

## 傅里叶变换红外光谱用于胆囊癌细胞及其细胞核结构的基础研究

孙学军<sup>1</sup>, 孙丰雷<sup>1</sup>, 杜俊凯<sup>1</sup>, 潘庆华<sup>2</sup>, 张元福<sup>2</sup>, 徐怡庄<sup>2</sup>, 石景森<sup>1\*</sup>, 吴瑾光<sup>2</sup>

1. 西安交通大学医学院第一附属医院普外科, 陕西 西安 710061
2. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

**摘要** 应用傅里叶变换红外光谱(FTIR)对体外培养胆囊癌细胞、细胞核进行检测, 对照胆囊癌组织光谱特征, 研究胆囊癌细胞株及细胞核的光谱表现; 为红外光谱法诊断胆囊癌奠定细胞学基础。应用美国 Nicolet(尼高力)公司 5700-II 型红外光谱仪, 组织标本放置于 OMNIC 采样器表面进行检测, 记录红外光谱; 体外培养胆囊癌细胞株(GBC-SD)及提取的细胞核涂于欧米采样器表面进行红外检测, 记录红外光谱, 得到时间轴上体外培养细胞株及细胞核的光谱图; 选择特征性光谱与胆囊癌组织光谱进行比对。结果发现胆囊癌细胞株红外光谱特征与相应癌组织光谱特征存在异同。从而可得出结论: 将体外培养肿瘤细胞株及提取的肿瘤细胞核, 进行 FTIR 测定是行之有效的细胞红外光谱检测手段, 能得到体外培养细胞的红外谱图; 胆囊癌组织所表现的红外光谱特征具有胆囊癌细胞本身的红外光谱特征, 同时也具有组织自身的复杂特点; FTIR 为应用于胆囊癌的定性诊断提供了更加丰富的细胞学基础。

**关键词** 傅里叶变换红外光谱; 胆囊癌; 细胞株; 细胞核

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)07-1750-04

### 引言

原发性胆囊癌是胆道系统最常见的恶性肿瘤, 近年来发病率日益增高。该病缺乏典型的临床表现, 一经发现多属中晚期, 手术切除率低, 术后 5 年生存率不到 5%, 而早期原发性胆囊癌术后 5 年生存率甚至可达 100%。因此, 早期诊断是提高疗效、改善预后的关键。

自 1985 年 Benedetti 等首次将傅里叶变换红外光谱用于白血病人淋巴细胞的研究以来, 该技术在肿瘤领域的研究日益受到人们的重视。红外光谱是分子结构的灵敏探针, 能够在分子水平上对肿瘤进行研究, 目前已经成为生物医学领域的热门话题。傅里叶变换红外光谱已用于宫颈癌、结肠癌、肝癌、皮肤癌、乳腺癌、口腔鳞状细胞癌、胃癌等组织的研究, 并获得了一些有意义的信息; 在细胞水平已有研究报告<sup>[1-4]</sup>, 但在亚细胞结构研究未见有报告。而肿瘤细胞是肿瘤组织的主要组成成分, 并决定着肿瘤的生物特点, 细胞恶变的一个重要特征就是由于 DNA 的大量复制而导致其在细胞核内含量增加, 细胞核体积增大和核浓染是在 HE 染色光镜下判断其良恶性的重要指标, 本实验应用傅里叶变换红

外光谱对胆囊癌组织, 细胞株及其亚细胞结构细胞核进行检测研究, 期望为肿瘤组织的定性诊断提供更丰富的细胞学基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 标本取材和处理

所有组织标本为西安交通大学医学院第一附属医院外科手术切除的胆囊癌, 征得患者家属同意, 手术切除后立即取材。用无菌蒸馏水清洗干净标本后, 取大小为 1 cm×1 cm×1 cm 的组织两块, 均取自癌中心部位, 一块放入液氮中冻存备用, 一块用 10% 的福尔马林溶液固定, 石蜡包埋, 常规病理检测。

#### 1.2 胆囊癌细胞株的培养及其细胞核的制备

胆囊癌细胞株(GBC-SD)由西安交通大学医学院中心实验室提供。胆囊癌细胞放在 RPMI1640 培养液(含 10% 胎牛血清, 青霉素和链霉素各 100 U·mL<sup>-1</sup>)中, 置 37 °C, 饱和湿度, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养, 待细胞进入对数生长期后, 收集细胞, 应用细胞核制备试剂盒提取所需癌细胞核以备检测。

收稿日期: 2008-11-16, 修订日期: 2009-02-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371604, 50673005, 50203001)和陕西省科学技术研究发展计划项目(2006K09-G8)资助

