

胃和结直肠癌的傅里叶变换红外光谱研究

凌晓锋¹, 徐怡庄², 王立新¹, 李维红², 张元福², 杨展澜²,
侯纯升¹, 周孝思¹, 吴瑾光², 徐智¹

(1. 北京大学第三医院普通外科, 北京 100083;
2. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要 利用傅里叶变换红外光谱仪及带 ATR 探头的中红外光纤系统测定了手术切除的胃癌、结直肠癌及相应的正常组织共 31 对标本粘膜面的反射红外光谱. 结果表明, 与正常组织相比, 癌组织的红外光谱发生明显变化: (1) 与脂类相关的谱带 2955, 2920, 2870, 2850 和 1740 cm^{-1} 出现几率明显低于正常组织 ($P < 0.001$), I_{1460}/I_{1400} (I 为峰强度) 明显降低 ($P < 0.001$), 表明癌组织的脂类相对含量降低; (2) 与蛋白质相关谱带 N—H 和 O—H 明显红移 ($P = 0.025$), 表明 N—H 和 O—H 的氢键化程度增加, 癌组织的 I_{3375}/I_{1460} , I_{1640}/I_{1460} 和 I_{1550}/I_{1460} 明显升高 ($P < 0.01$), 表明癌组织的蛋白质相对于脂类的含量增加, 癌组织的 $\text{HW}_{1550}/I_{1550}$ (HW 为半高宽) 明显升高 ($P = 0.036$), HW_{1550} 则明显降低 ($P = 0.05$), 表明癌组织中蛋白质的二级结构发生显著变化; (3) 与醌类相关谱带中癌组织的 I_{1160}/I_{1460} 降低 ($P = 0.002$), 结合组织化学染色, 推测可能是癌组织表面的糖蛋白明显减少造成的, 而 I_{1120}/I_{1460} 升高 ($P = 0.019$) 则可能是癌组织表面的糖原颗粒增加所致. (4) 与核酸相关谱带中癌组织的 P=O 的反对称伸缩振动蓝移 ($P = 0.033$), 表明癌组织中磷酸基团的氢键化程度降低. 研究表明, 红外光谱有望成为诊断恶性肿瘤的有力工具.

关键词 胃癌; 结直肠癌; 红外光谱

中图分类号 O657; R730.43

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)03-0445-05

恶性肿瘤一直是危害人类健康的顽疾, 提高其早期诊断水平是临床医学的重要任务之一. 临床上, 影像学检查能发现无自觉症状的恶性肿瘤, 提高了恶性肿瘤的诊断水平, 但是恶性肿瘤发展到 B 超、CT 和 MRI 等能探测到的肿块往往已非早期. 人们可以通过对病变部位进行组织活检, 对脱落细胞进行细胞学检查, 从而把恶性肿瘤的诊断提高到组织学和细胞学水平. 不仅如此, 人们还发现了恶性肿瘤组织产生的可以反映恶性肿瘤组织自身存在的肿瘤标记物, 这些物质多为大分子蛋白质, 如甲胎蛋白和癌胚抗原等. 近年来, 对恶性肿瘤的分子生物学研究备受关注, 研究者试图发现先于组织学和细胞学变化的恶性病变, 从而把恶性肿瘤的诊断提高到分子水平, 但这些成果尚难以应用于临床实践. 目前认为癌细胞的发生始动因子是细胞内的 DNA 分子结构发生异常, 继而基因的产物蛋白质的结构发生异常以及脂类和糖类也发生结构异常, 最终分化成为癌细胞.

傅里叶变换红外光谱是研究分子结构的有力工具, 已被应用于农业、化工和医药等领域, 从而获得许多物质的分子结构及分子内部的基团和构象等丰富的亚分子结构信息. 基于此, 本文采用傅里叶变换红外光谱技术来研究恶性肿瘤, 探讨了将反射红外光谱用于临床诊断胃肠道恶性肿瘤的可能性.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Nicolet 公司的 Magna 750 傅里叶变换红外光谱仪和 MCT 检测器, SpectroTech 公司的中红外光纤纤维和 ATR (Attenuated Total Reflection) 探头.

收稿日期: 2006-03-30.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 50203001, 30371604) 和国家“九七三”计划前期专项基金 (批准号: 2002CCA01900) 资助.

