

学校编码：10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号：20520131151566

UDC\_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

拉曼光谱和成像技术用于细胞体系的研究

**The Application of Raman Spectroscopy and Imaging in Cellular Research**

张金亮

指导教师姓名：任斌教授

专业名称：分析化学

论文提交日期：2016年5月

论文答辩日期：2016年5月

学位授予日期：2016年 月

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评阅人：\_\_\_\_\_

2016年5月



# **The Application of Label-free Raman Spectroscopy and Imaging on Cellular Research**

A Dissertation Submitted for the Degree of

**Master of Science**

By

**Jin-Liang Zhang**

Directed by Prof. Bin Ren

Department of Chemistry

College of Chemistry and Chemical Engineering

Xiamen University

May, 2016

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘要.....	I
Abstract .....	III
<b>第一章 绪论.....</b>	<b>1</b>
1.1 癌细胞.....	1
1.1.1 癌细胞的特点 .....	1
1.1.2 癌症的诊断 .....	2
1.2 单细胞水平研究技术.....	2
1.2.1 常用的单细胞分析技术.....	3
1.3 振动光谱技术.....	5
1.3.1 拉曼光谱原理 .....	6
1.3.2 共振拉曼原理 .....	7
1.3.3 拉曼成像技术 .....	8
1.4 拉曼光谱和成像在生物医学研究的应用 .....	8
1.4.1 细胞种类的鉴别 .....	9
1.4.2 细胞分裂过程 .....	10
1.4.3 细胞凋亡的研究 .....	13
1.5 本论文的研究目的与主要内容 .....	15
参考文献 .....	16
<b>第二章 实验.....</b>	<b>25</b>
2.1 实验试剂 .....	25
2.2 实验所需溶液的配制 .....	26
2.3 常规实验仪器 .....	27
2.3.1 共聚焦显微技术 .....	27
2.3.2 共聚焦拉曼光谱系统 .....	28
2.4 酶标仪的介绍 .....	31
2.4.1 EnSpire 酶标仪.....	33
2.5 细胞培养及其相关操作 .....	33
2.5.1 细胞培养器皿和仪器 .....	33

2.5.2 细胞操作 .....	34
2.6 细胞拉曼检测 .....	36
2.6.1 细胞在封片条件下的常规拉曼检测 .....	36
2.6.2 抗肿瘤药物作用细胞后的常规拉曼检测 .....	37
2.6.3 细胞原位培养与成像 .....	37
2.7 细胞的 MTT 实验 .....	38
参考文献 .....	38
<b>第三章 拉曼光谱和成像技术用于肝正常细胞 (7701) 和肝癌细胞 (Huh7) 的研究</b>	<b>41</b>
3.1 拉曼光谱和拉曼成像用于 7701 和 Huh7 的研究 .....	43
3.1.1 7701 和 Huh7 在拉曼光谱上的区别 .....	43
3.1.2 7701 和 Huh7 在拉曼成像结果的差异 .....	44
3.2 乙醇诱导 7701 和 Huh7 凋亡的研究 .....	45
3.2.1 乙醇作用肝细胞的机理 .....	45
3.2.2 乙醇诱导 7701 和 Huh7 的 MTT 实验 .....	46
3.2.3 乙醇作用诱导 7701 和 Huh7 凋亡后的拉曼光谱分析 .....	47
3.2.4 乙醇作用诱导 7701 和 Huh7 凋亡后的拉曼成像分析 .....	49
3.3 7701 和 Huh7 在不同生长时期的拉曼光谱和拉曼成像 .....	51
3.3.1 7701 和 Huh7 在不同增殖时期的拉曼光谱分析 .....	51
3.3.2 7701 和 Huh7 在不同增殖时期的成像结果 .....	53
3.4 本章小结 .....	54
参考文献 .....	54
<b>第四章 拉曼光谱用于宫颈癌细胞的研究</b>	<b>57</b>
4.1 拉曼光谱和拉曼成像用于 CaSki 和 HeLa 的研究 .....	59
4.1.1 CaSki 和 HeLa 的拉曼光谱分析 .....	59
4.1.2 CaSki 和 HeLa 拉曼成像结果分析 .....	60
4.2 顺铂诱导不同宫颈癌细胞凋亡的研究 .....	61
4.2.1 顺铂的抗肿瘤机制 .....	61
4.2.2 顺铂药物的成份分析 .....	63
4.2.3 浓度序列的顺铂对 CaSki 和 HeLa 的 MTT 实验 .....	64
4.3 顺铂和二甲氧基雌二醇作用于 CaSki 的结果分析 .....	66

