

傅里叶变换红外光谱用于肿瘤细胞株检测的研究

杜俊凯¹, 石景森¹, 徐怡庄², 张元福², 孙学军¹, 王健生¹, 翁诗甫², 吴瑾光²

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 采取在体外培养胃癌细胞株(SGC7901), 将培养细胞涂于 BaF₂ 窗片的方法, 应用美国 Nicolet(尼高力)公司 Magna750-II 型红外光谱仪对细胞株进行透射红外光谱检测, 得到了时间轴上体外培养细胞株的光谱图, 将特征性光谱与胃癌组织光谱进行了比对。发现胃癌细胞株红外光谱特征与相应癌组织光谱特征存在异同, 说明细胞胃癌组织所表现的红外光谱特征可以反映胃癌细胞本身的红外光谱特征, 同时也具有自身的复杂特点。实验为红外光谱法诊断胃癌奠定了细胞学基础。

关键词 傅里叶变换红外光谱; 胃癌; 细胞株

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)01-0051-04

引言

恶性肿瘤是一种严重危害人类身心健康并消耗大量医疗卫生资源的疾病, 由于目前缺乏有效的对晚期癌症的治疗手段, 肿瘤的早期诊断对延长患者的生存时间和提高生活质量具有重要的意义。

傅里叶变换红外光谱可以提供有关分子结构和变化的多种信息, 能在分子水平对细胞组织的改变做出反映, 是行之有效的肿瘤早期检测的手段, 较传统的肿瘤手段而言, 具有快速, 准确, 客观等特点^[1]; 甚至可以通过光纤附件, 实现肿瘤的原位、在体、实时检测和诊断^[2]。我课题组在肿瘤组织的 FTIR 检测方面已做了大量的工作, 取得了很多进展^[3-7]。但肿瘤组织的特征性 FTIR 谱图是肿瘤组织还是肿瘤细胞的特异性决定? 肿瘤组织的特征性 FTIR 谱图是否具有可靠的细胞学基础呢? 肿瘤组织与肿瘤细胞间 FTIR 谱图特征是否存在差异? 本研究应用红外光谱技术对胃癌组织及其细胞株进行了检测研究。

1 材料和方法

1.1 组织标本取材和处理

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胃癌标本, 征得患者同意, 手术切除后立即取材。用生理盐水冲洗净粘液和血污, 取材 1.0 cm×1.0 cm×1.0

cm 大小组织 2 块, 一块取自癌中心部位, 另一块取自标本切级最远端。所有标本均对称地一分为二, 一块放入液氮中冷冻保存备用; 另一块用体积分数为 10% 的福尔马林溶液固定, 石蜡包埋, 常规病理切片染色检查。

1.2 胃癌细胞株培养

胃癌细胞株(SGC7901)由西安交通大学医学院中心实验室提供。胃癌细胞放在 RPMI1640 培养液(含 10% 胎牛血清, 青霉素和链霉素各 100 U·mL⁻¹)中, 置 37 °C, 饱和湿度, 5% CO₂ 的培养箱中进行培养, 待细胞进入对数生长期后, 收集细胞备用。

1.3 组织及细胞标本的 FTIR 检测

仪器采用美国 Nicolet 公司生产的 Magna750-II 型红外光谱仪。组织标本室温条件下自然解冻, 将每一标本的粘膜面和浆膜面直接放置于欧米采样器表面进行检测, 记录红外光谱。培养细胞离心后, 在 BaF₂ 窗片上进行涂片, 置于穿梭器中, 以空白 BaF₂ 窗片为背景。扫描次数为 32 次, 扫描范围 4 000~900 cm⁻¹, 分辨率 4 cm⁻¹。

2 结果

2.1 标本资料

12 例组织标本均经病理检测确定, 中心部位均为癌组织, 远端切缘无癌细胞浸润。

2.2 胃癌组织及正常切缘 FTIR 检测结果

通过胃癌组织与正常组织的 FTIR 谱图比较, 可以发现

收稿日期: 2007-03-25, 修订日期: 2007-06-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500119)资助

