

活细胞内 5-羟色胺可见荧光的多光子激发成像*

张智红 曾绍群 骆清铭** 刘亚丰 周 炜 陈同生

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074)

摘要 应用多光子激发激光扫描显微镜对 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 孵育的大鼠粘膜型肥大细胞进行自发荧光成像, 首次观察到了活细胞内 5-HT 相关的可见荧光, 并对其产生机理进行了初步探讨. 实现了对活细胞内 5-HT 空间分布的高分辨成像, 为研究活组织或细胞内 5-HT 的空间分布和含量与细胞功能状态的关系提供了新的实验方法.

关键词 多光子激发, 5-HT, RBL-2H3 细胞, 成像, 荧光

学科分类号 Q63

多光子激发激光扫描显微镜 (multi-photon excitation laser scanning microscope, MPELSM) 是一种新型高精度显微成像系统, 多光子激发时荧光分子同时吸收两个或多个光子, 每次吸收会产生等同于被吸收光子能量的分子激发, 经过能量弛豫后发出荧光. 由于使用低能量光子实现了非线性激发, 因而具有光毒性小、空间分辨率高等特点, 能对组织细胞中的自发荧光或荧光探针标记的蛋白质分子、离子进行长时间动态的观察和检测, 为探索细胞内各种分子水平的信号和功能活动提供了最新研究技术^[1].

5-羟色胺 (5-hydroxy tryptamine, 5-HT) 是脑内单胺类神经递质, 在调节机体的生理活动中发挥重要作用. 组织细胞中 5-HT 的分布和含量是反映其生物合成、释放、摄取、失活等过程的生化指标, 也是研究神经元的功能状态或药物对神经组织作用的影响的一项重要检测指标. 因此, 选择一种灵敏度高、重复性好, 快速简便的方法, 对脑组织或神经细胞内 5-HT 的空间分布及其含量进行高分辨成像具有重要的价值. 目前, 对固定组织中单胺分布的成像标准方法有: 用放射性单胺^[2], 免疫组化方法^[3], 或甲醛诱导的单胺荧光^[4]. 然而, 这些方法的问题在于需固定样品, 而不适用于活组织和细胞. 自 1997 年以来, Sheri^[5]和 Vladimir 等^[6]用 305 nm 激光激发, 分别对大鼠腹膜肥大细胞和水蛭 Retzius 神经元内的 5-HT 进行 UV 自发荧光成像. Maiti^[7]和 Williams 等^[8]应用 740 nm 对大鼠粘膜型肥大细胞 (RBL-2H3 细胞) 内 5-HT 进行 3 光子激发 (3-photons excitation, 3PE), 通过探测 5-HT 的 UV 荧光获得了 5-HT 囊泡颗粒的高分辨空

间分布图像, 从而实现了活细胞内 5-HT 的空间分布及囊泡释放的动态监测.

本实验在此基础上, 应用 740 nm 多光子激发 5-HT 孵育的 RBL-2H3 细胞, 发现了与 5-HT 相关的可见荧光, 并对其光谱特性进行了初步探讨. 由于通过探测 5-HT 相关可见荧光来反映细胞内 5-HT 囊泡的空间分布, 这使得高分辨地探测活细胞内 5-HT 分布及其含量所使用的光路更加简单, 且更易实现与其他发射波长的荧光探针联合使用, 从而达到同时检测细胞内多项信号的目的. 本实验为研究 5-HT 在活组织细胞中的空间分布和含量与细胞功能状态的关系提供了新的简便可行的方法.

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 培养液 (GIBCO 公司产品), 加 15% 胎牛血清 (GIBCO 公司产品), 青霉素 100 mg/L, 链霉素 100 mg/L. 5-HT 为 Sigma 试剂. RBL-2H3 细胞由美国 Cornell 大学应用和工程物理学院赠送. 35 mm 盖玻片底的细胞培养皿购自 MatTek 公司. 成像仪器为多光子共聚焦扫描显微镜 (MRC-1024MP, Bio-Rad 公司). 该显微镜配有氩离子激光器 (488 nm 和 514 nm), 可进行普通共聚焦成像. 采用 Ti:sapphire 飞秒激光器产生的红外激光 (波长 690~1050 nm 可调) 进行多光子激发.

* 国家自然科学基金重点项目 (59836240), 国家杰出青年科学基金 (60025514), 国家自然科学基金 (39870205) 和高校博士点专项基金 (98048733) 等资助.

