

血清一阶导数荧光光谱诊断早期恶性肿瘤

张荣斌¹ 周培琛¹ 林国春² 李耀群*¹

¹(厦门大学化学化工学院与现代分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005)

²(厦门大学物理与机电学院, 厦门 361005)

摘要 利用 Wistar 大鼠接种恶性肉瘤模拟人患上癌症。取 Wistar 大鼠眼静脉血制备血清, 并用乙醇简单处理得上层清液, 扫描获得其一阶导数荧光光谱, 确定上层清液原卟啉发射带 (630 nm 附近) 的峰高, 观察到健康 Wistar 大鼠与癌变大鼠的血清样存在明显差异, 10 例癌变样假阳性率为 0 而 20 例正常样中仅有 1 例假阳性达到了恶性肿瘤早期诊断的目的。

关键词 癌症, 原卟啉, 阶导数荧光光谱, 血清

1 引言

荧光分析法相对于其它光谱法有 3 个主要优势: 高灵敏度、快速和破坏性小, 近年来已广泛用于癌症诊治领域。有研究表明, 癌症患者卟啉代谢异常, 其体内具有特征荧光光谱的原卟啉^①可以作为癌症的分子标志物^[1]。Proffo^[2], Alfano^[3], Lohmann^[4]以及 Yang^[5]等开展了在人类体内外和动物肿瘤自体荧光的研究。可是利用这项技术通过血清或血浆来诊断癌症的研究并不多^[6~10]。孟继武等^[11]通过直接扫描血清荧光并采用经验公式开展临床筛查, 但由于内滤效应等因素的影响, 血清直接扫描可能会使光谱失真而导致假阴性的误诊。Masilanania 等^[10]通过丙酮萃取红细胞中的原卟啉及锌原卟啉, 扫描其萃取液的荧光发射光谱, 并用荧光强度比值 ($I_{630\text{ nm}}/I_{590\text{ nm}}$) 作为判别界限, 效果较好。当恶性肿瘤导致临床症状时, 一般来说它就长到常规方法能确定的尺寸。但由于早期癌变并无特别的临床症状, 常规方法不足以诊断早期癌变^[10]。因而有必要建立行之有效的新方法用于诊断早期癌变。

导数技术应用于荧光分析, 在解决荧光测定中的背景干扰和谱带重叠问题上收到了良好效果, 已被证明是一种提高荧光分析选择性的有效手段^[11, 12]。本研究利用血清中能被乙醇萃取的卟啉类荧光团的自身荧光光谱来辨别早期癌变, 并结合导数技术, 提高其确诊率。由于本方法能够在较早阶段对肿瘤无影响的情况下检测到癌变, 且不会使病人感到恐惧和痛楚, 可见本方法颇有前景。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

实验室自制多功能荧光分光光度计^[13, 14], 氙灯功率为 150 W。激发、发射单色器狭缝宽度均为 5 nm, 扫描速度为 240 nm/min, PMT 负高压 = -702 V, 灵敏档 S = 3 导数光谱采用电子微分获得。液池的规格为 1 cm × 1 cm; RJTGL-16C 型高速台式离心机 (无锡市瑞江分析仪器有限公司)。

健康 Wistar 雄性大鼠 30 只, 体重 250~300 g 购自厦门大学抗癌中心动物实验室, 随机分为 6 组, 4 组为正常空白样, 2 组为接种瓦克癌-256 的早期荷瘤大鼠样, 无水乙醇, 分析纯 (国药化学试剂公司)。

2.2 实验方法

于大鼠眼眶处取血 3.0 mL, 装入离心管, 2 h 后, 以 3000 r/min 离心 10 min 制得血清。取 0.5 mL 血清于 2.0 mL 血清瓶, 加入 1.0 mL 无水乙醇, 盖上盖子震摇均匀, 以 3000 r/min 离心 10 min, 取 1.0 mL 上层清液注入石英样品池中。将装有样品的石英液池置于仪器的样品池架中, 测绘其零阶和一阶导数荧光光谱。导数光谱采用峰-峰测量法 (一阶导数荧光光谱图 629.2 nm 处的最低峰与 643.9 nm 处最高

2007-05-14 收稿; 2007-08-06 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20575055)、国家重点基础研究发展计划 (No. 2007CB935601) 及福建省自然科学基金 (No. B0410002)

