

衰减全反射红外光谱用于人乳腺癌组织的研究*

于 舸¹ 吕淑华² 许家林¹ 张存洲¹ 张春平¹

(1 南开大学物理科学学院光子学中心, 天津 300071) (2 天津医科大学肿瘤医院, 天津 300060)

摘 要 通过对32例人乳腺良、恶性肿瘤的衰减全反射红外光谱的对比研究发现, 它们之间存在明显而规律的光谱差异, 反映了乳腺良、恶性病变组织中, 蛋白质、核酸和脂类等生物大分子的构型与构象以及相对含量上的差别. 研究表明: 傅里叶变换红外光谱可以从分子水平上揭示良、恶性肿瘤的分子结构信息, 极有潜力成为一种临床原位诊断肿瘤的新方法.

关键词 衰减全反射; 傅里叶变换红外光谱; 乳腺肿瘤组织; 蛋白质二级结构; 氢键

中图分类号 O657.33

文献标识码 A

0 引言

众所周知, 乳腺癌是导致女性死亡的主要恶性肿瘤之一. 因此, 早期作出正确诊断对疾病的治疗具有决定性的意义. 现行的原位诊断方法例如 X 光拍片及超声都是探测乳腺密度的变化, 而不是分子化学成分的分析, 因此这些技术都无法可靠地区分癌变和良性肿瘤, 只能用作检测疑似病例而不能用作诊断. 为了区分恶性与良性肿瘤, 通常需要做具有一定创伤性的活体组织切片检查, 而切片病理表明 70% ~ 90% 又是良性的. 显然, 寻求一种具有分子化学成分分析能力的原位诊断方法是具有重要的科学意义和实用价值的. 随着光诊断和光治疗应用的不断深入, 光学手段已成为研究生物大分子特性的一种有效方法^[1,2]. 本文旨在探索不做活体切片检查而采用傅里叶变换红外光谱, 对疑似病例提供在线诊断信息的可能性.

人体各种组织和细胞都是由蛋白质、核酸、脂类等生物分子组成的. 每一种物质都有其特征的红外谱带. 在组织和细胞癌变初始过程中, 组成细胞、组织的各种生物分子只是在不同组织和细胞内的构型、构象以及各种成分的构成比例不同, 但还不足以引起临床症状和医学影像学的变化, 而红外光谱却能从分子水平反映这些早期的变化. 在先期的研究中, 研究者应用红外、傅里叶变换 (FTIR) 红外光谱等方法对离体良性、恶性肿瘤组织光谱特性进行了研究^[3-7]. 在这些研究中, 对样品的处理一般较复杂, 需要的时间较长. 而且容易使肿瘤组织中的蛋白质大分子变性失活. 应用衰减全反射 (Attenuated Total Reflection) 傅里叶变换红外光谱法 (简称 ATR-

FTIR) 就可以避免上述问题. 它不需要透过样品的信号, 而是通过样品表面的反射信号获得样品表层生物大分子的结构信息. 实验时样品制备简单、快捷, 而且保持了生物组织的自然状态. 同时, 该方法具有较高的准确性及灵敏度. 本文采用 ATR-FTIR 谱学方法研究乳腺良性病变组织和癌变组织, 从谱型、吸收频率、相对强度等谱学参量分析其差异性, 揭示这两类病变组织组成和分子结构的差异, 探索临床诊断的可能性.

1 样品和方法

1.1 样品

32 例乳腺组织样品全部取自天津肿瘤医院手术切除的新鲜标本. 经病理科检验证实乳腺癌组织 18 例 (浸润性导管癌 5 例, 单纯癌 9 例, 腺癌 2 例, 髓样癌 1 例, 鳞状细胞癌 1 例), 良性肿瘤 14 例 (增生症 8 例, 纤维腺瘤 6 例). 标本离体后用生理盐水冲洗净血渍, 取材 1.0 cm × 1.0 cm 大小, 厚度分别为 1.0 cm、0.5 cm 的组织两块, 均来自于肿瘤中心部位. 其中一部分用福尔马林固定, 石蜡包埋, 进行常规病理切片 HE 染色检查; 另一部分新鲜样品, 随即用于光谱研究.

