

糖尿病及并发症血清的表面增强拉曼光谱

韩洪文¹ 闫循领¹ 班戈¹ 李珂¹ 杨颖² 邢艳霞²

(¹聊城大学物理科学与信息工程学院, 山东 聊城 252059; ²聊城市人民医院, 山东 聊城 252000)

摘要 为了从分子水平上探讨病人血清中组织、细胞代谢产物的生化异常,利用表面增强拉曼散射技术检测了糖尿病及并发症(冠心病、青光眼和脑梗塞)病人的血清。结果表明:这几种疾病患者血清的表面增强拉曼光谱十分相似,说明这几种疾病中组织、细胞代谢产物的分子结构或含量变化相近;与正常人血清的表面增强拉曼光谱相比,存在显著的差异,特别是在这几种疾病患者血清中,谱线 725 cm^{-1} 相对强度明显增强,且增强部分来自腺嘌呤的贡献,与血糖的高低无关,说明这几种疾病患者的代谢产物中含有较高的碱基腺嘌呤,这些结果为研究糖尿病及并发症的生化机理以及临床诊断提供有力的实验依据。

关键词 光谱学; 代谢产物的生化异常; 表面增强拉曼光谱; 糖尿病及并发症; 血清; 腺嘌呤

中图分类号 O657.37 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS20092904.1122

Surface-Enhanced Raman Spectra Analysis of Serum from Diabetes Mellitus and Complication

Han Hongwen¹ Yan Xunling¹ Ban Ge¹ Li Ke¹ Yang Ying² Bing Yanxia²

¹ School of Physical Science and Information Technology, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059, China
² Liaocheng People's Hospital, Liaocheng, Shandong 252000, China

Abstract In order to study the biochemical abnormality of metabolites from tissues or cells at the molecular level, the surface enhanced Raman scattering technique was used to detect the serums from diabetes mellitus and complication (coronary disease, glaucoma and cerebral infarction). It is found that the characteristics surface-enhanced raman spectra (SERS) of serums are very similar to that from diabetes mellitus, which indicates that the changes of molecular structure or content from the metabolites of tissues or cells in these diseases are similar. The significant differences of SERS are found between normal and diseased serums. Especially, the relative intensity of the band from patients increases obviously at 725 cm^{-1} . The partial reinforcement comes from the adenines' contribution and is independent of the blood sugar level, which indicates that there exist many adenines in these serums. The results will offer the experimental basis for the biochemical study and clinical diagnosis of diabetes mellitus and complication.

Key words spectroscopy; biochemical abnormality of metabolites; surface-enhanced Raman spectroscopy; diabetes and complication; serum; adenine

1 引言

糖尿病是一种多病因的代谢疾病,伴随因胰岛素分泌不足或作用无效引起的糖、脂肪和蛋白质代

谢紊乱,可导致不同脏器的损伤、衰竭。糖尿病的慢性并发症可遍及全身各重要器官,常伴有动脉粥样硬化性心、脑血管疾病、糖尿病性肾病变和眼部病变

收稿日期: 2008-07-05; 收到修改稿日期: 2008-10-08

基金项目: 国家自然科学基金(60571062)和山东省自然科学基金(Y2004G09)资助项目

作者简介: 韩洪文(1981-), 男, 硕士研究生, 主要从事拉曼光谱方面的研究。E-mail: hongwen411@163.com

导师简介: 闫循领(1963-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事拉曼光谱方面的研究。

E-mail: yanxl207@lcu.edu.cn (通信联系人)

等。其中冠心病、脑梗塞等血管疾病与糖尿病的关系非常密切,常常如影随形,美国心脏学会甚至发出了“糖尿病就是心血管疾病”的呼声。青光眼是另一种常见的慢性并发症,它能使患者引起不可逆的视觉损害乃至失明。世界卫生组织最新一项统计显示,世界已有约 2.4 亿糖尿病患者(I 型和 II 型)。因此,探索新的、有效的、有助于早期诊断糖尿病及其并发症的技术和治疗方法已成为当今生物工程领域的研究重点。

