

## 疼痛相关神经肽 Substance P 改变肿瘤细胞组分的 同步辐射显微红外光谱成像研究

杨超<sup>1</sup>, 朱朕<sup>2</sup>, 李静<sup>4</sup>, 孙运恒<sup>5</sup>, 欧阳雪岩<sup>1</sup>, 王佳唯<sup>2</sup>,  
黄骞<sup>1</sup>, 丁罡<sup>3</sup>, 王耀晟<sup>1\*</sup>, 姜峰<sup>1\*</sup>

1. 新华医院崇明分院癌痛转化研究所, 上海 202150
2. 上海大学生命科学学院/医学院, 上海 200436
3. 上海国际医学中心肿瘤科, 上海 201318
4. 河南省人民医院, 河南 郑州 450003
5. 仁济医院上海市肿瘤研究所, 上海 200032

**摘要** 疼痛是肿瘤患者最常见的症状之一, 长期以来, 临床肿瘤治疗过程中对于疼痛症状的控制仍然不能得到足够的重视。疼痛促进肿瘤的作用机制也尚未得到全面的解析。Substance P(SP)作为介导疼痛的神经肽在癌痛患者血清中高表达。通过同步辐射显微红外光谱成像对 SP 刺激后的肿瘤细胞进行红外光谱采集分析, 以期揭示疼痛促进肿瘤的可能机制。结果显示在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231, MCF-7 及肺癌细胞系 A549, SPCA-1 中, 反映蛋白质二级结构的酰胺 I 在  $1655\text{ cm}^{-1}$  附近的吸收峰发生蓝移, 说明 SP 刺激肿瘤细胞可能引起肿瘤细胞蛋白质二级结构的改变。在 MDA-MB-231 和 A549 细胞系中, 光谱  $1500\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  波段和  $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$  中酰胺 I 吸收峰和酰胺 II 吸收峰也显著下降, 说明在这两种细胞系中, 肿瘤细胞的蛋白质表达也出现明显降低。A549 细胞系中, 光谱  $1070\sim 1090\text{ cm}^{-1}$  区段和  $1230\sim 1250\text{ cm}^{-1}$  中磷酸二酯基团的正反伸缩振动峰位蓝移, 表明疼痛介质 SP 刺激 A549 细胞系还影响了该细胞系核酸的结构, 提示 SP 可能引起肿瘤细胞抑癌基因的损伤及癌基因的激活。同步辐射显微红外光谱通过对单一肿瘤细胞的光谱成像分析, 揭示了持续性疼痛症状通过神经递质的释放影响肿瘤细胞的生物学活性, 可能是通过改变肿瘤细胞内蛋白质及核酸的结构实现的。光谱学结果显示, 疼痛等不良症状的存在, 疼痛相关物质的释放可能影响肿瘤细胞内蛋白质结构和表达及肿瘤细胞核酸变化, 对肿瘤的治疗产生不利影响。提示在临床肿瘤治疗过程中, 不仅需要重视对肿瘤细胞的杀灭, 更需重视对周边症状的对症控制。

**关键词** 同步辐射显微红外光谱成像; P 物质; 乳腺癌; 肺癌

**中图分类号:** R730.6 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)11-3579-06

### 引言

世界卫生组织 2018 年全球最新癌症报告指出, 全球新增 1810 万例癌症病例, 死亡人数达 960 万, 中国癌症的发病率居世界第一位, 肺癌, 乳腺癌是中国最常见的癌症<sup>[1]</sup>。流行病学调查显示, 肺癌与乳腺癌患者当中, 因骨转移发生率较高、放化疗造成的相关疼痛情况较为常见<sup>[2]</sup>。Substance P

(SP, P 物质)作为一种神经递质, 主要分布于神经元、神经纤维末梢和免疫细胞, 通过与细胞膜上 NK-1 受体结合发挥其作用, 即介导疼痛与调制免疫<sup>[3-4]</sup>。P 物质可以促进肿瘤细胞发展, 如 P 物质促进胶质瘤发展; 皮肤肿瘤可能会受到神经末梢释放的如 P 物质等神经内分泌因子影响而加快进展速度; 子宫内膜癌、结肠癌中 P 物质与其受体的高表达也会提高肿瘤发展进程、愈后较差; 在乳腺癌中 P 物质的刺激会造成肿瘤细胞的化疗抵抗<sup>[5-8]</sup>。因此研究 P 物质对肿瘤细胞

