

恶性肿瘤早期诊断的傅立叶变换红外光谱研究

凌晓锋 徐怡庄^① 综述 徐智 吴瑾光^① 周孝思 徐端夫^② 校审

北京大学第三医院普外科(北京,100083)

中图分类号 R730.43

文献标识 :A

文章编号 :1009-6604(2003)03-0271-03

为寻找恶性肿瘤的早期诊断方法,人们一直进行着不懈的努力。组织和细胞的恶变总是从构成它们的分子开始的。在组织和细胞恶变的过程中,蛋白质、脂类、碳水化合物和核酸等构成组织和细胞的主要物质在结构、构象和数量上都发生了明显的变化,这些变化并不出现临床症状和医学影像学改变。所以研究这些变化是更早期诊断的研究方向。红外光谱主要是研究分子中以化学键联结的原子之间的振动光谱和分子的转动光谱^[1]。早在五十年前,Sutherland 和 Thompson 就认为各种化合物的红外光谱是该化合物最具特色的性质,它能够反映物质的结构,因此红外光谱有可能成为恶性肿瘤早期诊断的重要手段。20 世纪 80 年代以来,傅立叶变换技术引入红外光谱。傅立叶变换红外光谱仪不仅具有高光通量、低噪声和测量速度快等优点^[2],而且红外波长长,能量小,不破坏样品的结构,具有无损伤的优点,而被广泛应用于蛋白质、脂类、碳水化合物和核酸等生物分子的结构、构象的研究。在此基础上,人们比较各种类型的恶性肿瘤及其相应正常组织或细胞的红外光谱特点,为恶性肿瘤的早期诊断及其发生发展机理的研究开辟了一条新的途径。本文就消化系统、生殖系统、呼吸系统和血液造血系统等恶性肿瘤的红外光谱研究予以文献综述。

消化系统恶性肿瘤的红外光谱研究

在国内,北京大学吴瑾光教授和周孝思教授领导的课题小组率先测定了消化道恶性肿瘤(包括胰腺、食管、胃、小肠和结肠等)的红外光谱,总结了消化道恶性肿瘤红外光谱的特点,而且正从基础研究向临床应用过渡。孙传文^[3]将中红外光纤技术用于胰腺肿瘤的诊断,结果表明正常胰腺组织和舍格伦综合征的胰腺组织红外光谱反射很相似,而与胰腺肿瘤组织的光谱存在着明显差别。同时也观察到良性与恶性肿瘤的光谱在若干波段处有所不同。赵代伟^[4]和彭卿等^[5,6]首次使用细胞悬液法,利用红外显微镜和中红外光导纤维测定了食管癌、胃癌和结肠癌组织和及其相应的正常细胞组织的红外光谱。结果表明:三种癌细胞的红外光谱在 2800cm⁻¹~3000cm⁻¹区域内的 C-H 峰明显降低,而位于

1740cm⁻¹附近的 C=O 峰则完全消失。随后又采用冰冻切片法研究了上述三类癌组织与相应正常组织的红外光谱。结果显示这三种癌组织的红外光谱基本一致,其主要峰有位于 2800cm⁻¹~3000cm⁻¹区域的内的 ν_{as} CH₃、 ν_{as} CH₂、 ν_s CH₃ 和 ν_s CH₂ 振动峰,位于 1655cm⁻¹与 1546cm⁻¹附近的蛋白质酰胺 I 带和 II 带,位于 1241cm⁻¹与 1085cm⁻¹附近的核酸分子中的磷酸二酯基团的反对称伸缩振动(ν_{as} PO₂⁻)与对称伸缩振动(ν_s PO₂⁻)谱带。癌组织与正常组织红外光谱的主要区别在于:在癌组织中最明显的是位于 1085cm⁻¹附近的谱带明显增强,由于该谱带反映了细胞内核酸分子中磷酸二酯基团的对称伸缩振动,所以它的增强恰能反映出癌组织中核酸含量的增加。对光谱中蛋白质酰胺 I 带曲线拟合的结果表明,正常组织和癌组织中蛋白质的二级结构有很大的差别,在癌组织中 α 螺旋的含量大大增加,而 β 折叠的含量大大降低,不规则卷曲和转角结构的含量变化不大。为了使傅立叶变换红外光谱在临床上得到应用,他们将带衰减全反射(Attenuated Total Reflection, ATR)探头的中红外光导纤维连接在傅立叶变换红外光谱仪上,测定了手术切除的消化道恶性肿瘤及相应正常组织粘膜面的红外光谱。研究表明消化道恶性肿瘤与相应正常组织的红外光谱间存在着明显差异^[7],利用这些差异有可能进行临床诊断。李维红^[8]等还收集了恶性肿瘤病人的临床资料和恶性肿瘤及其相应正常组织红外光谱的各项指标,建立了恶性肿瘤的红外光谱数据库,为傅立叶变换红外光谱在临床上应用打下了基础。

