

Hoechst 33342 与 DAPI 标记细胞核对胞内活性氧检测效果的比较

周玉环, 刘树迎, 平苏宁, 王晶晶, 陈大堤, 黄锦桃, 李朝红

(中山大学中山医学院组织学与胚胎学教研室, 广东省广州市 510080)

[关键词] 活性氧; 血管平滑肌细胞; Hoechst 33342; DAPI

[摘要] **目的** 探讨 Hoechst 33342 与 DAPI 两种荧光染料标记细胞核后对细胞内活性氧水平的影响。**方法** 静息培养的血管平滑肌细胞加入晚期糖基化终末产物作用 10 min, 加入标记活性氧的荧光探针 H2DCFDA, 再分别加入 Hoechst 33342 和 DAPI 不同荧光染料进行核标记。荧光显微镜下观察细胞核被标记的数目与细胞内活性氧的荧光水平。**结果** Hoechst 33342 染料标记 5 min 后即可见细胞核被标记上, 随着时间的延长被标记的核数目并不发生改变; 而与之明显不同的是, DAPI 染料标记 5 min 时, 只有几个细胞核被标记上, 但随着时间的延长被标记的核数目越来越多。Hoechst 33342 标记后细胞内活性氧的荧光强度并不随着时间的延长发生变化, 而 DAPI 标记后细胞内活性氧绿色荧光的细胞数就越少, DAPI 标记的细胞核数与显示活性氧绿色荧光的细胞数呈反比。这些结果提示, DAPI 染料在标记细胞核时破坏了活性氧在细胞内的储存, 干扰了实验结果。**结论** 检测细胞内活性氧时, 应使用 Hoechst 33342 核标记染料而不能用 DAPI。

[中图分类号] R329

[文献标识码] A

Comparison of the Influence of Hoechst 33342 and DAPI on the Level of Intracellular Reactive Oxygen Species

ZHOU Yu-Huan, LIU Shu-Ying, PING Su-Ning, WANG Jing-Jing, CHEN Da-Di, HUANG Jin-Tao, and LI Chao-Hong
(Department of Histology and Embryology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Reactive Oxygen Species; Vascular Smooth Muscle Cells; Hoechst 33342; DAPI

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influence on the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) by staining the cell nuclei using two fluorescent dyes —Hoechst 33342 and DAPI, respectively. **Methods** Vascular smooth muscle cells (VSMC) were stimulated with advanced glycation end products (AGE) for 10 minutes and then incubated with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA). After that, cell nuclei were stained with Hoechst 33342 and DAPI respectively. And through the analysis of the number of labeled nuclei and the level of intracellular ROS by fluorescence microscopy, the fluorescence intensity of intracellular ROS were detected by staining with two different fluorescent dyes.

Results After staining with Hoechst 33342 for 5 min, cell nuclei were labeled immediately and the number of them did not change with the increase of staining time. However, there were only a few cell nuclei could be labeled when the cells were stained with DAPI for 5 min, with the increase of staining time, more and more cell nuclei could be labeled. Surprisingly, the fluorescence intensity of Hoechst 33342 group showed no significant differences staining at 5, 10 and 20 min. However, with the increase of staining time, the more the cell nuclei were labeled with DAPI, the less the fluorescence intensity of ROS was. These results suggest that DAPI damages the storage of intracellular ROS during the nuclei staining, thus disturbing the experimental results. **Conclusion** Cell nuclei should be stained with Hoechst 33342 not DAPI during the detection of intracellular ROS.

[收稿日期] 2013-09-14

[基金项目] 国家自然科学基金(30871023 和 81070124); 广东省自然科学基金(S2012010009199); 高等学校博士学科点专项科研基金(20090171110049)

[作者简介] 周玉环, 硕士研究生, 研究方向为血管重构分子机制与防治, E-mail 为 yhzhou13@126.com。刘树迎, 博士, 讲师, 研究方向为血管重构分子机制与防治, E-mail 为 liushuying212914@126.com。通信作者李朝红, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管重构分子机制与防治, E-mail 为 lichao@mail.sysu.edu.cn。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是生物体内一类活性含氧化合物的总称,它包括超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基等^[1]。研究显示,在高血压、高血脂、糖尿病血管病变如动脉粥样硬化等疾病的发生过程中,细胞内 ROS 水平迅速升高,促进上述疾病的发生、发展^[14]。

