

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-水凝胶三维成像体系的构建 [J]. 集成技术, 2023, 12(6): 14-24.

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, 12(6): 14-24.

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-水凝胶三维成像体系的构建

苏兆卿^{1,2} 黎朝^{1,2*} 邓玉林^{1,2*}

¹(北京理工大学医学技术学院 医工融合研究院 北京 100081)

²(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 空间特殊环境会引起宇航员机体损伤, 机体生理指标的监测对损伤机制和保护手段的研究至关重要。人体长期处于微重力环境, 会引起线粒体功能紊乱。线粒体膜电位是线粒体功能是否正常的重要参考指标, 因此, 快速、简便地监测模拟微重力环境下线粒体膜电位具有重要意义。该文利用线粒体靶向聚集诱导发光探针 TPE-Ph-In 实现了对细胞的免洗和长周期染色, 以及在微重力环境下对线粒体膜电位的成像监测。此外, 为克服长时间微重力环境下细胞贴壁不牢固的问题, 利用水凝胶 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。该文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 R 381 文献标志码 A 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^{1,2} LI Zhao^{1,2*} DENG Yulin^{1,2*}

¹(Institute of Engineering Medicine, School of Medical Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

²(Beijing Key Laboratory of Bio-separation and Bio-analysis, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

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

Abstract Space environment can cause damage to astronauts, therefore, it is critical to monitor the

收稿日期: 2022-10-10 修回日期: 2023-01-10

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项目(XSQD-202023002, XSQD-202123005)

作者简介: 苏兆卿, 博士研究生, 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.

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.

Keywords simulated microgravity; aggregation-induced emission; hydrogel; mitochondrial membrane potential; 3D imaging system

Funding This work is supported by National Natural Science Foundation of China (22005028, 22105020), and 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,人体长期处于失重环境会产生骨丢失^[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、损伤与人体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]。跨膜电位差形成的线粒体膜电位是否稳定是线粒体功能是否正常的重要指标,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(simulated microgravity, SMG)环境下,对细胞中线粒体膜电位进行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。

可视化监测技术具有直观、成本低、操作简单等优点,现已被应用于各个领域中的靶向物

监测^[10-11]。其中,荧光成像可视化技术具有响应快速、信噪比高、灵敏度高和非侵入性等优点,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,传统的荧光探针存在聚集诱导猝灭效应,即在固态或聚集态下会发生猝灭,从而导致光稳定性差、成像前需要漂洗等不足。模拟微重力实验具有仪器(双轴回旋仪)复杂、监测周期长、停止模拟后效应恢复快等缺点,此外,聚集诱导猝灭染料的光稳定性差及不免洗等缺点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(aggregation-induced emission, AIE)现象^[15],即分子在稀溶液中不发光,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成像,为及时捕捉微重力效应奠定了坚实的基础^[19-23]。

本文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 具有线粒体靶向性优异、生物相容性好、光稳定性高及免洗特性, 这些优异特性使 TPI 可以对 U87-MG 细胞进行长时间染色, 同时, 可以在短时间内完成样品线粒体膜电位的成像。此外, 针对长时间 (>72 h) 模拟微重力时细胞会因气泡的剪切力而无法贴壁的问题, 本文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构建 AIE 探针-水凝胶 3D 成像体系, 以此克服长时间模拟微重力存在的问题。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- d_6) 购买于西格玛奥德里奇 (上海) 公司, 线粒体绿色荧光探针 (Mito-Tracker Green, MTG) 与四甲基罗丹明甲基酯 (tetramethylrhodamine, methyl ester, TMRM)、线粒体电子传递链抑制剂 (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP) 和胰蛋白酶消化液 (体积质量为 0.25%) 购买于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 公司。细胞增殖检测试剂盒 (CCK-8) 购买于北京索莱宝科技有限公司。细胞培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) 购买于美国的赛默飞世尔 (上海) 管理有限公司。生物基质胶 (Matrigel) 购买于美国的康宁公司。

模拟微重力的 SM-31 双轴回旋仪由中国科学院空间应用工程与技术中心提供, 细胞培养箱购买于美国的赛默飞世尔科技公司, 核磁共振氢谱 (^1H NMR) 由美国的 Bruker AVIII 400 MHz