许多光谱技术,包括显微光谱技术、分光光度技术、光波导光模光谱技术、光学相干层析技术、空间分辨漫反射技术和荧光测定技术等^[1~4]在医学的不同方面都找到了应用。和其它技术相比,拉曼光谱是一种非常有效的探测界面特性和分子间相互作用、表征表面分子吸附行为和分子结构的工具,尤其是表面增强拉曼散射(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)的发现^[5],获得了比常规拉曼谱大几万倍的增益系数,已成为灵敏度最高的研究界面效应的技术之一,最大范围地应用于研究吸附分子在表面的取向及吸附行为、吸附界面表面状态、生物大分子的界面取向及构型、构象和结构分析^[6,7]。本文利用 SERS 技术研究了糖尿病、冠心病、青光眼、糖尿病并发脑梗塞患者血清和正常人血清的拉曼光谱。

2 材料与方法

实验选取聊城市人民医院确诊为糖尿病、冠心病、青光眼、糖尿病并发脑梗塞患者血清 90 例,选取正常人的血清数 30 例作为对照组,每例病人取 4 ml 血清。用柠檬酸钠还原硝酸银,利用微波炉加热法制备银胶^[8]。

实验在 Renishaw 公司生产的 2000 型共聚焦显微拉曼光谱仪上进行,用 780 nm、功率为 25mW 的半导体激光器作为光源,仪器的分辨率为 2 cm^{-1} ,曝光时间为 10 s, 180° 方式收集散射光,将血清样品和银胶溶液按 2 : 1 的比例配制,显微镜下进行拉曼光谱测量,最后把血清的拉曼光谱减去背景的光谱,得到血清最终的表面增强拉曼光谱,整个实验利用同一次配置的银胶进行表面增强拉曼光谱检测。

3 实验结果与讨论

糖尿病、冠心病、青光眼、糖尿病并发脑梗塞

的平均 SERS 谱如图 1 所示。血清的 SERS 谱主要来自蛋白质、脂类、碳水化合物的贡献。从图 1 可以看出,冠心病、青光眼、糖尿病并发脑梗塞血清的拉曼谱和糖尿病血清的拉曼谱十分相似,表明上述几种疾病血清中组织、细胞代谢产物的分子结构或含量变化相近。和正常人血清的表面增强拉曼谱[如图 2(a)中曲线 2 所示]进行比较,其谱线的变化特征为:谱线 1619 cm^{-1} 来源于蛋白质苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸共同贡献^[9],而在几种疾病患者血清中位移到 1586 cm^{-1} ;色氨酸的咪唑环的谱线为 1365 cm^{-1} ^[10],而在几种疾病患者血清中谱线 1365 cm^{-1} 变成宽峰,且位移改变了 $1\sim 5\text{ cm}^{-1}$,其相对强度减少;类脂物特征峰 1449 cm^{-1} 是由膜脂酰基的 CH_2 、 CH_3 弯曲振动引起的^[11],且相对强度增加;碳水化合物 C-O-H 振动的特征峰 1333 cm^{-1} 位移改变了 $1\sim 3\text{ cm}^{-1}$,且相对强度增加;D-甘露糖的谱线 1098 cm^{-1} 和 740 cm^{-1} ^[12] 相对强度也增加;谱线 725 cm^{-1} 是来自蛋白质的侧链的反式构象或碱基的贡献^[13],其相对强度显著增强,且与血糖值的高低无关。

