

doi: 10.3969/j.issn.1007-7146.2015.01.017

基于拉曼光谱的鼻咽癌细胞株 总蛋白放射敏感性研究

欧琳¹, 苏颖², 陈阳³, 冯尚源¹, 邹长琰², 雷晋萍¹, 陈荣^{1*}

1. 福建师范大学医学光电科学与技术教育部重点实验室 福建 福州 350007;
2. 福建省肿瘤医院放射生物研究室 福建 福州 350014;
3. 厦门大学福建省等离子体与磁共振研究重点实验室 福建 厦门 361005)

摘要: 本文以鼻咽癌细胞株 CNE2 为放射敏感性的研究对象, 经不同剂量 X 射线照射及不同时间培养后分别提取总蛋白, 用共聚焦显微拉曼光谱仪检测其拉曼光谱。统计分析表明: 被测样品的拉曼光谱中观察到一些可以归属于蛋白质物质的较为明显的基团频率振动峰; 不同剂量的 X 射线照射后, 总蛋白质的平均拉曼光谱与对照组谱形基本一致, 但与对照组间的光谱存在着对应峰信号强度的不同。实验提示: 照射后谱峰强度的增大或减小, 提示着相关物质含量有所改变。分析照射后癌细胞总蛋白拉曼光谱的变化情况, 结合数学统计方法, 以探寻放射敏感性的特征拉曼标志, 可以作为研究肿瘤放射敏感性的手段之一。

关键词: 拉曼光谱; 鼻咽癌细胞株; 蛋白质; 支持向量机

中图分类号: O657.37

文献标识码: A

文章编号: 1007-7146(2015)01-0107-04

Application of Raman Spectroscopy for Analysis in Radiosensitivity of Total Protein of Nasopharyngeal Carcinoma Cells

OU Lin¹, SU Ying², CHEN Yang³, FENG Shangyuan¹, ZOU Changyan², LEI Jinping¹, CHEN Rong^{1*}

1. Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, Fujian, China;
2. Department of Radiobiology, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China;
3. Fujian Provincial Key Laboratory of Plasma and Magnetic Resonance, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: To study the effects of total protein of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2 treated by different doses of X-ray irradiation. The total protein is extracted from the cell line and detected by confocal micro-Raman spectroscopy. Both t test and support vector machine are employed via SPSS and LIBSVM software packages for statistical analysis of Raman spectrum. The results show that several Raman bands assigned to total protein can be detected; and the X-ray irradiation have various effects on different components in total protein, and related to the radiation dose. It was indicated

收稿日期: 2014-06-27; 修回日期: 2014-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(11104030); 福建省自然科学基金项目(2011J01153)

作者简介: 欧琳(1958—)女, 福州人, 福建师范大学教授, 研究方向: 物理电子学。(电话) 0591-22867373; (电子邮箱) oulin@fjnu.edu.cn

* 通讯作者: 陈荣(1950—)男, 福州人, 福建师范大学教授, 博导, 研究方向: 激光生物医学。(电话) 0591-83489919; (电子邮箱) chenr@fjnu.edu.cn

that in spite of no significant diversification on structures of protein, the content may be varied during irradiation.

Key words: Raman spectroscopy; nasopharyngeal carcinoma cells; total protein; support vector machine

0 引言

鼻咽癌以放射治疗为主,治疗效果受到包括肿瘤本身的放射敏感性、宿主状态及正常组织放射损伤程度等因素影响。目前肿瘤放射敏感性的研究重点之一是深入至亚细胞层次,分析细胞内各种生物大分子物质受射线辐照后的影响^[1]。

细胞的形态和生物功能各不相同,但都是由蛋白质、核酸、脂类和碳水化合物等生物分子组成的,每一种物质都有其特征的拉曼光谱。细胞在受到射线照射后氨基酸、脂类、碳水化合物都可能发生变化,可能成为特征拉曼标志光谱。通过照射前后细胞蛋白质的拉曼光谱对比分析可以得出其生物分子结构及其含量的变化,有利于研究细胞在特定条件下的损伤修复机制。本文采用 X 射线辐照人鼻咽癌的细胞株 CNE2,通过分析照射前后其总蛋白质的拉曼光谱,研究细胞内蛋白质结构和化学成分的变化情况。

1 样品准备及测量

人鼻咽癌细胞株 CNE2(福建省肿瘤医院提供)培养后分两组:一组于辐照后立即提取蛋白质,另一组则于辐照后继续培养 72 h 之后再提取,每组 6 瓶。取对数生长期的细胞种植贴壁后用 X 射线室温照

