

引文格式:

苏兆卿,黎朝,邓玉林.聚集诱导发光探针对模拟微重力下线粒体膜电位的监测及探针-水凝胶 3D 成像体系的构建[J]. 集成技术,2023, ? (?): ?-?.

Su ZQ, Li Z, Deng YL. Monitoring of Mitochondrial Membrane Potential under Simulated Microgravity by an Aggregation-Induced Emission Probe and Construction of a Probe-Hydrogel 3D Imaging System[J]. Journal of Integration Technology, 2023, ?(?): ?-?.

聚集诱导发光探针对模拟微重力下线粒体膜电位的监测及探针-水凝胶 3D 成像体系的构建

苏兆卿^{1,3} 黎朝^{2,3*} 邓玉林^{1,3*}

¹(北京理工大学生命学院 北京 100081)

²(北京理工大学医学技术学院 医工融合研究院 北京 100081)

³(北京理工大学生物医药成分分离与分析北京市重点实验室 北京 100081)

摘要: 空间特殊环境可引起宇航员机体损伤,对机体生理指标的监测对于损伤机制和保护手段的研究至关重要。微重力作为空间特殊环境之一可以导致线粒体功能紊乱。线粒体膜电位是线粒体功能是否正常的重要的参考指标,因此快速和简便地监测模拟微重力(SMG)下线粒体膜电位具有重要意义。本工作利用线粒体靶向聚集诱导发光(AIE)探针 TPE-Ph-In 实现了对细胞的免洗和长周期染色,及在 SMG 下对线粒体膜电位的成像监测;同时为克服长时间 SMG 下细胞贴壁不牢固的问题,采用水凝胶 Matrigel 包裹细胞进行培养,用 TPE-Ph-In 进行成像,构建了 AIE 探针-水凝胶 3D 成像体系。此工作为探究细胞的微重力效应提供了新的研究方法思路。

关键词 模拟微重力; 聚集诱导发光; 水凝胶; 线粒体膜电位; 3D 成像体系

中图分类号: R318.5 **DOI:**10.12146/j.issn.2095-3135.20221010001

Monitoring of Mitochondrial Membrane Potential under Simulated Microgravity by an Aggregation-Induced Emission Probe and Construction of a Probe-Hydrogel 3D Imaging System

SU Zhaoqing^{1,3} LI Zhao^{2,3*} DENG Yulin^{1,3*}

来稿日期: 2022-10-10 修回日期: 2023-1-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(22005028、22105020); 北京理工大学青年学者研究基金(XSQD-202023002, XSQD-202123005)

作者简介: 苏兆卿, 硕士研究生, 研究方向为荧光生物探针的开发; 黎朝(通讯作者), 博士, 特别副研究员, 研究方向为荧光凝胶, E-mail: lizhao@bit.edu.cn; 邓玉林(通讯作者), 博士, 教授, 研究方向为神经生物学、空间生物学和生物分析技术, E-mail: deng@bit.edu.cn。

¹(School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

²(Institute of Engineering Medicine, School of Medical Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

³(Beijing Key Laboratory for Separation and Analysis in Biomedicine and Pharmaceuticals, Beijing 100081, China)

*Corresponding Authors: lizhao@bit.edu.cn; deng@bit.edu.cn

Abstract: Space environment may cause damage to astronauts, therefore, it is critical to monitor the physiological indicators with the purpose to study the damage mechanisms and means of protection. As a special space environments, microgravity can lead to mitochondrial dysfunction. Since mitochondrial membrane potential is an important indicator of normal mitochondria, as a result, it is meaningful to monitor mitochondrial membrane potential under simulated microgravity (SMG) quickly and easily. In this work, a mitochondria-targeting aggregation-induced emission (AIE) probe (TPE-Ph-In) is developed to monitor mitochondrial membrane potential under SMG. In order to overcome the problem of insecure cell apposition under a prolonged time of SMG, an AIE probe-hydrogel 3D imaging system is constructed by seeding the cells into Matrigel and imaging the cells with TPE-Ph-In. This work provides a new approach to investigate the cells under microgravity environment.

Key words: simulated microgravity; aggregation-induced emission; hydrogel; mitochondrial membrane potential; 3D imaging system

Funding: This project is supported by the National Natural Science Foundation of China (22005028, 22105020), and the Beijing Institute of Technology Research Fund Program for Young Scholars (XSQD-202023002, XSQD-202123005).

1 引言

随着人类对太空的不断探索,太空飞行下宇航员的健康问题须得到关注^[1]。微重力作为空间的特殊环境之一,对宇航员的身体存在着潜在的威胁。研究表明,长期失重环境会对人体产生骨丢失^[2]、肌肉萎缩^[3]、心脏功能减弱^[4]和因力的变化而导致的流体相关问题^[5]。因此,研究微重力下人体的损伤机制对宇航员的健康保护十分重要。细胞是生物学中构成生物体的基本单位,其增殖、分化、衰老、损伤与人的生命活动息息相关^[6,7]。线粒体作为细胞有氧呼吸的主要场所是细胞中最重要的细胞器之一^[8]。因跨膜电位差形成的线粒体膜电位的稳定是维持线粒体功能正常的重要指标,其降低或崩溃是细胞凋亡过程中的重要特征^[9]。因此,在模拟微重力环境下对细胞中线粒体膜电位的多时间点监测对了解微重力环境下人体的损伤机制具有重要意义。

可视化监测技术拥有直观、低成本、操作简单等特点,现已被应用于各个领域来进行靶向物的监测^[10,11]。其中,荧光成像可视化技术拥有响应快速、信噪比高、灵敏度高和非侵入性的优势,已成为监测活细胞线粒体膜电位变化的有力方法^[12,13]。然而,传统的荧光探针有着聚集诱导淬灭效应(ACQ),即在固态或聚集态下会发生淬灭,从而引发了光稳定性差、成像前需要漂洗等不足。模拟微重力实验有着仪器(双轴回旋仪)复杂、监测周期长、停止模拟后效应恢复快等特点,ACQ染料的光稳定性差及不免洗的劣势不利于模拟微重力下长期、

