DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.009

应用共聚焦激光扫描显微镜对体外培养人脐静脉内皮细胞的研究*

姚忠祥** 蔡文琴 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 研究内皮细胞内 Ca^{2+}。方法: 应用共聚焦激光扫描显微镜术(CLSM)研究体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)胞浆内游离 Ca^{2+} 变化。结果: 5μmol/L Fluo-3/AM 恒温(37℃)孵育体外培养 HUVEC60 min即可达到最佳负载效果,孵育时间的再延长只能增加背景染色,随着观察时间的延长荧光强度逐渐减弱,可能是荧光淬灭的结果。另外,胞浆内游离 Ca^{2+} 浓度([Ca^{2+}]i)在整个细胞内的分布是不均匀的,其确切意义尚不清楚。结论: 胞浆内游离 Ca^{2+} 的标记需要适宜的条件,并尽早检测。Ca^{2+} 在细胞内的分布是不均匀的。

关键词 内皮细胞;脐静脉;共聚焦激光扫描显微镜术

中图法分类号 R329.2

血管内皮细胞具有重要的生理和病理学意义[1]。随着研究的深入,人们迫切希望能直观地看到细胞各种生理特性(离子通道、离子浓度、pH等)的动态变化,看到比普通光学显微镜图像更精细的三维结构。新近发展起来的共聚焦激光扫描显微镜术(Confocal laser scanning microscopy, CLSM)的应用满足了这一要求。现简要介绍 CLSM在体外培养人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)胞浆内游离 Ca^{2+} ([Ca^{2+}]i)研究中的初步应用。

1 材料与方法

1.1 CLSM原理[2]

传统的光学显微镜使用场光源,标本上每一点的图像都受到其邻近的衍射和散射光的干扰。CLSM使用点光源,扫描标本焦平面上的每一个点。标本点发出的散射光或反射光重复原入射光路穿过物镜,见图1,实线,通过双向色镜(对荧光图像而言)或半银镜(对反射光图像而言)聚焦成象于第二个光孔(探测孔径)。共聚焦技术的关键在于,相对于焦平面上的标本点,照明孔径与探测孔径是共轭的。这样,焦平面之外大部分的残余散射光,见图1,点线和短划线,由于不能聚焦于探测孔径处而不被探测器所接收,从而在理论上使焦平面上的图像分辨率达到普通显微镜分辨率的1.4倍。

用微动马达控制载物台的升降,使焦平面位于标本的不同层面上,从而得到整个标本的"光学切片"。为了探测标本的深层结构,只有采用高亮度的光源(如激光)、反射率高的标本或荧光标本。荧光或反射光图像经光电倍增管(PMT)和冷电耦合器件(cCCD)摄象机,以数字方式输入计算机,可以完成各类图像处理工作,得到荧光强度随时间变化的图像和曲线。

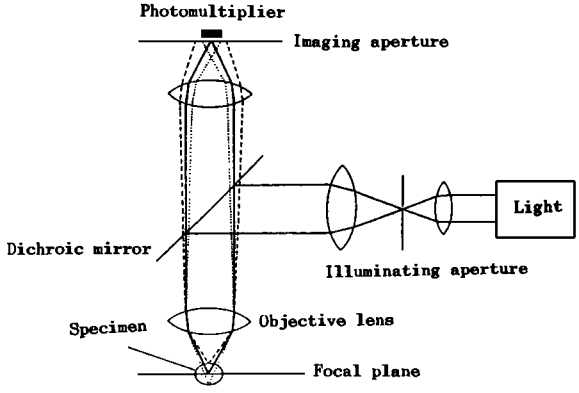


图1 CLSM原理示意图

Fig 1 Schematic diagram of the principle of CLSM

1.2 实验仪器和实验条件

本实验采用德国 Leica仪器公司制造的 CLSM系统(由上海医科大学医学神经生物学国家重点实验室提供)。整个系统主要由一台倒置荧光相差显微镜、氪氩混合离子激光器、控制和输入命令的486DX50微型计算机、进行图像运算处理的工作站以及图像打印设备(UP-5200 MDP型彩色打印机)构成。

