

显微多道分光光度法研究受柠檬醛损伤后 黄曲霉细胞形态变化

罗 曼¹ 黄耀熊² 蒋立科^{1*} 籍 涛²

(¹ 安徽农业大学生命科学学院 合肥 230036)

(² 暨南大学生物医学工程研究所 广州 510632)

摘 要 采用从山苍籽油分离出的柠檬醛作为抗菌药物,产毒和无毒的黄曲霉细胞(*Aspergillus flavus* cell, AFC)作为药物作用的靶,以显微多道分光光度法和显微图像分析法对被该醛所损伤的 AFC 进行图像捕获,测定受损伤后细胞内吸收光谱、截面积、周长、长轴长及短轴长所发生的变化。发现在 410nm 和 665nm 处产毒 AFC 存在特征吸收峰,受该醛损伤后产毒和无毒 AFC 的吸收光谱波峰均发生迁移,且峰面积增大;截面积等 4 类形态参数的数值随柠檬醛浓度升高而减少;为质膜物理化学及细胞内生理生化指标变化提供了理论依据。表明柠檬醛不仅破坏质膜的选择性通透性,而且使细胞质膜结构改变并进入细胞,与靶分子及靶细胞器作用而引发一系列新的生理生化现象的出现。实现对活态细胞受药物作用后形态及生物大分子动态变化的快速、实时、在位的测定,对抗菌药物作用于细胞并使其发生形态结构及靶分子的变化提供了必要的物理参数,在药物抗菌理论及方法研究上具有重要意义。

关键词: 显微多道分光光度法, 柠檬醛, 黄曲霉, 细胞形态, 细胞内吸收光谱

中图分类号: Q545 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2003)03-0400-07

细胞生命活动与整体细胞活动的状态有关,细胞的异质性导致细胞在化学组成、生理响应时间等方面的差异性,而该异质群体细胞中单个特异细胞的结构和功能分析则是了解单个细胞和群体细胞间协同效应、细胞与组织间的关系和进行生物模拟研究的重要基础,单个活态细胞与周围环境之间,同一细胞内生物分子之间相互作用的实时、无扰、在位的高分辨率观察和分析是细胞生理学行为及其机理研究的重要部分。单个细胞的细胞质、细胞器、全细胞的多维分析、对同种细胞功能是否相同、生理行为与细胞形态及化学组成间关系、细胞变异及细胞通讯的生化基础等生物学和医学中一些悬而未决的问题有望得到回答。单个细胞化学组成分析可用于评价外界刺激(如药物和毒素)对细胞化学组成的影响,获得其他方法所不能获得的宝贵信息,为有效地减少副作用药物设计提供重要的依据。鉴于只涉及单个细胞,其单细胞分析方法的建立,不但可解决用人和动物组织进行科学实验材料来源问题,而且可大大缩短有关研究和分析的时间。

与对照组相比较,本研究采用显微多道分光光度系统与显微图像处理分析系统^[1-3]

基金项目: 国家档案局资助项目(903-保-02)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-551-2822298

作者简介: 罗 曼(1963-)女,安徽合肥,副教授,博士,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: xionglu@ustc.edu.cn

收稿日期: 2002-07-15, 修回日期: 2002-09-25

相结合,测定黄曲霉受柠檬醛损伤后,细胞内吸收光谱和细胞形态的变化,探讨柠檬醛作用于黄曲霉细胞(*Aspergillus flavus* cell, AFC)的规律。结果表明 AFC 经该醛损伤后截面积、周长、长轴与短轴长度随药物浓度升高而减小。细胞特征吸收波长改变,进一步证明柠檬醛明显破坏 AFC 质膜从而进入细胞,导致电导率升高^[4]、线粒体产生不规则增生^[5]、破坏氧化还原反应系统,还使核 DNA 损伤^[6]等,克服了激光共聚焦显微技术难以实现对细胞内分子内部结构和化学组成微小变化进行高灵敏度分析的局限性,弥补了流式细胞技术无法对同一细胞进行连续观察及其动力学测定的不足;同时取代了虽可快速有效地进行单个细胞化学组成分析测定和生物学事件分析,却又因干扰活细胞正常状态并对环境要求高而难以测定的微电极技术,也解决了荧光分析和活细胞探针技术中因受荧光漂白及特异结构探针种类与装载方法的限制而难以对活细胞进行无扰、实时、快速地连续动态监测的问题。

