

光动力作用诱导人宫颈癌细胞 HeLa 凋亡的 红外光谱分析

刘婉华¹ 刘 健²

(¹郑州大学物理工程学院,河南 郑州 450001; ²郑州大学信息工程学院,河南 郑州 450001)

摘要 研究光动力作用诱导人宫颈癌细胞 HeLa 凋亡的分子机制。利用傅里叶变换红外光谱(FTIR),分析光动力作用后,细胞中的核酸、蛋白质、脂类的谱图变化。结果显示,与对照组相比,表征核酸的 3 条谱线 972,1083 和 1241 cm^{-1} ,峰强减小,峰位发生位移;表征脂质的 2923 cm^{-1} 和 2957 cm^{-1} 峰,波数增加,峰强度明显减弱;蛋白质二级结构中,无规卷曲和 β 转角的内容大幅上升, α 螺旋和 β 折叠含量减少。实验结果表明,光动力作用使核酸、蛋白质、脂类受到损伤,从而诱导肿瘤细胞凋亡。

关键词 光动力疗法; 傅里叶变换红外光谱; 宫颈癌细胞 HeLa; 凋亡

中图分类号 R730.57; O657.33

OCIS 300.0300 170.0170

文献标识码 A

Infrared Spectroscopy Study on Apoptosis of Human Cervix Cancer Cells Induced by Photodynamic Therapy

Liu Wanhua¹ Liu Jian²

(¹ School of Physics Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China
² School of Information Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract The molecular mechanism of apoptosis induced by photodynamic therapy on human cervix cancer cells (HeLa) was studied. The method was to analyze the changes in FTIR spectrum of nucleic acids, proteins and lipids after photodynamic therapy. Compared with contrast group, the result shows that the peak intensity of the three spectrum lines (972, 1083 and 1241 cm^{-1}) representing nucleic acids decreases and the peak position shifts; the peak wave number of the spectrum lines (2923 cm^{-1} and 2957 cm^{-1}) representing lipids increases and the peak intensity decreases noticeably; on the secondary structure of protein, the content of random coil and β turn increases dramatically and the content of α helix and β sheet decreases. It is concluded that photodynamic therapy leads to the damages of nucleic acids, proteins and lipids, as a result, inducing cancer cells apoptosis.

Key words photodynamic therapy; Fourier transform infrared spectrum; human cervix cancer cells; apoptosis

1 引 言

傅里叶变换红外光谱(FTIR)主要研究分子的振动光谱和转动光谱,其谱线的频率和强度可以反映各种基团的振动情况,从而可以用于了解核酸、蛋白质、脂类等生物大分子的结构。当生物大分子在细胞内的含量、构型、构象变化时,谱线频率和强度会发生相应的改变,因此可以通过谱线的变化,得到所研究大分子或组织的变化和环境对生物组织的影响。目前,利用去卷积、二阶导数、曲线拟合等技术,还可将重叠谱带分开,从而获取原始光谱中隐含的生物大分子结构和含量的信息。FTIR的特点是扫描速度快、分辨率高、信噪比高、测定光谱范围宽,在分子生物学和临床医学研究领域有着广泛的应用。光动力学疗法(PDT)的基础是生物光动力敏化作用,光敏化反应过程中会产生单态氧($^1\text{O}_2$)和超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)等活性氧物质(ROS)。这些活性氧物质能高效氧化生物分子,与不饱和脂肪酸、蛋白质、核酸等反应而产生损

收稿日期: 2010-02-09; **收到修改稿日期:** 2010-03-25

基金项目: 河南省自然科学基金(2010A180022)和河南省科技攻关项目(062441052)资助课题。

作者简介: 刘婉华(1963—),副教授,主要从事激光生物医学和光谱分析等方面的研究。E-mail: zzdshwl@yahoo.com.cn

伤效应,导致细胞凋亡或死亡。

有关光动力杀伤肿瘤细胞作用机理,不少学者在分子水平上从不同的角度进行了研究,并取得了有价值的进展,但仍有不少问题有待深入研究和解决。本文用傅里叶变换红外光谱技术,通过光动力作用人宫颈癌细胞 HeLa 后红外光谱的变化,讨论光敏化过程中,核酸、蛋白质、脂类结构和含量的改变,分析光动力作用对生物分子微观结构的影响,从而对光动力敏化损伤肿瘤细胞机制有更本质的了解。