联系人简介: 徐智 (1959 年出生), 男, 教授, 主任医师, 主要从事外科疾病的临床和分子光谱研究.

E-mail: xuzhi123456@sohu.com

1.2 实验过程

1.2.1 标本 胃癌、结直肠癌及正常组织均来自北京大学第三医院病人的手术标本. 手术切除的癌组织和距离癌组织 10 cm 以上的正常组织作为一对, 取得胃癌根治手术的标本 14 对, 结直肠癌根治手术的标本 17 对, 共计 31 对.

1.2.2 红外光谱测定 手术标本离体后, 去除污渍, 迅速切取胃癌、结直肠癌及正常组织标本, 并将标本保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内. 用时取出标本, 在室温下解冻. 用液氮冷却 MCT 检测器. 将带 ATR 探头的中红外光导纤维连接在 Magna 750 型傅里叶变换红外光谱仪上. 用经硅胶分子筛干燥脱水的压缩空气吹扫光学台, 以避免水汽对光谱的干扰. 清洁 ATR 探头, 扫描得到背景. 切取 $1\text{ cm} \times 0.6\text{ cm}$ 的组织块, 使 ATR 探头与组织块的粘膜面密切接触, 分辨率定为 4 cm^{-1} , 扫描 64 次, 获得标本的红外光谱, 每个标本至少测定 2 次以保证光谱的重现性.

将得到的红外光谱用 Nicolet 公司的 Omnic 专用软件处理, 逐一测量红外光谱各谱带的峰位、峰高和半高宽; 计算谱带间的相对强度, 共计 22 个变量.

1.2.3 标本的病理和组织化学检查 (1) HE 染色: 以证实正常或癌组织是否符合扫描前的判断. (2) PAS 染色: 以观察癌组织表面糖蛋白含量的变化. (3) Best 糖原染色: 以观察癌组织表面糖原含量的变化.

1.2.4 标准统计学处理 采用 SPSS(11.0) 软件对计量资料进行正态性检验, 对不符合正态分布的进行配对秩检验, 对符合正态分布的计量资料进行配对 t 检验; 对计数资料进行卡方检验.

2 结果与讨论

2.1 病理学和组织化学研究

(1) 31 对标本都经过常规 HE 染色. 检查结果与扫描前的判断完全一致. 胃和结直肠癌组织结构紊乱, 癌细胞有明显的异型性, 细胞核增大, 染色深浅不一, 核浆比例增大. (2) PAS 染色: 正常胃和结直肠粘膜表面有一层红染的厚厚的糖蛋白, 而胃癌和结直肠癌组织的生长破坏了正常粘膜表面而形成溃疡, 癌表面的糖蛋白明显减少. (3) Best 糖原染色表明正常胃和结直肠粘膜表面不存在糖原颗粒, 而在胃和结直肠癌表面和癌细胞的胞浆内或细胞间质存在大量细小而鲜红的糖原颗粒.

2.2 红外光谱分析

(1) 各标本的红外光谱循序出现 15 个谱带(图 1), 它们的指认结果见表 1. (2) 正常组织和癌组织的 FTIR 谱带比较: 对计量资料中不服从正态分布的变量进行秩检验结果见表 2; 对服从正态分布的变量进行配对 t 检验结果见表 3. 计数资料的卡方检验结果见表 4. 由于 2955, 2920, 2870 与 2850 cm^{-1} 谱带的出现几率完全相同, 故以 2920 cm^{-1} 谱带为代表进行分析.