* E-mail: yqli@xmu.edu.cn

峰的差值)定量原卟啉。

3 结果与讨论

3.1 未经处理的血清及添加乙醇处理后获得的样品的荧光光谱

原卟啉在乙醇中的最大激发波长为 400 nm, 当 $\lambda_{ex} = 400$ nm 时, 在 500~700 nm 的范围内对添加乙醇处理后获得的样品扫描荧光发射光谱, 可得其荧光发射特征峰在 630 nm 附近, 如图 1 中实线所示。

采用 $\lambda_{ex} = 400$ nm 分别扫描未经处理的血清及添加乙醇处理后获得的样品的荧光发射光谱。在多数情况下, 前者与后者的光谱变化趋势保持一致, 这也是孟继武等^[1]直接扫描未经处理的血清进行癌变筛查的可行之处。不过由于内滤效应等的作用, 有些样品直接扫描获得的光谱就会失真(图 1 中破折点线为一份未经处理血清样的失真光谱)。添加乙醇简单处理后, 获得的光谱比较接近事实(如图 1 中实线所示), 由此可降低检测的假阴性率。另外, 血清中原卟啉在乙醇溶剂中的荧光强度比直接测定或者用磷酸缓冲溶液稀释后获得的强度大很多, 有利于辨别。

3.2 添加乙醇处理后获得的样品的零阶及其一阶导数荧光光谱

比较添加乙醇处理后获得的样品的零阶和一阶导数荧光光谱, 如图 2 所示。由图可知, 电子微分后, 通过取峰-峰值可方便地确定血清中的原卟啉值, 而且放大信号后, 有利于辨别正常样与癌变样。

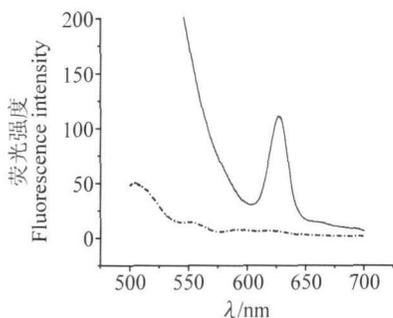


图 1 未经处理的血清(破折点线)及添加乙醇处理后获得的样品(实线)的荧光发射光谱

Fig 1 Fluorescence emission spectra of serum (dash dot) and supernatant extracted with ethanol (solid)

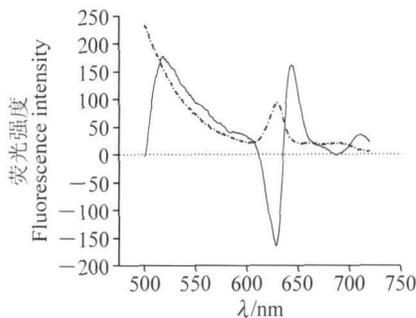


图 2 添加乙醇处理后获得的样品的零阶(虚线)及其一阶导数荧光光谱(实线)

Fig 2 Fluorescence emission spectra (dash dot) and first-derivative fluorescence emission spectra (solid) of supernatant extracted with ethanol

根据 3.1 和 3.2 节的实验结果, 确定采用导数

荧光法快速测定经过乙醇简单处理的血清样, 该法对健康 Wistar 大鼠与癌变大鼠的血清处理样进行辨别, 得到了令人满意的结果。

3.3 数据分析结果

采用 $\lambda_{ex} = 400$ nm 分别测绘 20 个正常样与 10 个早期癌变样的一阶导数荧光光谱(图 3 给出 2 个正常样与 2 个癌变样的一阶导数荧光光谱图实例), 取峰-峰值, 得知正常样的值除了一异常值外, 其余皆在 701 以下; 而癌变样则都在 728 以上, 由数据分类制得表 1。从表 1 可知, 假阴性率为 0%, 而 20 例正常样中仅有一例假阳性。

表 1 研究对象分布

Table 1 Distribution of cases

类型 Type	样品数 Number of cases	测定正确数 Correct diagnose	错误阳性 False positive	错误阴性 False negative
正常样 Normal	20	19	1	0
早期癌变样 Cancer at early stage	10	10	0	0

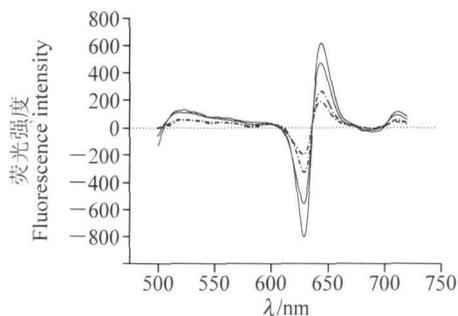


图 3 2 个正常样(破折点线)与 2 个癌变样(实线)的一阶导数荧光光谱

Fig 3 First-derivative fluorescence emission spectra of two normal samples (dash dot) and two cancer samples (solid)

