

人胚胎干细胞与急性早幼粒细胞白血病细胞的拉曼光谱特征研究

梁昊岳, 程雪莲, 杨晚竹, 于文颖, 李长虹, 董树旭, 赵轼轩, 茹永新*

中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室,
国家血液病临床学研究中心, 天津 300020

摘要 急性早幼粒细胞白血病(APL)属于急性髓系白血病(AML), 是FAB分型中的M₃亚型。部分APL患者形成早幼粒细胞白血病/维甲酸受体融合基因, 即PML-RAR α 融合基因。在内外界多种因素的共同作用下, 早幼粒细胞白血病发病。胚胎干细胞(ESCs)具有多向分化的能力, 在一定诱导条件下, ESCs可以向造血系统分化。早幼粒细胞位于ESCs分化下游, 为粒系分化阶段的一种细胞。探索一种非标记的技术方法鉴别不同分化阶段造血细胞具有重要的科研和实践意义。拉曼光谱技术可用于多种类型疾病的鉴别诊断研究, 近年来应用前景愈加广阔。实验研究人胚胎干细胞系(ES)、急性早幼粒细胞白血病细胞系(NB4)和急性早幼粒细胞白血病患者(M₃)白血病细胞的拉曼光谱特征, 建立拉曼光谱非标记鉴别不同分化阶段白血病的方法, 为临床实验研究提供基础。分别收集胚胎干细胞系(ES)、急性早幼粒细胞白血病细胞系(NB4)和4例M₃患者白血病细胞, 使用Horiba Xplora拉曼光谱仪获取拉曼光谱, 每组或每例患者采集25~30个白血病细胞光谱。结合应用主成分分析法(PCA)、判别函数分析(DFA)、系统聚类分析和偏最小二乘判别分析(PLS-DA), 对三类细胞的光谱进行分析并建立模型, 进而对三类细胞进行鉴别, 应用交互验证法对模型进行验证。同时结合细胞超微结构分析三种细胞的拉曼光谱特征。M₃, NB4和ES细胞的拉曼光谱差别显著, 主要表现为M₃和NB4细胞光谱中对应核酸、蛋白质及脂类物质的谱峰明显高于ES细胞, 其生物学机制包含了APL与PI3K/Akt/mTOR通路的密切关系。PI3K/Akt/mTOR通路在急性早幼粒细胞白血病细胞中存在异常激活, 影响白血病细胞的生物大分子代谢; 鉴别建模的总体分类准确率达100%(181/181), 交互验证的分类准确率达98.9%(179/181), 表明鉴别模型预测能力良好。拉曼光谱分析显示M₃细胞和NB4细胞增殖代谢明显高于ES细胞, 根据PCA-DFA、聚类分析及PLS-DA建立的拉曼光谱鉴别模型能够准确区分3种不同分化阶段白血病相关细胞, 其结果与电镜结果相符。

关键词 人胚胎干细胞; 急性早幼粒细胞白血病; 拉曼光谱; 超微结构

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)01-0001-09

引言

白血病(acute leukemia, ALs)是一种恶性克隆疾病^[1], 其中多种类型预后不佳^[2]。急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)是成人中最常见的白血病, 它是造血细胞在骨髓中异常增殖和分化的结果^[3]。白血病的分类主要包括法-美-英国(FAB)和世界卫生组织(WHO)分类^[4-5]。

目前, 拉曼光谱已被用作快速和无标记方法来分析和分类具有位置特异性的细胞^[6-7]。它是一种振动光谱技术, 提供关于细胞和组织的分子组成信息^[8]。它也适用于白血病领

域的分类。Ilin等^[9]应用偏最小二乘判别分析法(PLS-DA), 区分长、短周期造血干细胞、粒细胞和淋巴细胞。Happillon等建立了区分CLL和正常淋巴细胞光谱的分类模型^[10]。Vanna等从AML和MDS患者样本中区分原始粒细胞, 早幼粒细胞, 异常早幼粒细胞和成红细胞, 并且发现MPO是重要的标志物^[11]。但是没有来自使用具有高度分化潜能的胚胎干细胞分析白血病的项目, 并发现干细胞和白血病细胞之间的差异。

实验应用拉曼光谱技术对三种不同分化阶段白血病相关细胞进行研究, 获取特征光谱数据, 通过数学模型分析建立鉴别模型, 建立以拉曼光谱技术为基础的区分不同分化阶段

收稿日期: 2018-10-29, 修订日期: 2019-02-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(81670105)资助

作者简介: 梁昊岳, 1987年生, 北京协和医学院卫生主管技师

e-mail: lianghaoyue@ihcams.ac.cn

* 通讯联系人 e-mail: ruyongxin@ihcams.ac.cn

白血病相关细胞的新方法。同时,结合白血病相关细胞的超微结构,对拉曼光谱特征进行探讨,以期研究白血病细胞分化并进行早期鉴别提供一种新方法。

1 实验部分

1.1 人胚胎干细胞和急性早幼粒细胞白血病细胞系的培养与传代

人胚胎干细胞株 H1 培养于培养板中,培养基为 mTeSR (STEM CELL Technologies)。H1 细胞克隆传代,在 37 °C 孵箱中孵育 6~8 min,加入 DMEM/F12 培养基洗 3 次,收集细胞悬液,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。mTeSR 培养基重悬后,平均分入培养皿中。H1 单细胞传代,使用 1 mg·mL⁻¹ Accutase、37 °C 消化细胞 3 min。DMEM/F12 基础培养基重悬细胞悬液,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。

急性早幼粒细胞白血病细胞系 NB4 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度孵箱中培养。

1.2 标本收集

选取天津血液病医院 2016 年急性早幼粒细胞白血病患者,主要为 2016 年 1 月到 6 月在我院住院的患者,其中男 2 例,女 2 例,年龄最小 4 岁,最大 46 岁,中位年龄 43.5 岁。经骨髓穿刺,并进行细胞形态学、流式细胞术和电子显微镜等检查,主要以细胞形态和组化为依据,根据 FAB 确诊。

