

UV 胁迫酵母细胞凋亡过程的拉曼光谱研究*

Raman Spectroscopy for the Non-destructive Monitoring of Apoptosis Process by UV Stress within a Single Yeast Cell

黄庶识^{1,2}, 卢明倩¹, 黄桂媛¹, 廖 威³, 陈丽梅^{2**}

HUANG Shu-shi^{1,2}, LU Ming-qian¹, HUANG Gui-yuan¹, LIAO Wei³, CHEN Li-mei²

(1. 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530007; 2. 昆明理工大学生物工程技术研究中心, 云南昆明 650500; 3. 广西职业技术学院, 广西南宁 530226)

(1. Lab of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan, 650500, China; 3. Guangxi Vocational and Technical College, Nanning, Guangxi, 530226, China)

摘要:【目的】了解 UV 诱导酵母细胞发生凋亡过程中生物大分子的变化及细胞凋亡的分子机制。【方法】应用单细胞激光光镊拉曼光谱技术(LTRS), 实时研究酵母细胞凋亡过程中拉曼光谱强度的动态变化, 分析单个细胞凋亡过程的生理生化变化。【结果】致死剂量 UV 照射酵母细胞后, 细胞发生凋亡。对于群体细胞, 归属于核酸的 1085 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 蛋白质的 850 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1604 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} 和脂类的 1085 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} 拉曼峰强度都随凋亡时间的延长而降低, 反映酵母细胞在凋亡过程中, 细胞内核酸、蛋白质、脂质等大分子物质的含量随时间变化逐步减少; 1604 cm^{-1} 下降幅度最大, 到凋亡后期下降 60%, 反映细胞凋亡过程中能量代谢受阻, 呼吸产能活力下降, 推测与麦角固醇结构与功能改变有关。单个细胞凋亡过程动态的光谱变化显示, 归属于蛋白质等生物大分子的光谱强度也呈下降趋势, 但是在 $90\sim 120\text{ min}$ 和 $125\sim 167\text{ min}$ 时间段里, 850 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} 和 1665 cm^{-1} 拉曼峰强度出现恢复性的上升和下降过程, 说明群体细胞平均后的光谱数据信息, 掩盖了个体细胞凋亡过程中一些信息的变化, 群体细胞的结果不能完全反映个体细胞真实的生理状态。【结论】LTRS 基于单个细胞水平上的研究, 能更直接、真实地反映 UV 胁迫下细胞内生物大分子变化的动态信息。

关键词: 拉曼光谱 酵母 UV 照射 凋亡 单细胞分析

中图分类号: O657.37 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2015)02-0113-08

Abstract:【Objective】The apoptosis of yeast cells was induced by ultraviolet and its process was studied in order to understand the changes of biological macromolecules and the molecular mechanism. 【Methods】Laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) was used to monitor the dynamics of the intracellular biological macromolecules in real-time during the apoptosis process of yeast cells stressed with UV at both cellular population level and single-cell level, respectively. 【Results】Lethal doses of UV irradiation could cause cell apoptosis. The intensities of

收稿日期: 2014-11-14

修回日期: 2015-03-05

作者简介: 黄庶识(1964-), 男, 研究员, 主要从事应用微生物及分子光谱研究。

* 广西自然科学基金重点项目(2014GXNSFDA118012)和国家自然科学基金项目(No. 31160018)资助。

** 通讯作者: 陈丽梅(1964-), 女, 博士, 教授, 主要从事分子生物学研究, E-mail: chenlimeikm@yahoo.com.cn.

Raman peaks, which were assigned to nucleic acids (1085 cm^{-1} , 1300 cm^{-1}), proteins (850 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1604 cm^{-1} , 1655 cm^{-1}) and lipids (1085 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 1440 cm^{-1}), decreased significantly as a function of the duration of cell apoptosis at cellular population level, suggesting that the content of nucleic acids, proteins and lipids reduced gradually during the time that the yeast cells were undergoing apoptosis induced by UV. The peak of 1604 cm^{-1} , which was called the Raman spectroscopic signature of life in yeasts, was a marker of Raman band for cell metabolic activity. Its intensity had the sharpest decline by 60% at the late stage of apoptosis, implying that the energy metabolism and breathing capacity were decreased during the process of cell apoptosis, which related to the changes of ergosterol structure and function theoretically. However, the changes of the intensities of Raman peaks at 850 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} and 1665 cm^{-1} between the group cells and the single cells were different significantly in the period of 90~120 min and 125~167 min, demonstrating that the heterogeneities of the single cells were masked by the average spectroscopy of the population cells.

【Conclusion】LTRS can be used to directly and truthfully detect the kinetics of apoptotic process of yeast cells under UV irradiation at the single cell level and probe cellular heterogeneity.

Key words: Raman spectrum, yeast, ultraviolet irradiation, apoptosis, single cell analysis