在国外,由于取材的限制,人们仅仅研究了恶性肿瘤组织切片和恶性肿瘤细胞的红外光谱。Rigas^[9]采用了组织切片法研究了 11 例结肠癌及其相应正常组织的透射红外光谱。与正常组织比,结肠癌的红外光谱均发生了异常变化,这些变化包括:1. 代表核酸谱带变化,核酸中磷酸基团的对称伸缩振动和反对称伸缩振动谱带分别位于 1082.4cm⁻¹和 1241.0cm⁻¹。结肠癌红外光谱磷酸基团的反对称伸缩振动谱带增强,而对称伸缩振动谱带减弱。反对称伸缩振动谱带由 1241.0cm⁻¹移至 1239.4cm⁻¹,对称伸缩振动谱带由

① 北京大学化学学院
② 中国科学院化学研究所

1082.4 cm^{-1} 移至 1085.1 cm^{-1} 。1241 cm^{-1} 谱带随着压力的升高而蓝移,说明磷酸基团非氢键化的化学键加强。2. 代表蛋白质谱带的变化:蛋白质的 C-O 基团的伸缩振动的谱带位于 1164 cm^{-1} 附近。该谱带在结肠癌移至 1173.1 cm^{-1} 。随着压力的升高,正常组织的该谱带波数降低,结肠癌该谱带波数升高。3. 代表脂类谱带的变化:2852.5 cm^{-1} 谱带是由膜的亚甲基对称伸缩振动产生的,2958.5 cm^{-1} 是由甲基的反对称伸缩振动产生的。结肠癌组织的后者降低,前者升高,它们的相对强度比值 H2958.5/H2852.5 降低。

人的结肠腺癌细胞系的高压透射红外光谱表现出结肠癌组织切片几乎所有的重要特征^[10]:1. 核酸中磷酸二酯基团的氢键化程度增加。2. 碳水化合物和蛋白质的 C-OH 基团的氢键化程度降低。3. 在 972 cm^{-1} 处有明显的谱带。4. 谱带 1082 cm^{-1} 移至 1086 cm^{-1} 。而与结肠癌组织不同的特点是:在 991 cm^{-1} 谱带较强而结肠癌组织的 991 cm^{-1} 谱带较弱。

生殖系统及乳腺癌的红外光谱研究

Wong^[11]等对宫颈的正常细胞、分化异常的细胞和癌细胞进行了透射红外光谱测定,发现分化异常细胞的红外光谱与癌细胞的红外光谱基本相同但又不完全相同,这表明红外光谱确能反映出恶性肿瘤的发生发展。正常宫颈细胞的红外光谱主要谱带如下:1. 1025 cm^{-1} 和 1047 cm^{-1} 主要来源于碳水化合物的 -CH₂OH 基团的振动和 C-OH 基团的 C-O 伸缩及其弯曲振动。2. 谱带 1082 cm^{-1} 主要来源于核酸的磷酸基团对称伸缩振动,1244 cm^{-1} 主要为酸基团的反对称伸缩振动。3. 代表脂类 C=O 伸缩振动的 1740 cm^{-1} 谱带与 1244 cm^{-1} 谱带的强度比值为 0.15~0.30。4. 蛋白质酰胺 I 带和酰胺 II 带分别位于 1652 cm^{-1} 和 1545 cm^{-1} 。酰胺 I 带位于 1652 cm^{-1} 意味着正常宫颈细胞的蛋白质主要为 α 螺旋。5. 谱带 1155 cm^{-1} 是细胞蛋白质中丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸 C-OH 基团或碳水化合物的 C-O 基团形成的。