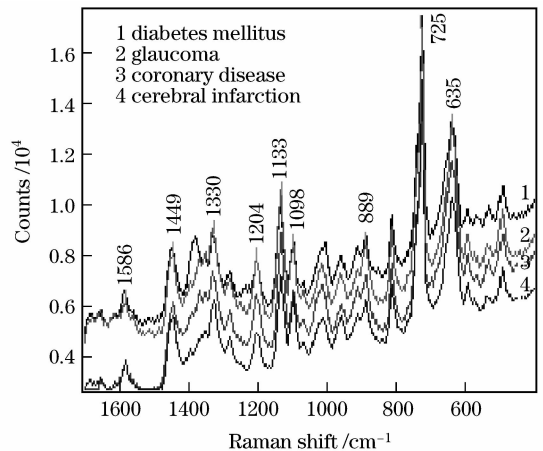


图 1 病人血清的 SERS 谱

Fig. 1 SERS of serum

为了获得更详细的结果,以 635 cm^{-1} 为参考标准,定义 725 cm^{-1} 峰的相对强度 $\beta = I_{725}/I_{635}$ 。将 30 个正常人血清,30 个糖尿病人血清和 30 个并发症患者血清 β 的比值分布情况用图 3 表示。从图 3 可以看出,在正常人血清中 β 值的范围在 $0.4\sim 0.7$ 之间,平均值为 0.64,糖尿病血清中 β 值的范围在 $0.7\sim 1.7$ 之间,平均值为 1.31,而糖尿病并发症患者血清中 β 值的范围在 $1.7\sim 4.5$ 之间,平均值为 2.8。

为了验证增强部分贡献的来源,设计了如下实验:在糖尿病人血清银胶中加入少量的 DNA (Desoxyribose Nucleic Acid),然后进行测量。图 2

给出了加 DNA 和不加 DNA 糖尿病血清以及正常人血清的 SERS 谱,然而银胶中加入少量 DNA 没有得到新谱线。加入 DNA 后糖尿病血清的 β 的平均值为 0.97,这表明在糖尿病血清中加入 DNA 后 725 cm^{-1} 谱线的相对强度减弱,这是因为加入 DNA 后,

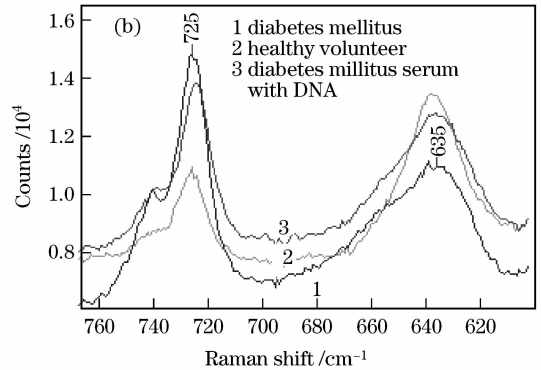
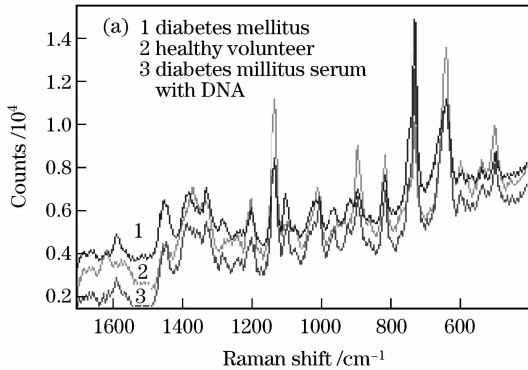


图 2(a) 血清的 SERS 谱(b)是图(a)在 $765\text{ cm}^{-1}\sim 610\text{ cm}^{-1}$ 的部分图

Fig. 2 SERS of serum from diabetes mellitus and healthy volunteer.

