

文章编号:1001-5078(2008)02-0118-04

· 激光技术与应用 ·

恶性骨肿瘤患者红细胞的拉曼光谱研究

刘 伟¹, 赵元黎¹, 余发军¹, 张凤秋¹, 王雷鸣², 刘 丹²

(1. 郑州大学物理工程学院, 材料物理教育部重点实验室, 河南 郑州 450052; 2. 郑州市骨科医院, 河南 郑州 450052)

摘 要:通过对正常人和恶性骨肿瘤患者红细胞的拉曼光谱进行了研究。发现对于恶性骨肿瘤患者, 部分谱线如 1001.2, 1228.8, 1398.7, 1372.8 cm^{-1} 红移了 2~4 cm^{-1} , 说明这些谱线对应的基团内部构象发生微小变化。以 1586 cm^{-1} 为标记峰得到各峰的相对峰强比, 发现恶性骨肿瘤患者红细胞的拉曼峰相对于正常人的相对强度的比值在 1505, 1228, 1087, 1001 和 747 cm^{-1} 处显著减小, 说明亚铁血红素、苯丙氨酸和脱氧核糖在红细胞内的含量减少。由统计分析可知 $I_{1586/1228}$, $I_{1586/1001}$ 和 $I_{1586/1169}$ 的峰-峰比的变化可为恶性骨肿瘤的早期诊断提供一定的依据。

关键词:红细胞; 亚铁血红素; 恶性骨肿瘤; 拉曼光谱

中图分类号: O657.37; R738.1 **文献标识码:** A

Raman Spectra of Red-cell from the Malignant Osteoma

LIU Wei¹, ZHAO Yuan-li¹, YU Fa-jun¹, ZHANG Feng-qiu¹, WANG Lei-ming², LIU Dan²

(1. Physical Engineering College of Zhengzhou University, Key Laboratory of Materials Physics of State Education Commission, Zhengzhou 450052, China; 2. Zhengzhou Orthopaedics Hospital, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: The Raman spectra of red-cell from the normal blood and the malignant osteoma blood was given. For the malignant osteoma, lines of 1001.2, 1228.8, 1398.7, 1372.8 cm^{-1} were red shifted 2~4 cm^{-1} . It supported that the conformation of the base clusters were changed punily. The ratio of relative intensity of lines based on 1586 cm^{-1} in red-cell were minished in 1505, 1228, 1087, 1001 and 747 cm^{-1} , which showed the contents of heme, phenylalanine and deoxyribose in red-cell from the malignant osteoma were reduced. According to the statistic analysis, the changes of $I_{1586/1228}$, $I_{1586/1001}$ and $I_{1586/1169}$ might provide a method for diagnosing malignant osteoma.

Key words: red-cell; heme; malignant osteoma; Raman spectra

1 引言

红细胞是血液中最多种细胞,其主要功能是运输 O_2 和 CO_2 ,此外还在酸碱平衡中起一定的缓冲作用。红细胞的这两项功能都是通过细胞内的血红蛋白来实现的。血红蛋白(Hb)由珠蛋白和亚铁血红素结合而成。Bayden R. Wood 等人通过单个红细胞与单晶态的血晶素、血红素和血红蛋白拉曼光谱的比较分析,发现红细胞的主要特征峰都来自于自由态的铁-卟啉结合蛋白^[1]。而铁-卟啉结合蛋白属于亚铁血红素(heme)的主要物质,因此,对红细胞的拉曼光谱的分析主要归结于对其内部亚铁血红素的分析。单晶态的血晶素、血红素的拉曼光谱其信噪比低且特征峰少,而红细胞的拉曼光谱的

信噪比很高且有较多特征峰,这使得对红细胞的拉曼光谱研究具有更加重要的意义^[2]。

骨肿瘤多发于 15~25 岁青少年,分为良性和恶性。其中恶性骨肿瘤单纯手术 5 年存活率为 20%,加上相应的其他治疗,可以提高到 55%~80%。本文分析了正常人和恶性骨肿瘤患者红细胞的拉曼光谱,以研究红细胞内各物质结构和含量的变化。

