

· 新技术应用 ·

# 激光扫描共聚焦显微技术在中医药研究中的应用

江 巍<sup>1</sup> 朱 泉<sup>1</sup> 黄春林<sup>2△</sup>

激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM)是上世纪 80 年代发展起来的一项具有划时代意义的高科技新产品,是当今世界上最先进的分子细胞生物学分析仪器之一。它是在普遍荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置,并利用计算机的图象处理技术,使用紫外或可见激光激发荧光探针,从而得到细胞或组织内部细微结构的荧光图象。它采用了能达到最高分辨率及重复性的无色差扫描技术,克服了普通偏轴镜扫描因色差造成的低分辨率的弱点,改进了定量采样时重复性差等缺点,从而不仅提高了光学成像的分辨率,而且能产生真正具有三维清晰度的图象,同时可在亚细胞水平上观察诸如  $Ca^{2+}$ 、pH 值和膜电位等生理信号及细胞形态的实时动态变化,成为形态学、分子细胞生物学、神经科学、药理学、遗传学等领域中新一代强有力的研究工具<sup>(1)</sup>。

近几年来,激光扫描共聚焦显微技术这一先进的检测手段被引入中医药研究领域,并取得了有价值的研究成果,为中医药研究的现代化创造了条件。现将激光共聚焦显微镜技术在中医药研究中的应用情况汇总如下。

## 在中药单体或有效部位研究中的应用

艾静等<sup>(2)</sup>研究了苦参碱对豚鼠心肌细胞胞浆游离钙离子的影响。采用 Fluo-3/AM 标记胞浆内游离钙离子,激光扫描共聚焦显微镜动态测定胞浆游离钙浓度变化。结果表明,苦参碱可剂量依赖性促进外钙内流,但不具有促进内钙释放的作用,同时当细胞内钙增高后又可使钙离子浓度下降。小檗碱是中药黄连的主要有效成分,董德利等<sup>(3)</sup>研究了小檗碱对豚鼠心肌细胞游离钙离子浓度的影响。采用 Fluo-3/AM 标记胞浆内游离钙离子,激光扫描共聚焦显微镜实时测定细胞内游离钙浓度变化。结果表明,低浓度小檗碱即能抑制豚鼠心肌细胞电压依赖性钙通道,而高浓度时又能激动细胞内钙库释放。小檗胺是中药十大功劳叶的有效成分,赵艳玲<sup>(4)</sup>等应用激光扫描共聚焦显微技术,以荧光探针 Fluo-3/AM 负载,研究了小檗胺对氯化钾

(KCl)和哇巴因(Oua)诱导的体外培养家兔血管平滑肌细胞(VSMC)内游离钙的影响。研究结果显示,小檗胺可拮抗 KCl 或 Oua 升高 VSMC 内游离钙的作用,此抑制作用可能与小檗胺阻断电压依赖性钙通道及激活  $Na^{+}-K^{+}-ATP$  酶的作用有关。金春华<sup>(5,6)</sup>等观察了虎杖甙(PD)对人脐带动脉 VSMC 内游离钙、细胞膜电位的变化。用 Fluo-3/AM、DiBAC4(3)标记培养的 VSMC,在激光扫描共聚焦显微镜上测定细胞内游离钙和膜电位变化。结果表明 PD 可通过细胞外钙内流来增加细胞内游离钙浓度,并促进细胞外钠离子内流而导致细胞去极化。另外他们还应用激光扫描共聚焦显微镜探讨了 PD 改善休克动物微循环的作用机制。采用股动脉放血复制休克模型,取肠系膜微动脉 VSMC,用不同荧光染料分别标记细胞,测定细胞内钙、pH 和膜电位的变化。结果显示 PD 对细胞内钙、pH 有双向调节作用:正常情况下 PD 增加细胞内游离钙、升高 pH 以提高血管张力,休克时 PD 降低细胞内钙浓度、降低细胞内 pH 以降低血管张力,使血管扩张。PD 还可能通过促进细胞外钠离子内流使细胞去极化来调节血管。陈文东<sup>(7)</sup>等应用双波长荧光分光光度计和激光扫描共聚焦显微镜测定了新生大鼠大脑皮层神经细胞悬液和海马神经元原代培养在加入茯苓水提液后细胞内钙离子浓度的变化,以探讨茯苓水提液对神经细胞内钙稳态的影响。结果显示,茯苓水提液可剂量依赖性的诱导细胞内钙离子浓度升高,但当浓度大于或等于 500mg/L 时,则无明显升高胞浆内钙离子浓度的作用。31~2000mg/L 茯苓水提液均有不同程度抑制谷氨酸诱导的升钙作用。表明茯苓水提液对神经细胞内钙离子浓度具有双向调节作用。阿魏酸是中药川芎的有效成分,陆怡<sup>(8)</sup>等研究阿魏酸钠对  $H_2O_2$  诱导人淋巴细胞凋亡的影响。采用免疫荧光标记 bcl-2 和 bax 基因,激光扫描共聚焦显微镜观察。结果显示,  $H_2O_2$  处理后,细胞 bcl-2 基因表达明显减少,加入阿魏酸钠后明显恢复。而  $H_2O_2$  对 bax 基因表达略有增加,加入阿魏酸钠后明显降低。表明  $H_2O_2$  能诱导淋巴细胞凋亡,阿魏酸钠可减轻细胞凋亡,同时阿魏酸钠可使  $H_2O_2$  诱导的细胞 bcl-2 基因表达明显恢复,对 bax 基因表达明显降低。