** 通讯联系人.

Tel: 027-87544624, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2001-07-27, 接受日期: 2001-09-28

1.2 细胞培养及准备

用 DMEM 完全培养液, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 RBL-2H3 细胞. 实验前 6~8 h 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 以 2×10^5 /ml 接种细胞于 35 mm 盖玻片底的细胞培养皿内, 用含 200 μ mol/L 5-HT 的 DMEM 完全培养液培养细胞. 设细胞培养液中不含 5-HT 的细胞为对照组. 在多光子激发成像前, 用 HBSS (NaCl, 140 mmol/L; KCl, 5 mmol/L; CaCl₂, 1.3 mmol/L; MgCl₂, 1 mmol/L; 葡萄糖, 10 mmol/L; HEPES, 10 mmol/L; pH 7.2) 溶液洗涤细胞 3 次, 最后加入 2 ml HBSS 溶液入培养皿内准备成像.

1.3 多光子激发成像

应用 80 MHz 锁模, 70~80 fs 脉宽, 740 nm 波长激发 RBL-2H3 细胞内的自发荧光. 使用 60 $\times$ /1.3 NA 油镜 (Nikon, Japan), 室温. 光电倍增管 (photomultiplier, PMT) 1 和 PMT2 分别探测不同波长的发射光.

2 结果与分析

2.1 活细胞内自发荧光物质的多光子激发成像

应用 740 nm 波长进行多光子激发成像, 使用 TS1 和 A2 阻挡滤光片, 内部 PMT2 (522/DF35 发射滤光片) 探测细胞内的自发荧光. 图 1 显示, 未加 5-HT 孵育的细胞内可见许多较弱的荧光颗粒散在地分布于胞浆中, 此荧光颗粒的直径很小, 胞浆中尚有更弱的基础荧光, 胞核无荧光. 个别细胞

内偶见胞浆中有 1~2 个大荧光颗粒 (图 1b 箭头所指处). 图 2 显示, 5-HT 孵育 6 h 后的 RBL-2H3 细胞内可在胞浆中探测到大小不一的强荧光颗粒, 核无荧光, 不同的细胞中此强荧光颗粒的数目不等, 大小不一. 同时, 在胞浆中也可观察到如图 1 所示的弱荧光颗粒. 改换其他光谱段的发射滤光片, 强荧光颗粒的荧光强度明显下降, 故推测此强荧光颗粒的荧光峰值在 520 nm 左右.

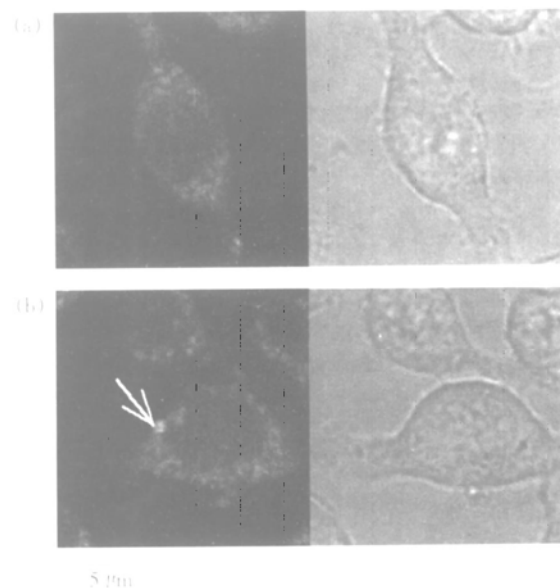


Fig. 1 Multi-photon excitation imaging of autofluorescence in control RBL-2H3 cells

(a) and (b) are the autofluorescence images of individual cells at two different places at the same experiment condition. Left are the cellular fluorescence images and right are cellular transmission images.