4.3.1 顺铂和二甲氧基雌二醇作用于 CaSki 的 MTT 实验分析 .....	66
4.3.3 顺铂和 2-ME 分别作用于 CaSki 后的成像分析 .....	69
4.4 顺铂对 CaSki 的时间序列研究分析 .....	69
4.4.1 顺铂对 CaSki 的时间序列 MTT 实验 .....	69
4.4.2 顺铂作用 CaSki 时间序列的成像分析 .....	71
4.5 本章小结 .....	73
参考文献: .....	74
<b>第五章 细胞在原位环境下成像条件的探索 .....</b>	<b>77</b>
5.1 细胞培养原位装置的结构图 .....	78
5.2 激光波长与激光功率对细胞成像的影响 .....	81
5.3 不同条件对细胞成像的影响 .....	83
5.3.1 温度和二氧化碳对细胞损伤的影响 .....	83
5.3.2 CaSki 细胞在 x-line 和 xy-imaging 模式下的成像结果 .....	83
5.4 细胞在不同放置条件下的成像结果 .....	85
5.5 本章小结 .....	89
参考文献 .....	90
<b>总结与展望 .....</b>	<b>91</b>
<b>在学期间发表论文 .....</b>	<b>93</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>95</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

**Table of Contents**

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1 A brief introduction to cancer .....	1
1.1.1 Characteristics of cancer.....	1
1.1.2 Diagnosis of cancer .....	2
1.2 Significance of single-cell research.....	2
1.2.1 Common techniques for single cell analysis .....	3
1.3 Vibration spectrum.....	5
1.3.1 Principle of Raman spectroscopy .....	6
1.3.2 Resonance Raman spectroscopy.....	7
1.3.3 Raman imaging.....	8
1.4 Biomedical applications of Raman spectroscopy.....	8
1.4.1 Identify of cell .....	9
1.4.2 Mitosis .....	10
1.4.3 Apoptosis.....	13
1.5 Objective and main contents of this thesis .....	15
References .....	16
<b>Chapter 2 Experimental section</b> .....	<b>25</b>
2.1 Reagents .....	25
2.2 Preparation of solutions.....	26
2.2.1 Pretreatment of cellular devices .....	27
2.3 Experimental apparatus .....	27
2.3.1 Confocal microscopic system.....	27
2.3.2 Confocal Raman spectroscopy .....	28
2.4 Introduction of Colorimetric method .....	31
2.4.1 EnSpire .....	33

2.5	Cell culture .....	33
2.5.1	Devices and instruments for cell culture .....	33
2.5.2	Pretreatment of devices .....	34
2.6	Cellular experiment .....	36
2.6.1	Cell detection by conventional Raman .....	36
2.6.2	Cell detection after treating with drugs .....	37
2.6.3	cellular imaging .....	37
2.7	MTT experiment .....	38
	References .....	38

### **Chapter 3 Investigation of the 7701 and Huh7 cell by Raman spectroscopy and imaging 41**

3.1	Investigation of 7701 and Huh7 by Raman spectroscopy and imaging .....	43
3.1.1	Raman spectroscopy of 7701 and Huh7 .....	43
3.1.2	Raman imaging of 7701 and Huh7 .....	44
3.2	The EtOH-induced apoptosis of 7701 and Huh7 .....	45
3.2.1	Mechanism of EtOH-induced apoptosis of liver cancer .....	45
3.2.2	MTT experiment of EtOH with 7701 and Huh7 .....	47
3.2.3	Raman spectroscopy of 7701 and Huh7 during apoptosis .....	48
3.2.4	Raman imaging of 7701 和 Huh7 during apoptosis .....	49
3.3	Investigation of 7701 and Huh7 in the logarithmic and stationary phase .....	51
3.3.1	Raman spectroscopy of 7701 and Huh7 in the logarithmic and stationary phase .....	51
3.3.2	Raman imaging of 7701 和 Huh7 in the logarithmic phase and stationary phase .....	53
3.4	Summary .....	54
	References .....	54

### **Chapter 4 Investigation of cervix cancers by Raman spectroscopy .....**

4.1	Research of CaSki and HeLa .....	59
4.1.1	Raman spectroscopy of CaSki and HeLa .....	59
4.1.2	Raman imaging of CaSki and HeLa .....	60
4.2	Research of CaSki and HeLa treated with cisplatin .....	61