2 实验部分

2.1 实验样品及仪器

血液:正常人血液 11 例,恶性骨肿瘤患者的血

作者简介:刘 伟(1982-),男,硕士研究生,从事生物医学光子学方向研究。E-mail:lw198299@sohu.com

收稿日期:2007-07-19; **修订日期:**2007-09-10

液 10 例,均由郑州市骨科医院提供(抗凝剂为 ED-TA - K₂)。

仪器:小型台式离心机 TGL216G;激光显微共聚焦拉曼光谱仪(英国 Renishaw 公司生产)。

2.2 实验方法

样品制备:各取 1mL 血液放入离心管中,离心 5min(2200rpm)以分离出红细胞溶液。然后用 PBS 洗涤三次,适量稀释后固定成片进行拉曼光谱采集。

激光显微共聚焦拉曼光谱仪参数设定:激发波长 514nm,光谱扫描范围 1800 ~ 600cm⁻¹,扫描时间 20s,采集次数 1 次。

3 结果与讨论

3.1 构象分析

正常人和恶性骨肿瘤患者红细胞的拉曼光谱如图 1 所示,其各峰峰位及归属如表 1 所示。在 1300 ~ 1700cm⁻¹的高频区域存在一些特征峰,其中与 v₄ 模式对应的特征峰对卟啉环内的 Π 电子转移构象灵敏^[3,6-7],而与 v₂、v₃ 模式对应的谱线对于血红蛋白内 heme 的铁原子的配位数和自旋状态的变化是构象灵敏的^[7-8]。根据相关文献,由 1505cm⁻¹ (v₃),1561cm⁻¹ (v₂),1637cm⁻¹ (v₁₀) 三条谱线可知细胞内的 heme 为六配位低螺旋状态^[9-10]。

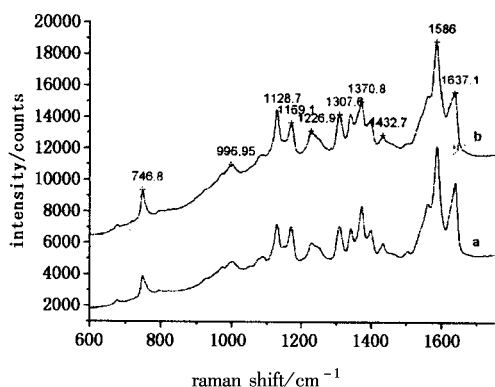


图 1 在 514nm 激光激发下红细胞的拉曼光谱 (a - 正常人;b - 恶性骨肿瘤患者)

对应归属于苯丙氨酸的单基取代苯基环振动的谱线 1001.2cm⁻¹,在恶性骨肿瘤患者的光谱中位移到 996.95cm⁻¹,说明苯丙氨酸的构象发生了变化。

1228.8cm⁻¹ 归属于次甲基变形模式,该峰在恶性骨肿瘤患者的光谱中位移到 1226.9cm⁻¹。由于次甲基振动受蛋白质相互作用和血色素堆积的影响很大,故上述波段的较小位移说明蛋白质发生变异使红细胞内亚铁血红素的浓度发生了微小变化^[1]。由于 heme 在红细胞内的分布有一定的规律,故亚铁血红素浓度的变化会对细胞内氧的运输产生一定

的影响^[3]。

1398.7cm⁻¹,1372.8cm⁻¹ 属于吡咯环呼吸模型,这两个峰向低波数移动了 2cm⁻¹左右波数。峰位位移很小说明 Fe 原子的螺旋状态有微小变化^[1]。

表 1 红细胞显微拉曼光谱的峰位及归属^[1,3-5]

健康人	恶性骨肿瘤患者	模式	振动模式初步指认
1637.8	1637.1	v ₁₀	v(C _α C _m) _{asym}
1586	1586	v ₃₇	v(C _α C _m) _{asym}
1561.5	1561.8	v ₂	v(C _β C _β)
1505.3	1505.3	v ₃	v(C _β C _β)
1433.3	1432.7	v ₂₈	v(C _α C _m) _{sym}
1398.7	1396.3	v ₂₀	v(pyr quarter-ring)
1372.8	1370.8	v ₄	v(pyr half-ring) _{sym}
1341.1	1339.9	v ₄₁	v(pyr half-ring) _{sym}
1308	1307.6	v ₂₁	δ(C _m H)
1228.8	1226.9	v ₁₃ or v ₄₂	δ(C _m H)
1169.7	1169.1	v ₃₀	Tyr
1127.9	1128.7	v ₂₂	v(pyr half-ring) _{sym}
1087.6	1088.4	v ₂₃	v(C _β C ₁) _{asym}
1001.2	996.95	v ₄₇	v(C _β C ₁) _{asym}
747.73	746.8	v ₁₅	v(pyr breathing)