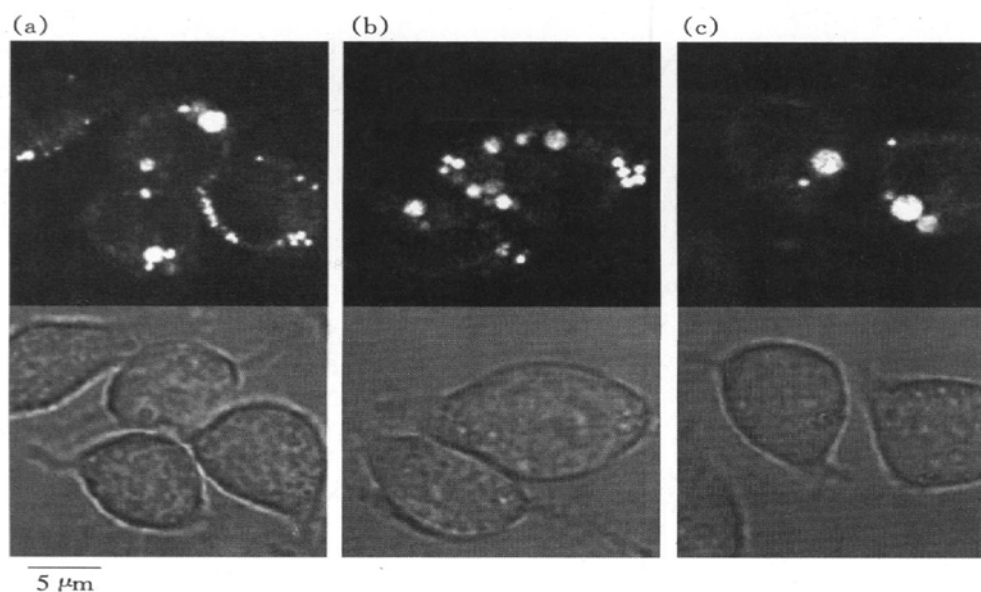


Fig. 2 Multi-photon excitation imaging of autofluorescence in 5-HT loaded RBL-2H3 cells

(a), (b) and (c) are the autofluorescence images of individual cells at three different places at the same experiment condition. Up are the cellular fluorescence images and down are cellular transmission images.

2.2 两种类型荧光颗粒的分布及光谱特性的比较

对 5-HT 孵育 6 h 后的 RBL-2H3 细胞进行多光子激发成像, 使用 TS1, VHS 滤光片, 内部 PMT1 (460LP 发射滤光片) 和 PMT2 (455/30 发射滤光片) 分别探测细胞内不同光谱范围的自发荧光. 结果见图 3, 在 PMT1 中可探测到细胞内的强荧光颗粒, 而在 PMT2 与强荧光颗粒相对应的位置无荧

光, 证明这些强荧光颗粒的发射波长不在 455 nm 附近, 改变 PMT1 的发射滤光片为 580DF32 或 DR585LP 时, 强荧光颗粒的荧光值明显降低. 从而进一步确定此强荧光颗粒的荧光峰值在 520 nm 左右. 弱荧光颗粒的发射荧光光谱范围较宽, 从 440~540 nm 均可探测到.

