

文章编号:1001-5078(2007)09-0856-04

X 射线照射 HEP-2 细胞的 FTIR 光谱研究

张广水,刘婉华,郭郑元,张建民,唐伟跃
(郑州大学物理工程学院,河南 郑州 450052)

摘要:通过对不同剂量 X 射线照射的人上皮样喉癌细胞(HEP-2)的傅里叶变换红外(FTIR)光谱研究发现:不同剂量组 HEP-2 细胞受到的影响存在较大差异。与对照组相比,HEP-2 细胞内部的蛋白质、核酸和脂类的含量在较大剂量组大幅减少;随照射剂量的逐渐增大,部分谱线位置频移较明显,如 3314cm^{-1} 谱线逐渐红移 $3 \sim 16\text{cm}^{-1}$, 1454cm^{-1} 谱线逐渐蓝移 3cm^{-1} , 1400cm^{-1} 谱线逐渐红移 3cm^{-1} , 2847cm^{-1} 谱线逐渐蓝移 $4 \sim 8\text{cm}^{-1}$, 表明这些谱线对应的基团内部构象发生变化。另外,从相对峰强比 I_{1654}/I_{1542} , I_{1454}/I_{1400} , I_{2958}/I_{2847} 随照射剂量的变化关系发现,同对照组相比,HEP-2 细胞在 8Gy 组内部蛋白质、核酸、脂类的含量和构象改变最为明显,癌化程度最弱,说明在所设定剂量组中 8Gy X 射线照射对 HEP-2 细胞的影响相对最好,这为将来进一步寻找射线作用于癌细胞的最佳剂量提供了一定的实验依据。

关键词:傅里叶变换红外光谱;人上皮样喉癌细胞;X 射线

中图分类号: O657.33 **文献标识码:** A

FTIR Spectroscopic Study of HEP-2 Cell Irradiated by X-Ray

ZHANG Guang-shui, LIU Wan-hua, GUO Zheng-yuan, ZHANG Jian-min, TANG Wei-yue
(College of Physics and Engineering of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to study the HEP-2 cells irradiated by X-Ray with different dose. The results showed that there were significant discrepancies in the different dose groups' cells. Compared with the control group, the contents of protein, nucleic acid and fat in the higher dose groups were decreased obviously. The wavenumbers of some peaks were shifted when irradiation dose was increased gradually. For example, there were red-shift $3 \sim 16\text{cm}^{-1}$ in the absorption peak around 3314cm^{-1} ; the peak of 1454cm^{-1} was blue-shifted by 3cm^{-1} ; the peak of 1400cm^{-1} was red-shifted by 3cm^{-1} ; the peak of 2847cm^{-1} was blue-shifted by $4 \sim 8\text{cm}^{-1}$. In addition, from the relative intensities ratios of I_{1654}/I_{1542} , I_{1454}/I_{1400} , I_{2958}/I_{2847} , the contents and frameworks of protein, nucleic acid and fat were changed most intensely in the 8Gy dose group, which was compared with the control group. It suggested that the cancerization of the 8Gy dose group's cells was the lowest in these groups. All of the results may offer some experimental evidences in search of the optimum irradiational dose of X-ray.

Key words: FTIR; HEP-2 cell; X-Ray

1 引言

目前国内外对肿瘤的临床治疗,多采用手术切除、放射治疗、药物治疗等手段。就放疗而言,放射源多采用 X 射线, ^{60}Co , ^{131}I 等。但是对于放疗时所需采用的放射剂量,还没有一个统一的标准可供参

考。医生在临床治疗中对放射剂量的选定,仅限于

基金项目:河南省科技攻关项目(No. 0624410052)

作者简介:张广水(1983-),男,郑州大学,物理工程学院生物医学光子学方向研究生。E-mail: waterelfzgs@163.com

收稿日期:2007-03-10;修订日期:2007-05-05

“经验”的层面,存在一定的主观性。傅里叶变换红外光谱技术从 20 世纪 80 年代出现以来,一直被广泛应用于研究各种癌细胞和正常细胞之间的差别,实践证明它能在一定程度上反映细胞内部蛋白质、核酸、脂类以及碳水化合物的成分、构象和含量变化^[1-2]。而且红外光谱仪较其他测量仪器廉价,有望成为检测癌变的实用设备。