NMR spectrometer 测试, 紫外吸收光谱和荧光发射光谱均由英国的 Edinburgh FS5-SS Fluorescence Spectrometer 在室温下测定, 激光共聚焦显微镜图像由日本的 Nikon N-SIM Super-resolution Microscopes 拍摄, 细胞毒性测试所用的酶标仪由美国 Biotek 公司的 Cytation 3 提供, 细胞计数通过美国的 Nexcelom Cellometer Mini Automated Cell Counter 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 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储存液。用移液枪缓慢吸取 200 μL 储存液, 并加入 1 800 μL 的 DMSO, 配置成浓度为 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 2 mL 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 TPI 工作液。扣除空白背景之后, 即得到 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 的二氯甲烷中, 并超声加速溶解。待固体粉末完全溶解, 即溶液呈现澄清状后, 迅速用移液枪吸取 TPI 溶液平均分配到 7 个 5 mL 的玻璃瓶中, 得到每个瓶子 10 μL 的 TPI 储存液。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, 分别向每个瓶中加入不同比例的 DMSO 和水, 使水的体积分数分别为 0%、10%、30%、50%、70%、90%、95%, 进而形成 TPI 浓度为 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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

本实验的实验对象为神经胶质瘤母瘤细胞 (U87-MG)。细胞培养在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为 5% 的无菌环境中。完全培养基的配置: 10% 的胎牛血清、1% 的青霉素链霉素和 1% 的非必

需氨基酸 (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 cm² 的细胞培养瓶来进行细胞的培养与扩增。用体积质量为 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, 以进行下一步实验。

2.2.3 细胞毒性测定

细胞毒性测定通过 CCK-8 试剂盒与 U87-MG 细胞完成。将等量的 U87-MG 细胞接种到 96 孔板中 (8 000 个细胞/孔), 并每孔加入配置好的完全培养基 100 μ L。在 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 体积分数为 5% 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 μ mol \cdot L⁻¹、2 μ mol \cdot L⁻¹、5 μ mol \cdot L⁻¹) 的 TPI 培养基混合溶液。待共同孵育 48 h 后, 用移液枪缓慢移除 TPI 培养基混合溶液。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, 每孔加入 100 μ L 的新鲜完全培养基及 10 μ L 的 CCK-8 检测液, 孵育 1 h。使用酶标仪来测量孵育后的溶液在 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, 并通过计算信号丢失率来进行测定。将 U87-MG 细胞分别等量地接种到细胞培养皿 (20 mm²) 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, 并加入新鲜完全培养基以及适量的 TPI 与 TMRM 的工作液, 使其体系分别达到 2 μ mol \cdot L⁻¹ 和 100 μ mol \cdot L⁻¹ 的浓度。孵育 15 min 后, 用磷酸缓冲盐溶液缓慢清洗 TMRM 所染色的细胞 3 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

线粒体靶向性与线粒体靶向机理通过 MTG

及 CCCP 进行测定。U87-MG 细胞分别等量地接种到细胞培养皿 (20 mm²) 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, 并加入新鲜完全培养基以及适量的 AIE 与 MTG 的工作液, 使其体系分别达到 2 μ mol \cdot L⁻¹ 和 100 μ mol \cdot L⁻¹ 的浓度。孵育 15 min 后, 用磷酸缓冲盐溶液缓慢清洗 MTG 所染色的细胞 3 次。通过激光共聚焦显微镜拍摄图像, 并利用 ImageJ Fiji 来计算共定位皮尔逊系数。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 μ mol \cdot L⁻¹。通过激光共聚焦显微镜拍摄, 并通过计算平均荧光强度, 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

以 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。将 U87-MG 细胞分别等量 (50 000 个细胞/皿) 地接种到 6 皿细胞培养皿 (20 mm²) 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, 并加入新鲜完全培养基以及适量的 TPI 工作液, 使体系的 AIE 浓度达到 2 μ mol \cdot L⁻¹。将整个体系放入细胞培养箱中孵育 6 h 后取出, 向培养皿中加满新鲜的培养基 AIE 溶液, 以防止旋转产生剪切力, 并放进双轴回旋仪中进行回旋。回旋仪设置为随机转速模式。对照组的样品放置在同样的培养箱内。待模拟微重力完成后, 迅速取出完成模拟的样品, 并快速对剩余的样品进行模拟。快速将完成模拟的样品进行激光共聚焦显微镜成像, 从样品取下到完成成像的整个过程少于 10 min。

2.2.7 AIE-水凝胶三维成像体系的建立

将适量细胞从细胞培养皿中进行消化离心后, 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培养皿的底部, 摇匀。轻轻放置到 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 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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。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。如图 2(a) 所示, TPI