注:v - 伸缩振动;δ - 面内变形振动;sym - 对称;asym - 反对称;pyr - 吡咯;Tyr - 色氨酸。

3.2 物质含量分析

红细胞内峰值强度最大的拉曼峰位于 1586cm⁻¹,而单晶态的 heme、血晶素等的拉曼谱带内最强的峰位于 1374cm⁻¹。这可能是由于 514nm 的激发光对红细胞和单晶态的 heme 的增强机制不同^[4]。以位于 1586cm⁻¹的峰为标记峰^[5],得到各个峰的相对强度,如表 2 所示。

表 2 正常人和恶性骨肿瘤患者各拉曼峰的相对峰强

相对峰强	健康人	恶性骨肿瘤患者	相对峰强	健康人	恶性骨肿瘤患者
I _{1586/1637}	1.231505	1.239406	I _{1586/1308}	1.708651	1.384915
I _{1586/1586}	1	1	I _{1586/1228}	2.014316	1.515054
I _{1586/1561}	1.425621	1.258014	I _{1586/1169}	1.720496	1.448165
I _{1586/1505}	2.204576	1.624908	I _{1586/1127}	1.684426	1.364022
I _{1586/1433}	2.02516	1.552195	I _{1586/1087}	2.375784	1.759809
I _{1586/1398}	1.779794	1.427687	I _{1586/1001}	2.523473	1.883543
I _{1586/1372}	1.452576	1.295923	I _{1586/747}	3.130977	2.303126
I _{1586/1341}	1.740277	1.379417			

由表2可知,除了 1637cm^{-1} 峰的相对峰强几乎没有变化外,恶性骨肿瘤患者相对于正常人红细胞的拉曼峰强都有不同程度的减小,说明恶性骨肿瘤患者红细胞内各物质的含量都有所减少。相对峰强减小较明显的峰主要有 1505cm^{-1} , 1228cm^{-1} , 1087cm^{-1} , 1001cm^{-1} 和 747cm^{-1} 。 1505cm^{-1} 对 heme 内中心铁原子的配位和自旋状态敏感, 1087cm^{-1} 和 1001cm^{-1} 归属于苯丙氨酸的单基取代苯基环振动, 1228.8cm^{-1} 归属于核酸分子中脱氧核糖的次甲基变形模式, 747cm^{-1} 归属于 heme 内吡咯环的呼吸振动。这说明对于恶性骨肿瘤患者,亚铁血红素、苯丙氨酸和脱氧核糖在红细胞内的含量明显减少。

3.3 红细胞拉曼光谱对肿瘤的诊断意义

拉曼光谱能够精确地反映物质的结构和含量变化,利用光谱的特征变化可以为恶性骨肿瘤的诊断提供客观依据。作为构象分析主要依据的拉曼峰移在恶性骨肿瘤患者和正常人之间变化较小,而与物质含量相关联的相对峰强变化明显。因此,本文对相对峰强变化最明显的五个峰作统计分析。

对 $I_{1586/1505}$, $I_{1586/1228}$, $I_{1586/1087}$, $I_{1586/1001}$ 和 $I_{1586/747}$ 分别进行统计分析(正常人血样11例,恶性骨肿瘤患者血样10例),可知对于大多数恶性骨肿瘤患者的血样,上述五个峰强比都小于大多数正常人血细胞的拉曼峰峰强比,说明亚铁血红素、苯丙氨酸和脱氧核糖在恶性骨肿瘤患者红细胞内含量的减少具有普遍意义。其中 $I_{1586/1228}$ 和 $I_{1586/1001}$ 的样品符合率较为理想,可作为判别正常人和恶性骨肿瘤患者的依据。 1169cm^{-1} 归属于色氨酸,在拉曼谱图中其相对峰强的变化并非很明显。作 $I_{1586/1169}$ 的统计分析,发现样品的符合率很高,说明这一峰强比可用于对恶性骨肿瘤的检测,这与苏玉玲等人关于恶性骨肿瘤患者血清的研究相一致^[11](如图3和表3所示)。

