系单原子分子测控教育部重点实验室, 北京 100084;

²⁾北京大学生物技术系植物基因及蛋白质工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 天花粉蛋白 (trichosanthin, TCS) 是从中草药栝楼根中提取的一种核糖体失活蛋白, 具有抗肿瘤和抗 HIV 功能. 应用双光子及共聚焦激光扫描显微术结合特异性荧光探针 Hoechst 33342、2', 7'-二氯荧光黄双乙酸酯 (DCFH-DA)、Indo-1 和 Fluo-3-AM, 首次同时观察了 TCS 诱导人绒癌细胞 (JAR 细胞) 凋亡过程中活性氧自由基 (ROS) 和细胞内钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 的变化, 实验结果表明 TCS 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高和 ROS 形成参与了 TCS 诱导的 JAR 细胞凋亡, 并且 ROS 形成和 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有关. 共聚焦激光扫描显微术的研究结果表明, $[Ca^{2+}]_i$ 升高不是导致 ROS 形成的主要原因, TCS 诱导产生的 ROS 可能是通过 TCS 与 JAR 细胞膜表面受体作用介导的.

关键词 双光子激光扫描显微术, 共聚焦激光扫描显微术, 天花粉蛋白, 人绒癌细胞, 活性氧自由基, 钙

学科分类号 O65, Q51, Q-331

荧光显微术是现代生物学中用于无损观察活细胞和组织的一种重要方法^[1]. 共聚焦激光扫描显微术能对活细胞和组织作光切片, 实现扫描三维成像^[2]. 双光子激发激光扫描显微术是一种最新的、可实现扫描三维成像的显微技术, 具有近红外光激发、对生物样品的光损伤小、穿透深度深和荧光收集率高等特点^[3, 4]. 双光子激发激光扫描显微术和共聚焦激光扫描显微术相结合为在单细胞层次多参数观察活细胞提供了可能.

天花粉蛋白 (TCS) 是从中草药栝楼根中提取的分子质量为 27 ku、含 274 个氨基酸的蛋白质, 具有 RNA N-糖苷酶活性、切割超螺旋 DNA 活性和抑制 HIV 复制的功能^[5-7]. 人绒癌细胞株 (JAR 细胞) 是 TCS 的靶细胞^[5]. 在单细胞层次观察 TCS 对 JAR 细胞的作用机制, 有助于我们深入研究 TCS 的抗肿瘤和抗 HIV 机理. 本文应用双光子及共聚焦激光扫描显微术结合特异性荧光探针 Hoechst 33342、DCFH-DA、Indo-1 和 Fluo-3-AM, 首次同时观察了 TCS 诱导 JAR 细胞凋亡过程中活性氧自由基和细胞内钙浓度的变化, 建立了一种在单细胞层次适时、无损伤、多参数观察活细胞的方法.

1 材料与方 法

1.1 材料

天花粉蛋白由北京大学生物技术系植物基因及

蛋白质工程国家重点实验室提供; RPMI 1640 培养基、小牛血清、胰蛋白酶购自美国 GIBCO-BRL 公司; Hoechst 33342、2', 7'-二氯荧光黄双乙酸酯 (DCFH-DA)、Indo-1、Fluo-3-AM、A23187 和 Thapsigargin 购自美国 Molecular Probes 公司; 其余药品均为国产分析纯.

1.2 细胞系及细胞培养

实验用的细胞系为人绒癌细胞株 (JAR 细胞), 由北京大学生物技术系植物基因及蛋白质工程国家重点实验室提供. JAR 细胞在含 5% CO₂、37℃ 的恒温箱中培养, 细胞培养液为含 10% 小牛血清、0.05 mg/ml 青霉素的 RPMI 1640 培养液.

1.3 双光子及共聚焦激光扫描显微术同时观察细胞核和 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化

细胞经 50 mg/L TCS 处理 24 h, 在 HBSS 缓冲液 [137 mmol/L NaCl, 5.37 mmol/L KCl, 1.37 mmol/L CaCl₂, 0.81 mmol/L MgSO₄, 0.44 mmol/L KH₂PO₄, 0.37 mmol/L Na₂HPO₄, 10 mmol/L HEPES (pH 7.2), 5.56 mmol/L 葡萄糖] 中, 用 10 mg/L Hoechst 33342 (37℃ 染色

* 清华大学 985 重点资助项目, 国家自然科学基金 (19874036) 和海外杰出青年学者合作基金 (19928408) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62784531-164, E-mail: Mahui@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2000-12-07, 接受日期: 2001-01-20

20 min) 和 5 $\mu\text{mol/L}$ Fluo 3-AM (37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 1 h) 同时对细胞进行双标记, 用 Bio-Rad MRC 1024MP 双光子激发激光扫描显微镜对细胞核成像, 激发波长为 730 nm, 发射滤光片为 460LP; 用 Bio-Rad MRC 1024MP 共聚焦激光扫描显微镜对细胞内钙成像, 激发波长为 488 nm, 发射滤光片为 540/30.