1.3 电镜检测

淋巴细胞分离液分离有核细胞,部分细胞做常规电镜观察,其余部分做髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)染色。然后锇酸固定、脱水、浸透、包埋、切片和染色。日立 H-600(日本)透射电镜观察。根据细胞结构分析,按 FAB 形成电镜诊断。

1.4 拉曼光谱检测

将分离液分离的有核细胞或培养的细胞系细胞通过甩片机 Cytospin4(Thermo Fisher Scientific, 美国)均匀涂于石英玻片上。本研究采用共聚焦拉曼光谱仪 XploRA Raman microscope(HORIBA Scientific, 法国)对目的细胞检测。以 785 nm 激光作为激发光,功率为 40 mW,记录波数范围为 600~1 800 cm⁻¹,通过镜下观察,随机选取一个目的细胞,在扫描拍摄中通过×40 0.75 NA 尼康镜头将约 40 mW 激发激光束聚焦到样品上 2 μm×2 μm 的光斑大小尺寸上。每种白血病患者检测 20~30 个细胞,每个细胞标本区域扫描累积时间为 250 s,分辨率为 1 cm⁻¹。应用 Labspec6 软件(BC Cancer Research Center, 加拿大),平滑系数为 1,消除噪声信号、去除荧光背景并对光谱进行平滑,并在整个光谱区域校正多点基线。所有光谱以各自的 1 450 cm⁻¹ 拉曼峰进行归一化。

1.5 拉曼光谱数据分析及鉴别模型建立

采用 SPSS Statistics 20(IBM, USA)软件处理数据,对人胚胎干细胞系、急性早幼粒细胞白血病细胞系(NB4)和急性早幼粒细胞白血病患者(M₃)骨髓白血病细胞进行主成分分析、判别分析和聚类分析。应用主成分分析(principle component analysis, PCA)法对获得的拉曼光谱数据进行 PCA。

应用判别函数分析(discrimination function analysis, DFA)对获取的主成分数据进行分析,建立鉴别模型对 ESCs, NB4 和 M₃ 患者白血病细胞的光谱数据进行鉴别,应用交互验证(cross-validation)的方法对鉴别模型进行验证。采用 SIMCA-P (Ver 14.1, Umetrics, Umea, Sweden)软件对三组细胞进行偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)。所有数据操作使用 Origin(OriginLab, Northampton, MA)、Graphpad Prism5(Graphpad Software, USA)和 Volocity(Perkin Elmer, USA)软件进行。

2 结果与讨论

2.1 三组细胞瑞氏-吉姆萨染色光学显微镜成像与电子显微镜成像结果

从图 1(a)吉姆萨染色的病理图中可以看出 M₃ 细胞核不规则,胞浆含大量颗粒。图 1(b)中 NB4 细胞胞浆少,核质比大,细胞核规则,核仁不明显。图 1(c)中 ES 细胞胞浆稀少,异染色质多,核仁不明显,无致密颗粒。图 1(d)的电镜结果显示 M₃ 细胞富含颗粒,内质网扩张。图 1(e)中 NB4 细胞颗粒少,细胞核轻度不规则。图 1(f)中 ES 细胞核仁明显,无颗粒。M₃ 细胞胞浆内所含颗粒主要为 MPO 颗粒。为了确认拉曼数据,从形态学成像计算细胞核质比例。我们从图 1(a)~(c)选取 20~24 个细胞计算核质比例。M₃, NB4 和 ES 细胞的平均比例依次上升[图 1(g)]。通过形态学成像获得的数据与通过拉曼显微镜获得的数据一致。然后通过 TEM 图像分析 MPO 含量。在 TEM 图像中清楚地显示了含有亚细胞水平的 MPO 颗粒的分布[图 1(d)~(f)]。M₃ 细胞显示强烈的 MPO 活性[图 1(d)]。NB4 细胞含有一些显示细胞质中 MPO 活性较弱的细颗粒[图 1(e)]。ES 细胞中 MPO 的分布非常少[图 1(f)]。三种不同分化阶段白血病相关细胞中 MPO 含量的变化趋势与 MPO 带(1 581 cm⁻¹)收集的拉曼数据一致。

2.2 三组细胞平均拉曼光谱的外形比较

本研究共获得不同分化阶段白血病相关细胞拉曼光谱 181 例,其中 ES 细胞特征光谱 29 例, NB4 细胞特征光谱 25 例, M₃ 细胞特征光谱 127 例(图 2)。细胞拉曼光谱的分子结构和峰位归属见表 1。在 600~1 800 cm⁻¹ 的范围内可见三种不同分化阶段白血病相关细胞拉曼光谱呈现多个谱峰,形态相近。通过对比平均光谱,获得差异性光谱,显示不同种细胞间的拉曼光谱存在一定差异(图 3)。在 M₃ 细胞和 NB4 细胞差异光谱中, M₃ 细胞在 754, 781, 852, 1 003, 1 033, 1 121, 1 157, 1 215, 1 340, 1 551, 1 581 cm⁻¹ 等处对应的谱峰明显强于 NB4 细胞,其中 852, 1 003, 1 033, 1 157 和 1 551 cm⁻¹ 反映样本细胞内蛋白质的结构及含量, 781, 1 340, 1 581 cm⁻¹ 与核酸相关,在这些波数处谱峰强度的变化表明 M₃ 细胞中的 DNA, RNA 和蛋白质等物质的含量明显高于 NB4 细胞。M₃ 细胞在 754, 1 003, 1 121, 1 157, 1 173, 1 215, 1 340, 1 551 和 1 581 cm⁻¹ 等处的谱峰强于 ES 细胞,表明前者核酸、蛋白质、脂类等物质的含量较高。NB4 细胞和 ES 细胞拉曼光谱的比较显示,前者在 622, 643, 781, 852, 934, 1 003, 1 340 和 1 581 cm⁻¹ 谱峰明显高于 ES