收稿日期: 2019-10-18, 修订日期: 2020-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81572859)、上海市卫生健康委员会项目(201840003, 20184Y0016, 201540083)资助

作者简介: 杨超, 1991 年生, 新华医院崇明分院癌痛转化研究所研究实习员 e-mail: yangchao@xinhumed.com.cn

朱朕, 1994 年生, 上海大学生命科学学院/医学院硕士研究生 e-mail: zzzzzzz@shu.edu.cn

杨超, 朱朕: 并列第一作者 \* 通讯联系人 e-mail: jf365321@163.com; wangyaosheng@xinhumed.com.cn

生物学特性(核酸、蛋白、脂类)的改变,有助于进一步了解疼痛促进肿瘤发展的机制。光谱学技术在癌症的诊断领域已有广泛的应用<sup>[9-10]</sup>,傅里叶变换红外光谱法(FTIR)作为光学技术的一种,能够有效地探测细胞样本中的化学组成及其分布,例如,红外光谱可以检测细胞样本中核酸、蛋白、脂类及碳水化合物的含量,同时,还可以检测生物细胞中蛋白质二级结构的改变,红外光谱能根据细胞样本的特征性光谱来区分不同生理或病理状态的细胞<sup>[11-14]</sup>。相比传统红外光源,同步辐射光源在中红外光波段的亮度有 100~1 000 倍的提高。同步辐射红外光谱显微成像技术(synchrotron radiation based-Fourier transform infrared microspectroscopy, SR-FT-IR)能够在细胞水平对生物组织或细胞中包含的各种生物化学分子的代谢状态进行分析。本工作在乳腺癌细胞系和肺癌细胞系培养过程中加入 P 物质培养 24 h,对正常培养细胞和加入 P 物质培养细胞进行同步辐射红外光谱显微成像技术光谱成像,研究 P 物质对细胞生物大分子的代谢改变。

## 1 实验部分

### 1.1 细胞培养

肺癌细胞株 A549 与 SPCA-1,乳腺癌细胞系 MCF-7 与 MDA-MB-231 均购于中国科学院细胞库。4 株细胞均使用含 10% 胎牛血清,含有  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素以及  $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  两性霉素的 DMEM 高糖的培养液培养;细胞在 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 饱和湿度的培养箱中培养,细胞培养皿底部预先铺设高温灭菌的  $\text{BaF}_2$  玻片,  $\text{BaF}_2$  玻片上细胞密度达到 80% 以上后分别加入预先制备好、不含 P 物质的培养基和含有  $0 \sim 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  P 物质的培养基,培养 24 h。取出附着细胞样本的玻片自然风干 24 h,测定光谱前置于封闭干燥的器皿中防止空气中水分干扰。

### 1.2 光谱采集

光谱数据采集在合肥国家同步辐射实验室进行。使用仪

器包括:傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司),红外显微镜(Hyperion 3000),Single-point 探测器,操作软件 OPUS 6.5。实验过程中保持仪器处于超低温状态。以  $7 \mu\text{m} \times 7 \mu\text{m}$  的狭缝覆盖所测细胞,光圈大小为  $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ 。在玻片上选择一个干净、无样本的点获取背景光谱。为了避免样品周围空气变化,每次加液氮后以及更换新的样品玻片后都需重新采集背景光谱。按照上述方法依次对每组不同编号的样品进行光谱测定。光谱扫描范围为  $4\ 000 \sim 600 \text{ cm}^{-1}$ ,分辨率为  $8 \text{ cm}^{-1}$ ,每个样品扫描累加次数为 20 次以减少信噪比。维持  $12 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  的样品光谱测定速度。采用 OPUS 6.5 软件 R 3.6.0 软件处理数据,对照组与实验组间比较使用 t-Test。

