

文章编号: 0258-7025(2008)09-1432-05

亚硝酸钠和氧合血红蛋白反应的拉曼光谱

沈高山 谷怀民 闫天秀 魏华江

(华南师范大学激光生命科学研究所暨激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要 采用显微拉曼光谱技术研究了亚硝酸钠(NaNO_2)与氧合血红蛋白(HbO_2)在水溶液中的相互作用,为检测高铁血红蛋白(MetHb)提供了一种新的方法。激发波长 514.5 nm,血红蛋白取自健康成人的血液。结果显示 NaNO_2 与氧合血红蛋白反应后,氧合血红蛋白特征峰 570 cm^{-1} 与水合高铁血红蛋白(MetHbH_2O)特征峰 495 cm^{-1} 强度的比值 I_{570}/I_{494} ,以及铁离子低自旋态与高自旋态特征峰强度的比值 I_{1586}/I_{1555} 均减小。对血红蛋白氧化态敏感的特征峰向低波数方向移动,对卟啉环中心孔径大小敏感的峰向高波数方向移动。研究表明拉曼光谱能够监测到 NaNO_2 对血红蛋白的影响,鉴别血红蛋白与水合高铁血红蛋白,可作为一种检测高铁血红蛋白的新方法。

关键词 光谱学;拉曼光谱;亚硝酸钠;氧合血红蛋白;水合高铁血红蛋白

中图分类号 O 657.37;R 318.51 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20083509.1432

Micro-Raman Spectroscopy of the Interaction between Sodium Nitrite and Oxyhemoglobin

Shen Gaoshan Gu Huaimin Yan Tianxiu Wei Huajiang

(Key Laboratory of Laser Life Science and Institute of Laser Life Science, Ministry of Education, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

Abstract To explore a new method to dignose methemoglobin, micro-Raman spectroscopy was used to investigate the interaction of sodium nitrite and oxyhemoglobin in aqueous solution, with 514.5 nm exitation. Hemoglobin was obtained from the healthy adult. The results show that the inensity ratio of the oxyhemoglobin marker band 570 cm^{-1} to the aquomethemoglobin marker band 495 cm^{-1} , and that of low spin state marker band 1586 cm^{-1} to the high spin state marker band 1555 cm^{-1} decrease during the interaction. The bands sensitive to the oxidation state shift to higher frequency. This work indicates that micro-Raman spectroscopy could monitor the bioeffects of sodium nitrite on the oxyhemoglobin, and distinguish hemoglobin and aquomethemoglobin. As a new method to detect methemoglobin, micro-Raman spectroscopy may have great potential applications in the diagnosis of methemoglobinemia.

Key words spectroscopy; Raman spectroscopy; sodium nitrite; oxygenated hemoglobin; aquomethemoglobin

1 引言

血红蛋白^[1]与亚硝酸钠反应生成高铁血红蛋白(MetHb),MetHb没有载氧能力,致使组织缺氧而中毒。正常人血液中高铁血红蛋白的体积分数不超过 3%,当其体积分数为 10%~25%时皮肤紫绀,体积分数为 35%~40%时会出现呼吸困难头痛,体积分数达到 70%时将会导致死亡。亚硝酸钠

(NaNO_2)是一种无机盐,在纺织工业上用作染色剂,还作为肉类食品的防腐剂和鲜色剂,腐烂的食物中也含有 NaNO_2 。据统计,在中国化学类食物中毒中, NaNO_2 中毒事件位居前列^[2]。因此,快速检测高铁血红蛋白具有重要的现实意义。

拉曼光谱在生命科学领域有很大的应用潜力,可以探测分子组成及结构信息,具有对样品损伤小、制样简便、无需标记等优点^[3~5]。Kruk用共振拉曼

收稿日期:2007-11-06;收到修改稿日期:2008-01-28

作者简介:沈高山(1979—),男,山东人,硕士研究生,主要从事激光拉曼光谱技术的研究。E-mail:shen-55555@163.com

导师简介:谷怀民(1965—),男,教授,博士生导师,主要从事激光光谱、激光生命科学领域的研究。

E-mail:guh@scnu.edu.cn(通信作者)

