

单个乳腺癌细胞表面增强拉曼光谱研究

钱 晨¹, 郭 强², 陈 娜², 鲁 波³, 刘书朋¹, 陈振宜²

1. 上海大学通信与信息工程学院(上海,200072)

2. 上海大学特种光纤与光接入网省部共建国家重点实验室培育基地(上海,200072)

3. 上海大学分析测试中心(上海,200072)

【摘要】 将内吞进入细胞内部的金纳米颗粒作为表面增强拉曼散射光谱的活性增强基底,通过共聚焦显微拉曼光谱仪测试单个人乳腺癌细胞(MCF-7)的常规拉曼光谱和表面增强拉曼光谱,并进行了初步峰位归属分析及不同拉曼峰强度柱状图对比分析。实验结果表明,内吞金纳米颗粒的单个MCF-7细胞的表面增强拉曼光谱相比于常规拉曼光谱包含更多的细胞生化物质拉曼信号,并且谱线强度有显著增强。由于细胞中各种生物分子在结构和含量上的变化可以反映细胞代谢及病理变化,因此,以具有高灵敏度的金纳米颗粒作为生物分子探针可能成为探测细胞内部组分信息的一种有效的方法,基于内吞金纳米颗粒的单个MCF-7细胞SERS技术在乳腺癌的诊断和治疗方面具有广阔的应用前景。

【关键词】 SERS; 金纳米颗粒; 人乳腺癌细胞 MCF-7; 光谱分析

【中图分类号】R736.3;O657.3

【文献标识码】A

文章编号:1674-1242(2012)04-0214-05

SERS Spectra Studies on Single Human Breast Cancer Cells

Qian Chen¹, Guo Qiang², Chen Na², Lu Bo³, Liu Shupeng¹, Chen Zhenyi²

1. School of Communication and Information Engineering, Shanghai University (Shanghai,200072)

2. The Key Laboratory of Specialty Fiber Optics and Optical Access Networks,
Shanghai University (Shanghai,200072)

3. Instrumental Analysis and Research Center, Shanghai University (Shanghai,200072)

【Abstract】 Using the gold nanoparticles endocytosed into single living human breast cancer(MCF-7) cell as active substrate, the surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra and normal Raman spectra of single living human breast cancer(MCF-7) cell were obtained by confocal microscopy Raman spectrometer. The characteristic Raman peaks and the intensity histogram graph of different Raman peaks were analyzed. The results showed that, the SERS spectra of single MCF-7 cell incubated with gold nanoparticles contained more abundant biochemical Raman signals and the intensity of spectral lines were significantly enhanced compared with normal Raman spectra. The metabolic and pathological changes of cells could be reflected by the structural and content changes of various biomolecules in cells. Therefore, the high sensitivity gold nanoparticles could be used as biomolecule probe and might provide an effective method on detecting inner components information of cells. Furthermore, the SERS spectroscopic technique based on single MCF-7 cell incubated with gold nanoparticles would have wide prospects on diagnosing and curing breast cancer.

【Key words】 SERS, gold nanoparticles, human breast cancer cell MCF-7, spectroscopic analysis

0 引言

拉曼光谱技术是一种能够反映分子精细结构和振动信息的无损检测技术。无需样品制备或标记就可以通过拉曼光谱检测样品的分子结构变化^[1]。尽管它具有以上优点,由于拉曼信号十分微弱以至于难以获得清晰的拉曼光谱,使它的实际应用被大大的限制。因此,寻找能够增强拉曼信号的基底尤其是贵金属纳米结构成为研究的热点。1974年英国 Fleischmann 等人从吡啶在粗糙银电极表面上发现了表面增强拉曼散射(SERS)效应,极大地提高了拉曼光谱的灵敏度。利用 SERS 技术可以获得高质量的表面分子信息,从而被广泛应用于多种分析领域^[2]。

