

研究报告

芯片毛细管电泳评估脂质体介导超氧化物歧化酶减低细胞内氧化应激

孙悦¹ 殷学锋^{*1} 卢敏²(浙江大学化学系微分析系统研究所¹, 生命科学学院生物大分子与酶工程研究所² 杭州 310027)

摘要 超氧化物歧化酶(SOD)可用作抗氧化的药物。它能催化并清除细胞内的活性氧组分(ROS),保护细胞免受自由基的氧化破坏。但是由于SOD分子量较大,难以透过细胞膜进入细胞内,显著降低了SOD的药效。本研究用激光共聚焦荧光显微镜拍摄的荧光图像说明,纳米脂质体可介导SOD进入细胞。用芯片毛细管电泳激光诱导荧光分析法(MCE-LIF)测定单细胞中ROS和谷胱甘肽(GSH)的荧光信号强度,评估了用脂质体包裹的SOD与细胞作用的抗氧化效果。用脂质体包裹的SOD与肝癌细胞共培养2h,与直接用SOD作用于肝癌细胞相比较,细胞内ROS明显降低,GSH明显提高。实验结果说明,用脂质体包裹SOD是一种减低细胞内氧化应激的有效给药途径。

关键词 超氧化物歧化酶 脂质体 单细胞 氧化应激

1 引言

在正常状态下,人体内氧化因子和抗氧化因子间处于平衡状态。在代谢过程中,如细胞不能完全清除体内的自由基即可产生氧化应激(oxidative stress)。细胞内活性氧(ROS)和谷胱甘肽(GSH)含量是表征氧化应激高低的重要指标^[1]。

由于紫外线照射、药物、有毒食物和各种工业污染,使细胞内ROS升高。ROS包括氢氧自由基($\cdot\text{OH}^-$)、超氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、过氧羟自由基($\cdot\text{HO}_2^-$)和过氧化氢(H_2O_2)等组分。ROS过高会产生氧化应激,引起细胞的氧化损伤、凋亡,引发各种自由基疾病并导致衰老^[1]。ROS检测方法有顺磁共振法^[2]、化学发光法^[3]和荧光分光光度法^[4]等。但是由于细胞内ROS具有很高的活性,其含量与细胞内的生物环境和pH有关。因此,用这些方法不能得到准确的分析结果^[5]。

GSH是细胞内主要的含有硫醇基的化合物,它具有强还原性,用于保护细胞内含硫醇的蛋白免遭ROS的氧化。在自由基引发的生理伤害发生时,ROS的含量升高,GSH的含量降低^[6]。GSH可用酶比色法^[7]、HPLC^[8]和CE^[9]等方法检测。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种广泛存在于生物体内的金属蛋白,它能催化并清除细胞内的超氧自由基,保护细胞免受自由基的氧化破坏^[10]。药用SOD由于其分子量较大,难以透过细胞膜进入细胞内,显著降低了SOD的药效。脂质体(liposome)是通过自组装作用将水相包裹在脂质双分子层中而形成闭合微囊泡^[11]。由于脂质体的磷脂膜与细胞膜的结构和成分相似,可以将基因或药物带入细胞内^[12],在生物医学方面得到广泛应用。

微流控芯片的微通道适合单细胞样品的引入、控制、反应、分离和检测。近年来,文献[13~16]报道,用2,3-萘乙二醛(NDA)选择性标记细胞中GSH,用双氢罗丹明123(DHR123)使细胞中ROS转化为荧光物质Rh123,并根据肿瘤细胞的特点,对微流控芯片通道进行改进,在分离通道中设置围堰,使细胞在固定位置停靠并溶膜,用微流控芯片测定了单个人血红细胞和肿瘤细胞中GSH和ROS的含量。

2006-08-11 收稿 2006-11-17 接受

本文系国家自然科学基金资助项目(No. 20475049)和浙江省重大科技计划项目(No. 2004C113001)

* E-mail: yinx@sun.zju.edu.cn

本研究用 MCE-LIF 测定了纳米脂质体介导 SOD 进入 HepG2 肝癌细胞前后细胞内 ROS 和 GSH 的变化,首次在单细胞水平上评估了脂质体包裹 SOD 药效。实验结果说明,用纳米脂质体包裹 SOD 能有效地清除细胞内 ROS,提高 GSH 含量,减低肝癌细胞内的氧化应激。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

JY98-3D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);LSM 510 激光共聚焦荧光显微镜(Zeiss, Germany);Mastersizer 2000 激光粒度分布测定仪(英国马尔文公司)。自制四路高压直流电源(0~1500V)和共聚焦激光诱导荧光检测器(LIF)激发波长473 nm,发射波长520 nm,用于细胞观察、操纵以及 LIF 检测。