1.4 双光子及共聚焦激光扫描显微术同时观察细胞核和 ROS 的变化

细胞经 50 mg/L TCS 处理 24 h, 在 HBSS 缓冲液中, 用 10 mg/L Hoechst 33342 (37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 20 min) 和 20 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA (37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 15 min) 对细胞进行双标记, 用双光子激发激光扫描显微镜对细胞核成像, 激发波长为 730 nm, 发射滤光片为 460LP; 用共聚焦激光扫描显微镜对细胞内 2', 7'-二氯荧光黄 (DCF) 荧光成像, 激发波长为 488 nm, 发射滤光片为 540/30.

1.5 双光子及共聚焦激光扫描显微术同时观察 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 ROS 的变化

细胞经 50 mg/L TCS 处理 24 h, 在 HBSS 缓冲液中, 用 5 $\mu\text{mol/L}$ Indo-1 (37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 50 min) 和 20 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA (37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 15 min) 对细胞进行双标记, 用双光子激发激光扫描显微镜对细胞内钙成像, 激发波长为 730 nm, 发射滤光片为 460LP; 用共聚焦激光扫描显微镜对细胞内 DCF 荧光成像, 激发波长为 488 nm, 发射滤光片为 540/30.

1.6 共聚焦激光扫描显微术适时测量细胞内 ROS 的变化

在 HBSS 缓冲液中, 用 20 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 对细胞染色 15 min, 加入 TCS、A23187 或 Thapsigargin, 用共聚焦激光扫描显微镜采集细胞内 DCF 荧光信号, 激发波长为 488 nm, 发射滤光片为 540/30, 每隔 5 min 采集一次荧光信号.

2 结果和讨论

2.1 钙离子参与了 TCS 诱导的细胞凋亡

双光子激发激光扫描显微术的观察结果表明, TCS 和 JAR 细胞作用 24 h 后, 细胞核染色质浓缩, 并出现特征凋亡小体 (图 1a 和图 2a), 表明 TCS 能引起 JAR 细胞凋亡.

TCS 和 JAR 细胞作用 24 h 后, 用 Hoechst 33342 和 Fluo 3-AM 对细胞进行双标记, 用双光子激发激光扫描显微术观察细胞核形态变化, 同时

用共聚焦激光扫描显微术测量 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化 (图 1). 图 1 显示在染色质浓缩和有凋亡小体出现的细胞中 (图 1a), Fluo 3 荧光明显增强 (图 1b), 表明在凋亡细胞中, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著升高. 文献表明钙离子作为细胞内第二信使, 在细胞凋亡中起着非常重要的作用, 例如在凋亡细胞过程中, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性的核酸内切酶活性增强等^[8,9]. 双光子激发激光扫描显微术和共聚焦激光扫描显微术同时观察细胞核形态和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的实验结果 (图 1), 表明 TCS 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高参与了 TCS 诱导的 JAR 细胞凋亡.

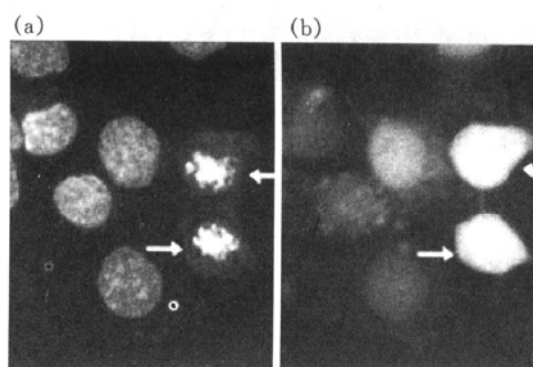


Fig. 1 Nuclear morphological changes (a) and intracellular calcium changes (b) in JAR cells

After treating with 50 mg/L TCS for 24 h, JAR cells were double labeled with Hoechst 33342 and Fluo 3-AM. Image of Hoechst 33342 fluorescence (a) was obtained via two-photon laser scanning microscopy and image of Fluo 3 fluorescence (b) was obtained simultaneously via confocal laser scanning microscopy. Apoptotic cells (arrow) showed chromatin condensation and apoptotic body formation (a) and high Fluo 3 fluorescence (b).