乳腺癌是一种严重影响妇女身心健康甚至危及生命的最常见的恶性肿瘤之一,发病率在全世界范围内逐年升高。现行的诊断方法虽能最终确定肿瘤性质,却无法尽早发现癌变迹象。由于细胞中各种生物分子在结构和含量上的变化可以反映细胞代谢及病理变化,因此,如果能获得乳腺癌细胞的拉曼光谱,就可以从分子水平深入地研究癌变机理^[3]。对肿瘤组织或细胞进行常规拉曼光谱检测的研究中,往往存在着获取生物信号微弱以及生物分子信息少等缺点。如对胃癌组织拉曼光谱的研究中,只获得了6个特征峰,并且谱线强度极低^[4]。而利用具有单分子探测灵敏度的 SERS 光谱技术,将纳米粒子作为活性基底引入细胞内部,可以显著提高拉曼光谱的信噪比,并且获得更加丰富的分子结构信息。如对将银溶胶通过电穿孔引入细胞内部检测鼻咽癌细胞的 SERS 光谱,已获得十几个拉曼特征峰^[5]。

本文选用对生物细胞伤害性较小的金纳米颗粒作为 SERS 光谱检测的增强基底,利用细胞的内吞作用将金纳米颗粒引入细胞内部,通过共聚焦显微拉曼光谱仪测试单个人乳腺癌细胞的表面增强拉曼光谱,并分析各拉曼特征峰所对应的细胞内部组分信息,比较表面增强拉曼光谱和常规拉曼光谱的拉曼峰强度。

1 实验材料与方法

1.1 实验设备

本实验采用英国 Renishaw 公司生产的 Invia 型号共聚焦显微拉曼光谱仪,配置正置显微镜以及带有光栅尺反馈系统的高精度 XYZ 三维自动平台,空间分辨率横向小于 1 μm 。细胞培养及观察采用

Thermo Scientific Forma CO₂ 培养箱(美国 Thermo Forma 公司)、NIKON 倒置显微镜 ECLIPSE TE2000-S(日本 NIKON 公司)。

1.2 样品来源与制备

人乳腺癌细胞 MCF - 7 购于中科院细胞库,生长在含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素、1 mg/100 ml 胰岛素的 DMEM 培养液(美国 HyClone 公司)中,置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养,定期观察,选用对数生长期细胞进行实验。单个 MCF - 7 细胞的显微图像如图 1 所示,细胞长度约为 15 μm ,形状近似圆形。

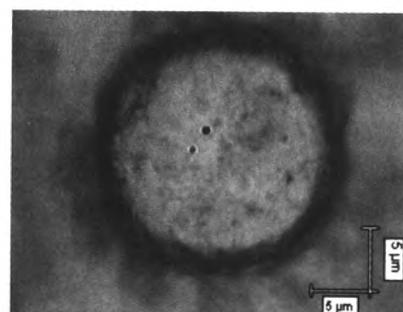


图 1 单个 MCF - 7 细胞的显微图像
Fig. 1 Image of single MCF - 7 cell observed by 100 \times microscope

金纳米颗粒的制备过程如下:将 1 ml 1% 氯金酸(HAuCl₄)溶液加入 99 ml 去离子水(上海物化去离子水厂)中,置于微波炉中加热约 150s 至沸腾,再加入 0.5 ml 1% 柠檬酸三钠(沈阳试剂三厂,分析纯)溶液,继续加热沸腾约 6 min,将所得紫红色混合溶液自然冷却至室温,即得金溶胶。通过紫外可见吸收光谱仪测得金颗粒的紫外可见吸收光谱,吸收峰在 541 nm,如图 2 所示。将金溶胶离心、超声提纯后滴于铜网上,通过 JEM - 200CX 透射电镜(日本 JEOL 公司)观察到金纳米颗粒的直径约为 50 nm 左右,如图 3 所示。