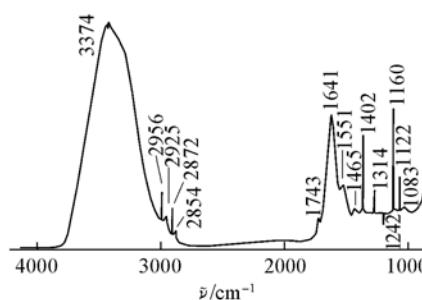


Fig. 1 FTIR spectrum of normal sigmoid colon

Table 1 Preliminary assignments of FTIR bands of normal samples

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Preliminary assignment	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Preliminary assignment
3375	$\nu_{\text{O-H}}, \nu_{\text{N-H}}$ (water, protein)	1460	$\delta_{\text{C-H}}$
2955	$\nu_{\text{as}}, \text{CH}_3$	1400	$\delta_{\text{C-H}}, \delta_{\text{C-O-H}}$
2920	$\nu_{\text{as}}, \text{CH}_2$	1313	$\delta_{\text{C-H}}, \delta_{\text{C-O-H}}$, amide III band, etc.
2870	$\nu_{\text{s}}, \text{CH}_2$	1241	$\delta_{\text{as}}, \text{PO}_2^-$ (nucleic acid), etc.
2850	$\nu_{\text{s}}, \text{CH}_2$	1160	$\nu_{\text{C-O}}, \delta_{\text{C-O-H}}, \delta_{\text{C-O-C}}$ (carbohydrate or glycoprotein), etc.
1740	$\nu_{\text{C=O}}$ (lipid)	1120	$\nu_{\text{C-O}}, \delta_{\text{C-O-H}}, \delta_{\text{C-O-C}}$ (carbohydrate or glycoprotein), etc.
1640	Amide I band (protein), $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$	1080	$\nu_{\text{s}}, \text{PO}_2^-$ (nucleic acid), etc.
1550	Amide II band (protein)		

Table 2 FTIR spectrum variables comparisons between normal and cancer tissues^a

Variable	Normal sample median, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Cancer-normal			T +	T -	P
		0 (Pairs)	Negative (Pairs)	Positive (Pairs)			
P_{3375}	3374	18	10	3	13.50	77.50	0.025 ^b
P_{1640}	1641	13	7	11	112.00	59.00	0.227
P_{1460}	1458	9	12	10	75.00	178.00	0.093
P_{1400}	1401	10	8	13	127.50	103.50	0.669
P_{1160}	1160	9	7	14	159.50	71.50	0.125
P_{1080}	1082	10	14	7	98.50	132.50	0.547
I_{1313}/I_{1241}	0.41	0	6	25	402.00	94.00	0.003 ^c
I_{1460}/I_{1400}	0.63	2	25	4	27.00	408.00	0.000 ^c
HW ₁₅₅₀	40.24	0	20	11	148.00	348.00	0.050 ^b
HW ₁₅₅₀ /I ₁₅₅₀	1173.12	0	7	24	355.00	141.00	0.036 ^b

a. P Stands for the peak position of band, I stands for the band intensity, HW stands for the half high wide, T + stands for the positive rank sum, T - stands for the negative rank sum; b. $P < 0.05$; c. $P < 0.01$.

Table 3 FTIR spectrum variables comparisons between normal and cancer tissues

Variable ^a	Pair	Normal sample mean \pm SD	Cancer-normal mean \pm SD	t	P
P_{1550}	31	1549.77 \pm 1.75	0.48 \pm 1.73	1.558	0.130
P_{1313}	31	1313.39 \pm 1.76	-0.48 \pm 2.19	-1.231	0.228
P_{1241}	31	1241.61 \pm 6.15	2.84 \pm 7.06	2.238	0.033 ^b
P_{1120}	31	1120.74 \pm 2.65	1.03 \pm 3.07	1.871	0.071
I_{3375}/I_{1460}	31	67.60 \pm 43.11	31.94 \pm 41.17	4.319	0.000 ^c
I_{1640}/I_{1460}	31	29.06 \pm 15.23	11.95 \pm 13.93	4.776	0.000 ^c
I_{1550}/I_{1460}	31	5.36 \pm 1.51	1.06 \pm 1.96	3.013	0.005 ^c
I_{1160}/I_{1460}	31	0.29 \pm 0.20	-0.13 \pm 0.21	-3.381	0.002 ^c
I_{1120}/I_{1460}	31	0.27 \pm 0.17	1.00 \pm 0.22	2.473	0.019 ^b
I_{1080}/I_{1460}	31	1.86 \pm 0.60	0.30 \pm 0.98	1.701	0.099

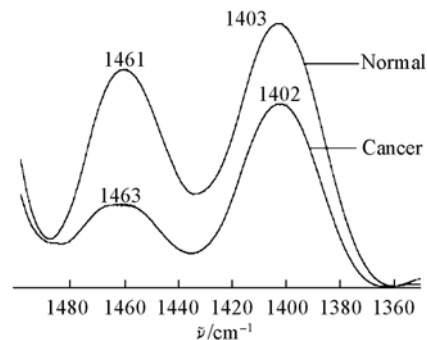
a. P Stands for peak position of band, I stands for band intensity; b. $P < 0.05$; c. $P < 0.01$.

