

抑癌基因 p53 的单细胞傅里叶变换显微 红外光谱

闫婧雯 蒋诗平 陈 亮

(中国科学技术大学国家同步辐射实验室, 安徽 合肥 230029)

摘要 为探索单细胞红外光谱技术对单基因差异的鉴别能力,利用同步辐射傅里叶变换红外显微光谱技术采集含抑癌基因 p53 (野生型)和敲除抑癌基因 p53 (敲除型)结肠癌细胞的单细胞显微红外光谱。研究分析光谱发现,二者在脂质、蛋白质以及核酸吸收谱带峰强度和位置都有明显的差异。敲除 p53 后脂质、核酸以及蛋白特征吸收峰均减弱,且几乎所有的吸收峰都向高波数位移。分析了酰胺 I 带与酰胺 II 带的相对吸收强度比,发现敲除型比值明显变大;酰胺 I 带拟合结果表明野生型细胞中蛋白质二级结构的 α 螺旋和无规则卷曲含量明显低于敲除型,转角和非典型螺旋的含量则高于敲除型,而 β 折叠的含量无明显变化。研究表明,同步辐射单细胞红外光谱可以在分子水平上鉴别因 p53 基因差异而产生的细胞代谢变化。

关键词 医用光学;生物光学;傅里叶变换红外显微光谱;抑癌基因 p53;单细胞

中图分类号 O657.33; TL53; Q2 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/AOS201232.1017002

Tumor Suppressor Gene p53 of Single Cell Fourier Transform Infrared Microspectroscopy

Yan Jingwen Jiang Shiping Chen Liang

(National Synchrotron Radiation Laboratory, University of Science and Technology of China,
Hefei, Anhui 230029, China)

Abstract In order to explore the capability of Fourier transform infrared microspectroscopy in discriminating single gene difference in single cell, synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy is used to measure single cell spectra of colorectal cancer cells with and without tumor suppressor gene p53, respectively. With comparison of spectra of these two types of cancer cells, absorption intensities and frequencies of lipids, proteins and nucleic acids are evidently different. The absorption bands of single cell without p53 are weak and almost all the peaks drift to higher wavenumbers. Absorption intensity ratio of amide I/amide II increases significantly in the cell without p53, indicating the secondary structures of proteins change. The fitting analysis of amide I absorption band reveals that contents of α helix and random coil in secondary structures of proteins in cell with p53 gene are lower than that in cell without p53, and contents of turns and atypical helix are higher in cell with p53. However, content of β -sheet in both cell is very similar. The results demonstrate that the absence of single gene p53 can affect metabolism activity, which can be clarified by synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy at molecular level.

Key words medical optics; biotechnology; Fourier transform infrared microspectroscopy; tumor suppressor gene p53; single cell

OCIS codes 120.3890; 170.3880

收稿日期: 2012-04-10; 收到修改稿日期: 2012-05-11

作者简介: 闫婧雯(1984—),女,博士研究生,主要从事同步辐射及应用和生物光谱等方面的研究。

E-mail: jwyan@mail.ustc.edu.cn

导师简介: 蒋诗平(1963—),男,副研究员,主要从事同步辐射生物学应用、X射线显微成像技术及应用等方面的研究。

E-mail: spjiang@ustc.edu.cn(通信联系人)

1 引 言

p53 是抑制细胞癌变的基因,定位于人类 17 号染色体,该基因表达的蛋白质是一种转录因子蛋白。自 Lane 等^[1]首次报道 p53 以来,受到研究人员的高度重视。最初因为 p53 的各种特性显示出该基因和癌症相关,被误认为是致癌基因。后来由 Wolf 等^[2]的研究结果表明 p53 并不致癌,而是可以抑制癌症的发生。目前发现至少有 50% 的癌症源于 p53 的突变^[3]。对于缺失 p53 或缺少 p53 正常功能的细胞,容易产生突变,导致机体病变、癌化等。