1.2 方法

本实验使用的是 Nicolet 公司出品的 NEXUS 870 型傅里叶变换红外光谱仪, 以及该仪器配备的水平多次衰减全反射内反射元件 (IRE) 和中红外 MCT-A 检测器. IRE 为等腰梯形 ZnSe 晶体, 光线入射角为 45°, 如图 1. 实验设定仪器光谱分辨率为 4 cm⁻¹, 测量范围为 4000 ~ 700 cm⁻¹, 扫描信号累加次数为 400 次. 实验时将样品放在 ZnSe 晶体的表面, 压紧, 测试其红外光谱. 光谱数据的处理由 Nicolet 公司提供的 OMNIC E. S. P. V6.1 光谱软件完成.

* 国家教育部“振兴”计划基金资助项目

Tel: 022-66229448 Email: yuge62@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-05-31

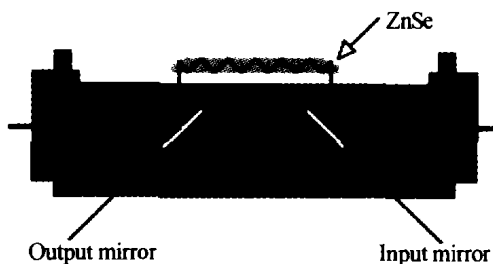


图 1 衰减全反射附件图
Fig. 1 Schematic Diagram of ATR-FTIR Attachment

2 实验结果

2.1 蛋白质吸收谱带的变化

2.1.1 蛋白质的酰胺 I 带

图 2 表示乳腺良性病变组织(增生症)和癌组织(单纯癌)样品在 $1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 的 ATR-FTIR 谱图. 图 2(a) 为乳腺良性肿瘤和癌变组织有精细结构的蛋白质酰胺 I 带的 ATR 光谱, 蛋白质的酰胺 I 带有三个肩峰, 分别位于 1652 、 1647 和 1635 cm^{-1}

附近. 在癌变组织中, 位于 1652 cm^{-1} 处的肩峰有较强的吸收. 参照良性、癌变组织酰胺 I 带的二阶导数谱, 对原始谱图 2(a) 去卷积, 得到其去卷积光谱, 图 2(b) 所示. 对酰胺 I 吸收带各子峰归属如下: $1609 \sim 1629 \text{ cm}^{-1}$ 和 1682 cm^{-1} 附近吸收峰分别归属于分子间反平行 β -折叠和平行 β -折叠 $\nu(\text{C-O})$ 吸收峰, $1630 \sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ 峰由分子内 β -折叠产生. 无序卷曲结构、转角和无序转角的吸收峰分别位于 1645 、 1695 和 1673 cm^{-1} . $1650 \sim 1657 \text{ cm}^{-1}$ 来自 α -螺旋的 $\nu(\text{C-O})$ [8], $1658 \sim 1668 \text{ cm}^{-1}$ 吸收峰可归属为非典型螺旋结构, 如 3_{10} 螺旋、三股螺旋或超螺旋 [9]. 乳腺良性肿瘤组织的去卷积谱主要由 1652 、 1645 、 1635 和 1625 cm^{-1} 四条谱带组成. 癌变组织的酰胺 I 带中归属为 α -螺旋结构的 1652 cm^{-1} 谱带呈现出很强的吸收. 1645 、 1635 以及 1660 cm^{-1} 吸收峰也是它的主要谱带. 计算酰胺 I 主要谱带吸光度之间的比值, 可以看出, 癌组织中蛋白质 β -折叠构

