

文章编号: 0258-7025(2010)02-0605-04

结直肠癌组织中脂类伸缩振动的拉曼光谱

高泽红¹ 于晶功² 刘福祥³ 胡 波² Michael Guiver⁴

¹ 大连大学生物工程学院, 辽宁 大连 116622

² 大连大学附属医院病理科, 辽宁 大连 116021

³ 大连大学机械学院, 辽宁 大连 116622

⁴ Institute for Chemical Process and Environmental Technology,

National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, K1A 0R6, Canada

摘要 为了探索脂类分子结构的变化与细胞癌变的关系,应用共聚焦显微拉曼光谱系统,检测结直肠癌组织及邻近正常组织的拉曼光谱,得到归属于脂类 CH_2 对称伸缩振动在 2857 cm^{-1} 和反对称伸缩振动在 2891 cm^{-1} 的拉曼峰以及归属于脂类和蛋白 C—H 伸缩振动在 2938 cm^{-1} 的拉曼峰。实验结果显示,结直肠癌组织和邻近正常组织的拉曼光谱存在以下显著的差异:1) 与正常组织相比,结直肠癌组织中位于 2857 cm^{-1} 和 2891 cm^{-1} 的拉曼峰强度相对较弱,而 2938 cm^{-1} 拉曼峰的强度相对较强。2) 结直肠癌组织中在 2891 cm^{-1} 和 2857 cm^{-1} 的拉曼峰强度比值 I_{2891}/I_{2857} 小于正常组织的比值。用 SPSS16.0 统计学软件中平均值之间的比较功能计算出正常组织的 I_{2891}/I_{2857} 平均值为 2.21,癌变组织的 I_{2891}/I_{2857} 平均值为 1.69。研究结果表明,当正常细胞转变为癌细胞时,脂类分子的侧向堆积程度下降,细胞膜流动性增加,脂类与蛋白的相互作用增强,揭示了脂类分子伸缩振动的拉曼光谱与细胞癌变的关系。

关键词 光谱学;拉曼光谱;结直肠组织;脂类;癌症

中图分类号 O657.37;R318.51 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20103702.0605

Micro-Raman Spectra for Lipids C—H in Colorectal Tissue

Gao Zehong¹ Yu Jingong² Liu Fuxiang³ Hu Bo² Michael Guiver⁴

¹ College of Biological Engineering, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China

² Pathology Department, Dalian University Hospital, Dalian, Liaoning 116021, China

³ College of Mechanics, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China

⁴ Institute for Chemical Process and Environmental Technology,

National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, K1A 0R6, Canada

Abstract The purpose of this study is to investigate a relationship between the structure of lipid and colorectal carcinogenesis at the molecular level. Colorectal cancer specimens and adjacent normal tissues were measured using confocal Raman microscopy system. The bands at 2857 cm^{-1} and 2891 cm^{-1} originate from CH_2 symmetric and asymmetric stretching vibrations, respectively. The band at 2938 cm^{-1} arises from symmetric C—H stretching vibrations. The results show that there are prominent differences between colorectal cancer specimens and adjacent normal tissues in Raman spectroscopy: 1) The intensity of the bands of the cancer tissue spectrum at 2857 cm^{-1} and 2891 cm^{-1} are reduced compared with those of the normal spectra. The relative intensity of the band at 2938 cm^{-1} of lipid of colorectal cancer is stronger than that in normal tissues. 2) The average ratio (I_{2891}/I_{2857}) values is reduced compared with those of the normal spectra. The values for normal and cancerous tissues are 2.21 and 1.69 by the function of ‘compare means’ of SPSS16.0 software. The research results demonstrated that the lateral packing of lipids is loosened which may result in the fluidity of lipid to be increased and the interactions of lipid and protein increase when normal cells are transformed into cancerous cells. Our data suggested there is the relationship between the stretch vibrations of lipids and colorectal carcinogenesis.