作者简介: 孙学军, 1965 年生, 西安交通大学医学院第一附属医院教授 e-mail: sunxy@mail.xjtu.edu.cn

\* 通讯联系人 e-mail: shijingsen@xjtu.edu.cn

### 1.3 仪器与检测方法

采用美国尼高力(Nicolet)公司生产的 5700-II FTIR 光谱仪,将培养细胞收集于离心管中,应用细胞核制备试剂盒分步提取所需的胆囊癌细胞核,将提取的细胞核放置于 OM-NIC 采样器上,连续扫描 32 次,扫描范围  $4\ 000\sim 800\ \text{cm}^{-1}$ ,分辨率为  $8\ \text{cm}^{-1}$ ;每 5 min 重复一次扫描,直至水分蒸发完毕,水峰恒定不变,得到细胞核红外光谱。利用北京瑞利分析仪器公司研制的配有 ATR 附件的可移动新型红外光谱仪,将手术中得到的液氮冻存离体标本放于红外光谱仪的 ATR 附件的硒化锌晶片上进行光谱测定, $4\ \text{cm}^{-1}$ 分辨率,扫描 32 次,得到组织红外光谱。

## 2 结果与讨论

恶性肿瘤是目前严重危害人类生命健康的主要疾病之一,近 30 年以来,在绝大多数国家恶性肿瘤的发病一直呈上升的趋势。流行病学、病因学、早期诊断、预防和临床综合治疗已成为学者们努力研究的重点课题。细胞和组织的恶变总是从构成它们的分子开始的,在细胞和组织癌变的过程中,蛋白质、脂类、碳水化合物和核酸等构成细胞和组织的主要物质,在结构、构型、构象和各组分数目方面都发生了明显的变化,这些变化明显早于临床症状的出现和医学影像学的改变,因此,研究这些变化是恶性肿瘤早期诊断的研究方向。

傅里叶变换红外光谱是分析物质分子结构及其变化的有效手段,为研究肿瘤细胞超微结构的变化提供了可能。已有研究证明:恶性肿瘤组织与正常组织之间的红外光谱存在明显的差异,它可能在分子水平上揭示组织癌变的特征;利用红外光谱测定方法具有简便、快速的特点,获取在分子水平上的、高准确率判断依据,建立并完善红外光谱与生物组织之间的相关性,可能使其成为肿瘤的临床鉴别和诊断的可行方法。

在国内,本课题组最早对多种肿瘤组织的红外光谱特征进行了深入的研究<sup>[5-17]</sup>,并取得了肿瘤组织的特征性光谱图,使 FTIR 诊断肿瘤研究从基础走向临床。国外许多学者也对红外光谱应用肿瘤研究进行了有意义的探讨<sup>[1, 18]</sup>。肿瘤组织的复杂性决定了红外光谱的复杂性,而良恶性组织的本质区别来源于组织细胞的区别,为了更好地认识肿瘤组织的特异性,本课题组针对体外培养的胆囊癌细胞株(GBC-SD)进行 FTIR 检测,为肿瘤组织的红外检测奠定细胞学基础。细胞核的多形性及核浓染是诊断细胞癌变的最重要的证据,所以本实验对癌细胞及其细胞核进行 FTIR 检测,对比癌细胞、癌细胞,细胞核的图谱,期望发现更多的诊断依据。

### 2.1 胆囊液氮冻存标本的红外光谱研究

本组 11 例组织标本均经常规病理检测,中心部位均为分化程度不一的胆囊腺癌,对得到的光谱进行分析,可以发现胆囊癌组织具有的特征性光谱,并与我课题组总结的肿瘤光谱特征相吻合<sup>[19]</sup>。

研究发现,肿瘤的光谱特征如下。

(1)碳氢伸缩振动吸收峰( $3\ 000\sim 2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ )和与脂肪

相关的羰基伸缩振动吸收峰( $1\ 740\ \text{cm}^{-1}$ )相关谱带的强度很弱或者消失(符合率 70%);

(2)肿瘤组织的酰胺 I 带峰位通常 $\leq 1\ 642\ \text{cm}^{-1}$ (符合率 82%);

(3)肿瘤组织的酰胺 I 带与酰胺 II 带的强度之比( $I_{1\ 642}/I_{1\ 550}$ ) $\geq 1.9$ (符合率 100%);

(4)肿瘤组织的  $1\ 460\ \text{cm}^{-1}$ 附近谱带与  $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 附近谱带的强度比( $I_{1\ 460}/I_{1\ 400}$ ) $\leq 1.0$ (符合率 82%);