谱研究发现,当血红蛋白水溶液中的乙醇浓度增加时,血红蛋白氧亲和力降低^[6]。

NaNO_2 与氧合血红蛋白(HbO_2)反应可生成一种高铁血红蛋白,称为水合高铁血红蛋白(MetHbH_2O)。本文以514.5 nm激发,用显微拉曼光谱监测 NaNO_2 与氧合血红蛋白在不同浓度下的反应过程,分析了血红蛋白分子结构的变化,并对氧合血红蛋白和水合高铁血红蛋白进行鉴定区分。结果表明,显微拉曼光谱能够检测到血红蛋白分子结构的差异,为检测高铁血红蛋白中毒提供了一种新方法。

2 实验

静脉抽取健康成人的血液于肝素锂抗凝管中,以3000 r/min离心10 min分离出红细胞,用生理盐水洗涤,再以同样的速率离心3次;然后分离出红细胞,以1:4体积比加入三蒸水溶血,以15000 r/min高速离心30 min分离出血红蛋白。离心时温度保持在4℃,整个操作都在室温环境下进行。化学试剂均为国产分析纯,实验用水为三蒸水。紫外可见分光光度计(Lambda 35 UVIS spectrometer,美国PE公司)测得所用血红蛋白为氧合血红蛋白,血红蛋白在415 nm处的摩尔吸光系数取 $5.25 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ^[7]。为了减小 NaNO_2 氧化, NaNO_2 溶液配好后,立刻与 HbO_2 水溶液混合,加入浓度为100 mmol/L的 Na_2SO_4 作为内标,震荡均匀后,注入毛细管中进行拉曼光谱测定。

显微拉曼光谱仪配有 Olympus BX41 型显微镜和40×的物镜,美国 Princeton acton 公司生产的 Acton spectrapro@2300i 光谱仪和 Pixis256 CCD。激发波长514.5 nm,采用 LL01-514.5 (Semrock, USA)滤波片对激发光进行滤波处理,样品上的激发光功率约为8 mW,每个样品每次采集时间15 s。光谱测量可重复的准确度优于 $\pm 0.5 \text{ cm}^{-1}$ 。以 SO_4^{2-} 在 981 cm^{-1} 处的峰为内标,通过 OriginPro7.5 程序对得到的拉曼光谱图进行基线校正标准化处理。

3 结果与讨论

图1(a),(b)分别为浓度0.3 mmol/L NaNO_2 , 0.6 mmol/L NaNO_2 和0.24 mmol/L HbO_2 反应后,在不同时刻采集的拉曼光谱。图中从1到6依次为0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min。0时刻是指未加入 NaNO_2 反应之前的时

刻。在血红蛋白的拉曼光谱中,1370~1378 cm^{-1} 区域的峰表示血红蛋白处在氧化态,1555~1600 cm^{-1} 区域的谱线对铁离子自旋态(电子具有自旋性质,多电子体系所有电子的总自旋角动量 S 的大小决定其所处的自旋态,自旋态不同说明分子性质不同)敏感,在约1585 cm^{-1} 的峰表明铁离子处在低自旋态($S=1/2$),而在约1560 cm^{-1} 的峰表明铁离子处在高自旋态($S=5/2$)^[8,9]。图1(a)中,加入 NaNO_2 后,高自旋态的特征峰1555 cm^{-1} 强度增加,低自旋态的特征峰1586 cm^{-1} 强度减弱。与图1(a)相比,图1(b)中拉曼线型变化明显。在图1(b)中,425 cm^{-1} , 570 cm^{-1} , 677 cm^{-1} , 1586 cm^{-1} 和1637 cm^{-1} 峰强度减弱较大,495 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} , 1609 cm^{-1} 处强度变强。与0时刻相比,反应2 h后425 cm^{-1} 和570 cm^{-1} 峰基本消失;还有峰产生了频移,如677→675 cm^{-1} , 1374→1372 cm^{-1} , 1555→1560 cm^{-1} , 1604→1609 cm^{-1} 。