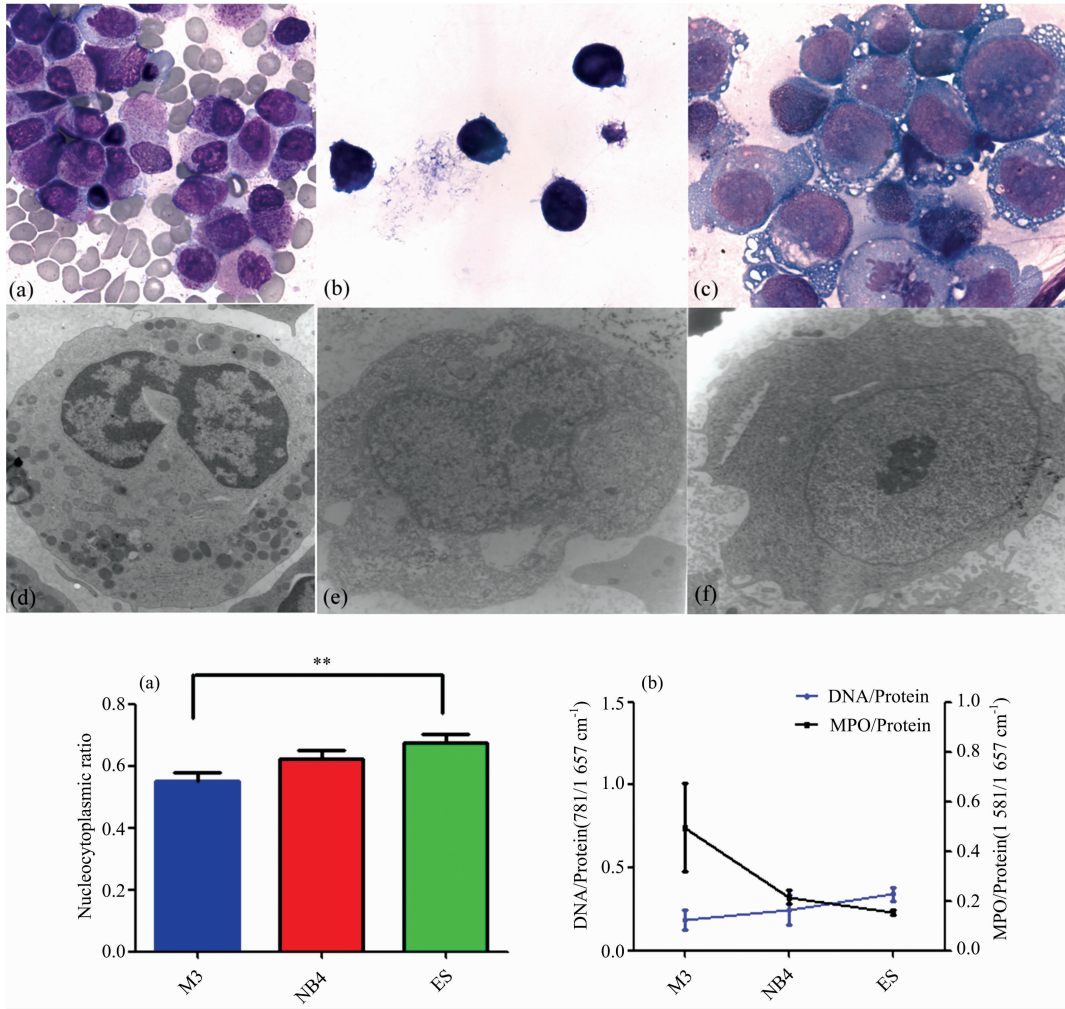


图 1 三组细胞形态学分析结果

(a) — (c): M₃, NB₄, ES 细胞瑞氏-吉姆萨染色结果; (d) — (f): M₃, NB₄, ES 细胞透射电镜结果; (g): 数字化图像中 M₃, NB₄, ES 细胞核质比率计算结果; (h): M₃, NB₄, ES 细胞 MPO 含量和核质比率平均值比较 (** $p < 0.01$)

Fig. 1 Morphological analysis of three groups of cells

(a) — (c): Wright-Giemsa staining result of M₃, NB₄, ES cell; (d) — (f): TEM result of M₃, NB₄, ES cell; (g): Calculation of nucleocytoplasmic ratio of M₃, NB₄, ES cell in digitization images; (h): Comparison of averaged intensity of MPO content and nucleocytoplasmic ratio of M₃, NB₄, ES cell (** $p < 0.01$)

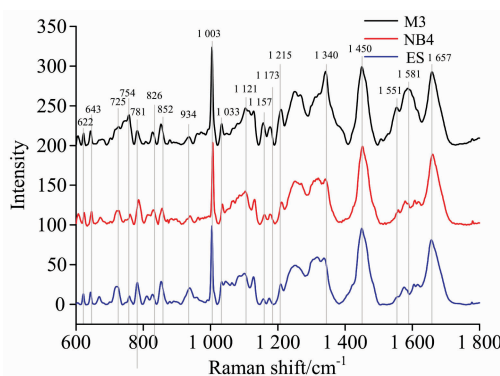


图 2 三组细胞平均拉曼光谱

Fig. 2 The mean spectrum of the three groups with Raman peaks

细胞, 其中 622, 643, 852, 934 和 1 003 cm⁻¹与蛋白质有关, 781, 1 340 和 1 581 cm⁻¹与核酸组分有关, 提示 NB₄ 细胞内蛋白质和核酸等物质与 ES 细胞存在较大差异。上述结果显示白血病细胞的整体活跃程度高于相对原始的胚胎干细胞, 这与 PI3K/Aku/mTOR 通路有密切关系。例如 mTOR 复合物 1(mTORC1)通过调控 RNA 翻译、线粒体基因转录、磷酸化线粒体蛋白、参与糖酵解等方式, 控制线粒体活性和生物合成。mTORC1 也可促进磷酸戊糖途径相关基因表达来促进核酸生成。mTORC1 也可通过调节核糖体合成(mTORC1-S6K-S6 通路)和 mRNA 的转录起始来调控蛋白质合成。此外, mTORC1 可通过激活脂肪合成基因的调控分子 SREBP 来促进脂肪生成。更为重要的是, mTOR 可以抑制细胞的过度自噬。上述生物学过程解释了白血病细胞光谱在核酸、蛋白质及脂类等物质谱峰强度高于 ES 细胞的原因。电镜下观