H2DCFDA 探针是一种常用的检测细胞内 ROS 水平的荧光探针^[5]。H2DCFDA 本身没有荧光,探针进入细胞后,被细胞内的酯酶水解生成 DCFH,细胞内产生的 ROS 氧化 DCFH,生成发出荧光的 DCF,通过荧光显微镜检测 DCF 的荧光强度可以判断细胞内 ROS 水平^[6]。但目前,在检测 ROS 的过程中对产生 ROS 荧光的细胞进行细胞核标记的相关报道尚少见。标记细胞核的化学试剂有很多种,常用的有 DAPI 和 Hoechst 33342。DAPI 是一种常用的标记细胞核的荧光染料,它可与细胞核中的双链 DNA 相结合,常用于标记固定细胞的细胞核^[7,8]。Hoechst 33342 也是一种常用的标记细胞核的荧光染料,它选择性地与细胞核中的双链 DNA 相结合,常用于活细胞的细胞核标记^[9,10]。那么,这两种细胞核染料究竟哪一种对产生 ROS 的细胞进行核标记的效果好?目前尚无相关报道。为此,本研究通过在荧光显微镜下观察 Hoechst 33342 与 DAPI 两种荧光染料分别标记产生 ROS 荧光的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的细胞核的效果,从而选出一种较好的染料能够应用于通过荧光方法检测 ROS 时对细胞的细胞核进行标记,希望能够为 ROS 的检测提供更好的技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

台盼蓝、Hoechst 33342、DMSO 购于美国 Sigma-aldrich 公司;DAPI 购于美国 Roche 公司;ROS 检测试剂 H2DCFDA 购于美国 Invitrogen 公司;DMEM 培养基购于美国 Life 公司;胎牛血清购于天津市灏洋生物科技股份有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购于广州斯佳生物科技公司;晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)。

1.2 细胞培养及处理

参考文献[11]方法,体外分离 C57BL/6J 小鼠的主动脉,通过酶消化法进行分离、培养出小鼠主动脉 VSMC。在 37℃、5% CO₂ 条件下培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。实验分组:参考文献[12],按照直径为 35 mm 的细胞培养皿中 AGE(阳

性对照)终浓度为 50 mg/L,分别作用细胞 0、10、10、10 及 10 min 设为一组,随后用终浓度为 16 μmol/L Hoechst 33342 染料染色 0、0、5、10 及 20 min;使相同终浓度为 50 mg/L AGE 同样作用细胞 0、10、10、10 及 10 min 为另一组,随后用相同终浓度为 16 μmol/L DAPI 染料染色 0、0、5、10 及 20 min。

1.3 细胞活性的形态学检测

取对数生长期的 VSMC,接种于含有盖玻片的直径为 35 mm 的细胞培养皿(Corning, USA)中,待细胞生长为典型形态,融合度为 70%~80%时,换用无血清 DMEM 培养基培养 24 h,在光学显微镜下拍片;弃去培养皿内的无血清培养基, PBS 清洗 2 次,加入浓度为 0.2% 的台盼蓝染液,室温下染色 2 min^[13],取出盖玻片, PBS 清洗残留染液, 50% 甘油封片,在光学显微镜下观察拍片。

1.4 晚期糖基化终末产物的制备

参考文献[12]方法,将 1 mmol/L 无脂肪酸的 BSA 与 0.5 mol/L 葡萄糖溶于 PBS(0.2 mol/L, pH=4.0)中,反应混合物用 PBS 进行透析,透析后用 0.22 μm 微孔膜过滤除菌,在 37℃、5% CO₂ 无菌条件下避光孵育 8 周。荧光分光光度计检测其激发光波长峰值为 370 nm,发射光波长峰值为 440 nm~450 nm,鉴定符合 AGE 特征性荧光光谱。BSA 法测定蛋白浓度,以蛋白浓度代表 AGE 浓度。