## 2 结果与讨论

在晚期肿瘤患者中进行的临床研究表明,癌痛肺癌患者和癌痛乳腺癌患者血清中 P 物质的表达量高于无疼痛的患者。细胞学实验表明,P 物质可促进多种肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。P 物质含量的增加是否影响肿瘤细胞代谢,改变肿瘤细胞内生物大分子的含量和结构,进而影响肿瘤细胞的生物学活性。本研究通过同步辐射红外光谱显微成像技术绘制了正常培养的四种肿瘤细胞系(乳腺癌细胞系 MDA-MB-231, MCF-7 及肺癌细胞系 A549, SPCA-1)的红外光谱图及 P 物质处理四种肿瘤细胞系的红外光谱图(图 1)。表 1 中,位于  $1\ 070 \sim 1\ 090 \text{ cm}^{-1}$  区段的  $\text{PO}_2$  对称拉伸振动和  $1\ 230 \sim 1\ 250 \text{ cm}^{-1}$  区段的  $\text{PO}_2$  反对称拉伸振动能够反映核酸的浓度变化,位于  $1\ 500 \sim 1\ 600 \text{ cm}^{-1}$  区段的酰胺 II 和  $1\ 600 \sim 1\ 700 \text{ cm}^{-1}$  区段的酰胺 I 可以反映细胞内蛋白质的结构及浓度变化,脂类基团的吸收谱带集中在  $1\ 700 \sim 1\ 800 \text{ cm}^{-1}$  和  $2\ 800 \sim 2\ 950 \text{ cm}^{-1}$ ,以上两个谱带可以反映脂类的变化情况, $990 \sim 1\ 040$  和  $3\ 300 \sim 3\ 500 \text{ cm}^{-1}$  则反映碳水化合物变化情况<sup>[15]</sup>。

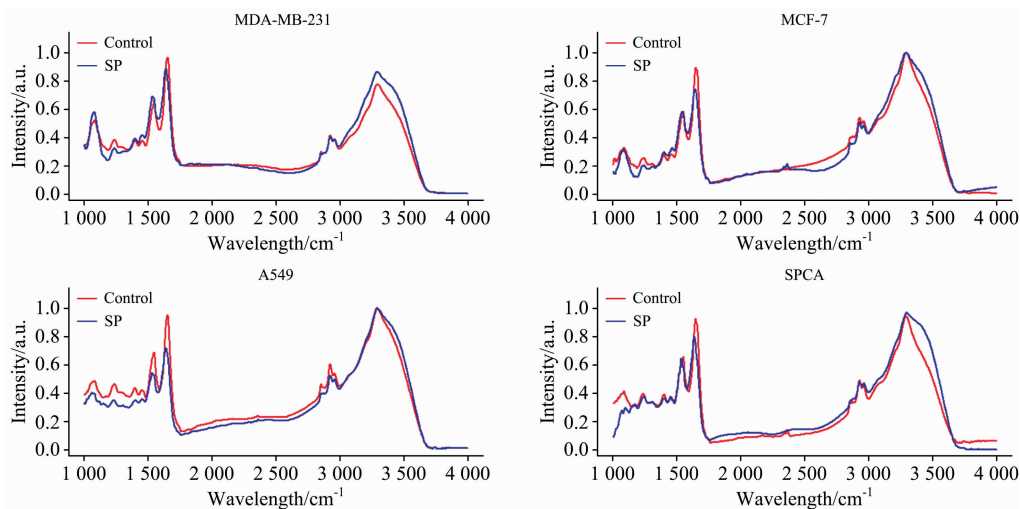


图 1 四种细胞系红外光谱吸收图谱

Fig. 1 FTIR spectra of four cell lines

**表 1 红外吸收光谱中各生化分子基团谱带指认**  
**Table 1 The bands frequencies assigned for the IR spectra**

Range /cm <sup>-1</sup>	Peak position/cm <sup>-1</sup>	Possible resolve
990~1 040	1 029	C—O—, C—O—H
1 040~1 070	1 054	C—O stretching
1 070~1 090	1 083	P=O stretching
1 150~1 190	1 165	C—O stretching
1 230~1 250	1 240	P=O stretching
1 430~1 470	1 455	—CH <sub>2</sub> deformation
1 500~1 600	1 551	Amide II
1 600~1 700	1 655	Amide I
1 700~1 800	1 747	C=O stretching
2 910~2 950	2 930	C—H stretching
2 950~2 990	2 970	
3 300~3 500	3 383	O—H, N—H stretching