Fluo-3的激发波长为488 nm,发射波长为525 nm,本实验采用波长为488 nm的激光束为激发光,Fluo-3阻挡滤色镜波长为515 nm,光电倍增管收集波长大于498 nm的发射荧光。所用显微镜物镜为40× 1.3油镜。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670382

** 姚忠祥,男,32岁,讲师,博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本实验在连续监测胞浆内 $[Ca^{2+}]i$的变化时,采用 IDQ(Ion domain quantify)软件(由 Leica公司提供)对所选定的区域进行荧光强度的数据采集。由该软件提供的窗口可对荧光强度的变化进行实时观察。数据输入到 Microsoft Excel 5.0中作进一步分析处理。

1.3 细胞培养

参见我室改建的 HUVEC体外培养方法[3],无菌条件下取胎龄为 37周~ 40周的新生儿脐带(距离胎儿 10 cm),胰蛋白酶消化收集 HUVEC进行体外培养。

1.4 钙敏染料 Fluo-3/AM的负载及 $[Ca^{2+}]i$动态观察方法[4]

培养 72 h的 HUVEC, 37℃避光孵育于分别含 2μmol/L、3μmol/L、4μmol/L、5μmol/L、6μmol/L Fluo-3/AM的无血清 RPMI-1640培养液中 30 min、60 min、90 min、120 min后,用不含 Fluo-3/AM的同样培养液冲洗 3遍后,即可用氪氩离子激光激发,在 CLSM下观察胞内荧光物质的分布及强度变化。每间隔 10 s记录一次图像,曲线则连续记录,每个样本记录 10 min。

2 结果

2.1 体外培养 HUVECFluo-3/AM的负载

应用(2~ 6)μmol/L Fluo-3/AM恒温(37℃)孵育体外培养 HUVEC 30 min~ 120 min后,分别观察 Fluo-3与游离 Ca^{2+}结合后被激光束激发出的荧光,结果显示: 5μmol/L Fluo-3/AM恒温(37℃)孵育体外培养 HUVEC 60 min即可达到最佳负载效果,孵育浓度的进一步提高和孵育时间的再延长只能增加背景染色,若降低孵育浓度或缩短孵育时间则难于达到最佳效果。

2.2 游离 Ca^{2+}在体外培养 HUVEC中的分布特点

Fluo-3与游离 Ca^{2+}结合后,在激光束激发下发出黄绿色荧光,荧光不均匀的分布于胞浆中,核周胞浆内的荧光强度明显强于其它区域,在远离胞核的胞浆中荧光分布亦不均匀,呈网状或团块状,在细胞周围伸出的短小胞质突起和细长的分枝状突起中分布亦不均匀,见图 2;另外,利用 CLSM的"光学切片"特性及进行三维重建后观察整个细胞内荧光强度时可见不同层面之间的荧光强度亦存在明显差异,见图 3。



图 2 游离 Ca^{2+}在体外培养 HUVEC中的平面分布

Fig 2 The two dimensional distribution of free calcium ion in the cultured HUVEC *in vitro*

图 3 游离 Ca^{2+}在体外培养 HUVEC中的立体分布

Fig 3 The three dimentional distribution of free calcium ion in the cultured HUVEC *in vitro*

2.3 胞浆内 $[Ca^{2+}]i$的动态观察

与空白对照组相比, 5μmol/L Fluo-3/AM恒温(37℃)负载 60 min后体外培养 HUVEC胞浆内荧光强度明显增强,其强度变化均随时间延长而减弱。

3 讨论

应用 CLSM技术,我们观察到 5μmol/L Fluo-3/AM恒温(37℃)负载体外培养 HUVEC 60 min为显示胞浆内游离 Ca^{2+}分布和浓度的最适宜条件。CLSM是新近发展起来的一种新技术,最近几年才逐步得到应用,它与普通显微镜和电镜相比具有明显的优点[5]: CLSM样品处理过程与普通荧光显微镜无异,不需电镜样品的特殊制作过程。CLSM结合倒置相差显微镜可对活体细胞进行动态观察,记录其形态及生理变化过程。我们对体外培养的活体 HUVEC胞浆内 $[Ca^{2+}]i$