本文利用傅里叶变换红外光谱仪对经不同剂量 X 射线照射的 HEP-2 细胞进行测定,发现不同剂量射线作用于 HEP-2 细胞后,其红外吸收光谱存在差异,尤其是小剂量和大剂量之间在谱线位置和吸收强度两方面存在较大差异。通过光谱数据的分析,我们发现 X 射线的照射剂量与 HEP-2 细胞内部成分和构象的变化并不成比例,而是存在某个剂量能够更好的促进 HEP-2 细胞凋亡,从而为将来能够寻找放射源的最佳剂量提供参考。

2 实验

2.1 实验材料及仪器

细胞:人上皮样喉癌细胞株(HEP-2,由郑州大学病理解剖学重点实验室提供)。

仪器:37℃,5% CO₂ 的细胞培养箱,小型台式离心机 TGL216G;德国西门子 6MeV 直线加速器(由郑州大学第一附属医院光子刀中心提供);德国 CHRIST 冰冻干燥机,型号 ALPHA 1-2LD;美国 Nicolet IR200 傅里叶变换红外光谱仪(由郑州大学化工学院提供)。

2.2 实验方法

样品制备:分别取相同数量的处于指数生长期的 HEP-2 细胞,分成 6 个剂量组(1Gy, 2Gy, 5Gy, 8Gy, 10Gy, 12Gy)和一个空白对照组(对照组除不受射线照射外,所处环境条件和其他各组完全一样),对剂量组进行 X 射线照射。继续培养 72h,收集各皿细胞,进行冰冻干燥,用 KBr 压片法制成薄片,置于红外光谱仪样品室进行光谱采集。

仪器参数设置:

直线加速器参数设定:X 光子能量为 6MeV, X 光出射口距盛放细胞的培养皿 100cm,布野面积 10cm × 20cm;

红外光谱仪参数设定:光谱范围 4000 ~ 400cm⁻¹,分辨率 1cm⁻¹,扫描次数 16 次。

3 实验结果

对各剂量组 HEP-2 细胞进行 X 射线照射后继续培养 72h,分别采集 4000 ~ 400cm⁻¹范围内的 FT-IR 光谱,如图 1 和图 2 所示。

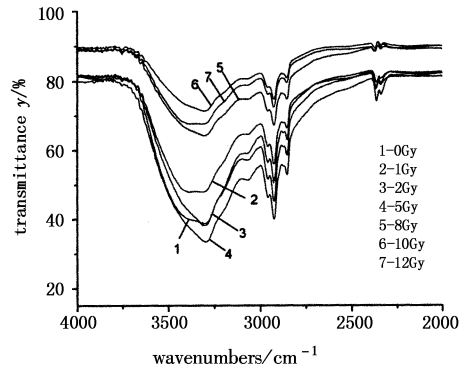


图 1 不同剂量组培养 72h 后的 FTIR 光谱 (4000 ~ 2000cm⁻¹)

Fig. 1 the FTIR spectrum of different dose group cultured by 72h(4000 ~ 2000cm⁻¹)

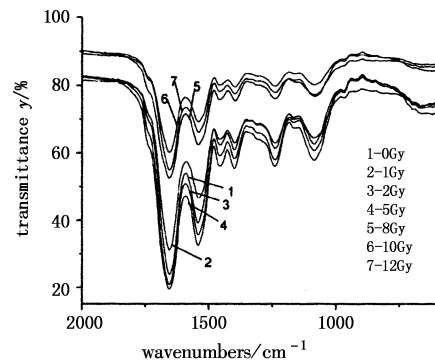


图 2 不同剂量组培养 72h 后的 FTIR 光谱 (2000 ~ 600cm⁻¹)

Fig. 2 the FTIR spectrum of different dose group cultured by 72h(2000 ~ 600cm⁻¹)

