

单个肝癌细胞的拉曼成像研究

孟令晶^{1,2} 纪晓露¹ 李自达^{1,2} 刘军贤¹ 李 蕾³ 姚辉璐²

(¹广西师范大学物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004
²广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530003; ³广西医科大学研究生院, 广西 南宁 530021)

摘要 应用拉曼成像技术检测单个人体肝癌细胞, 获得了单个肝癌细胞微区的拉曼光谱图谱, 同时计算出 786, 1450 和 1658 cm^{-1} 等特征峰的峰面积, 这些特征峰分别归属于 DNA, 脂类和蛋白质, 根据归一化后的数值在相应的细胞扫描位置成像, 重构出这些物质的拉曼特征峰在肝癌细胞中的分布图。结果表明, 应用这种方法可以很明确地看到 DNA, 脂类及蛋白质特征峰在细胞中的分布情况, 通过荧光染色验证了成像系统的可靠性。因此, 可以通过特征峰的成像图确定物质在细胞中的微区分布情况, 为拉曼方法检测和诊断肝癌提供了可靠的依据。

关键词 光谱学; 肝癌; 拉曼; 成像; 图像

中图分类号 O433.5⁺4 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP48.021703

Mono-Hepatocellular Carcinoma by Raman Mapping

Meng Lingjing^{1,2} Ji Xiaolu¹ Li Zida^{1,2} Liu Junxian¹ Li Lei³ Yao Huilu²

(¹ College of Physics and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China
² Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530003, China
³ College of Graduate, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract Raman mapping technique is applied to detect mono-hepatocellular carcinoma. The area of characteristic peak at 786, 1450 and 1658 cm^{-1} , which assigns to DNA, lipid and protein, is calculated. According to normalized values image in the corresponding scan location of the cells, the distribution of Raman characteristic peak of these materials in liver cell is reconstructed. The results show that, the distribution of DNA, lipid and protein is exhibited clearly by this Raman mapping system, and the reliability is validated by fluorescence staining. The micro distribution of material in the cells can be confirmed by the imaging of characteristic peak, which provides reliable evidence for Raman detection and liver cancer diagnosis.

Key words spectroscopy; hepatocellular carcinoma; Raman; mapping; image

OCIS codes 170.1530; 100.2960; 110.3010; 140.3550; 170.3880

1 引言

拉曼光谱技术可以很精确地提供细胞及组织中分子特征变化的信息^[1], 使其在临床上成为一种适合迅速诊断的有利工具^[2,3]。由于肝癌细胞的直径很大, 以往的研究主要是用两种方式进行的: 一是利用扫描方式, 设定一个区域和时间让激光连续在设定好的区域进行运动以累积方式记录光谱信号, 从而得到光谱; 二是采用在一个细胞中选择几个点来进行光谱收集, 然后把它们累加, 平均后作为该细胞的光谱^[3~5]。这两种方式都不能 100% 的反应细胞的信息量, 信息缺失严重。拉曼扫描成像就是在样品上进行逐点扫描, 收集拉曼光谱, 然后进行图像重构, 取得拉曼图像的一种方法^[6]。目前, 点扫描成像在国外已经在各个领域都得到了广泛的应用^[7~10]。但在病理学方面, 大多数都是对组织扫描成像, 对单个癌细胞的报道所见甚少。

收稿日期: 2010-11-09; **收到修改稿日期**: 2010-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(60868002, 30760278)和广西科技攻关(桂科合 10100019-22)资助课题。

作者简介: 孟令晶(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事激光拉曼光谱扫描成像系统构建与拉曼光谱分析等方面的研究。

E-mail: xiaomeng198688@163.com

导师简介: 姚辉璐(1972-), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事仪器构建及光谱分析等方面的研究。E-mail: yaohl@163.net