1.5 细胞内活性氧检测

H2DCFDA 探针进入细胞后,被细胞内的酯酶水解生成 DCFH,细胞内产生的超氧阴离子和过氧化氢等 ROS 氧化 DCFH,生成发出荧光的 DCF,通过检测 DCF 的荧光可以检测细胞内 ROS 水平^[6]。取含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 VSMC,均匀地接种于含盖玻片的直径为 35 mm 的细胞培养皿内,待细胞生长到融合度为 70%~80%时,换用无血清的 DMEM 培养基培养 24 h。不同处理因素作用后,盖玻片用无血清培养基清洗 1 次,加入含 10 μmol/L H2DCFDA 探针的无血清培养基,在条件为 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱内孵育 30 min^[14]。随后,用无血清培养基清洗盖玻片 2 次, PBS 清洗 2 次, 50% 甘油封片,在荧光显微镜(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)下随机拍片,绿色荧光强度用 Image Pro Plus 软件进行分析。

1.6 Hoechst 33342 与 DAPI 染料标记细胞核

将 Hoechst 33342 与 DAPI 染液分别加入到 37℃ 温浴的无血清培养基中,终浓度均为 16 μmol/L。静息培养的 VSMC 用 50 mg/L AGE 作用 10 min,加入 H2DCFDA 探针孵育 30 min,将盖玻片

用无血清的 DMEM 培养基清洗 2 次,弃去废液。不同组内分别加入上述配置的浓度均为 16 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hoechst 33342 与 DAPI 染液,染色时间分别是 0、0、5、10 及 20 min,染色结束后,PBS 清洗盖玻片 2 次,50% 甘油封片,在荧光显微镜下随机观察拍片,绿色荧光强度用 Image Pro Plus 软件进行分析。

1.7 统计学方法

每组实验重复 3 次以上,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血管平滑肌细胞活性

光镜下,无血清 DMEM 培养基培养 24 h 后的 VSMC 完全贴壁,界限清楚,呈长梭形,胞核位于细胞中央,呈圆形或椭圆形。用浓度为 0.2% 的台盼蓝染液染色后,光镜下观察到,VSMC 的形态与未染色时无差别,未见呈蓝染的死亡细胞。提示 VSMC 有平滑肌细胞特性,且活性较好,可用于后续研究(图 1)。

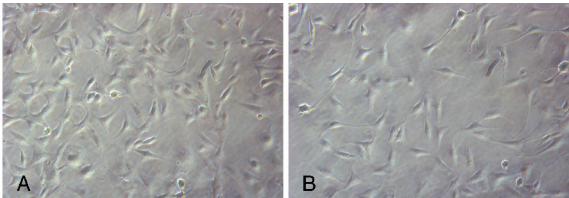


图 1. VSMC 活性的形态学检测(×100) A 为饥饿 24 h 后的 VSMC,B 为饥饿 24 h 后 0.2% 台盼蓝染液染色的 VSMC。

Figure 1. The morphological detection of the activity of VSMC

2.2 Hoechst 33342 与 DAPI 染核后对血管平滑肌细胞活性氧荧光强度的影响

正常 VSMC 内 ROS 水平较低,用浓度为 50 mg/L AGE 作用 10 min 后,VSMC 内的 ROS 水平显著升高($P < 0.05$)。Hoechst 33342 染料标记 5 min 后即可见细胞核被标记上,且随着时间的延长被标记的核数目不发生改变;而 DAPI 染料标记 5 min 时,只有几个细胞核被标记上,随着时间的延长被标记的核数目逐渐增多。Hoechst 33342 染料标记后细胞内的 ROS 荧光强度并不随时间延长而发生变化,与未标记组 ROS 荧光强度无显著性差异($P > 0.05$);而 DAPI 标记随着时间的延长被标记上的细胞核数目越多,显示 ROS 绿色荧光的细胞数就越少,细胞内 ROS 荧光强度越低,均与未标记组的荧光强