察到 M3 细胞胞浆中存在大量 MPO 颗粒, 数量明显高于 NB4、ES 细胞。MPO 是一种含血红素辅基的血红素蛋白酶。因此三组白血病相关细胞平均光谱在 754, 1 121, 1 215 和 1 581 cm^{-1} 峰位上存在明显的差异, 这对通过拉曼光谱鉴别三种白血病相关细胞具有潜在的应用价值。

2.3 三组细胞拉曼光谱的主成分分析-判别分析结果

通过对 ES、NB4 和 M₃ 患者骨髓白血病细胞的光谱数据进行 PCA 分析, 从每张光谱 1211 个数据点提出 79 个主成分, 累积变异性 97%。将提取出的 181 张光谱数据的主成分进行 DFA 分析, 建立鉴别模型。在 DFA 鉴别分类过程中, ES 鉴别准确率为 100% (29/29), NB4 鉴别准确率为 100% (25/25), M₃ 鉴别准确率为 100% (127/127), 总体鉴别准确率达 100% (181/181)。本研究采用交互验证的方法对鉴别模型进行检验, ES 鉴别准确率为 100% (29/29), NB4 鉴别准确率为 96% (24/25), M₃ 鉴别准确率为 99.2% (126/127), 而通过交互验证检验后鉴别模型的总体准确率达 98.9%

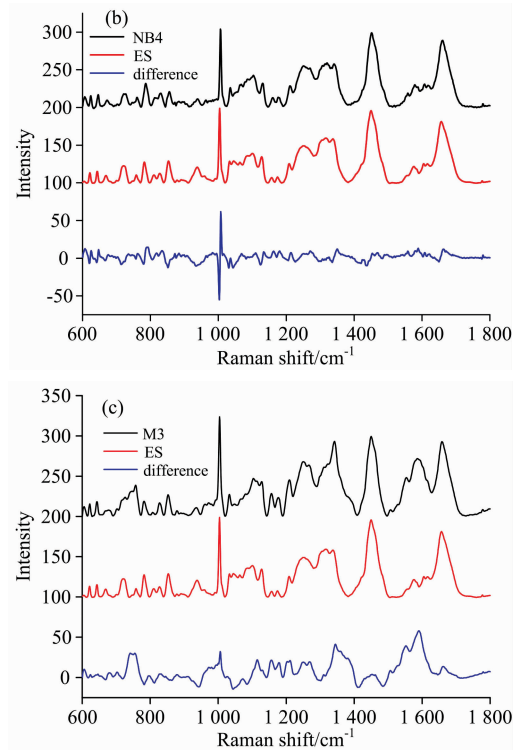
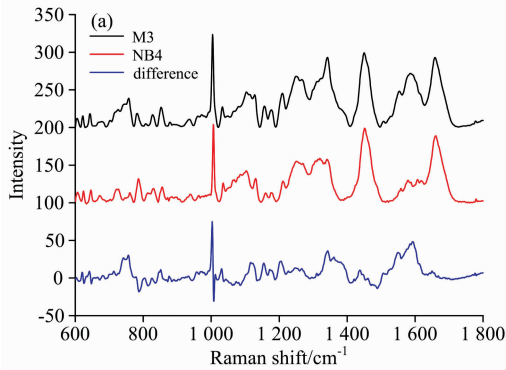


图 3 三组细胞的平均和差异谱

(a): M₃, NB4; (b): NB4, ES; (c): M₃, ES

Fig. 3 The mean and difference spectrum of the three groups

(a): M₃, NB4; (b): NB4, ES; (c): M₃, ES

表 1 细胞拉曼光谱的分子结构和峰位归属

Table 1 Molecular structure and peak assignments for Raman spectra of cells acquired

Peak position/ cm^{-1}	MPO	Nucleic Acids	Proteins	Lipids	Carbohydrates
622			phenylalanine		
643			tyrosine		
728		A	C—S	CH ₂ rocking	CH ₂ rocking
734	MPO				
754	MPO				
781		O—P—O, C, U, T			
826		O—P—O stretch			
852			tyrosine		
879			Tryptophan		
934			C—C		
1 003			phenylalanine		
1 033			Phenylalanine stretch		
1 060~1 195		C—C stretch	C—N stretch	C—C stretch	
1 087~1 101		C—C stretch	C—C or PO ₂ stretch	C—C stretch	
1 117				C—N stretch	
1 121	MPO		C—C stretch		glucose
1128			C—N stretch	C—C stretch	glucose
1 157			C—C(C—N) stretch		
1 158~1 171			Tyrosine C—C (C—N) stretch		
1 173			tyrosine		carbohydrates
1 208			Tryptophan		

续表 1

1 215	MPO			
1 240			Amide III	
1 250			Amide III	
1 300				CH ₂ deformation
1 313			CH ₃ CH ₂ twisting	CH ₃ CH ₂ twisting
1 336	Polynucleotide chain			
1 340	Polynucleotide chain			
1 361	MPO			
1 415		A, G ²		
1 437				CH ₂ deformation
1 450			CH ₂ binding	
1 545~1 600	MPO			
1 581	MPO	Pyrimidine ring		
1 596	MPO			
1 658			Amide I	C=C deformation

(179/181), 表明鉴别模型预测能力良好(表 2)。本文从 3 类细胞拉曼光谱结果中随机抽取 30 张特征光谱(每类 10 张), 组成三组数据。图 4 显示 3 组数据的二维分布和三维分布, 表明应用 PCA-DFA 方法可以很好地鉴别 ES, NB4 和 M₃ 患者骨髓白血病细胞的光谱数据。

将 ES 细胞(1~10)、NB4(11~20)和 M₃ 细胞(21~30)拉曼光谱区分为三大类。

表 2 基于 PCA-DFA 的三组细胞分类和交互验证结果

Table 2 Classification and cross-validation result of the three groups based on PCA-DFA

		Classification Results ^{a,c}				
		Sample	Predicted group membership			Total
			ES	NB4	M3	
Original	Count	ES	29	0	0	29
		NB4	0	25	0	25
		M3	0	0	127	127
	%	ES	100.0	0	0	100.0
		NB4	0	100.0	0	100.0
		M3	0	0	100.0	100.0
Cross-validated ^b	Count	ES	29	0	0	29
		NB4	0	24	1	25
		M3	0	1	126	127
	%	ES	100.0	0	0	100.0
		NB4	0	96.0	4.0	100.0
		M3	0	0.8	99.2	100.0

a: 100.0% of original grouped cases correctly classified; b: Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case; c: 98.9% of cross-validated grouped cases correctly classified.