本文通过构建激光拉曼扫描成像系统对单个肝癌细胞扫描,然后应用扫描数据进行峰面积成像,直接得到了DNA、蛋白质和脂类等物质在癌细胞中的分布图。

2 实验材料和方法

2.1 样品来源与处理方法

人肝癌细胞(HepG-2)由广西医科大学肿瘤医院提供;改良 Eagle 培养基(DMEM)培养液、1:250 胰蛋白酶为美国 Hyclone 产品;新生牛血清为杭州四季青生物材料研究所产品;Hoechst33258 染色液为江苏海门生物技术研究所产品。人肝癌细胞生长在体积分数为 10% 新生牛血清、100 unit/mL 的青霉素、链霉素的 DMEM 培养液中,置于 37 ℃,体积分数为 5% 的 CO₂ 的培养箱中培养。定期观察,每 1~2 天换液,最后选用对数生长期细胞进行实验。加入 Hoechst33258 染色液染色 5 min,在 100 倍物镜的荧光显微镜下观察,激发光波长 350 nm,发射光波长 460 nm。

2.2 实验装置与光谱收集

拉曼成像系统实验装置是在文献[1]的激光拉曼光谱系统实验装置基础上改进而成,改进后的装置图如图 1 所示。把一束波长为 785 nm 的激光导入尼康倒置的显微镜,在第二块陷波滤波片(HNF2)后加入一对扫描透镜(SM),通过数字/模拟(D/A)转换器控制扫描透镜在 x 轴和 y 轴方向移动,使光斑精确地定位在所需要的位置。使用的是放大 100 倍的油浸物镜。光斑大小为 2 μm 。

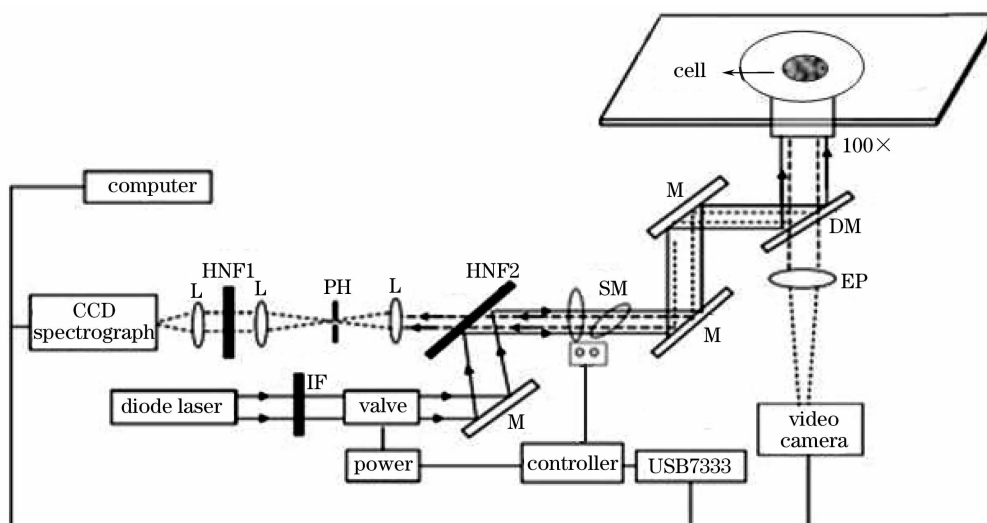


图 1 实验装置图

Fig. 1 Schematic of the experimental arrangement

取 150 μL 含肝癌细胞的混合液置于石英片样品槽内,加盖玻片密封。移动载物台找到均匀的单个肝癌细胞,由于肝癌细胞放置在样品池中会自动下沉并贴壁,所以实验中可以保证收集到的光谱是准确的,细胞扫描前后分别在细胞附近收集 3 个背景光谱。启动程序,设定光谱积分时间为 20 s,自动扫描整个样品。

2.3 拉曼逐点扫描的实现过程及数据处理

通过编程控制 D/A 转换器把计算机的数字信号转换成电压信号,然后对其放大,驱动扫描对镜移动,从而实现控制激光光斑的移动,使激光光斑精确地定位在所需要的位置。由于是使用电压信号控制光斑每次移动的距离,所以可以很精确地控制步长。另外,经多次测试,重复精度是非常高的。通过程序控制计算机的数字信号,从而控制光斑移动的幅度和时间,实现控制激光光斑每次移动的步长为 2 μm ,根据样品的大小,设定 x 轴及 y 轴方向扫描的距离,从而实现整个样品的全自动扫描。同时通过程序控制打开 WinSpec32 软件(光谱仪自带)进行光谱的收集,在程序中设定收集光谱的积分时间,并由程序控制自动根据位置对光谱命名,并保存。