实时性的成像^[14]。2001年唐本忠院士课题组发现了聚集诱导发光(AIE)现象^[15],即分子在稀溶液下不发光,在聚集态下有着很强的荧光^[16, 17]。近年来,越来越多的线粒体靶向聚集诱导发光探针被设计并开发出来,为线粒体膜电位的监测可视化提供了有力的工具^[18]。聚集诱导发光效应赋予了荧光探针免洗、光稳定性高的特点,不仅可以对细胞的线粒体进行长时间的可视化示踪,还可以在样品完成模拟微重力后进行迅速的成像,为及时捕捉微重力效应奠定了坚实的基础^[19-24]。

在本次工作中,我们用线粒体膜电位聚集诱导发光探针 TPE-Ph-In (TPI)来探究模拟微重力下多时间点的神经胶质瘤母瘤(U87-MG)细胞的膜电位变化。TPI有着优异的线粒体靶向性,生物相容性与出色的光稳定性与免洗特性,这些优异的特性使 TPI 可以对 U87-MG 细胞进行长时间的染色,同时可以完成对样品的线粒体膜电位短时间内的迅速成像。此外,针对于长时间(>72h)模拟微重力时细胞会因气泡的剪切力而无法贴壁的问题,提出了利用生物基质胶培养并保护细胞,同时用 TPI 进行荧光可视化成像的方法,从而构建了 AIE 探针-水凝胶 3D 成像体系,以此来克服长时间模拟微重力下存在的问题。本工作将聚集诱导发光和空间生命科学相结合,为研究细胞的模拟微重力效应提供了有力的方法。

2 材料和方法

2.1 材料与仪器

TPE-Ph-In(TPI)固体粉末从香港科技大学唐本忠院士课题组获得。氘代二甲基亚砷(DMSO-d₆)购买于 Sigma-Aldrich China Inc, 线粒体膜电位探针 Mito-tracker Green(MTG)与线粒体膜电位探针 TMRM、线粒体电子传递链抑制剂(CCCP)和胰蛋白酶消化液(0.25%)购买于中国的上海碧云天生物技术有限公司。胎牛血清(FBS)购买于德国的 PAN-BIOTECH GMBH。细胞增殖检测试剂盒(CCK-8)购买于中国的北京索莱宝科技有限公司。DMEM 培养基购买于美国的 Saimofei Shi'er (Shanghai) Management Co., Ltd。生物基质胶(Matrigel)购买于美国的 Corning Incorporated。

模拟微重力的 SM-31 双轴回旋仪是中国科学院空间应用工程与技术中心提供的,细胞培养箱购买于美国的 Thermo Scientific,核磁共振氢谱(¹H NMR)是由美国的 Bruker AVIII 400 MHz NMR spectrometer 测试的,UV 紫外光谱和 PL 荧光光谱均是由英国的 Edinburgh FS5-SS Fluorescence Spectrometer 在室温下测定的,激光共聚焦显微镜图像是由日本的 Nikon N-SIM Super-resolution Microscopes 拍摄的,细胞毒性测试所用的酶标仪是由美国 Biotek 公司的 Cytation 3 所提供,细胞计数是通过美国的 Nexcelom Cellometer Mini Automated Cell Counter 来完成。

2.2 实验方法

2.2.1 TPI 的光物理性质

紫外光谱的测定:称取适量 TPI 固体粉末,将其溶于 DMSO 中配置成浓度为 10⁻³ M 的储存液。用移液枪缓慢吸取 200 μL 工作液加入 1800 μL 的 DMSO 中配置成 2 mL,浓度为 10⁻⁴ M 的工作液。在 FS5-SS 荧光光谱仪中先测定同体积空白 DMSO 中的紫外吸收,再测定已配置好的 AIE 工作液。扣除空白的背景之后得到了 TPI 的紫外吸收光谱。

荧光光谱(AIE 曲线)的测定:称取适量 TPI 固体粉末溶于 70 μL 的二氯甲烷(DCM)并超声加速溶解。待固体粉末完全溶解,溶液呈现澄清状后,迅速用移液枪吸取 AIE 溶液平均分配到 7 个 5 mL 的玻璃瓶中。将玻璃瓶放置在 50 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中 10 min。待溶剂蒸发完全后,取出玻璃瓶,按照所既定的比例分别向不同的玻璃瓶中加入水和 DMSO 形成 10^{-4}M 浓度的工作液。在 FS5-SS 荧光光谱仪中用之前测定好的紫外吸收来设置激发波长,进而得到最终的 AIE 曲线。

2.2.2 细胞的培养

本实验选择神经胶质瘤母瘤细胞(U87-MG)作为实验对象。细胞培养在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%二氧化碳的无菌环境中。完全培养基的配置:10%的 FBS、1%的青霉素链霉素和 1%的非必须氨基酸(NEAA)按照顺序缓慢加入 500 mL 的 DMEM 中,摇匀以作下一步备用。用 25 cm^2 的细胞培养瓶来进行细胞的培养与扩增。用 0.25%的胰蛋白酶消化液将生长到亚融合处的细胞从表面分离出来,并接种到不同大小的培养容器中,以进行下一步的实验。

2.2.3 细胞毒性测定

细胞毒性测定是通过 CCK-8 试剂盒与 U87-MG 细胞来完成的。将等量的 U87-MG 细胞接种到 96 孔板中(8000 个细胞每孔)并加入配置好的完全培养基 100 μL 。在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%二氧化碳的细胞培养箱中孵育 24 h 后,用移液枪将培养基移除,并加入已经配置好的不同浓度(0, 1, 2, 5 μM)的 AIE 培养基混合工作液。待共同孵育 48 h 后,用移液枪缓慢移除 AIE 培养基混合工作液,加入 100 μL 的新鲜培养基及 10 μL 的 CCK-8 检测液到每一个孔中,孵育 1 个小时。使用酶标仪来测量溶液在 450 nm 的吸光度,并将结果进行归一化处理,完成细胞毒性的测定。