2 材料和方法

2.1 仪器和材料

仪器:CO₂细胞培养箱;德国 CHRIST 冰冻干燥机,型号:ALPHA1-2LD;美国 Nicolet IR200 傅里叶变换红外光谱仪(由郑州大学化工学院提供);光敏剂激发光源 He-Ne 激光器,波长 632.8 nm,输出功率 0~30 mW;Olympus 公司 IX-70 倒置荧光显微镜。材料:光敏剂血卟啉衍生物(HpD),购自北京制药工业研究所;人宫颈癌细胞 HeLa,购于中国医学科学院上海细胞库;质量分数为 10%的胎牛血清 RPMI-1640 培养液,购自美国 GIBCO 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞及其培养

人宫颈癌细胞 HeLa 培养于质量分数为 10%胎牛血清(加双抗)的 RPMI-1640 培养液中,置于 CO₂ 培养箱中培养,培养条件为 37 °C,体积分数为 5%CO₂ 和饱和湿度,单层贴壁生长,取对数生长期细胞进行实验。

2.2.2 HeLa 细胞的 PDT 处理

将 HeLa 细胞按分子浓度 10⁵/mL 制成单细胞悬液,接种于培养板中,实验分为对照组(不加光敏剂,不照光)和光动力组,每组 5 个复孔。将培养板放入 CO₂ 培养箱中培养 24 h,光动力组加入质量浓度为 5 μg/mL 的光敏剂 HpD,在 CO₂ 培养箱中培养 6 h 后,用 He-Ne 激光垂直照射培养板,光剂量为 10 J/cm²。继续在 CO₂ 培养箱中培养 6 h,收集细胞。将各组细胞分为两部分,一部分用于荧光染色,进行细胞形态学变化观察,另一部分用于红外光谱的采集。

2.2.3 红外光谱的采集方法

将细胞制成溴化钾压片,放置于红外光谱仪中进行检测。红外光谱参数设定:光谱扫描范围为 800~4000 cm⁻¹,分辨率为 4 cm⁻¹,扫描累加次数为 128 次。实验所得光谱均用 Nicolet 公司的 Omnic 5.0 专用软件处理(包括消除水峰,平滑曲线和基线校准等步骤)。蛋白质酰胺 I 带采用 Origin 7.5 软件进行去卷积、二阶导数处理,确定重叠峰个数、峰位置。用 Origin 7.5 的 Peak Fitting 插件,对酰胺 I 带进行曲线拟合。根据各子峰占整个酰胺 I 带面积的比例计算各二级结构的含量。

2.2.4 荧光染色

将细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,加入质量分数为 4%的多聚甲醛固定 15 min,再用 PBS 漂洗 2 次,加入 5 mol/mL 的 Hoechst33258 染色液,染色 5 min,甘油 PBS 封片,用于倒置荧光显微镜观察。

3 结果与讨论

3.1 荧光染色观察 PDT 对 HeLa 细胞凋亡的影响

HeLa 细胞经 Hoechst33258 染色后在荧光显微镜下观察,结果显示对照组细胞饱满,反光性强,细胞核染色均匀,形态完整。光动力组大部分细胞体积缩小,细胞变形、皱缩,反光性差,染色质浓缩边集,可见凋亡小体,表现凋亡的典型特征。