HEP-2 细胞红外吸收光谱的各谱峰的归属详见表 1。

表 1 HEP-2 细胞红外光谱的各谱峰的归属

Tab. 1 the recognition of each peaks in the FTIR spectra of the HEP-2 cells

谱峰位置 /cm ⁻¹	振动模式初步指认	谱峰位置 /cm ⁻¹	振动模式初步指认
3314	v(N-H)	1542	Amide II α-helix
2958	v _{as} (CH ₃)	1454	δ(CH ₂)
2925	v _{as} (CH ₂)	1400	δ _s (CH ₃)
2847	v _s (CH ₂)	1239	v _{as} (PO ₂ ⁻)
1654	Amide I α-helix	1086	v _s (PO ₂ ⁻)

注:v-伸缩振动;v_s-对称伸缩振动;v_{as}-反对称伸缩振动;δ-弯曲振动;δ_s-对称弯曲振动。

4 分析讨论

通过对7个照射剂量的红外光谱分析,发现在较小剂量(1Gy,2Gy,5Gy) X-ray作用下癌细胞各谱带吸收强度有明显变化;而在较大剂量(8Gy,10Gy,12Gy)作用下吸收强度明显变小,说明大剂量射线作用后,癌细胞内部各组成成分的含量较无射线照射时减少。吸收谱带3314,2847,1454,1400 cm^{-1} 频移较明显,而其他谱带频移较微小。

4.1 蛋白质吸收谱带分析

4.1.1 蛋白质分子中的N-H基团谱带

HEp-2细胞蛋白质分子中的N-H基团振动谱带位于3314 cm^{-1} 处,与对照组比较,随着照射剂量逐渐增大,3314 cm^{-1} 的波数大约红移3~16 cm^{-1} ,说明N-H基团的氢键化程度增强^[3],原因可能是X射线照射能够提供给N-H基团一定的能量形成氢键。从各剂量组3314 cm^{-1} 的吸收强度能够表明,蛋白质分子中的N-H基团含量随X射线照射剂量的增大而逐渐减少。

4.1.2 酰胺I带、II带

1654 cm^{-1} ,1542 cm^{-1} 处的吸收峰归属于蛋白质分子的酰胺I带、II带,各剂量组的频移均不明显,但是在吸收强度上8Gy,10Gy,12Gy组的吸收明显变小。有关文献曾报道,肿瘤组织中酰胺I带、II带的相对峰强比 I_{1654}/I_{1542} 明显高于正常组织, I_{1654}/I_{1542} 可以作为判断组织癌化程度的一个有效指标^[4]。我们取不同剂量1654 cm^{-1} ,1542 cm^{-1} 处的相对峰强比 I_{1654}/I_{1542} (表2),相对峰强比随剂量的变化关系如图3所示。图3表明在所设定的各剂量组中 I_{1654}/I_{1542} 在8Gy时最小,说明HEp-2细胞在8Gy时的癌化程度最小,细胞内部蛋白质的含量改变相对较大,作者认为可能是在此剂量时能够更大程度的抑制HEp-2细胞的新陈代谢。

表2 各剂量组吸收光谱的

峰高比 I_{1654}/I_{1542} , I_{1454}/I_{1400} , I_{2958}/I_{2847}

Tab. 2 the intensities ratios of

I_{1654}/I_{1542} , I_{1454}/I_{1400} , I_{2958}/I_{2847}

of each spectrum with different dose

峰高比	照射剂量/Gy						
	0	1	2	5	8	10	12
I_{1654}/I_{1542}	1.25	1.29	1.23	1.19	1.18	1.29	1.33
I_{1454}/I_{1400}	0.962	0.973	0.977	0.984	0.987	0.976	0.971
I_{2958}/I_{2847}	1.179	1.157	1.168	1.147	1.137	1.149	1.164