---

4.2.1	The mechanism of cisplatin induced cellular apoptosis .....	61
4.2.2	Composition of cis-platin .....	63
4.2.3	MTT result of the concentration-series cisplatin on CaSki and HeLa .....	64
4.3	Research of CaSki treated with cisplatin and 2-ME .....	66
4.3.1	MTT result of the concentration-series 2-ME and cisplatin on CaSki .....	68
4.3.3	Raman imaging of CaSki treated with cis-platin and 2-ME.....	69
4.4	Research of time-series cisplatin on CaSki .....	69
4.4.1	MTT result of the time-series cis-platin on CaSki .....	69
4.4.2	Raman imaging of time-series cis-platin on CaSki .....	71
4.5	Summary .....	73
	References .....	74
	<b>Chapter 5 Raman imaging of cells in in-situ condition .....</b>	<b>77</b>
5.1	Devices of cell culture.....	78
5.2	Influence of laser wavelengh and power on Raman imaging .....	81
5.3	Influence of different condition on Raman imaging .....	83
5.3.1	Temperature and CO <sub>2</sub> .....	83
5.3.2	x-line and xy-imaging mode.....	83
5.4	Raman imaging of cells in upright and invert conditions .....	85
5.5	Summary .....	89
	References .....	90
	<b>Summary and prospects .....</b>	<b>91</b>
	<b>Publications during postgraduate study .....</b>	<b>93</b>
	<b>Acknowledgements .....</b>	<b>95</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

细胞是真核生物的最小生命单元，也是维持生物形态和功能的最基本单位。细胞在生命过程中时时刻刻都进行着复杂的新陈代谢。细胞内所有信息的传递、物质交换、胞内分子的变化都和细胞的状态有着密切联系。它是生物个体在生命过程中疾病产生和发展的基础。自从人类发明了显微镜，对生命的研究对象开始由宏观的个体、器官、组织向细胞、亚细胞水平发展。现在，人们对细胞的整体组成以及细胞内亚结构已经基本确定。尽管许许多多的科学家对细胞的研究已经深入细胞内（细胞核、DNA、核内蛋白质、脂质），但是由于细胞这一体系的特殊性及其复杂性，因而对细胞的许多研究问题都未能得到解决。所以当前急需发展多种细胞检测和分析技术，以研究细胞中各类生物分子的结构、分布以及含量的变化。这对研究细胞病理的发生机制，以及药物与细胞的作用机制都有着非常重要的生物学意义。

与其他光学技术相比，拉曼光谱具有较多的优势。拉曼光谱能够检测样品的分子指纹信息，从而反映分子的种类、结构及其所处环境的信息。此外，拉曼光谱技术不需要样品前处理、标记，因此可用于生物传感研究。拉曼光谱谱峰通常较窄，极大地避免了样品中相邻谱峰的重叠，因而特别适合于多组分分析。拉曼光谱所用的激光波长分布从短波长的紫外光到较长波长的红外光区域，且稳定性较好。因此拉曼光谱广泛应用在生物细胞的研究中。

本论文主要围绕生物细胞这一重要体系，分别选取肝正常细胞 7701、肝癌细胞 Huh7、宫颈癌 HeLa 细胞、CaSki 细胞等细胞系，应用拉曼光谱分别对它们进行光谱成像研究。然后选用乙醇及顺铂、二甲氧基雌二醇等药物诱导细胞凋亡，对细胞凋亡过程中胞内分子变化信息进行研究。最后运用我们组自主设计的细胞原位培养装置，开展对细胞在原位条件下的成像条件的研究。论文的主要创新工作与成果如下：

1. 培养了肝正常细胞（7701）和肝癌细胞（Huh7），通过拉曼光谱成像对 7701 和 Huh7 进行了鉴别，发现 7701 含有更多脂类。分别对这 7701 和 Huh7 两株细胞在对数期和稳定期的拉曼光谱进行分析，发现稳定期的细胞比对数期的细

胞内含有更多的  $\beta$ -胡萝卜素。

2. 通过 MTT 实验获得乙醇诱导 7701 和 Huh7 的  $IC_{50}$  值，发现乙醇更容易诱导 Huh7 凋亡。通过拉曼成像发现乙醇进入细胞后，会使脂质发生氧化，从而诱导细胞凋亡。说明含有脂类较多 7701 细胞，具有较高的抗氧化性。

3. 运用拉曼光谱技术对两种不同的宫颈癌细胞 HeLa 和 CaSki 细胞进行准确快速鉴别，发现 HeLa 细胞具有较多的  $\beta$ -胡萝卜素和饱和脂类。通过 MTT 实验发现顺铂更容易诱导 HeLa 凋亡。说明含有较多  $\beta$ -胡萝卜素的 HeLa 细胞抗药性更低。同时用 MTT 实验获得顺铂和二甲氧基雌二醇作用于 CaSki 细胞的  $IC_{50}$  值，并用这一浓度的两种药物作用于宫颈癌细胞，用拉曼光谱成像研究了药物对细胞的作用机理。并利用细胞色素 c 含量区分细胞凋亡的程度。

4. 为了在更长时间范围内研究活细胞内的生命活动过程，我们采用原位装置对细胞进行研究，发现细胞在原位条件下容易受到激光的损伤。通过对不同的成像条件进行探索及优化，获得了细胞原位条件下成像不发生损伤的条件以及损伤的原因。

**关键词：**拉曼光谱；细胞成像；细胞凋亡；乙醇；抗肿瘤药物；细胞损伤

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库