自编 Visual Basic 应用程序读取 WinSpec32(光谱仪自带)光谱文件数据进行相关预处理。将每个样品的 3 个背景光谱用 17 点 Savitzky-Golay 法平滑,取平均,得到平均背景光谱;样品细胞每点的拉曼光谱则由

样品中的每点光谱减去平均背景光谱、平滑、多项式拟合基线校正后得到。

成像部分处理方法如下:将预处理后的细胞样品上每点的光谱数据读入自编程序,输入相应物质的特征峰值,计算出峰面积值后进行 min-max 归一化处理,应用归一化的结果,对应给出细胞样品上的每点的颜色值,从而重构出肝癌细胞的拉曼图像,既可得到此细胞特征峰的峰面积成像图。

3 实验结果与分析

应用上述的成像方法,分别对肝癌细胞中 DNA,脂类和蛋白质的特征谱带 786, 1450 和 1658 cm^{-1} 进行抽取、计算,然后成像。图 2(a)~(c)分别是这 3 个特征峰的峰面积在肝癌细胞中的分布情况。成像图由 224 (16 \times 14)幅谱图组成,每个微区谱图的积分时间为 20 s,一个单细胞扫描完成需要时间大约 1.5 h,波数范围在 600~1800 cm^{-1} ,扫描步长为 2 μm ,总体扫描面积为 32 $\mu\text{m}\times$ 28 μm 。

3.1 峰面积成像与谱特征

根据文献[11]报道,正常肝细胞与肝癌细胞在细胞核、脂类和蛋白质中拉曼特征峰差异很大,在 786, 1450 和 1658 cm^{-1} 特征峰的位置差异显著,所以在此分别选择这 3 个拉曼特征谱线,计算其峰面积进行成像,成像结果如图 2(a)~(c)所示。在图 2(a)中,786 cm^{-1} 的谱线归属于 DNA 骨架磷酸根对称伸缩振动,从这幅图中可以看出,这个特征峰的分布集中在细胞的中心位置,由于肝细胞在癌变后,细胞核会变大^[8],所以在图中 DNA 的分布范围也是比较大的,这与文献[8]报道相符。图 2(b)是 1450 cm^{-1} 特征峰在肝癌细胞中的分布成像图,由于 1450 cm^{-1} 归属于脂类 CH_2 或 δCH_3 振动峰,细胞膜主要是由脂类和蛋白大分子构成,1450 cm^{-1} 的分布可以看出脂类物质大量分布在细胞膜中。图 2(c)是 1658 cm^{-1} 信号特征峰在肝癌细胞中的分布情况。1658 cm^{-1} 信号峰归属于蛋白酰胺 I,表征了蛋白质在肝癌细胞中的分布情况。拉曼光谱特征峰的归属如表 1 所示^[3,12]。