Fig. 2(b) is part of Fig. 2(a) between $765\text{ cm}^{-1}\sim 610\text{ cm}^{-1}$

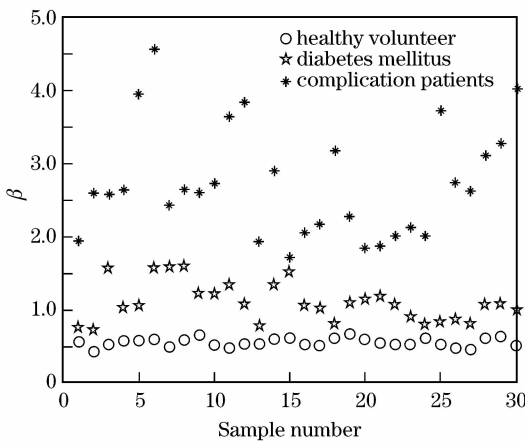


图 3 糖尿病人、并发症患者以及健康人自清中 β 值的分布

Fig. 3 Distribution map of β in serums from diabetes mellitus, complication and healthy volunteer

把糖尿病人血清放置于沸水中,待血清凝固后取出剩余清液,进行表面增强拉曼测试。得到的 SERS 谱如图 4 中曲线 1 所示,蛋白质的拉曼峰消失,出现了特征峰 732 cm^{-1} 。又做了碱基腺嘌呤溶液的 SERS 如图 4 中曲线 2 所示。不难看出图 4 中曲线 1 和图 4 中曲线 2 对应性较好,显然特征峰 732 cm^{-1} 归属于腺嘌呤,然而,被加热的正常人血清剩余清液中没有观察到该峰。所以糖尿病人血清中含有碱基腺嘌呤的信息,它很可能和蛋白质结合,所以得到的“指纹峰” 725 cm^{-1} 是碱基和蛋白质共同作用的结果。因此此峰的增量主要来自碱基腺嘌呤的贡献。这说明糖尿病患者的代谢产物中含有某个异

DNA 和碱基发生竞争吸附现象^[14],导致碱基谱线的相对强度减弱,然而除 725 cm^{-1} 外蛋白质的其它谱线没有明显变化,这表明谱线 725 cm^{-1} 和碱基有关,但以上结论还有待进一步验证。

常的 DNA 或 RNA(Ribose Nucleic Acid)片段或某个细胞中的基因发生变异,其产物被代谢到血液中。目前尚不清楚这种特殊的 DNA(RNA)片段从何而来,但是这种片段的碱基腺嘌呤在血清中与蛋白质结合。

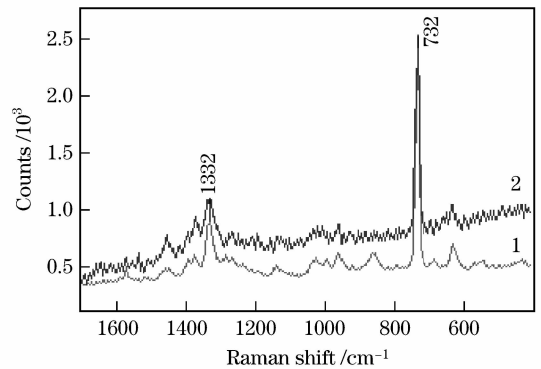


图 4 碱基腺嘌呤溶液的 SERS 谱(1);糖尿病血清煮沸后剩余清液的 SERS 谱(2)

Fig. 4 SERS taken for adenine solution (1) and SERS of residual solution after the serum of diabetes mellitus is incubated at $100\text{ Celsiur degree}$ until solidified (2)

4 结 论

采用表面增强拉曼散射技术研究了糖尿病、冠心病、青光眼和糖尿病并发脑梗塞病人血清的拉曼光谱,发现这几类疾病患者血清中碱基腺嘌呤和蛋白质共同作用的谱线 725 cm^{-1} 明显增强。同时

还发现,上述几种疾病患者血清的 SERS 谱十分相似,表明上述几种疾病血清中组织、细胞代谢产物的分子结构或含量变化相近。这些结果,从分子水平上探讨了糖尿病及并发症血清中组织、细胞代谢产物的生化机理,为实现糖尿病及并发症临床诊断提供有力的实验依据。