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20150401.001

0 引言

【研究意义】作为模式生物的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 与人类细胞在基因结构、代谢调控和信号传导途径等方面具有很高的同源性^[1]。因此, 酵母在基础生物学、生物医学以及基因工程研究方面具有许多内在优势。自 1996 年酿酒酵母基因组序列被公布以后^[2], 研究发现, 酵母存在与多细胞生物凋亡调节相似的各种功能基因和基本的凋亡机制, 以酵母作为研究细胞凋亡的生物模型, 有助于加深对细胞凋亡机制的了解。**【前人研究进展】**细胞凋亡 (apoptosis) 是指细胞在一定的生理或病理条件下, 由多种基因控制的有序的自主死亡过程, 涉及系列基因激活、表达以及调控等作用。生物体通过细胞凋亡的方式, 清除对有机体无用的细胞, 参与机体的防御机制, 清除入侵的病菌, 保持生命正常代谢运动, 是生物体适应生存环境的一种策略。作为一种低等真核单细胞生物的酵母, 直到 1997 年才首次被发现其在死亡时具有与多细胞生物类似的凋亡表现^[3]; 之后又发现, 通过外源性化合物 H_2O_2 ^[4]、HOCl^[5]、蔗糖^[6]等处理以及 UV 照射^[7,8]可诱导酵母发生凋亡。UV 能够破坏机体细胞中 DNA 的分子结构, 造成细胞死亡^[9], 而细胞基因组 DNA 的损伤在 UV 诱导的细胞凋亡中扮演重要角色。当 UV 照射细胞后, DNA 作为 UV 的一个主要靶标, 引起 DNA 损伤, 诱导细胞内 P53 等多种凋亡调控基因表达增加, 导致细胞凋亡^[10~12]。单细胞激光光镊拉曼光谱技术 (LTRS) 是实时研究细胞凋亡过程其内含物结构和含量改变的一种单细胞分析工具, 可以实时检测溶液中单个活细胞生理生化变化过程^[13,14], 可应用于药物诱导细胞凋亡的研究。通过分析细胞内

生物大分子脂类、核酸和蛋白质的拉曼特征峰的改变, 可知其表征的大分子结构或含量的改变并检测细胞的凋亡^[15,16]。**【本研究切入点】**UV 辐射引起酵母细胞 DNA 损伤进而导致酵母凋亡, 由于酵母细胞凋亡过程的复杂性以及实时损伤检测方法的局限性, 本研究应用 LTRS 实时观测、记录 UV 照射后酵母细胞凋亡过程中的光谱变化, 探知 DNA 的损伤以及细胞状态的变化。**【拟解决的关键问题】**通过研究酿酒酵母在致死 UV 剂量照射后, 在 YEPD 培养基培养过程中, 不同时间点几个特征峰强度变化的趋势, 了解 UV 诱导酵母发生凋亡过程的生物大分子变化以及细胞凋亡的分子机制。

1 材料和方法

1.1 菌种

酿酒酵母 (*S. cerevisiae*, 菌种保藏编号: ATCC24859) 在 YEPD 培养基中进行复苏活化, 置于 -70°C 下 15% 甘油中保存。

1.2 培养基

YEPD 培养基 (Yeast extract peptone dextrose medium): 酵母膏 10.0 g/L, 葡萄糖 20.0 g/L, 蛋白胨 20.0 g/L, KH_2PO_4 2.0 g/L, pH 值为 6.0, 4 种成份分别于 121°C 、15 min 灭菌后再混合, 4°C 条件下保存备用 (不超过 14 d)。

1.3 酵母细胞培养

挑取单菌落于 YEPD 液体培养基中, 29°C 、150 r/min 培养过夜活化, 然后释液涂板, 30°C 培养 48 h。挑取单菌落在新鲜的 YEPD 液体培养基中培养 12 h 后, 按 1% 的接种量接种于新鲜的 YEPD 液体培养基中, 29°C 、150 r/min 培养 8 d。1500 r/min 离心, 去上清液后, 沉淀用 50 mM, pH 值为 7.5 的无菌 Tris

缓冲液洗涤 3 次后用 Tris 缓冲液悬浮,4℃ 黑暗保存备用。

1.4 酵母同步细胞分离

应用 Percoll 连续密度梯度分离法^[13] 分离酵母同步细胞,2 mL 聚丙烯离心管中加入 Percoll 等渗贮备液,角式转头、19320 g 离心 15 min 形成 Percoll 连续密度梯度,将酵母细胞悬浮物铺在 Percoll 梯度液顶部,25℃、400 g 离心 60 min 使细胞分层,穿刺法取出细胞,Tris 缓冲液离心漂洗,重复 3 次,最后用 Tris 缓冲液悬浮,4℃ 保存备用。

1.5 UV 处理酵母细胞以及凋亡检测

1.5.1 不同剂量 UV 胁迫酵母细胞后的存活率

取 0.5 mL 酵母同步细胞悬浮液,用 Tris 缓冲液稀释 20 倍,分别吸取 2 mL 细胞溶液到编号 1~7 号的培养皿(Φ 18 mm)中,摇动培养皿使液体均匀铺在培养皿底部,然后分别置于 15 W,265 nm 紫外灯下 10 cm 照射处理,照射时间根据紫外照射照度计(ZDZ-1,上海市嘉定学联仪器厂)在测定点上的测定数据计算,照射过程中转动培养皿,使每个细胞得到均匀照射;1~7 号的处理强度分别是 0 J/m²,30 J/m²,60 J/m²,90 J/m²,120 J/m²,150 J/m²,180 J/m²。随后离心收集酵母细胞,分别用 Tris 缓冲液悬浮细胞,将悬浮液稀释为 10⁴ 个细胞/L,分别取 100 μ L 菌液涂布于 YEPD 固体培养基上,30℃ 培养 2 d,每个处理重复 3 次,统计菌落数并计算存活率,确定致死 UV 照射剂量。

1.5.2 致死 UV 剂量处理酵母细胞凋亡的 DAPI 检测

吸取 2 mL 酵母同步细胞悬浮液置于培养皿中,以 120 J/m² 强度 UV 照射,离心收集酵母细胞,2 mL Tris 缓冲液悬浮,然后将细胞悬浮液转到含 10 mL YEPD 培养基的 25 mL 三角瓶中,30℃ 培养,于 0 h,1 h,2 h,3 h 和 4 h 的时间点吸取 0.5 mL 细胞液进行凋亡检测,以未照射 UV 的细胞做对照。按 DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole,4,6-二氨基-2-苯基吡啶)试剂盒说明,将母液用甲醇稀释 10 倍,制备成 1~2 μ g/mL 的 DAPI 工作液,按说明书操作步骤进行细胞染色,最后用试剂盒 Buffer A 重悬细胞。荧光显微镜下 340/380 nm 紫外光激发,镜检并拍照。