通过对乳腺癌细胞系红外光谱的峰位分析(表 2), SP 处理乳腺癌系 MDA-MB-231, MCF-7 后, MDA-MB-231 红外光谱中, 位于 1 500~1 600 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 II 吸收峰和 1 600~1 700 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 I 吸收峰分别由 (1 548.086 ± 0.941) 和 (1 651.678 ± 4.705) cm<sup>-1</sup> 移动到 (1 538.719 ± 1.712) 和 (1 639.555 ± 3.419) cm<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ), 在 MCF-7 红外光谱图峰位也分别从 (1 547.432 ± 3.082) 和 (1 647.235 ± 4.426) cm<sup>-1</sup> 移动到 (1 538.03 ± 4.25) 和 (1 636.869 ± 3.391) cm<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ )。其他分子峰位无明显改变。同时, 在 MDA-MB-231 细胞系中, SP 处理组细胞光谱位于 1 500~1 600 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 II 吸收峰和 1 600~1 700 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 I 吸收峰低于对照组(表 3), 差异均有显著性 ( $p < 0.05$ )。有无 SP 刺激对两种乳腺癌细胞系在脂类和碳水化合物指纹区段的峰位及峰强度均无明显影响。

**表 2 乳腺癌细胞系光谱峰位统计分析**

**Table 2 Spectral peak analysis of breast cancer cell lines**

Range /cm <sup>-1</sup>	MDA-MB-231 (Mean ± SD)		P-value	MCF-7 (Mean ± SD)		P-value
	Control (n=12)	SP (n=12)		Control (n=12)	SP (n=12)	
	1 070~1 090	1 076.69 ± 6.56		1 077.241 ± 4.572	0.854	
1 230~1 250	1 235.383 ± 2.916	1 234.832 ± 6.171	0.848	1 237.656 ± 4.917	1 237.656 ± 7.766	0.51
1 380~1 420	1 396.005 ± 2.062	1 397.934 ± 4.648	0.134	1 396.763 ± 3.38	1 395.316 ± 4.25	0.272
1 430~1 470	1 452.760 ± 4.944	1 453.587 ± 5.068	0.732	1 459.441 ± 7.968	1 460.405 ± 4.696	0.401
1 500~1 600	1 548.086 ± 0.941	1 538.719 ± 1.712	<0.001	1 547.432 ± 3.082	1 538.03 ± 4.25	0.002
1 600~1 700	1 651.678 ± 4.705	1 639.555 ± 3.419	0.001	1 647.235 ± 4.426	1 636.869 ± 3.391	<0.001
2 910~2 950	2 925.311 ± 4.121	2 925.247 ± 4.181	0.9	2 925.632 ± 1.897	2 924.347 ± 0.996	0.209
2 950~2 990	2 959.244 ± 1.517	2 959.244 ± 2.187	0.999	2 958.418 ± 1.604	2 958.9 ± 0.893	0.241
3 300~3 500	3 295.366 ± 1.834	3 295.488 ± 2.396	0.929	3 292.542 ± 1.996	3 292.059 ± 5.646	0.417

在肺癌细胞系中, A549 和 SPCA-1 的红外光谱中, 位于 1 500~1 600 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 II 吸收峰和 1 600~1 700 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 I 吸收峰也有 10 cm<sup>-1</sup> 以上的蓝移 ( $p < 0.05$ )。A549 细胞系中, 位于 1 070~1 090 和 1 230~1 250 cm<sup>-1</sup> 的 PO<sub>2</sub> 的吸收峰也有明显的蓝移 ( $p < 0.05$ ) (表 3)。SP 处理组 A549 细

胞, 光谱位于 1 500~1 600 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 II 吸收峰和 1 600~1 700 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 I 吸收峰强度低于对照组(表 4), 差异均有显著性 ( $p < 0.05$ )。在脂类及碳水化合物指纹区段, 有无 SP 刺激对两种肺癌细胞系的峰位及峰高均无明显影响。