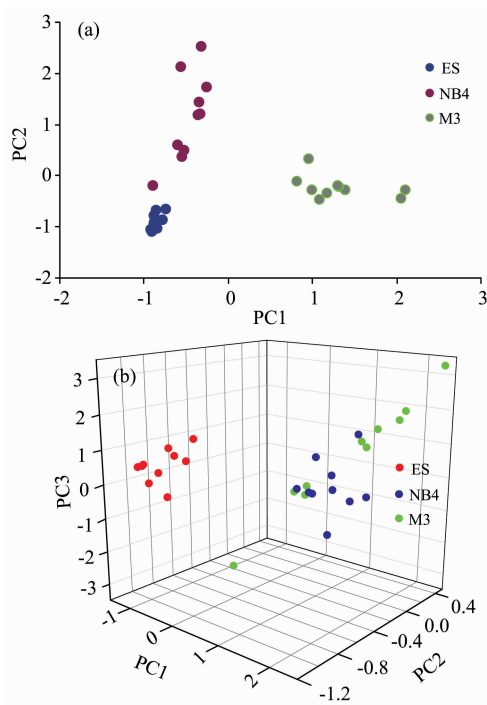


图 4 主成分分析结果

(a): 二维图; (b): 三维图

Fig. 4 PCA result

(a): 2D plot using scores of PC1 and PC2;

(b): 3D plot using scores of PC1, PC2 and PC3

2.4 系统聚类分析

系统聚类法是目前最常用的一种聚类方法。使用前文所述方法从 3 类细胞拉曼光谱结果中随机抽取 30 张特征光谱(每类 10 张), 组成三组数据。由图 5 可知, 该方法能很好地

2.5 三组细胞拉曼光谱的偏最小二乘判别分析结果

为了更好的区分 ES, NB4 和 M₃ 细胞的拉曼光谱差异, 区分这三种细胞的特异性生物标志物, 在 PCA 分析结果的基础上对数据进一步运用有监督的模式识别方法——偏最小二乘判别分析(PLS-DA)对样本数据进行分析比较。如图 6 所示, 使用前文所述分组方法, 三种细胞被成功区分。模型质量参数 $R^2 X=0.684$, $R^2 Y=0.979$, $Q^2=0.937$, 模型质量参数表示该模型概括了第一主成分($t[1]$)和第二主成分($t[2]$)两种整体信息的 68.4%, 能解释因变量 97.9% 的变异

信息, 模型可预测准确程度为 93.7%。三种细胞中起主要区分作用的峰位在于 MPO 相关峰(754, 1 121, 1 215 和 1 581 cm^{-1})、蛋白质相关峰(934, 1 003 和 1 450 cm^{-1})以及核酸相关峰(826 和 1 340 cm^{-1})。

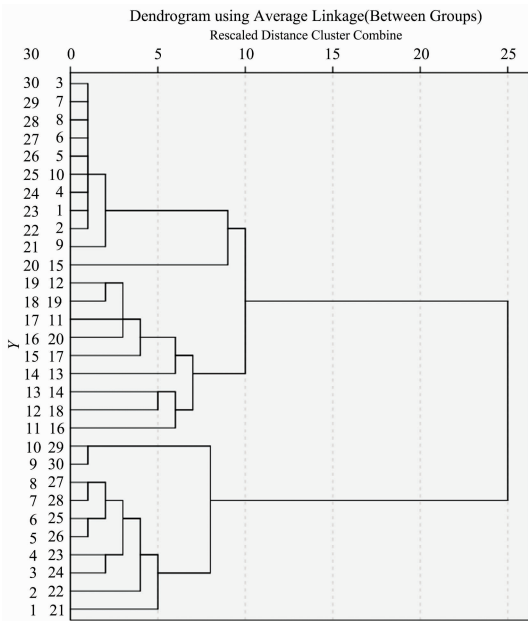


图 5 三组细胞聚类分析树状图

Fig. 5 Dendrogram of cluster analysis of the three groups

2.6 三种细胞两两组合进行偏最小二乘判别分析结果和潜在变量负荷

为了进一步客观地验证三种细胞的拉曼谱峰差别, 在差异谱的基础上将三种细胞两两组合进行 PLS-DA 并分析载荷表征情况。如图 7(a)–(c)所示, 三种细胞被两两成功区分, PLS 拟合参数如下: (a) $R^2 X(\text{cum}) = 0.634$, $R^2 Y(\text{cum}) = 0.99$ 和 $Q^2(\text{cum}) = 0.966$, (b) $R^2 X(\text{cum}) = 0.581$, $R^2 Y(\text{cum}) = 0.991$ 和 $Q^2(\text{cum}) = 0.941$, (c) $R^2 X(\text{cum}) = 0.496$, $R^2 Y(\text{cum}) = 0.99$ 和 $Q^2(\text{cum}) = 0.945$ 。表明大部分方差由模型解释, PLS-DA 得分图模型参数良好, 并且拟合程度良好。使用这种方法, 我们清楚地将其他三种不同分化阶段细胞区分开。通过载荷分析, ES 细胞在核酸峰(781, 826 和 1 340 cm^{-1})高于 M_3 细胞, 这与影像学观察到的 ES 细胞具有较高的细胞核与细胞质比率一致, 符合处于分化早期的原始细胞的一般特征。MPO 相关峰(754, 1 121, 1 215 和 1 581 cm^{-1})是区分三种细胞的主要因素之一, 在 M_3 , NB4 和 ES 细胞中的含量依次减少, 这一现象与三种细胞超微结构观察到的颗粒依次减少相符。其余蛋白相关峰(622, 643, 852, 934, 1 003, 1 450 和 1 551 cm^{-1})反映了三种细胞的活跃程度和增值代谢依 M_3 , NB4 和 ES 顺序逐渐递减, 这与它们所处的分化阶段有关, 也与拉曼差异谱反映的信息一致, 但并非如 MPO 和细胞核质比率具有较高的特异性。