2.2 ROS 参与了 TCS 诱导的细胞凋亡

TCS 作用 JAR 细胞 24 h 后, 用 Hoechst 33342 和 DCFH-DA 对细胞进行双标记, 用双光子激发激光扫描显微术观察细胞核形态变化, 同时用共聚焦激光扫描显微术观察细胞内 ROS 的变化 (图 2). 图 2 显示, 在染色质浓缩和有凋亡小体出现的细胞中 (图 2a), DCF 荧光明显增强 (图 2b), 表明在凋亡细胞中, ROS 升高. 文献表明 ROS 作为细胞内第二信使, 在细胞内酶的激活、细胞生长和分化及细胞凋亡中起着非常重要的作用^[10,11]. 双光子激发激光扫描显微术和共聚焦激光扫描显微术同时观察细胞核形态和细胞内 ROS 变化的实验, 结果表明 TCS 诱导产生的 ROS 参与了 TCS 诱导的 JAR 细胞凋亡 (图 2).

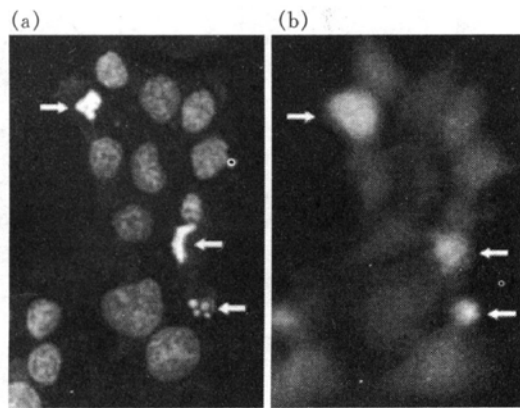


Fig. 2 Nuclear morphological changes (a) and production of ROS (b) in JAR cells

After treating with 50 mg/L TCS for 24 h, JAR cells were double labeled with Hoechst 33342 and DCFH-DA. Image of Hoechst 33342 fluorescence (a) was obtained via two-photon laser scanning microscopy and image of DCF fluorescence (b) was obtained simultaneously via confocal laser scanning microscopy. Apoptotic cells (arrow) showed chromatin condensation and apoptotic body formation (a) and high DCF fluorescence (b).

2.3 ROS 形成和 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有关

TCS 作用 JAR 细胞 24 h 后, 用 Indo-1 和 DCFH-DA 对细胞进行双标记, 用双光子激发激光扫描显微术观察细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化, 同时用共聚焦激光扫描显微术观察细胞内 ROS 的变化 (图 3)。图 3 显示, 在 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的细胞 (图 3a), DCF 荧光明显增强 (图 3b), 表明 TCS 诱导产生的 ROS 是钙依赖性的。为了进一步研究细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高对 TCS 诱导产生 ROS 的影响, 我们研究了 A23187 和 Thapsigargin 对细胞内 ROS 形成的影响。A23187 是 Ca^{2+} 离子载体, 能促进胞外 Ca^{2+} 转移到胞内。Thapsigargin 是 Ca^{2+} 释放剂, 能促进内质网钙库的释放。图 4 表明仅加入 A23187 或 Thapsigargin 后, JAR 细胞内 ROS 并未显著增加; 而 TCS 和 A23187 或 Thapsigargin 同时加入, 细胞内 ROS 显著增加, 但仍比 TCS 直接诱导产生 ROS 的增加幅度小, 提示 $[Ca^{2+}]_i$ 升高并不是 TCS 诱导产生 ROS 的主要原因。TCS 和 A23187 或 Thapsigargin 共同诱导产生的 ROS 比 TCS 直接诱导产生的 ROS 少的原因可能是由于 A23187 和 Thapsigargin 破坏了细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的平衡, 降低了与产生 ROS 有关酶的活性。值得注意的是, TCS 直接诱导 JAR 细胞产生的 ROS 在 30 min 内增加了近 30 倍 (图 4), 说明 TCS 刺激 JAR 细胞产生 ROS 的速度非常快。最近的研究发现, TCS 通

过与细胞膜表面受体作用而进入和作用于细胞^[12, 13], 提示 TCS 诱导 JAR 细胞产生 ROS 可能是通过与细胞膜表面受体作用介导的。TCS 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高在 TCS 诱导 JAR 细胞产生 ROS 中所起的作用可能是激活细胞内与 ROS 有关酶的活性^[14], 但不是诱导 ROS 产生的主要原因。TCS 诱导 JAR 细胞产生 ROS 的机制有待继续深入研究。

