

文章编号: 0258-7025(2009)02-0509-04

EC9706 细胞经不同剂量 X 射线 辐照后的拉曼光谱

张广水 陈长青 齐 健 唐伟跃

(郑州大学物理工程学院, 河南 郑州 450052)

摘要 为了研究不同剂量 X 射线对食管癌(EC9706)细胞的辐射损伤, 经不同剂量 X 射线照射后继续培养 24 h, 利用拉曼光谱分析其内部蛋白质、核酸、脂类等构象和含量变化。实验结果表明, 各剂量组拉曼光谱的峰强和频移与空白对照组之间存在较大的差异。对照组光谱中某些谱带在个别剂量组消失, 如蛋白质主链中 C-N 振动 1114 cm^{-1} 谱带在各剂量组中消失, 脱氧核糖 Dr 振动谱带 895 cm^{-1} 仅存在于 8Gy 组, 937 cm^{-1} 谱带仅存在于 12Gy 组, 膜脂中膜结合 β -胡萝卜素的 C=C 振动谱带 1523 cm^{-1} 仅存在于 6Gy 组。这些特征谱带在不同剂量组光谱中的变化, 为进一步研究 X 射线辐照 EC9706 细胞的最佳剂量提供了一定参考。

关键词 光谱学; 拉曼光谱; 人食管癌细胞; X 射线; 剂量

中图分类号 O657.37; R318.51

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL20093602.0509

Raman Spectroscopic Study on EC9706 Cells Irradiated by X-Ray with Different Dose

Zhang Guangshui Chen Changqing Qi Jian Tang Weiyue

(College of Physics and Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract The radiation damage in EC9706 cells by X-rays was studied. Laser Raman spectrum was used to analyze the change of structure and content of protein, nucleic acid and fat, while EC9706 cells irradiated by X-rays was cultivated for 24 h. The results show that the peak and frequency shifting are different from spectra of the controlled dose and reference groups. The peak in the controlled group spectrum vanishes in some dose groups. The peak at 1114 cm^{-1} of $\nu(\text{C-N})$ in the main chain of protein disappears in all dose group's, the peak at 895 cm^{-1} of $\nu(\text{Dr})$ only exists in 8Gy group's, and the peak at 937 cm^{-1} only exists in 12Gy group's. In addition, the C=C vibration peak at 1523 cm^{-1} β -carotenoid combining cell film only exists in 6Gy group's. The preferable dose of X-rays can be found by analyzing the variety of the above-mentioned peaks in some dose groups.

Key words spectrum; Raman spectrum; EC9706 cells; X-ray; dose

1 引 言

临床对食管癌的放射治疗多采用 X 射线, ^{60}Co 等放射源, 但放射剂量的设定一直没有统一的标准可供参考。医生对放射剂量的选定存在一定的主观性。拉曼光谱是一种简便灵敏的光谱分析新技术^[1,2], 在细胞的结构、功能及凋亡等方面的研究取得了迅速发展^[3~8]。实践证明它能在一定程度上反

映细胞内部蛋白质、核酸、脂类以及碳水化合物的成分、构象和含量变化。本文利用激光共焦显微拉曼光谱仪, 对经不同剂量 X 射线辐照的食管癌(EC9706)细胞进行测定, 发现各剂量组的拉曼光谱在散射强度和谱线位置上存在一定程度的差异, 说明 X 射线的辐照剂量与 EC9706 细胞内部各组分的含量和构象变化存在一定联系, 为进一步探索食管

收稿日期: 2008-04-07; 收到修改稿日期: 2008-05-21

基金项目: 河南省科技攻关项目(0624410052)资助课题。

作者简介: 张广水(1983-), 男, 山东人, 硕士研究生, 主要从事现代光谱技术应用方面的研究。

E-mail: waterelfzgs@163.com

导师简介: 唐伟跃(1958-), 男, 河南人, 教授, 硕士生导师, 主要从事激光医学方面的研究。

E-mail: tangwy@zzu.edu.cn(通信作者)

癌 X 射线放疗的最佳剂量提供一定参考。

2 实 验

选用人食管癌细胞株 (EC9706, 购于上海细胞库)。实验仪器为: 37 °C, 5 % CO₂ 细胞培养箱、小型台式离心机 TGL-16G (由河南省生物工程重点实验室提供); 德国西门子 6 MeV 直线加速器 (由郑州大学第一附属医院光子刀中心提供); 英国 Renishaw 激光共焦显微拉曼光谱仪 (由郑州大学材料物理重点实验室提供)。分别取相同数量的处于指数生长期的 EC9706 细胞, 分成 6 个剂量组 (1Gy, 3 Gy, 6Gy, 8 Gy, 10 Gy, 12 Gy) 和一个空白对照组 (对照组除不受射线辐照外, 所处实验条件和其他各