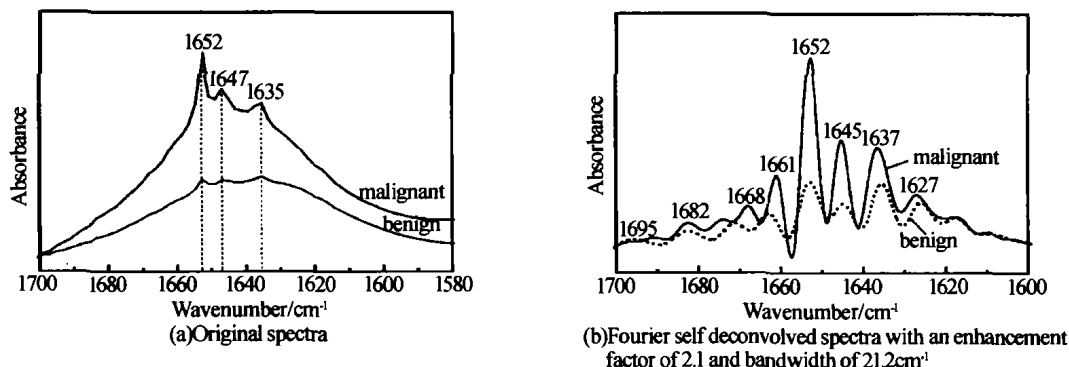


图 2 乳腺肿瘤组织在酰胺 I 带区的衰减全反射红外光谱

Fig. 2 ATR-FTIR spectra in the amide I region of benign and malignant breast tumor tissues

象的含量明显减少, 表明维持蛋白质 β -折叠构象部分的氢键大部分被破坏, 另外, 非典型螺旋和无序卷曲结构的相对含量也都减少, 因此, 蛋白质构象主要呈现 α -螺旋构象. 而在良性病变组织中, 蛋白质构

象主要表现为 α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲结构, 见表 1. 产生这种结果原因, 可能主要是由于良性组织中胶原蛋白的含量高于癌变组织所导致的.

表 1 良、恶性肿瘤组织酰胺 I 主要谱带吸光度的比率

	A_{1635}/A_{1652}	A_{1625}/A_{1652}	A_{1645}/A_{1652}	A_{1662}/A_{1652}	A_{1682}/A_{1652}
良性病变组织	0.98	0.65	0.64	0.49	0.17
恶性肿瘤组织	0.43	0.23	0.56	0.37	0.09

2.1.2 蛋白质分子中 C-O 基团的谱带

生物组织细胞内蛋白质的 C-O 基团振动谱带主要来自丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的 C-O(H) 伸缩振动 [5,10,11]. 该基团一般与其它分子或基团形成氢键. 氢键对于生物大分子保持相对稳定的空间构象起着关键作用; 氢键效应又常使基团的伸缩振动吸收频率降低 [10]. 图 3 表示乳腺良性病变组织, (增生症) 和癌组织(单纯癌)样品在 $1500 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 段的 ATR-FTIR 谱图. 从图 3 可以看出, 该 C-O 基团伸缩振动谱带在乳腺良性组织中位于 1160 cm^{-1}

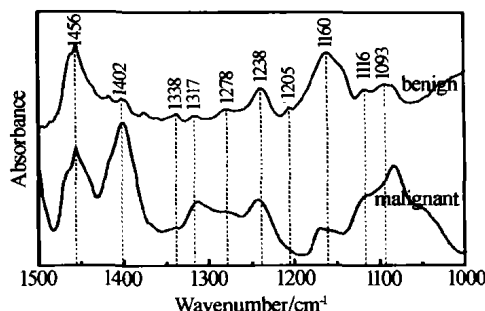


图 3 乳腺肿瘤组织在 $1500 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 区域的衰减全反射红外光谱

Fig. 3 ATR-FTIR spectra in the frequency region 1500 to 1000 cm^{-1} of human breast tissues

附近;而在癌组织中位于 1168 cm^{-1} , 向高波数位移了 8 cm^{-1} 左右. 此谱带经去卷积处理, 可得 1172 、 1161 cm^{-1} 两个谱带, 低波数的谱带来源于组织中氢键化的 C-O(H) 基团, 而高波数的谱带则来源于非氢键化的. 与良性病变组织相比, 乳腺癌组织中, 低波数谱带的吸收强度减弱, 而高波数侧谱带的吸收强度增强. 光谱的这一变化表明, 癌组织中蛋白质的 C-O 基团形成的氢键大部分受到破坏, 导致蛋白质空间构象受到破坏. 该频率的位移被认为是细胞蛋白质磷酸化引起的^[9]. 当蛋白质中 -OH 被 PO_4^{3-} 基团取代后, 维持分子内 β -折叠构象的氢键被破坏, 结果导致 β -折叠构象含量减少.