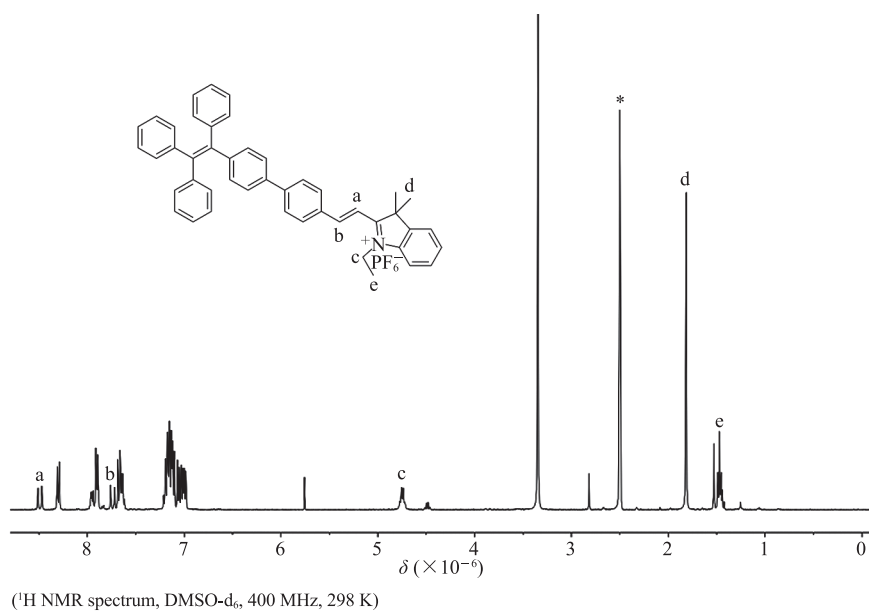


图 1 TPI 的核磁共振氢谱

Fig. 1 ^1H NMR spectrum of TPI

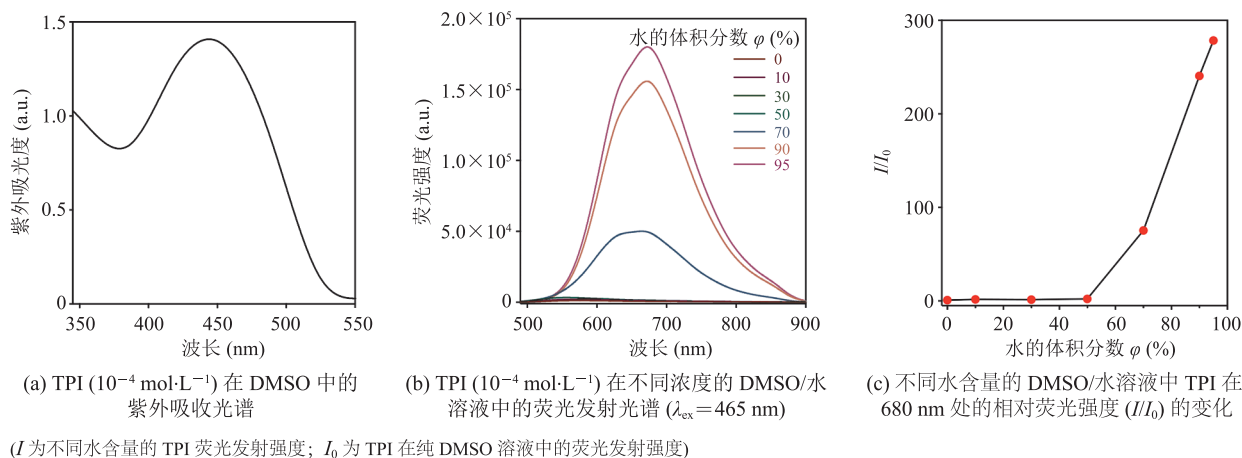


图 2 TPI 的光物理性质

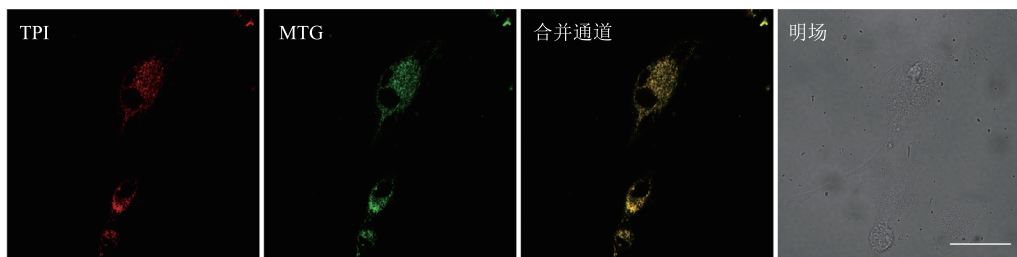
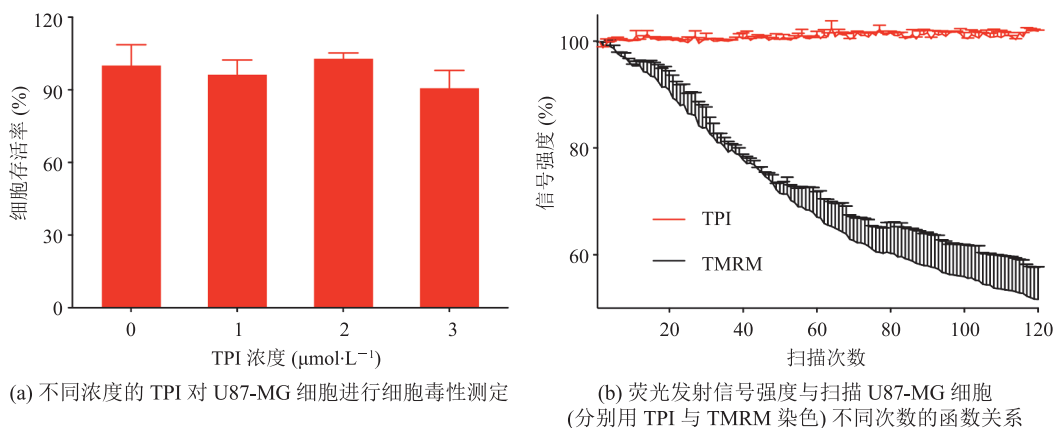
Fig. 2 Optical properties of TPI

在 440 nm 处有明显的吸收峰。如图 2(b)~(c) 所示, 在 DMSO 中, TPI 以单分子状态存在, 没有明显的荧光; 随着水的比例逐渐增加, TPI 的荧光强度逐渐增强。与此同时, TPI 的最大发射波长为 680 nm, 避免了生物自发光的干扰。

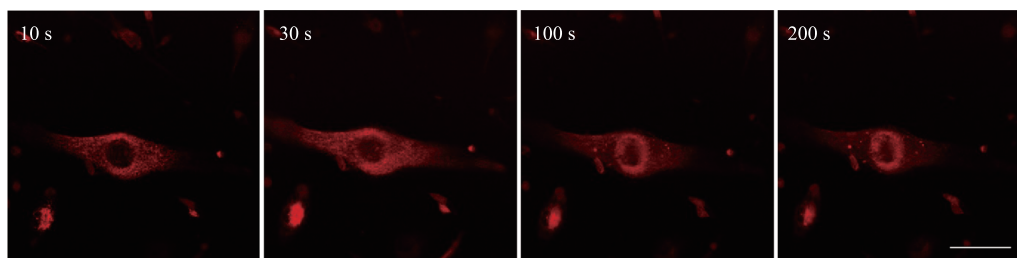
3.2 TPI 的生物学测试

TPI 的生物相容性、光稳定性与线粒体靶向性测试如图 3 所示。如图 3(a) 所示, 当 TPI 的浓度为 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, U87-MG 细胞依然保持较高的活性, 这证明 TPI 的生物相容性较好, 也

为之后 U87-MG 细胞的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 3(b) 所示, 向 U87-MG 细胞分别加入 TPI 与 TMRM 进行共染色, 并通过激光共聚焦显微镜进行多次扫描。当扫描次数为 120 次时, TMRM 的荧光强度信号丢失了至少 40%, 而 TPI 的荧光强度信号保持在较高的水平, 表明 TPI 的光稳定性较好。随后, 本研究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 TPI 与 MTG 共定位实验证明



(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: $c_{\text{TPI}}=2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $c_{\text{MTG}}=100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $c_{\text{TMRM}}=100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 红色通道, $\lambda_{\text{ex}}=485.7 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=620\sim720 \text{ nm}$; 绿色通道, $\lambda_{\text{ex}}=485.7 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=500\sim550 \text{ nm}$; 标度尺为 $20 \mu\text{m}$)

