

文章编号:1001-5078(2007)09-0824-04

单个肝癌细胞的拉曼光谱分析研究

杨文沛¹,姚辉璐²,朱 森³,王桂文²,彭立新²,何 敏³,黎永青⁴

(1. 右江民族医学院物理教研室, 广西 百色 533000; 2. 广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530003;

3. 广西医科大学, 广西 南宁 530021; 4. 东卡罗莱纳大学物理系, 美国北卡罗莱纳 27858)

摘 要: 本工作利用激光镊子拉曼光谱系统研究了人正常肝细胞株(LO₂)和肝癌细胞株(SMMC-7721)的单细胞拉曼光谱, 对于每个细胞在不同部位测三个点。实验结果显示: 正常细胞和癌细胞的平均拉曼光谱存在显著差异; 癌细胞谱线强度整体变弱; 正常细胞的1658cm⁻¹处峰和1450cm⁻¹处峰的强度比值为0.63, 癌细胞的为0.99; 癌细胞的核酸、蛋白质、脂类等重要生物分子在结构或含量上都发生了不同的改变。用PCA主成分对单个细胞的平均拉曼光谱进行分析, 结果发现PCA可以正确区分出正常细胞和癌细胞。这些结果表明, 激光镊子拉曼光谱是判断正常肝细胞和肝癌细胞的有效方法。

关键词: 光学; 显微拉曼光谱; 肝癌; 激光镊子; 主成分分析

中图分类号: O657.37; R735.7 **文献标识码:** A

Raman Spectrums of Mono-hepatocellular Carcinoma

YANG Wen-pei¹, YAO Hui-lu², ZHU Miao³, WANG Gui-wen²PENG Li-Xin², HE Min³, LI Yong-qing⁴

(1. Physical Department of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000; 2. Biophysical Laboratory of Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003; 3. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 4. Physical Department of East Carolina University, North Carolina State 27858, USA)

Abstract: Monocellular Raman spectrums of normal liver cell line (LO₂) and carcinoma liver cell line (SMMC-7721) were studied with laser tweezers Raman spectrums system and each cell was investigated in three different points, the result of which showed: significant differences of average Raman spectrums were found between the normal cell and the carcinoma one; And, the spectra line of carcinoma cell became weak at the whole; Additionally, the spectral peak intensity ratio of normal cell at 1658cm⁻¹ and 1450cm⁻¹ was 0.63 while that of carcinoma was 0.99; Moreover, the structure and the amount of protein; nucleic acid, lipids and other such molecules had also changed. Average Raman spectrum of monocell was analyzed with the principal component of PCA, the result of which suggested normal cell and carcinoma cell could be differentiated with PCA. All these indicate that judging normal liver cell and carcinoma cell with laser tweezers Raman spectrums is an efficient method.

Key words: optics; Raman micro-spectroscopy; hepatocellular carcinoma; laser tweezers; principal component analysis

1 引言

拉曼光谱是研究物质分子结构的重要手段之一, 其特征峰位置、强度和线宽可提供构成物质的分子振动、转动方面的信息, 从而反映出分子中不同的化学键或官能团。该方法不需对样品进行特别的处理, 能提供快速、非侵袭性的检测, 给出高专一性

的光谱信息, 使得在线分析和实地检测成为可能。激光光镊拉曼光谱技术是将光学囚禁技术与显微拉

基金项目: 广西科学基金项目(桂科基 0575027)资助课题。

作者简介: 杨文沛(1968-), 男, 讲师, 理学学士, 广西右江民族医学院物理教研室副主任。E-mail: yangwp8686@sina.com

收稿日期: 2007-03-14; **修订日期:** 2007-04-22

曼光谱技术相结合用于单细胞探测的新技术^[1-3]。它与传统显微拉曼光谱技术相比具有如下优点:①光镊可以利用一束聚焦的激光产生的梯度力将单个活细胞长时间固定在焦点附近^[4]。而显微拉曼光谱技术对于受布朗运动影响或会游动的细胞或生物大分子则无能为力。②由于细胞被囚禁在光束焦点位置,因此优化了散射光的收集光路,从而获得高的信噪比。③细胞被囚禁在载玻片上方 $20\mu\text{m}$ 的位置,使来自载玻片的杂散光明显减弱。因此,单细胞光镊拉曼光谱技术可以无干扰地、直接地检测体内细胞生物大分子的变化,从而得到更多的、真实的信息。

