

文章编号: 0258-7025(2009)10-2647-04

抗血管生成药物对鸡胚血管作用的拉曼光谱

林居强 黄瑞香 李永增 陈 荣* 冯尚源 黄祖芳

(福建师范大学医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建省光子技术重点实验室, 福建 福州 350007)

摘要 抑制血管生成是肿瘤治疗的重要方法之一,若能从分子水平检测血管损伤的机制,对治疗将更具指导意义。拉曼光谱是一种无损、信息非常丰富的光谱技术,可以应用于固态、溶液或液态的生物分子分析。基于激光共焦拉曼光谱技术设计一方案,测量分析了鸡胚微血管在抗血管药物沙利度胺作用前后的拉曼光谱。加药 5 h 与对照组血管的平均拉曼谱在位置和形状上类似,但某些特征峰在强度上却发生变化,如波数 1441 cm^{-1} , 1527 cm^{-1} 及 1657 cm^{-1} 的强度明显增强而 971 cm^{-1} 和 1081 cm^{-1} 的强度明显减弱,这些变化可能是药物作用血管后,使血管内的核酸、蛋白质、磷脂等重要生物分子在结构或含量上发生了不同的改变而引起的。研究结果表明拉曼光谱有可能成为从分子水平分析抗血管生成药物对血管作用的一种有效方法。

关键词 医用光学; 拉曼光谱; 抗血管生成; 鸡胚

中图分类号 O657.3; R318.51 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2647

Raman Spectroscopy for Chick Embryo Vascular Injury with Anti-Angiogenesis Drugs

Lin Juqiang Huang Ruixiang Li Yongzeng Chen Rong Feng Shangyuan Huang Zufang

(Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education,
Fujian Provincial Key Laboratory of Photonic Technology, Fujian Normal University,
Fuzhou, Fujian 350007, China)

Abstract Inhibit angiogenesis is one of important tumor therapies. If the mechanism of vascular changes can be detected from molecular lever, it will have therapeutic significance. Raman spectroscopy is a non-destructive spectrum technology holding rich information, which can be applied to the structural analysis of solid, liquid or solution of biological molecules. Based on confocal Raman microscope, a unique system is developed for obtaining the different Raman spectrum about vessels of the chick embryo with and without the anti-angiogenic drugs-thalidomide. In the study, the location and shape of the average Raman spectrum of vessels in drug 5 h is similar to the ones without medicine, but the intensity of some characteristic peaks changes. Intensity at 1441 cm^{-1} , 1527 cm^{-1} and 1657 cm^{-1} , increases markedly, while the 971 cm^{-1} and 1081 cm^{-1} decreases. The change is due to vascular medicine which causes the nucleic acid, protein, phospholipids and other important biological molecules in the vessels to change on the structure or content. The result indicates that Raman spectroscopy could be an effective tool for detection of the mechanism of vascular changes.

Key words medical optics; Raman spectroscopy; angiogenesis; chick embryo

1 引 言

1971 年 Folkam 首次提出肿瘤生长和转移具有血管依赖性的观点,为以抑制血管生成作为靶点的肿瘤治疗奠定了理论基础。近年来,抗血管生成治疗

已成为肿瘤综合治疗的研究热点。目前评价血管生成或损伤主要是利用影像学方法,如正电子成像术(Positron Emission Tomography, PET)、核磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)、光学多

收稿日期: 2009-02-23; 收到修改稿日期: 2009-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(60778046)和福建省教育厅科技计划(JA07040)资助课题。

作者简介: 林居强(1976—),男,博士,讲师,主要从事生物医学光学方面的研究。E-mail: jqclin@fjnu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: chenr@fjnu.edu.cn

普勒成像(Optical Doppler Tomography, ODT)、光声成像(Optoacoustic Imaging)等^[1]。但这些方法尚不能从分子水平解释血管损伤的机制。因此,寻找一种无损、简便、可以从分子水平分析抗血管生成药物对血管作用的方法,对肿瘤临床治疗意义重大。

拉曼光谱是研究物质分子结构的重要手段之一,其特征峰位置、强度和线宽可提供物质构成的分子振动、转动方面的信息,从而反映出分子中不同的化学键或官能团。拉曼光谱是一种无损、信息非常丰富的光谱技术,可以应用于固态、溶液或液态的生物分子的结构分析,对样品不需进行特别的处理,因此可直接对生物样品,如细胞、组织及 DNA 和蛋白质等进行检测,能提供快速、非侵袭性的检测。拉曼光谱具有非破坏性和精细如“指纹”的分辨能力以及不受水的干扰等优点,给出高专一性的光谱信息,使得在线分析、实地检测以及实时获取光谱成为可能,日益受到重视^[2~4]。