2.2.4 光稳定性实验

TPI 的光稳定性实验是通过对染色的 U87-MG 细胞进行多次层扫同时计算信号丢失来进行的。U87-MG 细胞分别等量地接种到了 20 mm^2 的细胞培养皿中并加入配置好的完全培养基 1.5 mL。待孵育 24 h 完全贴壁后,用移液枪将旧的培养基缓慢吸出并加入新鲜培养基以及适量的 TPI 与 TMRM 的工作液,使其体系分别达到 2 μM 和 100 nM 的浓度。孵育 15 min 后用 PBS 缓慢清洗 TMRM 所染色的细胞三次。所有的样品均被激光共聚焦显微镜扫描 120 次,然后通过计算其平均荧光强度得到信号丢失率。

2.2.5 共定位实验及线粒体染色机理实验

线粒体靶向性测定与线粒体靶向机理测定通过线粒体探针 MTG 以及 CCCP 来进行测定。U87-MG 细胞分别等量地接种到了 20 mm^2 的细胞培养皿中并加入配置好的完全培养基 1.5 mL。待孵育 24 h 完全贴壁后,用移液枪将旧的培养基缓慢吸出并加入新鲜培养基以及适量的 AIE 与 MTG 的工作液,使其体系分别达到 2 μM 和 100 nM 的浓度。孵育 15 min 后用 PBS 缓慢的冲洗 MTG 所染色的细胞三次。通过激光共聚焦显微镜拍摄并通过计算或者共定位皮尔逊系数。TPI 的线粒体靶向机理测定同理,在加入 TPI 后将 CCCP 加入到体系中,使体系中的 CCCP 浓度达到 10 μM 。通过激光共聚焦显微镜拍摄并通过计算平均荧光强度来得到线粒体染色机理。

2.2.6 模拟微重力下不同时间点线粒体膜电位的监测

用 U87-MG 细胞作为监测模拟微重力下不同时间点线粒体膜电位变化的模型细胞。U87-MG 细胞分别等量(50000 个细胞每皿)地接种到了 20 mm^2 的细胞培养皿中并加入配置好的完全培养基 1.5 mL。待细胞完全贴壁后,用移液枪将旧

的培养基缓慢吸出并加入新鲜培养基以及适量的 TPI 工作液，使体系的 AIE 浓度达到 $2\ \mu\text{M}$ 。将整个体系放入细胞培养箱中再次孵育 6 h 取出，将小皿中加满新鲜的培养基 AIE 溶液以防止旋转产生的剪切力，并放置进双轴回旋仪中进行回旋。回旋仪设置为随机转速模式。对照组的样品在同样的培养箱内进行放置。待模拟微重力完成后，迅速取出完成模拟的样品，并快速将剩余的样品继续模拟。快速将完成模拟的样品进行激光共聚焦显微镜成像，整个从样品取下到完成成像的过程不超过 10 min。

2.2.7 AIE-水凝胶 3D 成像体系的建立

将适量细胞从细胞培养皿中进行消化离心，加入 1 mL 培养基缓慢吹匀配置成细胞工作悬液。从冰盒中迅速的取出 0.37 mL 的 Matrigel 与 0.25 mL 的细胞工作悬液混匀，比例为细胞工作液：Matrigel = 1 : 1.5。迅速将混匀的 Matrigel 细胞工作混合液加入至培养皿的底部，摇匀。轻轻放置进 37°C 的细胞培养箱中成胶固化 1 h。待检查 Matrigel 是否完全凝固于培养皿底部后，加入 1 mL 浓度为 $2\ \mu\text{M}$ 的含有 AIE 工作液的新鲜培养基，与 Matrigel 细胞混合液进行共同孵育。

2.2.8 数据分析

统计学分析由 Graphpad prism 9 进行分析。平均荧光强度和皮尔逊系数由 ImageJ Fiji 计算得到。在本次工作中，所有的实验数据均进行 3 次以上的重复实验并进行统计学意义分析。

3 结果

3.1 TPI 的分子表征与光物理性质

TPI 的分子结构与核磁共振氢谱如图 1 所示，其光学性质如图 2 所示。图 2A 展示了 TPI 在 440nm 处有着明显的吸收峰。如图 2B 和 C 所示，在 DMSO 中，TPI 以单分子状态存在，没有明显的荧光。但随着不良溶剂水的比例逐渐增加，TPI 的荧光强度逐渐上升。与此同时，TPI 的最大发射达到了 680nm，避免了生物自发光的干扰。

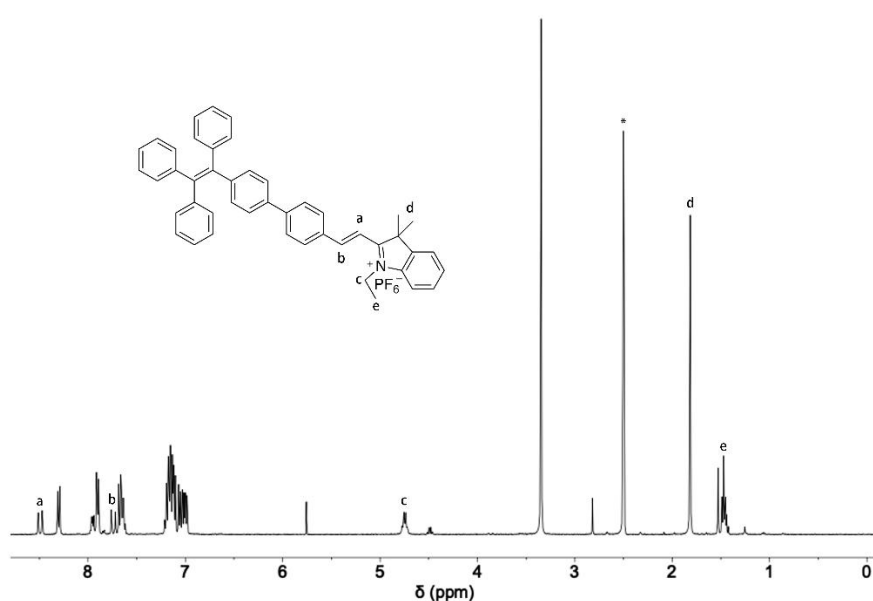


图 1 TPI 的核磁共振氢谱(^1H NMR spectrum, DMSO- d_6 , 400 MHz, 298K)