参照前文^[16,17]自制微流控玻璃芯片(图1)。在进样通道(S-SW)和分离通道(B-BW)两端钻有直径1.2 mm的小孔,用环氧树脂粘合4个直径4 mm高6 mm的微量移液管头作为储液槽。样品及其废液池分别为S、SW 缓冲液及其废液池为B和BW。

卵磷脂(华东师范大学化工厂)-20℃储存,SOD(上海宝安生物技术公司,活力单位>3000 U)。生理盐水(PSS 0.9 wt% NaCl, pH7.4)0.4%羟丙基纤维素的生理盐水溶液(HPMC-PSS)。电泳缓冲液为含10 mmol/L 十二烷基硫酸钠(SDS)的硼砂缓冲液(pH 9.2);HepG2 肝癌细胞(生物大分子与酶工程研究所);1 mg DHR 123 溶于1 mL 二甲亚砜(DMSO)(0.29 mmol/L)2 mg NDA 溶于1 mL 乙腈

中,-20℃避光保存;荧光素异硫氰酸酯(FITC)1.5 mg 溶于15 mL DMSO 中,4℃避光保存;RPMI 1640 培养基(GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA)。试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 SOD 的 FITC 标记

根据文献[18]将0.1 μmol SOD 溶于10 mL 100 mmol/L pH 9.0 碳酸盐缓冲液,加入10 μL FITC (SOD 和 FITC 摩尔比≈1:3),混匀室温暗处放置12 h,使 FITC 标记 SOD。标记样品在4℃下用10 L PSS 中透析24 h,中间换液6次。

2.3 脂质体制备及其介导 SOD 进入细胞

参考文献[19],在50 mL 烧杯中加入100 mg 卵磷脂、8 mg SOD 和20 mL PSS 后置于冰水浴中,以400 W 功率超声振荡10 min,再在冰水浴中冷却10 min。重复以上超声、冷却步骤3次。以3000 r/min 离心5 min,除去残渣和大脂质体,将制得的包裹 SOD 的纳米脂质体置于4℃冰箱保存,一星期内使用。脂质体中 SOD 包埋率测定方法是:以100 g/L Triton-100 溶解制得的包裹 SOD 的脂质体,再用 Folin-酚法测定其中蛋白含量。包封率(%)=100×脂质体小囊中的蛋白含量/总 SOD 投入量(8 mg)。

于 RPMI 1640 培养基中,接种200 μL HepG2 细胞(5×10^5 cells/mL)于96孔板,CO₂(5%)培养箱中(37℃)培养24 h。PSS 洗涤细胞两次后,加入1 mL 包裹 SOD 的脂质体和细胞共培养2 h,PSS 洗细胞2次除去未进入细胞的脂质体,并用 PSS 稀释至 10^6 cells/mL 细胞悬液。

2.4 细胞内 ROS 和 GSH 的衍生

将1 mL 细胞悬液(10^6 cells/mL)转入1.5 mL 离心管,以1000 r/min 离心,去上清液,加 PSS 至1 mL,加 DHR 123 储备液10 μL,混匀后避光反应30 min。衍生细胞内的 ROS 后,再以1000 r/min 离心5 min,弃去上清液,再洗涤两次后,加 PSS 盐水至1 mL,用10 μL NDA 储备液衍生细胞内 GSH 3 min,离心清洗两次后,用约1 mL HPMC-PSS 稀释细胞,得到细胞密度为 1.2×10^5 cells/mL 的细胞悬液。

2.5 微流控芯片电泳检测单细胞

参考文献[13,16],分别将电泳缓冲液100、100和50 μL 加入储液池B、BW 和 SW 中,将150 μL 细胞悬液(1.2×10^5 cells/mL)加入样品储液池S中。由于液面高度不同,在显微镜下可以观察到细胞

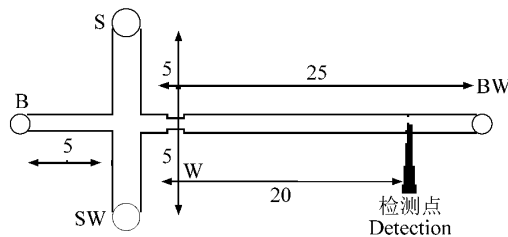


图1 芯片示意图

Fig.1 Schematic diagram of the microfluidic chip

悬液从 S 流向 SW ,当某单个细胞到达通道十字交叉口时 ,在 B、BW、S 和 SW 储液池中分别施加 1200、0、800 和 800 V 电压 5 s。细胞在电压驱动下进入分离通道并被截留在围堰 W 处 ,同时电泳缓冲液迅速取代了细胞周围的 HPMC-PSS ,使细胞在 15 s 内溶膜。迅速将检测点移至离十字通道口 2 cm 处 ,再次施加上述电压 ,细胞释放物被电泳分离并检测。