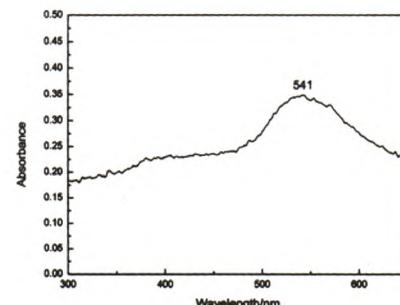


图 2 金颗粒的紫外可见吸收光谱
Fig. 2 UV-vis absorption spectrum of gold nanoparticles

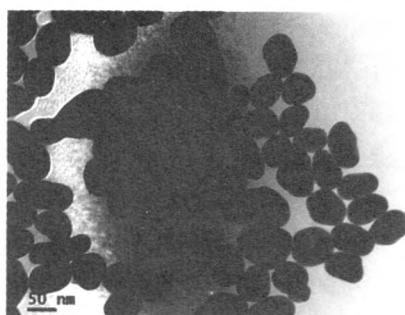


图3 金颗粒的TEM图
Fig.3 TEM of gold nanoparticles

1.3 实验方法

将实验室培养的 MCF - 7 细胞进行细胞传代至六孔板的盖玻片上, 放入细胞培养箱培养 1d, 待细胞完全贴壁后, 再将金纳米颗粒以 1:2 的比例添加至培养基, 与细胞混合培养 24 h, 利用细胞的内吞作用, 金纳米颗粒会被引进细胞内。之后, 用 PBS 缓冲液冲洗盖玻片上的细胞, 洗去细胞表面游离的金纳米颗粒, 同时也避免了培养基对细胞拉曼光谱检测的干扰。实验采用对细胞活性影响较小的波长为 785 nm 的近红外激发光, 半导体激光器功率为 200 mW, 将贴有细胞的盖玻片放在样品台上, 激光经物镜 (×100) 聚焦后形成直径约 5 μm 的光斑, 照射到细胞的功率为 20 mW, 积分时间为 10 s, 选择吞入金纳米颗粒较多的单个细胞进行拉曼光谱测量, 采用 180° 背散射接收方式, 收集的拉曼光谱范围为 400 ~ 1800 cm^{-1} 。

1.4 数据处理

将光谱数据转换为 ASC II 数据, 通过 Micro Origin8.1 光谱分析软件进行处理, 得到最终的单细

胞拉曼光谱图。

2 结果与讨论

本实验分别采集了 20 组内吞金纳米颗粒的单个 MCF - 7 细胞的不同位置的表面增强拉曼光谱以及 20 组单个 MCF - 7 细胞的不同位置的常规拉曼光谱, 二者的平均拉曼光谱如图 4 所示。

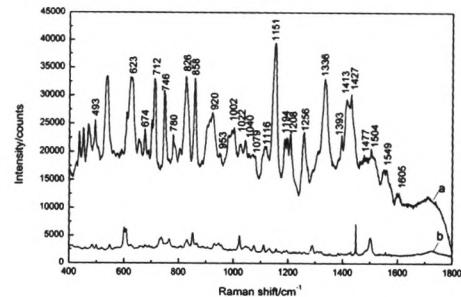


图4 内吞金纳米颗粒的 MCF - 7 细胞的表面增强拉曼光谱(a)和常规拉曼光谱(b)

Fig.4 SERS spectra of MCF - 7 cell incubated with gold nanoparticles (a) and Raman spectra of MCF - 7 cell (b)

从图 4(b) 中可以看出, 由于生物分子的常规拉曼光谱信号十分微弱, 单个 MCF - 7 细胞中很多生物分子的常规拉曼光谱特征峰不明显, 并且只有极少数的拉曼特征峰被检测出来。相比而言, 内吞金纳米颗粒的单个 MCF - 7 细胞的表面增强拉曼光谱 (图 4a) 检测出了 20 多个拉曼特征峰, 并且谱线强度显著增强。此外, 一些拉曼特征峰的峰位发生了少许频移, 这是由于金纳米颗粒的分子移动^[9]。内吞金纳米颗粒的单个 MCF - 7 细胞的表面增强拉曼光谱中的特征峰的归属见表 1。

表1 内吞金纳米颗粒的单个 MCF - 7 细胞的表面增强拉曼光谱中的特征峰的归属
Tab.1 Raman bands observed in the SERS spectra of MCF - 7 cell and their tentative assignments