3.2 红外光谱分析和讨论

图 1 为人宫颈癌细胞 HeLa 在 800~4000 cm⁻¹ 范围的 FTIR 光谱图。从 FTIR 光谱结果显示,光动力损伤后,对照组和光动力组的谱线存在明显的差异。核酸、蛋白质和脂类的有关特征峰,发生了不同层度的频移,峰强度大部分下降,说明光动力作用造成核酸、蛋白质和脂类损伤。HeLa 细胞的 FTIR 谱主要吸收谱带归属见表 1^[1~3]。表中 str 为伸缩振动;Amide 为酰胺;PO₂⁻ 为磷酸离子;ν_s 为对称伸缩;ν_{as} 为反对称伸

缩； δ 为弯曲振动。

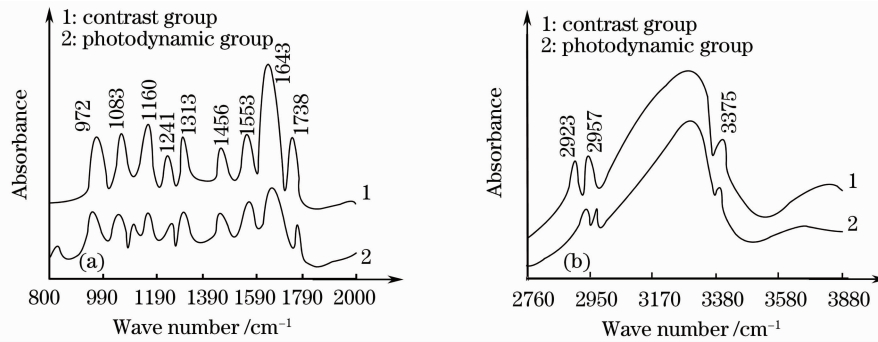


图 1 不同波段的人宫颈癌 HeLa 红外光谱图

Fig. 1 FTIR spectrum of human cervix cancer cells at different wavelength ranges

表 1 人宫颈癌细胞 HeLa 红外光谱特征峰及归属

Table 1 Characteristic bands in FTIR spectrum and assignments of human cervix cancer cells

Wave number/cm ⁻¹	Assignment	Wave number /cm ⁻¹	Assignment
972	O—P—O str	1738	C—O str
1083	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	2853	$\nu_s(\text{CH}_2)$
1241	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$	2876	$\nu_s(\text{CH}_3)$
1313	Amide III	2923	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$
1456	δ C—H	2957	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
1548	Amide II	3281	N—H str
1643	Amide I		

3.2.1 核酸谱带的比较分析

FTIR 光谱中,反映核酸信息的主要有 972,1083 和 1241 cm⁻¹ 3 条谱线。972 cm⁻¹ 谱带起因于磷酸化蛋白和核酸的磷酸单酯二价阴离子的对称伸缩振动,细胞中核酸含量的改变可导致该谱带强度的变化。1083 cm⁻¹ 和 1241 cm⁻¹ 分别归属为磷酸二酯基团的对称伸缩振动和反对称伸缩振动。如图 1(a) 显示,光敏作用后,972,1083 和 1241 cm⁻¹ 峰向高波数移动。已有实验证实,PO₂⁻ 谱带可以反映核酸骨架上磷酸二酯基团结构的变化,在完全无氢键时,磷酸二酯基团的反对称伸缩振动在 1260 cm⁻¹ 处,在完全氢键化后在 1240 cm⁻¹ 处^[4]。1241 cm⁻¹ 峰向高波数移动,表明磷酸二酯基团中氧原子形成氢键的程度减弱了,氢键程度的降低使细胞的核酸骨架从无序趋向于有序。光敏化作用起到了抑制癌细胞突变和异构化的作用。从谱线也可以看到,3 条谱线强度明显减小。已知谱线的强度是细胞中 DNA 含量的重要指标之一^[5],癌变时细胞无限增殖,DNA 大量复制,使细胞中的 DNA 含量增加,谱峰强度也增加。光敏损伤后 3 条谱峰强度降低,表明细胞中 DNA 含量降低,癌细胞 DNA 复制能力被抑制,细胞产生凋亡。