**表 3 乳腺癌细胞系光谱峰统计分析**

**Table 3 Statistical analysis of spectral peak of breast cancer cell lines**

Range /cm <sup>-1</sup>	MDA-MB-231 (Mean ± SD)		P-value	MCF-7 (Mean ± SD)		P-value
	Control (n=12)	SP (n=12)		Control (n=12)	SP (n=12)	
	1 070~1 090	0.52 ± 0.129		0.581 ± 0.182	0.415	
1 230~1 250	0.382 ± 0.088	0.324 ± 0.166	0.705	0.257 ± 0.086	0.204 ± 0.068	0.262
1 380~1 420	0.381 ± 0.084	0.394 ± 0.121	0.516	0.278 ± 0.072	0.299 ± 0.074	0.632
1 430~1 470	0.377 ± 0.082	0.416 ± 0.11	0.255	0.282 ± 0.061	0.328 ± 0.074	0.284
1 500~1 600	0.663 ± 0.073	0.691 ± 0.095	0.29	0.588 ± 0.065	0.583 ± 0.095	0.917
1 600~1 700	0.965 ± 0.057	0.886 ± 0.101	0.274	0.896 ± 0.076	0.739 ± 0.134	0.058
2 910~2 950	0.417 ± 0.057	0.406 ± 0.056	0.788	0.54 ± 0.045	0.511 ± 0.02	0.158
2 950~2 990	0.386 ± 0.074	0.388 ± 0.049	0.955	0.515 ± 0.051	0.485 ± 0.018	0.182
3 300~3 500	0.775 ± 0.163	0.862 ± 0.118	0.497	0.999 ± 0.001	0.996 ± 0.002	0.015

表 4 肺癌细胞系光谱峰位统计分析

Table 4 Spectral peak analysis of lung cancer cell lines

	A549 (Mean±SD)		P-value	SPCA (Mean±SD)		P-value
	Control (n=12)	SP (n=12)		Control (n=12)	SP (n=12)	
1 070~1 090	1 082.166±2.172	1 079.121±2.713	0.021	1 081.871±4.421	1 080.996±5.535	0.468
1 230~1 250	1 235.728±3.219	1 231.871±3.049	0.018	1 232.353±3.993	1 232.835±4.581	0.516
1 380~1 420	1 397.004±1.767	1 398.209±3.571	0.329	1 397.004±3.082	1 397.486±3.409	0.626
1 430~1 470	1 451.245±2.305	1 453.655±5.716	0.38	1 451.486±3.409	1 450.796±1.767	0.782
1 500~1 600	1 545.021±4.991	1 534.655±5.899	0.001	1 546.468±3.779	1 535.619±3.049	0.001
1 600~1 700	1 651.092±3.779	1 637.351±8.117	<0.001	1 645.065±4.123	1 638.074±10.254	0.023
2 910~2 950	2 924.186±1.364	2 924.347±1.575	0.999	2 925.186±1.438	2 925.081±0.941	0.356
2 950~2 990	2 958.659±0.682	2 959.141±0.998	0.351	2 958.659±0.682	2 958.9±0.893	0.351
3 300~3 500	3 292.783±2.291	3 293.747±4.305	0.563	3 294.153±2.569	3 293.372±3.404	0.683

酰胺 I 的振动频率位于  $1\ 655\ \text{cm}^{-1}$  附近, 酰胺 II 的振动频率位于  $1\ 545\ \text{cm}^{-1}$  附近, 因此, 通过红外吸收光谱的生化分子基团频率指认, 在四种细胞系中峰位发生蓝移的为酰胺 I 和酰胺 II 的吸收峰, 提示 SP 刺激以上四种肿瘤细胞系可能引起肿瘤细胞内的蛋白二级结构异常, 这可能是引起肿瘤细胞生物学特性改变的重要原因。此外, 使用 SP 刺激肺癌细胞系 A549 后, A549 的红外光谱  $1\ 070\sim 1\ 090\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 230\sim 1\ 250\ \text{cm}^{-1}$  出现蓝移 ( $p<0.05$ ), 这两个波段分别被指与核酸中磷酸二酯键的对称振动和反对称振动相关联, 这可能与肿瘤细胞 DNA (癌基因和抑癌基因) 的结构变化相关。

通过对 SP 处理组和对照组细胞的红外光谱峰位统计, 可以分析 SP 处理对肿瘤细胞蛋白质二级结构以及 DNA 结

构的影响, 通过相对吸收峰强度可以分析细胞内核酸、蛋白质、脂类及碳水化合物的含量变化。图 1 显示, 四种细胞系中, SP 处理组在大部分指认相关区段的峰高低于对照组, 但大部分不具有统计学差异 (表 3), 但在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和肺癌细胞系 A549 中酰胺 I 和酰胺 II 的吸收峰强度低于对照组, 具有统计学差异 ( $p<0.05$ ) (表 3、表 5)。结合 SP 处理肿瘤细胞可以促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力, 推测可能原因是, 肿瘤细胞增殖能力增强, 细胞分裂速度加快, 导致新生肿瘤细胞内与细胞增殖无关蛋白合成减少, 例如细胞骨架蛋白部分组分, 细胞膜蛋白 (纤连粘蛋白) 等, 从而提高了肿瘤细胞的形变能力以及降低肿瘤细胞黏附能力, 从而促进了肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。