2.1.3 胶原蛋白分子的吸收谱带

表 2 乳腺良、恶性病变组织的 ATR-FTIR 谱主要参量比较

	$\nu(\text{C-O})/\text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2)/\text{cm}^{-1}$ 1238 cm^{-1} 双肩峰	A_{1162}/A_{1083}	A_{1456}/A_{1400}
增生症	8 例 1162 ± 1	1240, 有	1.05(0.85 ~ 1.23)	1.14(1.05 ~ 1.28)
纤维腺瘤	6 例 1161	1240, 有	0.92(0.87 ~ 0.97)	1.03(1.02 ~ 1.04)
浸润性导管癌	2 例 1162 ± 2 3 例 1171	1240, 无	0.71(0.50 ~ 0.83)	0.94(0.89 ~ 1.02)
单纯癌	4 例 1162 ± 2 5 例 1169 ± 2	1242, 无 1240, 无	0.84(0.781 ~ 0.87)	0.98(0.95 ~ 1.03)
腺癌	2 例 1163	1236, 无	0.74(0.68 ~ 0.78)	0.91(0.85 ~ 0.96)
髓样癌	1 例 1165	1240, 无	0.83	0.99
鳞状细胞癌	1 例 1155	1240, 无	0.49	0.90

2.1.4 蛋白质分子 CH_3 基团的谱带

1456 cm^{-1} 和 1402 cm^{-1} 附近的谱带分别归属于蛋白质分子中 CH_3 基团对称弯曲和反对称弯曲振动^[5]. 癌变组织中 CH_3 基团反对称弯曲振动的谱带移动到 1400 cm^{-1} , 且强度显著增强(图 3). 表 2 给出了 32 例良、恶性乳腺组织这两谱带吸光度的比率 A_{1456}/A_{1400} , 显然, 在良性组织中该比值大于 1, 而癌变组织中则小于 1. 这表明相对于良性病变组织, 癌组织中蛋白质分子反对称弯曲振动 CH_3 基团数目增多. 这一差别有可能成为鉴别良、恶性肿瘤的一个判据.

2.2 核酸的谱带的变化

归属于核酸中的磷酸二酯基团 PO_2 的对称和反对称伸缩振动的谱带在良性组织分别位于 1093 、 1238 cm^{-1} 附近^[5,6]. 癌组织中这两条谱带分别位移到 1083 、 1242 cm^{-1} . 虽然组织中细胞膜内酯类的磷酸残基也含有磷酸二酯基团, 但对该谱线的贡献可以忽略不计^[3]. 胶原蛋白对这两条谱带也有贡献, 但组织发生癌变时, 胶原蛋白含量相对减少, 而 1083 cm^{-1} 谱带强度却有显著地增强(图 3), 说明此谱带主要来自于核酸的贡献. 该谱带与 1162 cm^{-1} 附近谱带吸收强度的比值 (A_{1162}/A_{1083}), 显示乳腺癌组织中核

位于 1238 cm^{-1} 两侧的“双肩峰”(1205 、 1278 cm^{-1}) 和 1338 cm^{-1} 三个低强度吸收谱带, 主要由胶原蛋白分子 C-O 基团伸缩振动引起^[5,6,10]. 由图 3 可见, 从良性病变组织→乳腺癌组织, 这些吸收谱带的强度明显减弱或消失. 18 例乳腺癌组织样品的实验结果也得出了相同的结论(表 2). 这说明乳腺癌组织中, 胶原蛋白相对含量减少. 脯氨酸和羟脯氨酸是胶原蛋白中含量较多的氨基酸, 其阻碍 α -螺旋构象的形成, 胶原蛋白以 3 股螺旋构象存在. 癌变组织中由于胶原蛋白含量减少, 所以必然导致 α -螺旋构象增多, 非典型螺旋构象含量减少. 这一推论与图 2 中的实验结果相符合.

酸含量尤其是 DNA 含量明显增加(表 2). 这一实验结果与细胞病理学中, 癌症表现为癌细胞无限增殖, 细胞中 DNA 大量复制的结论相吻合.