与正常宫颈细胞相比,恶性宫颈细胞的红外光谱有如下特点:

1. 代表核酸中磷酸基团的 1082 cm^{-1} 谱带明显地向高波数方向移动即蓝移。1244 cm^{-1} 谱带是由两个重叠的谱带构成的,它的低波数谱带强度显著增加,说明癌组织中磷酸基团的氢键化程度增加。2. 谱带 1025 cm^{-1} 与谱带 1082 cm^{-1} 强度比显著下降。3. 1155 cm^{-1} 谱带也发生明显蓝移。1155 cm^{-1} 谱带是由三个重叠的谱带构成的,分别是 1153 cm^{-1} ,1161 cm^{-1} 和 1172 cm^{-1} 。宫颈癌细胞的红外光谱中 1153 cm^{-1} 和 1161 cm^{-1} 谱带的强度降低而 1172 cm^{-1} 谱带的强度增高。

分化异常的细胞与癌细胞相似,但变化程度不如癌细胞那么显著,并且 1082 cm^{-1} 谱带不移动。国内刘金绪等人的实验结果与此相似^[12]。

Fung 等^[13]更将研究的结果应用于临床诊断。他们利用红外光谱对正常宫颈、宫颈炎、宫颈癌前病变和宫颈癌组织的脱落细胞进行了透射红外光谱和标准巴氏涂片法的对比

研究,结果表明红外光谱法对宫颈癌前病变和宫颈癌诊断的灵敏度为 98.6%,特异度为 98.8%,假阴性和假阳性率分别为 1.4%和 1.2%,阳性预测值和阴性预测值分别为 99.5%和 96.5%,大大优于巴氏涂片法。

Malins^[14]等分析正常乳腺组织和浸润性导管癌组织中 DNA 的红外光谱,结果表明正常乳腺组织和乳腺癌组织的 DNA 有实质的区别,这可以把癌和非癌区别开来。Dukof^[15]利用红外光谱对乳腺良性病变、不典型增生、及乳腺癌进行了线性判别分析,对良恶性病变的判别正确率为 100%,对良性病变和不典型增生的判别正确率为 100%,对恶性病变和不典型增生的判别正确率为 90%。Malins 的傅立叶变换红外光谱统计模型显示 DNA 结构的无序化参与了人类正常卵巢和乳腺组织的恶变过程,这种无序化发生在恶性肿瘤的远处转移之前^[16]。DNA 从有序到无序的转化可以通过红外光谱的主要成分分析来显示,在这个分析中,每个 DNA 样品与二维坐标的点对应。点阵的大小和定位可以显示从有序到无序化的程度。研究表明卵巢原发恶性肿瘤的 DNA 是高度无序化的,而远处转移肿瘤部位的 DNA 是相对有序的。转移灶的 DNA 红外光谱与正常卵巢的相比变得多样化,提示 DNA 有明显的变化。同样地,乳腺癌原发灶 DNA 无序化明显而转移灶相对有序。因此可以说 DNA 的无序化是癌发生的必经过程,突变 DNA 有序性的恢复与转移癌的发生有关。