射,其中每组各取一瓶作为对照(无照射处理),其余 5 瓶分别经 2、4、6、8、10 Gy 等不同剂量的 X 射线照射。应用 Qproteome Mammalian Protein Prep Kit 提取各组细胞的总蛋白质溶液。然后制成“细胞裂解混合液”重悬细胞沉淀,静置,在特定条件下离心,收集的上清液即为鼻咽癌细胞相应的蛋白质溶液,保存于 -20 °C 冰箱中。激发光源为 785 nm,在 50 倍物镜下进行蛋白质的拉曼光谱测量,光谱收集范围为 500 ~ 3 200 cm^{-1} 。

2 实验结果

2.1 CNE2 细胞株经照射后的总蛋白质的光谱分析

在上述条件下测得鼻咽癌细胞株 CNE2 经不同剂量辐照后 0 h 和 72 h 培养提取的总蛋白质的拉曼光谱如图 1 和图 2,图中可以看出某些可以归属为蛋白质的较为明显的谱带: 641、715、951、1 419、2 879、2 930 和 3 020 cm^{-1} ; 同时还检测到了提取残留物的谱带,如 679、1 013 cm^{-1} 分别归属为核酸碱基 G 和 DNA 骨架振动。表 1 列出了检测出的拉曼谱带与之相对应的物质归属^[2-40]。图 1(b) 与图 2(b) 为照射组与对照组比较的差异谱。将照射组与对应的未照射组间的谱峰强度,用 SPSS 软件进行 *t* 检验。

表 1 CNE2 细胞株经不同剂量的 X 射线照射后提取的总蛋白质的拉曼谱带及归属

Tab. 1 Band assignments for Raman spectra of total protein extracted from CNE2 cell line after different doses of X-ray

对照	谱带(cm^{-1})					归属
	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy	
641	641	641	642	640	640	C-S 伸缩, C-C 扭曲, 酪氨酸
679	679	679	679	679	679	G
717	717	716	716	716	716	C-S 伸缩
952	952	952	952	951	952	L-苯丙氨酸
1013	1014	1014	1012	1015	1014	DNA 骨架
1419	1420	1419	1419	1419	1419	羧酸: O=C-O-伸缩
2879	2881	2879	2877	2874	2881	CH ₂ 伸缩
2931	2931	2931	2931	2931	2931	CH 伸缩
3020	3018	3021	3021	3021	3018	C-H 伸缩 (CH, CH ₂ , CH ₃)

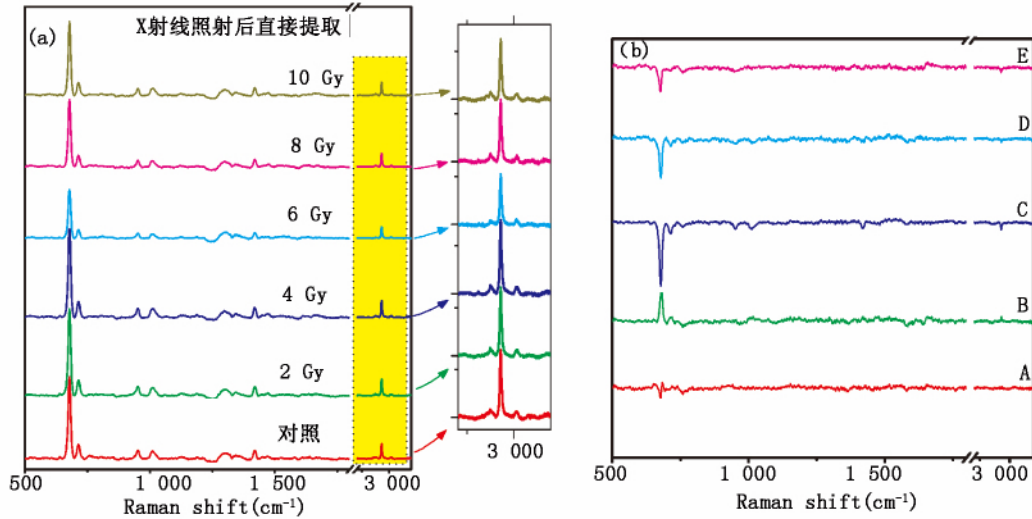


图 1 (a) CNE2 细胞经不同剂量 X 射线辐照后立即提取的蛋白质光谱; (b) 照射组和对照组之间的差异光谱

Fig. 1 (a) RS of total protein extracted from CNE2 cell line after different doses of X-ray irradiation following on with 0 h of incubation; and (b) The corresponding difference spectra between irradiation group and control group