1.6 酵母细胞拉曼光谱收集及数据处理

1.6.1 致死剂量 UV 照射酵母细胞的群体拉曼光谱测定

以 120 J/m² 强度 UV 照射酵母细胞,离心取上清液,Tris 缓冲液悬浮,吸取 10 μ L 悬浮液置于样品池内(预先加入 150 μ L YEPD 培养基),100 \times 油镜

下,分别在 0 h,1 h,2 h,3 h 和 4 h 的时间点,以光镊子随机捕获酵母细胞并测定其拉曼光谱,每个时间点测定 30 个细胞。激光强度为 16 mW,激发波长为 778 nm,积分时间为 20 s。0 h 时间点样品池内用 Tris 缓冲液替代。

1.6.2 致死剂量 UV 照射单个酵母细胞的拉曼光谱测定

载玻片加入 150 μ L YEPD 培养基后,将以 120 J/m² 强度 UV 照射酵母细胞悬浮液 2 μ L 注入样品池中,盖上盖玻片,100 \times 油镜下,以光镊子捕获单个酵母细胞,实时测定单个酵母细胞的拉曼光谱。激光强度设定为 3.5 mW,激发波长为 778 nm,积分时间为 60 s,每隔 7 min 记录一次光谱,记录后,将激光挡住,将细胞从光镊子中放出来,到下一个时间点再重新俘获细胞进行测定,连续测定 4 h,重复测定 10 个细胞。

1.6.3 光谱数据处理

光谱数据用自编软件进行去背景平滑,导入 Origin8.1 软件处理后,应用 Raman Baseline 软件进行基线校正,应用 Origin8.1 软件截取 600~1800 cm⁻¹ 信号峰集中的指纹区作图分析。

2 结果与分析

2.1 不同强度 UV 胁迫酵母细胞后存活率

图 1 结果显示,不同强度 UV 胁迫酵母细胞,其存活率随着 UV 强度增加而逐步降低,当 UV 强度达到 120 J/m² 时,酵母细胞的存活率为 1.09%,接近于 0,120 J/m² 是酵母细胞的致死强度,酵母细胞存活率与 UV 强度之间存在依赖关系。

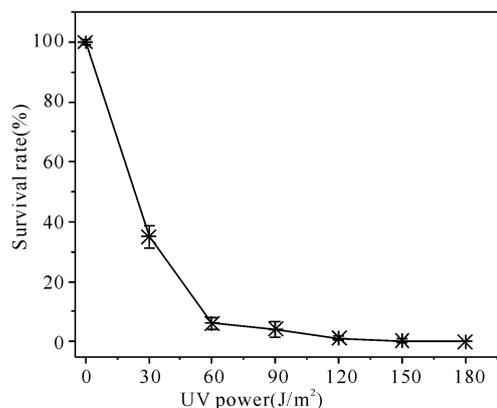


图 1 不同强度 UV 胁迫酵母细胞后的成活率

Fig. 1 Survival rate of yeast after irradiation in different UV doses

2.2 酵母细胞凋亡的 DAPI 检测

正常细胞的细胞膜有半通透性,DAPI 可以透过细胞膜进入细胞内,与细胞核的 DNA 产生非嵌入结

合,产生比 DAPI 自身强 20 多倍的荧光,在紫外光激发下产生蓝色荧光。细胞凋亡过程中,细胞膜通透性逐渐增加,发生凋亡的细胞摄取 DAPI 染料量增加,会产生更强的蓝光荧光。通过比较细胞荧光强度以及细胞核形态变化,可以鉴别细胞是否发生凋亡。

用 120 J/m^2 强度的 UV(致死强度)照射酵母细胞后,在 YEPD 中培养,对不同培养时间点的细胞进行 DAPI 染色,随着培养时间的延长,酵母细胞逐步呈现出典型的细胞凋亡形态(图 2)。正常酵母细胞经 DAPI 染色后,细胞核发出较弱的蓝色荧光,核形完整,染色质均匀(图 2a);UV 处理后的酵母细胞,在 YEPD 培养表达 0 h 和 1 h 后,DAPI 染色结果与正常酵母细胞差异不大(图 2b 和图 2c),说明在细胞凋亡初始阶段,膜通透性没有增加,随着培养时间的延长,细胞核的荧光越来越明亮,细胞核边缘不规则;培养 4 h 后,细胞核向外周聚集,核内的染色质凝聚呈新月状分布于核内周边,有的细胞核破裂形成碎片,细胞出现明显的凋亡特征,表明细胞进入凋亡的后期。说明酵母被致死剂量的 UV 辐射之后,随着处理时间的延长,细胞因 DNA 损伤而产生的有序变化凋亡过程中,DNA 降解,染色质片段逐步断裂,从外观上看,细胞质膜在整个过程中保持了良好的完整轮廓,但是通透性明显增加,进入细胞的染料随之增加,蓝色荧光更加明亮。