目前,对 p53 的研究通常采用基于分子生物学的方法,对于 p53 存在与否的单细胞光谱分析尚未见报道。振动光谱是基于分子振动产生的,反映的是分子结构和构象的变化,因而可以反映待测样品在分子水平上的变化。因其能快速、准确、无损检测样品分子水平上的变化而被广泛应用于生物医学领域^[4~7]。红外光谱是振动光谱的一种,该技术在生物医学领域的应用研究越来越多且在癌症以及病变组织诊断上有广泛的应用前景^[8~10],而红外显微技术的发展使得红外光谱技术在生物学领域的应用更加广泛^[11,12]。Sahu 等^[13]用傅里叶变换红外显微镜在分子水平上检测结肠活组织切片的异常代谢。Yang 等^[14]用红外显微镜对心肌梗塞的病理切片进行红外成像,得到组织切片的不同组分的红外图像。Hastings 等^[15]用红外显微镜研究了不同层面的单层细胞红外光谱的区别。

傅里叶变换红外显微镜不仅具备普通红外光谱仪的优点,还具较高的空间分辨能力,能获得微小区域内样品的光谱,且制样简单,无需对样品添加化学制剂,因而一定程度上更能反映待测样品的本质光谱。与普通红外光源相比,同步辐射为傅里叶变换红外显微镜提供更加优质的光源,使其达到红外衍射极限的空间分辨率,选择合适的细胞即可在单细胞状态下研究细胞分子水平上的变化。本文利用同步辐射傅里叶变换红外显微镜研究抑癌基因 p53 存在与否的结肠癌细胞显微红外光谱。通过研究分析谱图特征,对抑癌基因 p53 敲除与否的结肠癌单细胞红外显微光谱进行研究。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

实验试剂包括:高糖培养基(DMEM)(GIBCO Corporation),胎牛血清(Bio Basic Inc.),青霉素/

链霉素(Bio Basic Inc.),磷酸盐缓冲液(PBS)(Bio Basic Inc.),胰酶以及其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司,所有试剂均被直接使用,未经进一步纯化处理;红外实验窗片(CaF₂):直径为 14 mm,厚度为 1 mm,对红外光的通透率最高可达 95%;倒置显微镜:Motic AE31。

2.2 细胞培养

结肠癌细胞 HCT116(p53+/+, p53-/-),培养于含体积分数为 10% 的优级胎牛血清、青霉素 100U 和链霉素含量为 100 mg/L 的高糖 DMEM 中,在 CO₂ 体积分数为 5%,37 °C 恒温培养箱中传代。直径为 50 mm 的组织培养皿中置入预先灭菌处理的 CaF₂ 窗片,最终以 1×10⁴/mL 的细胞浓度接种于组织培养皿内培养 12 h。在倒置显微镜下观察细胞的生长状况,确保细胞是单层贴敷在红外窗片表面。

2.3 光谱采集及预处理

将单层细胞贴敷的氟化钙窗片用 PBS 温和地冲洗 3 次,洗去附着于细胞表面的培养基,将窗片置于超净工作台自然干燥超过 1 h,以减少光谱集中水分对红外光吸收的干扰。光谱采集在合肥国家同步辐射实验室红外与远红外实验站完成,该实验站配有 Bruker 66v/s 傅里叶变换红外光谱仪和 Bruker Hyperion 3000 红外显微镜,该红外显微镜配有可见光源以及 CCD,用以在采集光谱前确定所要采集的区域。以液氮冷却汞镉碲(MCT)检测器,采用透射模式,狭缝大小为 10 μm×10 μm,波数分辨 4 cm⁻¹,扫描 512 次。在 400~4000 cm⁻¹ 波数范围采集原始单细胞红外显微光谱。考虑到细胞上的 PBS 残留可能对红外吸收有所影响,因而在背景光谱测量时选用与采集细胞同一窗片上的无细胞区域,该区域也存在 PBS 残留,因此在扣除背景光谱时 PBS 残留的影响也近似认为被扣除。

实验中使用同步辐射红外波段的光源作为红外光源。由于同步辐射光源的光强是随时间而衰减的,而光强对采集信号强度有很大的影响,因此对每个采集的光谱做光强归一化处理。实验中从单一窗片上随机选择 3 个细胞并采集得到 3 条谱线,使用另一窗片重复该过程,将采集得到的 6 条光谱求平均而得到最终显微红外吸收谱,且每条光谱均经过扣除背景噪声处理。