组完全一样), 对各剂量组进行 X 射线照射。继续培养 24 h, 收集各组细胞, 置于激光共焦显微拉曼光谱仪下进行光谱采集。

直线加速器参数设定为: X 光子能量 6 MeV, 源皮距 100 cm, 野面积 10 cm×10 cm; 激光共焦显微拉曼光谱仪参数设定为: 激发波长 514 nm, 光谱扫描范围 500~2000 cm⁻¹, 扫描时间 20 s, 采集次数 1 次。

3 实验结果

对 EC9706 细胞分别辐照不同剂量 X 射线, 继续培养 24 h, 采集拉曼光谱, 如图 1 所示。

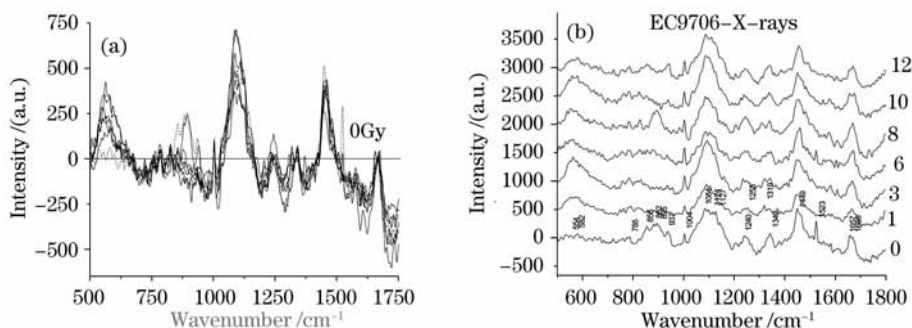


图 1 不同剂量组的拉曼光谱

Fig. 1 Raman spectra of different dose groups

表 1 EC9706 细胞拉曼光谱各谱线的归属

Table 1 Recognition of each peak in the Raman spectra of the EC9706 cells

Band/cm ⁻¹	Vibration mode
554, 582, 882, 1342	The indole ring of Trp stretching mode
785	PO ₂ ⁻ symmetric stretching mode
855	Ring breathing mode of tyrosine
895, 937	Dr vibration mode
1003, 9	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine
1084, 1	PO ₂ ⁻ symmetric stretching mode
1114	C-N stretching mode of proteins
1127	C-C stretching mode of lipids
1240	A mide III β-sheet
1253	A mide III disordered conformation
1319	A mide III β-collapse
144, 9	CH ₂ , CH ₃ wagging mode
1523, 6	C-C of β-carotenoid
1657, 1668, 4	AmideIα-helix

图 1 (a) 采用 Origin7. 5 软件进行了基于 Positive peak algorithm 算法的 Baseline 处理, 虚线为空白对照组谱线, 其他谱线分别对应于 X 射线各剂量组。为了便于分析各剂量组光谱图特征峰位的

频移, 以对照组为基准, 将各剂量组谱线强度依次上调 500 a. u., 得图 1 (b)。EC9706 细胞拉曼光谱各谱线的归属详见表 1。

4 分析讨论

对比分析 EC9706 细胞空白对照组和各 X 射线剂量组的拉曼光谱发现,某些特征谱带的峰位和强度发生较明显的变化,表明这些谱带归属的物质成分在不同剂量的 X 射线辐照下,其构象和含量发生了变化。