表3 正常人和恶性骨肿瘤患者红细胞的符合率

符合条件的血样比例	正常人红细胞/%	恶性骨肿瘤患者红细胞/%
$I_{1586/1505}$ (以2.0为界)	72.7	100
$I_{1586/1228}$ (以1.7为界)	90.9	80
$I_{1586/1087}$ (以2.1为界)	81.8	80
$I_{1586/1001}$ (以2.31为界)	81.8	100
$I_{1586/747}$ (以2.8为界)	81.8	80
$I_{1586/1169}$ (以1.57为界)	90.9	80

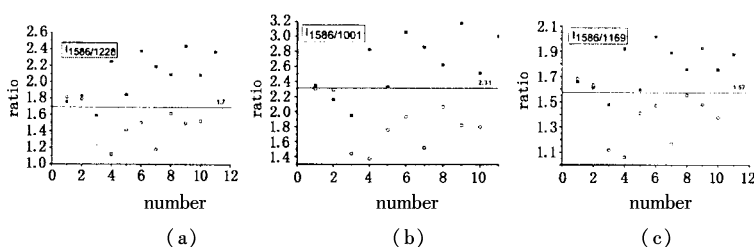


图3 $I_{1586/1228}$, $I_{1586/1001}$ 和 $I_{1586/1169}$ 的比值分布图
(■ - 正常人; ○ - 恶性骨肿瘤患者)

4 小结

Edward DeMoll 等人对血红蛋白和去侧链的血红蛋白与氧结合状态的判别进行了研究^[12]; YasuhiroMie 等人通过对各种天然和人造肌球蛋白的分析,研究了亚铁血红素的功能^[13]; 国内严拯宇等人对巴洛沙星与血清白蛋白的相互作用进行了研究^[14]。这些研究使人们对血液内各物质的结构与功能有了进一步的认识。本文通过对正常人和恶性骨肿瘤患者红细胞的拉曼光谱进行研究,发现恶性骨肿瘤患者红细胞内 Fe 原子的螺旋状态有微小变化,亚铁血红素、苯丙氨酸和脱氧核糖在红细胞内的含量减少。由统计分析可知 $I_{1586/1228}$, $I_{1586/1001}$ 和 $I_{1586/1169}$ 的峰-峰比值的可为恶性骨肿瘤的判定提供一定的依据。在今后的实验中,我们将对多种肿瘤类型的患者的红细胞进行研究,以分析不同肿瘤患者红细胞内部各物质的变化。

参考文献:

- [1] Bayden R Wood, Brain Tait, Donald McNaughton. Biochimica et Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte[J]. Biophysica Acta, 2001, 1539: 58 - 70.
- [2] Yasutomo Nagano, Jin-Gang Liu, Yoshinori Naruta, et al. UV resonance Raman study of model complexes of the CuB site of cytochrome c oxidase[J]. Journal of Molecular Structure, 2005, 735 - 736: 297 - 291.
- [3] Bayden R Wood, Larissa Hammer, Don McNaughton. Resonance Raman spectroscopy provides evidence of heme ordering within the functional erythrocyte[J]. Vibrational Spectroscopy, 2005, 38: 71 - 78.
- [4] James Turner, Vaithianathan Palaniappan, Avram Gold, et al. Resonance Raman spectroscopy of oxoiron(IV) porphyrin p-cation radical and oxoiron(IV) hemes in peroxidase intermediates[J]. Journal of Inorganic Biochemis-