肝癌是最常见的癌症,其死亡率很高。在细胞癌变的过程中,组成细胞的基本成分蛋白质、核酸、脂类和糖类等物质结构都会发生一定程度改变,在癌变早期这些变化不引起临床症状且常规的临床检测手段往往难以发现。而拉曼光谱由于能在分子水平上反映物质的结构和变化,目前已成为生物医学工程领域尤其是早期诊断癌症的研究重点。近年来拉曼光谱已被用于乳腺癌、结肠癌、食管癌、前列腺癌和胃癌等研究^[5-7]。但对于肝癌细胞系的拉曼光谱研究目前还未见报道。本文利用激光光镊拉曼光谱仪测量单个正常细胞与肝癌细胞的拉曼光谱,并利用 PCA 主成分分析方法对光谱进行分析,从而建立一个识别正常细胞与癌细胞的运算判断模型,为应用拉曼光谱分析技术对肝癌的诊断进行有益的探索。

2 实验方案

2.1 实验设备

单细胞光镊拉曼光谱技术实验装置如图 1 所示。用一束波长为 785nm 的半导体激光经过滤波后导入一台尼康倒置生物显微镜,显微镜物镜是数值孔径为 1.30,放大倍数为 100 倍的油浸物镜。激光束经物镜聚焦后在焦点附近形成一个单光束光势阱,激光束到达物镜前的光斑直径大约 6mm ,发散角为 2mrad 。半导体激光器通过恒温电路控制以避免波长漂移。样品池由下底密封了 $100\mu\text{m}$ 的石英盖玻片和上边密封了 1 号盖玻片的玻璃板构成,玻璃板中心有一个直径为 6mm 的孔。含有样品的缓冲液就放置在两个玻片之间的孔里。缓冲液里的单个细胞可以被聚焦的激光束产生的辐射压力囚禁在焦点附近,同时这束激光也用来激发被囚禁细胞的

拉曼散射。在收集光路里,物镜也作为收集透镜收集来自细胞的背向散射光,一个 $200\mu\text{m}$ 的针孔用来去除离轴的散射光。细胞的散射光包括三部分:拉曼信号、荧光和弹性散射光。由于是单细胞测量,细胞的荧光明显减小。两个干涉陷波滤波器被用来滤除波长与激发波长相同的弹性散射光。拉曼散射光随后被聚焦进光谱仪的输入狭缝。光谱仪的衍射光栅参数是闪耀波长为 1000nm ,每毫米 600 线。光谱仪耦合到电荷耦合器件 (CCD) 上,为了获得极低的暗电流,CCD 被冷却到 -120°C 。为方便实验操作,被囚禁的细胞通过一个摄像机连续监视。

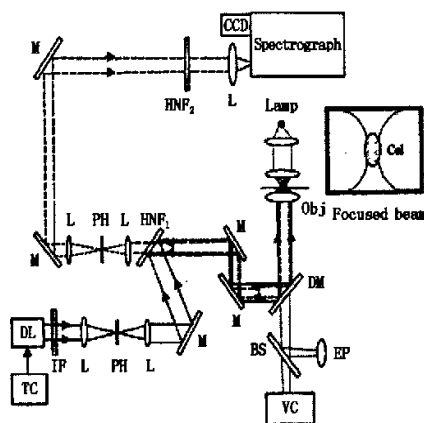


图1 激光镊子拉曼光谱系统示意图

DL - 激光二极管; IF - 干涉滤波片; M - 反射镜; L - 透镜;
BS - 光束分配镜; Obj - 物镜; EP - 目镜; VC - 摄像头;
Lamp - 灯; Cel - 细胞; TC - 温度控制器; PH - 针孔;
DM - 分色镜; HNF - 陷波滤波器; CCD - 电荷耦合器