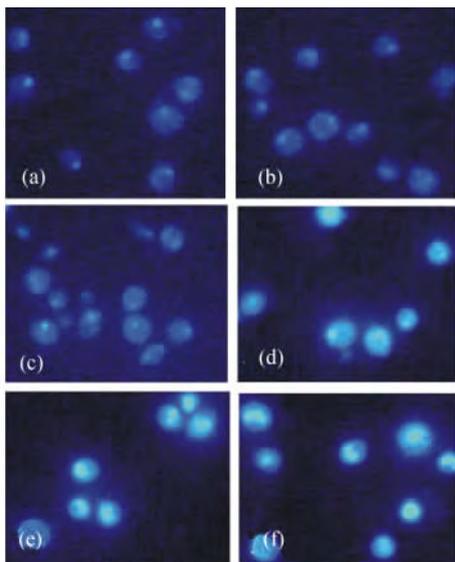


图 2 不同时间点的 DAPI 染色荧光图

Fig. 2 The DAPI photofluorograms of yeast cells from 0 h to 4 h

(a) $0 \text{ J/m}^2, 0 \text{ h}$; (b) $120 \text{ J/m}^2, 0 \text{ h}$; (c) $120 \text{ J/m}^2, 1 \text{ h}$; (d) $120 \text{ J/m}^2, 2 \text{ h}$; (e) $120 \text{ J/m}^2, 3 \text{ h}$; (f) $120 \text{ J/m}^2, 4 \text{ h}$

2.3 120 J/m^2 强度 UV 胁迫酵母细胞凋亡过程的拉曼光谱

用致死剂量 120 J/m^2 强度 UV 照射酵母细胞

后,将酵母细胞在培养基中进行孵育,在细胞凋亡过程中,不同时间点的平均拉曼光谱及其主要特征峰强度变化趋势如图 3 所示。随着培养时间的延长,酵母细胞的几个拉曼光特征峰强度呈下降趋势(图 3b),到凋亡晚期,除了 1604 cm^{-1} 峰强度下降大约 60% 以

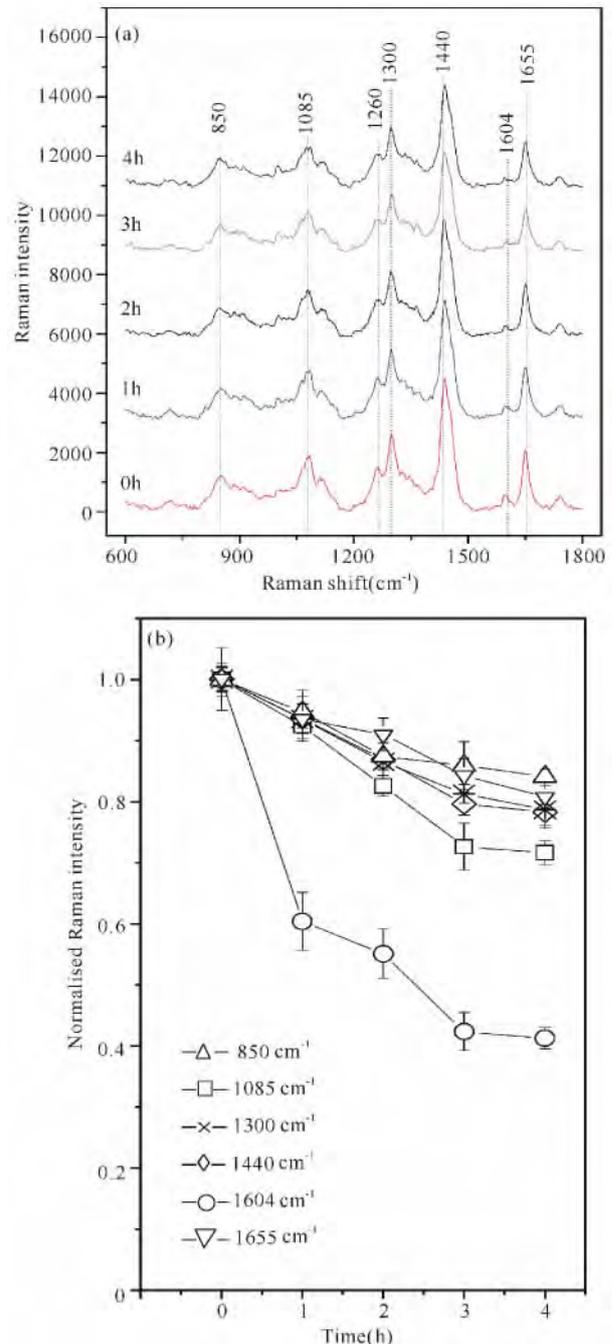


图 3 120 J/m^2 UV 胁迫酵母后的拉曼光谱

Fig. 3 Raman spectroscopy after UV irradiation of 120 J/m^2 dose

(a) 不同时间点的群体细胞平均拉曼光谱; (b) 主要特征峰强度变化趋势

(a) The average Raman spectra of cell population at different time points; (b) The change trend of the main characteristic peaks

外,其它光谱下降大约 20%。850 cm^{-1} 峰归属于酪氨酸的对羟基苯基呼吸振动,1085 cm^{-1} 峰归属于核酸的 O=P-O 伸缩振动和脂类的 C-C 扭曲旋转,1260 cm^{-1} 峰归属于蛋白质的酰胺 III 以及脂类的 CH 变性振动,也包括 DNA 的胞嘧啶和腺嘌呤,1300 cm^{-1} 峰归属于脂类的 CH_2 扭曲和腺嘌呤,1440 cm^{-1} 峰归属于脂类和蛋白质的 CH 变性振动,1604 cm^{-1} 峰归属于酪氨酸和苯丙氨酸,1655 cm^{-1} 峰归属于酰胺 I α -螺旋^[17,18],上述光谱的变化结果和我们之前利用乙醇胁迫酵母凋亡过程的光谱变化趋势一致^[19],反映酵母细胞内生物大分子核酸、蛋白质和脂类的含量随着细胞凋亡加重而减少。