Table 4 Presence rates of 2920 cm^{-1} and 1740 cm^{-1} comparisons between normal and cancer tissues

Tissue	2920 cm^{-1} Presence			χ^2	P	1740 cm^{-1} Presence			χ^2	P
	Yes	No	Total			Yes	No	Total		
Normal	24	7	31	14.57	0.000	13	18	31	16.45	0.000
Cancer	9	22	31			0	31	31		

2.3 脂类相关的谱带变化

2955, 2920, 2870, 2850 和 1740 cm^{-1} 谱带均与脂类相关. 与正常组织比较, 癌组织中前 4 个谱带出现的几率为 29.03% (9/31), 而正常组织出现的几率为 77.42% (24/31) ($P < 0.001$, 表 4); 癌组织的 1740 cm^{-1} 谱带出现几率也明显减少, 为 0 (0/31), 而正常组织则为 41.94% (13/31) ($P < 0.001$, 表 4). 这些结果与细胞悬液法^[1]的结果十分相似. 其原因可能是脂类中含有甲基、羰基和大量亚甲基, 所以这些谱带可以反映出脂类的含量, 表明癌组织的脂类相对含量减少. 孙传文等^[2]比较了正常腮腺和腮腺恶性肿瘤的红外光谱, 认为恶性肿瘤生长迅速, 耗能快, 脂类物质难以在组织和细胞内堆积, 造成了恶性肿瘤的脂类成分含量明显减少, 其红外光谱则表现为代表脂类谱带的强度明显降低. 文献[3]也有与此相似的结果. 1460 cm^{-1} 处的谱带为 $(-\text{CH}_2)_n$ 的变角振动, 与脂类相关; 本研究中 1400 cm^{-1} 谱带的具体指认比较困难, 因其基质复杂. 研究结果表明, 癌组织脂类分解代谢加强, 癌细胞的外表面糖脂趋于减少, 这些因素可能使 1460 cm^{-1} 谱带的相对强度降低 (图 2), 故 I_{1460}/I_{1400} 明显降低 (表 2).

**Fig. 2 FTIR spectra of normal and cancer tissues**

2.4 与蛋白质相关的谱带变化

3375 cm^{-1} 处的峰为 N—H 和 O—H 的伸缩振动, 1640 cm^{-1} 处的峰为蛋白质酰胺 I 带 C=O 基团或 H₂O; 1550 cm^{-1} 处的峰为蛋白质酰胺 II 带. 与正常组织相比, 癌组织的 3375 cm^{-1} 谱带明显红移(表 2). 该谱带发生红移表明, N—H 和 O—H 的氢键化程度增加; 癌组织的 I_{3375}/I_{1460} , I_{1640}/I_{1460} 和 I_{1550}/I_{1460} 明显升高(表 3), 表明癌组织蛋白质的 3 条谱带同与脂类相关的 1460 cm^{-1} 谱带强度之比升高, 故推测蛋白质相对于脂类的含量明显升高. 癌细胞代谢旺盛, 蛋白质的合成增加. 研究表明, 结肠癌的微绒毛酶类发生了变化, 刷状缘水解酶类如蔗糖酶-异麦芽糖酶、氨基肽酶二肽酰胺酶 IV、乳糖酶等在胚胎结肠和小肠刷状缘含量丰富, 但在正常结肠组织含量较少, 而在结肠癌组织则呈阳性表达^[4], 这些都是造成癌组织内蛋白质相对含量升高的因素. 虽然癌组织的 1550 cm^{-1} 谱带较 1460 cm^{-1} 谱带相对升高, 但其绝对强度可能下降, 所以该谱带在形态上变得比较扁(图 3). 本实验结果还表明, 癌组织的 HW_{1550} 明显降低, $\text{HW}_{1550}/I_{1550}$ 明显升高(表 2), 说明 I_{1550} 有更明显的下降, 这些变化表明癌组织蛋白质的二级结构发生了明显的变化.