度有显著差异($P < 0.01$;图 2 和表 1)。

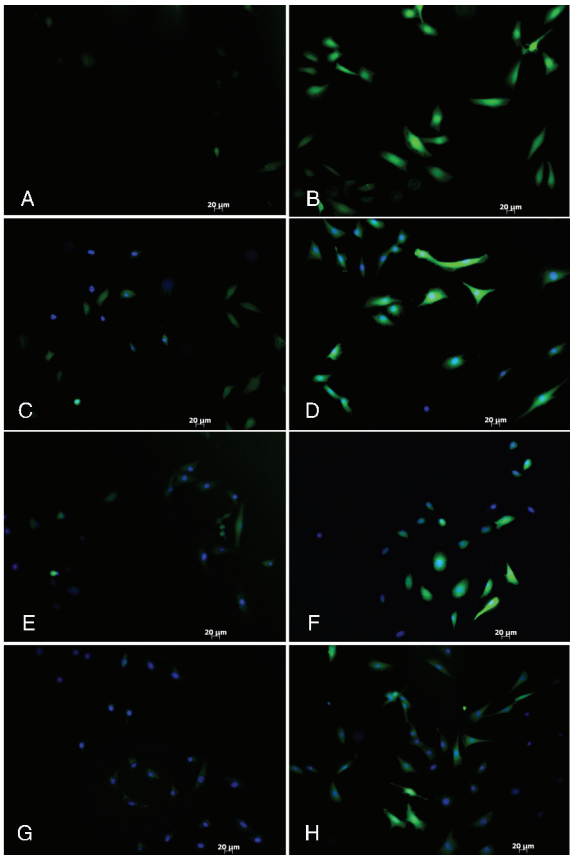


图 2. Hoechst 33342 与 DAPI 染核后对 VSMC 内 ROS 荧光强度的影响(×200) A 为阴性对照组,B 为阳性对照组,C 为 AGE 刺激后 DAPI 标记 5 min 组,D 为 AGE 刺激后 Hoechst 33342 标记 5 min 组,E 为 AGE 刺激后 DAPI 标记 10 min 组,F 为 AGE 刺激后 Hoechst 33342 标记 10 min 组,G 为 AGE 刺激后 DAPI 标记 20 min 组 H 为 AGE 刺激后 Hoechst 33342 标记 20 min 组。

Figure 2. The influence of Hoechst 33342 and DAPI on fluorescence intensity of ROS in the vascular smooth muscle cells

表 1. Hoechst 33342 与 DAPI 染色对血管平滑肌细胞内 ROS 荧光强度的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 50$)

Table 1. The influence of Hoechst 33342 and DAPI on fluorescence intensity of ROS in the vascular smooth muscle cells

分 组	未标记组	Hoechst 33342 染料标记组	DAPI 染料标记组
阴性对照	6.0 ± 4.0		
阳性对照	24.9 ± 14.4 ^a		
染色 5 min		22.2 ± 14.9 ^b	15.8 ± 12.6 ^{bce}
染色 10 min		22.4 ± 16.2 ^b	7.7 ± 8.4 ^{cde}
染色 20 min		20.7 ± 14.4 ^b	6.3 ± 6.4 ^{cde}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与阴性对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与阳性对照组比较; d 为 $P < 0.01$, DAPI 染料标记组间比较; e 为 $P < 0.05$, 与 Hoechst 33342 染料标记组相同染色时间点比较。

3 讨论

ROS 逐渐成为分子家族领域中的研究热点,其作为细胞内一种重要的信号分子参与细胞多种功能的调控。采用荧光探针通过荧光显微镜检测细胞内 ROS 水平的方法已得到广泛应用^[15],然而,在此检测过程中对产生 ROS 荧光的细胞的细胞核进行标记的相关报道尚少见,这对细胞内 ROS 荧光水平的定量分析带来了较大困难。为了探讨这一有意义的问题,本研究通过观察对静息培养的 VSMC 加入 AGE 作用 10 min,诱导 VSMC 内的 ROS 水平迅速增加,再分别用 Hoechst 33342 和 DAPI 两种荧光染料分别对产生 ROS 的细胞进行核标记,比较两种荧光染料标记细胞核后对细胞内 ROS 水平的影响。研究表明,DAPI 染料在标记细胞核时破坏了 ROS 在细胞内的储存,干扰了实验结果,而 Hoechst 33342 染料不仅能够快速的标记细胞核,且不影响细胞内已产生的 ROS 水平。所以,通过荧光方法检测 ROS 时,应使用 Hoechst 33342 染料标记细胞核,而不能使用 DAPI 染料,因其标记细胞核后会导导致细胞内的 ROS 水平显著减低。何种原因导致 DAPI 染料破坏了 ROS 在细胞内的储存? 目前尚不清楚。