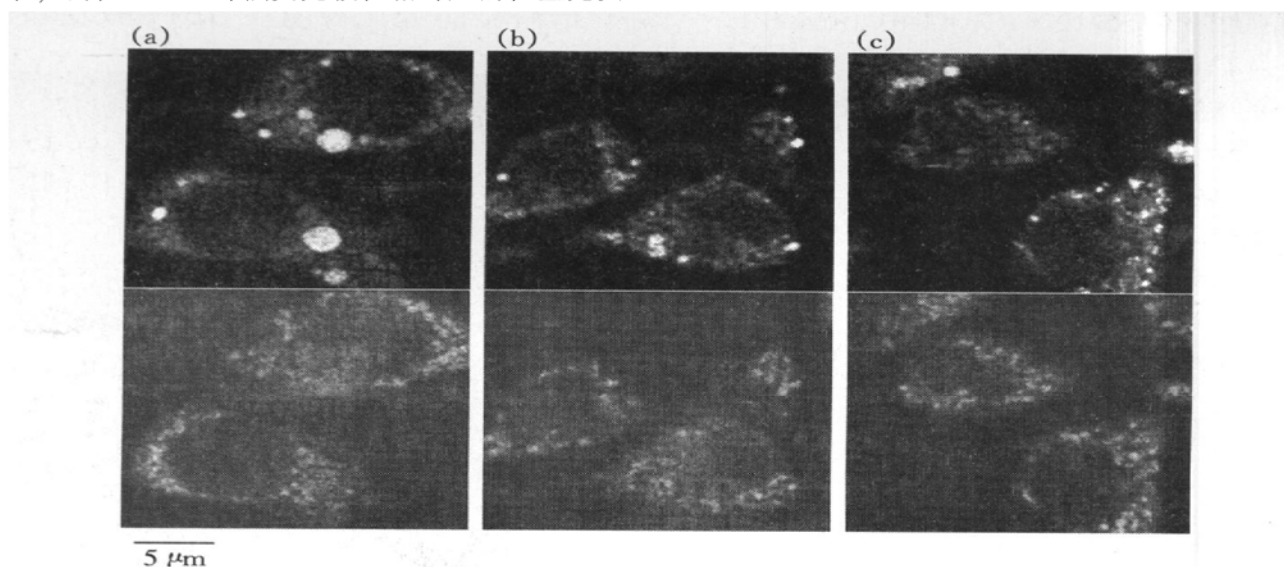


Fig. 3 The distribution and spectra properties of two kinds of fluorescent granules in 5-HT loaded RBL-2H3 cells

(a), (b) and (c) are the autofluorescence images of individual cells at three different places at the same experiment condition. Up are detected by PMT1 (460LP) and down are detected by PMT2 (455/32).

2.3 荧光颗粒的光子吸收特性

荧光强度与激发光功率对数的斜率 (n) 反映了荧光物质在被激发时吸收的光子数, 即应用 740 nm 近红外光激发自发荧光物质, 对该物质实现了多 (n) 光子激发成像. 结果显示, 这些分散的强荧光颗粒均是同时吸收了 3 个光子 (表 1),

而弱荧光颗粒是同时吸收了 2 个光子 (表 2). 结果表明, 荧光物质同时吸收的光子数与荧光强度无关, 但与荧光物质的种类有关.

Table 1 The relation of the excitation power and fluorescent intensity of the strong fluorescent granules in RBL-2H3 cells

The strong fluorescent granules	The fluorescent intensity excited with various average excitation power/ a. u. ¹⁾			Slope ³⁾ (n)
	22.0 mW	19.0 mW	15.2 mW	
1	208.66 ²⁾	126.34	63.02	3.2 ± 0.01
2	203.9	112.9	70.6	2.8 ± 0.03
3	209.5	118.0	64.1	3.2 ± 0.02
4	101.98	68.94	30.52	3.3 ± 0.02
5	122.18	68.02	37.86	3.1 ± 0.02

¹⁾The fluorescent intensity is an arbitrariness unit (a. u.); ²⁾ detected fluorescent intensity; background fluorescent intensity; ³⁾ slope ± standard deviation.

Table 2 The relation of the excitation power and fluorescent intensity of the faintish fluorescent granules in RBL-2H3 cells

The faintish fluorescent granules	The fluorescent intensity excited with various average excitation power/ a. u. ¹⁾			Slope ³⁾ (n)
	22.0 mW	19.0 mW	15.2 mW	
1	43.1 ²⁾	28.03	20.57	2.0 ± 0.02
2	28.2	26.1	14.48	1.9 ± 0.03
3	19.86	12.66	9.41	2.0 ± 0.03
4	20.01	16.57	10.18	1.9 ± 0.01
5	47.78	35.67	23.66	1.9 ± 0.01

¹⁾The fluorescent intensity is an arbitrariness unit (a. u.); ²⁾ detected fluorescent intensity; background fluorescent intensity; ³⁾ slope ± standard deviation.

3 讨 论

通常细胞内的自发荧光物质主要来源于还原型

嘧啶核苷 (NAD(P)H) 和氧化型黄素 (FAD). NAD(P)H 的激发峰值为 350 nm, 发射峰值为 450 nm. FAD 的激发峰值为 450 nm, 发射峰值为 530 nm. 此两种自发荧光物质均主要存在于线粒体中, 也少量存在于胞浆中. 根据 FAD 的单光子吸收谱可推测, 在 740 nm 激发下无法实现对 FAD 的多光子激发, 故图 1 中未加 5-HT 孵育的 RBL-2H3 细胞内呈现的弱荧光颗粒主要来源于 NAD(P)H. 活细胞内 NAD(P)H 的光谱范围较宽, 约 430~550 nm, 故在图 3 中 PMT1 和 PMT2 均可探测到. 表 2 结果显示弱荧光颗粒是同时吸收了 2 个光子后被激发的, 从而进一步从光谱特性上证明此自发荧光物质来源于 NAD(P)H^[9].