3 结果与讨论

3.1 光谱定性分析

抑癌基因 p53 野生型和敲除型的结肠癌单细胞

傅里叶变换红外显微吸收光谱如图 1 所示,其中谱线 1 为 p53 野生型红外吸收谱,谱线 2 为敲除型的光谱。可以发现 p53 野生型光谱较为复杂,蛋白质相关的酰胺带吸收强度明显高于 p53 敲除型的吸

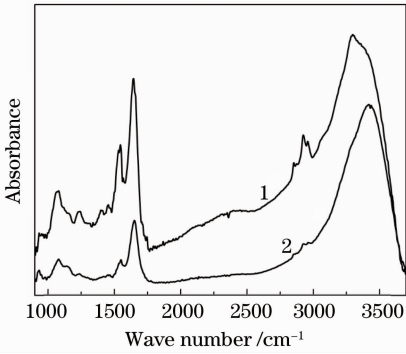


图 1 结肠癌细胞同步辐射傅里叶变换红外显微光谱。

谱线 1: p53 野生型;谱线 2: p53 敲除型

Fig. 1 Synchrotron Fourier transform infrared microspectra of human colorectal cancer cell line HCT116. Line 1: with p53; line 2: without p53

表 1 野生型和敲除型结肠癌细胞同步辐射傅里叶变换红外吸收峰位置与吸收模式指认比较

Table 1 Comparison of synchrotron Fourier transform infrared microspectral bands and their assignments of HCT116 with and without p53

No.	With p53 /cm ⁻¹	Without p53 /cm ⁻¹	Frequency shift /cm ⁻¹	Definition of assignment
1	3298	3420	122	N-H stretching; amide A; O-H stretching; H ₂ O
2	2958	2961	3	CH ₃ anti-symmetric stretching vibrations; lipid and protein side chains
3	2925	2927	2	CH ₂ anti-symmetric stretching vibrations; mainly lipid with a little protein side chains
4	2873	2873	0	CH ₃ symmetric stretching vibrations; mainly proteins with a little contribution from lipids
5	2854	2854	0	CH ₂ symmetric stretching vibrations; mainly lipids with a little protein side chains
6	1644	1652	8	amide I; proteins
7	1545	1549	4	amide II; proteins
8	1454	—	—	CH ₂ bending; mainly lipids with a little contribution from proteins
9	1404	—	—	COO ⁻ symmetric stretching; fatty acids
10	1233	1237	4	PO ₂ ⁻ anti-symmetric stretching; nucleic acids
11	1079	1080	1	PO ₂ ⁻ symmetric stretching; nucleic acids

脂类相关的吸收主要在 2958、2925、2873、2854、1454、1404 cm⁻¹。其中 2958 cm⁻¹和 2873 cm⁻¹分别为脂类、蛋白质侧链 CH₃ 的反对称和对称振动吸收,而 2925 cm⁻¹和 2854cm⁻¹主要归为脂类、少量蛋白质侧链 CH₂ 的反对称和对称振动吸收。1454 cm⁻¹主要为脂质 CH₂ 弯曲振动,而 1404 cm⁻¹则主要为脂肪酸 COO⁻ 对称伸缩振动,在上述脂类吸收峰中,野生型细胞中吸收峰的强度较高,而敲除型在脂类吸收峰中非常微弱,