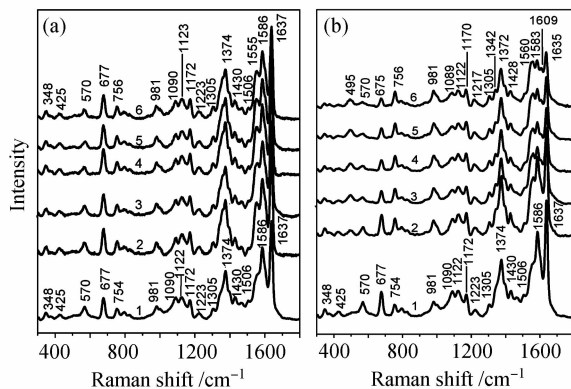


图1 NaNO_2 和氧合血红蛋白反应后不同时刻的拉曼光谱。(a) 0.3 mmol/L NaNO_2 与0.24 mmol/L HbO_2 ;

(b) 0.6 mmol/L NaNO_2 与0.24 mmol/L HbO_2

Fig. 1 Raman spectra of the reaction between NaNO_2 and HbO_2 at different times. (a) 0.3 mmol/L NaNO_2 and 0.24 mmol/L HbO_2 ; (b) 0.6 mmol/L NaNO_2 and 0.24 mmol/L HbO_2

表1给出了 570 cm^{-1} 与 495 cm^{-1} 峰强度比值 I_{570}/I_{494} 以及峰强度比值 I_{1586}/I_{1555} 在 NaNO_2 和氧合血红蛋白反应之前(0时刻,没加 NaNO_2)和反应过程中不同时刻的大小。结果表明,加入 NaNO_2 之后,比值 I_{570}/I_{494} 和比值 I_{1586}/I_{1555} 均显著变小,而且随着 NaNO_2 浓度的不同,比值变化的显著度和达到平衡的时间存在差异。0.3 mmol/L NaNO_2 与0.24 mmol/L HbO_2 反应时,在15 min内比值变化较快,15 min之后比值逐步趋于稳定。0.6 mmol/L NaNO_2 与0.24 mmol/L HbO_2 反应

时,比值变化更为显著,而且达到平衡的时间延长,经过30 min后比值才趋于稳定。通过比较可以看出,0.6 mmol/L NaNO_2 对血红蛋白的影响相对显著。

表1 NaNO_2 和氧合血红蛋白反应后不同时刻的峰强度比值

Table 1 Ratio of the intensity of band at different times after the reaction of NaNO_2 and HbO_2

(a) 0.3 mmol/L NaNO_2 and 0.24 mmol/L HbO_2

Time /min	0	15	30	60	90	120
I_{570}/I_{495}	3.619	3.547	3.445	3.431	3.416	3.429
I_{1586}/I_{1555}	1.600	1.473	1.414	1.422	1.412	1.402

(b) 0.6 mmol/L NaNO_2 and 0.24 mmol/L HbO_2

Time /min	0	15	30	60	90	120
I_{570}/I_{495}	3.619	1.519	0.762	0.667	0.598	0.596
I_{1586}/I_{1555}	1.600	1.397	1.157	1.151	1.107	1.005