2.3 细胞膜中脂质 CH 基团谱带的变化

图 4 表示乳腺良性病变组织, (增生症) 和癌组织(单纯癌)样品在 $3000 \sim 2800\text{ cm}^{-1}$ 的 ATR-FTIR 谱图. 图中显示了经基线校正后的乳腺良性组织和癌组织碳氢伸缩振动部分的 ATR 光谱. 2852 cm^{-1} 和 2923 cm^{-1} 附近的谱带分别为膜脂质中 CH_2 的对称伸缩振动和反对称伸缩振动, 2870 cm^{-1} 和 2958 cm^{-1} 分别为 CH_3 基团对称伸缩振动和反对称伸缩振动, 主要来源于细胞膜中脂质末端 CH_3 和膜蛋白中 CH_3 基团^[6,7]. 从图 4 中可以看出 νCH_2 与 νCH_3 吸收强度的

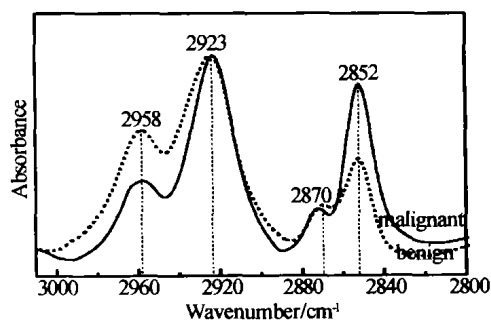


图 4 乳腺肿瘤组织中 C-H 基团的衰减全反射红外光谱
Fig. 4 ATR-FTIR spectra of C-H in breast tumor tissues

差别,说明癌变组织中 CH_2 和 CH_3 基团数目比值 $N(\text{CH}_2)/N(\text{CH}_3)$ 大于良性病变组织. 其它癌组织,如结肠癌、宫颈癌等肿瘤组织的红外光谱研究中,也发现这个比值增大的现象. 这可能与细胞脂质中亚甲基链结构发生改变有关. 肿瘤组织中膜脂质的 CH_2 链比良性病变组织取向更加趋向无序.

3 结论

通过以上实验研究可以看出,人乳腺良、恶性肿瘤组织的 ATR-FTIR 光谱存在明显差异. 这些差异来源于组织中生物大分子功能基团振动方式的改变,反映组织细胞中大分子组成、构象的变化. 具体表现在:与良性病变组织相比,1) 癌变组织中胶原蛋白含量降低,细胞蛋白质 C-OH 基团被磷酸化,使某些氨基酸残基的 C-OH 基团氢键大部分受到破坏,使蛋白质分子的 α -螺旋构象含量显著增加, β -折叠构象的含量减少;2) 蛋白质分子中 CH_3 基团对称弯曲和反对称弯曲振动两谱带的吸收强度比值 A_{1456}/A_{1400} 在乳腺良、恶性组织中分别为大于1和小于1,这有可能成为鉴别良、恶性肿瘤的一个判据;3) 核酸中磷酸二脂基团 PO_2^- 的对称伸缩振动谱带强度显著增加,丝氨酸等氨基酸残基 C-O(H) 谱带与该谱带吸光度比值 A_{1162}/A_{1083} 小于0.85(良性组织的大于0.9),表明癌组织中核酸含量的明显增加. 4) 细胞膜中脂质 CH_2 与 CH_3 基团数目比值 $N(\text{CH}_2)/N(\text{CH}_3)$ 大于良性病变组织,这可能使膜脂质的 CH_2 链取向更加趋向无序.

根据乳腺良、恶性肿瘤组织的 ATR-FTIR 光谱的这些特征,同时考虑到与光纤传感技术相结合,由此预见,ATR-FTIR 光谱学可以成为乳腺肿瘤原位活体诊断的有利工具.