本文基于激光共聚焦显微拉曼光谱仪(英国, Renishaw 公司, InVia),设计一实验方案,获得了活体鸡胚微血管的拉曼光谱,并初步研究探讨了抗血管生成药物(沙利度胺)作用微血管后,鸡胚微血管拉曼光谱的特征峰变化。

2 材料和方法

2.1 实验药物及材料

沙利度胺药片购自福建省肿瘤医院,受精的胚蛋购于福州市种鸡场。

2.2 鸡胚培养

鸡胚种蛋浸泡于新洁尔灭 2~3 min,拭干后将种蛋放入(38±0.5)℃,湿度为 50%~60%的恒温孵箱里孵育 3 天,然后在超净台上采用直接敲壳法移植鸡胚,将鸡胚移入自制的孵育容器内。选取胚盘直径 7~10 mm,胚胎位于卵黄中央上方且能看见心搏,卵黄膜未破裂的鸡胚。在容器口覆盖一层保鲜膜,放入温度 37.8℃,湿度 50%~60%的恒温孵箱继续培养。

2.3 加 药

1 g 的沙利度胺药片,用蒸馏水配成质量浓度为 1 g/mL 的溶液,装于无菌的离心管中,以待备用。

取 8 日龄鸡胚 8 个,随机分成加药与对照两组。对于加药组,在鸡胚毛细微血管新生区,放置一直径为 1 cm 的塑料圆环,往圆环内滴加 50 μL 沙利度胺溶液,对照组滴加 50 μL 去离子水。接着在容器口覆盖一层保鲜膜,放入温度 37.8℃,湿度 50%~

60%恒温孵箱继续培养 5 h。

2.4 实验装置与光谱收集

图 1 所示的光谱收集装置由 Renishaw 拉曼光谱仪主机(①),光纤探头(②),785 nm 激光器(③)可上下精细调节的支架(④)和显示器(⑤)组成。将探头固定在支架上,对准样品(⑥)调好焦距后,785 nm 激光激发,采集到的拉曼信号经光谱仪收集。加药组以及对照组的实验参数相同,均采用激发波长 785 nm,输出功率 100 mW,曝光时间为 60 s,扫描范围 200~2200 cm⁻¹。每个样品各取 5 条微血管,每条血管取 2 个不同位置采集拉曼信号。对所得光谱扣除荧光背景后,进行平滑和归一化处理。对于加药组,在实验前,还需将残留药品用 PBS 缓冲液冲洗干净。

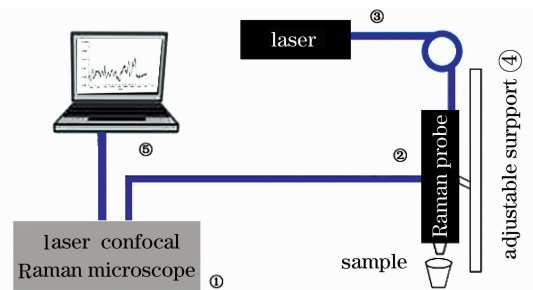


图 1 拉曼成像实验装置

Fig. 1 Experimental system of Raman spectra

3 结果与分析

实验所获取的所有光谱都使用硅的三阶峰进行校准。光谱扫描范围为 200~2200 cm⁻¹,但考虑到拉曼光谱仪内部反射镜的边缘效应,选取 550~2000 cm⁻¹范围进行分析,每个光谱通过荧光背景扣除(软件由加拿大 BC 癌症研究中心曾海山博士惠赠^[5]),并用 origin 自带的多项式拟合进行归一化和平滑处理。加药组和对照组的每个鸡胚均采集 10 个光谱,分别来自 5 处微血管区,每个区选取 2 个不同位置取谱,最后得到各自的平均拉曼光谱如图 2 所示,其中插图中箭头所示为拉曼取谱处的鸡胚微血管区。

从图 2 可以看出加药 5 h 与无加药微血管的平均光谱的位置和形状十分类似。图 3 比较了加药 5 h 与对照组鸡胚微血管的平均光谱,其差异值如谱线所示。加药组较对照组弱的特征峰有 867 cm⁻¹, 1002 cm⁻¹ 和 1081 cm⁻¹,而加药组较对照组强的特征峰有 1302 cm⁻¹, 1441 cm⁻¹, 1527 cm⁻¹, 1657 cm⁻¹ 及 1744 cm⁻¹。