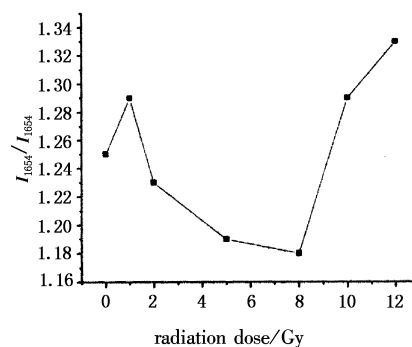


图3 I_{1654}/I_{1542} 随照射剂量的变化关系

Fig. 3 the change of I_{1654}/I_{1542} with different dose

4.2 核酸分子谱带

4.2.1 脱氧核糖中(CH₂)弯曲振动谱带和DNA胸腺嘧啶中(CH₃)对称弯曲振动谱带

1454 cm^{-1} 归属于核酸分子中脱氧核糖的(CH₂)的弯曲振动谱带。同对照组相比,1454 cm^{-1} 均向高波数大约移动3 cm^{-1} ,原因可能是-CH₂连接了不饱和基团或电负性基团致使其构象发生变化^[5]。1400 cm^{-1} 源于DNA胸腺嘧啶中(CH₃)的对称弯曲振动谱带,在大剂量射线作用红移3 cm^{-1} ,作者认为可能是射线照射损伤了DNA的某些复制机制,使癌细胞增殖和分裂变慢。已经知道 I_{1454}/I_{1400} 可以作为判断癌变组织和正常组织的依据,癌变组织 $I_{1454}/I_{1400} < 1$,正常组织 $I_{1454}/I_{1400} > 1$, I_{1454}/I_{1400} 越接近于1说明组织癌化程度越低^[6]。取1454 cm^{-1} ,1400 cm^{-1} 相对峰强比 I_{1454}/I_{1400} (见表2),由图4可以看出 I_{1454}/I_{1400} 随着剂量增加而先变大后又变小,在8Gy时达到最大值,说明随着照射剂量不同,HEp-2细胞的癌化程度不同,8Gy剂量组癌化程度相对最大。

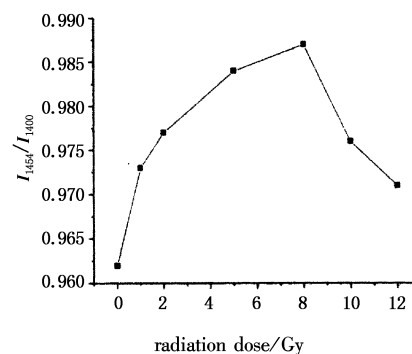


图4 I_{1454}/I_{1400} 随照射剂量的变化关系

Fig. 4 the change of I_{1454}/I_{1400} with different dose

4.2.2 磷酸二酯基团(PO₂⁻)的伸缩振动谱带

核酸分子中磷酸二酯基团的对称伸缩振动

$\nu_s(\text{PO}_2^-)$ 谱带对应于 1086cm^{-1} , 反对称伸缩振动 $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ 谱带对应于 1239cm^{-1} , 其频移都不明显, 仅 1086cm^{-1} 在较大剂量组 (8Gy, 10Gy, 12Gy) 略微红移约 2cm^{-1} , 说明 PO_2^- 基团非氢键化的化学键有所加强; 较大剂量组 1086cm^{-1} , 1239cm^{-1} 处的吸收强度均大幅下降, 表明 HEP-2 细胞内部核酸含量明显减少, 从而可以说明大剂量射线作用抑制了 HEP-2 细胞内部 DNA 的大量复制。

