DOI:10.16016/j.1000-5404.201507138

活性氧与细胞核共染影响因素的实验研究

罗 莉[1],侯凤艳[1,2],严 军[1],梁华平[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[1];325035 浙江 温州,温州医科大学附属第一医院急诊科[2])

[摘要] **目的** 利用二氯荧光黄二乙酸酯(2′,7′-Dichlorodihydrofluorescein diacetate,DCFH-DA)探针和4′,6′-二脒基-2-苯基吲哚(4′,6′-diamidino-2-phenylindole,DAPI)探讨影响活性氧(reactive oxidative species,ROS)和细胞核共染的因素,以优化最佳的研究方案。**方法** 以RAW 264.7细胞株为研究对象,首先采用不同浓度的多聚甲醛分别固定10、30 min,1、2、4 h,进行ROS和DAPI检测;再用不同的固定试剂分别在ROS检测前和后固定,检测ROS荧光强弱;将DAPI在DCFH-DA探针加入前12、4、2、1 h,20 min加入和两者同时加入,检测DAPI染色情况;最后,DAPI在ROS检测前12 h加入,以不加DAPI组为对照,分别用LPS和H_2O_2刺激产生ROS并检测,计算其荧光数和平均荧光强度,利用SPSS 18.0软件进行t检验分析。**结果** 不同固定浓度、固定试剂、固定顺序的结果均表明,固定虽然会增强DAPI的染色,但同时会减弱ROS的荧光强度;活细胞DAPI染色时,随着染色时间的延长,核着色强度和均匀度都更好;DAPI染色12 h后检测ROS,对ROS的荧光数和平均荧光强度都没有统计学影响($P>0.05$)。**结论** DCFH-DA探针法检测ROS荧光时不能与细胞固定连用;DAPI在DCFH-DA探针孵育前12 h加入,并不影响ROS荧光的产生和检测,该研究方案可有效实现ROS与DAPI的共染。

[关键词] 活性氧;细胞核;共染;影响因素
[中图法分类号] R329-33;R329.24 [文献标志码] A

Influential factors for co-staining of reactive oxidative species and cell nucleus *in vitro*

Luo Li[1], Hou Fengyan[1,2], Yan Jun[1], Liang Huaping[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Emergency, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang Province, 325035, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the influential factors of reactive oxidative species (ROS) and cell nucleus co-staining with 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and 4′,6′-diamidino-2-phenylindole (DAPI). **Methods** RAW264.7 cells were fixed with paraformaldehyde (0%, 0.5%, 1%, 2% and 4%) for 10 and 30 min, and 1, 2 and 4 h. Then the ROS and DAPI were detected and the fluorescent signals were analyzed by ImageXpress XLS. Meanwhile, another fixing reagent, ethanol, was adopted to do the similar experiment, and ROS was detected before or after the cells were fixed for 20 min. Thereafter, DAPI staining was performed at 12, 4 and 1 h, 20 and 0 min before DCFH-DA incubation, and the fluorescent signals were detected *via* the same technology. In addition, LPS and H_2O_2 were used to induce ROS, and DAPI was stained in advance. Twelve h later, the number of fluorescent cells and the average fluorescence intensity of ROS were detected. All data was analyzed by t-test via SPSS18.0 software. **Results** No matter which factors of cell fixation (fixing concentrations, fixing reagents and fixing sequences) were adopted, the fluorescent intensity of ROS was decreased while the fluorescent signals of DAPI was

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81471863)
[通信作者] 严 军,电话:(023)68757413,E-mail:13883092250@163.com
梁华平,电话:(023)68757411,E-mail:13638356728@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1340.017.html(2015-12-04)

increased. Along with the dying time, the strength and uniformity of DAPI staining became better without fixation. ROS was detected after DAPI staining for 12 h, and there was no significant influence on the number of fluorescent cells and average fluorescence intensity of ROS ($P>0.05$). **Conclusion** It is not suggested to carry out DCFH-DA incubation and cell fixation simultaneously to detect the fluorescence of ROS. However, the measuring effect of fluorescence intensity will not be impacted significantly if DAPI staining is accomplished at 12 h before DCFH-DA incubation. Thus, this proposal may obtain the optimal effect of ROS and DAPI co-staining.