3.2.2 脂类谱带的比较分析

谱带 2853 cm⁻¹ 和 2923 cm⁻¹ 属于磷脂脂质中 CH₂ 基团的对称伸缩振动和反对称伸缩振动,而谱带 2876 cm⁻¹ 和 2957 cm⁻¹ 属于磷脂脂质中 CH₃ 基团的对称伸缩振动和反对称伸缩振动。与对照组相比,光敏损伤后,各谱线峰位向高波数移动 5~8 cm⁻¹。CH₂ 和 CH₃ 基团伸缩振动谱带反映膜脂分子内碳氢链构象的无序化程度^[6],谱峰波数增加,表明磷脂碳氢链扭式构型增多。1456 cm⁻¹ 谱带为脂类分子的 CH₂ 弯曲振动,它可以反映膜脂疏水相区磷脂分子间的排列状态^[7],光敏作用后,峰位向高波数移动,表明细胞膜分子结构中碳氢链无序化程度加强。1738 cm⁻¹ 属于细胞膜磷脂结构中 C=O 基团的伸缩振动,峰位向高波数移动,表明磷脂的构象发生了改变,磷脂分子碳氢链处于凝胶态,碳氢链间相互作用增强^[8]。光敏损伤使各峰强度也明显加强,说明光动力作用后脂类成分含量增加。光敏作用结果导致膜上多种功能基团结构受损,细胞膜完整性和流动性下降。其原因可能是光动力作用所产生的单线态氧、羟自由基等与细胞膜磷脂发生氧化反应,破坏了细胞膜结构。已有实验证实,细胞膜磷脂参与细胞凋亡的发生^[9]。本实验发现光动力作用会引起细胞膜磷脂结构的改变,这可能是光动力诱导细胞凋亡的分子机制之一。

3.2.3 蛋白质二级结构的谱带比较分析

蛋白质的二级结构是指蛋白质中多肽链的规则排布,由主链极性基团的氢键形成。FTIR 光谱中的酰胺 I 带常用来分析蛋白质的二级结构。因为蛋白质的二级结构是由代表羰基伸缩振动的几个子带组成,包含有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角等谱带,所以在这个区域,各组分的谱带通常相互叠加在一起,因此酰胺 I 带是一个宽峰,要解析酰胺 I 带的各子带,必须利用去卷积、二阶导数等数学方法使其分开。酰胺 I 带去卷积谱包含 9~11 个子峰,由二阶导数谱可确定各子峰的精确峰位,做曲线拟合处理可求出各子峰面积,得到二级结构相对含量(峰面积百分数)。图 2 为结合去卷积、二阶导数谱对原谱进行曲线拟合得到的拟合谱图。蛋白质二级结构的指认和平均相对百分含量值见表 2。

表 2 蛋白质二级结构的指认和百分含量的变化

Table 2 Changes of fractional areas(%) of the secondary structure and assignments

	α -helix		β -sheet		Random coil	β -turn	
Wave number / cm^{-1}	1654	1609	1621	1631	1683	1642	1679
Contrast	19.4	8.2	25.3	9.8	10.6	14.2	12.5
Photodynamic	17.6	7.1	23.5	8.2	9.5	19.3	14.8