(5)肿瘤组织的  $1\ 310\sim 1\ 280\ \text{cm}^{-1}$ 区间内的谱带强度增加(符合率 90%)。

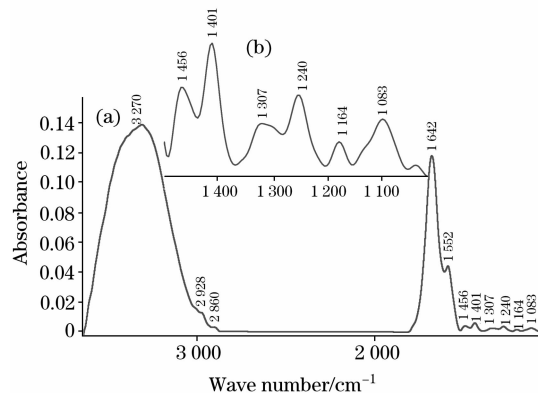


Fig. 1 FTIR spectra of the gallbladder carcinoma tissue

(a):  $4\ 000\sim 8\ 000\ \text{cm}^{-1}$ ; (b):  $1\ 500\sim 1\ 000\ \text{cm}^{-1}$

### 2.2 胆囊癌细胞的红外光谱研究

通过对比组织与胆囊癌细胞株的红外光谱,可以发现他们之间存在差别。在胆囊癌细胞株的红外光谱特征中,特征 1, 2, 3 均与胆囊癌组织的光谱特征表现出了差异。碳氢伸缩振动吸收峰( $\nu_{\text{C-H}}$ ,  $3\ 000\sim 2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ )和羰基伸缩振动吸收峰( $\nu_{\text{C=O}}$ ,  $1\ 740\ \text{cm}^{-1}$ )与脂类含量有关,由于恶性肿瘤生长迅速,耗能快,脂类物质难以在组织和细胞内堆积,造成恶性肿瘤中脂类成分含量减少。进一步深入分析可以看出,差异的区间为  $3\ 000\sim 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 和  $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 附近,而这两个区域恰恰是水的羟基伸缩振动和变角振动的区域。宽大的水峰与肿瘤的特征谱峰重叠,导致肿瘤组织特征 1 中  $3\ 000\sim 2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 的碳氢伸缩振动吸收峰和  $1\ 740\ \text{cm}^{-1}$ 的羰基伸缩振动吸收峰被掩盖;而肿瘤组织特征 2 中酰胺 I 带峰位通常 $\leq 1\ 642\ \text{cm}^{-1}$ 也是位于  $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 附近的水分子的变角振动所产生的峰位的影响所致;至于肿瘤组织特征 3 与肿瘤细胞光谱的差别也源于水峰重叠后的掩盖。由此可见,由于肿瘤组织中含有大量水,水峰的叠加掩盖了其一些特征谱峰,使得组织光谱表现出与细胞光谱不同的特征。由图 2 可以看出,由于胆囊癌细胞中水的相对含量小于胆囊癌组织中水的相对含量,导致酰胺 I 带减弱、酰胺 II 带增强,使胆囊癌细胞株红外光谱中的酰胺 I 带与酰胺 II 带的强度比值可能小于 1.9。

观察图 2 可以发现,胆囊癌细胞株与胆囊癌组织的红外光谱中表现出一些相似的特征。特征 4 中  $1\ 460\ \text{cm}^{-1}$ 处谱带为碳氢的变角振动,与脂类有关,而由于癌细胞及组织中的

脂类分解代谢增强,致使癌细胞表面的糖脂趋于减少,从而导致组织细胞光谱中  $1\,460\text{ cm}^{-1}$  谱带强度降低,故  $1\,460$  与  $1\,400\text{ cm}^{-1}$  附近吸收峰的相对强度比  $I_{1\,460}/I_{1\,400}$  明显降低。此外,我们发现在胆囊癌细胞株的红外光谱中,同样存在  $1\,300\text{ cm}^{-1}$  附近的吸收峰,这一特征与胆囊癌组织相似。由此可见,本实验可为 FTIR 应用于胆囊癌组织的定性诊断提供了一定的细胞学基础。