2.2 样品来源与处理方法

材料:人正常肝细胞 (LO₂) 购于上海午立生物技术有限公司;人肝癌细胞 (SMMC-7721) 由广西医科大学肿瘤医院提供;RPMI-1640 培养液、MEM 培养液、1:250 胰蛋白酶为美国 Hyclone 产品;新生牛血清为杭州四季青生物材料研究所产品。

细胞培养:人正常肝细胞、人肝癌细胞生长在含 10% 新生牛血清、100U/mL 的青霉素、链霉素的 RPMI-1640 培养液中,置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养。定期观察,每 1~2 天换液,最后选用对数生长期细胞进行实验。

2.3 测试方法

用 20mW 激光功率和 30s 曝光时间分别采集 40 个正常肝细胞和 40 个肝癌细胞的拉曼光谱,对于每个细胞按照平均位置分布测三个点,然后对光谱进行背景谱扣除及强度修正。由于每个细胞只

被功率为 20mW 的激光照射了 30s, 因此对细胞生物活性的影响很小。

3 结果与讨论

3.1 人正常肝细胞与肝癌细胞各 40 个细胞的平均拉曼光谱(见图 2)

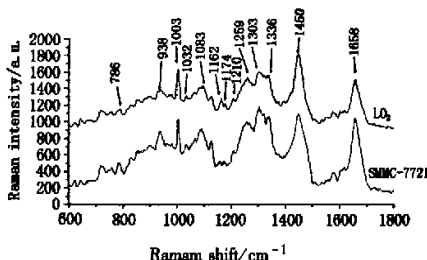


图 2 正常肝细胞(LO₂)和肝癌细胞(SMMC-7721)的平均拉曼光谱

从图 2 中可以看到:人正常肝细胞与肝癌细胞的拉曼特征峰主要出现在 600 ~ 1660cm⁻¹ 的波长范围内,一共找出 14 个明显的特征峰,它们的归属如表 1 所示。

表 1 拉曼光谱峰值对应的物质归属

Tab. 1 the peak positions and assignment of Raman spectra

峰位置/cm ⁻¹ peak positions	归属/assignment
786	DNA: O - P - O, cytosine, uracil, thymine
938	C - C stretch backbone
1001 ~ 1003	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine
1031	C - H in plane bending mode of phenylalanine
1080 ~ 1090	C - C stretch, O - P - O ⁻ stretch
1155	C - C stretching of proteins (also carotenoids)
1170	C - H in plane bending mode of tyrosine
1209	Tryptophan and phenylalanine ν mode
1258	Amide III; adenine/cytosine
1260	Amide III; unordered
1304	CH ₂ deformation (lipid)/adenine, cytosine
1336	Polynucleotide chain
1450	CH ₃ CH ₂ twisting mode of lipid
1654 ~ 1658	Amide I

3.2 人正常肝细胞与肝癌细胞光谱对比分析

(1) 正常肝细胞和肝癌细胞的平均拉曼光谱存在显著差异;癌细胞谱线强度整体变弱,在一系列峰的位置,正常肝细胞的光谱强度都比肝癌细胞高且正常肝细胞 1450cm⁻¹ 处峰的光谱强度比 1658cm⁻¹

处峰高了很多,而肝癌细胞的 1450cm⁻¹ 处峰的光谱强度与 1658cm⁻¹ 处峰相比则变化不大。经计算对于正常肝细胞的 I₁₆₅₈/I₁₄₅₀ 等于 0.63,癌细胞的 I₁₆₅₈/I₁₄₅₀ 等于 0.99。

(2) 核酸分子的变化:肝癌细胞比正常肝细胞在 1083cm⁻¹, 786cm⁻¹ 处峰的光谱强度明显增强。1083cm⁻¹ 的谱线归属 DNA 骨架磷酸二酯集团 PO₂⁻ 的对称伸缩振动, 786cm⁻¹ 的谱线归属 DNA 骨架磷酸根对称伸缩振动。可见细胞癌变,核酸的含量相对增加, DNA 双螺旋结构发生改变。