峰位置(cm^{-1})	归属	峰位置(cm^{-1})	归属
493	Glycogen	1116	$\nu(\text{CN})$
623	Phe (CC twist)	1151	$\text{C}-\text{C str, C}-\text{N str, } \rho(\text{CH}_3)$
674	T, G	1194	base $\nu(\text{CN})$, Tyr, Phe
712	choline (H_3C) $\text{N} +$	1208	Phe, Tyr ($\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5\text{ str}$)
746	T	1256	amide III / $\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$
780	C, T	1336	Polynucleotide chain
826	O - P - O str DNA bk	1393	$\delta(\text{CH}_3)$ sym
858	Tyr, Pro	1413	Amino acids, $\delta(\text{CH}_3)$ asym, $\nu(\text{COO}^-)$
920	Proline: ring $\nu(\text{CC})$	1427	A, G
953	Tyr	1477	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$
1002	Phe, ring breathing	1504	A, C, G
1022	Phe (CH in plane def)	1549	amide II
1040	C - C stretch	1605	Phe, Tyr
1079	PO_2^- sym		

MCF-7 细胞在内吞金纳米颗粒后,细胞内部的生物分子吸附在金纳米颗粒上,当发生拉曼散射时,细胞内部的生物分子的振动谱线得到了增强,并且激发出了很多常规拉曼光谱中所没有的特征峰,由此获得了细胞内部丰富的蛋白质、核酸以及脂类的生化信息。当金纳米颗粒聚集所形成的“热点”表面的生物分子受到激发时,该生物分子的拉曼散射强度会明显增强,如 623、712、826、858、1151 和 1336 cm^{-1} 处的拉曼谱线均有显著增强。

内吞金纳米颗粒的单个 MCF-7 细胞的 SERS 光谱可以反映蛋白质分子的组成成分及复杂结构,如酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酰胺 I-VII、主链骨架 C-C 和 C-N 以及侧链肽键的特征振动。图 4(a) 中,酪氨酸和苯丙氨酸的特征峰体现在 623、858、953、1002、1022、1194、1208 和 1605 cm^{-1} 处,其中,623 cm^{-1} 的谱线强而宽,反映了 C-C 键的扭曲振动,858 cm^{-1} 同时体现了酪氨酸和脯氨酸,位于 1002 cm^{-1} 和 1022 cm^{-1} 处的特征峰分别反映了苯丙氨酸的对称振动呼吸以及 CH 平面弯曲变形,1194 cm^{-1} 还归属于 C-N 键的拉伸振动。此外,脯氨酸的 C-C 对称拉伸振动以及蛋白质分子 C-N 键的拉伸振动分别体现在 920 cm^{-1} 和 1116 cm^{-1} 处,1151 cm^{-1} 处出现的强拉曼峰归属于蛋白质分子主链骨架 C-C 和 C-N 的拉伸以及 CH₃ 的特征振动,1413 cm^{-1} 谱带源于氨基酸、CH₃ 非对称变形振动及 COO⁻ 拉伸振动,酰胺 II、III 的特征峰则体现在 1549 cm^{-1} 和 1256 cm^{-1} ,属于蛋白质二级结构^[12]。

对于 MCF-7 细胞内的核酸分子构象,也可以由图 4(a) 中的拉曼谱线解释。核酸中腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶及鸟嘌呤的拉曼特征峰主要体现在 674、746、780、1427 和 1504 cm^{-1} 处。双螺旋 DNA 骨架磷酸二酯的对称伸缩 O-P-O 振动谱线出现在 826 cm^{-1} 、1040 cm^{-1} 谱带源于核酸分子 C-C 键的拉伸振动,位于 1079 cm^{-1} 处的特征峰反映了双螺旋 DNA 骨架磷酸离子 PO₂⁻ 的对称伸缩振动,1336 cm^{-1} 谱线归属于多核苷酸链^[13]。