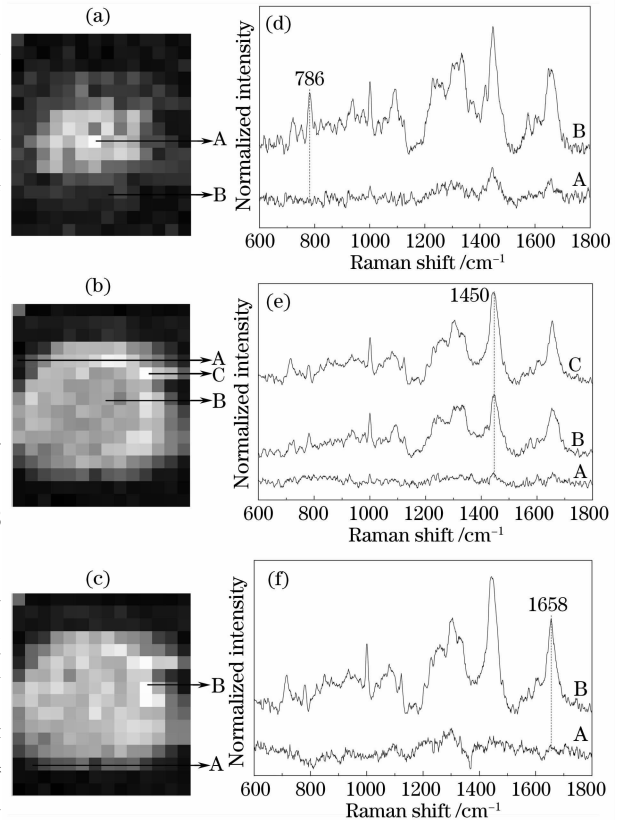


图 2 786, 1450 和 1658 cm^{-1} 峰面积成像图及图中亮点和暗点光谱

Fig. 2 Peak area images and Raman spectra of 786, 1450 and 1658 cm^{-1}

表 1 肝癌细胞拉曼光谱特征峰归属一览表

Table 1 Peak assignments for Raman spectra

Peak position / cm^{-1}	Major assignments
786	DNA: O—P—O, cytosine, uracil, thymine
938	C—C stretch backbone
1001	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine
1031	C—H in-plane bending mode of phenylalanine
1083	C—C stretch, O—P—O ⁻ stretch
1155	C—C (& C—N) stretching of proteins (also carotenoids)
1170	C—H in-plane bending mode of tyrosine
1209	Tryptophan and phenylalanine <i>n</i> (C—C6H5) mode
1258	Amide III/adenine/cytosine
1304	CH_2 deformation (lipid)/adenine, cytosine
1336	Polynucleotide chain
1450	CH_2CH_3 twisting mode of lipid
1654~1658	Amide I (C=O stretching mode of proteins, α -helix conformation)

图 2(d)~(f)光谱图是抽取在 $786, 1450$ 和 1658 cm^{-1} 拉曼特征峰峰面积在细胞上成像图中亮点和暗点的光谱,可以看出 DNA 的特征谱带 786 cm^{-1} 在图 2(a)的最亮点光谱 A 中确实清晰可见,但在暗点光谱 B 中几乎观察不到它们的存在,由此可见,亮点确实比暗点含有的 DNA 谱要多一些,而暗点处含有极少的 DNA 特征谱,基本可以反应出 DNA 的分布情况。由于 786 cm^{-1} 特征峰的峰面积相对较小,所以由于噪声引起很多成像点也呈现出暗颜色,通过光谱的比较,可以看出暗点几乎是不含有 786 cm^{-1} 特征谱的,上述问题也会得到很好的校正,校正后的成像图如图 3(a)所示,同时也说明成像的可靠性。同样地,也比较了 1450 cm^{-1} 脂类的特征峰亮点光谱 C,较亮点光谱 B 和暗点光谱 A,发现在细胞膜的部位成像点都是较亮的,说明脂类在细胞膜中的分布较多,而在细胞中分布较少。另外, 1658 cm^{-1} 是蛋白质酰胺 I 的 α 螺旋结构。通过 1658 cm^{-1} 蛋白质特征峰中亮点光谱 B 和较暗点光谱 A 比较发现,蛋白质在肝癌细胞中的分布是比较均匀的。

3.2 DNA 特征谱成像与荧光成像比较

在所有特征光谱成像中,DNA 谱具有最明确的物理意义。因为 DNA 只来源于细胞核中的核酸部分,细胞中的其他部位不会产生 DNA 谱^[13]。图 3(a)是肝癌细胞 DNA 特征谱成像图,图 3(b)是肝癌细胞的荧光图,图中亮的部分为细胞核的部分。可以看到,与 DNA 特征谱成像得到很好的对应,说明用本文构建的激光拉曼光谱逐点扫描成像系统可以很好地重构出 DNA,脂类及蛋白质特征峰在肝癌细胞中分布情况。

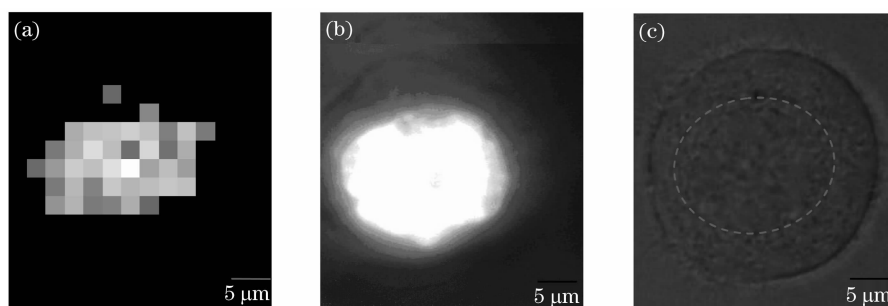


图 3 校正后的 786 cm^{-1} 特征峰成像与荧光图像比较。(a) 786 cm^{-1} 成像图,(b) 肝癌细胞荧光图,(c) 100 倍显微镜下观察到的肝癌细胞图

