

糖尿病人血清的表面增强拉曼光谱

韩洪文¹, 闫循领^{1*}, 李书锋¹, 班戈¹, 李珂¹, 张霞¹, 杨颖², 邢艳霞²

1. 聊城大学物理科学与信息工程学院, 山东 聊城 252059
2. 聊城市人民医院, 山东 聊城 252000

摘要 研究了糖尿病人和正常人血清的表面增强拉曼光谱。糖尿病人血清中蛋白质主链酰胺 II 的 C—N 伸缩振动的谱线位移到 $1\ 585\ \text{cm}^{-1}$, 相对强度增加了 14%, 酰胺 VI 的谱线 $593\ \text{cm}^{-1}$ 相对强度减少了 33%。蛋白质侧链色氨酸吡啉环“埋藏式”的谱线 $1\ 368\ \text{cm}^{-1}$ 位移到“暴露式”的 $1\ 365\ \text{cm}^{-1}$, 且相对强度减少了 59%; 侧链 C—S 键的扭曲构象的谱线 $635\ \text{cm}^{-1}$ 相对强度减少了 15%, 而反式构象的谱线 $725\ \text{cm}^{-1}$ 增加了 58%, 说明 C—S 键的扭曲构象部分转变为反式构象, 表明糖尿病人血清中蛋白质的有序结构发生变化; 类脂物特征峰 $1\ 449\ \text{cm}^{-1}$ 相对强度增加了 58%, 与糖类有关的特征峰谱线 $1\ 331, 1\ 099$ 和 $740\ \text{cm}^{-1}$ 相对强度分别增加了 35%, 100% 和 62%, 从而表明糖尿病人血清中与脂类和糖蛋白有关的物质含量增加。上述拉曼特征峰为糖尿病的诊断以及生化机理研究提供了有力的实验依据。

关键词 拉曼光谱; 表面增强拉曼光谱; 糖尿病; 血清

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)02-0399-03

引言

糖尿病是一种慢性葡萄糖(简称血糖)水平增高为特征的代谢紊乱性疾病,能引起糖蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列代谢异常。久病能引起多系统损害,常引发血管、神经、心脏、肾、眼等组织的慢性疾病,已成为威胁人类健康的世界性公共卫生问题。因此,糖尿病的诊断至关重要。

近年来发展起来的拉曼光谱分析技术提供了样品各成分分子的振动光谱,被广泛应用于物质的鉴定和分子结构的研究^[1],尤其是表面增强拉曼光谱散射(SERS)具有灵敏度高、干扰小等特点,能够获得比常规拉曼谱大几万倍的增益系数,被广泛应用于研究生物分子的界面取向、构象研究和结构分析等^[2,3]。本文利用 SERS 技术测量了糖尿病患者和正常人血清的拉曼光谱。

1 材料与方法

实验选取聊城市人民医院确诊为糖尿病患者血清 15 例,选取正常人的血清 15 例作为对照组,每例病人取 4 mL 血清。用柠檬酸钠还原硝酸银,再利用微波炉加热法制备银

胶^[4]。

实验在 Renishaw 公司的 2000 型共聚焦显微拉曼光谱仪上进行,用 780 nm、功率为 25 mW 的半导体激光器作为光源,仪器的分辨率为 $2\ \text{cm}^{-1}$ 。将血清样品和银胶溶液按 2:1 的比例配制,显微镜下进行拉曼光谱测量。

2 实验结果与讨论

整个实验利用同一次配置的银胶进行表面增强拉曼光谱

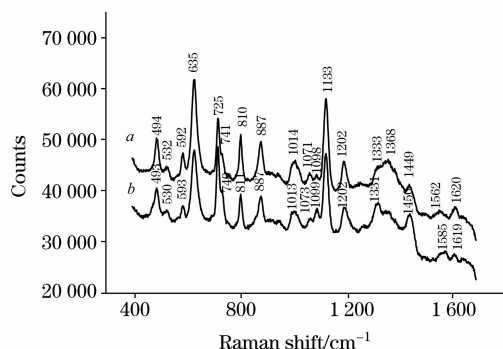


Fig. 1 SERS spectra of normal and diabetic serum

a: Normal serum; b: Diabetic serum

收稿日期: 2007-09-06, 修订日期: 2007-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(60571062)和山东省自然科学基金项目(Y2004G09)资助