参 考 文 献

- 1 Wu Zhongwei, Liu Qunjun, Wu Lingwei *et al.*. Application of optical waveguide lightmode spectroscopy in studying the interaction of DNA to DNA-binding protein [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(3): 521~525
吴中伟, 刘全俊, 吴凌伟等. 用光波导光模光谱技术研究 DNA-DNA 结合蛋白相互作用[J]. *光学学报*, 2007, **27**(3): 521~525
- 2 Liu Zhouyi, Zhu Tuo, Gu Endong *et al.*. Acid orange II detection by fluorescence spectra[J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(6): 1106~1110
刘周忆, 朱拓, 顾恩东等. 荧光光谱检测的酸性橙 II 的研究[J]. *光学学报*, 2008, **28**(6): 1106~1110
- 3 Zeng Nan, He Yonghong, Ma Hui *et al.*. Pearl detection with optical coherence tomography [J]. *Chin. J. Lasers*, 2007, **34**(8): 1140~1145
曾楠, 何永红, 马辉等. 应用于珍珠检测的光学相干层析技术[J]. *中国激光*, 2007, **34**(8): 1140~1145
- 4 Wei Huajiang, Xing Da, Wu Guoyong *et al.*. Using spatially resolved reflectance to measure optical properties of stomach tissue [J]. *Chin. J. Lasers*, 2007, **34**(4): 582~587
魏华江, 邢达, 巫国勇等. 采用空间分辨漫反射测定胃组织光学特性[J]. *中国激光*, 2007, **34**(4): 582~587
- 5 Fleischmann M, Hendra P J, Mcquillan A J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode [J]. *Chem. Physics Letters*, 1974, **26**(2): 163~166
- 6 Zhu Zhiliang, Gao Junying, Li Fengting *et al.*. A review on the research of the adsorption of metallic sols by surface-enhanced Raman scattering[J]. *Chin. J. Spectroscopy Laboratory*, 2003, **20**(2): 159~164
朱志良, 郜俊影, 李凤亭等. 金属胶体吸附的表面增强拉曼散射研究进展[J]. *光谱实验室*, 2003, **20**(2): 159~164
- 7 Liu Gang, Xing Da, Wang Haimin *et al.*. Study of protein in human gallstones by fourier transform infrared spectroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2002, **22**(4): 441~446
刘刚, 邢达, 王海珉等. 胆结石中蛋白质的傅里叶变换红外光谱和表面增强拉曼光谱研究[J]. *光学学报*, 2002, **22**(4): 441~446
- 8 Liu Kun, Wu Shifa. Silver colloid synthesized by microwave method and applied in surface enhanced Raman scattering [J]. *Chinese J. Light Scattering*, 2006, **1**(4): 332~335
刘琨, 吴世法. 微波法制备银胶体及其在表面增强拉曼散射中的应用[J]. *光散射学报*, 2006, **1**(4): 332~335
- 9 Goodwin D. C, Brahm J. Form of DNA and the nature of interactions with protein in chromatin [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1978, **5**(3): 835~850
- 10 Xu Yiming, Lu Chuangzong. Raman spectroscopic study on structure of human immunodeficiency Virus (HIV) and hypericin-induced photosensitive damage of HIV [J]. *Science in China (series C)*, 2005, **48**(2): 117~132
- 11 Gaber B P, Peticolas W L. On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1997, **465**(2): 260~74
- 12 She C Y, Dinh N D, Tu A T. Laser Raman scattering of glucosamine, N-acetylglucosamine and glucuronic acid [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1974, **372**: 345~357
- 13 Yu Ke, Xu Xiaoxuan, Niu Jun *et al.*. Studies on human breast cancer tissues with Raman microspectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, **24**(11): 1359~1362
于柯, 徐晓轩, 牛俊等. 人乳腺癌组织的显微拉曼光谱研究[J]. *光谱与光谱分析*, 2004, **24**(11): 1359~1362
- 14 Otto C, Hoeben F P, Greve J. Surface-enhanced Raman scattering of the complexes of silver with adenine and dAMP [J]. *J Raman Spectroscopy*, 1991, **22**(12): 791~796