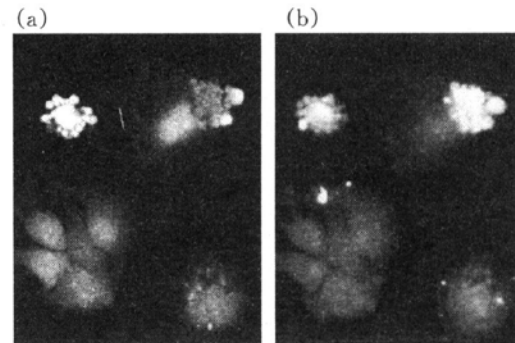


Fig. 3 Intracellular calcium changes (a) and production of ROS (b) in JAR cells

After treating with 50 mg/L TCS for 24 h, JAR cells were double labeled with Indo-1 and DCFH-DA. Image of Indo-1 fluorescence (a) was obtained via two-photon laser scanning microscopy and image of DCF fluorescence (b) was obtained simultaneously via confocal laser scanning microscopy.

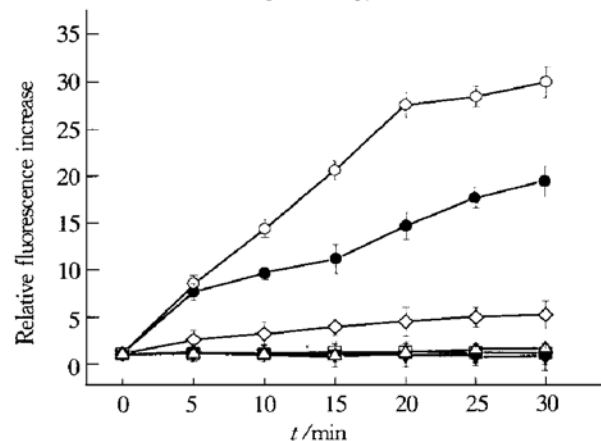


Fig. 4 Mean changes in DCF fluorescence in TCS, A23187 and thapsigargin treated JAR cells

○—○: TCS-treated JAR cells in Ca -containing HBSS; ●—●: TCS and A23187-treated JAR cells in Ca -containing HBSS; ◇—◇: TCS and thapsigargin-treated JAR cells in Ca -free HBSS; △—△: A23187-treated JAR cells in Ca -containing HBSS; □—□: Thapsigargin-treated JAR cells in Ca -free HBSS; ▼—▼: control JAR cells in Ca -containing HBSS. Fluorescence in single cells was expressed as a relative fluorescence increase as compared to the starting fluorescence. The data represents the mean + SEM of at least 80 cells in each condition, where absent error bars were smaller than the symbol.

3 结 论

在单细胞层次同时多参数观察活细胞内的生物

过程对细胞生物学研究具有非常重要的意义。然而, 由于成像技术发展的局限, 这项工作以前较难开展。共聚焦激光扫描显微术和双光子激发激光扫描显微术的发展为生物成像研究带来了方法学上的革命。本文应用双光子及共聚焦激光扫描显微术结合特异性荧光探针 Hoechst 33342、DCFH-DA、Indo 1 和 Fluo 3-AM, 首次同时观察了 TCS 诱导 JAR 细胞凋亡过程中 ROS 和 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化, 实验结果表明 TCS 诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高和 ROS 形成参与了 TCS 诱导的 JAR 细胞凋亡, 并且 ROS 形成和 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有关。共聚焦激光扫描显微术的研究结果表明, $[Ca^{2+}]_i$ 升高不是导致 ROS 形成的主要原因, TCS 诱导的 ROS 形成可能是通过 TCS 与 JAR 细胞膜表面受体作用介导的。我们首次应用双光子及共聚焦激光扫描显微术结合特异性荧光探针, 在单细胞层次同时观察了活细胞内各种生物过程的变化, 建立了一种在单细胞层次适时、无损伤、多参数观察活细胞的方法。