Fig. 1 ^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298K) of TPI

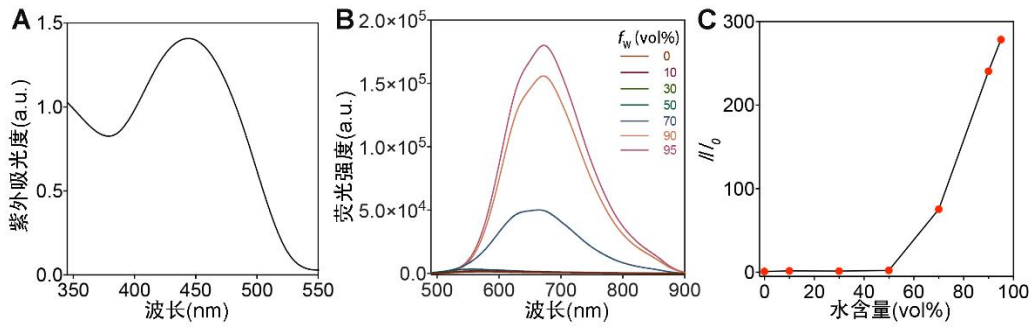


图 2 TPI 的光物理性质 (A) TPI (10^{-4}M) 在 DMSO 中的紫外吸收光谱 (B) TPI (10^{-4}M) 在不同浓度的 DMSO/水溶液中的荧光发射光谱 ($\lambda_{\text{ex}} = 465\text{ nm}$) (C) 不同水含量的 DMSO/水溶液中 TPI 在 680 nm 处的相对荧光强度 (I/I_0) 的变化: I 为不同水含量的 TPI 荧光发射强度, I_0 为 TPI 在纯 DMSO 溶液中的荧光发射强度

Fig. 2 Optical properties of TPI. (A) UV-vis absorption spectrum of ASCPB (10^{-4}M) in DMSO. (B) PL spectra of TPI (10^{-4}M) in DMSO/water mixtures with different water fractions (f_w). ($\lambda_{\text{ex}} = 465\text{ nm}$). (C) Change of relative PL intensity (I/I_0) at 680 nm of TPI in DMSO/water mixtures with different water fractions (f_w 's). I is the PL intensity of TPI with different water fractions and I_0 is the PL intensity of TPI in pure DMSO solution.

3.2 TPI 的生物学测试

TPI 的生物相容性、光稳定与线粒体靶向性测试如图 3 所示。从图 3A 中可以看出当 TPI 的浓度达到 $3\ \mu\text{M}$ 时, U87-MG 细胞依旧保持比较高的活性, 这证实了 TPI 拥有良好的生物相容性, 也为之后在长时间的模拟微重力过程中与 U87-MG 细胞长期染色奠定了坚实的基础。同时, 长期的共孵育染色需要 TPI 保持较高的光稳定性。如图 3B 所示, U87-MG 细胞分别进行 TPI 与线粒体膜电位探针 TMRM 的共染并通过激光共聚焦显微镜进行多次扫描。在扫描 120 次之后, TMRM 的荧光强度信号已经丢失了至少 40%, 而 TPI 的荧光强度信号一直保持在较高的水平, 表明 TPI 拥有出色的光稳定性。随后我们通过共定位实验测试了 TPI 的线粒体膜电位靶向性能。首先利用与线粒体探针 MTG 共定位实验来证明 TPI 的线粒体靶向性。如图 3C 所示, 激光共聚焦显微镜成像下可以分析出 TPI 与 MTG 共染色能较好的重合在一起, 其共定位皮尔逊系数达到了 0.94, 体现了出色的线粒体靶向性能。进一步利用 CCCP 来说明 TPI 是通过与线粒体膜电位的结合来靶向线粒体的机理, 即 TPI 是否能够表征线粒体膜电位的变化。如图 3D 所示, 在被 TPI 染色的 U87-MG 中加入了适量的 CCCP 之后, TPI 的荧光强度不断的下降直至几乎消失, 结合 CCCP 作为线粒体膜电位抑制剂的功能, 可以推断出 TPI 具备表征线粒体膜电位变化的能力^[25]。