1 原理和方法

1.1 实验装置和原理

实验装置如图 1 所示。图 1 表明本项实验测定的装置由显微多道分光光度系统、微型细胞培养地、显微数字成像和图像分析系统组成。整套硬件主要建立在一特定的 Nikon TE300 倒置显微镜之上,光源为 100W 卤钨稳流光源光束通过孔径大小可调的光阑 1 后,经透镜聚焦后照射到样品上。该显微镜包括前面、侧面、底面和两个目镜,共 5 个成像光路输出口;光路设计中利用显微镜侧面输出口作为显微数字图像输出口;利用显微镜前面输出口作为显微多道分光光度检测光路的输入端口;检测时使用光路切换装置,可选择单条成像光路输出,或几条光路相组合时输出,即可实现多种手段的同步联合检测;在测较暗图像时,可利用 METEORII 图像捕捉卡与 IMAC-CCDS30 摄像头的控制连线,送入积分时间控制信号,控制 IMAC-CCDS30 摄像头的 CCD 积分时间, METEOR II 图像捕捉卡再根据 IMAC-CCDS30 发出的捕捉脉冲输出信号,进行同步图像捕获。因积分时间可被控制,故作为 MMSP 技术的补充,该部分还可通过使用恒定单色均匀光源照明系统,而实现单道显微光度大视野范围(相校 MMSP)的二维多空间点快速同步吸收光谱检测。在系统制作时需要 CCD 光电响应的不均匀性和非线性进行校正,以及 CCD 检测通道电路中增益调节电路和 γ 校正电路作调整^[7]。每次利用系统进行图像摄取时,还可利用软件对所获图像进行背景扣除、滤波降噪处理等操作。软件系统还提供了多种滤波方法,可根据实际情况进行选择后,由计算机自动完成。

1.2 材料和试剂

1.2.1 菌种:黄曲霉(*Aspergillus flavus*),无毒和产毒两个菌株,从花生和大米中分离获得。

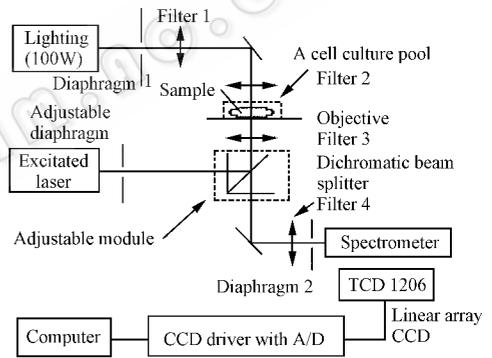


图 1 实验分析系统和图像获取系统

Fig. 1 The experiment setup

中国科学院微生物所齐祖同研究员鉴定。

1.2.2 试剂 柠檬醛、甘油、NaCl(AR)、Tween-20 均由上海化学试剂公司提供。

1.3 方法

1.3.1 样品准备及形态学参数的测定 将试验菌采用文献[4]方法,洗涤、收集并用所配制的4组不同浓度的柠檬醛溶液(将2.0 mg/mL母液分别稀释5倍、2倍、1倍,即表示为 $\times 5$ 、 $\times 2$ 、 $\times 1$,母液用 $\times 0$ 表示)处理,每组取7个画面观察,每个画面含23~43个细胞(一般为 $19 < X < 50$),每个细胞测定相关参数3次,取平均值,共测定1375个不同大小的单个细胞。然后由计算机摄取各浓度组的细胞图象并对其进行快速图像处理运算(如:点运算、代数运算、几何运算、波运算、边缘检测、数学形态运算、空间域和频域转换等),求出黄曲霉细胞截面积、周长及主轴长、短轴长,并与对照组比较,揭示受柠檬醛损伤后该4种量值及表面形态所发生的变化。

