

· 综述 ·

细胞拉曼光谱与肿瘤的诊断和研究

陈志华 李红艳 夏启胜综述 陈惟昌审校

【摘要】 细胞拉曼光谱具有无创、准确、快速地对活细胞进行实时定量和原位分析的优势,可鉴别肿瘤细胞的性质及分化程度,并进行肿瘤细胞癌变原理和药物疗效评估研究,在肿瘤早期诊断和肿瘤研究中具有较好的应用前景。

【关键词】 细胞; 光谱分析, 拉曼; 肿瘤

【中图分类号】 R730.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-422X(2007)12-0896-03

Raman spectroscopy in cancer diagnosis and research CHEN Zhi-hua, LI Hong-yan, XIA Qi-sheng. Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

【Abstract】 Raman spectroscopy can perform real-time quantification and in-situ analysis on living cells non-invasively, accurately and rapidly. Raman spectroscopy can identify the classification and differentiation of tumor cells, and can be used for studies of the oncogenesis mechanisms and pharmaceutical sensitivity evaluation on tumor cells. Raman spectroscopy has a good utilization prospect on early diagnosis and other researches on tumors.

【Key words】 Cells; Spectrum analysis, Raman; Neoplasms

光子行进过程中与分子发生碰撞后方向改变, 称为散射。碰撞后光子方向和波长都改变, 为非弹性散射亦称拉曼散射。不同分子有其特征性的拉曼光谱, 拉曼光谱能研究不同组织的化学组成和分子结构, 并在病变早期检测出这些变化, 这使其在肿瘤诊断和研究中都颇具潜力。现就拉曼光谱在肿瘤诊断和研究方面的进展作一综述。

1 肿瘤诊断

1.1 肿瘤细胞性质鉴别

Yan 等^[1]研究了胃肠道肿瘤患者正常细胞和癌细胞的拉曼光谱, 癌细胞谱线整体变弱, DNA 磷酸根骨架峰 $1\ 084\text{ cm}^{-1}$ 谱带明显减弱, 说明 DNA 磷酸根骨架有断裂, 导致癌细胞的分裂增殖失去有效控制。Banerjee 等^[2]发现, 和正常细胞相比, 脑部肿瘤星形细胞瘤的 $1\ 032\text{ cm}^{-1}$ (苯丙氨酸)、 $1\ 660\text{ cm}^{-1}$ (蛋白酰胺 I)等 5 个拉曼谱带变强, 说明肿瘤细胞的化学组成和分子结构发生了改变。

Chen 等^[3]取结肠癌患者术后组织进行肿瘤细胞和正常细胞原代培养, 以近红外激光捕获拉曼光谱系统分析活细胞。和正常细胞相比, 肿瘤细胞 788 cm^{-1} (DNA 磷酸根骨架)和 $1\ 257\text{ cm}^{-1}$ (酰胺 III)等 9

个谱带改变, 核酸和蛋白的浓度升高。以 8 位患者标本的光谱进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 建立诊断模式, 其诊断敏感性为 77.5%、特异性为 81.3%。Notinger 等^[4]用显微拉曼光谱分析非肿瘤骨细胞和骨肿瘤细胞, 以线性判别分析建立诊断模式, 可区分肿瘤和非肿瘤细胞, 而两种非肿瘤骨细胞没有明显差别, 该模式诊断敏感性为 100%, 特异性为 95%。

普通拉曼光谱可观察谱带峰位和峰高的变化, 但光谱中还存在直接观察不到的谱带变化, 且很多成分的谱带是重叠的, 因此直接或用统计学方法确定的谱带变化仅为定性分析。PCA 等多元统计分析法是对多个变量的统计, 只能确定两样品之间光谱是否发生改变, 不能明确癌变细胞化学成分是如何变化的。而细胞基本成分拟合拉曼指纹谱, 则可定量细胞化学成分相对量的变化和各化学成分相对量比值的变化, 是定量分析, 且拟合拉曼指纹谱比普通光谱更加灵敏^[5]。

Mourant 等^[6]以细胞基本成分(蛋白质、DNA、RNA、脂类和糖原)拟合拉曼指纹谱, 分析正常乳腺细胞和癌基因转染获得恶性表型的转化细胞, 同时也观察两类细胞不同增殖状态对拉曼光谱的影响。结果显示转化细胞蛋白质、核酸含量增加, 脂类和糖原含量下降。而细胞增殖状态对拉曼光谱的影响强于

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30440067, 30672406)

作者单位: 100029 北京, 中日友好医院临床医学研究所

癌基因转染的影响,一方面说明单个癌基因转染对细胞拉曼光谱影响不是很大,同时也提示在区分肿瘤和正常细胞时,细胞的增殖状态也是需要考虑的重要因素。

1.2 肿瘤细胞分化程度鉴别

Crow 等^[7]以近红外拉曼光谱研究 4 株分期和侵袭特性不同的雄激素非依赖性前列腺癌细胞,LNCaP 和 MDApc2b 细胞分化较好,对雄激素敏感;而 DU145 和 PC3 细胞分化差,对雄激素不敏感,转移性强。PCA 和线性判别分析诊断模式可准确预测 4 个不同的细胞株,敏感性为 96% ~ 100%,特异性为 99%。说明拉曼光谱可区分不同侵袭、不同分化程度的前列腺癌细胞。