[**Key words**] reactive oxidative species; cell nucleus; co-staining; influential factors

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471863). Corresponding author: Yan Jun, E-mail: 13883092205@163.com; Liang Huaping, E-mail:13638356728@163.com

随着活性氧(reactive oxidative species,ROS)作为第二信使以及它在各种疾病中的广泛研究[1-2],其测定方法得到了极大的发展,其中二氯荧光黄二乙酸酯(2′,7′-Dichlorodihydrofluorescein diacetate,DCFH-DA)(绿色荧光)探针法是最常用、最快捷、最直观的方法之一。另一方面,4′,6′-二脒基-2-苯基吲哚(4′,6′-diamidino-2-phenylindole,DAPI)(蓝色荧光)作为一种常用的细胞核染料,可透过完整的细胞膜,常用于活细胞和固定细胞的染色,固定后效果更好。为了直观反映不同条件下 ROS 的变化情况,常规研究需要拍摄绿色荧光照片,同时为了排除非特异的荧光信号和分析数据,还需要拍摄白光或核染色以确定细胞的位置、大小和形态等[3],但白光和绿光在合并时会遇到以下问题:白光太亮或绿光太弱,合并后荧光信号弱;白光太暗,图片不美观;另外利用白光图片定位细胞并不准确(可能有细胞重叠、融合等),也不利于高内涵成像分析系统的分析。由于实现 ROS 与核的共染能够解决上述问题,而探讨影响 ROS 与 DAPI 共染的因素(包括固定试剂的种类、浓度、作用时间、顺序以及活染条件等)对于研究结果的科学性又具有重要作用,因此我们以 DCFH-DA 探针法和 DAPI 染色为研究手段,对共染过程中出现的问题进行影响因素分析,以便指导和优化现有方法,为后续研究提供理论支持和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RAW264.7 细胞株来自第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室;DCFH-DA 探针、DAPI 染料、DMSO 购自美国 Sigma 公司;0.25% 胰蛋白酶、RPMI1640 培养基和胎牛血清购自美国 HyClone 公司;H_2O_2、多聚甲醛和乙醇由成都市科龙化工试剂厂提供。

1.2 多聚甲醛对共染荧光信号的影响

取 RAW264.7 细胞,弃 RPMI1640 培养基;用无菌 PBS 洗涤 1 次,加 0.25% 胰酶 37 ℃消化 3 ~ 5 min;用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基终止消化,计数;铺板,48 孔板,5×10^4 个细胞/孔,37 ℃,5% CO_2 培养 4 h;10 μg/mL LPS 刺激 12 h,37 ℃,5% CO_2 培养过夜;PBS 洗 1 次,用 0%、0.5%、1%、2%、4% 多聚甲醛固定 10、30 min,1、2、4 h;PBS 洗涤,加入 DCFH-DA 探针(终浓度 20 μmol/L)和 DAPI(终浓度 1 μg/mL)染料孵育 20 min;PBS 洗涤 2 次。高内涵成像分析系统(ImageXpress XLS, Molecular Devices)观察和拍照。

1.3 不同固定方式及其顺序对 ROS 荧光信号的影响

取 RAW264.7 细胞,按 1.2 方法常规细胞铺板,37 ℃,5% CO_2 培养 4 h;10 μg/mL LPS 刺激 12 h,37 ℃,5% CO_2 培养;次日,1 组细胞先用 4% 多聚甲醛、95% 乙醇、70% 乙醇固定 20 min,PBS 洗涤后加入 DCFH-DA 探针和 DAPI 染料孵育 20 min;另 1 组先加 DCFH-DA 探针孵育 20 min,再用 4% 多聚甲醛、95% 乙醇、70% 乙醇固定 20 min,再加 DAPI 染料孵育 20 min;PBS 洗涤 2 次。倒置荧光显微镜(IX71,OLYMPUS)观察和拍照。