参 考 文 献

- Gustafsson M G L. Extended resolution fluorescence microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 1999, **9** (5): 627~ 634
- White J G, Amos W B, Fordham M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol*, 1987, **105** (1): 41~ 48
- Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1990, **248** (4591): 73~ 76
- Denk W, Piston D W, Webb W W. Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy. In: Pawley J B, ed. *Handbook of Biology Confocal Microscopy*. New York: Plenum Press, 1995. 445
- Tsao S W, Kan K T, Yeung H W. Selective killing of choriocarcinoma cells *in vitro* by trichosanthin, a plant protein purified from root tubers of the Chinese medicinal herb *Trichosanthes kirilowii*. *Toxicol*, 1986, **24** (8): 831~ 840
- Takemoto D J. Effect of trichosanthin an anti-leukemia protein on normal mouse spleen cells. *Anticancer Res*, 1998, **18** (1A): 357~ 361
- Au T K, Collins R A, Lam T L, *et al.* The plant ribosome inactivating luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1. *FEBS Lett*, 2000, **471** (2~ 3): 169~ 172
- Wyllie A H, Morris R G, Smith A L, *et al.* Chromatin cleavage in apoptosis: associated with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*, 1984, **142** (1): 67~ 77
- Cohen J J, Duke R C. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei lead to cell death. *J Immunol*, 1984, **132** (1): 38~ 42
- Suzuki Y J, Forman H J, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biol Med*, 1997, **22** (1~ 2): 269~ 285
- Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, **10** (2): 248~ 253
- Chan W L, Shaw P C, Tam S C, *et al.* Trichosanthin interacts with and enters cells via LDL receptor family members. *Biochem Biophys Res Com*, 2000, **270** (2): 453~ 457
- Zhao J, Ben L H, Wu Y L, *et al.* Anti-HIV agent trichosanthin enhances the capabilities of chemokines to stimulate chemotaxis and G protein activation, and this is mediated through interaction of trichosanthin and chemokine receptor. *J Exp Med*, 1999, **190** (1): 101~ 111
- Goldman R, Moshonov S, Zor U. Generation of reactive oxygen species in a human keratinocyte cell line: role of calcium. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **350** (1): 10~ 18

Studying the Effect of Trichosanthin on Choriocarcinoma Cells with both Two-photon and Confocal Laser Scanning Microscopy*

ZHANG Chun-Yang¹⁾, GONG Yi-Xuan²⁾, MA Hui^{1)**}, AN Cheng-Cai²⁾, CHEN Die-Yan¹⁾

¹⁾ Molecular and Nano Sciences Laboratory, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾ National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Trichosanthin (TCS), a ribosome inactivating protein extracted from the root tuber of a traditional Chinese medicinal herb *Trichosanthes kirilowii*, possesses anti-tumor and anti-human immunodeficiency virus (HIV) activities. With both two-photon laser scanning microscopy and confocal laser scanning microscopy in combination with the fluorescent probe Hoechst 33342, 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), Indo 1 and Fluo 3-AM, TCS-induced changes in nuclear morphology, reactive oxygen species (ROS) and intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) during the apoptosis of choriocarcinoma cells (JAR) were simultaneously observed for the first time. The results indicated that TCS-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ and ROS formation were

involved in apoptosis of JAR cells, and that TCS-induced ROS formation was related to TCS-evoked increase in $[Ca^{2+}]_i$. Further studies with confocal laser scanning microscopy revealed that TCS-evoked increase $[Ca^{2+}]_i$ was not the main factor responsible for TCS-induced ROS formation, and that TCS might induce the production of ROS through its interaction with membrane-bound receptor.

Key words two-photon laser scanning microscopy, confocal laser scanning microscopy, trichosanthin, choriocarcinoma cells, reactive oxygen species, calcium

* This work was supported by grants from Tsinghua University Fund for Basic Research, National Nature Science Foundation of China (19874036) and National Science Fund for Distinguished Young Overseas Scholars (19928408).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62784531-164, E-mail: Mahui@tsinghua.edu.cn

Received: December 7, 2000 Accepted: January 20, 2001

欢迎订阅 欢迎投稿

《应用与环境生物学报》(双月刊)

刊号 ISSN 1006-687X 邮发代号: 62-15
CN 51-1482/Q

本刊是中国科学院主管、中国科学院成都生物研究所主办、科学出版社出版、国内外公开发行的全国性学术科技期刊(学报级),是我国应用生物学和环境生物学的核心刊物。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果,包括研究论文、研究简报和本刊邀约的综述或科学出版基金资助。

《应用与环境生物学报》为双月刊(1999年由季刊改为双月刊),双月25日出版,每期96页,2001年起改为大16开,高档铜板纸印刷。定价仍为每期11.00元,年定价66.00元。全国各地邮局(所)均可订阅。新订户可向本刊编辑部补购1995、1996、1997、1998、1999、2000年各卷(卷价分别为32.00元、44.00元、44.00元、44.00元、66.00元、66.00元和66.00元)。以及1999年增刊(环境微生物学研究),订价每册22.00元。编辑部地址:成都市人民南路4段9号,中国科学院成都生物研究所学报编辑部。邮编:610041 电话:(028) 5229903, 5237341 (联系人:刘东渝)