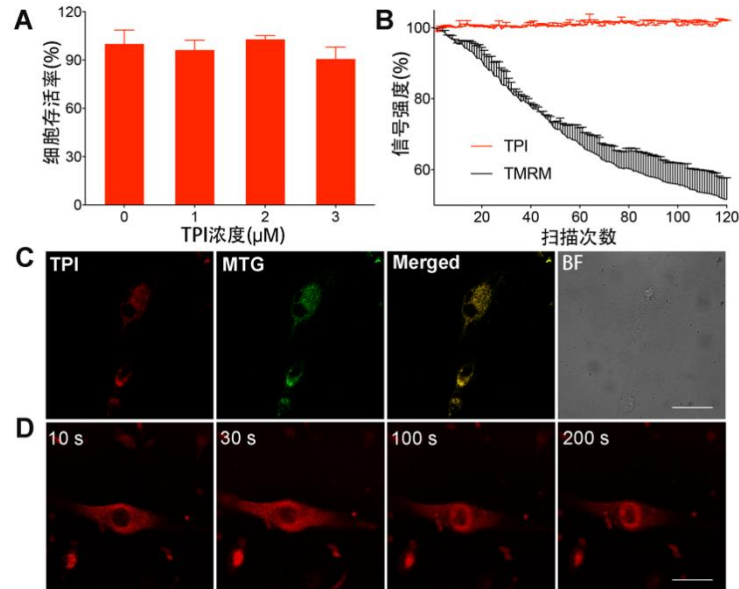


图3 TPI的生物相容性、光稳定性和线粒体靶向性测试 (A)不同浓度的TPI对U87-MG细胞进行细胞毒性测定 (B)荧光发射信号强度与扫描U87-MG细胞(分别用TPI与TMRM染色)不同次数的函数关系 (C)U87-MG细胞在TPI(红色通道)和MTG(绿色通道)共染30 min后的激光共聚焦显微镜成像 (D)TPI染色的U87-MG细胞加入CCCP后激光共聚焦显微镜成像 实验条件:[TPI] = 2 μM; [MTG] = 100 nM; [TMRM] = 100 nM; 红色通道: $\lambda_{ex} = 485.7 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 620 - 720 \text{ nm}$; 绿色通道: $\lambda_{ex} = 485.7 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 500 - 550 \text{ nm}$; Scale bar = 20 μm

Fig. 3 Evaluation of biocompatibility, photostability and mitochondria targeting ability of TPI. (A) Cytotoxicity assays of TPI at different concentrations for U87-MG. (B) Singal loss of fluorescence emission as a function of scan number for TPI and TMRM. (C) Confocal laser fluorecence images of U87-MG cells co-stained with TPI and MTG for 30 min from the red channel for TPI and the green channel for MTG. (D) Confocal laser fluorecence images of U87-MG cells stained with TPI after adding CCCP. Conditions: [TPI] = 2 μM; [MTG] = 100 nM; [TMRM] = 100 nM; The red channel: $\lambda_{ex} = 485.7 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 620 - 720 \text{ nm}$; The green channel: $\lambda_{ex} = 485.7 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 500 - 550 \text{ nm}$; Scale bar = 20 μm.

3.3 模拟微重力下不同时间点线粒体膜电位的监测

在进行模拟微重力实验之前,先要确定提前加入AIE进行染色是否会影响细胞状态。如图4所示,通过对照组与TPI的明场状态下对比可以观察到提前加入TPI染色不会对细胞状态有明显的影响。同时24 h后染色后的激光共聚焦显微镜成像也证实了这一点。随后进行了正式的模拟微重力实验,图5A详细的概述了整体的实验流程与思路。本实验中用随机转速模式的双轴回旋仪SM-31完成微重力的模拟。TPI在提前6 h对U87-MG细胞进行染色,并在放入回旋仪装置之前填满新鲜的培养基,封好透气的封口膜防止培养基侧漏。在整个操作的过程中需要小心缓慢进行,以防止气泡的产生并对细胞形成剪切力,使细胞无法牢固贴壁进而不能完成成像捕捉。模拟微重力下不同的时间点的监测对于及时捕捉细胞的模拟微重力效应十分重要。在本次实验中,共设计了12 h、16 h、24 h、36 h及48 h的5个时间点,利用TPI光稳定性强,免洗的性能及时并迅速地捕捉模拟微重力下的细胞线粒体膜电位的变化。图5B以柱状图的形式将不同时间点处理后的TPI平均荧光强度进行呈现。结合图5C(U87-MG细胞不同时间点的模拟微重力组与对照组的共聚焦显微镜成像图)可以看出,线粒体膜电位在5个

时间点没有发生明显的变化。其中值得注意的是，在 16–24 h 的模拟微重力下 TPI 的荧光强度有略微的下降(相比于对照组)，这可能归结为模拟微重力下线粒体发生的氧化应激作用引导的线粒体损伤导致的膜电位下降，而后随着细胞在一定范围内适应了模拟微重力环境，线粒体膜电位又完全恢复。但相较于图 3D 中加入 CCCP 后线粒体膜电位的明显变化相比，在整个模拟微重力过程中用 TPI 来监测线粒体膜电位的变化不明显，这也从侧面说明了 U87-MG 细胞的线粒体膜电位在面对模拟微重力环境等刺激条件变化不大，即使有微小的波动也能够通过自身的适应性进行弥补。

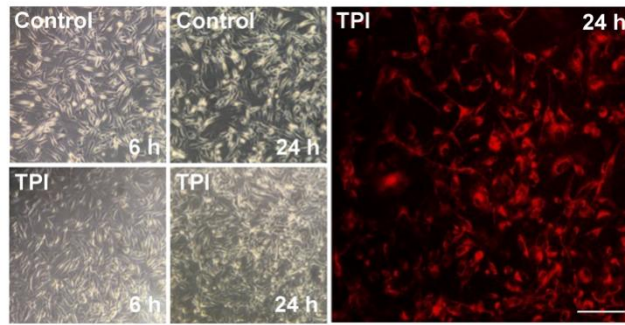


图 4 TPI 与 U87-MG 细胞提前共孵育下的细胞明场与激光共聚焦显微镜成像图 实验条件: $[TPI] = 2 \mu M$; $\lambda_{ex} = 485.7 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 620 - 720 \text{ nm}$; Scale bar = 100 μm

Fig. 4 Confocal laser fluorescence images and Bright-field (BF) of U87-MG cells co-incubation of TPI. Conditions: $[TPI] = 2 \mu M$; $\lambda_{ex} = 485.7 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 620 - 720 \text{ nm}$; Scale bar = 100 μm .