1.4 DAPI 染色时间对核染色荧光信号的影响

细胞培养和铺板方法同 1.2。LPS(10 μg/mL)刺激 12 h,将细胞分为 6 组,按 DAPI(1 μg/mL)和 DCFH-DA(20 μmol/L)顺序依次加样作用,表 1 为各试剂加样后的间隔时间。DAPI 和 DCFH-DA 探针孵育后,PBS 洗涤 2 次,倒置荧光显微镜观察和拍照。

表 1 DAPI 作用不同时间影响细胞核染色荧光信号的实验分组

组别	DAPI	DCFH-DA
1	12 h	20 min
2	4 h	20 min
3	2 h	20 min
4	1 h	20 min
5	20 min	20 min
6	0 min	20 min

1.5 DAPI 长时间作用对 ROS 测定的影响

细胞培养和铺板方法同 1.2。根据 1.4 的实验结果,选择最合适的 DAPI 染色时间(12 h),分别用 LPS(10 μg/mL)进行长效(12 h)刺激或用 H_2O_2(100 μmol/L)进行短效(5 min)刺激;以不加 DAPI 为对照组,最后加 DCFH-DA 探针孵育 20 min,实验分组设计见表 2。PBS 洗涤 2 次,高内涵成像分析系统进行拍照和数据分析。

表 2 最佳 DAPI 作用时间影响不同刺激方式产生 ROS 的实验分组

组别	LPS	H_2O_2	DAPI
1	+	−	−
2	+	−	+
3	−	+	−
4	−	+	+

1.6 统计学分析

1.5 实验中每组各设 3 个重复孔,每孔拍摄 9 个视野,计算荧光数和荧光强度,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS 18.0 统计学软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 多聚甲醛负向影响共染效果并呈明显的量效和时效依赖性

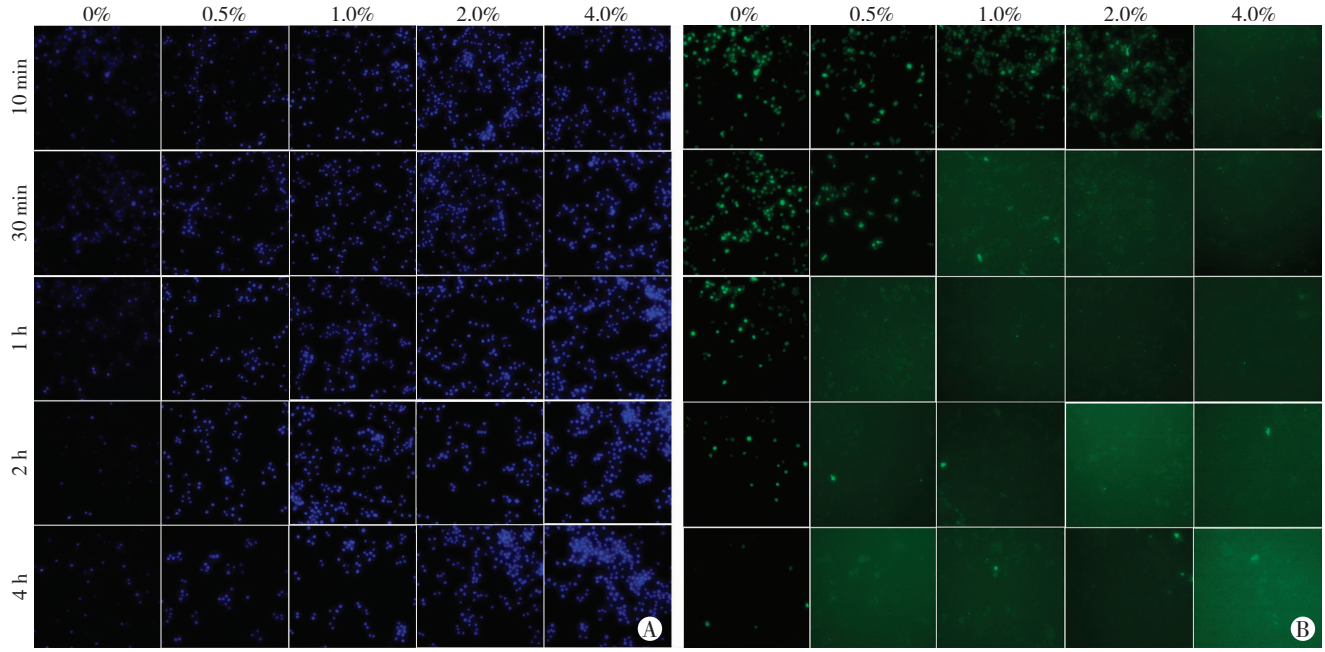
采用不同浓度(0%、0.5%、1%、2%、4%)多聚甲醛固定不同时间(10、30 min,1、2、4 h)后,高内涵成像分析系统荧光检测结果表明,随着多聚甲醛固定时间的延长和固定浓度的增加,DAPI 染色越来越强,但 ROS 荧光信号越来越弱,甚至消失,两者共染效果极差,同时说明 ROS 荧光的减弱是由于多聚甲醛固定造成的,而非拍照时间过长自然衰减造成的(因为全部图片的采集仅用 5 min),如图 1。