1.3 混合肿瘤细胞鉴别

Krishna 等^[8]将人早幼粒白血病细胞 HL60 和人乳腺癌细胞 MCF7、人子宫肉瘤细胞 Mes-sa 和 MCF7 各 50% 混合,对混合细胞做拉曼光谱分析。不同细胞显示不同的拉曼光谱,HL60 和 MCF7 光谱间的差别比 Mes-sa 和 MCF7 间的差别大。而 PCA 分析则可将混合细胞中的不同细胞分开。该实验旨在模拟体内正常细胞、肿瘤细胞混杂的状态,观察拉曼光谱从混合细胞中区分肿瘤细胞的能力。

穿刺活检术创伤小易被患者接受,但因缺乏组织结构参考,诊断准确率达不到临床要求。共聚拉曼光谱可区分正常和癌变细胞,区分不同侵袭、分化程度的癌细胞;获取数据、自动分析仅需几分钟,且可获得癌变化量数据,排除人为因素的干扰。因此将共聚拉曼光谱技术精确、快速、定量分析的特性和穿刺活检微创的优势相结合,可有效提高穿刺活检诊断的准确性和速度。同样,共聚拉曼光谱技术也可用于胃肠道、呼吸道灌洗细胞,以及胸水、腹水和尿液细胞癌变的分析。

随着光纤技术和拉曼光谱技术的发展,无创的拉曼光谱用于呼吸道、消化道等肿瘤诊断的研究也在进行,而细胞生物学研究结果可使检测更加精确和量化,利于肿瘤早期诊断和手术范围的确定。

2 肿瘤研究

2.1 癌变原理研究

基因转染是研究癌变原理的方法之一。近年来,一些研究组以拉曼光谱技术监测转入的癌基因是否启动了细胞的遗传修饰,从而导致可稳定遗传的化学成分和分子结构变化。

Gao 等^[9]以近红外傅立叶变换拉曼光谱观察永生化人表皮角化细胞 HPK1A 及其相应的恶性转化细胞 HPK1A-ras,两种细胞的拉曼光谱不同,两种细

胞提取 DNA 的拉曼光谱也显著不同,843 cm⁻¹/810 cm⁻¹ 峰高比 HPK1A 为 1.6 ± 0.13,HPK1A-ras 为 0.68 ± 0.09,说明恶性转化导致 DNA 骨架结构特异性改变,提示 DNA 光谱 843 cm⁻¹/810 cm⁻¹ 峰高比可能成为判断恶性的有用参数。

Chan 等^[10]用激光镊拉曼技术研究活细胞,即正常 T 细胞、B 细胞和相应的转化细胞。T 细胞和 B 细胞谱线非常相似,但转化细胞和正常细胞的谱线明显不同。和正常细胞相比转化细胞 DNA 含量下降,蛋白含量升高,RNA 含量升高。已知典型转化细胞特点为 RNA 水平升高,蛋白浓度增加以支持 RNA 合成;细胞核变大、细胞质变小,复制和转录水平升高,染色质松解,这和拉曼光谱分析的结果一致,提示拉曼光谱可确定基因转染导致的 RNA、蛋白质含量增加和染色质松解。

共聚拉曼光谱的空间分辨率 <1 μm,具备观察亚细胞结构如细胞核的条件,分析正常和转化细胞核拉曼光谱的变化,可以更直接、准确地监测基因转染对正常细胞的影响,确定癌变过程最早期化学成分和分子结构的变化。

MCF10A 为正常乳腺上皮细胞,MCF10AT 是 ras 转染 MCF10A 获得的恶性转化细胞。Yu 等^[11]提取细胞核的 DNA、RNA 和蛋白质拟合拉曼指纹谱,以拟合系数确定各基本成分相对量的改变。和正常细胞核相比,转化细胞细胞核 DNA 含量明显升高,蛋白质含量稍有升高,而 RNA 含量改变不明显,可能是因为 DNA 和 RNA 碱基组成非常接近,拟合时不易区分。DNA 含量升高可能和转化细胞异倍体性质有关。提示癌基因转化导致 DNA 和蛋白质的变化非常明显。