图 3 TPI 的生物相容性、光稳定性和线粒体靶向性测试

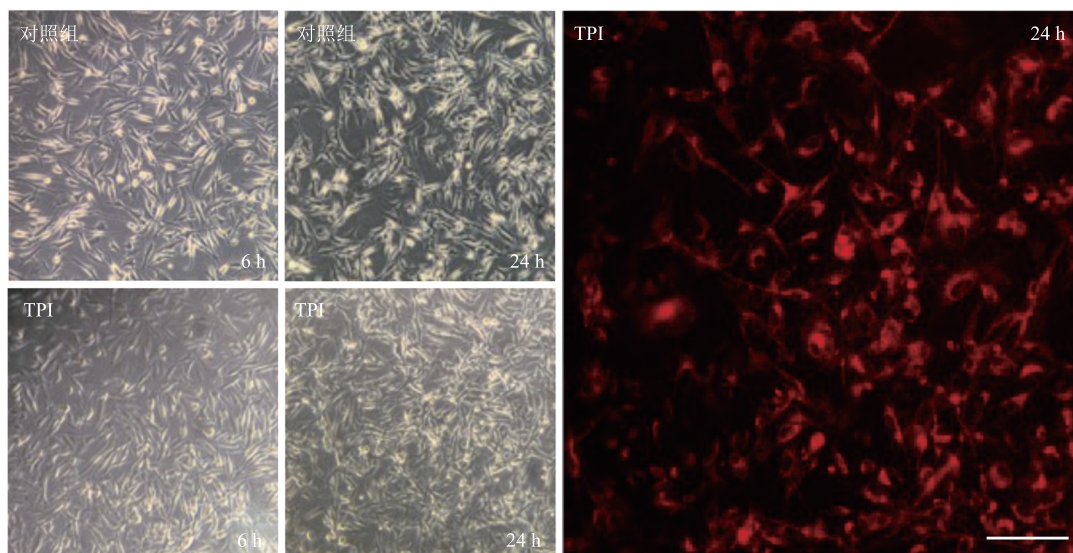
Fig. 3 Evaluation of biocompatibility, photostability and mitochondria targeting ability of TPI

TPI 的线粒体靶向性。如图 3(c)所示,激光共聚焦显微镜成像下可以分析出 TPI 与 MTG 共染色能较好地重合在一起,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。然后利用 CCCP 来证明 TPI 能够靶向线粒体膜电位,即 TPI 是否能够表征线粒体膜电位的变化。如图 3(d)所示,向被 TPI 染色的 U87-MG 细胞中加入适量的 CCCP 后, TPI 的荧光强度不断下降,直至几乎消失,结合 CCCP 作为线粒体膜电位抑制剂,可以推断出 TPI 具备表征线粒体膜电位变化的能力^[24]。

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,需确定提前加入 TPI 进行染色是否会影响细胞状态。如图 4 所示,通过对比对照组与 TPI 的明场状态可知:提前加入 TPI 染色不会对细胞状态有明显影响。此外,模拟微重力 24 h 后,对 U87-MG 细胞进行染色,其激光共聚焦显微镜成像证实了这一点。随后进行正式的模拟微重力实验,图 5(a)详细概述了实验流程与思路。本实验利用随机转速模