3 结论

该研究证明了拉曼光谱作为基于内在分子指纹的临床工

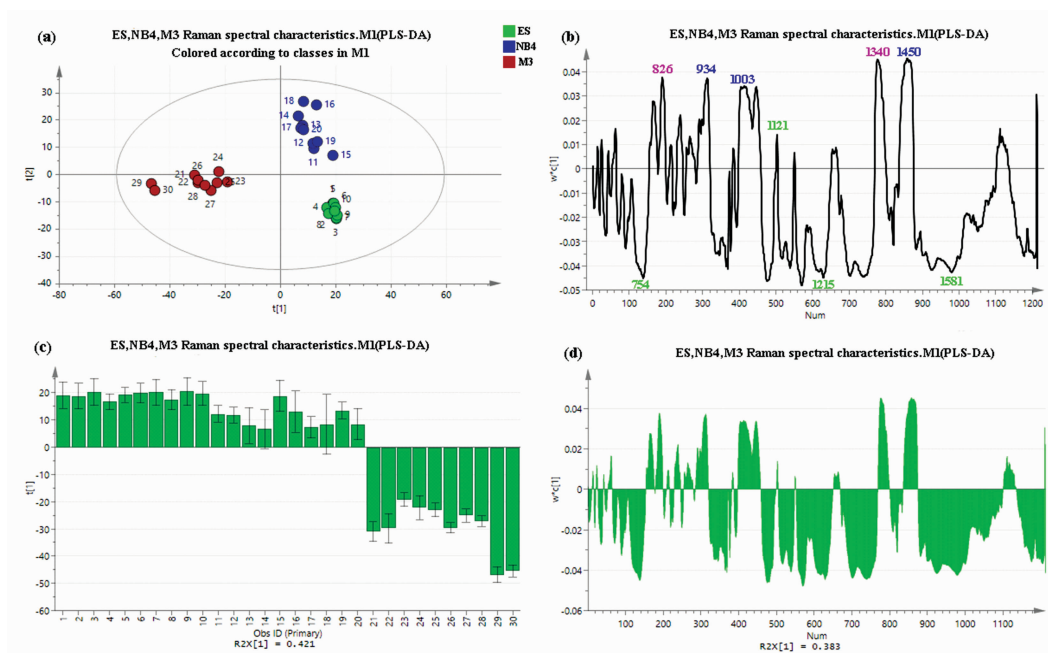


图 6 三种细胞的 PLS-DA 分析结果

粉红色, 绿色, 和蓝色数字分别与核酸, MPO 和蛋白质相关

Fig. 6 PLS-DA result of the three groups

(a): Score scatter plot; (b): Loading line plot;

The pink, green and blue numbers are associated with nucleic acid, MPO and protein respectively;