作者简介: 杜俊凯, 1976 年生, 西安交通大学医学院第一附属医院主治医师 e-mail: dj_k_828@126.com

胃癌组织具有特征性的光谱, 与我课题组所总结特征一

致^[2-7], 如图 1 所示。

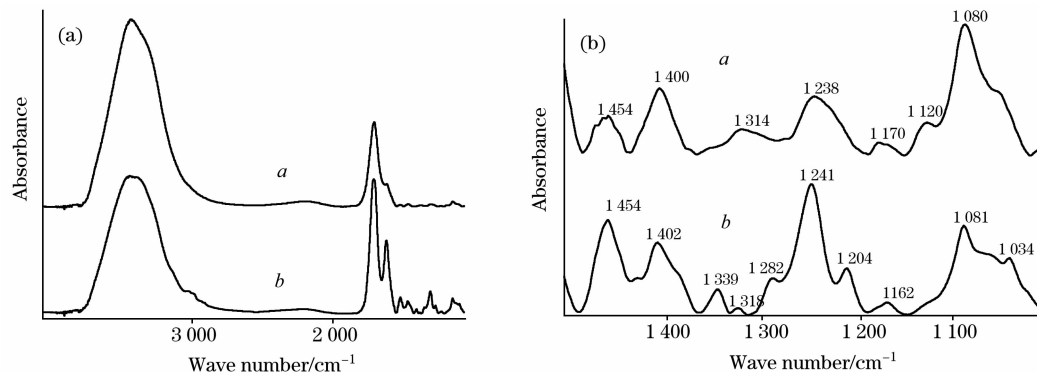


Fig. 1 FTIR spectra of the frozen gastric tissues

(A): 4 000~1 000 cm^{-1} ; (B): 1 500~1 000 cm^{-1} ; a: carcinoma tissue; b: normal tissue

(1) 碳氢伸缩振动吸收峰($\nu_{\text{C-H}}$, 3 000~2 800 cm^{-1})和与脂肪相关的羰基伸缩振动吸收峰($\nu_{\text{C=O}}$, 1740 cm^{-1})相关谱带的强度很弱或者消失, 而在正常组织样品的红外光谱中通常存在这两个谱带;

(2) 胃癌组织的酰胺 I 带峰位通常 $\leq 1 642 \text{ cm}^{-1}$, 正常组织则 $\geq 1 642 \text{ cm}^{-1}$;

(3) 胃癌组织的酰胺 I 带与酰胺 II 带的强度之比($I_{1 642} / I_{1 550}$) ≥ 1.9 , 正常组织则 ≤ 1.9 ;

(4) 胃癌组织的 1 460 cm^{-1} 附近谱带与 1 400 cm^{-1} 附近谱带的强度比($I_{1 460} / I_{1 400}$) ≤ 1.0 , 而正常组织则 ≥ 1.0 ;

(5) 胃癌组织的 1 310~1 280 cm^{-1} 区间内的谱带强度增加。

2.3 胃癌细胞株 FTIR 检测结果

胃癌细胞株 FTIR 检测光谱如图 2 所示, 与胃癌组织光谱图比较, 光谱特征存在差异。

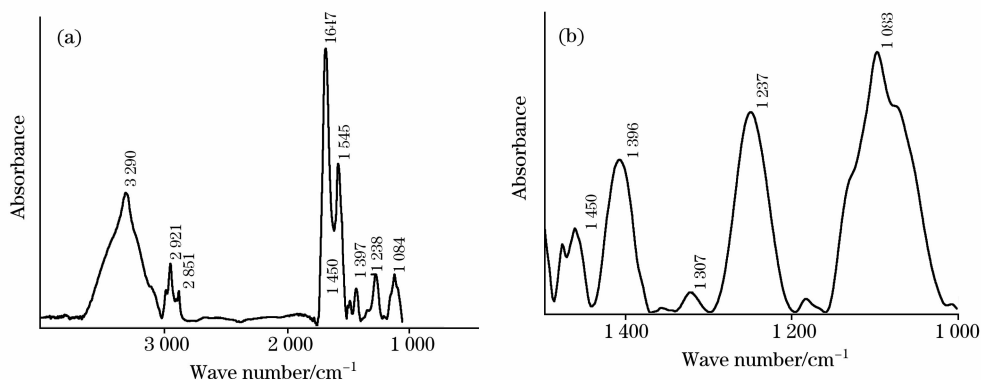


Fig. 2 FTIR spectra of the cultured gastric carcinoma cell line (SGC7901)

(a): 4 000~1 000 cm^{-1} ; (b): 1 500~1 000 cm^{-1}

(1) 碳氢伸缩振动吸收峰($\nu_{\text{C-H}}$, 3 000~2 800 cm^{-1})和与脂肪相关的羰基伸缩振动吸收峰($\nu_{\text{C=O}}$, 1 740 cm^{-1})相关谱带的强度较胃癌组织明显增加;

(2) 胃癌细胞株的酰胺 I 带峰位 $\geq 1 642 \text{ cm}^{-1}$, 与肿瘤组织通常 $\leq 1 642 \text{ cm}^{-1}$ 的结论不相一致;

(3) 胃癌细胞株的酰胺 I 带与酰胺 II 带的强度之比($I_{1 642} / I_{1 550}$) ≤ 1.9 , 光谱表现于肿瘤组织存在差异;