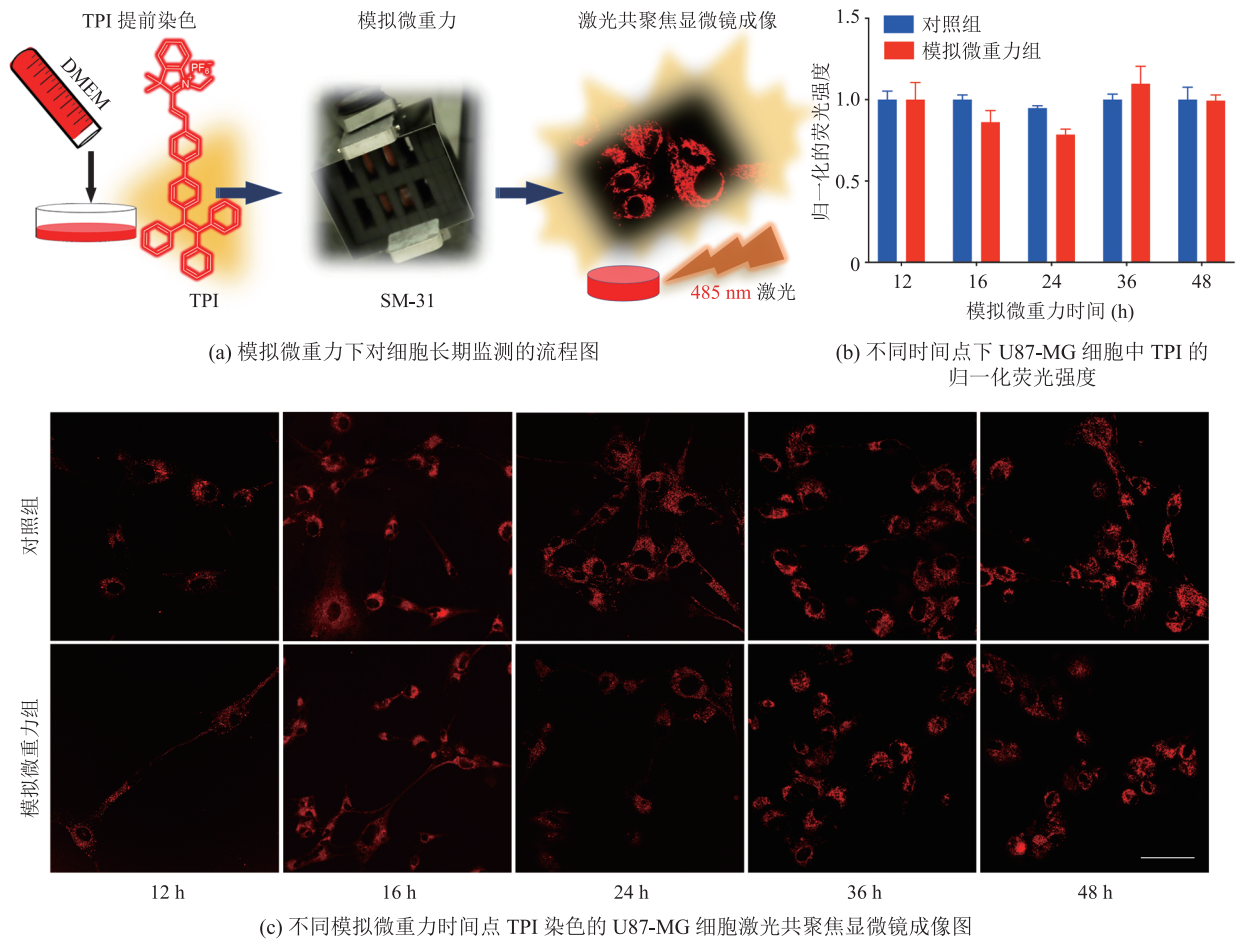
式的双轴回旋仪 SM-31 完成微重力的模拟。提前 6 h 加入 TPI 对 U87-MG 细胞进行染色,并在放入回旋仪装置之前填充新鲜培养基,封好透气的封口膜,防止培养基侧漏。整个操作过程需小心缓慢进行,以防因产生气泡而对细胞形成剪切力,使细胞无法牢固贴壁,进而不能完成成像捕捉。模拟微重力下,不同时间点的监测对及时捕捉细胞的模拟微重力效应十分重要。在本次实验中,共设计了 12 h、16 h、24 h、36 h 及 48 h 等 5 个时间点,利用 TPI 的光稳定性强、免洗等性能,及时、迅速地捕捉模拟微重力下的细胞线粒体膜电位变化。图 5(b)以柱状图的形式呈现不同时间点处理后的 TPI 平均荧光强度。结合图 5(c)可以看出,线粒体膜电位在 5 个时间点均未发生明显变化。其中值得注意的是,在 16~24 h 的模拟微重力下, TPI 的荧光强度略微下降(与对照组相比),这可能是因为模拟微重力下,线粒体发生的氧化应激作用引起的线粒体损伤导致膜电位下降,而后,随着细胞在一定范围内适应模拟微重力环境,线粒体膜电位又完全恢复。但与图 3(d)中加入 CCCP 后线粒体膜电位的



(实验条件: $c_{TPI}=2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\lambda_{\text{ex}}=485.7 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=620\sim 720 \text{ nm}$; 标度尺为 $100 \mu\text{m}$)

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

Fig. 4 Confocal laser fluorescence images and bright-field (BF) of U87-MG cells co-incubation of TPI



(实验条件: $c_{TPI} = 2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\lambda_{ex} = 485.7 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 620 \sim 720 \text{ nm}$; 标度尺为 $50 \mu\text{m}$)

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

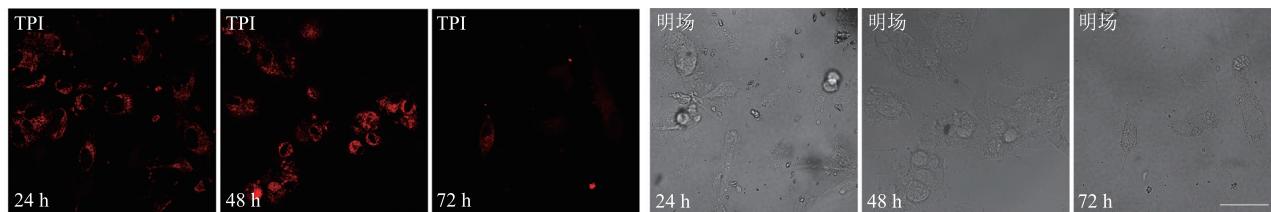
Fig. 5 Long-term monitoring mitochondrial membrane potential of U87-MG cells by TPI under simulated microgravity