(3) 脂类分子的变化:肝癌细胞的光谱中 1450cm⁻¹ 的峰高比正常肝细胞明显降低。肝癌细胞的蛋白质酰胺 I 带(1658cm⁻¹ 谱带)与脂类 CH₃ 或 CH₂ 弯曲振动峰(1450cm⁻¹ 谱带)的峰高比明显升高。核酸中磷酸二酯基团的振动峰(1083cm⁻¹ 谱带)与脂类的 CH₂ 或 8 CH₃ 振动峰(1450cm⁻¹ 谱带)峰高之比也明显升高。经计算表明在肝癌细胞中 I₁₆₅₈/I₁₄₅₀ (0.99), I₁₀₈₃/I₁₄₅₀ (0.85) 的比值明显高于正常肝细胞中 I₁₆₅₈/I₁₄₅₀ (0.63), I₁₀₈₃/I₁₄₅₀ (0.53) 的比值,与胃癌组织的研究结果相似^[8-9]。这些谱线强度的减少表明癌细胞中脂肪成分所占的比例大大减少,说明癌细胞生长迅速、耗能快,脂类物质提供生长所需的能量而使得脂类物质难以在癌细胞中聚集。

(4) 蛋白质分子的变化:蛋白质分子的酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸等残基中的 C - O 基团可以与其他基团或分子形成氢键。有氢键结合的 C - O 伸缩振动峰出现在 1162cm⁻¹ 附近,没有氢键相结合的 C - O 伸缩振动峰出现在 1174cm⁻¹ 附近^[10]。由图 2 可见,肝癌细胞中 1162cm⁻¹ 的谱线减弱, 1174cm⁻¹ 的峰高相对增强。说明蛋白质分子中 C - O 受约束的程度降低,形成的氢键受到严重破坏,导致蛋白质的空间构象发生改变。1259cm⁻¹ 处的峰归属蛋白质酰胺 III 中 β - 折叠或无规则卷曲结构, 1658cm⁻¹ 处的峰归属蛋白质酰胺 I 的 α 螺旋结构,由图 2 可见在癌细胞中 1658cm⁻¹ 处的峰明显增高,说明蛋白质的二级结构发生了改变。938cm⁻¹ 肽链骨架 C - C 键振动峰也有所改变。位于 1210cm⁻¹, 1032cm⁻¹ 代表苯丙氨酸的谱线,癌细胞与正常细胞相比均有不同程度的增加,反映了蛋白质分子侧链氨基酸残基的改变。这几种改变叠加的结果,必然导致蛋白质结构的无序性。

3.3 人正常肝细胞与肝癌细胞主成分分析

为了获得更详细可信的结果,我们将 40 个正常

肝细胞和 40 个肝癌细胞的 I_{1658}/I_{1450} 比值分布情况用图 3 表示。从图 3 可以看出,以 I_{1658}/I_{1450} 等于 0.8 作为判断是否癌变的标准,有 5 个癌细胞落在正常细胞区域,同时有 8 个正常细胞落在癌细胞区域,可见以 I_{1658}/I_{1450} 的比值为 0.8 来区分正常细胞与癌细胞,其灵敏度只有 87.5%,特异度只有 80%。