尽管如此,亦有少数文献中报道其使用 DAPI 染料对产生 ROS 细胞的细胞核进行标记,然其标记效果亦不理想,通过观察分析其实验结果发现,DAPI 染料标记的细胞核数目越多,其细胞显示的 ROS 绿色荧光反而减弱。这些研究报道与上述的研究结果相一致。这些结果同样提示 DAPI 染料不能用于标记产生 ROS 细胞的细胞核。而本研究所使用的另一种荧光染料—Hoechst 33342 与 DAPI 染料相比,产生了截然不同的效果,其不仅能够快速标记细胞核,且不影响细胞内的 ROS 荧光水平,是检测 ROS 水平的过程中一种理想的核标记染料。

近年来 ROS 在心血管疾病的研究中取得了一定的进展,为高血压、高血脂、糖尿病血管病变等多种疾病的研究提供了新的突破途径。研究显示,在上述疾病的发生过程中,机体内的 ROS 平衡失调,细胞内的 ROS 水平显著升高^[1,3,4]。由此可见,对 ROS 这一重要因素进行深入研究显得颇为重要。本研究通过采用 Hoechst 33342 染料对产生 ROS 的细胞的细胞核进行标记的方法,解决了在 ROS 检测过程中对细胞核进行快速标记的问题,能够更好的对细胞内 ROS 水平进行定量分析,从而方便了 ROS

的研究过程,为未来发现上述疾病新的干预靶点及提出更优的治疗方案起到十分有意义的作用。

[参考文献]

- [1] Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, et al. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species[J]. J Nutr Biochem, 2007, 18 (9): 567-579.
- [2] Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular nox, and hypertension: Focus on translational and clinical research[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, Epub ahead of print.
- [3] Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance [J]. Hypertension, 2004, 44 (3): 248-252.
- [4] Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension[J]. Cardiovasc Res, 2006, 71 (2): 247-258.
- [5] de Castro PA, Savoldi M, Bonatto D, et al. Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Eukaryot Cell, 2011, 10 (3): 398-411.
- [6] Okoh VO, Felty Q, Parkash J, et al. Reactive oxygen species via redox signaling to PI3K/AKT pathway contribute to the malignant growth of 4-hydroxy estradiol-transformed mammary epithelial cells [J]. PLoS One, 2013, 8 (2): e54206.
- [7] Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe[J]. Biotech Histochem, 1995, 70 (5): 220-233.
- [8] Zhao H, Li J, Traganos F, et al. Cell fixation in zinc salt solution is compatible with DNA damage response detection by phospho-specific antibodies[J]. Cytometry A, 2011, 79 (6): 470-476.
- [9] Gregoire M, Hernandez-Verdun D, Bouteille M. Visualization of chromatin distribution in living PTO cells by Hoechst 33342 fluorescent staining[J]. Exp Cell Res, 1984, 152 (1): 38-46.
- [10] Hubbard KS, Gut IM, Scheeler SM, et al. Compatibility of SYTO 13 and Hoechst 33342 for longitudinal imaging of neuron viability and cell death[J]. BMC Res Notes, 2012, 5: 437.
- [11] Liu S, Li Y, Zhang Z, et al. α 1-Adrenergic receptors mediate combined signals initiated by mechanical stretch stress and norepinephrine leading to accelerated mouse vein graft atherosclerosis [J]. J Vasc Surg, 2013, 57 (6): 1 645-656.
- [12] Li Y, Liu S, Zhang Z, et al. RAGE mediates accelerated diabetic vein graft atherosclerosis induced by combined mechanical stress and AGEs via synergistic ERK activation[J]. PLoS One, 2012, 7 (4): e35016.
- [13] 彭彬, 吴晶晶, 李烨, 等. 贴壁培养细胞台盼蓝拒染试验的方法学探讨[J]. 激光生物学报, 2011, 20 (2): 269-273.
- [14] Sato H, Sato M, Kanai H, et al. Mitochondrial reactive oxygen species and c-Src play a critical role in hypoxic response in vascular smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Res, 2005, 67 (4): 714-722.
- [15] 章舒祺, 魏永锋. 检测活性氧的荧光探针新进展[J]. 光谱实验室, 2009, 26 (4): 794-802.

(此文编辑 文玉珊)