明显变化相比, 在整个模拟微重力过程中, TPI 监测到的线粒体膜电位的变化不明显, 这从侧面说明, 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时, 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调整。

3.4 利用 AIE 水凝胶三维成像体系进行长时间微重力的模拟及三维成像

本文进一步进行了 72 h (3 d) 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 成像体系建立的主要原因: 当随机回旋的时间增加至 72 h 时, 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

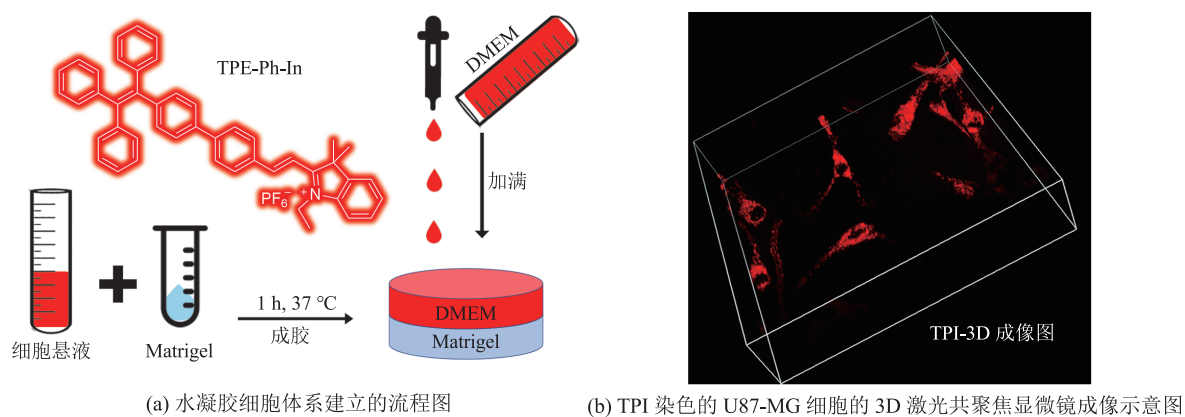
无法在激光共聚焦显微镜下进行成像, 从而完成对样品统计学意义上的捕捉与分析。为解决这个问题, 本文提出利用生物相容性较好的生物基质胶 Matrigel 对 U87-MG 细胞进行 3D 培养, 并防止在长时间模拟微重力中细胞被气泡切下^[25]。图 7(a) 与 2.2.7 小节的研究方法部分地展示了整个方法的操作过程。由于基质胶在常温下易成胶, 因此, 整个体系的操作过程需在冰上进行, 操作需稳定、迅速。图 7(b) 展示了 Matrigel 培养的 U87-MG 细胞在 TPI 染色后的 3D 成像图。从图 7(b) 中可以清晰地观察到 U87-MG 细胞三维分布在空间中, 侧面证明了生物基质胶 Matrigel 的存在对 TPI 的细胞染色无影响。随



(实验条件: $c_{TPI}=2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\lambda_{ex}=485.7 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=620\sim 720 \text{ nm}$; 标度尺为 $50 \mu\text{m}$)

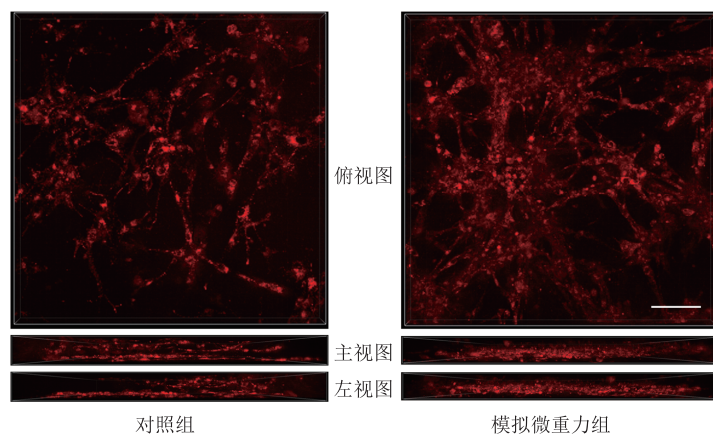
图 6 模拟微重力下经 TPI 染色 24 h、48 h、72 h 时 U87-MG 细胞的贴壁明场与激光共聚焦显微镜成像图