1.3.2 AFC对应波长吸收光度的测定 调节光阑1使入射光斑直径为 $10\mu\text{m}$,一次仅有一个AFC被照射。每个浓度测定约30个不同大小的细胞进行测定然后取其平均值。选用 $40\times$ 物镜,光阑2直径取 0.2mm ,考虑的中间接力透镜为2倍,实际检测微区直径为 $2.5\mu\text{m}$,则可对单AFC内部进行吸光度测量。调节显微镜,选定单个AFC某一局域后,设定合适的CCD积分时间进行测定,再分别测定单个AFC透射光强 $I(\lambda)$,邻近细胞间液体透射光强 $I_0(\lambda)$ 及CCD元件暗电流所产生的暗电流暗输出 $I_d(\lambda)$,然后按照下式计算AFC对应波长吸光度 $A(\lambda)$:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0(\lambda) - I_d(\lambda)}{I(\lambda) - I_d(\lambda)}$$

2 结果

2.1 柠檬醛损伤AFC质膜的显微观察

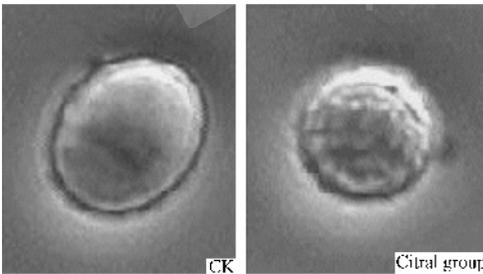


图2 受柠檬醛损伤后黄曲霉细胞的显微观察

Fig.2 Micro-observation on AFC damaged by citral

经抽取图像中能区分的目标和背景(空间、变换域、空间、变换域特征:如边界和轮廓特征、形状特征、统计特征、纹理特征、色度特征等),然后把具有相近性质的区域彼此分开,在计算机显像屏幕上显示。观察到当柠檬醛为致敏浓度时,被损伤AFC质膜因受到该醛的触蚀,由不透明到半透明状;当在半致死浓度(1.5mg/mL)时,AFC表面出现囊状小泡;当在大于致死浓度(3.0mg/mL)时,小泡破裂,原生质溢出,周围低渗透压区域小分子物质进入细胞,使质膜呈多孔隙的皱缩状态。图2所示对照组细胞表面光滑(图2 CK),而实验组细胞表面凹陷较深且有致密的皱缩(图2 Citral group)。

2.2 柠檬醛能显著改变AFC形态特征

对每组样品各选择250个以上细胞进行形态学参数测定,由计算机自动给出统计平均值。与对照组相比,各柠檬醛浓度组所测得的AFC截面积、周长、长轴长(长径)、短轴

长(短径)如表 1 所示。从表 1 可看出未受柠檬醛作用的产毒黄曲霉其各形态参数值均比无毒黄曲霉大,这与在显微镜下观察到的结果相一致。另外表 1 还反映出不论是产毒黄曲霉还是无毒黄曲霉,随着柠檬醛浓度的增大,各形态参数值均减小,虽减小的程度不像柠檬醛剂量成份呈比例变化,但表明柠檬醛对 AFC 形态特征的改变程度是随其浓度的增大而增大。

表 1 黄曲霉细胞形态参数与柠檬醛浓度的相关性

Table 1 Relativity of AFC morphological parameters with citral concentration

	Toxicogenic <i>A. flavus</i> (mg / mL)					Atoxigenic <i>A. flavus</i> (mg / mL)				
	CK	×5	×2	×1	×0	CK	×5	×2	×1	×0
Area / μm^2	23.83	21.61	19.07	18.40	17.71	14.45	14.20	14.10	12.68	12.22
Perimeter / μm	19.37	18.10	16.79	16.53	16.00	14.67	14.48	14.29	13.64	13.45
Major axis length / μm	5.97	5.80	5.33	5.21	5.16	44.42	4.38	4.36	4.15	4.09
Minor axis length / μm	5.08	4.73	4.47	4.42	4.28	44.05	4.02	4.01	3.78	3.69

2.3 活态 AFC 吸收光谱的测定

所测得的活态 AFC 吸收光谱如图 3。图中采用单次测量,CCD 积分时间取 200ms,经中值滤波得吸收光谱曲线。该图以吸光度(OD 值)为纵坐标,波长为横坐标。通过比较产毒与无毒两种菌株对照组的吸收光谱,每个细胞测 5~7 次,其曲线均能重合,表明柠檬醛作用于细胞内的靶物质是同类物质分子。由该图可看出有 3 个差异:A.特征吸收峰:于 410nm 和 665nm 处前者有一个吸收峰,尽管峰小,但后者却无,表明了两种菌株间生物学的显著生理差异;B.波形的拐点位置不同:前者位于 530nm 处,而后者位于 390nm 处;C.吸收峰移动:表明吸收峰向紫外光区移动,提示部分活性蛋白失活,而在 650~750nm 波