收。表 1 中列出了主要吸收峰位置的变化。

与蛋白质相关的吸收峰主要在 3400、1652、1545 cm⁻¹,对比图谱可以看出野生型吸收峰强度明显高于敲除型,其中 3400 cm⁻¹附近的吸收是羟基与氨基的叠加吸收。在野生型和敲除型中此处的吸收峰位置相差达 122 cm⁻¹,这个区域主要是蛋白质酰胺 A 带吸收和水分的羟基吸收,由于无法规避样品中水分羟基吸收对分析结果的影响,未对该吸收区域进行详细分析。在蛋白质酰胺带的吸收也有着较大的区别,较之野生型,敲除型在酰胺 I 带和酰胺 II 带的吸收强度明显减弱,且酰胺 I 带和 II 带吸收峰分别向高波数偏移 8 cm⁻¹和 4 cm⁻¹。敲除型蛋白质相关谱带吸收强度减弱表明蛋白质含量的减少,而吸收峰向高波数移动则说明敲除型中分子的氢键化程度降低,意味着蛋白等分子含量较之野生型有所降低。分析结果表明,抑癌基因 p53 的改变导致细胞内部代谢程度的改变,也改变了蛋白质所处的化学环境。

且几乎所有的吸收峰向高波数偏移。同一样品的不同吸收峰相对强度比通常可以用来描述样品内相对基团数量的变化,通过比较 A₂₉₂₅/A₂₉₅₈ (在 2925 cm⁻¹和 2958 cm⁻¹两吸收峰的强度比)和 A₂₈₅₃/A₂₈₇₃,发现野生型这两个比值分别为 1.04 和 1.01,而敲除型分别为 0.98 和 0.96,说明敲除 p53 后细胞中脂质的 CH₂ 和 CH₃ 基团数量发生了变化,导致烃链长度变短^[16]。可见敲除 p53 后可能影响了脂类物质的代谢与合

成,以及改变了脂类物质所处的化学环境,导致吸收峰强度的降低以及峰偏移。如上所述 1454 cm^{-1} 和 1404 cm^{-1} 的吸收主要来自脂质 CH_2 弯曲振动和脂肪酸 COOH^- 对称伸缩振动,然而这两个吸收峰在敲除型吸收谱中几乎消失,进一步说明敲除 p53 会导致细胞内脂类物质含量的减少。

核酸相关的吸收主要位于 1079 cm^{-1} 和 1233 cm^{-1} ,分别对应于核酸中磷酸二酯基团的对称与反对称振动吸收。相比较于野生型,敲除型中核酸相关的吸收峰强度降低,同时吸收峰位置略向高波数偏移,磷酸二酯基团对称吸收与酰胺 II 带吸收的相对强度比(A_{1079}/A_{1545})常被用来表示核酸相对于蛋白质含量的变化。通过比较发现在野生型中该值为 0.74,而敲除后为 1.01,表明敲除 p53 之后核酸相对于蛋白质含量明显增加,再次说明细胞中的代谢活跃程度降低,蛋白质合成量减少。

3.2 酰胺 I 带吸收的定量分析

蛋白质酰胺带的吸收是蛋白质的特征吸收,酰胺带吸收峰的变化在一定程度上可以反映出蛋白质二级结构的变化。光谱定性分析发现敲除 p53 前后细胞中蛋白质酰胺带的吸收变化较大,且蛋白质酰胺 II 带相对于酰胺 I 带的吸收强度明显升高,说明蛋白质发生了构象或者结构上的变化,为了进一步揭示敲除抑癌基因 p53 前后细胞中产生的变化,对酰胺带的吸收做进一步的分析。红外吸收的强度与吸收基团的数量相关,基团的含量升高将导致吸收强度增加,同一样品的不同基团相对吸收强度比值可以用于分析基团相对含量的变化。研究比较了野生型和敲除型结肠癌细胞在蛋白质酰胺 I 带和酰胺 II 带的相对吸收强度比值(amide I/amide II)发现,野生型比值为 1.32,而敲除型比值为 1.93,参考 Dogan 等^[17]根据 amide I/amide II 比值变化得出蛋白质结构发生变化的研究结果可知,敲除 p53 后蛋白质结构发生了明显变化。对蛋白质酰胺 I 带吸收进行二阶导数光谱分析,如图 2 所示,可见两种细胞二阶导数光谱也有明显区别。对两组细胞的酰胺 I 带吸收峰进行傅里叶自去卷积,再拟合求出各种蛋白质二级结构所占百分含量,蛋白质二级结构红外吸收位置归属参考文献^[18],具体含量在表 2 中列出,可以看出在 p53 敲除前后各种蛋白质二级结构的含量有明显的变化。结合图 2 和表 2 可以得出,p53 野生型细胞中 α 螺旋和无规则卷曲的含量都明显低于敲除型细胞,而非典型螺旋和 β 转角含量则明显高于敲除型, β 折叠的含量在 p53 敲除