4.1 蛋白质结构谱带

蛋白质的主链构象主要是由肽键($-\text{CONH}-$)和骨架 $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{N}$ 引起的,其中在肽键引起的不同类型振动模中,酰胺 I 和酰胺 III 对蛋白质构象的变化十分敏感。 1240 cm^{-1} 处的拉曼峰源于酰胺 III 带 β 折叠^[9]。同对照组比较,各剂量组频移不明显,光谱强度除 8Gy 外变化不大,8Gy 组强度是对照组的 4 倍,表明在该辐照剂量下蛋白质酰胺 III 带 β 折叠构象的含量明显增多。 1253 cm^{-1} 归属于酰胺 III 带无规卷曲, 1318 cm^{-1} 归属于酰胺 III 带 β 回折,对照组中不存在这两个谱带,而在中小剂量(1Gy, 3Gy, 6Gy)出现该谱带,且强度很小,表明中小剂量 X 射线作用使 EC9706 细胞中酰胺 III 带出现无规卷曲和 β 回折构象。酰胺 I 带 α 螺旋构象在对照组中对应于 1657 cm^{-1} , 1668 cm^{-1} 双峰,施加 X 射线辐照后仅大剂量(10GY, 12Gy)存在双峰,其他剂量组双峰消失,且中大剂量组(6Gy, 8Gy, 10Gy)波数蓝移 $3\sim 7\text{ cm}^{-1}$, 强度变化不明显。蛋白质主链中由骨架 $\text{C}-\text{N}$ 引起的振动谱带位于 1114 cm^{-1} 处,对照组中该谱带较明显,但在各剂量组中却消失了,这主要是因为 X 射线提供能量使 $\text{C}-\text{N}$ 键断裂,破坏了该结构。

侧链构象中, 554 cm^{-1} , 581 cm^{-1} , 882 cm^{-1} , 1342 cm^{-1} 谱带源于色氨酸的吡啶环振动^[10]。其中 554 cm^{-1} 谱带在各剂量组中强度普遍增强,3Gy 剂量组更是增强至对照组的 8.6 倍,且峰位蓝移 10 cm^{-1} ; 581 cm^{-1} , 882 cm^{-1} , 1342 cm^{-1} 谱带频移不明显, 882 cm^{-1} 谱带施加 X 射线辐照后仅在 6Gy, 8Gy 有该峰出现。酪氨酸的对羟苯基环的环平面外弯曲振动引起的 855 cm^{-1} 谱峰在各剂量组中也基本消失。 1004 cm^{-1} 源于苯丙氨酸的单基取代苯基环的振动^[11], 谱线强,半宽小,且不易改变,施加辐照后各剂量组该谱线基本上没有频移,可作为内标。

4.2 核酸结构谱带

核酸对应的谱带主要是 DNA 的 2 个磷酸骨架峰(785 cm^{-1} , 1084 cm^{-1})^[12,13]。 785 cm^{-1} 处的拉曼峰源于磷酸二酯键($\text{O}-\text{P}-\text{O}$)的对称伸缩振动, X 射线辐照后频移不明显,除 12Gy 外峰值强度均有

增加,其中 10Gy 增至对照组的 4.45 倍,这表明 X 射线作用使核酸中形成更多的 $\nu_s(\text{O}-\text{P}-\text{O})$ 。源于磷酸二酯键($\text{O}=\text{P}=\text{O}$)的对称弯曲振动的 1084 cm^{-1} 谱带,辐照组蓝移 $3\sim 8\text{ cm}^{-1}$, 可能是 X 射线提供能量打断了 $\text{P}=\text{O}$ 双键,使 $\text{O}=\text{P}=\text{O}$ 断裂为 $\text{O}-\text{P}=\text{O}$ 或 $\text{O}-\text{P}-\text{O}$ 结构。

脱氧核糖 Dr 引起的振动谱带在 895 cm^{-1} , 937 cm^{-1} 处。辐照 X 射线后, 895 cm^{-1} 谱带只有 8Gy 组有峰,强度基本未变化,无频移; 937 cm^{-1} 谱带只有 12Gy 组有峰,峰强变小,且蓝移 4 cm^{-1} 。

4.3 脂类结构谱带

光谱中 1449 cm^{-1} 的拉曼峰是类脂中 CH_2 , CH_3 弯曲振动的贡献,通常该谱线的构象不灵敏。而在各剂量组中出现不同程度的蓝移,6Gy 组甚至增加 11 cm^{-1} , 表明 X 射线作用在一定程度上改变了该组分的结构。原因在于不同剂量的射线作用使该脂酰基链骨架发生了断裂或关联,从而使谱线出现较大幅度的蓝移。

1523 cm^{-1} 谱带归属于膜结合 β -胡萝卜素的 $\text{C}=\text{C}$ 振动。对照组出现 1523 cm^{-1} 谱线,而在各剂量组中仅在 6Gy 组出现该谱带,且峰位相同,强度有所降低。膜结合 β -胡萝卜素的强度随细胞膜中胆固醇与磷脂的比例的增加而下降^[14]。X 射线作用使膜脂结构遭到破坏, β -胡萝卜素的 $\text{C}=\text{C}$ 共轭双键被氧化,含量减少甚至消失;而对于 6Gy 组该谱带的重现,则不仅与膜脂结构受到破坏有关,还与 6Gy 剂量时抑癌基因激活导致该剂量组内部各组分的含量明显增加有关,脂类绝对含量增加,使 β -胡萝卜素对应谱线重新出现。