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进行了动态观察,其荧光强度随着观察时间的延长逐渐减弱,可能是荧光淬灭的结果。CLSM可在对样品结构无物理上破坏的情况下对样品进行断层扫描(Optical section)并可由计算机图像处理系统完成三维重建,我们应用这一特点对体外培养 HUVEC胞浆内游离 Ca^{2+} 在细胞内的立体分布结果说明胞浆内游离 Ca^{2+} 在整个细胞内分布是不均匀的,其确切意义尚不清楚。CLSM的主要应用之一是对活体细胞胞浆内 $[Ca^{2+}]i$、pH等的动态观察,并可用于离子分布的研究。快速发展的荧光标记技术还可进行特异性标记(如标记胞膜、核膜、细胞骨架、细胞器等),并可同时标记两种或三种物质。

Fluo-3的乙酰甲氧基(Acetoxy methyl, AM)酯化形式容易扩散入细胞,在胞内又被酯酶重新水解成 Fluo-3[6]。我们对体外培养 HUVEC胞浆内 Ca^{2+} 荧光强度的检测是利用钙敏荧光物质 Fluo-3的四羧酸结构与 Ca^{2+} 结合后荧光强度增强 40倍的特性[7],借助 CLSM良好的空间和时间分辨率直接观察其变化,为进一步研究 HUVEC的生理功能及形态结构提供了一种崭新的手段。

参考文献

1 Luscher T F, Vanhoutte P M. The endothelium: modulator of cardiovascular function. Boston: CRC Press, Boca Raton, Arbor Ann, 1990: 1~ 228

2 Fine A, Amos W B, Durbin R M *et al*. Confocal microscopy: applications neurobiology. Trends Neurosci, 1988; 11(2): 346

3 姚忠祥,蔡文琴,徐有奇. VIP对体外培养人脐静脉内皮细胞释放 ANP、ATLL和 EDLS的影响.第三军医大学学报, 1996; 18(5): 417

4 郗　昕,孙建和,姜泗长等.豚鼠耳蜗外毛细胞的共聚焦图像.中华耳鼻咽喉科杂志, 1995; 30(1): 67

5 Shotton D M. Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. J Cell Science, 1989; 94(2): 175

6 Thomas A P, Delaville F. The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. In: McCormack J G, Cobbold P H eds. Celluar calcium: a practical approach. London: Oxford, 1991: 1~ 54

7 Yorek M A, Davidson E P, Dunlap J A *et al*. Effect of bradykinin on cytosolic calcium in neuroblastoma cells using the fluorescent indicator fluo-3. Biochimica et Biophysica Acta, 1993; 1177(2): 215

(收稿: 1997-11-09;修回: 1998-02-18)

(编辑　汪勤俭)

Observation of human umbilical vein endothelial cells in vitro with confocal laser scanning microscopy*

Yao Zhongxiang, Cai Wenqin (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the intracellular free calcium ion ($[Ca^{2+}]i$) of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods**: After the HUVECs were cultured *in vitro*, the concentration of $[Ca^{2+}]i$ was labeled by the indicator of dye Fluo-3/AM and detected by confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Results**: 5μmol/L Fluo-3/AM loading at 37℃ for 60 min was the best condition for observation of the $[Ca^{2+}]i$ in the cultured HUVECs *in vitro*. The distribution of $[Ca^{2+}]i$ was heterogeneous in a cell. **Conclusion**: Appropriate condition is needed to label and detect $[Ca^{2+}]i$ and the distribution of $[Ca^{2+}]i$ is heterogeneous in a cell.

Key words confocal laser scanning microscopy; endothelial cell; umbilical vein

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670382

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net