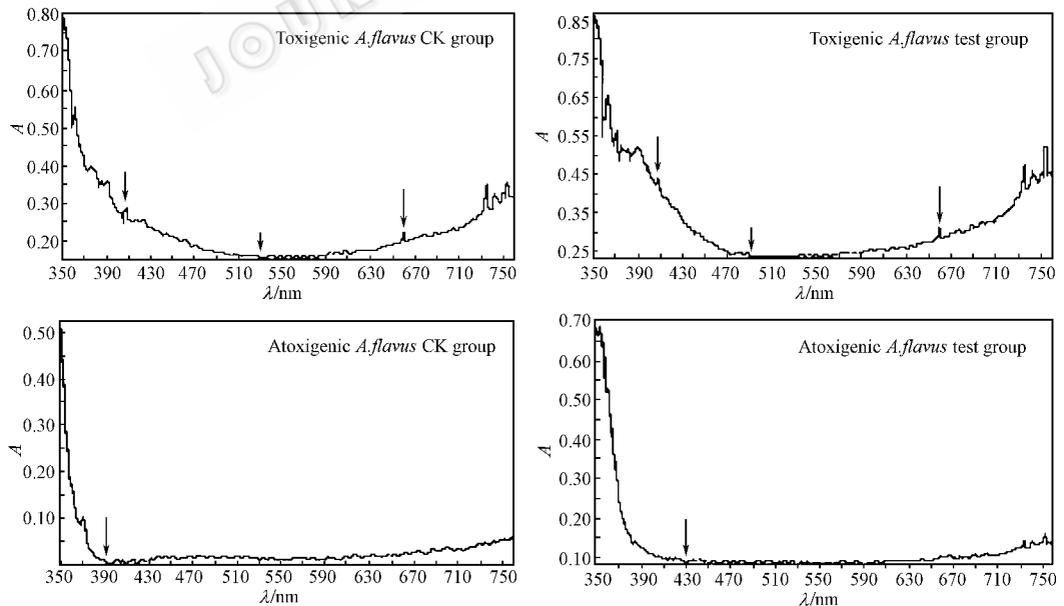


图 3 快速显微多道分光光度法测定黄曲霉细胞内吸收光谱

Fig.3 Mensuration intracellular absorption spectrum of *A. flavus* by fast MMSP

长范围内前者有 3 个明显吸收峰,而后者的波形较平缓,表明柠檬醛对该波长范围活性蛋白影响较小。

图 3 还表明,同一种菌株的试验组与对照组之间有显著差异,就产毒菌株而言,与对照组相比,试验组在 410nm 处的吸收峰明显增高,波形的拐点位置由对照组的 530nm 左移至 490nm,就无毒菌株而言,与对照组相比,试验组波形的拐点位置由对照组的 390nm 右移至 430nm,而且在 650~750 nm 波长范围内波形不再平缓并出现若干个小吸收峰。

2.4 不同波长范围内吸光强度的积分值测量

选择不同波长范围,由计算机自动完成 AFC 在该区段吸光强度的积分求和取得积分值(表 2),表 2 中数据即为不同菌株、不同柠檬醛浓度试验条件下所测得的积分值。该表反映出无毒菌株所有波长区段的吸光强度积分值均随药物浓度增加而增大,产毒菌株除个别数值略有异常外,在各波长区段的吸光强度积分值也呈现出与药物浓度的正相关性。

表 2 不同波长范围黄曲霉细胞吸光强度的积分值

Table 2 Integral values of AFC absorbance at different wavelength ranges

		Integral values of absorbance at different wavelength ranges			
		(350~750)nm	(350~510)nm	(510~630)nm	(630~750)nm
Toxicogenic <i>A. flavus</i>	CK	251.98	128.26	59.76	73.70
	×5	266.69	142.97	56.74	67.53
	×2	291.66	135.54	71.37	84.92
	×1	346.94	179.61	80.46	89.96
	×0	377.57	195.03	86.20	93.20
Atoxigenic <i>A. flavus</i>	CK	146.51	69.37	26.85	50.38
	×5	173.40	82.69	38.75	52.10
	×2	196.85	95.39	44.61	57.35
	×1	281.58	142.82	61.13	77.78
	×0	329.59	181.52	67.23	79.41