2.2 荧光信号的减弱和消失只与细胞固定本身有关

采用 3 种固定液(4% 多聚甲醛、95% 冰乙醇、70% 冰乙醇)和两种固定顺序(固定在 DCFH-DA 探针孵育之前和之后)作用细胞后,进行 ROS 荧光检测。图 2 结果表明,无论采用哪种固定方式和固定顺序,只要细胞固定后 ROS 荧光信号都会减弱甚至消失。

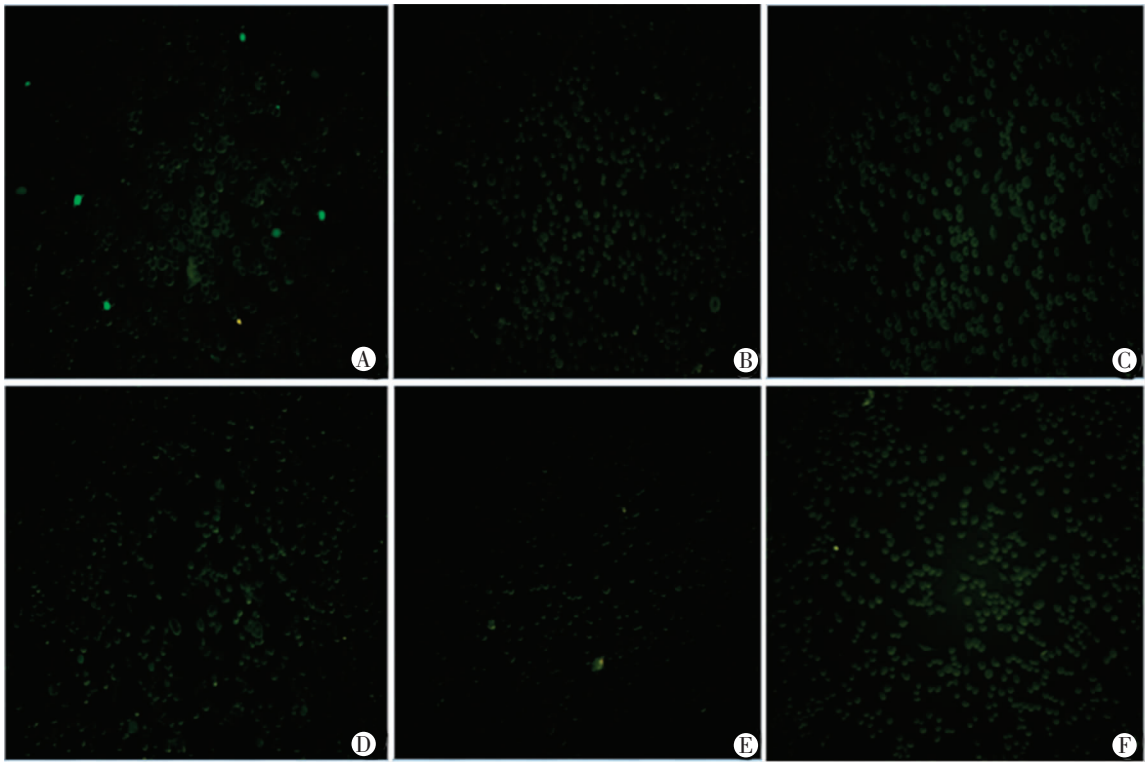
2.3 DAPI 染色时间正向影响核染色荧光信号