表 5 肺癌细胞系光谱吸收峰变化统计分析

Table 5 Statistical analysis of spectral peak of lung cancer cell lines

	A549 (Mean±SD)		P-value	SPCA (Mean±SD)		P-value
	Control (n=12)	SP (n=12)		Control (n=12)	SP (n=12)	
1 070~1 090	0.486±0.17	0.396±0.342	0.075	0.415±0.256	0.297±0.133	0.468
1 230~1 250	0.463±0.121	0.349±0.283	0.176	0.391±0.102	0.377±0.127	0.505
1 380~1 420	0.433±0.114	0.346±0.24	0.839	0.388±0.098	0.361±0.129	0.095
1 430~1 470	0.419±0.115	0.356±0.089	0.57	0.369±0.078	0.375±0.11	0.427
1 500~1 600	0.687±0.059	0.539±0.209	<0.001	0.656±0.083	0.644±0.153	0.583
1 600~1 700	0.951±0.018	0.714±0.267	<0.001	0.922±0.077	0.798±0.108	0.018
2 910~2 950	0.604±0.102	0.524±0.145	0.204	0.491±0.058	0.473±0.039	0.064
2 950~2 990	0.537±0.088	0.495±0.134	0.342	0.453±0.087	0.465±0.016	0.305
3 300~3 500	0.993±0.006	0.997±0.003	0.186	0.94±0.056	0.966±0.03	0.358

## 4 结 论

使用同步辐射红外显微光谱检测了 SP 处理前后四种肿瘤细胞系细胞内四种中生物大分子的结构和含量变化。实验

结果显示 SP 处理四种肿瘤细胞系肿瘤细胞后, 四种细胞系的红外光谱  $1\ 655\ \text{cm}^{-1}$  附近的酰胺 I 吸收峰以及  $1\ 545\ \text{cm}^{-1}$  附近的酰胺 II 吸收峰发生蓝移。在 A549 细胞系和 MDA-MB-231 细胞系中, 酰胺 I 和酰胺 II 的吸收峰与对照组相比强度明显下降。在 A549 细胞系中,  $1\ 070\sim 1\ 090$  和  $1\ 050\sim$

1 230  $\text{cm}^{-1}$  波段是磷酸二酯基团( $\text{PO}_2^-$ )的吸收谱带的峰位蓝移。以上光谱学结果提示,微环境中的 SP 可能通过影响肿瘤细胞内蛋白质及核酸的表达,蛋白质二级结构等,从而影响肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

红外光谱分析表明 SP 刺激与否显著改变了肿瘤细胞的光谱学结果,与蛋白相关的吸收峰的蓝移提示细胞内整体蛋白的二级结构发生改变,同时,部分肿瘤细胞系内与核酸相

关的吸收峰蓝移揭示了微环境中 SP 对肿瘤细胞代谢特性影响的复杂性。对于更好地解释持续性疼痛调控肿瘤增殖、迁移和侵袭的生物学机制具有重要意义,为人类更好地理解肿瘤发生、发展和转移研究提供了新的视角和新的思路。