Fig. 3 Comparison between correcting image of 786 cm^{-1} with fluorography. (a) correcting image of 786 cm^{-1} , (b) fluorography, (c) image of mono-hepatocellular carcinoma observed by $100\times$ microscope

4 结 论

实验构建了拉曼光谱逐点扫描成像系统,全面反应出物质拉曼特征峰在单个细胞中的分布情况,对类似肝癌细胞这样的生物大细胞具有较好的针对性。表征 DNA,脂类和蛋白质的拉曼特征峰在单个肝癌细胞中的分布情况,尤其是细胞核中 DNA 特征峰的分布,基本可以体现出细胞核在细胞中的分布位置。应用荧光染色对结果验证了成像系统的可靠性。随着研究的不断深入和系统的不断改进,提高系统的空间分辨率和时间分辨率,拉曼光谱逐点扫描成像系统可以在生物学研究中发挥更广泛和更重要的作用,为医学诊断研究提供更可靠、便捷的研究手段。

参 考 文 献

- Huilu Yao, Zhanhua Tao, Min Ai *et al.*. Raman spectroscopic analysis of apoptosis of single human gastric cancer cells[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2009, **50**(2): 193~197
- J. Smith, C. Kendall, A. Sammon *et al.*. Raman spectral mapping in the assessment of axillary lymph nodes in breast cancer[J]. *Technol. Cancer. Res. Treat.*, 2003, **2**(4): 327~329
- Yang Wenpei, Yao Huilu, Zhu Miao *et al.*. Raman spectrums of mono-hepatocellular carcinoma[J]. *Laser & Infrared*, 2007, **37**(9): 824~827
- 杨文沛, 姚辉璐, 朱 淼 等. 单个肝癌细胞的拉曼光谱分析研究[J]. *激光与红外*, 2007, **37**(9): 824~827
- 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
- 5 Ximei Qian, Xianghong Peng, Dominic O. Ansari *et al.*. *In vivo* tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, **26**(1): 83~90
- 6 L. R. Lewis, H. G. M. Edwards. Handbook of Raman Spectroscopy[M]. New York: CRC Press, 2001. 191~213
- 7 Marta Larraona-Puy, Adrian Ghita, Alina Zoladek *et al.*. Development of Raman microspectroscopy for automated detection and imaging of basal cell carcinoma[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2009, **14**(5): 054031
- 8 Ting Yu, Zhenhua Ni, Chaoling Du *et al.*. Raman mapping investigation of graphene on transparent flexible substrate: the strain effect[J]. *J. Phys. Chem.*, 2008, **112**(33): 12602~12605
- 9 Slobodan Sasic, Donald A. Clark, John C. Mitchell *et al.*. A comparison of Raman chemical images produced by univariate and multivariate data processing—a simulation with an example from pharmaceutical practice [J]. *Analyst*, 2004, **129**(11): 1001~1007
- 10 S. Keren, C. Zavaleta, S. S. Gambhir *et al.*. Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy[J]. *P. Natl. Acad. Sci.*, 2008, **105**(15): 5844~5849
- 11 Zhang Weiming. Liver Cancer Cells in Laser Tweezers Raman Spectroscopy[D]. Guangxi: Guangxi Medical University, 2010
- 张维明. 肝癌细胞的激光光镊子拉曼光谱研究[D]. 广西: 广西医科大学研究生学院, 2010
- 12 Nicholas Stone, Catherine Kendall, Jenny Smith *et al.*. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers[J]. *Faraday Discuss*, 2004, **126**: 141~157
- 13 Yu Ge, Zhang Pan, Tan Enzhong *et al.*. Study of human tumor tissues by Raman imaging spectra[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(2): 295~298
- 于 舸, 张 攀, 谭恩忠. 人体肿瘤组织的拉曼光谱相关系数成像[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, **27**(2): 295~298