DAPI 染料在 DCFH-DA 探针孵育前 12、4、2、1 h,20 min 以及同时加入后,进行 DAPI 荧光检测。图 3 结果表明,DAPI 染色时间越短,染色弱且弥散,而随着 DAPI 染色时间的延长,核染色信号越强且集中。



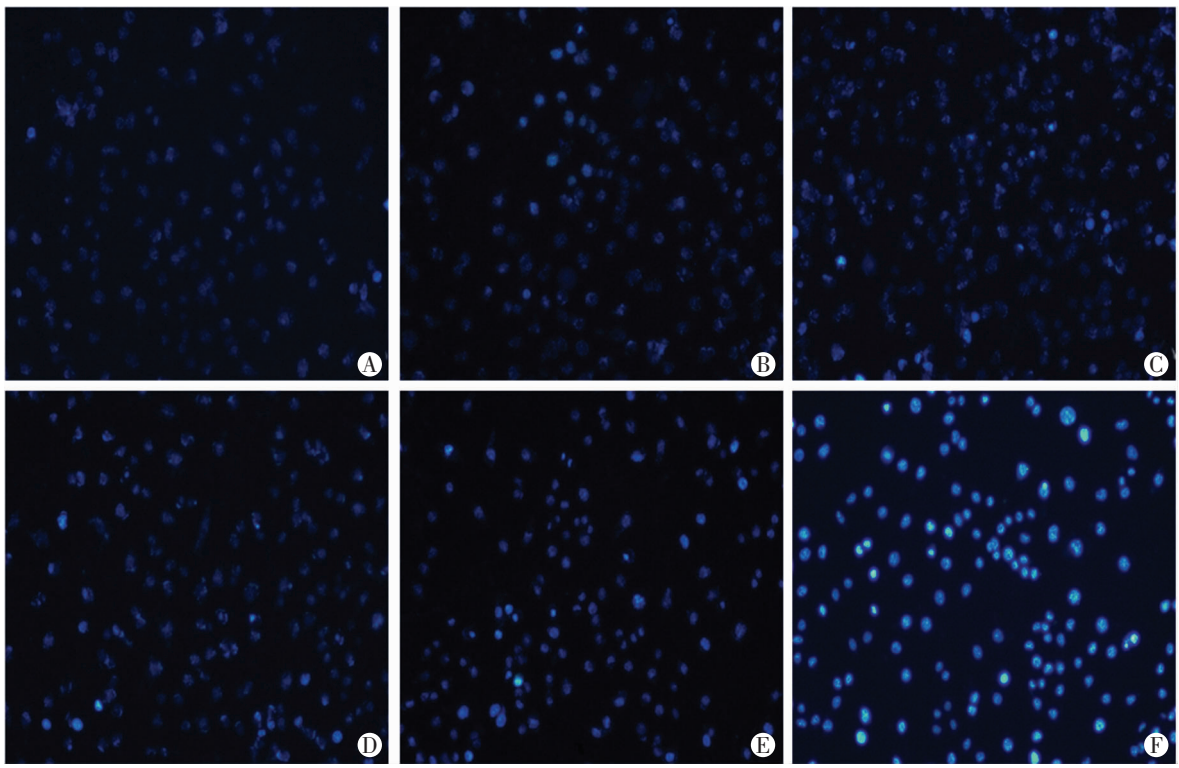
A:不同浓度多聚甲醛固定后 DAPI 染色结果;B:不同浓度多聚甲醛固定后 ROS 检测结果