**致谢:** 中国科学技术大学国家同步辐射实验室的大力支持。

## References

- [ 1 ] Yang L, Zheng R, Wang N, et al. *Chin. J. Cancer Res.*, 2018, 30(3): 291.
- [ 2 ] Masel E K, Schur S, Nemecek R, et al. *Ann. Palliat Med.*, 2017, 6(1): 6.
- [ 3 ] Steinhoff M S, von Mentzer B, Geppetti P, et al. *Physiol. Rev.*, 2014, 94(1): 265.
- [ 4 ] Suvas S. *J. Immunol.*, 2017, 199(5): 1543.
- [ 5 ] Sun T, Jiang X, Wang Q, et al. *ACS Appl. Mater Interfaces*, 2017, 9(40): 34603.
- [ 6 ] Lupu M, Caruntu A, Caruntu C, et al. *Oncol. Rep.*, 2017, 38(3): 1327.
- [ 7 ] Chen X Y, Ru G Q, Ma Y Y, et al. *OncoTargets Ther.*, 2016, 9: 3595.
- [ 8 ] Robinson P, Kasembeli M, Bharadwaj U, et al. *Biomed. Res. Int.*, 2016, 2016: 1959270.
- [ 9 ] Bunaciu A A, Hoang V D, Aboul-Enein H Y. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2015, 45(2): 156.
- [ 10 ] Raczowska M K, Koziol P, Urbaniak-Wasik S, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2019, 1085: 39.
- [ 11 ] Nallala J, Lloyd G R, Shepherd N, et al. *Analyst*, 2016, 141(2): 630.
- [ 12 ] Bunaciu A A, Udristioiu G E, Ruta L L, et al. *Saudi. Pharm. J.*, 2009, 17(4): 303.
- [ 13 ] Chwiej J, Dulinska J, Janeczko K, et al. *J. Chem. Neuroanat.*, 2010, 40(2): 140.
- [ 14 ] Surowka A D, Pilling M, Henderson A, et al. *Analyst*, 2016, 142(1): 156
- [ 15 ] Grzelak M M, Wrobel P M, Lankosz M, et al. *Spectrochim Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2018, 203: 48.

## Changes of Tumor Cell Components Induced by Pain-Related Neuropeptides SP Investigated by Synchrotron Radiation Infrared Microscopic Imaging Technology

YANG Chao<sup>1</sup>, ZHU Zhen<sup>2</sup>, LI Jing<sup>4</sup>, SUN Yun-heng<sup>5</sup>, OUYANG Xue-yan<sup>1</sup>, WANG Jia-wei<sup>2</sup>, HUANG Qian<sup>1</sup>, DING Gang<sup>3</sup>, WANG Yao-sheng<sup>1\*</sup>, JIANG Feng<sup>1\*</sup>

1. Translational Institute for Cancer Pain, Xinhua Hospital Chongming Branch, Shanghai 202150, China

2. School of Life Sciences and Medicine, Shanghai University, Shanghai 202436, China

3. Department of Oncology, Shanghai International Medical Center, Shanghai 201318, China

4. Henan People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

5. Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, Shanghai 200032, China

**Abstract** Pain is one of the most common symptoms in cancer patients, but for a long time, the control of pain symptoms in clinical cancer treatment still cannot get enough attention. The mechanism of pain promoting tumor has not been fully understood. Substance P (SP), as a neuropeptide mediating pain, is highly expressed in serum of patients with cancer pain. In this study, the SP stimulated tumor cells were collected and analyzed by synchrotron radiation microscopic infrared spectroscopy imaging, in order to reveal the possible mechanism of pain promoting tumor. Results show that in the breast cancer cell lines MDA-MB-231, MCF-7, and lung cancer cell lines A549, SPCA, the absorption peak of amide I near 1 655  $\text{cm}^{-1}$  which reflect the secondary structure of the protein, showed blue shift. Suggesting that SP stimulate tumor cells may cause tumor cell protein secondary structure change. In MDA-MB-231 and A549, the absorption peaks of amide I and amide II which located in 1 500~1 600 and 1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$  also declined significantly, show that in the two cell lines, the protein expression of tumor cells is significantly lower. In A549 cell line, the symmetric stretch vibration peaks of phosphodiester group in 1 070~1 090 and 1 230~1 250  $\text{cm}^{-1}$  show blue shift, indicating that SP stimulated A549 cell lines also affected the nucleic acid structure of this

cell line, suggesting that SP may cause the damage of tumor suppressor genes and the activation of oncogenes. Synchrotron radiation micro-infrared imaging analysis revealed that persistent pain symptoms affect the biological activity of tumor cells through the release of neurotransmitters, possibly by changing the structure of proteins and nucleic acids in tumor cells. The results of spectroscopy showed that the presence of pain and other adverse symptoms and the release of pain-related substances may affect the protein structure and expression in tumor cells and the change of nucleic acid in tumor cells, which might have adverse effects on the treatment of tumors. In clinical tumor treatment, attention should be paid not only to killing tumor cells but also to symptomatic control of symptoms.

**Keywords** Synchrotron radiation infrared microscopic imaging; Substance P; Breast Cancer; Lung Cancer

(Received Oct. 18, 2019; accepted Feb. 9, 2020)

YANG Chao and ZHU Zhen: joint first authors

\* Corresponding authors