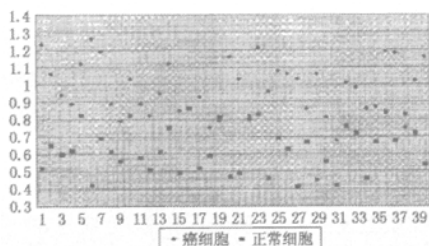


图 3 正常肝细胞(LO_2)、肝癌细胞(SMMC-7721) I_{1658}/I_{1450} 比值分布图

为提高拉曼光谱识别的灵敏度和特异度,我们将原始数据进行减除背景、平滑(线性三点平滑,以消除噪音对数据分析的影响)、求导(消除数据的平移误差)后,采用 PCA(principle components analysis,主成分)的方法对光谱数据重新进行分析。主成分分析是将研究对象的多个相关变量转化为少数几个不相关综合变量的一种多元统计方法。它研究如何将多指标问题化为较少的综合指标问题,以此建立识别模型,结果如图 4 所示。图中“☆”代表人正常肝细胞,“○”代表肝癌细胞。由图 4 我们可以清楚地看到,对于细胞的平均拉曼光谱,正常肝细胞与肝癌细胞分别落在各自相应的区域,区分率达 100%,即灵敏度和特异度均为 100%。由此表明,PCA 方法能够准确区别正常肝细胞和肝癌细胞。同时在 PCA 中我们也注意到癌细胞的分布区域比正常细胞的区域要大,这说明癌细胞在个体差异上比正常细胞的要大,其内部物质均匀性比正常细胞的要差。

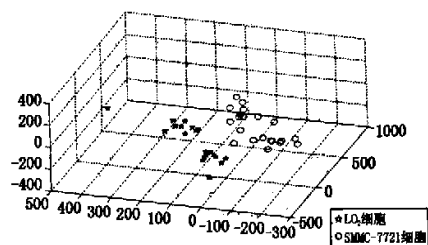


图 4 正常肝细胞(LO_2)和肝癌细胞(SMMC-7721)主成分分析

综上所述,我们利用激光光镊拉曼光谱仪测量了 40 个人正常肝细胞和肝癌细胞的拉曼光谱。结

果表明,正常肝细胞与肝癌细胞的平均拉曼光谱在峰强度、频率等方面均存在明显差异;癌细胞谱线强度整体变弱;癌细胞的核酸、蛋白质、脂类等重要生物分子在结构或含量上都发生了不同的改变;如果在肝癌细胞中以 I_{1658}/I_{1450} 的比值为 0.8 来区分正常细胞与癌细胞,灵敏度只有 87.5%、特异度只有 80%;而在此基础上建立起来的 PCA 主成分分析方法判别系统,其判别正常细胞和癌细胞的灵敏度和特异度均为 100%。通过分析我们还发现该判别方法对光谱的激发位置要求不高,这些都为拉曼光谱进行临床诊断提供了有力依据。

参考文献:

- [1] Xie C A, Dinno M A, Li Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. Opt. Lett., 2002, 27: 249.
- [2] Xie C A, Li Y Q. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cell using optical trapping and shifted excitation difference techniques[J]. Appl. Phys., 2003, 93: 2982.
- [3] Xie C A, Li Y Q, Tang W, et al. Study of dynamical process of heat denaturation in optically trapped single micro organisms by near-infrared Raman spectroscopy[J]. Appl. Phys., 2003, 94: 6138.
- [4] Ashkin A, Schutze K, Dziedzic J M. Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser[J]. Nature, 1990, 348: 346-348.
- [5] Nicholas Stone, Catherine Kendall, Jenny Smith, et al. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers[J]. Faraday Discuss., 2004, 126: 141-157.
- [6] Yan Xunling, Wang Qiuguo, Dong Ruixin, et al. Raman spectra of cell from breast cancer patients[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2005, 25 (1): 58. (in Chinese)
- [7] Tang Weiyue, Wang Jiefang, Xu Ping. Research of stomach cancer tissue by Raman spectroscopy[J]. Laser Journal, 2004, 25(1): 82. (in Chinese)
- [8] Hayashi K, Hecht P, Thabit G, et al. The biologic response to laser thermal modification in an in vivo sheep model[J]. Clin Orthop, 2000, (373): 265-276.
- [9] Imhoff A, Ledermann T. Arthroscopic subacromial decompression with and without the Holmium: YAG - laser. A prospective comparative study[J]. Arthroscopy, 1995, 11(5): 549-556.
- [10] Wong P T, Cadrin M, French S W, et al. Distinctive infrared spectral features in liver tumortissues of mice: evidence of structural modifications at molecular level[J]. Exp. Mol. Pathol., 1991, 55: 269-284.