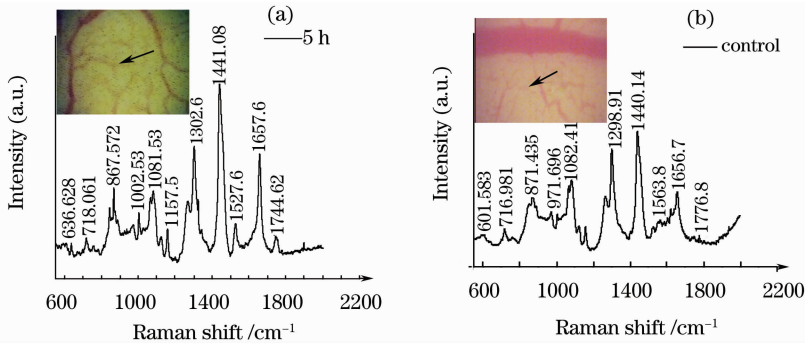


图 2 加药 5 h(a)与无加药(b)微血管的平均拉曼光谱

Fig. 2 Average Raman spectra of vessel. (a) and (b) are the Raman spectra of vessel with drug treatment and none-treatment, respectively

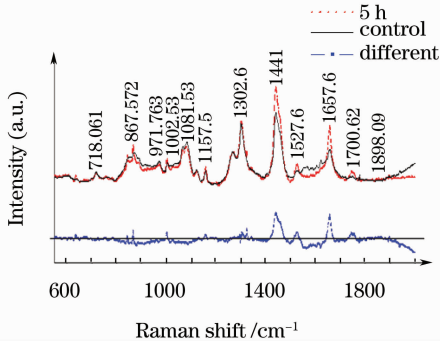


图 3 加药 5 h 与无加药(control)微血管的平均拉曼光谱及两者的差异(最下面的谱线)

Fig. 3 Average Raman spectra obtained from vessel with thalidomide for 5 h (control) and none and the difference between them (see below spectra)

表 1 主要拉曼信号峰来源及其可能对应的物质指认^[6,7]

Table 1 Peaks positions and assignment of raman spectra^[6,7]

| Raman shift /cm ⁻¹ | Origin and assignment |
|-------------------------------|---|
| 971 | $\delta(\text{=CH})$ swing |
| 868 | Proline |
| 1002 | V_s symmetric ring breathing mode, phenylalanine |
| 1081 | PO_2 -symmetric stretching vibration |
| 1302 | (CH_2) twist, phospholipids and collagen |
| 1441 | $\delta(\text{CH}_2)V_{as}(\text{CH}_3)$ in protein (around 1449) and lipids (around 1438) |
| 1527 | —C=C— stretching vibration |
| 1657 | $\text{C}\equiv\text{C}$ (amide I ($\text{C}\equiv\text{O}$ stretching mode of protein α -helix conformation) / $\text{C}=\text{C}$ lipid stretch |
| 1744 | $V(\text{C}=\text{O})$ of phospholipids |

表 1 列出了数据的相关峰位归属^[6,7]。1004 cm^{-1} 归属于蛋白质的苯丙氨酸对称呼吸振动模, 868 cm^{-1} 归属于脯氨酸, 1441 cm^{-1} 归属于 CH_2 弯曲振动, 以及 1657 cm^{-1} 归属于 amide I (蛋白质 α -螺

旋构像的 $\text{C}\equiv\text{O}$ 伸缩振动); 1081 cm^{-1} 归属于核酸的 PO_2 -对称伸缩振动; 1302 cm^{-1} 归属于磷脂和胶原的 (CH_2) 扭曲, 1744 cm^{-1} 归属于磷脂的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动; 而处于 1527 cm^{-1} 的峰归属于类胡萝卜素的 —C=C— 伸缩振动。表 1 中, V 表示伸缩振动, V_s 表示对称伸缩振动, V_{as} 表示不对称伸缩振动, δ 表示弯曲振动。