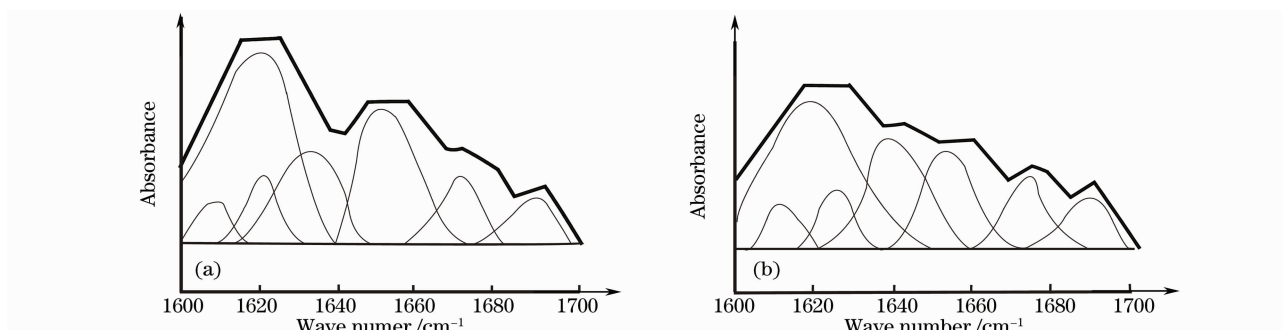


图 2 HeLa 细胞蛋白质酰胺 I 带拟合谱图。(a)对照组,(b)光动力组

Fig. 2 Curve-fitting of amide I band of protein in HeLa cells. (a) contrast group, (b) photodynamic group

本实验在 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 区域,对酰胺 I 带进行去卷积、二阶导数处理后可以得到较强 7 个子峰,其谱峰可作出明确的指认, 1609 cm^{-1} 归属于分子间反平行 β 折叠; 1621 cm^{-1} 和 1683 cm^{-1} 归属于分子间平行 β 折叠; 1631 cm^{-1} 归属于分子内 β 折叠; 1654 cm^{-1} 代表 α 螺旋; 1679 cm^{-1} 代表 β 转角; 1642 cm^{-1} 代表无规卷曲。光动力作用后,与对照组相比,属于 α 螺旋 1654 cm^{-1} 峰,频移到 1659 cm^{-1} 。 β 折叠的 4 条谱 $1621, 1683, 1608$ 和 1631 cm^{-1} , 峰位有 $2\sim 5\text{ cm}^{-1}$ 的频移。由表 2 可知,光敏损伤后,蛋白质的 α 螺旋含量减少 9.2% 、 β 折叠含量减少 10.3% ,而无规卷曲和 β 转角的含量上升,分别为 35.9% 和 18.4% 。实验结果表明,光动力作用使无规卷曲和 β 转角的含量大幅上升,提示无规卷曲和转角结构增多,蛋白质构像趋于松散、无序性增加,由此导致癌细胞中蛋白质变性^[10]。光动力作用使 α 螺旋和 β 折叠含量减少,可能的原因是羟自由基的强氧化性,破坏了形成 α 螺旋和 β 折叠的链内和链间氢键体系,使 α 螺旋和 β 折叠的有序结构遭到破坏^[11],从而使两者含量大大降低。光动力对蛋白质二级结构造成明显损伤,使蛋白质合成发生障碍,由此导致细胞凋亡。

4 结 论

研究光动力作用 HeLa 细胞的傅里叶红外光谱,通过对核酸、蛋白质、脂类大分子的谱图分析,从分子水平了解光动力诱导肿瘤细胞凋亡的机制。研究表明,HeLa 细胞光敏损伤后,细胞的核酸、蛋白质、脂类构型、构像都发生了改变,具体表现为:

1) 代表核酸的 3 条谱线 $972, 1083$ 和 1241 cm^{-1} 峰强减小、峰位位移,表明 DNA 受到损伤。DNA 是储存生物遗传信息的重要大分子,也是光动力损伤作用的主要靶分子,损伤的 DNA 可活化细胞的凋亡机制,使过度增殖的细胞和已经发生突变的细胞经凋亡途径而死亡。

2) 代表脂质 CH_2 和 CH_3 基团伸缩振动谱带 $2853, 2923$ 和 $2876, 2957\text{ cm}^{-1}$, 波数增加,峰强度明显减

弱,表明膜脂分子内碳氢链无序化程度加强,磷脂的构像发生了改变。原因可能是活性氧分子与细胞膜磷脂中多价不饱和脂肪酸发生过氧化反应,产生过氧化物,导致细胞膜磷脂结构的改变,使细胞膜完整性和流动性下降。研究表明细胞发生凋亡时,细胞膜磷脂参与了其过程。