作者简介: 韩洪文, 1981年生, 聊城大学物理科学与信息工程学院硕士研究生 e-mail: hongwen411@163.com

* 通讯联系人 e-mail: yanxl207@lccu.edu.cn

检测。糖尿病患者和正常人血清的表面增强拉曼光谱如图 1 所示, 它们的谱线主要来自蛋白质、脂类、碳水化合物, 谱线的归属见表 1。

用拉曼谱线相对强度的变化率研究生物大分子的各个基团和化学键变化前后的特征^[5], 相对强度的变化率定义为

$$I_n = \frac{I_n - I_1}{I_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中 I_1 和 I_n 分别为变化前后拉曼谱线的相对强度。

图 1 中可以看出, 表征为苯丙氨酸、色氨酸、甘露糖、天冬酰胺的谱线 1 202, 1 133, 1 071, 1 014, 887, 810, 532 和 493 cm^{-1} 两种血清频率和相对强度基本不变。我们选取苯丙氨酸的伸缩振动谱线 1 202 cm^{-1} 作为分析谱线强度变化的标准, 两种血清存在差异较大的有如下 10 条谱线(见表 1)。

Table 1 Assignment and relative intensity of Raman spectra of serum from normal and diabetes

健康人血清		糖尿病人血清		振动模式初步指认
Raman shift/ cm^{-1}	$I/I_{1\ 202}$	Raman shift/ cm^{-1}	$I/I_{1\ 202}$	
1 620	0.41	1 619	0.28	Trp, Tyr, Phe
1 562	0.28	1 585	0.32	Amide- II, Phe
1 449	1.02	1 450	1.61	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$
1 368	1.80	1 365	0.73	Trp
1 333	1.61	1 331	2.18	C(6)-H ₂ , CH ₃ COH
1 202	1.00	1 202	1.00	Trp, Phe
1 133	3.06	1 133	3.16	Man, $\gamma(\text{C}-\text{N})$
1 098	0.34	1 099	0.79	Man, $\gamma(\text{C}-\text{N})$
1 071	0.41	1 073	0.39	$\gamma(\text{C}-\text{N})$
1 014	0.81	1 013	0.76	Trp
887	1.32	887	1.29	Trp
810	1.52	811	1.36	Asn
741	0.92	740	1.51	Man
725	2.07	725	3.28	$\gamma(\text{C}-\text{S})$
635	3.35	635	2.84	$\gamma(\text{C}-\text{S})$
592	0.94	593	0.63	Amide-VI
532	0.47	530	0.48	$\gamma(\text{S}-\text{S})$
494	1.39	493	1.35	Man

说明: γ : 伸缩振动; Phe: 苯丙氨酸; δ : 弯曲振动; Tyr: 酪氨酸; Trp: 色氨酸; Man-D-甘露糖; Asn: 天冬酰胺

(1)与蛋白质主链有关的酰胺 II 和酰胺 VI 的谱线变化明显, 酰胺 II 的 C—N 伸缩振动谱线 1 562 cm^{-1} 在糖尿病人血清中位移到 1 585 cm^{-1} , 其相对强度增加了 14%。糖尿病人血清中酰胺 VI 的谱线 593 cm^{-1} 相对强度减少了 33%。

蛋白质侧链的变化明显: 正常人血清中的色氨酸吡啶环的谱线 1 620 和 1 368 cm^{-1} , 其中尖锐的谱线 1 368 cm^{-1} 说明色氨酸是“埋藏式”, 而糖尿病患者血清中两条谱线的相对强度分别减少了 32% 和 59%, 谱线 1 368 cm^{-1} 位移到 1 365 cm^{-1} 且变成宽峰, 表明色氨酸变成“暴露式”^[6]。由此可看出, 糖尿病人代谢物中所含氨基酸成分减少, 并且所处环境发生变化。谱线 635 和 725 cm^{-1} 分别属于蛋白质侧链 C—S 键的扭曲构象和反式构象^[7-9], 在糖尿病人血清中 635 cm^{-1} 的相对强度减少了 15%, 而 725 cm^{-1} 增加了 58%, 说明 C—S 键的扭曲构象部分转成反式构象。

(2)类脂物特征峰 1 449 cm^{-1} 是由膜蛋白和膜脂酰基的 CH_2 和 CH_3 弯曲振动引起的, 在糖尿病人血清中相对强度增加了 58%, 表明糖尿病人血清中与脂类有关的物质(如胆固醇)含量增加, 同时也反映出该脂类或蛋白质的 C—H 键和肽链骨架断裂^[10]。

(3)碳水化合物 C—O—H 振动的特征峰 1 333 cm^{-1} 在

糖尿病人血清中位移到 1 331 cm^{-1} 处, 相对强度增加了 35%。D - 甘露糖的谱线 740 cm^{-1} ^[11] 在糖尿病人血清中相对强度增加了 62%, 且位移改变了 1~3 cm^{-1} , 表明糖尿病人血清中与糖蛋白、糖质有关的物质含量增加。