比较致死剂量 UV 照射的酵母在 YEPD 培养基生长情况,未经 UV 照射的正常细胞在 YEPD 培养基生长过程中,其几个主要拉曼特征峰的变化趋势与 UV 处理的酵母有明显不同(图 4),850 cm^{-1} ,1300 cm^{-1} ,1440 cm^{-1} 和 1665 cm^{-1} 峰强在 0~3 h 是逐渐上升,增加值大约 20%,之后呈下降趋势,1085 cm^{-1} 峰强则在 1~2 h 和 3~4 h 呈下降趋势,上述几个拉曼峰总体趋势是上升的,1604 cm^{-1} (图 4c) 峰强变化趋势和 1085 cm^{-1} 峰(图 4b) 类似,但是其总体趋势是保持一种平衡的变化。本研究所用的细胞是经离心后纯化的同步细胞,我们之前的研究结果显示,这些同步细胞在 YEPD 培养基中正常生长的延滞期大约 3 h,在这期间,细胞的合成代谢活跃,核糖体、各种酶类和 ATP 的合成加速,之后进入细胞分裂增殖阶段,细胞内主要大分子含量呈下降趋势,细胞光谱变化趋势基本反映细胞的生长状态。而致死剂量 UV 照射的酵母细胞,DNA 受到严重损伤,细胞在培养过程中感受到相应的信号刺激,启动细胞凋亡控制开关的开启,引起细胞凋亡^[20]。因此,UV 处理过的酵母细胞在 YEPD 中表达培养,表现出与正常细胞不同的生长状态,并通过归属于不同生物大分子光谱强度随时间延长而下降而体现出来(图 3)。

在细胞 DNA 受损严重时,Caspase-3 被激活,从而介导细胞凋亡^[21]。细胞凋亡过程中最早发生的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyI aspartate specific proteinase,Caspase)水解活化事件,启动 Caspases 活化后,开启细胞死亡程序,进一步活化下游 Caspase,将凋亡信号放大,并向下游传递,整个过程涉及系列基因的激活、表达以及调控^[22,23]。Caspase 直接作用于胞骨架调节有关的酶或蛋白,裂解核纤层蛋白,凝胶原蛋白等,改变细胞结构,导致细胞染色质的固缩。凋亡细胞特征性表现包括 DNA 裂解为 200 bp 左右的片段,染色质浓缩,蛋白质构象改变,细胞

膜活化,膜的完整性和通透性受到破坏或改变,影响糖和氨基酸等的吸收,引起核苷酸、氨基酸、蛋白质以及 K 离子渗漏等^[24,25]。所以,在整个凋亡进程中,归属于蛋白质、核酸、脂类物质的光谱呈下降的趋势,提示酵母细胞凋亡过程中,膜通透性增加,胞内蛋白质、核酸逐步从细胞膜漏出胞外,使其胞内含量逐步降低。

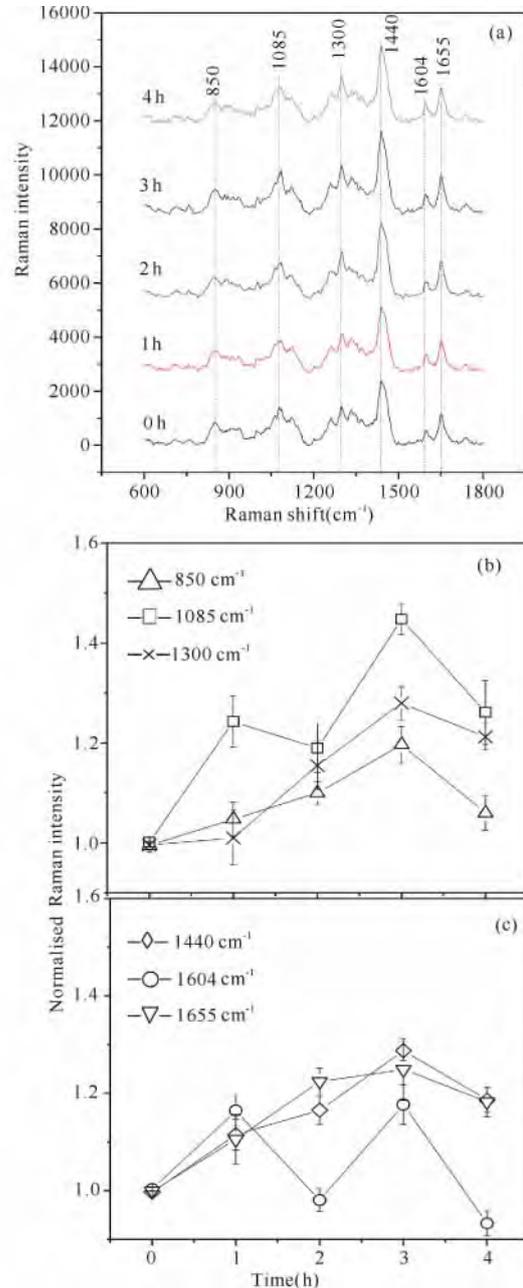


图 4 正常生长的酵母细胞的拉曼光谱

Fig. 4 Raman spectroscopy of yeast cells after growth in YEPD

(a) 不同时间点的群体细胞平均拉曼光谱;(b 和 c) 主要特征峰强度变化趋势

(a) The average Raman spectra of cell population at different time points; (b and c) The change trend of the main characteristic peaks

在酵母凋亡过程中,归属腺嘌呤的 721 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} 峰强随着凋亡的进程而降低(图 3a),ATP 由腺嘌呤和磷酸分子组成,这几个峰的降低可能和 ATP 合成下降有关。正常细胞受到辐照造成 DNA 受损时,细胞会启动 DNA 的修复, DNA 修复酶和 *p53* 蛋白表达增加, DNA 修复过程中需要消耗 ATP^[26],如果 DNA 受损严重,细胞无法完全修复 DNA,修复过程导致线粒体结构的严重破坏,促使 ATP 的合成进一步降低,使线粒体内的 Ca^{2+} 、细胞色素 C 外流到细胞质,促成细胞进入 Caspase 凋亡途径^[27]。