呼吸系统恶性肿瘤的红外光谱研究

在进行人类肺癌的红外光谱研究中,Benedetti 采用了组织匀浆后过滤使标本呈单细胞分散状态。单细胞悬浮液经离心后将沉淀物在氟化钡窗片上离心铺制成面积约 1 cm^2 的单细胞层,测定其显微透射红外光谱。以 $A_{1080\text{cm}^{-1}}/A_{1540\text{cm}^{-1}}$ (即 1080 cm^{-1} 谱带与 1540 cm^{-1} 谱带的面积之比,下同。)为指标,发现正常细胞该比值在 0.1~0.25 之间,而肺癌细胞则为 0.3~0.8。孙素琴等^[17]的研究不仅发现肺癌组织与正常组织的显微红外光谱有很大差别,而且肿瘤恶性程度与表征蛋白质二级结构的 α 螺旋和 β 折叠的比值有关。癌组织的 α 螺旋含量比正常组织的多, β 折叠则减少,并且随着肿瘤的恶性程度增加此比值升高。Wang^[18]研究了肺癌和肺结核病人胸水中细胞的红外光谱,结果表明:代表糖原的 1030 cm^{-1} 谱带与代表核酸中磷酸二酯基团的 1080 cm^{-1} 谱带的强度比值显著降低。他们认为红外光谱法鉴别肺癌和肺结核是便宜、速而有价值的方法。

血液和造血系统恶性肿瘤的红光谱研究

Benedetti^[19]分别将正常人的淋巴细胞与慢性淋巴细胞性白血病的淋巴细胞中分离出细胞核,去除胞质残余物,并用生理盐水清洗,然后将所提取的细胞核真空干燥,用溴化钾压片法测定其透射红外光谱。结果表明正常细胞与恶性肿瘤细胞的细胞核在 900 cm^{-1} ~1300 cm^{-1} 段存在显著差异。该区段的吸收主要来源于核酸中 O-P-O 振动的贡献。1080 cm^{-1} 和 1225 cm^{-1} 分别对应于磷酸基团对称伸缩振动与

反对称伸缩振动,恶性肿瘤细胞的上述二谱带增强。Benedetti 还认为与核酸相关的峰面积的变化对应于 DNA 含量的变化,提出可将 A_{1080}/A_{1540} 作为诊断早期慢性淋巴瘤的辅助指标。当比值大于 1.5 时,细胞就有恶变的倾向。Andrus^[20]分析了 39 例淋巴瘤标本(其中 9 例为非何杰金氏淋巴瘤)的透射红外光谱,分析表明恶性淋巴瘤在 1121cm^{-1} 出现吸收峰,随着淋巴瘤恶性程度的增加, A_{1121}/A_{1020} 的比值增加,这个比值可以作为一般恶性肿瘤分化程度的指标。

傅立叶变换红外光谱技术在恶性肿瘤的研究中已日益显示出它的优势,它不仅有快速、无创和廉价的特点,更重要的是它可以提高恶性肿瘤的诊断水平,检测出组织学未能发现的更早期的恶性肿瘤。目前对恶性肿瘤的研究大多停留在细胞水平上,一些学者虽然研究了肿瘤组织,但是由于仪器的限制,他们的实验均为离体实验,这样就限制了在临床的应用。目前,光导纤维作为光的传输介质已在通讯领域得到了广泛应用。随着光纤材料的制造工艺不断改进,中红外和近红外光纤相继问世。Spectra-Tech 公司率先推出了可与目前商用傅立叶变换红外光谱仪匹配的中红外光纤系统。它包括专利光纤接口、中红外光纤以及专利 ATR 探头等附件。其中 ATR 探头采用衰减全反射原理制成,可以采集物体表面的反射红外光谱,从而使红外光谱真正走向临床应用成为可能。采用该探头直接接触皮肤,或通过各种内窥镜接触消化道和泌尿生殖系统粘膜表面的病变组织,或通过穿刺乳腺组织接触乳腺肿物,导出病变组织的红外光谱,进行快速诊断,甚至可以在手术台上进行病变组织的快速定性,在恶性肿瘤的根治手术中快速确定手术切除的范围,免去了外科医生对冰冻报告的苦苦等待。所以,摆在我们面前的主要任务就是利用中红外光纤系统进一步研究各种正常组织和恶性肿瘤的反射红外光谱的特点,总结利用光纤系统的经验,为傅立叶变换反射红外光谱技术真正走向临床应用打好基础。

参 考 文 献

1 翁诗甫.傅立叶变换红外光谱技术及应用.见:吴瑾光,主编.近代傅立叶变换红外光谱技术及应用.上卷.第 1 版.北京:科学技术文献出版社,1994.159-186.