当铁离子结合的配体改变时,将引起电子分布在血红素上的变化,同时卟啉环以及附近的蛋白质部分结构会发生改变^[10]。在低波数段的拉曼峰,其位置会随配体的不同而移动。425 cm^{-1} , 570 cm^{-1} 峰,分别归属为 $\delta(\text{Fe-O-O})$ 弯曲振动和 $\nu(\text{Fe-O}_2)$ 伸缩振动^[11]。在图1中,二者的强度都减弱,说明铁氧键在断裂。在495 cm^{-1} 处出现了一个新峰,与Alain发现水合高铁血红蛋白在500 cm^{-1} 处有一个特征峰相符^[12]。因此,可以考虑将495 cm^{-1} 峰作为水合高铁血红蛋白的一个特征峰,虽然能否把该峰归属为 $\text{Fe-H}_2\text{O}$ 振动,需要进一步的验证。由表1可知,在加入 NaNO_2 后,570 cm^{-1} , 495 cm^{-1} 处强度的比值 I_{570}/I_{494} 变小,表明氧合血红蛋白浓度减小,水合高铁血红蛋白的浓度增加。677 cm^{-1} 峰变化是由血红素卟啉环中电子浓度分布改变造成的^[13]。1350~1380 cm^{-1} 区域的谱线对应 ν_4 振动模式,其中在1370~1378 cm^{-1} 区域的谱线表示血红蛋白处在氧化态。 ν_4 拉曼频移的产生是由卟啉环反 π^* 轨道上电荷浓度的变化引起的,当反 π^* 轨道上电荷浓度增加时成键轨道能量变弱, ν_4 振动波数将减小^[14]。因此,氧化态的特征峰1374 cm^{-1} 向低波数方向移动2 cm^{-1} , 说明在反应过程中卟啉环反 π^* 轨道电荷浓度增加,血红蛋白仍然处在氧化态。另外,有学者报道血红蛋白四级结构的改变也会影响反 π^* 轨道上的电荷浓度, ν_4 振动谱线的移动也能够反映血红蛋白四级结构的改变^[15]。

在高波数段,如表1所示,加入 NaNO_2 后,比值 I_{1586}/I_{1555} 的变化表明铁离子由低自旋态变为高自旋态,高铁血红蛋白浓度增加。由低自旋态变为

高自旋态过程中,铁离子在远离卟啉环^[16]。在1500~1650 cm^{-1} 区域的谱线,不仅对铁离子自旋态敏感,而且能够反映卟啉环中心孔径(core size, 铁离子到吡咯氮原子之间的距离)的大小。卟啉环中心孔径大小每产生0.10 nm的变化,对中心孔径大小敏感的特征峰将会产生5~6 cm^{-1} 的移动,波数将随着孔径的变小而增大^[17]。图1显示,1555 cm^{-1} , 1604 cm^{-1} 峰都向高波数方向移动,因此,可以推断在反应过程中,铁离子在远离卟啉环平面,使卟啉环中心孔径变小,并且卟啉环与铁离子之间的电子分布产生了变化,氧合血红蛋白生成水合高铁血红蛋白。

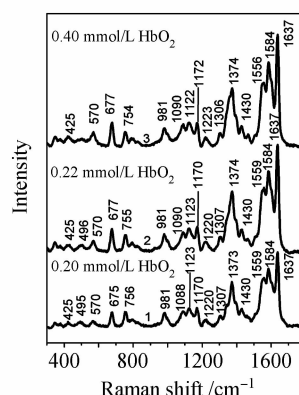


图2 0.20 mmol/L, 0.22 mmol/L 和 0.40 mmol/L HbO_2 与 0.4 mmol/L NaNO_2 反应 150 min 时的拉曼光谱图
Fig. 2 Raman spectra of the reaction for 150 min of 0.20 mmol/L, 0.22 mmol/L, 0.40 mmol/L HbO_2 and 0.4 mmol/L NaNO_2

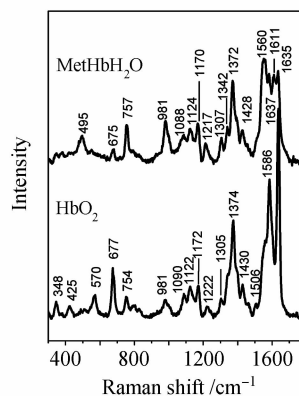


图3 氧合血红蛋白和水合高铁血红蛋白的拉曼光谱图

Fig. 3 Raman spectra of HbO_2 and MetHbH_2O

对同一浓度的 NaNO_2 与不同浓度的氧合血红蛋白反应过程,也进行了拉曼光谱检测。图2为0.4 mmol/L NaNO_2 分别与0.20 mmol/L, 0.22 mmol/L和0.40 mmol/L HbO_2 反应150 min