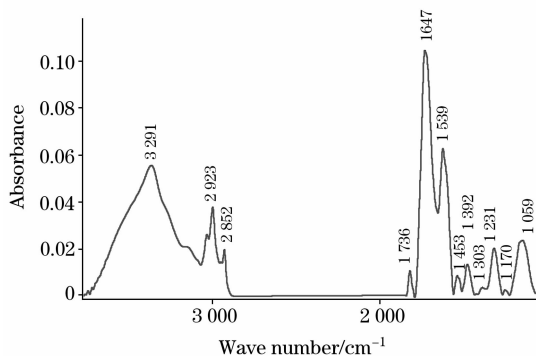


Fig. 2 FTIR spectra of the cultured gallbladder carcinoma cell line (GBC-SD)

### 2.3 胆囊癌细胞核的红外光谱研究

由图 3 可以看出,由于与胆囊癌组织相比,胆囊癌细胞核中的水分相对含量低,因此胆囊癌细胞核的碳氢伸缩振动吸收峰( $\nu_{\text{C-H}}$ ,  $3\,000\sim 2\,800\text{ cm}^{-1}$ )相关谱带的强度明显增强;酰胺 I 带和酰胺 II 带的比值降低,小于或等于 1.9;由于细胞恶变的一个重要特征就是由于 DNA 的大量复制而导致其在细胞中含量增加,细胞核体积变大和核浓染是在光镜下判断良恶性的重要指标。细胞核主要成分是核酸,约占细胞核组成的 90%。因此,在细胞核中,核酸的相对含量明显大于在组织中的相对含量,核酸是一线性多聚体,基本结构单元是核苷酸,而核苷酸是由碱基、戊糖和磷酸三部分组成。

核酸分子的磷酸二酯基团( $\text{PO}_2^-$ )对称伸缩振动光谱( $\nu_s\text{ PO}_2^-$ )位于  $1\,080\text{ cm}^{-1}$  附近,其反对称伸缩振动光谱( $\nu_{\text{as}}\text{ PO}_2^-$ )位于  $1\,240\text{ cm}^{-1}$  附近。而碱基、戊糖等的特征吸收峰也位于  $1\,500\sim 1\,000\text{ cm}^{-1}$  的区间内,因此,与胆囊癌组织的红外光谱相比,在细胞核的红外光谱中, $1\,460\text{ cm}^{-1}$  附近谱带与  $1\,400\text{ cm}^{-1}$  附近谱带的强度比( $I_{1\,460}/I_{1\,400}$ ) $\geq 1.0$ 。

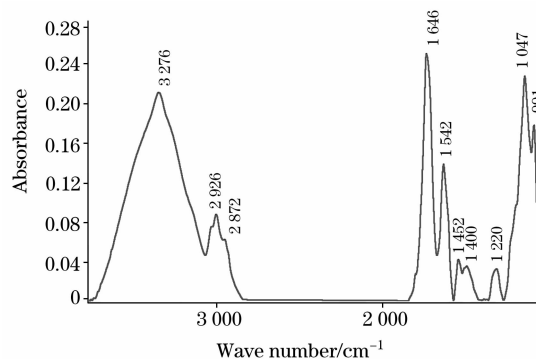


Fig. 3 FTIR spectra of the cultured gallbladder carcinoma cell (GBC-SD) nucleus

## 3 结 论

通过对细胞核进行 FTIR 检测,成功获得体外培养细胞及细胞核的红外图谱。研究发现,胆囊癌组织较正常胆囊组织在傅里叶变换红外光谱特征上存在显著差异,具有特征性表现,由于胆囊癌组织与胆囊癌细胞及细胞核相比较,其水的相对含量大,核酸的相对含量小于细胞核,因此胆囊癌组织与细胞株和细胞核的光谱特征存在差异,但除去水分的影响,胆囊癌细胞株所表现的部分光谱特征与胆囊癌组织相似,从而为 FTIR 应用于恶性肿瘤组织的定性诊断提供了更加丰富的细胞学基础。

## 参 考 文 献

- [1] Benedetti E, Palatresi M P, Vergamini P, et al. Leukemia Research, 1985, 9(8): 1001.
- [2] GAO Ti-yu, CI Yun-xiang, FU Shuang, et al(高体玉, 慈云祥, 付爽, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2001, 22(6): 908.
- [3] LIU Jin-xu, HAN Wei, PENG Ying-ke, et al(刘金绪, 韩伟, 彭英科, 等). Journal of Infrared and Millimeter Waves(红外与毫米波学报), 1998, 17(4): 313.
- [4] DU Jun-kai, SHI Jing-sen, XU Yi-zhuang, et al(杜俊凯, 石景森, 徐怡庄, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(1): 51.
- [5] XU Yi-zhuang, ZHAO Ying, LING Xiao-feng, et al(徐怡庄, 赵莹, 凌晓峰, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2007, 28(4): 645.
- [6] XU Yi-zhuang, ZHAO Ying, XU Zhi, et al(徐怡庄, 赵莹, 徐智, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(11): 1775.
- [7] XU Yi-zhuang, YANG Li-min, XU Zhi, et al. Science in China(Series B): Chemistry, 2005, 48(2): 167.
- [8] REN Yu, XU Yi-zhuang, ZHAO Ying, et al(任予, 徐怡庄, 赵莹, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(8): 930.
- [9] Peter R Griffiths, YANG Hu-sheng, Li Qing-bo, et al(Peter R Griffiths, 杨虎生, 李庆波, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(9): 1025.
- [10] LI Qing-bo, XU Zhi, XU Yi-zhuang, et al(李庆波, 徐智, 徐怡庄, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2001, 22(6): 908.