(c): Score column plot; (d): Loading column plot

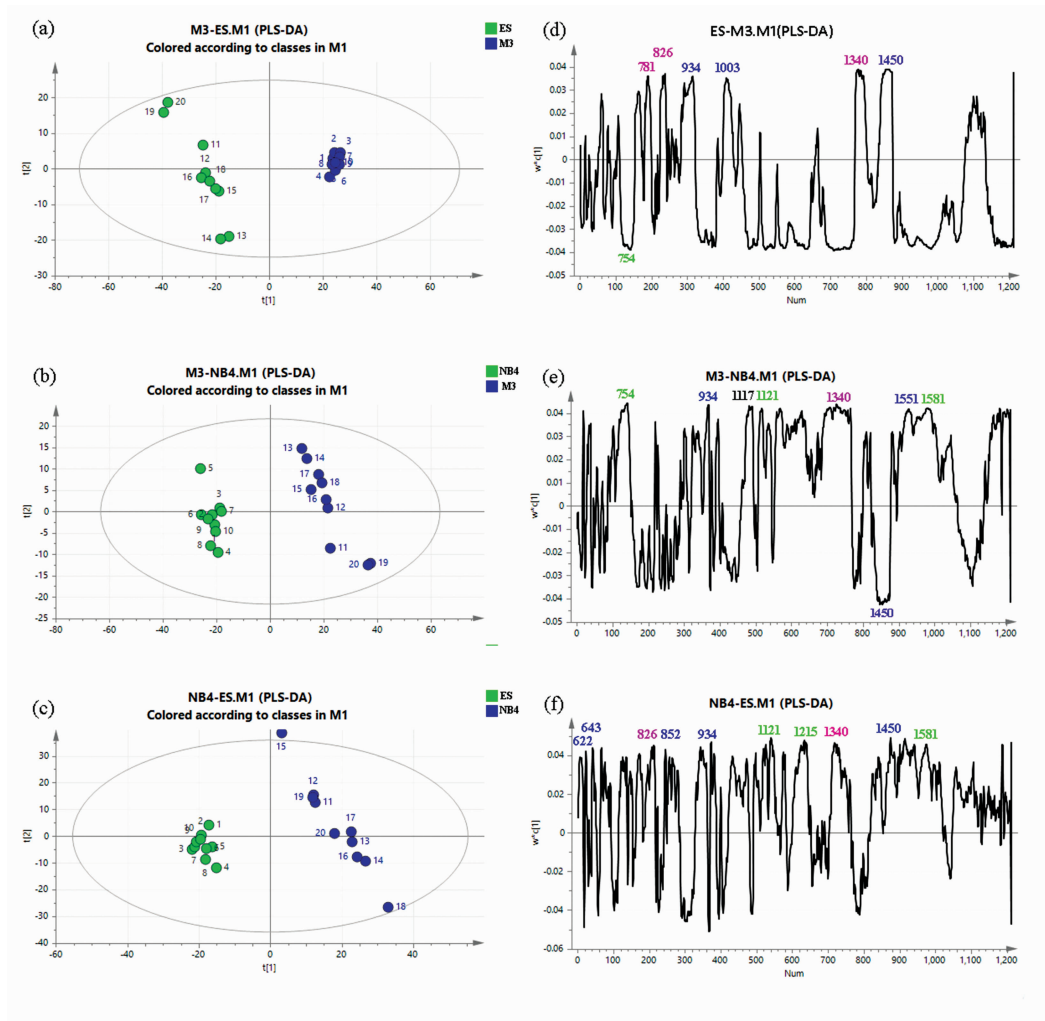


图 7 三种细胞两两组合 PLS-DA 模型中的分类散点图和潜在变量负荷
 粉红色, 绿色, 蓝色和黑色数字分别与核酸, MPO, 蛋白质和碳水化合物相关
Fig. 7 Score plot and loading plot for PLS-DA model from two combinations of
 the three groups (a—c) are score plots and (d—f) are loading plots

The pink, green, blue and black numbers are associated with
 nucleic acid, MPO, protein and Carbohydrates respectively

具来研究不同分化阶段白血病相关细胞的潜力^[12]。据我们所知, 这是有关人胚胎干细胞和早幼粒细胞白血病之间的第一个研究。我们已经证明, ES 细胞、NB4 细胞和 M3 细胞中主要的区别光谱特征是由于不同的 MPO 含量和核胞质比率。这些分子变化可以用作光谱标记以区分不同分化阶段早幼粒细胞白血病相关细胞。证明了利用拉曼光谱和 PLS-DA 来识别白血病相关细胞的谱系特异性分化阶段的可行性。这表明微小的变化可以在拉曼光谱的 PLS-DA 模型中捕获并用于鉴定细胞谱系。本研究通过 PCA-DFA 建立的鉴别模型总

体准确率为 100%, 交互验证后准确率为 98.9%, 表明该模型预测性较好。系统聚类对不同种白血病细胞具有理想的甄别能力。

显微拉曼光谱技术与 PCA-DFA、系统聚类、PLS-DA 等分析方法相结合, 不仅可以识别胚胎干细胞和急性早幼粒细胞白血病细胞内化学成分的区别, 并可以根据这些差异鉴别处于不同分化阶段的白血病相关细胞, 探索细胞命运, 具有广阔的科学价值。

References

- [1] Dores G M, Devesa S S, Curtis R E, et al. *Blood*, 2012, 119(1): 34.
- [2] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2015, 65(2): 87.
- [3] WANG Rong, MIU Kou-rong, QIU Hai-rong, et al(王 蓉, 缪扣荣, 仇海荣, 等). *Journal of Experimental Hematology(中国实验血液学杂志)*, 2011, 19(4): 983.
- [4] Bain B J, Estcourt L. *Brenners Encyclopedia of Genetics*, 2013, (1): 5.
- [5] Arber D A, Orazi A, Hasserjian R, et al. *Blood*, 2016, 127(20): 2391.
- [6] Ghita A, Pascut F C, Sottile V, et al. *EPJ Techniques & Instrumentation*, 2015, 2: 6.
- [7] Vendrell M, Maiti K K, Dhaliwal K, et al. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(4): 249.
- [8] Lee J S, Kim S K, Cha J K, et al. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2016, 22(10): 941.
- [9] Ilin Y, Choi J S, Harley B A C, et al. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(22): 11317.
- [10] Happillon T, Untereiner V, Beljebbar A, et al. *Analyst*, 2015, 140(13): 4465.
- [11] Vanna R, Ronchi P, Lenferink A T, et al. *Analyst*, 2015, 140(4): 1054.
- [12] Teddy H, Valérie U, Abdelilah B, et al. *Analyst*, 2015, 140(13): 4465.

Raman Spectral Characteristics of Human Embryonic Stem Cells and Acute Promyelocytic Leukemia Cells

LIANG Hao-yue, CHENG Xue-lian, YANG Wan-zhu, YU Wen-ying, LI Chang-hong, DONG Shu-xu, ZHAO Shi-xuan, RU Yong-xin*

State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Disease Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Abstract Acute promyelocytic leukemia (APL) belongs to acute myeloid leukemia (AML) and is an M_3 subtype in FAB typing. Some APL patients develop a promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor fusion gene, the PML-RAR α fusion gene. Under the combined action of various factors inside and outside, promyelocytic leukemia is onset. Embryonic stem cells (ESCs) have the ability to multi-differentiate. Under certain induction conditions, ESCs can differentiate into hematopoietic system. Promyelocytes are located downstream of ESCs differentiation and are a cell in the granulocyte differentiation stage. Exploring a non-labeled technical method to identify hematopoietic cells at different stages of differentiation has important scientific and practical significance. Raman spectroscopy can be used for differential diagnosis of many types of diseases, and its application prospects have become more extensive in recent years. This experiment investigated the Raman spectral characteristics of human embryonic stem cells leukemia cell line (ES), acute promyelocytic leukemia cell line (NB4) and leukemia cells from 4 patients with acute promyelocytic leukemia (M_3), established a novel Raman label-free method to distinguish leukemia-related cells of distinct differentiation stages and provided basis for clinical research. Leukemia cells were collected from human embryonic stem cell line, acute promyelocytic leukemia cell line and bone marrow of patients. Raman spectra were acquired by Horiba Xplora Raman spectrometer and Raman spectra of 25~30 cells from each group or each patient were recorded. The diagnostic model was established according to principle component analysis (PCA), discriminant function analysis (DFA), cluster analysis and partial least squares discrimination analysis (PLS-DA), and the spectra of three kinds of cells were analyzed and classified. Characteristics of Raman spectra were discussed combined with ultrastructure of leukemia cells. There were significant differences among Raman spectra of three kinds of leukemia-related cells. Compared with ES cells, the spectra of acute promyelocytic leukemia cells showed stronger peaks which contributed to nucleic acids, proteins and lipids. Its biological mechanism involved the close relationship between APL and the PI3K/Akt/mTOR pathway. The PI3K/Akt/mTOR pathway was abnormally activated in acute promyelocytic leukemia cells, affecting the biomacromolecular metabolism of leukemia cells. The diagnostic models established by PCA-DFA, cluster analysis and PLS-DA could successfully classify these Raman spectra of different cells with a high accuracy of 100% (181/181). The model was evaluated by "Leave-one-out" cross-validation and reached a high accuracy of 98.9% (179/181). The proliferation and metabolism of M_3 cells and NB4 cells were higher than those of ES cells. The diagnostic models established by PCA-DFA, cluster analysis and PLS-DA can classify these Raman spectra of different cells with a high accuracy. Raman spectra show consistent result with ultrastructure by TEM.