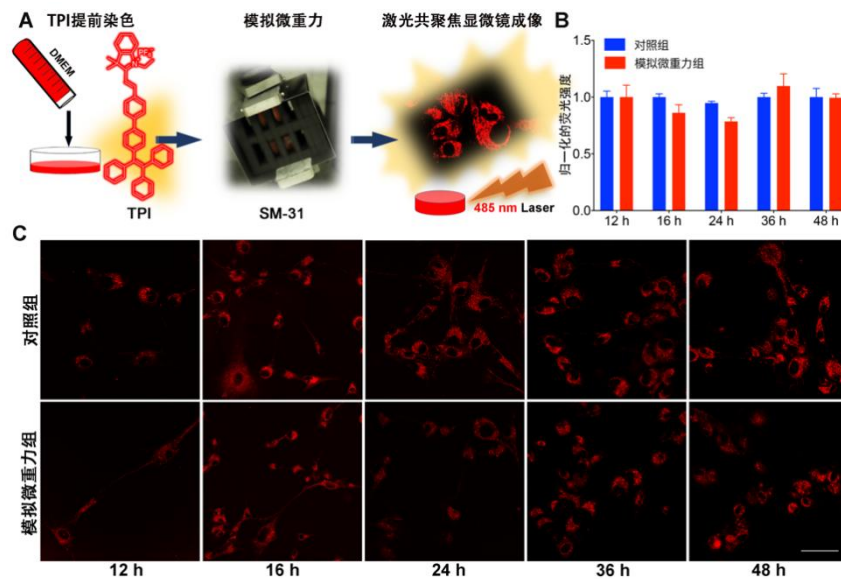


图 5 模拟微重力下 TPI 对 U87-MG 细胞的线粒体膜电位的长期不同时间点监测 (A)模拟微重力下对细胞长期监测的流程图 (B)不同时间点下 U87-MG 细胞中 TPI 的归一化荧光强度 (C)不同时间点对照组与模拟微重力组 TPI 染色的 U87-MG 细胞的激光共聚焦显微镜成像图 实验条件: $[TPI] = 2 \mu M$; $\lambda_{ex} = 485.7 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 620 - 720 \text{ nm}$; Scale bar = 50 μm

Fig. 5 Long-term monitoring MMP of U87-MG cells by TPI under simulated microgravity. (A) Schematic of monitoring MMP of U87-MG cells by TPI and the photograph of the dual-axis random clinostat. (B) Normalized fluorescence intensity of TPI-stained U87-MG cells with and without (Control) stimulation of simulated microgravity for 12, 16, 24, 36 and 48 h. The mean fluorescence emission intensity was processed

by Image J Fiji and expressed as the mean \pm SEM from independent experiments, $n \geq 3$. (C) Confocal laser fluorescence images of TPI-stained U87-MG cells without (Control) and with stimulation of simulated microgravity for 12, 16, 24, 36 and 48 h. Conditions: [TPI] = 2 μ M; λ_{ex} = 485.7 nm, λ_{em} = 620 – 720 nm; Scale bar = 50 μ m.

3.4 利用 AIE 水凝胶 3D 成像体系进行长时间微重力的模拟及 3D 成像

进一步进行了 72 h (3 days) 的模拟微重力实验，以此来监测长期模拟失重状态下 U87-MG 细胞的线粒体膜电位的变化情况。图 6 展示了 AIE-水凝胶 3D 成像体系建议的主要原因：当随机回旋的时间增加的 72 h 的时候，部分样品中的细胞贴壁不牢固，被旋转过程中产生的气泡切下，导致无法在激光共聚焦显微镜下进行成像，从而完成对样品统计学意义上的捕捉与分析。为了解决这个问题，我们提出了用拥有出色生物相容性的生物基质胶 Matrigel 来对 U87-MG 细胞进行 3D 培养，同时防止在长时间模拟微重力中细胞被气泡切下^[26]。图 7A 与前文的研究方法部分展示了整个方法的操作过程。因为在常温下基质胶非常容易成胶，所以在整个体系的操作过程中要在冰上进行，操作要稳定并迅速。图 7B 展示了 Matrigel 培养的 U87-MG 细胞在 TPI 染色后的 3D 成像图。从图中可以清晰地观察到 U87-MG 的细胞是三维分布在空间中，也侧面证明了生物基质胶 Matrigel 的存在并不会对 TPI 的细胞染色有影响。随后我们利用此体系进行了 72 h 下模拟微重力实验。图 7C 与 D 分别以激光共聚焦显微镜的三维成像三视图以及柱状图来呈现 72 h 模拟微重力下的实验结果。可以观察到在 Matrigel 的保护下，U87-MG 细胞生长状况良好，由此说明 Matrigel 为长期监测细胞的微重力效应提供了有效的帮助。而通过对三视图的平均荧光强度分析，72 h 模拟微重力时 U87-MG 细胞线粒体膜电位的变化依旧不明显。原因可能归结为两点：第一，在 72 h 时细胞依旧可以适应模拟微重力效应，在生长良好的状态下 72 h 的模拟微重力对细胞损伤不明显；第二，Matrigel 的存在对细胞形成了有力的保护，从而加强了细胞对外界刺激的适应与恢复导致模拟微重力效应无法被监测到。

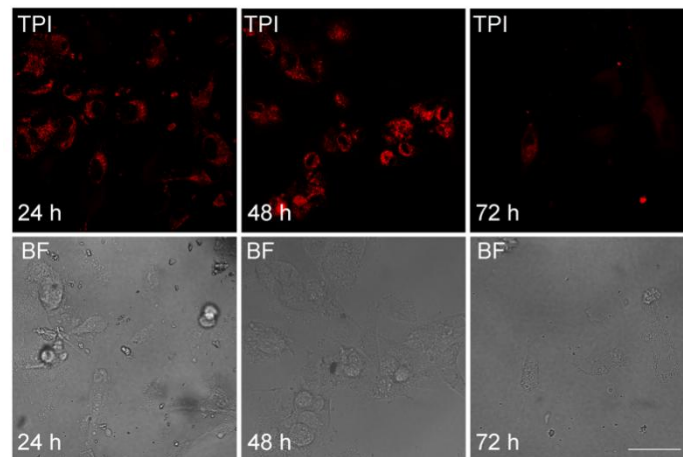


图 6 模拟微重力下 24、48、72 h 时细胞的贴壁明场与激光共聚焦显微镜成像图 实验条件：[TPI] = 2 μ M； λ_{ex} = 485.7 nm, λ_{em} = 620 – 720 nm; Scale bar = 50 μ m

Fig. 6 Confocal laser fluorescence images and Bright-field (BF) of U87-MG cells stained by TPI for 24, 48 and 72 h under simulated microgravity. Conditions: [TPI] = 2 μ M; λ_{ex} = 485.7 nm, λ_{em} = 620 – 720 nm; Scale bar = 50 μ m.