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



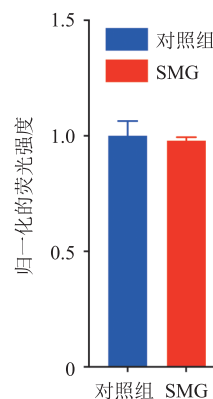
(a) 水凝胶细胞体系建立的流程图

(b) TPI 染色的 U87-MG 细胞的 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

(实验条件: $c_{TPI}=2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\lambda_{ex}=485.7 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=620\sim 720 \text{ nm}$; 标度尺为 $100 \mu\text{m}$)



(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

图 7 建立 3D 水凝胶体系来进行 72 h 模拟微重力下 U87-MG 细胞线粒体膜电位的监测

Fig. 7 72 h monitoring mitochondrial membrane potential of U87-MG cells by AIE-Matrigel 3D system under simulated microgravity

后, 本文利用此体系进行了 72 h 模拟微重力实验。图 7(c)、图 7(d) 分别以激光共聚焦显微镜的三维成像三视图、柱状图呈现 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 细胞的生长状况良好, 由此说明: Matrigel 有助于长期监测细胞的微重力效应。通过分析三视图的平均荧光强度, 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的损伤不明显; 第二, Matrigel 对细胞有保护作用, 使细胞对外界刺激的适应性与恢复性增强, 因此使得模拟微重力效应无法被监测到。

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, 其基础研究对宇航员在太空中的身体健康至关重要^[26]。微重力作为太空中重要的特殊环境之一, 被大量模拟于地面实验中。本工作利用聚集诱导发光探针完成模拟微重力下 U87-MG 细胞线粒体膜电位的不同时间点监测。TPI 具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、快速地监测细胞线粒体膜电位的变化提供了有力的帮助。此外, 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, 以及真实模拟人脑 3D 环境的需要, 本研究开发出 AIE-水凝胶 3D 成像体系, 完成长时间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新的研究方向和思路。

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 H_2O_2 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^[27]。与之前的研究相比, 本工作在利用 AIE 探针完成线粒体膜电位监测的同时, 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 成像体系是本工作中最大的创新点, 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。此外, 本文构建了 AIE-3D 水凝胶成像体系, 成功实现了 U87-MG 细胞的培养, 并利用 TPI 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): 1115-1118.
- [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): 1001-1008.
- [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): 823-839.
- [4] Aubert AE, Beckers F, Verheyden B. Cardiovascular function and basics of physiology in microgravity [J]. *Acta Cardiologica*, 2005, 60(2): 129-151.
- [5] Nelson ES, Mulugeta L, Myers JG. Microgravity-induced fluid shift and ophthalmic changes [J]. *Life(Basel)*, 2014, 4(4): 621-665.
- [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, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function [J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012, 26(6): 711-723.
- [9] Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, et al. Mitochondrial membrane potential [J]. *Analytical Biochemistry*, 2018, 552: 50-59.
- [10] Du ZB, Song B, Zhang WZ, 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): 1827-1837.
- [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: 114-124.
- [14] Li YJ, Liu S, Liu HY, 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): 2722.
- [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): 1740-1741.
- [16] Wurthner F. Aggregation-induced emission (AIE): a historical perspective [J]. *Angewandte Chemie (International Edition)*, 2020, 59(34): 14192-14196.
- [17] Mei J, Leung NLC, Kwok RTK, et al. Aggregation-induced emission: together we shine, united we soar! [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(21): 11718-11940.
- [18] Li HD, Kim H, Zhang C, et al. Mitochondria-targeted smart AIEgens: imaging and therapeutics [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 473: 214818.
- [19] Hu F, Liu B. Organelle-specific bioprobes based on fluorogens with aggregation-induced emission (AIE) characteristics [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2016, 14(42): 9931-9944.
- [20] Fan L, Ge JY, 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: 128929.
- [21] Zheng Y, Ding YW, Zheng XK, 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): 10272-10281.
- [22] Zheng Y, Ding YW, Ren JJ, 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): 14494-14500.
- [23] Yao YH, Sun Q, Chen ZY, 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: 429-436.
- [24] 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.
- [25] 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): 359-365.
- [26] Mortimer AJ, DeBaKey ME, Gerzer R, et al. Life science research in space brings health on Earth [J]. *Acta Astronautica*, 2004, 54(11-12): 805-812.
- [27] Su ZQ, Li Z, Zhang RY, et al. Simulated microgravity-induced endogenous H₂O₂ traced by an AIEgen [J]. *Science Bulletin*, 2022, 67(24): 2513-2516.