图 1 多聚甲醛影响 DAPI 和 ROS 荧光信号的量效和时效作用 (×200)



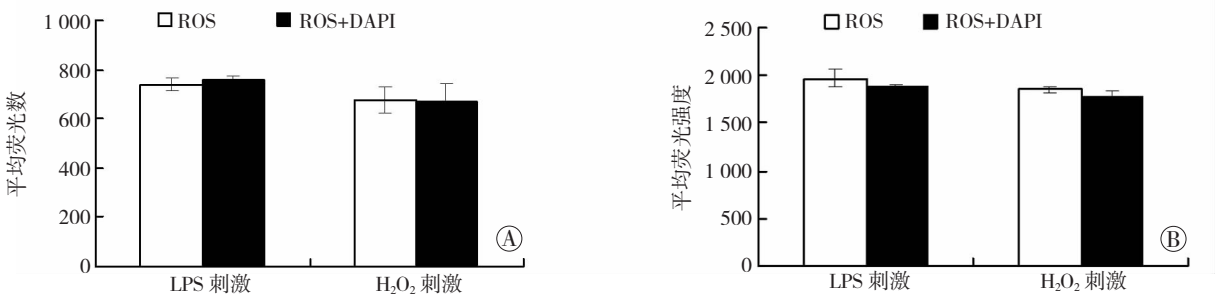
A:不同浓度4%多聚甲醛固定后加探针检测ROS;B:不同浓度95%冰乙醇固定后加探针检测ROS;C:70%冰乙醇固定后加探针检测ROS;D:加探针后4%多聚甲醛固定再检测ROS;E:加探针后95%冰乙醇固定再检测ROS;F:加探针后70%冰乙醇固定再检测ROS

图2 不同固定方式和顺序与ROS荧光信号的变化 (×200)