2.5 与碳水化合物相关的谱带变化

Wong 等^[5]认为 1160 cm^{-1} 谱带是蛋白质中丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸 C—OH 基团和碳水化合物的 C—O 基团形成的. 在正常情况下, 胃和结直肠的粘膜层表面有一层起保护作用的粘液, 是由粘膜表层上皮细胞和腺体的颈粘液细胞所分泌, 其成分以糖蛋白为主, 故 PAS 染色时在粘膜表面可见厚厚而红染的糖蛋白. 而癌组织的生长破坏了正常组织的粘膜结构, 形成了溃疡, 所以癌组织表面的糖蛋白明显减少; 当组织发生恶变时, 上皮细胞和颈粘液细胞失去原有的生物学性质和功能, 自身所产生的粘液层显著减少, 这两方面的原因使得在 PAS 染色时癌组织表面几乎看不到红染的糖蛋白, 导致 1160 cm^{-1} 谱带的相对强度降低(图 4). 实验结果表明, 1160 和 1120 cm^{-1} 谱带可能来自于两种不同的醣类或糖蛋白, 因为癌组织的 I_{1160}/I_{1460} 明显降低(表 3), I_{1120}/I_{1460} 却较正常组织明显升高(表 3). Best 糖原染色结果表明, 与正常组织相比, 胃癌和结直肠癌组织表面的糖原颗粒明显增多, 这可能是造成 1120 cm^{-1} 谱带的相对强度增加(图 4)的原因之一.

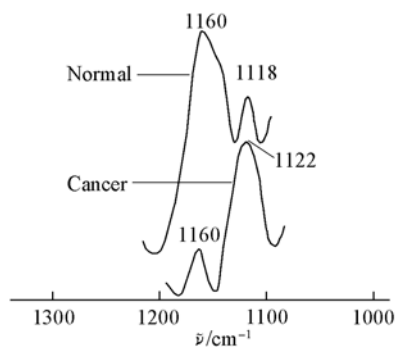


Fig. 4 FTIR spectra of normal tissue and colon cancer

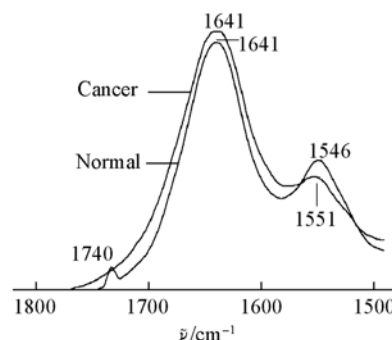


Fig. 3 FTIR spectra of normal gastric tissue and gastric cancer

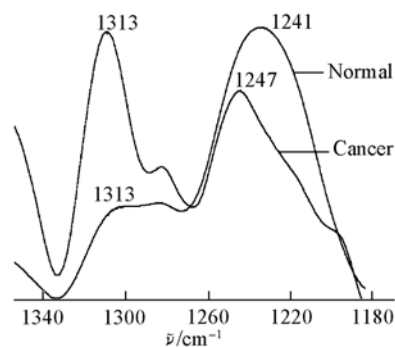


Fig. 5 FTIR spectra of sigmoid colon cancer and normal tissue

2.6 与核酸相关的谱带变化

1080 cm^{-1} 谱带为 P=O 或 P—O—C 的对称伸缩振动, 癌组织的 I_{1080}/I_{1460} 较正常组织有升高的趋势(表 3), 说明癌组织中核酸相对于脂类含量的升高. 从生物学角度来看, 癌细胞核有异型性: 染色体数目增加, 出现二倍体、三倍体; 可见巨核、双核、多核及核分裂相和核浆的比例增加. 所以癌组织的 1080 cm^{-1} 谱带有增强的趋势. 这与文献[6,7]报道的结果相似. 癌组织的 1241 cm^{-1} 谱带较正常组织明显蓝移(表 3), 表明癌组织核酸中磷酸基团氢键遭到了破坏, 使其氢键化程度降低.