(4) 胃癌细胞株 1 460 cm^{-1} 附近谱带与 1 400 cm^{-1} 附近谱带的强度比($I_{1 460} / I_{1 400}$) ≤ 1.0 , 与胃癌组织一致;

(5) 胃癌细胞株的 1 310~1 280 cm^{-1} 区间内有强度增加的谱带;

(6) 胃癌细胞株的 1 080 和 1 240 cm^{-1} 附近谱带强度明显增强。

3 讨论

在组织和细胞恶变的过程中, 蛋白质、脂类、碳水化合物和核酸等构成组织和细胞的主要物质在结构、构象和数量上都发生了明显的变化, 这些变化并不出现临床症状和医学影像学改变。所以研究这些变化是更早期诊断的研究方向。

红外光谱主要是研究分子中以化学键联结的原子之间的振动光谱和分子的转动光谱。20 世纪 80 年代以来, 傅里叶变换技术引入红外光谱。傅里叶变换红外光谱仪具有测定过程简便、噪声低、光通量高、测量速度快、波数精度高、频率测量范围宽、操作费用低、无损检测等优点, 很快被广泛应用于蛋白质、脂类、碳水化合物和核酸等生物分子的结构、

构象的研究。

傅里叶红外光谱及其相关技术的迅速发展,不仅越来越广泛地用于蛋白质、核酸等大生物分子结构研究上,而且已开始更深入地用来研究细胞和组织等更加复杂的体系。人体组织细胞中最基本的聚合物是核酸(DNA 和 RNA),蛋白质、双层磷脂膜等细胞的红外光谱就是这些聚合物分子的振动光谱组成。它反映了核酸、蛋白质、糖蛋白和生物膜等分子在细胞内的含量、构型、构象及其所发生的变化。

在此基础上,人们比较各种类型的恶性肿瘤及其相应正常组织或细胞的红外光谱特点,为恶性肿瘤的早期诊断及发生发展机理的研究开辟了一条新的途径。

国内北京大学化学与分子工程学院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,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。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。

国内外文献中,也曾有学者针对肿瘤在体脱落细胞或穿刺活检细胞,运用多种检测方法进行傅里叶变换红外光谱研究的报道^[8-13]。本课题针对体外培养的肿瘤细胞,对照相应的肿瘤组织进行傅里叶变换红外光谱研究,为肿瘤组织的红外检测奠定细胞学基础。

在胃癌细胞株的红外光谱特征中,特征(1),(2),(3)均与胃癌组织的光谱特征表现出了差异。深入分析可以看出,差异的区间为 $3\ 000\sim 3\ 600$ 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光谱重叠,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的细胞外水存在,对细胞光谱特征产生一定影响,水峰的叠加使得组织光谱在这些区间内变得复杂,而表现出与细胞光谱不同的特征。因此,细胞光谱的肿瘤判据与组织光谱会有所不同,由于没有了细胞外水的存

在,导致酰胺 I 带减弱、酰胺 II 带增强,使其酰胺 I 带与酰胺 II 带的强度比值可能小于 1.9。

胃癌细胞与胃癌组织在红外光谱特征(4)和(5)上表现完全相同。在胃癌细胞株的光谱特征中,我们可以发现,在 $1\ 080$ 和 $1\ 240\text{ cm}^{-1}$ 附近谱带强度明显增强,这一点较胃癌组织的光谱图更为显著。而这两个区域的谱带来自核酸分子内部的磷酸二酯基团的对称伸缩振动($\nu_s\text{PO}_2$, $1\ 080\text{ cm}^{-1}$)和反对称伸缩振动($\nu_{as}\text{PO}_2$, $1\ 240\text{ cm}^{-1}$),其强度比正常组织的谱带强度明显增加。同样的结果在近期的组织研究中也有报道^[14]。文献证明^[15-17],这些磷酸二酯基团的红外吸收来自细胞核酸的磷酸二酯骨架振动, $\nu_s\text{PO}_2$ 谱带强度恰恰反应了细胞核中 DNA 含量的增加。

通过本研究发现,胃癌细胞株与胃癌组织的特异性红外光谱存在异同。肿瘤组织的特征性表现(1),(2),(3)点,在肿瘤细胞中没有得到充分的体现,这正是肿瘤组织较细胞而言的组织复杂性决定的,组织中细胞外水的存在是这些特征存在的重要原因。而肿瘤组织的光谱特征(4)和(5),在肿瘤细胞的光谱特征中得到了充分的证明和加强,可以被初步认定为肿瘤细胞区别于正常细胞的特征性表现。在细胞特征(6)中,肿瘤细胞在 $1\ 080$ 和 $1\ 240\text{ cm}^{-1}$ 区域谱带强度明显增加,也体现了肿瘤细胞核酸含量丰富的特点,过去在胃癌组织光谱的研究中也注意到这一变化,但是由于组织中的成分更加复杂,变化规律并没有肿瘤细胞这么明显。