酵母细胞能量代谢与 1604 cm^{-1} 谱峰密切相关,其强度的变化敏感反映酵母线粒体的代谢活性以及呼吸水平^[28~31]。酵母细胞凋亡过程中, 1604 cm^{-1} 谱峰强度随时间变化而呈下降趋势(图 3b),YEPD 培养 1 h, 1604 cm^{-1} 峰强下降 40%,然后缓慢下降,4 h 后,总体下降 60%,表明在细胞的凋亡过程中,酵母线粒体呼吸产能的活力下降,造成细胞的能量代谢严重受阻,推测 1604 cm^{-1} 谱峰强度变化与线粒体结构受到破坏相关,与 721 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} 变化有关联性。另外, Huang 等^[32,33] 的研究认为, 1604 cm^{-1} 特征峰在酵母细胞中主要来自麦角固醇的贡献,该拉曼峰可以作为麦角固醇的标记。麦角固醇在酿酒酵母中的含量可高达 7%~10%,是酵母甾醇类中最主要的一种化合物,主要存在于细胞质膜磷脂分子和蛋白质之间,对于细胞质膜结构的完整性,质膜的流动性,细胞活力以及物质运输,膜蛋白的定位活性等方面起着重要作用^[34],酵母细胞凋亡过程中 1604 cm^{-1} 特征峰的下降,可能与麦角固醇结构与功能变化有关,进一步影响质膜的结构与功能,尤其是线粒体膜的功能。在细胞凋亡过程中麦角固醇如何影响质膜的结构与功能以及细胞活性有待深入研究。

2.4 120 J/m^2 强度 UV 胁迫单个酵母细胞凋亡过程的拉曼光谱

图 5 是对测定的 10 个细胞的光谱进行平均并进行归一化处理,结果显示,单个酵母细胞在连续测定 4 h 的时间点上,6 个特征峰强度随着培养时间的变化而呈现出逐渐下降的趋势,总体变化趋势和下降的幅度,与随机测定 30 个群体细胞的结果类似,即 850 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} 和 1665 cm^{-1} 峰强到了凋亡后期(4 h),下降 20%左右, 1604 cm^{-1} 下降大约 60%(图 3b)。但是,单个细胞的拉曼光谱变化趋势与基于群体细胞水平上的平均光谱变化趋势在细节上明显不同, 850 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} ,

1300 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} 和 1665 cm^{-1} 峰强在 90~120 min 和 125~167 min 的两个时间段里,出现上升再下降的过程,而 1604 cm^{-1} 峰强的下降显得平顺(图 5)。

对于 UV 胁迫酵母细胞凋亡过程中,群体细胞生理变化的光谱数据是来自群体细胞平均值,只反映群体细胞水平上的平均结果。由于个体细胞之间的异质性(heterogeneity),每个细胞都具有其独特性的特征。因此,研究群体细胞得出的结果,其群体信息会掩盖单个细胞内在差异性,不能真实反映出其个体性的特征。另外,实时动态研究群体细胞生理生化变化过程往往受到时间和研究手段的限制,无法选取更多时间点来进行研究,而 LTRS 可以实现单个酵母细胞生理生化变化过程的实时监测^[14]。UV 胁迫酵母细胞后,LTRS 可以实时监测单个细胞在 YEPD 培养基中凋亡过程中的动态变化,利用光镊子捕获同一个细胞,在 0~4 h 内,每隔 7 min 记录一次光谱数据,获得每个细胞在 4 h 内生物大分子变化过程的实时数据,可以真实反映出单个细胞在胁迫过程中的生理变化特性和动态变化,可以发现基于群体水平上被掩盖的细节,显示 LTRS 技术在单个细胞水平上的研究优势。

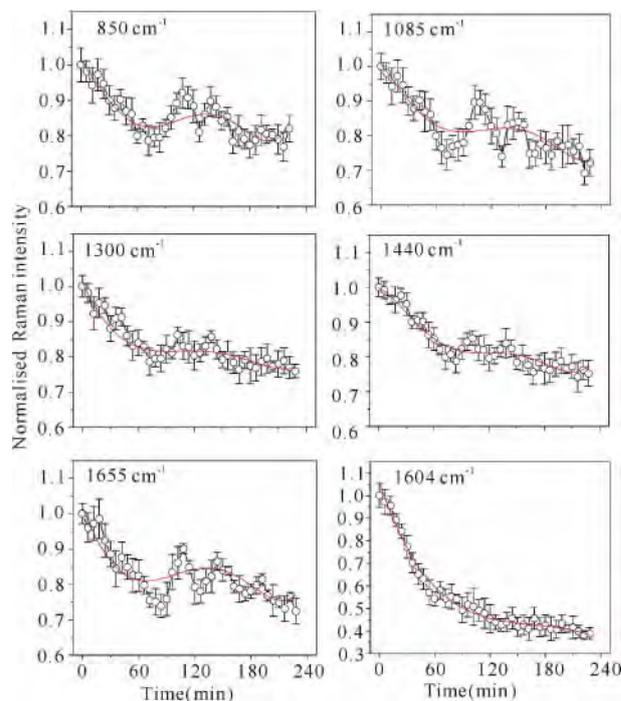


图 5 120 J/m^2 强度 UV 胁迫单个酵母细胞后不同时间点其主要特征峰强度变化趋势

Fig. 5 The trend of the main Raman characteristic peaks of single yeast cells at different time points after UV irradiated with 120 J/m^2 dose