- 报), 2004, 25(11): 2010.
- [11] WANG Jian-sheng, SHI Jing-sen, XU Yi-zhuang, et al(王健生, 石景森, 徐怡庄, 等). Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery(中华肝胆外科杂志), 2003, 9(11): 657.
- [12] LI Wei-hong, XU Yi-zhuang, WENG Shi-fu, et al(李维红, 徐怡庄, 翁诗甫, 等). Chinese Journal of Light Scattering(光散射学报), 1998, 10(3-4): 114.
- [13] SUN Lei-ming, TANG Wei-yue, GUO Ke-min, et al(孙雷明, 唐伟跃, 郭克民, 等). Laser & Infrared(激光与红外), 2005, 35(8): 587.
- [14] SUN Chuan-wen, XU Yi-zhuang, SUN Kai-hua, et al(孙传文, 徐怡庄, 孙开华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1996, 16(5): 22.
- [15] ZENG Xiang-tai, XU Yi-zhuang, ZHANG Xiao-qing, et al(曾祥泰, 徐怡庄, 张小青, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(12): 2422.
- [16] WANG Bing-bing, PAN Qing-hua, ZHANG Yuan-fu, et al(王冰冰, 潘庆华, 张元福, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(12): 2427.
- [17] SUN Xue-jun, LI Qing-bo, SHI Jing-sen, et al(孙学军, 李庆波, 石景森, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(8): 933.
- [18] Cyril Petibois, Benjamin Drogat, Andreas Bikfalvi, et al. FEBS Letters, 2007, 581: 5469.
- [19] XU Yi-zhuang, XU Zhi, LING Xiao-feng, et al(徐怡庄, 徐智, 凌晓锋, 等). Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis(北京大学学报·自然科学版), 2007, 43(4): 441.

## FTIR Spectroscopic Study on Gallbladder Carcinoma Cell and Nucleus

SUN Xue-jun<sup>1</sup>, SUN Feng-lei<sup>1</sup>, DU Jun-kai<sup>1</sup>, PAN Qing-hua<sup>2</sup>, ZHANG Yuan-fu<sup>2</sup>, XU Yi-zhuang<sup>2</sup>, SHI Jing-sen<sup>1\*</sup>,  
WU Jin-guang<sup>2</sup>

1. The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

2. College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

**Abstract** The aim of the present research is to establish the cell basis for the carcinoma tissue diagnosis by exploring a method to obtain the FTIR (Fourier transform infrared spectra) of the cultured carcinoma cell and nucleus with FTIR spectroscopy, and investigating the special spectral features of the carcinoma cell and nucleus compared with the carcinoma tissues. In this paper, the gallbladder carcinoma tissues confirmed by histology were measured using a Nicolet Magna 5700-II FTIR spectrometer and the corresponding FTIR spectra were obtained. The cultured gallbladder carcinoma cell (GBC-SD) and nucleus were centrifuged to provide a small pellet of cell and nucleus for FTIR analysis. The cell and nucleus pellet was then placed on the OMNIC sampler. Then the infrared spectra were recorded by the same equipment. Based on the previously established criteria, a comparative study was subsequently carried out between the spectra of the cultured carcinoma cell and nucleus (GBC-SD) and that of the corresponding gallbladder tissues. Several infrared spectral features of the carcinoma cell and nucleus were obtained. All the results suggest that the spectral features of the carcinoma cell and nucleus can be well reflected by that of the carcinoma tissue, though the later is more complicated, which might originate from the intrinsic complexity of the tissue. This study shows that the diagnosis of carcinoma tissue by FTIR method exhibits sufficient cell basis.

**Keywords** FTIR; Gallbladder carcinoma; Cells; Nucleus

(Received Nov. 16, 2008; accepted Feb. 18, 2009)

\* Corresponding author