另外, 糖尿病人血清中脂类的 C—N 振动和 D-甘露糖共同的谱线 1 133 cm^{-1} ^[12] 的相对强度基本不变, 而 1 099 cm^{-1} 的相对强度增强一倍, 从而说明糖尿病人血清中与脂类和糖蛋白有关的物质含量增加。

3 结 论

综上所述, 通过对比分析两种血清的表面增强拉曼光谱, 得知糖尿病人和正常人血清的拉曼信号存在差异。糖尿病人血清中蛋白质的有序结构发生了变化, 氨基酸的含量减少, 色氨酸变成“暴露式”; 脂类或蛋白质的 C—H 键和肽链骨架断裂, C—S 键扭曲构象部分变成反式构象。糖尿病人血清中与胆固醇、糖蛋白、糖质有关的物质含量增加, 这与血液病理检查结果相符。本研究所得结论, 可作为糖尿病的诊断以及生化机理研究的实验依据。

参 考 文 献

- [1] XUE Qi, WANG Yong-xia, et al(薛 奇, 王永霞, 等). Journal of Functional Polymers(功能高分子学报), 1993, 6(4): 357.
- [2] ZHU Zhi-liang, GAO Jun-ying, LI Feng-ting, et al(朱志良, 郜俊影, 李凤亭, 等). Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(光谱实验室), 2003, 20(2): 159.
- [3] YU Guo-tao(余国滔). Chinese Journal of Light Scattering(光散射学报), 1996, 8(2): 113.
- [4] LIU Kun, WU Shi-fa(刘 琨, 吴世法). Chinese Journal of Light Scattering(光散射学报), 2006, 18(4): 332.
- [5] ZHANG Zhi-yi, XU Yi-ming(张志义, 许以明). Science in China(Series B)(中国科学 B 辑), 1991, 21(6): 595.
- [6] YU Ke, XU Xiao-xuan, NIU Jun, et al(于 舸, 徐晓轩, 牛 昀, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(11): 1359.
- [7] XU Yi-ming, WU Cheng, FAN Rong(许以明, 吴 骋, 樊 蓉). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1987, 32(8): 616.
- [8] Tu A T. Principles and Applications. New York: John Wiley & Sons, 1982. 65.
- [9] Lord R C, Yu N T. J. Mol. Biol., 1970, 50: 509.
- [10] Xu Y M, Yang H Y, Zhang Z Y. Science in China(Series C-Life Science), 1998, 41(6): 608.
- [11] She, C Y, Dinh N D Tu A T. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 372: 345.
- [12] XU Yin-ming, LU Chuan-zong(许以明, 陆传宗). Chinese Journal of Light Scattering(光散射学报), 1997, 9(2): 247.

SERS Spectra of Serum from Diabetic

HAN Hong-wen¹, YAN Xun-ling^{1*}, LI Shu-feng¹, BAN Ge¹, LI Ke¹, ZHANG Xia¹, YANG Ying², BING Yan-xia²

1. School of Physical Science and Information Technology, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

2. Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, China

Abstract The SERS spectra were measured from normal and the diabetic serum. In the diabetic serum, the band of amide II shifted to $1\ 585\ \text{cm}^{-1}$ and the relative intensity increased 14%, while the relative intensity of $593\ \text{cm}^{-1}$ which belongs to amide VI reduced 33%. For the protein side chain, the band at $1\ 368\ \text{cm}^{-1}$ assigned to the "buried" tryptophan shifted to $1\ 365\ \text{cm}^{-1}$ of the "exposed" and the relative intensity reduced 59%. The relative intensity of $635\ \text{cm}^{-1}$ assigned to the gauche conformation of the C—S decreased 15% and the band at $725\ \text{cm}^{-1}$ increased 58%. These indicate that the structure of the protein changed in the diabetic serum. The relative intensity at $1\ 449\ \text{cm}^{-1}$ assigned to the lipids characteristic increased 58%. The relative intensity of the glucide characteristic at $1\ 331$, $1\ 099$ and $740\ \text{cm}^{-1}$ increased 35%, 100% and 62%, respectively. So it is indicated that the content of lipids, glucide and protein increased in diabetic. These results may offer a powerful experimental basis for diabetes diagnosis and biochemistry mechanism study.

Keywords Raman spectroscopy; SERS; Diabetes; Serum

* Corresponding author

(Received Sep. 6, 2007; accepted Dec. 16, 2007)