Key words spectroscopy; Raman spectra; colorectal tissue; lipid; cancer

收稿日期:2009-07-01;收到修改稿日期:2009-09-14

基金项目:国家自然科学基金(30670537)资助项目。

作者简介:高泽红(1959—),女,博士,教授,硕士生导师,主要从事激光生物医学的研究。E-mail:zehong9@yahoo.com.cn

1 引 言

结直肠癌 (colorectal cancer) 是常见的消化道恶性肿瘤, 发病率日益增加, 目前人们尚未找到其发病原因。从分子生物学的角度, 恶性肿瘤可视为基因的疾病, 是因某些染色体上的 DNA 损伤致使基因突变, 导致细胞的生长失控、缺乏分化而异常增生, 并可侵犯正常组织和器官, 最终可散布全身。一般分为 3 步: 基因突变、分子结构变化和肿块形成^[1]。因此, 检测出结直肠组织癌变过程中分子结构的变化规律对于探讨肿瘤的始发突变和肿块形成的机理意义重大。拉曼光谱由于能够检测出样品的分子构型和不同的化学键, 如 C—H, C—N, C=O, N—H 和 O—H 基团分子振动的信息^[2], 而这些基团普遍存在于所有生物分子中^[3], 因此, 应用拉曼光谱检测各种癌症是目前研究最活跃的领域之一, 它可以在分子水平反映组织、细胞的化学成分和分子结构的差异, 是一种简便灵敏的光谱分析新技术, 具有快速、准确、客观、无损等特点^[4,5]。现已应用于对乳腺、胃、皮肤、肺、子宫颈、前列腺等病变组织^[6~11]和细胞的检测并取得了重大进展^[12]。但是, 有关结直肠癌拉曼光谱研究的相对较少, Feld 等^[13]研究了正常和癌变结肠粘膜组织的光谱中在 1662, 1576, 1458 和 1340 cm^{-1} 的拉曼峰强度变化, 获得在癌变的结肠粘膜组织中核酸的含量增加和脂类的含量减少的重要结论。闫循领等^[14]研究了结肠癌病人的几种细胞中蛋白质酰胺 I 振动谱线和 CH_2 , CH_3 的变形振动模式以及在 1919, 1619, 1577, 1560 和 1548 cm^{-1} 归属于吡咯环的 C—N 呼吸振动模式的拉曼光谱强度、半峰全宽和谱线频移, 结果表明, 腺癌细胞的拉曼谱线相对较弱, 许多谱线消失, 生长在不同部位癌变细胞的荧光强度分布不同。本文选择在 2400~3400 cm^{-1} 频移范围, 检测结直肠癌组织及邻近正常组织的拉曼光谱, 研究脂类分子 C—H 伸缩振动的拉曼光谱与细胞癌变的关系。

2 材料与方法

2.1 标本的取材与处理

组织样品均由大连大学附属医院病理科提供, 78 例手术切除的结直肠癌组织和临近的正常组织来自 39 位患者, 术前征得患者同意。其中男 24 例, 女 15 例, 年龄 30~86 岁, 平均 62 岁。按照 Rehman 等^[2]报道的方法, 将结肠组织样品制备成厚度为

10 μm , 未经染色的病理切片。

2.2 共聚焦显微拉曼光谱仪

实验中使用的是 CRM 200 型共聚焦显微拉曼光谱仪。激发光源选用 177-G02 型氩离子激光器 (Spectra Physics, USA), 波长为 514.5 nm, 输出功率约为 30 mW, 由单模光纤连接到显微镜。激光通过 100 \times , 数值孔径 1.25 的显微镜物镜 (Nikon CFI achromat) 聚焦到样品上。照射在组织样品上的光斑直径大约为 1 mm, 分辨率为 2 cm^{-1} 。为了降低暗电流和热像素, 提高信噪比, 实验中用液氮冷却 CCD 数学探测器 -100 $^{\circ}\text{C}$ 。显微镜上部的 CCD 照相机 (Sony, Cambridge, MA, USA) 记录图像。