后采集的拉曼光谱。在0.20 mmol/L HbO₂ 光谱中,表征铁氧键振动的光谱线425 cm⁻¹,570 cm⁻¹强度减弱,低自旋态的特征峰1584 cm⁻¹强度也明显减弱。还有表征氧化态的特征峰出现在1373 cm⁻¹处,而在0.22 mmol/L和0.40 mmol/L HbO₂ 光谱中其位置在1374 cm⁻¹处。在0.20 mmol/L HbO₂ 的光谱中比值 I_{570}/I_{495} 和 I_{1586}/I_{1555} 最大;在0.24 mmol/L HbO₂ 的光谱中,比值最小。以上结果说明,0.40 mmol/L NaNO₂ 与0.20 mmol/L HbO₂ 反应时,有更多的氧合血红蛋白生成水合高铁血红蛋白。可见当同一浓度的NaNO₂ 与不同浓度的血红蛋白反应时,浓度越低的血红蛋白变化越明显。

比较了当用514.5 nm激发时氧合血红蛋白和水合高铁血红蛋白拉曼光谱。研究结果如图3所示,水合高铁血红蛋白光谱中425 cm⁻¹,570 cm⁻¹峰消失,出现了495 cm⁻¹,1560 cm⁻¹和1611 cm⁻¹几个锐利的峰;677 cm⁻¹峰频移到675 cm⁻¹处,强度明显减弱;表征氧化态的特征谱线向低波数移动了2 cm⁻¹;低自旋态的特征峰变得很弱,高自旋态的特征峰变强。因为氧合血红蛋白和水合高铁血红蛋白都处在氧化态,仅依据氧合态的特征峰是不能对二者区分的。在水合高铁血红蛋白光谱图中低自旋态的特征峰没有消失,这是由于在室温下,水合高铁血红蛋白中高自旋态与低自旋态之间的能量间隔很小,其自旋态表现为一种混合态^[15],这与本研究结果相符。虽然在水合高铁血红蛋白中低自旋态的特征峰存在,但是与高自旋态的特征峰相比其强度很弱。而且在氧合血红蛋白中低自旋态的特征峰很强,因此自旋态的特征峰可作为对氧合血红蛋白和水合高铁血红蛋白进行鉴定区分的依据。由此可以把570 cm⁻¹,1374 cm⁻¹,1586 cm⁻¹和1637 cm⁻¹附近的峰作为氧合血红蛋白的特征峰,495 cm⁻¹,1372 cm⁻¹,1560 cm⁻¹和1611 cm⁻¹附近的峰作为高铁血红蛋白的特征峰。研究表明拉曼光谱能够鉴定不同性质的血红蛋白,可作为一种检测高铁血红蛋白分子的新手段。

4 结论

用拉曼光谱监测了不同浓度的NaNO₂对不同浓度的有氧血红蛋白的反应,观察到血红蛋白分子结构发生改变且其浓度降低,高铁血红蛋白浓度增加。并对在514 nm激发下,氧合血红蛋白和水合高铁血红蛋白进行了鉴定区分。NaNO₂和氧合血

蛋白反应的显微拉曼光谱研究,一方面可以为氧合血红蛋白和水合高铁血红蛋白的结构分析、反应机制提供有效参考;另一方面,鉴于拉曼光谱能够反映分子结构的细微变化,且具有无需标记、制样简便、测试快捷等方面的优越性,为临床上应用拉曼光谱检测和诊断高铁血红蛋白中毒症提供了实验依据。