5 结论

EC9706 细胞经不同剂量的 X 射线辐照后,与对照组相比较,散射光谱发生明显变化。

剂量组的谱带频移较明显,如 DNA 中的磷酸二酯键弯曲伸缩振动 1084 cm^{-1} 谱带,施加辐照后蓝移 $3\sim 8\text{ cm}^{-1}$; 脂类中 CH_2 、 CH_3 弯曲振动谱带 1449 cm^{-1} 在各剂量组中出现不同程度的蓝移。

对照组存在该谱带,但在某些剂量组中消失,如蛋白质主链中 $\text{C}-\text{N}$ 骨架振动引起的 1114 cm^{-1} 谱带在射线辐照后消失; DNA 中脱氧核糖引起的振动谱带 895 cm^{-1} 只存在于 8Gy 组, 937 cm^{-1} 谱带只存在于 12Gy 组; 膜脂中膜结合 β -胡萝卜素的 $\text{C}=\text{C}$ 振动谱带 1523 cm^{-1} 仅存在于 6Gy 组。

对照组中不存在该谱带,但在某些剂量组中出

现,如蛋白质主链中的酰胺Ⅲ带在中小剂量组光谱中出现了 1253 cm^{-1} , 1318 cm^{-1} 谱带。

各 X 射线剂量组拉曼光谱出现不同程度的变化,充分表明 X 射线辐照使 EC9706 细胞内部成分的构象和含量发生改变。当然,还需深入研究不同剂量的 X 射线对 EC9706 细胞的辐射损伤机制,以便寻找 EC9706 细胞的最佳 X 射线辐照剂量。

参 考 文 献

- 1 Yang Junyi, Ma Hongliang, Lu Bo *et al.*. Raman spectroscopy study of phase transformation of TiO_2 rutile single crystal induced by infrared femtosecond laser[J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(10):1909~1912
杨俊毅,马洪良,鲁波等.飞秒激光诱导二氧化钛金红石单晶相变的拉曼光谱研究[J].*光学学报*,2007,**27**(10):1909~1912
- 2 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,梁会琴等.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
- 3 Christopher J. Frank, Richard L. McCreery. Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues[J]. *Anal. Chem.*, 1995, **67**:777~783
- 4 D. C. B. Redd, Z. C. Feng, K. T. Yue *et al.*. Raman spectroscopic characterization of human breast tissues: implications for breast cancer diagnosis[J]. *Appl. Spectrosc.*, 1993, **47**:787~791
- 5 C. H. Liu, B. B. Das, W. L. Sha Glassman *et al.*. Raman, fluorescence and time-resolved light scattering as optical diagnostic techniques to separate diseased and normal biomedical media[J]. *J. Photochem. Photobiol. B; Biol.*, 1992, **16**(2):

187~209

- 6 R. Rigas, S. Morgello, I. S. Goldman *et al.*. Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**(20):8140~8144
- 7 Basil Rigas, Patrick T. T. Wong. Human colon adenocarcinoma cell lines display infrared spectroscopic features of malignant colon tissues[J]. *Cancer Res.*, 1992, **52**: 84~88
- 8 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,孟耀勇等.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
- 9 S. R. Hawi, W. B. Campbell, A. Kajdacsy-Balla *et al.*. Characterization of normal and malignant human hepatocytes by Raman microspectroscopy[J]. *Cancer Letters*, 1996, **110**(1-2): 35~40
- 10 Xu Yiming. Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology[M]. Beijing: Chemistry Industry Press, 2005. 13.
许以明.拉曼光谱在结构生物学中的应用[M].北京:化学工业出版社,2005.13
- 11 D. Baretino, M. M. Vivanco Ruiz, H. G. Stunnenberg. Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor[J]. *EMBO J.*, 1994, **13**(13):3039~3049
- 12 R. Savoie, J. J. Jutier, S. Alex *et al.*. Laser Raman spectra of calf thymus chromatin and its constituents[J]. *Biophys. J.*, 1985, **47**:451~459
- 13 G. J. Puppels, H. S. P. Garritsen, G. M. J. Segers-Nolten *et al.*. Raman microspectroscopic approach to the study of human granulocytes[J]. *Biophys. J.*, 1991, **60**:1046~1056
- 14 S. P. Verma, D. F. Wallach. Carotenoids as Raman-active probes of erythrocyte membrane structure[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975, **401**(2):168~176