2.5 细胞全吸光强度与柠檬醛损伤浓度的相关性

在 350~750nm 波长区段吸光强度的总和又称细胞全吸光强度。以细胞全吸光强度为纵坐标,柠檬醛浓度为横坐标作图如图 4,该图表明细胞全吸光强度与柠檬醛浓度呈很好的正相关性,且产毒黄曲霉的相关性更好($R^2 = 0.98$)。

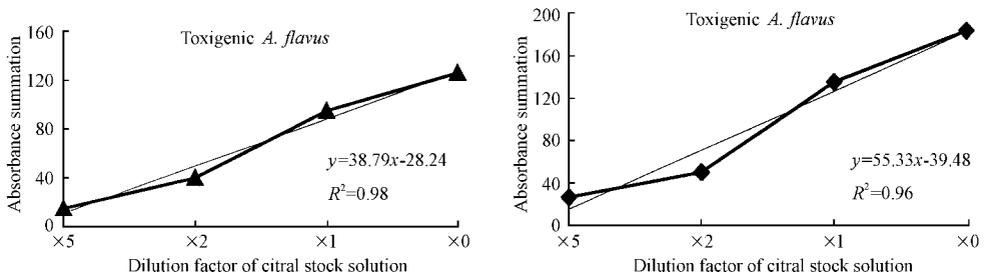


图 4 黄曲霉细胞全吸光强度与柠檬醛损伤浓度的相关性

Fig. 4 Relativity of AFC absorbance summation at whole wavelength ranges with citral concentration

3 讨论

3.1 方法对显微样品分析能力的评估

研究对象的代谢极为复杂,形态各异,传统的显微分光光度均采用单道光学检测系统,检测时间较长,难以进行时间分辨率要求高的光谱检测,而且仪器体积庞大,结构复杂而操作不便。近年有厂家研制出新型显微分光光度系统,使用二极管阵列作为检测器,可使检测时间加快到 20 ms。光谱检测范围 360 ~ 780 nm,最小检测区域 5 nm,但其波长分辨率有限(仅在 ~ 2.5 nm 量级)。所开发的线阵耦合器件 CCD 结合了数字信号处理技术,构成新型显微多道分光光度检测装置^[8],对微区样品在 350 ~ 800 nm 光谱波长进行快速(≈ 1 ms)光谱检测,同时使波长分辨率达 0.2 nm。从而,在探测波长全范围内光谱一次性快速成像,分辨率高,积分时间可调,信噪比高,体积小,便于操作,及 Windows 98 操作环境下系统软件和计算机强大的数据处理能力。

3.2 柠檬醛对 AFC 形态特征的改变

为保证细胞在生长发育过程中的同步性,避免客观误差,采用接种第 72 h 后采集的孢子,并在每个画面取不少于 23 个细胞进行测定,每个参数测定 3 次,取平均值,因而有代表性,且重复性也好。受柠檬醛损伤后的 AFC 图像在计算机屏幕上明显呈现许多钟孔,这在普通显微镜下因分辨率低而无法观察到,即使电子显微镜也因固定和数次脱水处理,改变了细胞表面物质组成,而看不到这一活态细胞表面所发生的微观变化。

由于 AFC 质膜经柠檬醛损伤后,质膜出现许多钟孔,反映出质膜上许多物质结构成分的破坏或生物学特性的丧失,产生低渗透压区小分子物质内渗,电导率升高,质膜失去选择性通透性及活态细胞的固有弹性,因而细胞长、短径随着截面积、周长的减少而缩小,使 AFC 呈现皱缩。