参 考 文 献

- Joel M. Friedman. Structure, dynamics, and reactivity in hemoglobin [J]. *Science*, 1985, **228**(4705):1273~1280
- Zhang Su. Focus analysis on the situation of food poisoning in China between 1985 to 2000 [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2002, **14**(5):26~28
张肃. 1985年~2000年我国食物中毒情况重点分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2002, **14**(5):26~28
- Wang Xiaodan, Zhao Zhiwei, Xu Xiaodong *et al.*. Lattice vibrational spectrum of Yb:Y₃Al₅O₁₂ crystals [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(8):1525~1528
王晓丹,赵志伟,徐晓东等. Yb:Y₃Al₅O₁₂晶体晶格振动光谱的研究[J]. *光学学报*, 2007, **27**(8):1525~1528
- Liang Erjun, Liang Huiqin. Study on the properties and phase transition in laser quenching and cladding layers by Raman spectroscopy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(1):120~123
梁二军,梁会琴. 激光淬火及熔覆层性能与物相变化的拉曼光谱研究[J]. *中国激光*, 2006, **33**(1):120~123
- Liu Songhao, Meng Yaoyong. Photodynamic damages of DNA with HMME probed by Raman spectroscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2000, **20**(4):529~532
刘颂豪,孟耀勇. 血卟啉单甲醚对DNA损伤的拉曼光谱研究[J]. *光学学报*, 2000, **20**(4):529~532
- Hu Xuzhou, Hu Xiaochun, Tan Honglin *et al.*. Laser Raman scattering spectrum of heroin [J]. *Chinese J. Lasers*, 2000, **A27**(10):891~897
胡绪洲,胡晓春,谭红琳等. 海洛因的激光拉曼散射谱[J]. *中国激光*, 2000, **A27**(10):891~897
- Scott Prahl. "Tabulated molar extinction coefficient for hemoglobin in water," <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/summary.html> (1999)
- Tomoko Yamamoto, Graham Palmer. The valence and spin state of iron in oxyhemoglobin as inferred from resonance Raman spectroscopy [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1973, **248**(14):5211~5213
- Denis L. Rousseau, Yuan-chin Ching, Maurizio Brunori *et al.*. Axial coordination of ferric aplysia myoglobin [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, **264**(14):7878~7881
- Lajos Rimai, Irving Salmeen, David H. Petering. Comparison of the resonance Raman spectra of carbon monoxy and oxy hemoglobin and myoglobin; similarities and differences in heme electron distribution [J]. *Biochemistry*, 1975, **14**(2):378~382
- Shanthini Jeyarajah, Leonard M. Proniewicz, Helen Bronder *et al.*. Low frequency vibrational modes of oxygenated myoglobin, hemoglobins, and modified derivatives [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**(49):31047~31050
- Alain Desbois, Marc Lutz, Ramaprasad Banerjee. Low-frequency vibrations in resonance Raman spectra of horse heart myoglobin. iron-ligand and iron-nitrogen vibrational modes [J]. *Biochemistry*, 1979, **18**(8):1510~1518
- Edyta Podstawka, Leonard M. Proniewicz. Resonance Raman

- study of deoxy and ligated (O_2 and CO) mesoheme IX-reconstituted myoglobin, hemoglobin and its α and β subunits [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2004, **98**(9):1502~1512
- 14 Bayden R. Wood, Don McNaughton. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2002, **33**(7):517~523
- 15 D. L. Rousseau, J. A. Shelnutt, E. R. Henry *et al.*. Raman difference spectroscopy of tertiary and quaternary structure changes in methaemoglobins [J]. *Nature*, 1980, **285**(5759):49~51
- 16 Bayden R. Wood, Brian Tait, Donald McNaughton. Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of hemoglobin within a single living erythrocyte [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1539**(1-2):58~70
- 17 Giulietta Smulevich. Understanding heme cavity structure peroxidases; comparison of electronic absorption and resonance Raman spectra with crystallographic results [J]. *Biospectroscopy*, 1998, **4**(S5):S3~S17