4 讨 论

鸡胚具有丰富的微血管网, 对刺激/抑制微血管生成的药物敏感, 且取材简便经济, 实验操作简单, 结果直观, 是一种研究血管生成和抗血管生成的最佳体内模型之一^[8~10]。沙利度胺 (thalidomide, 反应停) 是一种免疫调节和抗血管生成药物。药物残渣在实验前已用 PBS 清洗, 加药后鸡胚微血管的拉曼谱与加药前在谱峰位置和形状上基本一致, 加药前后强度有变化的谱峰 1441 cm^{-1} 及 1657 cm^{-1} 等没有药物对应的谱峰, 说明沙利度胺药物清洗得较为彻底, 没有对实验造成影响。兔角膜血管生成试验证明沙利度胺具有抗血管生成作用。其作用机制是阻断血管生成因子合成, 如碱性成纤维因子 (bFGF) 和血管内皮生成因子 (VEGF) 而实现^[11]。从图 3 可以看出, 加药组较对照组弱的特征峰有 867 cm^{-1} , 1002 cm^{-1} 和 1081 cm^{-1} , 分别属于脯氨酸、苯丙氨酸和磷酸根谱带。脯氨酸和苯丙氨酸主要构成蛋白质的侧链构像, 它们的减弱说明蛋白质结构发生改变, 从而影响到蛋白质功能。而这些蛋白质功能的改变可能是由于抗血管生成药物沙利度胺作用鸡胚微血管所致。而磷酸根谱带的减弱说明 DNA 合成减少, 即新生血管减弱或停止生成。加药组较对照组强的特征峰, 如主要归属于 α -螺旋结构谱带的 1441 cm^{-1} , 1527 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} , 归属于

磷脂和胶原的(CH_2) 1302 cm^{-1} 及 1744 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动)峰等说明血管中的弹性蛋白含量增加,可能是由于受损血管壁增厚所致。

5 结 论

本研究基于拉曼光谱技术设计一可活体测量鸡胚微血管拉曼光谱的实验方案,获得了鸡胚微血管的拉曼光谱,并对抗血管生成药物沙利度胺作用鸡胚微血管后得到的拉曼光谱进行了分析。对测量获得的加药组和对照组拉曼光谱数据比较分析后,得到两组实验获得的拉曼光谱在某些特征峰上存在着较明显的差异。从特征峰归属可以分析出抗血管生成药物沙利度胺作用鸡胚微血管后导致了血管内弹性蛋白、脂类及核酸分子在结构和功能上的改变。拉曼光谱可以反应物质分子结构、分子振动、转动方面的信息,可反映出分子中不同的化学键或官能团。根据加药前后拉曼特征峰的变化从分子水平上分析引起鸡胚微血管损伤的可能原因,有助于进一步了解药物的作用机制,从而有可能成为从分子水平分析抗血管生成药物对血管作用的一种有效方法。

参 考 文 献

- 1 L. Xiang, D. Xing, H. Gu *et al.*. Real-time optoacoustic monitoring of vascular damage during photodynamic therapy treatment of tumor [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2007, **12**(1): 014001
- 2 Yao Huilu, Zhu Miao, Wang Guiwen *et al.*. Study of Raman spectra of single carcinoma of nasopharynx cell [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(9): 1761~1764

- 姚辉璐, 朱 森, 王桂文等. 单个鼻咽癌细胞的拉曼光谱分析的研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(9): 1761~1764
- 3 Hu Xuzhou, Hu Xiaochun, Tan Honglin *et al.*. Laser Raman scattering spectrum of heroin [J]. *Chinese J. Laser*, 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
- 4 Yang Chaghu, Zeng Xiaoyig, Yuan Jianhui *et al.*. Application of Raman spectrum in water quality analysis [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(8): 1169~1172
- 杨昌虎, 曾晓英, 袁剑辉等. 激光拉曼光谱在水质分析中的应用 [J]. *中国激光*, 2008, **35**(8): 1169~1172
- 5 J. Zhao, H. Liu, H. Zeng. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy [J]. *Appl. Spectrosc.*, 2007, **61**: 1225~1232
- 6 R. E. Kast, G. K. Seerhatkulu, A. Cao *et al.*. Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model [J]. *Biopolymers*, 2008, **89**(3): 235~241
- 7 Shen Shijie, Liu Bingyu, Li Qing *et al.*. Distinctive infrared spectral features in human breast cancer [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2000, **20**(1): 28~30
- 沈世杰, 刘炳玉, 李 清等. 人乳腺癌组织的特征红外光谱研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2000, **20**(1): 28~30
- 8 A. Vargas, M. Zeisser-laboube, N. Lange *et al.*. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems [J]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, **59**(11): 1162~1176
- 9 A. M. Cimpean, D. Ribatti, M. Raica *et al.*. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis [J]. *Angiogenesis*, 2008, **11**(4): 311~319
- 10 M. Membrane-Brand, N. Lamandé, E. Larger *et al.*. Angiotensinogen impairs angiogenesis in the chick chorioallantoic [J]. *J. Mol. Med.*, 2007, **85**: 451~460
- 11 Yu Yanxia, Shi Yuankai. Thalidomide in cancer treatment [J]. *Oncology Progress*, 2005, **3**(4): 353~359
- 于燕霞, 石远凯. 沙利度胺在恶性肿瘤治疗中的应用 [J]. *癌症进展杂志*, 2005, **3**(4): 353~359