此外,内吞金纳米颗粒的单个 MCF-7 细胞的 SERS 光谱还检测出了细胞内含有少量糖类和脂类,这在常规拉曼光谱中是难以发现的。493 cm^{-1} 谱带属于糖原的特征谱带,脂类分子中胆碱的拉曼特征峰出现在 712 cm^{-1} ,位于 1393 cm^{-1} 处的特征峰反映了 CH₃ 对称变形振动,1477 cm^{-1} 谱带源于 CH₂、

CH₃ 的变形振动。

由此可知,当金纳米颗粒通过内吞作用进入 MCF-7 细胞内部后,可以获得细胞内部含量较高的蛋白质和核酸以及含量较低的糖类和脂类元素丰富的拉曼振动光谱。因此,当 MCF-7 细胞发生癌变导致细胞内部某些成分发生微量变化时,利用 SERS 技术在单细胞单分子水平上检测物质组分变化,将为乳腺癌的诊断提供有效的依据。而将具备高灵敏度、对生物细胞伤害小、容易制备等优点的金纳米颗粒作为生物分子探针,也为单细胞单分子研究提供了一个很好的途径。

为了更直观地反映以金纳米颗粒作为活性基底测得的单个 MCF-7 细胞 SERS 光谱的谱线强度与常规拉曼光谱相比所具有的显著差异,以图 4 中可明显分辨出来的拉曼特征峰 493、826、1022、1151 和 1427 cm^{-1} 为例,这 5 个特征峰在两种不同的条件下都产生了相似拉曼峰并得到其柱状图^[14],如图 5。

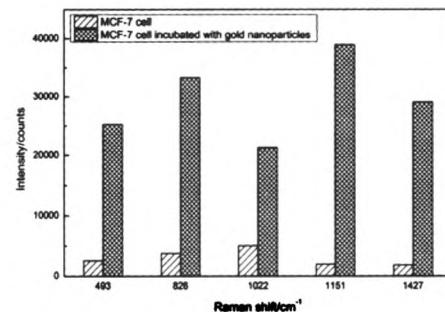


图 5 不同拉曼峰的强度直方图

Fig. 5 The histogram graph of different Raman peaks intensity

由图 5 可知,谱线 493、826、1022、1151 和 1427 cm^{-1} 这 5 个特征峰在单个 MCF-7 细胞的常规拉曼光谱和内吞金纳米颗粒的 SERS 光谱中都显示出来,但是两者强度却不同,内吞金纳米颗粒的 SERS 光谱比常规拉曼光谱的强度显著增强。从柱状图中可以看出,单个 MCF-7 细胞的常规拉曼光谱和内吞金纳米颗粒的 SERS 光谱中,谱线 1151 cm^{-1} 强度差异最明显,其他谱线也有不同程度的强度差异,并且出现微弱的频移。单个 MCF-7 细胞的常规拉曼光谱和内吞金纳米颗粒的 SERS 光谱在 5 个波长上检测到重复性好、强弱不同的拉曼峰,这说明内吞金纳米颗粒的 MCF-7 细胞与普通 MCF-7 细胞相比,细胞内分子散射截面及分子振动状态发生了微弱的改变,因此相同波长上拉曼峰强度产生了不同的变化,这就进一步证实了 SERS 光谱从技术上可