5-HT 在 215~300 nm 范围内有数个吸收峰, 这些峰值相应于从基态跃迁到 S_2 (1B_u , 1B_g) 和 S_1 (1L_a , 1L_b) 多重态 (manifolds)^[10]. 激发到 S_2 引起吲哚胺产生高量子产额的光致电离; 若光致电离不发生, S_2 经内部转换迅速弛豫到 S_1 . 在室温下水溶液中, 从 S_1 辐射式弛豫的 5-HT 产生特征性的 UV 荧光, $\lambda_{max} \approx 340$ nm (pH 范围约为 2~10). RBL-2H3 细胞通过其表面的 5-HT 转运体摄取 5-HT, 并贮存于囊泡颗粒中. 因而, 通过对 5-HT 自发荧光的监测, 可反映细胞 5-HT 转运能力及细胞脱颗粒状态^[7]. 在我们的多光子激发显微成像系统中, 用 740 nm 波长激发, 未获得 RBL-2H3 细胞内 5-HT 的 UV 荧光, 而是观察到了与 5-HT 密切相关的可见荧光. 正常情况下, 用 < 300 nm 的紫外光激发 5-HT 可产生 UV 荧光. 5-HT 在高酸性 (pH < 1.5) 溶液中能激发出宽带绿发射光 ($\lambda \approx 450$ nm), Chen^[11] 将此效应归因于激发态的质子转移. 而众多的资料表明, 肥大细胞内囊泡颗粒的 pH 值为 5.55 ± 0.06 ^[12], 故本实验中观察到的 5-HT 相关可见荧光不可能是由于高酸性环境引起的. 另外, 吲哚溶液的可见荧光也可由光化学反应产生, 吲哚光降解作用产物表现出激发光谱红移和发射最大值在 350~450 nm 范围. 另外, 在神经退行性疾病如老年痴呆和精神疾病如精神分裂症中, 可见吲哚胺异常的氧化产物, 5-HT 许多最初的氧化产物迅速二聚化导致吸收光谱范围为 320~360 nm, 荧光峰值为 420 nm 的自发荧光产物产生. 随后发生三聚化形成吸收峰值为 440 nm, 发射峰值为 520 nm 的自发荧光产物. 由此可见, 与 5-HT 相关的可见荧光有较多的生成途径.

为了初步探讨本实验中 740 nm 多光子激发下

5-HT 相关可见荧光的产生机理, 我们探测了 5-HT 相关可见荧光的光谱范围, 并计算了荧光强度与激发功率之间的对数斜率. 结果证明, 此 5-HT 相关荧光不是由 5-HT 的异常氧化产物二聚化或三聚化产生的, 因为, 若用 740 nm 激发 5-HT 的异常氧化产物, 将是双光子激发, 而我们实际测得的是 3 光子激发. 同理, 此 5-HT 相关荧光也非光化学反应产物. 同时, 图 3 显示内部 PMT2 (450/30 发射滤光片) 探测不到 5-HT 相关荧光, 从而进一步证明了此强荧光颗粒的来源并非上述两种情况. 本实验中观察到的 5-HT 相关可见荧光, 可能是由于多 (3) 光子激发 5-HT 后, 5-HT 的 UV 荧光发生光漂白而导致的可见荧光产生. 荧光的产生是能量依赖性的, 在本显微成像系统中的平均激发功率为 15~22 mW, 激发能量较大, 从而导致可见荧光的产生. 另外, 在实验中我们改变激发波长到 780 nm, 5-HT 相关荧光的强度与 740 nm 相近, 而改变激发波长到 820 nm 时, 5-HT 相关荧光明显减弱. 进一步证明, 我们所观察到的 5-HT 相关可见荧光与 5-HT 的光化学反应或异常氧化产物的聚合无关. 只有应用适当的激发波长实现多光子激发, 才能产生特异性的 5-HT 相关可见荧光. 多光子激发活细胞内 5-HT 相关可见荧光的确切机理尚有待进一步研究, 但此方法已可用于对活组织细胞内 5-HT 的空间分布进行高分辨成像. 另外, 通过对一系列浓度的 5-HT 溶液进行同等条件下的荧光强度测定, 并作浓度标准曲线, 则可实现对细胞内 5-HT 含量的测定^[7, 8].