3 结果与讨论

3.1 脂质体的性质

用超声法制备包裹 SOD 的脂质体时 ,超声功率越大 ,卵磷脂被超声分散的越均匀 ;形成的包裹 SOD 的脂质体越小 ,均匀度越高。为避免过大的超声功率引起的热效应 ,实验选用 400 W 作为制备脂质体所用功率。用激光粒度分布测定仪测得脂质体粒径分布见图 2。平均粒径约为 122 nm。用 Folin-酚法测得 SOD 脂质体的包封率为 $38\% \pm 5\%$ 。脂质体在一星期内基本稳定 ,否则脂质体有凝聚现象。

3.2 脂质体介导 SOD-FITC 进入细胞

用 FITC 标记 SOD 后 ,分别用 SOD-FITC 和包裹有 SOD-FITC 的脂质体与细胞共培养 2 h 后 ,用激光共聚焦荧光显微镜拍摄细胞图片见图 3。包裹 SOD-FITC 的脂质体与细胞共培养 2 h 后 ,细胞内出现 FITC 的绿色荧光(图 3) ,相同条件下 ,不用脂质体包裹的 SOD-FITC 与细胞共培养后 ,细胞内无绿色荧光(图 3a)。说明脂质体可在 2 h 内介导 SOD-FITC 进入细胞 ,而不用脂质体包裹的 SOD-FITC 在 2 h 内不能进入细胞。

将制得的 SOD-FITC 脂质体用生理盐水稀释后 ,与 HepG2 细胞共培养 2 h ,用 MCE-LIF 测定脂质体密度对进入细胞内 SOD-FITC 量的影响。结果说明 ,脂质体密度越高 ,测得细胞内荧光强度越大 ,进入细胞的 SOD-FITC 数量也越多。

3.3 用芯片毛细管电泳测定脂质体介导 SOD 清除细胞内活性氧能力

用 SOD 与肝癌细胞培养 2 h ,用 MCE-LIF 测定肝癌细胞中 ROS 和 GSH 的荧光强度。结果说明 ,无论是迁移时间还是荧光强度与未经 SOD 处理的细胞均无明显差异。由此可见 ,由于 SOD 分子量较大 ,在 2 h 内难以透过细胞膜进入细胞改变细胞内 ROS 和 GSH 的含量。

分别用 SOD 和包裹 SOD 的脂质体与肝癌细胞培养 2 h ,用 MCE-LIF 测定肝癌细胞中 ROS 和 GSH 的荧光信号强度。由于单细胞的个体差异 ,不同单细胞间 ROS 和 GSH 含量差异较大。因此 ,每组均测定 10 个细胞 ,电泳图分别见图 4a 和图 4b。图 4 中 ROS 和 GSH 的迁移时间及峰面积见表 1。用 t 检验二组数据 ,结果有明显差异 ($P = 0.99$)。说明用脂质体包裹的 SOD 能有效地降低肝癌细胞内的氧化应激 ,使 ROS 的含量降低 ,GSH 的含量升高。

4 结论

超氧化物歧化酶 (SOD) 能够催化并清除细胞内的活性氧组分 ,保护细胞免受自由基的氧化破坏。本实验采用激光共聚焦荧光显微镜拍摄荧光图像说明 ,纳米脂质体可介导 SOD 进入细胞。用芯片毛细管电泳激光诱导荧光分析法 (MCE-LIF) 测定单细胞中 ROS 和谷胱甘肽 (GSH) 的荧光信号强度 ,考察