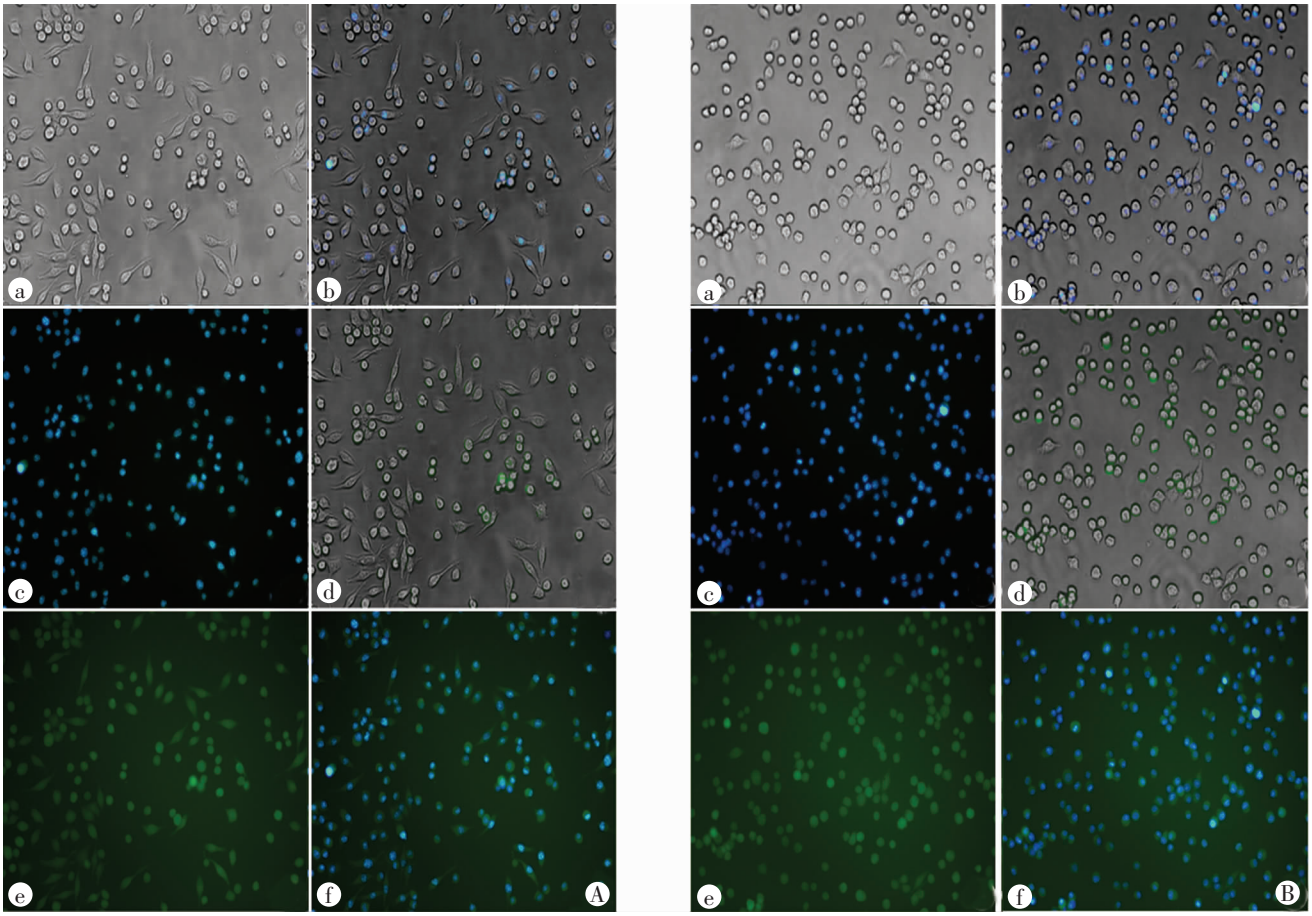
A:DAPI和探针同时加入染色20 min;B:DAPI在探针加入前染色20 min;C:DAPI在探针加入前染色1 h;D:DAPI在探针加入前染色2 h;E:DAPI在探针加入前染色4 h;F:DAPI在探针加入前染色12 h

图3 DAPI染色时间与核染色荧光信号变化 (×200)



A:荧光数;B:荧光强度

图 4 DAPI 对不同方式产生 ROS 荧光信号的影响



A: LPS 刺激下,DAPI 与 ROS 染色结果;B:H_2O_2 刺激下,DAPI 与 ROS 染色结果;a:白光观察;b: DAPI 染色结果; c: ROS 染色结果;d:白光和 DAPI 融合; e:白光和 ROS 融合; f: DAPI 和 ROS 融合

图 5 不同方式产生的 ROS 与 DAPI 的共染效果 (×200)

2.4 DAPI 染色 12 h 对 ROS 测定结果无影响

分别采用两种刺激方式(LPS 长时间刺激和 H_2O_2 短时间刺激)产生 ROS,同时进行加/不加 DAPI 染色 12 h,再孵育 DCFH-DA 探针 20 min,PBS 洗涤后使用高内涵成像分析系统荧光检测。每个实验组 3 个重复孔,每孔 9 个视野。结果表明,DAPI 染色 12 h 对两种刺激方式产生的 ROS 的平均荧光数和平均荧光强度均无统计学差异($P>0.05$),即 DAPI 染色 12h 不影响 ROS 的产生和荧光信号的检测(图 4)。

采用 DAPI 活细胞染色 12 h 后进行 ROS 检测,图 5结果显示,既能检测到 ROS 的荧光信号,同时细胞核也着色明显,该条件很好实现了二者的共染。

3 讨论

ROS 的检测对于及时了解正常或疾病条件下的机体生理/病理反应、预防疾病发生具有重要意义[4-12]。目前常用于 ROS 测定的荧光探针包括 DCFH-DA、双氢罗丹明、氢化乙啡啶等,而 DCFH-DA