2.7 其它谱带的变化

通常 1313 cm^{-1} 谱带为 CH 面内变角振动、环状 CH 振动或蛋白酰胺 III 带, 其指认比较复杂困难. 癌组织的 I_{1313}/I_{1241} 较正常组织明显升高(表 2), 因此该谱带相对强度的增加(图 5)有待于进一步研究.

参 考 文 献

- [1] Zhao D. W. , Zhou X. S. , Soloway R. D. , *et al.* . Gastroenterology[J], 1996, **110**: A620
- [2] SUN Chuan-Wen(孙传文), XU Yi-Zhuang(徐怡庄), SUN Kai-Hua(孙开华), *et al.* . Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)[J], 1996, **16**(5): 22—25
- [3] LI Wei-Hong(李维红), XU Yi-Zhuang(徐怡庄), WENG Shi-Fu(翁诗甫), *et al.* . Chinese Journal of Light Scattering(光散射学报)[J], 1998, **10**:114—119
- [4] GUO Wen(郭文), SHEN Jian(沈健), ZHANG Ya-Li(张亚力). Colon Cancer Basis and Clinics(大肠癌的基础与临床)[M], Shanghai: Shanghai Press of Science and Technology, 1999: 72—75
- [5] Wong P. T. T. , Wong R. K. , Caputo T. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 1991, **88**: 10988—10992
- [6] PENG Qing(彭卿), XU Yi-Zhuang(徐怡庄), LI Wei-Hong(李维红), *et al.* . Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)[J], 1998, **18**(5): 528—531
- [7] Benedetti E. , Palatresi M. P. , Vergamini P. , *et al.* . Appl. Spectrosc. [J], 1986, **40**(1): 39—43

Investigations on Gastric and Colorectum Cancer by FTIR Spectroscopy

LING Xiao-Feng¹, XU Yi-Zhuang², WANG Li-Xin¹, LI Wei-Hong², ZHANG Yuan-Fu²,
YANG Zhan-Lan², HOU Chun-Sheng¹, ZHOU Xiao-Si¹, WU Jin-Guang², XU Zhi^{1*}

(1. Department of General Surgery, Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China;

2. College of Chemistry Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Thirty-one pairs of FTIR spectra of samples, including gastric and colorectal cancer and the corresponding normal tissues, were collected after surgery. FTIR spectra of cancerous tissue were significantly different from those of normal tissues. (1) Alterations of bands related to lipid: 2955, 2920, 2870, 2850 and 1740 cm^{-1} appeared less frequently in malignant tissue ($P < 0.001$). The ratio of I_{1460}/I_{1400} in malignant tissue decreased significantly ($P < 0.001$), indicating that the relative quantity of lipid in malignant tissue decreased significantly. (2) Alterations of bands related to protein: in malignant tissue, the band of N—H and O—H shifted to a lower wave number ($P = 0.025$), suggesting that the degree of hydrogen-bonding of N—H and O—H increased. In malignant tissue, the ratios of I_{3375}/I_{1460} , I_{1640}/I_{1460} , I_{1550}/I_{1460} raised ($P < 0.01$), respectively. These changes illustrate that the relative quantity of protein to lipid in malignant tissue increased significantly. The ratio of $\text{HW}_{1550}/I_{1550}$ increased obviously ($P = 0.036$), while HW_{1550} decreased significantly ($P = 0.05$), compared with those of normal tissue. We can conclude that the secondary structure of protein in malignant tissue changed. (3) Alterations of bands related to carbohydrate: in malignant tissue, the ratio of I_{1160}/I_{1460} reduced ($P = 0.002$). It might be due to the lessen of glycoprotein on the surface of malignant tissue, reversely, the ratio of I_{1120}/I_{1460} raised ($P = 0.019$). The possible reason was that the glucogen grains on the surface of the malignant tissue increased. (4) Alterations of band related to nucleic acid: in normal tissue, the peak of $\text{P}=\text{O}$ antisymmetric vibration was at $(1241.61 \pm 6.15)\text{ cm}^{-1}$. In malignant tissue, the band shifted toward a higher wave number ($P = 0.033$) due to the decreased hydrogen-bonding of $\text{P}=\text{O}$. FTIR spectroscopy could be a powerful tool for cancer diagnosis.

Keywords Gastric cancer; Colorectal cancer; FTIR

(Ed. : K, G)