4.3 脂类分子谱带的变化

HEP-2 细胞中脂类分子的特征谱带位于 2958cm^{-1} , 2925cm^{-1} , 2847cm^{-1} , 分别对应于 (CH_3) 的反对称伸缩振动、 (CH_2) 的反对称伸缩振动、 (CH_2) 的对称伸缩振动谱带。由吸收光谱可以看出, 各剂量组 2958cm^{-1} , 2925cm^{-1} 基本不发生移动, 而 2847cm^{-1} 波数增加了 $4 \sim 8\text{cm}^{-1}$, 尤其是在 8Gy, 10Gy 组频移较大达到 8cm^{-1} 。 CH_2 基团伸缩振动谱带反映出膜脂分子内碳氢链构象的有序化程度^[7-8], 其波数增加反映出膜脂碳氢链旁式构型增多。从 2958cm^{-1} , 2847cm^{-1} 的峰高比 I_{2958}/I_{2847} (见表 2) 随剂量的变化关系 (见图 5) 可以发现, CH_2 对称伸缩振动基团在 8Gy 组相对含量最大, 说明 8Gy 剂量组 HEP-2 细胞内的脂类物质增加幅度相对最大, 膜脂中亚甲基链的无序状态程度最大。

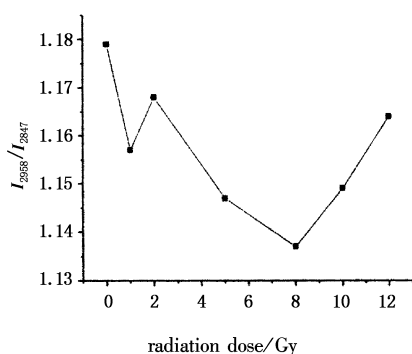


图 5 I_{2958}/I_{2847} 随照射剂量的变化关系

Fig. 5 the change of I_{2958}/I_{2847} with different dose

5 小结

综上所述, HEP-2 细胞经不同剂量的 X 射线照射后, 其内部蛋白质、核酸和脂类的含量发生变化, 较小剂量组变化较小, 在较大剂量组含量大幅减少。蛋白质分子中的 N-H 基团谱带、核酸分子

中脱氧核糖 $\delta(\text{CH}_2)$ 谱带、DNA 胸腺嘧啶 $\delta_s(\text{CH}_3)$ 谱带、脂类分子中 $\nu_s(\text{CH}_2)$ 谱带的谱线位置发生较明显的频移, 说明不同剂量 X 射线对 HEP-2 细胞内部蛋白质、核酸和脂类的构象存在一定的影响。尤其是我们注意到在所设定的剂量组中 8Gy 的 I_{1654}/I_{1542} , I_{1454}/I_{1400} , I_{2958}/I_{2847} 变化最为明显, 表明 HEP-2 细胞内部各成分的构象和相对含量在该剂量时变化最为强烈, 受到射线的影响最大, 由此能为将来寻找射线与癌细胞作用的最佳剂量提供一定的实验依据。

参考文献:

- [1] Rigas B, Wong P T T. Human colon adenocarcinoma cell lines display infrared spectroscopic features of malignant colon tissues[J]. Cancer Research, 1992, 52: 84-88.
- [2] Benedetti E, Teodori L, Trinca M L, et al. New approach to the study of human solid tumor cells by means of FT-IR microspectroscopy [J]. Appl. Spectrosc., 1990, 44: 1276-1283.
- [3] Huo Hong, Hu Xiang, Guan Hong-wei, et al. Studies on human breast cancer tissue with infrared spectrometry [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2000, 21(8): 1244-1247. (in Chinese)
- [4] Wang Jian-sheng, Xu Yi-zhuang, Shi Jing-sen, et al. FT-IR spectroscopic study on normal and cancerous tissues of esophagus [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2003, 23(5): 863-865. (in Chinese)
- [5] Lu Yi-Xian, Zhang Yue-can, Chu Jun-hao, et al. IR Spectroscopic study of brain tumour tissue slice [J]. Chinese journal of clinical neurosciences, 2000, 8(4): 278-279.
- [6] Xu Yi-zhuang, Zhao Ying, Xu Zhi, et al. Novel infrared spectroscopy methods for clinical diagnosis of tumor [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2005, 25(11): 1775-1778. (in Chinese)
- [7] Wang Fan, Ling Xiao-feng, Yang Zhan-lan, et al. FTIR spectroscopic study of normal and malignant tissues of rectum [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2003, 23(3): 498-501. (in Chinese)
- [8] B Rigas, S Morgello, I S Goldman, et al. Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87: 8140-8144.