2.3 数据采集与分析

所有实验所得光谱均用 Witec 公司的 WinSpec32 专用软件统一检测处理, 再使用 Origin7.0 数据处理软件的平滑功能, 平滑原始光谱, 归一化处理后再计算光谱强度。应用 SPSS16.0 统计学软件的计算平均值和比较平均值功能分析所得数据, 得出判别正常组织与癌变组织的分界值。

3 结果与讨论

3.1 实验结果和谱图处理

在 2400~3400 cm^{-1} 频移范围内, 检测到结直肠癌和邻近正常组织样品的拉曼光谱, 每份样品不同点扫描 3 次, 共计 200 张, 以评估该技术的精确性和再现性。图 1 和图 2 分别为结直肠癌和正常组织未染色的病理切片显微图像, 图中的圆圈为探测区域。为了更清晰地比较结直肠癌组织和正常组织拉曼光谱的差异, 将二者放在同一张图中进行比较分析, 如图 3 所示。由图中可见结直肠癌组织和正常组织的拉曼光谱存在很多差异, 图中各谱线归属如表 1 所示^[2,15,16]。

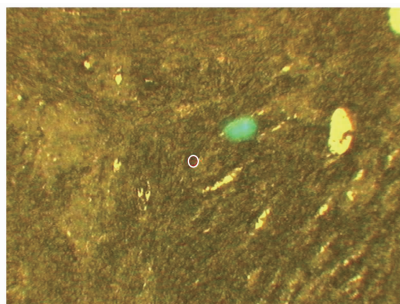


图 1 结直肠癌组织未染色的病理切片显微图像
Fig. 1 Image of the unstained biopsy of colorectal cancer tissue

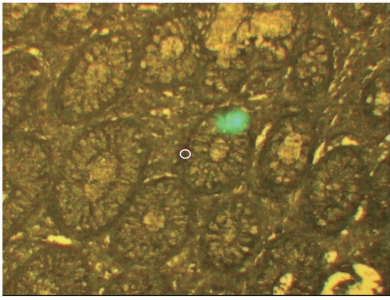


图 2 结直肠正常组织未染色的病理切片显微图像

Fig. 2 Image of the unstained biopsy of colorectal

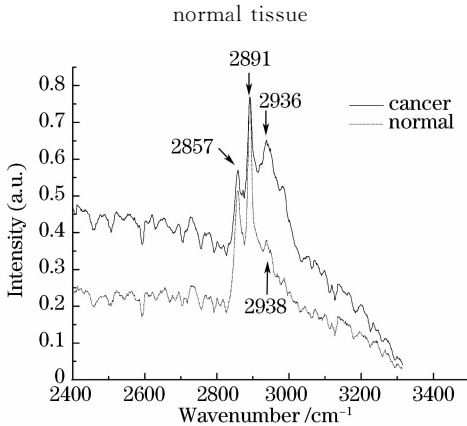


图 3 结直肠癌组织和正常组织的拉曼光谱

Fig. 3 Raman spectral of colorectal cancer and normal tissue

表 1 结直肠组织拉曼光谱各谱线的归属

Table 1 Frequency and assignment of the major vibrational modes in Raman spectra of tissue samples

Raman shift /cm ⁻¹	Assignments	
	Protein	Lipid
2857		CH ₂ sym str
2891		CH ₂ antisym str
2938	C—H str	C—H str

3.2 谱图分析

3.2.1 C—H 伸缩振动

图 3 中位于 2857 cm⁻¹ 和 2891 cm⁻¹ 拉曼峰归属于脂类 CH₂ 对称伸缩和反对称伸缩的两个带^[17], 与正常组织比较, 结直肠癌组织样品 2857 cm⁻¹ 和 2891 cm⁻¹ 两个峰相对强度下降; 而位于 2938 cm⁻¹ 拉曼峰归属于脂类和蛋白的 C—H 伸缩振动, 与正常组织比较, 在结直肠癌组织样品中强度增强, 如图 3 所示。