3) 对蛋白质的损伤研究。本文主要分析酰胺 I 带,经过去卷积、二阶导数和曲线拟合,得到较强 7 个子峰。结果显示光动力作用使无规卷曲和 β 转角的含量大幅上升、 α 螺旋和 β 折叠含量减少。提示光动力产生的活性氧物质与蛋白质中的氨基酸残基发生作用,使蛋白质上的氨基酸被氧化,蛋白质内部及分子间产生异常交联,蛋白质发生合成障碍^[12],由此诱导细胞凋亡。

参 考 文 献

- 1 Shi Jingsen, Wang Jiansheng, Xu Yizhuang *et al.*. FTIR study gallbladder cancer tissues [J]. *National Medical Journal of China*, 2005, **85**(32): 2287~2288
石景森,王健生,徐怡庄等. 胆囊癌组织的红外光谱研究 [J]. *中华医学杂志*, 2005, **85**(32): 2287~2288
- 2 Li Weixiu, Zheng Quanqing, Wang Ping *et al.*. Fourier transform infrared spectroscopy study on normal and malignant tissues of cervix [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**(10): 1833~1837
李炜修,郑全庆,王平. 宫颈正常与宫颈癌组织傅里叶变换红外光谱的初步研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, **26**(10): 1833~1837
- 3 Li Qingbo, Sun Xuejun, Zhang Yuanfu *et al.*. New detection method of gastric endoscope samples using Fourier transform mid-spectroscopy [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2004, **25**(9): 1624~1627
李庆波,孙学军,张元福等. 傅里叶变换中红外光谱技术用于人体胃镜样品检测的新方法 [J]. *高等化学学报*, 2004, **25**(9): 1624~1627
- 4 Jitsuo Usuda, Song-mao Chiu, Kashif Azizuddin *et al.*. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO; dependence on Bax [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, **76**(2): 217~223
- 5 Wang Jiansheng, Wu Wenan, Zhang Jia *et al.*. FTIR spectroscopic study on protein and lipid in membrane of gallbladder cancer and cholecystitis [J]. *Modern Oncology*, 2009, **17**(3): 403~405
王健生,吴文安,张佳等. 胆囊癌及炎性组织细胞膜中蛋白质和脂质变化的 FTIR 研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2009, **17**(3): 403~405
- 6 Huang Huifang, Chen Yuanzhong, Wu Yong. ZnPcS₂P₂-based photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in K562 cells [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005, **37**(7): 488~494
- 7 Angeles Juarranz, Jesus Espada, Juan Carlos Stockert *et al.*. Photodamage induced by Zinc (II)-phthalocyanine to microtubules, actin, α -actinin and keratin of HeLa cells [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2001, **73**(3): 283~289
- 8 Lu Feng, Lu Guohao, Cao Yongbing *et al.*. Effect of several Chinese herbal medicines on SMMC-7721 liver cancer cells by FTIR spectroscopy [J]. *Academic J. Second Military Medical University*, 2004, **25**(10): 1100~1103
陆峰,陆国浩,曹永兵等. FTIR 方法研究若干味中药对 SMMC-7721 肝癌细胞的作用 [J]. *第二军医大学学报*, 2004, **25**(10): 1100~1103
- 9 Du Junkai, Shi Jingsen, Xu Yizhuang *et al.*. FTIR spectroscopic study on carcinoma cells [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, **28**(1): 51~54
杜俊凯,石景森,徐怡庄等. 傅里叶变换红外光谱用于肿瘤细胞株检测的研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, **28**(1): 51~54
- 10 Irene E. Kochevar, Mary C. Lynch, Shougang Zhuang *et al.*. Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2000, **72**(4): 548~553
- 11 David Kessel, J. John, Jr. Reiners. Apoptotic response to photodynamic therapy versus the Bcl-2 antagonist HA14-1 [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, **76**(3): 314~319
- 12 Deng Hua, Song Zhanjun, Wang Dewen *et al.*. Study on the membrane protein conformational changes and mechanisms of myocardial cell irradiated by pulse microwave [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**(8): 1437~1440
邓桦,宋占军,王德文等. 脉冲微波辐照影响心肌细胞膜蛋白构像及其机制的研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, **26**(8): 1437~1440