前后无明显变化^[19]。amide I/amide II 比值的减小以及蛋白质二级结构组分含量的变化都说明了敲除 p53 后细胞中的代谢发生了变化,导致蛋白质结构和构象的明显改变。

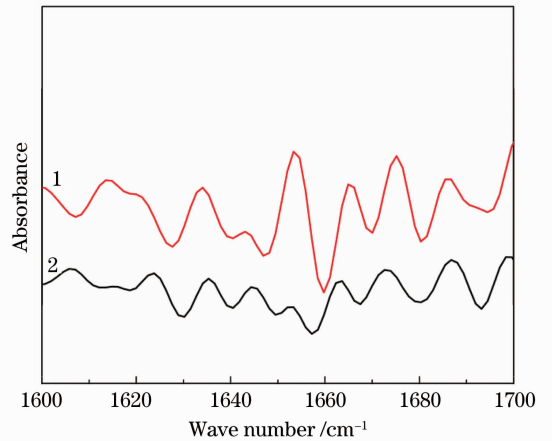


图 2 酰胺 I 带二阶导数光谱。谱线 1: p53 野生型; 谱线 2: 敲除 p53

Fig. 2 Second derivative spectra of amide I. Line 1: with p53; line 2: without p53

表 2 两种细胞中酰胺 I 带中各种二级结构百分含量值
Table 2 Contents of second structure of amide I in two cells

Item	With p53 / %	Without p53 / %
α helix	19.24	21.35
Atypical helix	15.89	14.05
β sheet	31.66	31.72
β turn	13.59	11.69
Random coil	19.63	21.35

综合光谱分析可以看出,抑癌基因 p53 的缺失导致细胞内代谢活跃程度发生变化,脂类、蛋白质以及核酸的含量和构象发生变化,并且细胞内的化学环境也发生了相应的改变。

4 结 论

通过对抑癌基因 p53 野生型和敲除型结肠癌细胞的单细胞红外光谱分析,发现两种细胞具有明显的区别。野生型和敲除型细胞在蛋白质氨基与羟基的叠加吸收峰上波峰相差 122 cm^{-1} ;在脂类的吸收峰上,敲除型只有极微弱的吸收峰;在蛋白质酰胺带的吸收上两种细胞也有明显的区别,吸收峰位置的变化表明二者在物质结构上的变化;敲除 p53 前后的细胞在酰胺带相对吸收强度比值(amide I/amide II)发生了明显的变化,表明二者在蛋白质结构组成

以及构象有明显的区别。对两种细胞酰胺 I 带光谱的二阶求导、去卷积以及拟合求出酰胺 I 带各种二级结构含量显示二者在蛋白质二级结构含量上有明显差别。

单基因改变致使细胞的内代谢活跃程度发生变化,最终导致吸收光谱的改变,此外 amide I/amide II 在研究中显著的差异有可能作为判断 p53 基因红外光谱的生物指标。傅里叶变换红外显微光谱初步研究表明该技术可以在单细胞水平上进行多指标分子水平分析。而同步辐射红外显微光谱可以提高空间分辨以及信噪比,有可能为单基因以及其他因素的改变导致细胞代谢变化提供单细胞分子水平上诊断的新方法。