- try, 2006, 100:480 - 501.
- [5] 闫循领,董端新,王秋国. 人血单个红细胞的共振拉曼光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24:576 - 578.
- [6] Shigenori Nagatomo, Yayoi Jin, Masako Nagai, et al. Changes in the abnormal α -subunit upon CO-binding to the normal β -subunit of Hb M Boston: resonance Raman, EPR and CD study[J]. Biophysical Chemistry, 2002, 98: 217 - 232.
- [7] Jotaro Igarashi, Akira Sato, Teizo Kitagawa, et al. Biochimica et CO binding study of mouse heme-regulated eIF-2a kinase: kinetics and resonance Raman spectra[J]. Biophysica Acta, 2003, 1650:99 - 104.
- [8] Ken-Ichi Oinuma, Takehiro Ohta, Kazunobu Konishi, et al. Heme environment in aldoxime dehydratase involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis[J]. FEBS Letters, 2004, 568:44 - 48.
- [9] Jioi Hudecek, Vladimir Baumruk, Pavel Anzenbacher, et al. Catalytically self-sufficient P450 CYP102 (Cytochrome P450 BM-3): resonance Raman spectral characterization of the heme domain and of the holoenzyme[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 243:811 - 815.
- [10] Jiri Hudecek, Eva Anzenbacherova, Pavel Anzenbacher, et al. Structural similarities and differences of the heme pockets of various P450 isoforms as revealed by resonance Raman spectroscopy[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, 383:70 - 78.
- [11] 苏玉玲, 张晓冬, 张录. 恶性骨肿瘤血清的吸收光谱研究[J]. 激光与红外, 2006, 36(9):880.
- [12] Edward DeMoll, David J Cox, Ezra Daniel, et al. Apparent specific volume of human hemoglobin: Effect of ligand state and contribution of heme[J]. Analytical Biochemistry, 2007, 363:196 - 203.
- [13] Yasuhiro Mie, Midori Kishita, Saburo Neya, et al. Electrochemical analysis of heme functions of myoglobin using semi-artificial myoglobins[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2006, 588:226 - 234.
- [14] 严拯宇, 邵秀芬, 姜新民, 等. 巴洛沙星与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26: 1494 - 1498.

(上接第 114 页)

参考文献:

- [1] P Polynkin, A Peleg, L Klein, et al. Optimized multiemitter beams for free-space optical communications through turbulent atmosphere[J]. Opt. Lett., 2007, 32(8):885 - 887.
- [2] P Polynkin, J Moloney. Scintillation index for two Gaussian laser beams with different wavelengths in weak atmospheric turbulence[J]. J. Opt. Soc. Am. A, 2006, 23(12): 3114 - 3122.
- [3] K Kiasaleh. On the scintillation index of a multiwavelength Gaussian laser beam in a turbulent free-space optical communications channel[J]. J. Opt. Soc. Am. A, 2006, 23(12):557 - 566.
- [4] J Durnin. Exact solutions for nondiffracting beams. I. The scalar theory[J]. J. Opt. Soc. Am. A, 1987, 4(4):651 - 654.
- [5] J Durnin, J J Micely Jr, J H Eberly. Diffraction free beams[J]. Phys. Rev. Lett., 1987, 58(15):1499 - 1501.
- [6] J C Gutie' rrez-Vega, M D Iturbe-Castillo, S Cha' vezCerde. Alternative formulation for invariant optical fields: Mathieu beams[J]. Opt. Lett., 2000, 25(20), 1493 - 1495.
- [7] M A Bandres, J C Gutie' rrez-Vega, S Ch'avez-Cerde. Parabolic nondiffracting optical wave fields[J]. Opt. Lett., 2004, 29(1):44 - 46.
- [8] J C Gutie' rrez-Vega, M A Bandres. Helmholtz-Gauss waves[J]. J. Opt. Soc. Am. A, 2005, 22(2):289 - 298.
- [9] H T Eyyuboglu. Propagation of higher order Bessel-Gaussian beams in turbulence[J]. Appl. Phys. B, 2007, 88(1): 259 - 265.
- [10] H T Eyyuboglu, F Hardalac. Propagation of modified Bessel-Gaussian beams in turbulence[J]. Optics & Laser Technology, 2007(待发表).
- [11] A E Siegman. Lasers[M]. Calif.: University Science, Mill Valley, 1986.
- [12] J C Gutie' rrez-Vega, R M Rodriguez-Dagnino, Mathieu functiona. A visual approach[J]. Am. J. Phys., 2003, 71(3):233 - 242.
- [13] H T Yura, S G Hanson. Second-order statistics for wave propagation through complex optical systems[J]. J. Opt. Soc. Am., 1989, A6(4):564 - 575.
- [14] Y Baykal, H T Eyyuboglu. Off-axis-Gaussian beam intensity in random medium[J]. Opt. Commun., 2007, 269(1):30 - 38.