2.2 药物疗效评估

EB1089 是角化细胞生长抑制剂。Gao 等^[9]以 EB1089 分别作用于 HPK1A 和 HPK1A-ras 细胞,用近红外傅立叶变换拉曼光谱分析作用前后细胞和提取 DNA 的拉曼光谱。细胞光谱 1 300 ~ 750 cm⁻¹ 区域有变化;DNA 光谱显示,EB1089 对 HPK1A 细胞 843 cm⁻¹/810 cm⁻¹ 峰高比没有影响,而使 HPK1A-ras 细胞 843 cm⁻¹/810 cm⁻¹ 峰高比由 0.68 ± 0.09 增加至 1.07 ± 0.10,接近 HPK1A (1.6 ± 0.13)。说明提取 DNA 的拉曼光谱特别是 843 cm⁻¹/810 cm⁻¹ 峰高比,可能成为判断抗肿瘤药物疗效的有用参数。

Notinger 等^[12,13]以拉曼光谱区分肺癌细胞 A549 活细胞和死细胞,并原位动态观察细胞凋亡过程。以 Triton X-100 处理 A549 细胞,在 0、24、48、72 h 4 个时间点进行分析,光谱可显示凋亡过程中细

胞主要化学成分和分子结构的改变,如 DNA 断裂、蛋白降解和脂质小泡的形成,随凋亡的不断进展拉曼光谱也呈动态变化。Triton X-100 处理后,代表 O-P-O 键伸缩的 788 cm^{-1} 峰相对强度下降,说明 DNA 断裂;代表蛋白质的 $1\,005\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,342\text{ cm}^{-1}$ 峰相对强度下降,代表脂质的 $1\,660\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,303\text{ cm}^{-1}$ 峰相对强度增强,反映了凋亡诱导过程中复杂的分子机制,即 DNA 断裂后发生的 caspase 激活导致的蛋白降解。

和其他肿瘤细胞研究技术相比,拉曼光谱最重要的特点是可进行活细胞分析,因此能对被干预的细胞做实时、原位的动态分析,而不必像其他技术那样对细胞进行固定、染色、荧光标记、核酸提取等处理程序,使分析更加快速、高效。此外,以基本成分拟合的拉曼指纹谱可定量分析细胞内在成分相对量的变化,直接分析也避免了其他处理程序带来的人为误差,为肿瘤细胞研究提供了新模式。

3 结语

肿瘤细胞拉曼光谱研究的目标有两个:①发挥无创、准确、快速和定量分析的特点,提高早期诊断能力,更加适合临床应用的需要;②利用其无损伤、实时定量、原位分析的优势,优化实验技术,使之成为揭示癌变原理、药物和肿瘤细胞相互作用的工具。目前这两方面工作都处于研究阶段,样品处理技术、设备改进、统计分析方法等方面的优化和标准化还需做很多工作。相信随着研究的深入和样品量的扩大,拉曼光谱在肿瘤诊断和研究方面将有很好的应用前景。

参 考 文 献

- Yan XL, Dong RX, Zhang L, et al. Raman spectra of single cell from gastrointestinal cancer patients. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(21): 3290-3292.
- Banerjee HN, Zhang L. Deciphering the finger prints of brain cancer astrocytoma in comparison to astrocytes by using near infrared Raman spectroscopy. *Mol Cell Biochem*, 2007, 295(1-2): 237-240.
- Chen K, Qin Y, Zheng F, et al. Diagnosis of colorectal cancer using Raman spectroscopy of laser-trapped single living epithelial cells. *Opt Lett*, 2006, 31(13): 2015-2017.
- Notinger I, Jell G, Lohbauer U, et al. In situ non-invasive spectral discrimination between bone cell phenotypes used in tissue engineering. *J Cell Biochem*, 2004, 92(6): 1180-1192.
- Short KW, Carpenter S, Freyer JP, et al. Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures. *Biophys J*, 2005, 88(6): 4274-4288.
- Mourant JR, Short KW, Carpenter S, et al. Biochemical differences in tumorigenic and nontumorigenic cells measured by Raman and infrared spectroscopy. *J Biomed Opt*, 2005, 10(3): 031106.
- Crow P, Barras B, Kendall C, et al. The use of Raman spectroscopy to differentiate between different prostatic adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer*, 2005, 92(12): 2166-2170.
- Krishna CM, Sockalingum GD, Kegelaer G, et al. Micro-Raman spectroscopy of mixed cancer cell populations. *Vib Spectrosc*, 2005, 38(1-2): 95-100.
- Gao X, Butler IS, Kremer R. A near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy of epidermal keratinocytes: changes in the protein-DNA structure following malignant transformation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2005, 61(1-2): 27-35.
- Chan JW, Taylor DS, Zwerdling T, et al. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophys J*, 2006, 90(2): 648-656.
- Yu C, Gestl E, Eckert K, et al. Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy. *Cancer Detect Prev*, 2006, 30(6): 515-522.
- Notinger I, Verrier S, Haque S, et al. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells. *Biopolymers*, 2003, 72(4): 230-240.
- Verrier S, Notinger I, Polak JM, et al. In situ monitoring of cell death using Raman microspectroscopy. *Biopolymers*, 2004, 74(1-2): 157-162.

(收稿日期:2007-06-25 修回日期:2007-07-10)