Keywords Human embryonic stem cells; Acute promyelocytic leukemia; Raman spectroscopy; Ultrastructure

* Corresponding author

(Received Oct. 29, 2018; accepted Feb. 6, 2019)

《光谱学与光谱分析》投稿简则

《光谱学与光谱分析》是由中国科协主管,中国光学学会主办,钢铁研究总院、中国科学院物理研究所、北京大学、清华大学共同承办的专业学术期刊。国内外公开发行人,从 2004 年起为月刊,大 16 开本,2020 年仍为月刊,每期 332 页。《光谱学与光谱分析》主要报道我国光谱学与光谱分析领域内具有创新性科研成果,及时反映国内外光谱学与光谱分析的进展和动态;发现并培育人才;推动和促进光谱学与光谱分析的发展。为科教兴国服务。读者对象为从事光谱学与光谱分析的科研人员、教学人员、分析测试人员和科研管理干部。

栏目设置和要求

1. 研究报告 要求具有创新性的研究成果,一般文章以 8000 字(包括图表、参考文献、作者姓名、单位和中文、英文摘要,下同)为宜。

2. 研究简报 要求在前人研究的基础上有重大改进或阶段性研究成果,一般不超过 5000 字。

3. 评述与进展 要求评述国内外本专业的发展前沿和进展动态,一般不超过 10000 字。

4. 新仪器装置 要求介绍新型光谱仪器的研制、开发、使用性能和应用,一般不超过 5000 字。

5. 来稿摘登 要求测试手段及方法有改进并有应用交流价值,一般以 3000~4000 字为宜。

稿件要求

1. 投稿者请经本刊编委(或历届编委)一人或本专业知名专家推荐,并附单位保密审查意见及作者署名顺序,主要作者介绍。文章有重大经济效益或有创新者,请说明,同时注明受国家级基金或国家自然科学基金资助情况。

2. 来稿要观点明确、数据真实可靠、层次分明、言简意明、重点突出。来稿必须是网上在线投稿(含各种符号和外文字母大写、小写、正体、斜体;希腊字母、拉丁字母;上角、下角标位置应标清楚)。中文摘要以 800 字为宜,英文摘要(建议经专业英语翻译机构润色)与中文摘要要对照;另附关键词。要求来稿应达到“齐、清、定”,中文、英文文字通顺,方可接受送审。

3. 为了进一步统一和完善投稿方式、缩短论文发表周期,本刊只接收网上在线投稿,不接收以邮寄方式或 e-mail 方式的投稿,严禁“一稿多投”,对侵权、抄袭、剽窃等学术不端行为,一经发现,取消三年投稿资格。

4. 文中插图要求完整,图中坐标、线条、单位、符号、图注等应标注准确、完整。如作者特殊要求需出彩色插图者,必须在投稿时事先加以说明,并承担另加的彩印费用。图幅大小:单栏图 7.5cm(宽)×6cm(高);双栏图:14cm(宽)×6cm(高);图中数字、图题、表题全部用中文、英文对照,图中数字、中文、英文全用 6 号字。电子文档中除实物图外,曲线图要用 Matlab, Excel, Visio 或 Origin 等软件制作,稿件中图片的原图并转成相应(可编辑)的文件格式(.fig, .xls, .vsd, .opj),非“.jpg”格式的文档,随电子版修改稿一同发送到本刊的修改稿专用邮箱。

5. 文中出现的单位必须按“中华人民共和国计量标准”及有关 GB 标准规定缮写。物理量符号一律用斜体,单位符号和词头用正体字母。

6. 名词术语,请参照全国科学技术名词规定缮写。

7. 参考文献,采用顺序编码制,只列主要文献;以 15~20 条为宜。内部资料、私人通讯、未经公开发表的一律不能引用。日文、俄文等非英文文献,请用英文表述;中文文献和中文图书采用中、英文对照表述,文献缮写格式请参照本刊。

8. 请在投稿第一页左下角写明投稿联系人的电话和两个 e-mail,以便及时联系。

稿件处理

1. 自收到稿件之日起,一个月内作者会收到编辑部的稿件处理意见。请根据录用通知中所提出的要求认真修改,希望修改稿在 30 天内寄回编辑部,并作为作者最终定稿(当作者接到校样时,以此修改稿为准进行校对,请勿再做大的改动),若二个月内编辑部没收到修改稿,将视为自行撤稿处理。

2. 有重大创新并有基金资助者可优先发表;不录用的稿件,编辑部将尽快通知作者,底稿一律不退,请自留底稿。

3. 来稿一经发表将酌致稿酬并送样刊 2 册。

4. 遵照《中华人民共和国著作权法》,投稿作者须明确表示,该文版权(含各种媒体的版权)授权给《光谱学与光谱分析》期刊社。国内外各大文献检索系统摘录本刊刊出的论文;凡不同意被检索刊物无稿酬摘引者,请在投稿时事先声明,否则,本刊一律认为已获作者授权认可。

5. 修改稿请寄:100081 北京市海淀区学院南路 76 号(南院西北门),《光谱学与光谱分析》期刊社(收)

电话:010-62182998 或 62181070 传真:010-62181070

e-mail: chngpxygpfx@vip.sina.com; 修改稿专用邮箱: gp2008@vip.sina.com 网址: http://www.gpxygpfx.com