4 结 论

通过细胞 BaF₂ 窗片涂片后进行 FTIR 检测,成功获得得到体外培养细胞的红外谱图;研究发现,胃癌组织较正常胃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;由于胃癌组织较胃癌细胞的组织复杂性,其光谱特征存在差异;但胃癌组织所表现的部分光谱特征是胃癌细胞的光谱特征的反映,FTIR 应用于恶性肿瘤组织的定性诊断具有充分的细胞学基础。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] YANG Li-min, XU Zhi, ZHANG Yuan-fu, et al(杨丽敏,徐智,张元福,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(5): 883.
- [3] SHI Jing-sen, WANG Jian-sheng, XU Yi-zhuang, et al(石景森,王健生,徐怡庄,等). Digestive Surgery(消化外科), 2003, 2(2): 96.
- [4] 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.
- [5] LI Qing-bo, SUN Xue-jun, XU Yi-zhuang, et al. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11(25): 3842.
- [6] WU Jin-guang, XU Yi-zhuang, SUN Chuan-wen, et al. Biopolymers, 2001, 62(4): 185.
- [7] LING Xiao-feng, XU Yi-zhuang, WANG Li-xin, et al(凌晓锋,徐怡庄,王立新,等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2007, 28(3): 445.
- [8] Benedetti E, Palatresi M R, Vergamini P, et al. Appl. Spectrosc., 1986, 40: 39.
- [9] PENG Qing, Soloway R D, WU Jin-guang, et al. Gastroenterology, 1996, 110: A576.

- [10] Zhao D W, Zhou X S, Soloway R D, et al. *Gastroenterology*, 1996, 110: A620.
- [11] WANG H P, WANG H C, HUANG Y J. *The Science of The Total Environment*, 1997, 204: 283.
- [12] Michael Fung Kee Fung, et al. *Gynecologic Oncology*, 1997, 66: 10.
- [13] Christian P Schultz, Kan-Zhi Liua, Elizabeth A Salamonb, et al. *Journal of Molecular Structure*, 1999, 480: 369.
- [14] LI Wei-xiu, ZHENG Quan-qing, WANG Ping, et al(李炜修, 郑全庆, 王 平, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(10): 1833.
- [15] Benedetti E, Teodori L, Trinca M L, et al. *Applied Spectroscopy*, 1990, 44: 1276.
- [16] PENG Qing, XU Yi-zhuang, LI Wei-hong, et al(彭 卿, 徐怡庄, 李维红, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 1998, 18(5): 528.
- [17] HUO Hong, WANG Xing-fu, CHE Xun, et al(霍 红, 王幸福, 车 迅, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2001, 21(5): 614.

FTIR Spectroscopic Study on Carcinoma Cells

DU Jun-kai¹, SHI Jing-sen¹, XU Yi-zhuang², ZHANG Yuan-fu², SUN Xue-jun¹, WANG Jian-sheng¹, WENG Shi-fu²,
WU Jin-guang²

1. The First Affiliated Hospital, College 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 this 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 cells with FTIR spectroscopy and investigating the special spectral features of the carcinoma cells compared with the carcinoma tissues. In the present paper, the gastric carcinoma tissues confirmed by histology were measured using a Nicolet Magna750- II FTIR spectrometer and the corresponding FTIR spectra were obtained. The cultured gastric carcinoma cells (SGC7901) were centrifuged to provide a small pellet of cells for FT-IR analysis. The cell pellet was then placed on a specially designed salt plate made of BaF₂. 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 cells (SGC7901) and that of the corresponding gastric tissues. Several infrared spectral features of the carcinoma cells were obtained; the different bands between cells and tissues locate in the range of 3 000-3 600 cm⁻¹ and 1 640 cm⁻¹ which are the range of the hydroxy stretching and blending bands of H₂O. There are more H₂O out of carcinoma cells in carcinoma tissues, so the strong bands of H₂O cover the distinctive bands of carcinoma cells in carcinoma tissues. Although the carcinoma tissue is more complicated, which might originate from the intrinsic complexity of the tissue, the results suggest that the spectral features of the carcinoma cells can be well reflected by that of the carcinoma tissue. This study shows that the diagnosis of carcinoma tissue by FTIR method exhibits sufficient cell basis.

Keywords FTIR; Gastric carcinoma; Cells

(Received Mar. 25, 2007; accepted Jun. 29, 2007)