酵母细胞在凋亡过程中,质膜结构的完整性以及流动性发生改变,造成细胞内含物包括蛋白质、脂类、

核酸等大分子外流,细胞活性以及能量代谢逐渐降低。所以上述生物大分子的特征峰强度随着凋亡过程的推进而不断下降。UV 照射引起细胞 DNA 损伤,到启动细胞凋亡过程,涉及到 DNA 修复以及凋亡过程系列基因表达、相关酶的形成或者激活等复杂的过程。在细胞启动凋亡以后,Caspase 被激活,裂解抑制物而激活内源性核酸内切酶,将 DNA 水解为寡核苷酸,这些核苷酸透过细胞膜使细胞内核酸物质流失,凋亡晚期 DNA 降解加剧,膜通透性更高,降解的核酸扩散到细胞外,细胞核酸碱基的含量下降,表现为归属于核酸拉曼峰强的下降。同样,尽管凋亡级联反应过程需要系列促凋亡蛋白酶的参与,如热激蛋白(HSP)、促凋亡蛋白 Bax 表达明显增强,但是胞内蛋白质含量也呈下降趋势,原因是与细胞增殖相关的一些蛋白的表达降低,蛋白质合成代谢减弱;在另一方面,凋亡过程还伴随着某些蛋白的水解,如 Caspases 成员被水解激活,然后催化其他蛋白质水解,最终,伴随着细胞凋亡过程中膜通透性增高,胞内蛋白质从胞膜内释放到胞外,总体上造成细胞内蛋白质含量降低。因而,归属于蛋白质的峰强度随之下降。但是,在这个过程中,在 90~120 min 和 125~167min 的两个时间段里,尽管呼吸标志峰 1604 cm^{-1} 强度呈下降趋势,显示细胞能量代谢和活性在下降中,850 cm^{-1} ,1085 cm^{-1} ,1300 cm^{-1} ,1440 cm^{-1} 和 1665 cm^{-1} 拉曼峰强度反而出现恢复性的上升和下降过程(图 5),推测与凋亡相关蛋白酶的过量表达有关,具体何种酶表达以及这些酶的功能和作用有待进一步研究。

近年来的细胞学研究表明,单个细胞的特定行为,以及细胞间个体化差异与异质性,对于生物体许多关键生命过程起至关重要的作用。但是,许多实验过程,尤其对于细胞内组分的分析研究,由于条件的限制,对单细胞行为分析的难度比较大,都是基于大量细胞平均测量所获得的结果进行验证,这种对细胞群体的统计分析结果,掩盖了独立个体样本的行为以及生命现象中单个个体存在的随机行为,不能完全正确反映复杂生物体系的全面真实信息。基于 LTRS 的单个细胞分析技术,能够克服群体分析中平均结果对个别信息掩盖的局限性,对于细胞学研究有重要的意义。

3 结论

UV 能够诱导酵母细胞发生凋亡,120 J/m^2 是酵母细胞的致死强度。致死剂量 UV 照射酵母细胞后,采用 LTRS 研究酵母细胞凋亡的过程中拉曼光

谱强度变化,结果显示,归属于核酸的 1085 cm^{-1} ,1300 cm^{-1} 、蛋白质的 850 cm^{-1} ,1440 cm^{-1} ,1604 cm^{-1} ,1650 cm^{-1} 和脂类的 1085 cm^{-1} ,1300 cm^{-1} ,1440 cm^{-1} 拉曼峰强度都随凋亡时间的延长而降低,反映酵母细胞在凋亡过程中,细胞内核酸、蛋白质、脂质等大分子物质的含量随时间变化逐步减少;1604 cm^{-1} 下降幅度最大,到凋亡后期下降 60%,反映细胞凋亡过程中能量代谢受阻,呼吸产能的活力下降,推测与麦角固醇结构与功能改变有关。进一步实时研究单个细胞凋亡过程动态的光谱变化,结果显示,850 cm^{-1} ,1085 cm^{-1} ,1300 cm^{-1} ,1440 cm^{-1} 和 1665 cm^{-1} 拉曼峰强度在 90~120 min 和 125~167 min 时间段里,出现恢复性的上升和下降过程,基于单个细胞水平上的信息能够真实反映出细胞凋亡过程中细胞生理动态变化,能够克服群体细胞平均后的数据信息对个体的某些信息掩盖的缺点,体现 LTRS 在单细胞分析上的优势。

参考文献:

- [1] Botstein D, Chervitz S A, Cherry J M. Yeast as a model organism [J]. *Science*, 1997, 277(5330): 1259-1260.
- [2] Goffeau A, Barrenll G, Bussey H, et al. Life with 6000 genes [J]. *Science*, 1996, 274: 546, 563-567.
- [3] Madeo F, Frohlich E, Frohlich K U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 1997, 139(3): 729-734.
- [4] Ludovico P, Sousa M J, Silva M T, et al. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid [J]. *Microbiology*, 2001, 147: 2409-2415.
- [5] King D A, Hannum D M, Qi J S. HOCl-mediated cell death and metabolic dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 423: 170-181.
- [6] Granot D, Levine A, Dor-Hefetz E. Sugar-induced apoptosis in yeast cells [J]. *FEMS Yeast Res*, 2003, 4: 7-13.
- [7] Del Carratore R, Della Croce C, Simili M, et al. Cell cycle and morphological alterations as indicative of apoptosis promoted by UV irradiation in *S. cerevisiae* [J]. *Mutation Research*, 2002, 513(1-2): 183-191.
- [8] 赵华, 伍丹. UV-B 诱导的酵母凋亡现象及调节机制的作用 [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(6): 826-830.
Zhao H, Wu D. UV-B irradiation regulates apoptosis in yeast [J]. *Microbiology*, 2009, 36(6): 826-830.
- [9] Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis [J]. *J Radiat Res*, 2011, 52: 115-125.
- [10] Kulms D, Yarosh D, Luger T A, et al. Nuclear and membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to ultraviolet B radiation [J]. *PNAS*, 1999, 96: 7974.
- [11] 冯莉, 苏奉发, 李丽, 等. 紫外线致 Hep2G2 细胞凋亡的