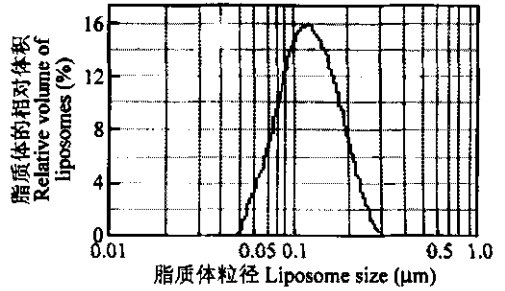


图 2 脂质体粒径分布图

Fig. 2 Size distribution of liposomes

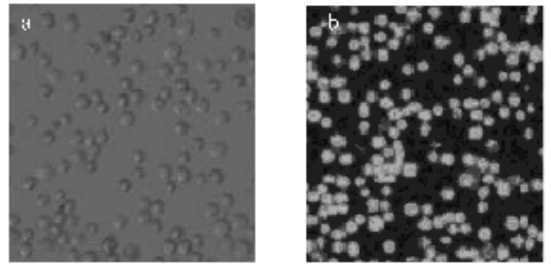


图 3 HepG2 细胞分别用 SOD-FITC(a) 及包裹 SOD-FITC 的脂质体(b) 培养 2 h 后的荧光图片

Fig. 3 Fluorescence images of HepG2 cells after incubation with FITC-SOD (a) with FITC-SOD encapsulated liposome (b) for 2 h

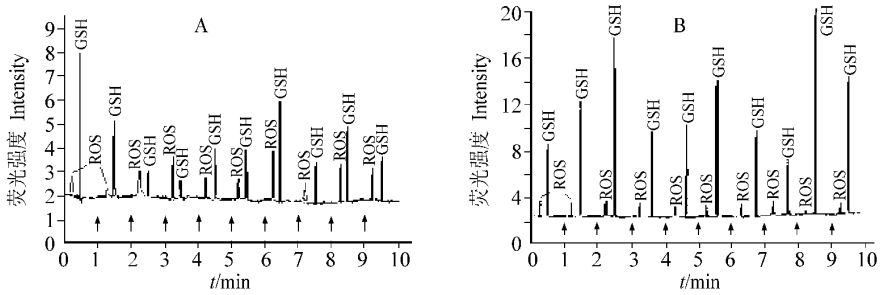


图 4 微流控芯片检测 10 个 HepG2 细胞内 ROS 和 GSH 电泳图($E=400\text{ V/cm}$ $L=2\text{ cm}$)

Fig.4 Recorded electropherograms of reactive oxygen species (ROS) and reduced glutathione (GSH) for a series of 10 HepG2 cells

箭头表示电泳开始分离的起点(arrows correspond to the starting points of CE separation)。A. 与 SOD 共培养 2 h (after incubation with SOD for 2 h); B. 和包裹 SOD 的脂质体共培养 2 h (after incubation with SOD liposomes for 2 h)。

表 1 细胞内 ROS 和 GSH 的迁移时间和峰面积

Table 1 Migration time and peak area of ROS and GSH in cells after incubation with SOD and SOD-liposome respectively

峰序号 Peak No.	迁移时间 Migration time t_R (s)		峰面积 Peak area A ($10^3\text{ mV} \cdot \text{s}$)			
	SOD		SOD		SOD-Liposome	
	ROS	GSH	SOD	ROS	ROS	GSH
1	15.6	27.9	2.0	5.8	0.80	5.8
2	14.9	26.9	0.92	4.1	0.85	10
3	14.3	27.8	3.0	1.8	2.2	14.8
4	14.8	29.8	3.9	2.2	1.1	7.5
5	15.3	29.2	1.1	1.9	0.59	7.3
6	15.5	24.3	1.4	2.4	1.37	11.5
7	14.3	25.0	4.6	4.2	0.92	11.4
8	15.4	26.6	1.8	1.6	0.80	8.4
9	14.6	25.9	1.4	2.9	0.45	30.6
10	14.5	29.5	1.3	1.9	0.59	9.5
平均值 Average	14.9	27.3	2.1	2.9	0.97	11.7
RSD (%)	3.3	6.9	60	48	52	61

了用脂质体包裹的 SOD 与细胞作用的抗氧化效果。用脂质体包裹的 SOD 与肝癌细胞共培养 2 h 后,与直接用 SOD 作用于肝癌细胞相比较,肝癌细胞内 ROS 明显降低,GSH 明显提高。实验结果证明,用脂质体包裹 SOD 是一种减低细胞内氧化应激的有效给药途径。