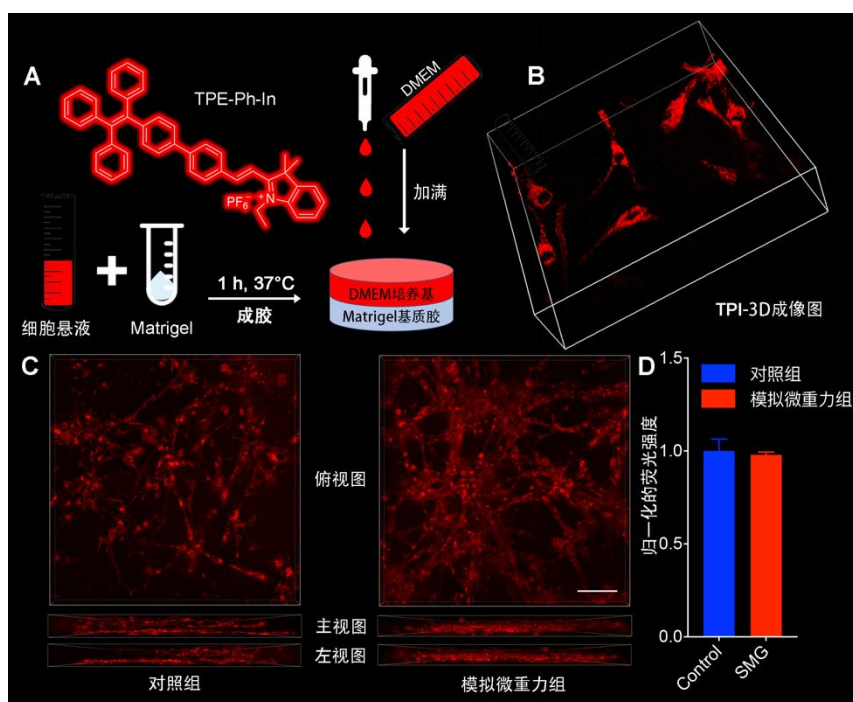


图7 建立3D水凝胶模拟人脑组织体系来进行72 h模拟微重力下U87-MG细胞线粒体膜电位的监测 (A)水凝胶细胞体系建立的流程图 (B) TPI染色的U87-MG细胞3D激光共聚焦显微镜成像示意图 (C)72 h模拟微重力下TPI荧光强度的激光共聚焦显微镜三视图 (D) 72 h模拟微重力下对照组与微重力组TPI的归一化荧光强度。实验条件: [TPI] = 2 μ M; λ_{ex} = 485.7 nm, λ_{em} = 620 – 720 nm, Scale bar = 100 μ m

Fig.7 72 h monitoring MMP of U87-MG cells by AIE-Matrigel 3D system under simulated microgravity. (A) Schematic of AIE-Matrigel system construction. (B) 3D Confocal laser fluorescence image of U87-MG cells stained by TPI. (C) Confocal laser fluorescence images of AIE-Matrigel system stained with U87-MG cells without (Control) and with stimulation of simulated microgravity for 72 h. (D) Normalized fluorescence intensity of AIE-Matrigel system stained with U87-MG cells with and without (Control) stimulation of simulated microgravity for 72 h. The mean fluorescence emission intensity was processed by Image J Fiji and expressed as the mean \pm SEM from independent experiments, $n \geq 3$. Conditions: [TPI] = 2 μ M; λ_{ex} = 485.7 nm, λ_{em} = 620 – 720 nm, Scale bar = 100 μ m.

4 讨论与分析

空间生命科学作为研究宇宙空间特殊环境因素作用下的生命现象及其规律的学科,其基础研究对于宇航员在太空中的身体健康至关重要^[27]。微重力作为太空中重要的特殊环境之一,更是被大量模拟于地面实验中进行研究。本工作利用聚集诱导发光探针完成了模拟微重力下U87-MG细胞线粒体膜电位的不同时间点监测。TPI拥有显著的聚集诱导发光性质,其出色的生物相容性,良好的光稳定性及免洗特性为模拟微重力条件下长期、快速的监测提供了有利的帮助。同时,长时间(72 h)微重力的模拟会使整个体系产生气泡,进而对细胞产生巨大的剪切力,使细胞面临贴壁不牢固的问题。针对此问题,同时也为真实模拟人脑3D环境的需要,我们开发出AIE-水凝胶3D成像体系,完成对长时间下模拟微重力效应的监测。AIE-水凝胶3D成像体系的开发与AIE在模拟微重力下的长期快速监测都为空间生命科学问题的研究提供了有力的方法。

聚集诱导发光技术与空间生命科学的结合是一个相对较新的领域。目前,国内外利用聚集诱导发光技术解决空间生命科学问题的研究较少,本课题组在之前

的研究中开发了具有聚集诱导发光性质的内源性 H₂O₂ 响应探针 ASCPB, 完成对模拟微重力下 U87-MG 细胞与 AC16 细胞的氧化应激监测^[28]。相比于之前的研究, 本工作在利用了 AIE 探针完成线粒体膜电位的同时, 还建立了 72 h 的 AIE-水凝胶 3D 成像体系, 克服了之前工作中只能对 48 h 的微重力效应进行监测的弊端, 完成了 72 h 的长期监测。AIE-水凝胶 3D 成像体系也是本工作中最大的创新点所在, 为未来复杂环境下细胞效应的长期监测提供了坚实的基础。