- 分子机制初探 [J]. 川北医学院学报, 2004, 19(10): 16-19.
- Feng L, Su F F, Li L, et al. Molecular events associated with cell apoptosis and tissue damage induced by ultra-violet radiation in Hep-G2 [J]. Journal of North Sichuan Medical College, 2004, 19(10): 16-19.
- [12] Bose P, Thakur S, Thalappilly S, et al. ING1 induces apoptosis through direct effects at the mitochondria [J]. Cell Death Dis, 2013, 4(9): e788.
- [13] 赖钧灼, 刘斌, 王桂文, 等. 单细胞拉曼光谱结合多元统计方法分析不同酿酒酵母菌株的成分差异[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(2): 412-417.
- Lai J Z, Liu B, Wang G W, et al. Analysis of components difference of yeast starins based on laser tweezers raman spectroscopy combined with multistatistical analysis[J]. Spectrosc Spect Anal, 2011, 31(2): 412-417.
- [14] 卢明倩, 董蓉, 温顺华, 等. 单细胞激光拉曼光谱检测重组大肠杆菌细胞表达甲酸脱氢酶[J]. 分析化学, 2012, 40(12): 1845-1851.
- Lu M Q, Dong R, Wen S H, et al. Detection of formate dehydrogenase protein expression in single living *Escherichia coli* cells by laser tweezers Raman spectroscopy[J]. Chin J Anall Chem, 2012, 40(12): 1845-1851.
- [15] Yao H L, Tao Z H, Ai M, et al. Raman spectroscopic analysis of apoptosis of single human gastric cancer cells [J]. Vib Spectrosc, 2009, 50(2): 193-197.
- [16] Tobias J M, Douglas S T, Denise M K, et al. Detection of doxorubicin-induced apoptosis of leukemic T-lymphocytes by laser tweezers Raman spectroscopy [J]. Biomed Opt Express, 2010, 1(4): 1138-1147.
- [17] 许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 125-141.
- XU Y M. Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 125-141.
- [18] Singh G P, Volpe G, Creely C M, et al. The lag phase and G1 phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy[J]. J Raman Spectrosc, 2006, 37(8): 858-864.
- [19] 王巧贞, 卢明倩, 李冰, 等. 乙醇胁迫酵母凋亡过程的单细胞拉曼光谱研究[J]. 光子学报, 2014, 43(6): 0630005-1-9.
- Wang Q Z, Lu M Q, Li B, et al. Study on the apoptosis process under high concentrations of ethanol stress at a single cell level with Raman spectroscopy [J]. ACTA Photonica Sinica, 2014, 43(6): 0630005-1-9.
- [20] Hsin-Lung Lo, Satoshi Nakajima, Lisa Ma, et al. Differential biologic effects of Cpd and 6-4Pp UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest [J]. BMC Cancer, 2005, 5(1): 135 (1-9).
- [21] Romashko J, Horowitz S, Franek W R, et al. MA. PK pathways mediate hyperoxia induced oncotic cell death in lung Pithelial cells [J]. Free Radic BioMed, 2003, 35: 978-993.
- [22] Ola M S, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 351(1-2): 41-58.
- [23] Kuranaga E. Beyond apoptosis: Caspase regulatory mechanisms and functions *in vivo* [J]. Genes Cells, 2012, 17(2): 83-97.
- [24] Häcker G. The morphology of apoptosis [J]. Cell Tissue Res, 2000, 301(1): 5-17.
- [25] Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516.
- [26] Kato R, Kataoka M, Kamikubo H, et al. Direct observation of three conformations of MutS protein regulated by adenine nucleotides [J]. J Mol Biol, 2001, 309(1): 227-238.
- [27] 周清明, 张红, 党秉荣, 等. 辐射诱导的 DNA 修复与细胞凋亡的 ATP 调控 [J]. 原子核物理评论, 2005, 22(2): 225-228.
- Zhou Q M, Zhang H, Dang B R, et al. Regulation of ATP on DNA repair and cell apoptosis induced by irradiation [J]. Nuclear Physics Review, 2005, 22(2): 225-228.
- [28] Huang Y S, Karashima T, Yamamoto M, et al. Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time and space-resolved Raman spectroscopy [J]. Biochemistry, 2005, 44(30): 10009-10019.
- [29] Huang Y S, Nakatsuka T, Hamaguchi H O. Behaviors of the "Raman spectroscopic signature of life" in single living fission yeast cells under different nutrient, stress, and atmospheric conditions [J]. Appl Spectrosc, 2007, 61(12): 1290-1294.
- [30] Onogi C, Hamaguchi H O. Photobleaching of the "Raman spectroscopic signature of life" and mitochondrial activity in rho-budding yeast cells [J]. J Phys Chem B, 2009, 113(31): 10942-10945.
- [31] Pully V V, Otto C. The intensity of the 1602 cm^{-1} band in human cells is related to mitochondrial activity [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2009, 40(5): 473-475.
- [32] Chiu L D, Hullin-Matsuda F, Kobayashi T, et al. On the origin of the 1602 cm^{-1} Raman band of yeasts: Contribution of ergosterol [J]. J Biophotonics, 2012, 5(10): 724-728.
- [33] Chiu Y F, Huang C K, Shigeto S. *In vivo* probing of the temperature responses of intracellular biomolecules in yeast cells by label-free Raman microspectroscopy [J]. Chembiochem, 2013, 14(8): 1001-1005.
- [34] Iwaki T, Iefuji H, Hiraga Y, et al. Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 3): 830-841.

(责任编辑: 竺利波)