References

- 1 Townsend D M ,Tew K D ,Tapiero H. *Biomedicine & Pharmacotherapy* ,**2003** ,57 :145 ~ 155
- 2 Thomalley P J ,Trotta R J ,Stern A. *Biochim. Biophys. Acta* ,**1983** ,759(1) :16 ~ 22
- 3 Brehm M ,Schiller E ,Zeller W J. *Toxico. Lett.* ,**1996** ,87(3) :131 ~ 138
- 4 Loetchutinata C ,Kothana S ,Dechsupaa S ,Meesungnoena J ,Jay-Gerinb J ,Mankhetkorn S. *Radiat. Phys. Chem.* ,**2005** ,72(3) :323 ~ 331
- 5 Stephanson C J ,Flanagan G P. *Free Radical Biology & Medicine* ,**2003** ,35(9) :1129 ~ 1137
- 6 Parmentier C ,Wellman M ,Nicolas A ,Siest G ,Leroy P. *Electrophoresis* ,**1999** ,20(14) :2938 ~ 2944
- 7 Tietze F. *Anal. Biochem.* **1969** ,27(2) :502 ~ 522
- 8 Carru C ,Zinellu A ,Mario P ,Marongiu G ,Tadolini B ,Deiana L. *Electrophoresis* ,**2002** ,23(11) :1716 ~ 1721
- 9 Orwar O ,Fishman H A ,Ziv N E ,Schneller R H ,Zare R N. *Anal. Chem.* ,**1995** ,67(23) :4261 ~ 4268
- 10 Huang P ,Feng L ,Oldham E A ,Keating M J ,Plunkett W. *Nature* ,**2000** ,407(6802) :390 ~ 395
- 11 Bangham A D ,Standish M. M ,Weissmann G J. *Mol. Biol.* ,**1965** ,13(2) :253 ~ 259

- 12 Ulrich A S. *Bioscience Reports* ,**2002** ,22(2) :129 ~ 150
- 13 Gao J ,Yin X F ,Fang Z L. *Lab Chip* ,**2004** ,4(1) :47 ~ 52
- 14 Sun Y ,Ling Y Y ,Yin X F ,Fang Z L. *Anal. Bioanal. Chem.* ,**2005** ,382(7) :1472 ~ 1476
- 15 Ling Y Y ,Yin X F ,Fang Z L. *Electrophoresis* ,**2005** ,26(24) :4759 ~ 4766
- 16 Sun Y ,Yin X F. *J. Chromatogr. A* ,**2006** ,1117(2) :228 ~ 233
- 17 Yin Xuefeng(殷学锋) ,Shen Hong(沈宏) ,Fang Zhaolun(方肇伦) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) ,**2003** ,31(1) :116 ~ 119
- 18 Thiele C ,Gänzle M G ,Vogel R F. *J. Agric. Food. Chem.* ,**2003** ,51(9) :2745 ~ 2752
- 19 Cunliffe J M ,Barla N E ,Luey C A. *Anal. Chem.* ,**2002** ,74(4) :776 ~ 783

Evaluation of the Effectiveness of Superoxide Dismutases Mediated by Liposomes for Reducing Intracellular Oxidative Stress by Microchip Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence

Sun Yue¹ , Yin Xue-Feng^{*1} , Lu Min²

¹(Institute of Microanalytical Systems , Department of Chemistry , Zhejiang University , Hangzhou 310027)

²(Institute of Biologic Macromolecule and Enzymatic Engineering , College of Life Science , Zhejiang University , Hangzhou 310027)

Abstract Superoxide dismutases (SOD) can be used as anti-oxidization drugs. They eliminate superoxide radicals and thus protect cells from damage induced by free radicals. However , their drug effectiveness is greatly reduced owing to their large molecular weight and impermeability to cell membrane. Fluorescent microscopy images of cells demonstrated that nano-liposome can transfer SOD into cells. The anti-oxidization action of liposome-mediated SOD has been evaluated through the determination of fluorescent intensity of intracellular reactive oxygen species (ROS) and reduced glutathione (GSH) in single cells by microchip electrophoresis with laser-Induced fluorescence. It has been observed that intracellular ROS decreased and GSH increased after incubation with SOD encapsulated liposomes for 2 h compared with direct incubating cells with SOD. The results demonstrate that the drug effectiveness of SOD for reducing intracellular oxidative stress is significantly improved by delivery of SOD mediated by liposomes.

Keywords Superoxide dismutases , liposome , single cell , oxidative stress

(Received 11 August 2006 ; accepted 17 November 2006)

“ 第十一届国际暨第一届中日双边电分析化学会议 ” 通知

经中国科学院批准 , 并受中国化学会委托 “ 第十一届国际暨第一届中日双边电分析化学会议 ” , 由中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室承办。研讨会将于 2007 年 8 月 16 日至 19 日在长春应用化学研究所举行。研讨会将特邀国际著名电分析化学家参加 , 会议语言为英语。欢迎参加 , 如提出报告 , 请交中英文摘要各一份。

论文截止日期 2007 年 5 月 15 日

联系人 张柏林 电话/传真 0431-85262430 Email blzhang@ciac.jl.cn

地址 长春市人民大街 5625 号 邮编 130022

欢迎登录 <http://isec.skleac.org/> 了解会议信息