5 结论

结果表明, 具有聚集诱导发光性质的线粒体探针 TPI 拥有出色的生物相容性, 光稳定性及线粒体靶向性, 为多时间点监测模拟微重力下线粒体的膜电位提供了有力的帮助。同时构建了 AIE-3D 水凝胶成像体系成功的实现了 U87-MG 的培养, 并利用 TPI 进行染色完成了 3D 成像。本工作为研究细胞的微重力效应提供了有力的方法, 将聚集诱导发光技术与空间生命科学相结合, 为解决复杂环境下的人体损伤机理提供了快速, 简便的监测手段。

参考文献

- [1] White RJ, Averner M. Humans in space [J]. *Nature*, 2001, 409(6823): 1115-8.
- [2] Nagaraja MP, Risin D. The current state of bone loss research: data from spaceflight and microgravity simulators [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2013, 114(5): 1001-8.
- [3] Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle [J]. *Journal of applied physiology*, 2000, 89(2): 823-39.
- [4] Aubert AE, Beckers F, Verheyden B. Cardiovascular function and basics of physiology in microgravity [J]. *Acta cardiologica*, 2005, 60(2): 129-51.
- [5] Reves C, Perez S, Fritsch-Yelle J. Orthostatic intolerance following short and long duration spaceflight [J]. *FASEB Journal*, 1999, 13(5): A1048-A.
- [6] Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Mitochondrial damage and intralysosomal degradation in cellular aging [J]. *Molecular aspects of medicine*, 2006, 27(5-6): 471-482.
- [7] Franceschi C. Cell proliferation, cell death and aging [J]. *Aging Clinical and Experimental Research*, 1989, 1(1): 3-15.
- [8] Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function [J]. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 2012, 26(6): 711-23.
- [9] Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, et al. Mitochondrial membrane potential [J]. *Analytical Biochemistry*, 2018, 552: 50-9.
- [10] Du Z, Song B, Zhang W, et al. Quantitative monitoring and visualization of hydrogen sulfide in vivo using a luminescent probe based on a ruthenium (II) complex [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(15): 3999-4004.
- [11] Ye S, Hananya N, Green O, et al. A Highly Selective and Sensitive Chemiluminescent Probe for Real-Time Monitoring of Hydrogen Peroxide in Cells and Animals [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(34): 14326-14330.
- [12] Risso A, Tell G, Vascotto C, et al. Activation of human T lymphocytes under conditions similar to those that occur during exposure to microgravity: a proteomics study [J]. *Proteomics*, 2005, 5(7): 1827-37.
- [13] Singh R, Rajput M, Singh RP. Simulated microgravity triggers DNA damage and

-
- mitochondria-mediated apoptosis through ROS generation in human promyelocytic leukemic cells [J]. *Mitochondrion*, 2021, 61: 114-24.
- [14] Li Y, Liu S, Liu H, et al. Dragon's Blood Regulates Rac1-WAVE2-Arp2/3 Signaling Pathway to Protect Rat Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction Induced by Simulated Microgravity [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(5).
- [15] Luo JD, Xie ZL, Lam JWY, et al. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole [J]. *Chemical Communications*, 2001, (18): 1740-1.
- [16] Wurthner F. Aggregation-Induced Emission (AIE): A Historical Perspective [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(34): 14192-6.
- [17] Mei J, Leung NL, Kwok RT, et al. Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar! [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(21): 11718-940.
- [18] Li H, Kim H, Zhang C, et al. Mitochondria-targeted smart AIEgens: Imaging and therapeutics [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 473.
- [19] Hu F, Liu B. Organelle-specific bioprobes based on fluorogens with aggregation-induced emission (AIE) characteristics [J]. *Org Biomol Chem*, 2016, 14(42): 9931-44.
- [20] Fan L, Ge J, Zan Q, et al. Real-time tracking the mitochondrial membrane potential by a mitochondria-lysosomes migration fluorescent probe with NIR-emissive AIE characteristics [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 327.
- [21] Zheng Y, Ding Y, Zheng X, et al. Long-Term Dynamic Imaging of Cellular Processes Using an AIE Lipid Order Probe in the Dual-Color Mode [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(29): 10272-81.
- [22] Zheng Y, Ding Y, Ren J, et al. Simultaneously and Selectively Imaging a Cytoplasm Membrane and Mitochondria Using a Dual-Colored Aggregation-Induced Emission Probe [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(21): 14494-500.
- [23] Yao Y, Sun Q, Chen Z, et al. A mitochondria-targeted near infrared ratiometric fluorescent probe for the detection of sulfite in aqueous and in living cells [J]. *Talanta*, 2018, 189: 429-36.
- [24] Zhao N, Chen S, Hong Y, et al. A red emitting mitochondria-targeted AIE probe as an indicator for membrane potential and mouse sperm activity [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(71): 13599-602.
- [25] Minamikawa T, Williams DA, Bowser DN, et al. Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1999, 246(1): 26-37.
- [26] Lee GY, Kenny PA, Lee EH, et al. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells [J]. *Nature Methods*, 2007, 4(4): 359-65.
- [27] Mortimer AJ, DeBaakey ME, Gerzer R, et al. Life science research in space brings health on Earth [J]. *Acta Astronautica*, 2004, 54(11-12): 805-812.
- [28] Su Z, Li Z, Zhang R, et al. Simulated microgravity-induced endogenous H₂O₂ traced by an AIEgen [J]. *Science Bulletin*, 2022, 67(24): 2513-2516.