2 沈学础.傅立叶变换光谱学的基本原理.见:吴瑾光,主编.近代傅立叶变换红外光谱技术及应用.上卷.第 1 版.北京:科学技术文献出版社,1994.1-2.

3 孙传文,徐怡庄,孙开华,等.中红外光纤技术用于腮腺肿瘤诊断的研究.光谱学与光谱分析,1996,16:22-25.

4 Daivei Zhao,Xiaosi Zhou,Soloway RD,et al.Infrared spectroscopic features of colon cancer cells differ from those of normal colonic cells from the same patient.Gastroenterology,1996,110:A620.

5 Qing Peng,Soloway RD,Jinguan Wu,et al.Use of a mid-infrared optical fiber to identify malignant cells.Gastroenterology,1996,110:A576.

6 彭卿,徐怡,李维红,等.胃肠道正常组织与相应肿瘤组织结构的 FTIR 光谱研究.光谱学与光谱分析,1998,18:528-531.

7 Soloway RD,Xiaofeng Ling,Weihong Li,et al.Human Malignant and benign gastric mucosal operative specimens demonstrate differences using fourier transform infrared fiberoptic and fluorescence spectroscopies.Gastroenterology,1999,116:A508.

8 Weihong Li,Xiaofeng Ling,Yizhuang Xu,et al.Infrared spectra of normal and malignant tissues:establishment of a database.Gastroenterology,2000,118:A1397.

9 Rigas B,Morgello S,Goldman IS,et al.Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra.Proc.Natl.Acad.USA,1990,87:8140-8144.

10 Rigas B,Wong PTT.Human colon adenocarcinoma cell lines display infrared spectroscopic features of malignant colon tissues.Cancer Research,1992,52:84-88.

11 Wong PTT,Wong RK,Caputo T,et al.IR spectroscopy exfoliated cervical cells:Evidence of extensive structural changes during carcinogenesis.Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1991,88:10988-10992.

12 刘金绪,韩伟,彭英科,等.关于癌变细胞红外光谱测定方法的研究.分析化学,1998,26:883-885.

13 Fung MFK,Senterman M,Eid P,et al.Comparison of Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Screening of Exfoliated Cervical Cell with Standard Papanicolaou Screening.Gynecologic Oncology,1997,66:10-15.

14 Malins DC,Polissar NL,Nishikida K,et al.The etiology and prediction of breast cancer.Fourier transform-infrared spectroscopy reveals progressive alterations in breast DNA leading to a cancer-like phenotype in a high proportion of normal women.Cancer,1995,75:503-517.

15 Dukor RK,Liebman MN,Johnson BL.A new non-destructive method for analysis of clinical samples with FT-IR microspectroscopy.Breast cancer tissue as an example.Cell Mol Biol(Noisy le grand),1998,44:211-217.

16 Malins DC,Polissar NL,Schaefer S,et al.A unified theory of carcinogenesis based on order-disorder transitions in DNA structure as studied in the human ovary and breast.Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1998,95:7637-7642.

17 孙素琴,胡鑫尧,谢来军,等.肺癌组织病变机理的显微红外光谱法研究.见:王宗明,主编.全国第八届分子光谱学术报告会文集.北京:北京大学出版社,1994.131.

18 Wang HP,Wang HC,Huang YJ.Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in pleural fluid.Sci.Total Environ,1997,204:283-287.

19 Benedetti E,Palatresi MR,Vergamini P,et al.Infrared characterization of nuclei isolated from normal and leukemic lymphocytes:Part III.Appl.Spectrosc,1986,40:39-43.

20 Andrus PG,Strickland RD.Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy.Biospectroscopy,1998,4:37-46.

(收稿日期 2001-07-06)

编者按 本文综述了消化系统、生殖系统、乳腺癌、呼吸系统、血液和造血系统恶性肿瘤的傅立叶变换红外光谱研究进展,其方法不仅无创快速,更提高了恶性肿瘤的诊断水平,从细胞分子结构水平的变化来诊断,检测出组织学未能发现的更早期恶性肿瘤。值得广大同道进一步深入研究。