3.2.2 侧向相互作用

归属于脂类分子 CH₂ 对称伸缩 2857 cm⁻¹ 和反对称伸缩 2891 cm⁻¹ 的两个拉曼峰对脂类结构变化

很敏感。Anthony T. Tu 等^[16] 在研究脂质体时发现, 当温度升高时, 2891 cm⁻¹ 和 2857 cm⁻¹ 带强度比值减少, 脂类脂肪酸链的侧向堆积程度下降, 所以比较 2891 cm⁻¹ 和 2857 cm⁻¹ 带强度比值, 可作为探针用于检测脂类脂肪酸链的侧向堆积程度。侧向堆积程度的下降能导致脂类流动性的增加^[18,19]。应用 SPSS16.00 软件计算了实验测得的 2891 cm⁻¹ 与 2857 cm⁻¹ 两个拉曼峰比值的平均值, 正常组织 (I_{2891}/I_{2857}) 的平均值为 2.21, 癌组织的为 1.69, 正常组织的平均值大于癌变组织的平均值 (见表 2)。因此实验结果表明, 当正常细胞转变为癌细胞时, 脂类分子侧向堆积程度下降, 导致脂类流动性增加。

表 2 为组织样品拉曼峰比值 I_{2891}/I_{2857} 的平均值统计表, Tissue 为组织样品, Mean 为平均值, N 为样本数, Std. deviation 为标准偏差, Variance 为方差。

表 3 为情况处理累计报告, 变量总数 N 为 200, 缺失值为 0。

表 2 结直肠癌组织和正常组织 I_{2891}/I_{2857} 平均值Table 2 Means for I_{2891}/I_{2857} of normal and cancer tissues

Tissue	Mean	N	Std. deviation	Variance
Cancer	1.68940	100	0.328187	0.108
Normal	2.21410	100	0.253660	0.064
Total	1.95175	200	0.393403	0.155

表 3 情况处理累计表

Table 3 Case processing summary

Case	N	Percent /%
Included	200	100
Excluded	0	0
Total	200	100

3.2.3 脂类与蛋白相互作用

位于 2938 cm⁻¹ 拉曼峰归属于脂类和蛋白的 C—H 伸缩振动, 与正常组织比较, 在结直肠癌组织样品中强度增强, 如图 3 所示。Anthony T. Tu 等^[16] 在研究质膜的流动性时发现, 当质膜的流动性增强时, 2938 cm⁻¹ 峰值增强, 其强度反映了质膜中脂类与蛋白的相互作用程度, 峰值愈强, 表明脂类与蛋白的相互作用程度愈高。实验结果表明, 当正常细胞转变为癌细胞时, 脂类与蛋白的相互作用增强。

从能量的角度分析上述实验结果, 推测这些变化是由于正常组织转变为癌组织过程中的脂类分子获得了更高的能量, 能量分布发生了变化, 导致脂类的侧向相互堆积程度下降, 侧向间相互作用减弱, 细胞膜的流动性增强, 脂类与蛋白的相互作用增强。而这些变化可能改变细胞膜的物质运输、能量传递

和信号传导,进而引起 DNA 结构的变化,失去原有的稳定性。因此脂类分子的能量分布变化可能是细胞癌变的原因之一,该结论需进一步探讨。

4 结 论

应用共聚焦显微拉曼光谱系统,可以检测出结肠癌组织及其相邻正常组织拉曼光谱的差异性。通过分析组织中脂类分子的 C—H 伸缩振动的谱线,可以获得结肠癌组织中脂类分子的侧向堆积程度下降,细胞膜的流动性增强,脂类与蛋白的相互作用增强的信息。该方法还可用于病理存档样品的研究,这将有助于分析癌症形成过程中生物和化学方面发生的微小变化,进行手术后跟踪调查等。