探针法因其简单、方便被广泛使用[13],其原理包括酯酶的水解和活性氧的氧化两个过程[14]。

按惯性思维在ROS检测时采用固定后DAPI染色(不同固定试剂、浓度、顺序),虽然可以染核,但ROS荧光信号减弱甚至消失,这个现象在A549和HeLa等细胞中也被观察到,分析其原因可能有:ROS检测主要针对细胞膜没有损坏的活细胞,而一经固定,细胞膜的通透性可能发生改变或者固定后导致细胞死亡,从而使活性氧消亡;因此,DCFH-DA探针法不宜与细胞固定一起使用。在不固定细胞的前提下,直接DAPI进行活染,则发现活细胞短时间染核存在荧光信号弱,弥散,漏染等问题,影响图片合并效果和定量分析,因此建议DAPI在染活细胞时,延长染色时间至4~12 h(相对固定细胞的10 min短染),且在探针孵育前染色,因为ROS的产生和消亡是一个比较快速的过程(20~30 min)。

由于本研究使用的高内涵成像系统是一款集速度、图像、数据为一体的荧光系统,耗时短(一般每孔扫描时间在几秒到几十秒之间),特别适合荧光反应迅速的样品检测,例如本研究完成全部孔荧光检测仅用5 min,有效避免常规研究中将"固定导致的荧光衰减"误判为是"拍照后期荧光的自然衰减",另外可以对荧光信号进行定量分析,从而保证数据的可信度和结论的可靠性。

综上所述,DCFH-DA探针法检测ROS荧光时不能与细胞固定连用,这可能使它在免疫组化和免疫荧光中的应用受到一定限制;但是,DAPI在DCFH-DA探针孵育前12 h加入,并不影响ROS荧光的产生和检测,同时又能将细胞核染色,实现ROS与DAPI在活细胞水平的共染,有助于准确研究ROS在创伤、炎症和疾病组织及细胞中的表达和定位。

参考文献:

[1] Holmstrom K M, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(6): 411-421. DOI:10.1038/nrm3801

[2] Phaniendra A, Jestadi D B, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases [J]. Indian J Clin Biochem, 2015, 30(1): 11-26. DOI:10.1007/s12291-014-0446-0

[3] Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury[J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2010, 24(4): 495-509.

[4] 梁馨予, 张婷, 周永, 等. 杨梅素减轻高糖诱导的血管内皮细胞氧化应激损伤[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(21): 2301-2305.

[5] Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies K J, *et al*. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(1): 1-6.

[6] Dikalov S I, Harrison D G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(2): 372-382. DOI:10.1089/ars.2012.4886

[7] Mo C, Wang L, Zhang J, *et al*. The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(4): 574-588. DOI:10.1089/ars.2012.5116

[8] 王真真, 刘地川, 蔡敏, 等. 别嘌呤醇对慢性心衰大鼠心功能的改善作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(10): 1021-1025.

[9] Yadav U C, Kalariya N M, Srivastava S K, *et al*. Protective role of benfotiamine, a fat-soluble vitamin B1 analogue, in lipopolysaccharide-induced cytotoxic signals in murine macrophages[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(10): 1423-1434.

[10] Halliwell B. The wanderings of a free radical[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(5): 531-542.

[11] Barnham K J, Masters C L, Bush A I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress[J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3(3): 205-214.

[12] Maiese K. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 875961.

[13] Roy K, Wu Y, Meitzler J L, *et al*. NADPH oxidases and cancer [J]. Clin Sci (Lond), 2015, 128(12): 863-875. DOI:10.1042/CS20140542

[14] Huang S K, Zhang Q, Qiu Z, *et al*. Mechanistic impact of outdoor air pollution on asthma and allergic diseases[J]. J Thorac Dis, 2015, 7(1): 23-33. DOI:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.12.13

(**收稿**:2015-07-23;**修回**:2015-10-16)

(编辑 王 红)