参 考 文 献

- 1 D. P. Lane, L. V. Crawford. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells [J]. *Nature*, 1979, **278**(5701): 261~263
- 2 D. Wolf, V. Rotter. Inactivation of p53 gene expression by an insertion of Moloney murine leukemia virus-like DNA sequences [J]. *Mol. Cell. Biol.*, 1984, **4**(7): 1402~1410
- 3 C. Bérout, T. Soussi. p53 gene mutation: software and database [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1998, **26**(1): 200~204
- 4 Chen Xingdan, Wang Dongmin, Lu Qipeng *et al.*. Progress of MIR non-invasive blood glucose determination and effect of stratum corneum[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(9): 0900105
陈星旦, 王动民, 卢启鹏等. 中红外无创血糖研究进展并论角质层影响[J]. *光学学报*, 2011, **31**(9): 0900105
- 5 Yao Hongwei, Liu Yaqi, Fu Wei *et al.*. Initial research on Fourier transform infrared spectroscopy for the diagnosis of colon neoplasms [J]. *Spectrosc. Spect. Anal.*, 2011, **31**(2): 297~301
姚宏伟, 刘亚奇, 傅卫等. 红外光谱用于大肠肿瘤诊断的初步研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2011, **31**(2): 297~301
- 6 Qian Aiping, Hua Guoran, Qian Zhiyu *et al.*. Therapy effect assessment by functional near infrared spectroscopy during laser induced interstitial thermotherapy[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(1): 0104003
钱爱平, 花国然, 钱志余等. 激光间质热疗的功能近红外疗效评估[J]. *中国激光*, 2011, **38**(1): 0104003
- 7 P. T. T. Wong, R. K. Wong, T. A. Caputo *et al.*. Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells: evidence of extensive structural changes during carcinogenesis [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS*, 1992, **88**(24): 10988~10992
- 8 Gao Zehong, Yu Jingong, Liu Fuxiang *et al.*. Micro-Raman spectra for lipids C-H in colorectal tissue[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(2): 605~608
高泽红, 于晶功, 刘福祥等. 结直肠癌组织中脂类伸缩振动的拉曼光谱[J]. *中国激光*, 2010, **37**(2): 605~608
- 9 P. G. Andrus, R. D. Strickland. Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Biospectroscopy*, 1998, **4**(1): 37~46
- 10 Kong Meng, Zeng Changchun, Xiong Honglian *et al.*. Effect of gold nanoparticles on tissue optical properties of gastric tumor tissue in near-infrared spectral in nude mice [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(3): 0317004
孔猛, 曾常春, 熊红莲等. 纳米金粒子对裸鼠胃癌组织近红外范围是组织光学特性影响[J]. *光学学报*, 2011, **31**(3): 0317004
- 11 E. Gazi, J. Dwyer, P. Gardner *et al.*. Applications of Fourier transform infrared microspectroscopy in studies of benign prostate and prostate cancer. a pilot study [J]. *J. Pathol.*, 2003, **201**(1): 99~108
- 12 S. Mark, R. K. Sahu, K. Kantarovich *et al.*. Fourier transform infrared microspectroscopy as a quantitative diagnostic tool for assignment of premalignancy grading in cervical neoplasia [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2004, **9**(3): 558~567
- 13 R. K. Sahu, S. Argov, E. Bernshtain *et al.*. Detection of abnormal proliferation in histologically 'normal' colonic biopsies using FT-IR-microspectroscopy [J]. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2004, **39**(6): 557~566
- 14 T. T. Yang, S. F. Weng, N. Zheng *et al.*. Histopathology mapping of biochemical changes in myocardial infarction by Fourier transform infrared spectral imaging [J]. *Forensic Sci. Int.*, 2011, **207**(1-3): 34~39
- 15 G. Hastings, K. Rice, M. S. Greenblatt *et al.*. Infrared microscopy for the study of biological cell monolayers. I. Spectral effects of acetone and formalin fixation [J]. *Biopolymers*, 2008, **89**(11): 921~930
- 16 Li Weixiu, Zheng Quanqing, Wang Ping *et al.*. Fourier transform infrared spectroscopy study on normal and malignant tissues of cervix [J]. *Spectrosc. Spect. Anal.*, 2006, **26**(10): 1833~1837
李炜修, 郑全庆, 王平等. 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
- 17 A. Dogan, G. Siyakus, F. Severcan. FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut (*Corylus avellana* L.) [J]. *Food Chem.*, 2007, **100**(3): 1106~1114
- 18 J. F. Neault, H. A. Tajmir-Riahi. Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1384**(1): 153~159
- 19 M. Jackson, H. H. Mantsch. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure [J]. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1995, **30**(2): 95~120

栏目编辑：韩峰