以检测到 MCF - 7 细胞的差异。然而对乳腺癌细胞的准确检测诊断仍需要大量数据和信息的积累, 数据的分析与处理必须建立在统计学基础之上。

3 结论

本文研究了单个 MCF - 7 细胞的常规拉曼光谱和内吞金纳米颗粒的表面增强拉曼光谱, 通过对比发现, 在金纳米颗粒的作用下, 单个 MCF - 7 细胞的表面增强拉曼光谱中出现了一些在常规拉曼光谱中不能出现的拉曼峰, 整体谱线强度以及相同波长上的拉曼峰强度也有显著增强。因此, 内吞金纳米颗粒的单个 MCF - 7 细胞的表面增强拉曼光谱中丰富的 SERS 信号表明利用, SERS 技术可以检测出细胞内各种蛋白质、核酸、脂类、糖类以及其他成分的分子结构等信息。而金纳米颗粒由于具备高灵敏度、对生物细胞伤害小等优越特性, 将成为非常有用的细胞生物分子探针。本文只是对内吞金纳米颗粒的单个 MCF - 7 细胞的 SERS 光谱进行了初步的测定和分析, 要想全面地测定和分析 MCF - 7 细胞 SERS 光谱中的特征峰, 还需要积累大量的实验数据, 在统计学基础之上深入分析。但是可以肯定的是, 利用基于金纳米颗粒的 SERS 技术检测细胞内生化物质信息将为乳腺癌早期诊断提供客观依据, 具有广阔前景。

参考文献

- [1] Andrzej Kudelski. Analytical applications of Raman spectroscopy [J]. *Talanta*, 2008, 76 (1): 1 - 8.
- [2] Jackson J, Halas N. Surface - enhanced Raman scattering on tunable plasmonic nanoparticle substrates [J]. *PNAS*, 2004, 101: 17930 - 17935.
- [3] Abigail S. Haka, Karen E. Shafer - Peltier, Maryann Fitzmaurice, et al. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy [J]. *PNAS*, 2005, 102 (35): 12371 - 12376.
- [4] Jonathan P. Scaffidi, Molly K. Gregas, Victoria Seewaldt, et al. SERS - based plasmonic nanobiosensing in single living cells [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393: 1135 - 1141.
- [5] 唐伟跃, 王杰芳, 徐平. 胃癌组织拉曼光谱的研究 [J]. *激光杂志*, 2004, 25 (1): 82 - 83.
- [6] 俞允, 林居强, 黄浩, 等. 银胶浓度对电穿孔获取细胞内表面增强拉曼光谱的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2011, 38 (10): 961 - 966.
- [7] Janina Kneipp, Harald Kneipp, Anpuchchelvi Rajadurai, et al. Optical probing and imaging of live cells using SERS labels [J]. *Raman Spectrosc*, 2009, 40: 1 - 5.
- [8] H. Abramczyk, J. Surmacki, B. Brozek - Pluska, et al. The hallmarks of breast cancer by Raman spectroscopy [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2009, 924 - 926: 175 - 182.
- [9] Hong - Wu Tang, Xuebin B. Yang, Jennifer Kirkham, et al. Probing intrinsic and extrinsic components in single osteosarcoma cells by near - infrared surface - enhanced Raman scattering [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 3646 - 3653.
- [10] 赵元黎, 吕晶, 葛向红, 等. 乳腺肿瘤周边组织的拉曼光谱研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26: 1267 - 1271.
- [11] Ute Neugebauer, Joachim H. Clement, Thomas Bocklitz, et al. Identification and differentiation of single cells from peripheral blood by Raman spectroscopic imaging [J]. *Biophoton*, 2010, 3 (8 - 9): 579 - 587.
- [12] Janina Kneipp, Harald Kneipp, Burghardt Wittig, et al. Novel optical nanosensors for probing and imaging live cells [J]. *Nanomedicine*, 2010, 6: 214 - 226.
- [13] Xie Wei, Wang Li, Zhang Yuying, et al. Nuclear targeted nanoprobe for single living cell detection by surface - enhanced Raman scattering [J]. *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20 (4): 768 - 773.
- [14] 艾敏, 刘军贤, 姚辉璐. 外周血中单个网织红细胞与小淋巴细胞的拉曼光谱 [J]. *光学学报*, 2009, 29 (4): 1043 - 1048.
- [15] Joseph M. McLellan, Yujie Xiong, Min Hu, et al. Surface - enhanced Raman scattering of 4 - mercaptopyridine on thin films of nanoscale Pd cubes, boxes, and cages [J]. *Chemical Physics Letters*, 2006, 417: 230 - 234.
- [16] JB. Brozek - Pluska, I. Placek, K. Kurczewski, et al. Breast cancer diagnostics by Raman spectroscopy [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2008, 141 (3): 145 - 148.

(收稿日期: 2012 - 10 - 20)