参 考 文 献

- Wang Hequn, Lü Gang, Shi Zhenzhi *et al.*. Study on the pathological uterine tissues with a fiber Raman spectrometry [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, **28**(10):2338~2342
王鹤群,吕刚,史振志等. 子宫病变组织的拉曼光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, **28**(10):2338~2342
- S. Rehman, Z. Movasaghi, A. T. Tucker *et al.*. Raman spectroscopic analysis of breast cancer tissues: identifying differences between normal, invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma *in situ* of the breast tissue [J]. *J. Raman Spectrosc.*, 2007, **38**(10):1345~1351
- V. R. Kondepati, M. Keese, R. Mueller *et al.*. Application of near-infrared spectroscopy for the diagnosis of colorectal cancer in resected human tissue specimens [J]. *Vibration Spectrosc.*, 2007, **44**(2):236~242
- Yang Junyi, Ma Hongliang, Lu Bo *et al.*. Raman spectroscopy study of phase transformation of TiO₂ 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
- 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
- Yu Ge, Lü Aijun, Wang Bin *et al.*. Study on Raman linear model of human breast tissue [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, **28**(5):1091~1094
于舸,吕爱君,王斌等. 乳腺组织的拉曼光谱线性模型研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, **28**(5):1091~1094
- S. K. Teh, W. Zheng, K. Y. Ho *et al.*. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue [J]. *British Journal of Cancer*, 2008, **98**:457~465
- Zhang Guojin, J. D. Moore, R. C. Flach *et al.*. Vibrational microscopy and imaging of skin: from single cells to intact tissue [J]. *Anal and Bioanal Chem.*, 2007, **387**(5):1591~1599
- C. Krafft, D. Codrich, G. Pelizzo *et al.*. Raman and FTIR imaging of lung tissue: Methodology for control samples [J]. *Vibration Spectrosc.*, 2008, **46**:141~149
- A. Robichaux-Viehoever, E. Kanter, H. Shappell *et al.*. Characterization of Raman spectra measured in vivo for the detection of cervical dysplasia [J]. *Applied Spectrosc.*, 2007, **61**(9):986~993
- P. Crow, N. Stone, C. A. Kendall *et al.*. The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro [J]. *BR J. Cancer*, 2003, **89**:106~108
- Zhang Guangshui, Chen Changqing, Qi Jian *et al.*. Raman spectroscopic study on EC9706 cells irradiated by X-ray with different dose [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(2):509~512
张广水,陈长青,齐健等. EC9706 细胞经不同剂量 X 射线辐照后的拉曼光谱[J]. *中国激光*, 2009, **36**(2):509~512
- M. S. Feld, R. Manoharan, J. Salenius *et al.*. Detection and characterization of human tissue lesions with near-infrared Raman spectroscopy [C]. *SPIE*, 1995, **2388**(2):99~105
- Yan Xunling, Wang Qiuguo, Dong Ruixin *et al.*. Raman spectra of several cells from colon patients [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2003, **23**(6):1129~1131
闫循领,王秋国,董瑞新等. 乳腺癌病人单个细胞的 Raman 光谱[J]. *光谱学与光谱分析*, 2003, **23**(6):1129~1131
- Z. Movasaghi, S. Rehman, I. U. Rehman. Raman spectroscopy of biological tissues [J]. *Applied Spectrosc. Rev.*, 2007, **42**(5):493~541
- Anthony T. Tu. Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications [M]. Wiley J, New York, 1982. 187~233
- Xu Yiming. Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology[M]. Beijing: Chemistry Industry Press, 2005. 13
许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 13
- L. Le Moyec, R. Tatoud, A. Degorges *et al.*. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy reveals cellular lipids involved in resistance to adriamycin and taxol by the K562 leukemia cell line [J]. *Cancer Res.*, 1996, **56**:3461~3467
- R. Callaghan, A. Stafford, R. M. Epan. Increased accumulation of drugs in a multidrug resistant cell line by alteration of membrane biophysical properties [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, **1175**(3):277~282