用 t 检验做数据分析, 早期癌变 10 个样品的强度平均值为 2224 相对标准偏差为 80%, $P < 0.001$ 。据此确定了不同样品, 即正常样与癌变样的显著差异。图 4 给出了支持以上结论的图像表现结果。

综上所述, 荧光技术对于早期癌变的诊断相当有用。本方法简便, 可信度高, 可用于筛查早期肿瘤, 利于早发现, 早治疗。

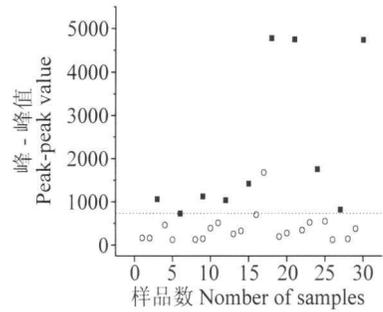


图 4 正常样与早期癌变样荧光强度差异

Fig 4 Variation of fluorescence intensities of normal and cancer at early stage

○: 正常 (normal); ■: 早期癌变 (cancer at early stage)。

References

- Meng Ji-Wu (孟继武), Zheng Rong-Er (郑荣儿), Zhang Yun-Dong (掌蕴东), Xu Xu-Rong (徐叙蓉). *Chinese Journal of Laser Medicine & Surgery* (中国激光医学杂志), **2003** 12 (1): 43~47
- Piofo A. *IEEE J. Quantum Electron*, **1984** 20(12): 1502~1507
- Alfano R, Tata D, Cordero J, Tomashefsky P, Longo F, Alfano A. *IEEE J. Quantum Electron*, **1984** 20: 1507~1511
- Lohmann W, Paul E. *Naturwissenschaften*, **1988** 75: 201
- Yang Y, Ye Y, Li F, Ma P. *Lasers Surg. Med.*, **1987**, 7: 528~532
- Xu X R, Meng J W, Hou S G. *J. Lum. in.*, **1988**, 40/41: 219~220
- Karthikeyan K, Masikmani V, Govindasamy S. *Pathol. Oncol. Res.*, **1999** 5: 46~48
- Masikmani V, Sivakumar N, Vijay K. *Asian J. Phys.* **2003** 12(1): 125~132
- Madhuri S, Vengadesan N, Aruna P, Koteeswaran D, Ganesan S. *Photochem. Photobiol.* **2003** 78(2): 197~204
- Masikmani V, Al-Zhrania K, Al-Salihia M, Al-Diabba A, Al-Ageily M. *J. Lum. in.*, **2004** 109: 143~154
- Schunman S G. *Molecular Luminescence Spectroscopy Methods and Applications* Part I, John Wiley & Sons **1985** 256
- Li Yao-Qun (李耀群), Huang Xian-Zhi (黄贤智), Xu Jin-Gou (许金钩), Chen Guo-Zhen (陈国珍). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **1992** 20(6): 692~694
- Su Wei (眭蔚), Wu Chun (吴春), Li Yao-Qun (李耀群), Wen We-Hua (温卫华). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2001** 29(3): 320~322
- Lin D L, He L F, Li Y Q. *Clin. Chem.*, **2004** 50(10): 1797~1803

Cancer Diagnosis at Early Stage Using Serum Derivative Fluorescence Emission Spectra

Zhang Rong-Bin¹, Zhou Pei-Chen¹, Lin Guo-Chun², Li Yao-Qun^{*1}

¹(Department of Chemistry, the Ministry of Education Key Laboratory of Analytical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

²(School of Physics and Mechanics & Electrical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Wistar big mice were inoculated with sarcoma to simulate cancer in human. After extracting their serum with ethanol, the intensities of fluorescence band (630 nm) of supernatants was measured with first-order derivative fluorescence emission spectra. An obvious contrast between healthy and diseased serum could be observed, and diagnosis of malignant tumors at early stage could be achieved. There are no false negative sample in all the cancer samples, and there is only one sample that is false positive.

Keywords Cancer; protoporphyrin; derivative fluorescence spectroscopy; serum

(Received 14 May 2007; accepted 6 August 2007)