1. 广州中医药大学 2000 级博士(广州 510405) 2. 广东省中医院

△指导 万方数据

### 在复方研究中的应用

蒙一纯<sup>(9,10)</sup>等应用激光扫描共聚焦显微镜定量分析了正常大鼠血清、免疫性肝纤维化大鼠血清和益气活血复方(丹参、赤芍、炙黄芪、柴胡等)药物血清培养的肝星形细胞(HSC)与其转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )表达的关系,应用免疫组化荧光染色二步法对TGF- $\beta_1$ 染色。结果表明益气活血方药通过拮抗血液中HSC活化物质达到抗纤维化的作用。另外,他们还进行了益气活血方剂抑制HSC合成I型胶原的作用和生物学机制的研究,应用激光扫描共聚焦显微镜定量分析了I型胶原的表达。结果显示益气活血药物血清可抑制纤维化模型血清诱导的HSC I型胶原的表达,其作用机制是改变了HSC的生活状态。王新月<sup>(11)</sup>等采用激光扫描共聚焦显微分析技术,吡啶橙DNA、RNA荧光染色,对大鼠酒精性肝损伤模型进行了肝细胞形态、肝细胞内DNA与RNA含量变化分析,探讨了解酒口服液(葛花、枳子、黄连、砂仁等)对酒精性肝损伤的防护作用机理。结果表明灌胃白酒可导致严重的肝细胞代谢及形态异常,细胞内DNA和RNA代谢性损害,解酒口服液对酒精所致的肝细胞形态和功能的改变有显著的改善。黄有文<sup>(12)</sup>等用流式细胞仪和激光扫描共聚焦显微镜技术观察了补肾生血方剂(生地、熟地、太子参、当归等)治疗 $\beta$ 珠蛋白生成障碍性贫血的疗效和对免疫功能的影响。采用流式细胞仪检测免疫指标,激光扫描共聚焦显微镜观察淋巴细胞DNA、RNA含量。结果显示治疗后病人外周血淋巴细胞总数、辅助T细胞及抑制T细胞比值均有提高,DNA排列整齐、分布均匀,含量较治疗前增加。表明补肾生血方药治疗 $\beta$ 珠蛋白生成障碍性贫血有比较稳定的疗效,并能改善患者的免疫功能。

### 结 语

对已进行的研究进行的回顾可以看出,激光扫描共聚焦显微技术在中医药领域的应用限于以下几个方面(1)中药单体或有效成分对心肌细胞、血管平滑肌细胞及神经细胞细胞内游离钙、细胞膜电位及pH值的影响(2)中药单体对细胞凋亡研究中bcl-2及bax基因的影响(3)中药复方保肝及抗肝纤维化的基础研究(4)中药复方治疗 $\beta$ 珠蛋白生成障碍性贫血的临床研究。而激光扫描共聚焦显微技术在现代医学研究中得到了更为广泛的应用,特别是在细胞亚结构观察、细胞凋亡、细胞内离子动态测定、细胞间通讯、三维重建、细胞分选等方面,临床涉及心血管、神经、肿瘤、血液、

呼吸、内分泌、五官科、骨科等多个学科,并取得了可喜的成果。激光扫描共聚焦显微技术在中医药研究中应用的还比较局限,它的优势还没有得到应有的发挥,特别是在中医的特色和优势学科中,如中医药抗肿瘤、中医骨科、中医基础理论研究,包括针灸机理研究等,以及中药药理及细胞内药物动力学等方面的研究中激光扫描共聚焦显微技术应有更广泛的应用前景,有待中医药工作者开发利用。

### 参 考 文 献

1. 李楠,尹岭,苏振伦主编.激光扫描共聚焦显微术.北京:人民军医出版社,1997:1.
2. 艾静,高焕焕,王,等.苦参碱对豚鼠心室肌细胞胞浆 $[Ca^{2+}]$ 的影响.哈尔滨医科大学学报 2000;34(4):235—236.
3. 董德利,孙建平,罗大力,等.小檗碱对豚鼠心室肌细胞胞浆内游离钙离子浓度的影响.中国药理学与毒理学杂志 2000;14(2):128—130.
4. 赵艳玲,乔国芬,周虹,等.小檗碱对KCl, Ouabain诱导的 $[Ca^{2+}]$ 升高的影响.哈尔滨医科大学学报 1999;33(4):265—268.
5. 金春华,赵克森,虎杖贰对正常人血管平滑肌细胞内钙和膜电位的调节作用.中国病理生理杂志 1999;15(3):233—236.
6. 金春华,赵克森,刘杰.虎杖苷对休克大鼠微血管平滑肌细胞内钙、pH和膜电位的影响.中国药理学通报 1998;14(6):539—542.
7. 陈文东,安文林,楚晋,等.茯苓水提液对新生大鼠神经细胞内钙离子浓度的影响.中国中西医结合杂志 1998;18(5):293—295.
8. 陆怡,许彩民,杨洋,等.阿魏酸钠对氧化诱导人淋巴细胞凋亡的抑制作用.中国医学科学院学报 1998;20(1):44—48.
9. 蒙一纯,丁霞,贲长恩,等.肝纤维化启动期大鼠血清对肝星形细胞TGF- $\beta_1$ 表达的影响.解剖学报 2000;31(3):257—260.
10. 蒙一纯,丁霞,贲长恩,等.益气活血方对肝星形细胞(HSC)I型胶原的表达影响的研究.中国组织化学与细胞化学杂志 2000;9(1):5—8.
11. 王新月,田德禄,蔡虹,等.解酒口服液对酒精性肝损伤肝细胞保护作用的激光共聚焦显微镜分析.中国中医基础医学杂志 2000;3(3):34—37.
12. 黄有文,张新华,王荣新,等.补肾生血治疗 $\beta$ 珠蛋白生成障碍性贫血进一步临床研究和免疫功能测定.临床血液学杂志 2000;13(2):54—56.

(收稿 2001-08-29 修回 2001-10-21)