参考文献

- 1 王水才,贺俊芳,彭菊芳,等. 超快微光分子光谱探测技术研究. 光子学报,2004,33(7):871~876
Wang S C, He J F, Peng J F, et al. *Acta Photonics Sinica*,

- 2004,33(7):871~876
- 2 许棠,张春平,王新宇,等. 连续光在生物组织中能流率分布的漫反射近似和模拟. 光子学报,2003,32(5):571~575
Xu T, Zhang C P, Wang X Y, et al. *Acta Photonics Sinica*, 2003,32(5):571~575
- 3 Rigas B, Wong P T T. Human colon adenocarcinoma cell lines display infrared spectroscopy features of malignant colon tissues. *Cancer Research*, 1992, 52(1):84~88
- 4 Benedetti E, Teodori L, Trinca M L, et al. A new approach to human solid tumor cells. *Applied Spectroscopy*, 1990,44(8):1276~1280
- 5 Marc M, Joellen W, Jiashu T, et al. Breast cancer detection by fourier transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 1996,10:341~346
- 6 慈云祥,高体玉,冯军,等. 乳腺癌变组织的 Fourier 变换红外光谱研究. 科学通报,1998,43(24):2627~2631
Ci Y X, Gao T Y, Feng J, et al. *Chinese Science Bulletin*, 1998, 43(24):2627~2631
- 7 霍红,胡祥,关宏伟,等. 人体乳腺癌组织红外光谱特征的研究. 高等学校化学学报,2000,21(8):1244~1247
Huo H, Hu X, Guan H W, et al. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2000,21(8):1244~1247
- 8 Jackson M, Mantsch H H. Biomembrance structure from FT-IR spectroscopy. *Spectrochim Acta Rev*, 1993,15(1):53~69
- 9 Wong P T T, Lacelle S, Yazdi H M. Normal and malignant human colonic tissues investigated by pressure tuning FT-IR spectroscopy. *Appl Spectrosc*, 1993,47(11):1830~1836
- 10 吴谨光. 近代傅立叶变换红外光谱术及应用. 北京:科技文献出版社,1994. 234~236
Wu J G. *Modern Fourier Transformation Infrared Spectrometry and Applications*. Beijing: Publishing House of Technical Literature, 1994. 234~236
- 11 Parker F S. Application of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry. *New York: Plenum*, 1983, 349~398

Studies on Breast Cancer Tissues With ATR-FTIR Spectroscopy

Yu Ge¹, Lu Shuhua², Xu Jialin¹, Zhang Cunzhou¹, Zhang Chunping¹

¹ Photonics Center, Institute of Physics, Nankai University, Tianjin 300071

² Tumour Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060

Received date: 2004-05-31

Abstract Attenuated total reflection (ATR) FTIR spectra of benign and malignant breast tumor tissues from 32 female patients have been determined and investigated. The spectral differences and changes (shape, peak position and relative intensities) have been observed between these two types of samples. In comparison with the benign tumor tissues, the mainly characteristic changes of malignant breast tissues involve: 1) The secondary structure of proteins in malignant tumor tissues is composed mainly of α -helix and random coil, in which α -helix structure is dominant. 2) The absorption band near 1160 cm^{-1} due to the C-O(H) stretching modes of serine, threonine, tyrosine groups evidently shifted to a higher wavenumber, suggesting that the intermolecular hydrogen bonds were nearly broken, and the collagen absorption peaks at 1205 cm^{-1} , 1278 cm^{-1} and 1338 cm^{-1} became lower or disappeared, showing its relative contents decreased. 3) The bands from the symmetric and asymmetric stretching modes of the PO_2^- of the phosphodiester groups in nucleic acid shifted to 1083 cm^{-1} and 1242 cm^{-1} , respectively, and became stronger. All these indicated that the relative content of nucleic acid increased greatly. 4) The A_{2852}/A_{2870} and A_{2923}/A_{2958} absorbance ratio were significantly higher for malignant tumor tissues than for benign breast tumor tissues. This suggested that there were changes in the conformational structure of the methylene chains of membrane lipids. These results showed that ATR-FTIR spectroscopy was able to become a powerful tool for the biochemical study and the vivo diagnosis of human breast cancers.

Keywords Attenuated Total Reflection (ATR); Fourier transformation infrared spectroscopy; Malignant breast tumor tissue; Secondary structure; Hydrogen bond



Yu Ge was born on November 20, 1962, in Heilongjiang province, China. She graduated from physics department of Heilongjiang University. Since 1997, she has been an associate professor. Now she is studying for her Ph. D. at the Institute of Physics in Nankai University. Her research interests are focused on spectroscopy application in medicine and biology.