本实验方法用于研究活细胞中 5-HT 的空间分布和含量具有以下几个特点: a. 对活细胞内 5-HT 相关可见荧光的多光子激发成像, 不仅反映了细胞内 5-HT 的空间分布, 通过对其荧光强度的测定也可精确地反映活细胞内特定区域的 5-HT 含量; b. 多光子激发较 UV 光激发, 具有对活细胞的光毒性小, 成像的空间分辨率高等特点. 由于使用的是近红外光, 其对组织的穿透能力强, 因而适用于对活组织切片 (如脑切片) 内 5-HT 空间分布及含量的高分辨、实时在体观察. c. 探测 5-HT UV 荧光的光路较复杂, 需用特殊的石英物镜和光反射镜片, 否则 UV 荧光极易被吸收而探测不到. 本实验所探测的 5-HT 相关可见荧光, 应用常规探测 FITC 的光路即可; d. 通过探测 5-HT 相关可见荧光, 更易实现与其他发射波长的荧光探针联合使用, 从而达到同时检测细胞内多项信号的目的.

参 考 文 献

- 1 Xu C, Zipfel W, Shear J, *et al.* Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (20): 10763~10768
- 2 Falck, B, Hillarp N A, Thieme C, *et al.* Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem*, 1962, **10** (2): 348~ 354
- 3 Dave V, Kimelberg H K. Na⁺-dependent, fluoxetine-sensitive serotonin uptake by astrocytes tissue-printed from rat cerebral cortex. *J Neurosci*, 1994, **14** (8): 4972~ 4986
- 4 Wassle H, Chun M H. Dopaminergic and indoleamine-accumulating amacrine cells express GABA-like immunoreactivity in the cat retina. *J Neurosci*, 1988, **8** (9): 3383~ 3394
- 5 Sheri J L, Edward S Y. Temporal and spatial monitoring of exocytosis with native fluorescence imaging microscopy. *Journal of Neuroscience Methods*, 1997, **75** (1): 103~ 109
- 6 Vladimir P, Wei T, Edward S Y, *et al.* Laser-induced native fluorescence (LINF) imaging of serotonin depletion in depolarized neurons. *J Neurosci Meth*, 1998, **82** (2): 151~ 158
- 7 Maiti S, Shear J B, Williams R M, *et al.* Measuring serotonin distribution in live cells with three-photon excitation. *Science*, 1997, **275** (5299): 530~ 532
- 8 Williams R M, Shear J B, Zipfel W R, *et al.* Mucosal mast cell secretion processes imaged using three-photon microscopy of 5-hydroxytryptamine autofluorescence. *Biophys J*, 1999, **76** (4): 1835~ 1846
- 9 George H P, Susan M K, Per A, *et al.* Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD (P) H responses in pancreatic islet β cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (10): 5203~ 5207
- 10 Dishi T, Tanaka M, Tanaka J. Electronic absorption and fluorescence spectra of 5-hydroxytryptamine (serotonin). Protonation in the excited state. *Bull Chem Soc Jpn*, 1977, **50** (3): 1267~ 1271
- 11 Chen R F. Fluorescence of protonated excited-state forms of 5-hydroxytryptamine (serotonin) and related indoles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, **60** (2): 598~ 605
- 12 Young M B, Nemeth E F, Scarpa A. Measurement of the internal pH of mast cell granules using microvolumetric fluorescence and isotopic techniques. *Arch Biochem Biophys*, 1987, **254** (1): 222 ~ 233

Multi-photon Excitation Imaging of 5-HT Visible Fluorescence in Live Cells*

ZHANG Zhi-Hong, ZENG Shao-Qun, LUO Qing-Ming**, LIU Ya-Feng, ZHOU Wei, CHEN Tong-Sheng
(The Key Laboratory of Biomedical Photonics, Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract The autofluorescence of 5-Hydroxytryptamine (5-HT) loaded rat mucosal mast cells (RBL-2H3 cells) was imaged with multi-photon excitation laser scanning microscope (MPELSM). Multi-photon excited 5-HT relative visible fluorescence is observed in live cells for the first time, and the generating mechanism of 5-HT relative visible fluorescence is preliminarily studied. The spatial distribution of 5-HT in live cells was imaged at high spatial resolution in this present, which provides a new way to study the correlation between 5-HT spatial distribution and content, and the cellular functional state in live tissue or cells.

Key words multi-photon excitation, 5-HT, RBL-2H3 cells, imaging, fluorescence

* This work was supported by grants from Key Program of National Natural Science Foundation of China (59836240), the Youth Fund of National Science Foundation of China (60025514), the National Natural Sciences Foundation of China (39870205) and Ph. D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (98048733).

** Corresponding author. Tel: 86-27-87544624, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

Received: July 27, 2001 Accepted: September 28, 2001