3.3 柠檬醛对 AFC 吸光度的改变

黄曲霉产毒和无毒两类菌株其差异可通过在 410 nm 及在 665 nm 处是否出现光吸收峰体现出来,为两类菌株的生理差异提供了依据;受柠檬醛损伤后,不论是那种菌株,吸收光谱的波形均发生迁移(左移或右移)并且峰面积增大,表明两种菌株受损伤后生理变化的类似特点;产毒菌株试验组 410 nm 处吸收峰的减小,可能反映柠檬醛在 AFC 转录或翻译水平对其产生了抑制,从而其毒素合成量减少。

综上所述,与常用光学显微镜相比,采用显微分光光度法研究抗菌药物的作用机理,不仅对发生的生理生化变化能灵敏、快速、直观,而且能定量测定;与电子显微镜相比,不仅可以观察到活态细胞在药物作用下所发生的动态变化,而且可以进行结构变化的测定,把静态观察的定性鉴定与动态变化过程的定量观察结合起来,能从更深层次发现问题,特别是能帮助探讨细胞内靶分子,避免药物实验盲目性,在当今药理研究上不失为一种良好的简便方法和手段。

致谢 感谢李晶博士、姚成灿博士、屠美博士及陈文心和陈光炜老师对本实验的大力支持和帮助。

参 考 文 献

[1] Yokoyama H, Hoyer P H, Hansen P M, et al. Immunohistochemical quantification of heparan sulfate proteoglycan and colla-

- gen IV in skeletal muscle capillary basement membranes of patients with diabetic nephropathy. *Diabetes*, 1997, **46**(11): 1875 ~ 1880.
- [2] Wojcik E M, Miller M C, O'Dowd G J, et al. Value of computer-assisted quantitative nuclear grading in differentiation of normal urothelial cells from low and high-grade transitional cell carcinoma. *Anal-Quant-Cytol-Histol*, 1998, **20**(1): 69 ~ 76.
- [3] Meyer B, Schaller C, Frenkel C, et al. Distributions of local oxygen saturation and its response to changes of mean arterial blood pressure in the cerebral cortex adjacent to arteriovenous malformations. *Stroke*, 1999, **30**(12): 2623 ~ 2630.
- [4] 罗曼, 蒋立科, 吴子健. 柠檬醛对黄曲霉质膜损伤机制的初步研究. *微生物学报*, 2001 **41**(6): 723 ~ 729.
- [5] 罗曼, 蒋立科. 柠檬醛损伤黄曲霉线粒体生化机理的研究. *微生物学报* 2002 **42**(2): 226 ~ 231.
- [6] 罗曼, 黄耀熊, 蒋立科. 彗星系统定量检测柠檬醛损伤黄曲霉 DNA 的研究. *微生物学报*, 2002 **42**(3): 341 ~ 347.
- [7] Satoru C T. A need and method for non-uniformity correction in solid-state image sensor. *SPIE*, 1982, **35**(1): 350 ~ 354.
- [8] 黄耀熊, 籍涛, 陈光炜. 发明专利: 一种快速显微多道分光光度检测方法及其装置 2001. 专利序号: 00117473.8. 主分类号: G01N21/17.

Study on Morphological Change of *Aspergillus flavus* Damaged by Citral with a Multi-channel Micro-spectrophotometer System

Luo Man¹ Huang Yaoxiong² Jiang Like^{1*} Ji Tao²

(¹ College of Life Sciences, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

(² Institute of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Citral extracted from *litsea cubeb* oil was used as antibacterial drug; toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* cell (AFC) were used as its target. Multi-channel micro-spectrophotometer (MMSP) and micro-image analysis were applied. Under the pressure of citral, changes in AFC were measured, including items such as absorbance, area, perimeter, major axis length and minor axis length. We found that toxigenic AFC had two characteristic absorbent peaks at 410 nm and 665 nm, and that the waveforms of absorption spectrum of toxigenic and atoxigenic AFC migrated and their peak areas increased, and that four morphological parameters reduced with citral concentration increasing. The results suggest that citral damages selective permeability and structure of membrane to enter to cell, and acts on target molecule or organelle to bring changes in physiology and biochemistry. In real-time, in-situ and non-invasive situation, the dynamic changes in shape and intracellular macromolecule are fastly measured during the drugs damage a living cell, which not only provides these changes with necessary physical parameters, but also has an importance in theoretical research and experimental method

Key words: Multi-channel micro-spectrophotometer system, Citral, *Aspergillus flavus*, Cell shape, Cell absorption spectrum