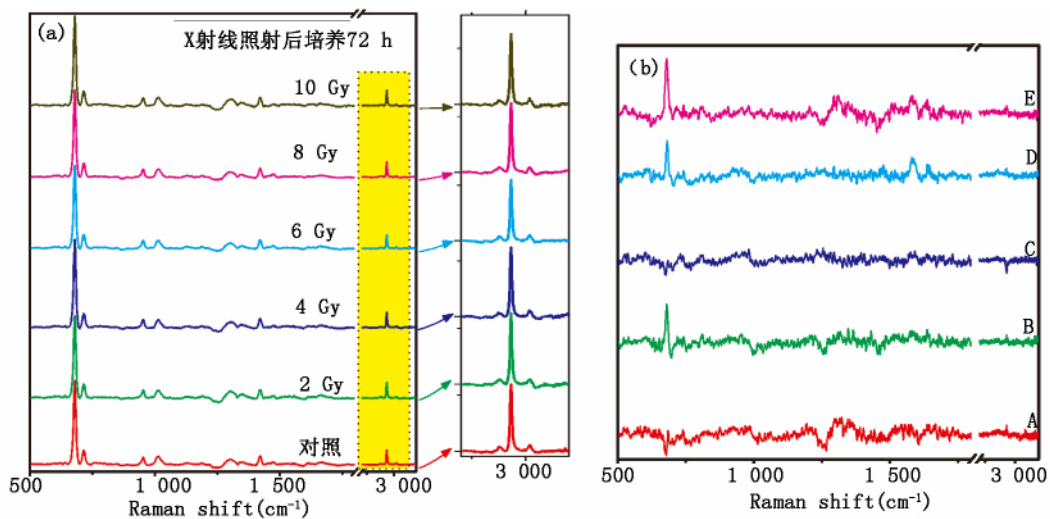


图 2 (a) CNE2 细胞株经不同剂量 X 射线辐照后培养 72 小时后提取的蛋白质光谱; (b) 照射组和对照组之间的差异光谱

Fig. 2 (a) RS of total protein extracted from CNE2 cell line after different doses of X-ray irradiation following on with 72 h of incubation; and (b) The corresponding difference spectra between irradiation group and control group

结果表明:经 2、4、6、8、10 Gy 照射之后的总蛋白质的平均拉曼光谱与对照组谱形基本一致,但与对照组间的光谱存在对应峰的强度不同。在 679、716、952、1 420、2 930 cm^{-1} 峰位处,照射组与对照组的强度差别具有统计学意义。以下重点分析归属为蛋白质的峰值强度变化情况:

在 C-S 伸缩振动的 716 cm^{-1} 位置,对于 0 h 组,

2 Gy 照射组的与强度对照组基本相同 ($P > 0.05$)。4 Gy 组强度高于对照组 ($P < 0.05$),其余各剂量组与对照组的相对强度随辐照剂量的增大而呈下降趋势,且均低于对照组 ($P < 0.05$); 72 h 后各剂量组强度虽随辐照剂量的增大呈上升趋势,但与对照组基本相同,10 Gy 组强度略高于对照组,但均未达到统计学显著性 ($P > 0.05$)。在归属为 L-苯丙氨酸的 952

cm^{-1} 位置,对于0 h组,除4 Gy组强度高于对照组($P < 0.05$)外,其余各照射剂量组的强度数值虽然存在上下波动,均低于对照组,但未达到统计学显著性($P > 0.05$),而72 h后各照射组的强度明显增加,均高于对照组,具有统计学意义($P < 0.05$),且各剂量组与对照组的相对强度随辐照剂量的增大差别不大。

在归属为(电离态)羧酸的 $\text{O}=\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动 1420 cm^{-1} 位置,对于0 h组,各照射剂量组的强度值与对照组相比上下波动明显,4 Gy组强度高于对照组($P < 0.05$),照射剂量6 Gy以上组峰值强度低于对照组($P < 0.05$);72 h后,照射剂量6 Gy以上的峰值强度有所增加,10 Gy组与对照组基本相同,6 Gy、8 Gy组的强度高于对照组($P < 0.05$)。

在归属为C-H伸缩振动的 2930 cm^{-1} 位置,对于0 h组,照射剂量为2 Gy时谱峰强度与对照组基本相同($P > 0.05$),4 Gy剂量时峰强高于对照组($P < 0.05$),6→10 Gy的谱峰强度均低于对照组($P < 0.05$),72 h后,各照射组强度均有所上升,除6 Gy组强度与对照组基本相同,其余均高于对照组达到统计学显著性($P < 0.05$)(见图1放大处及相应差谱)。

实验结果提示:不同剂量的X射线照射后,鼻咽癌细胞株CNE2的总蛋白质拉曼光谱谱峰强度有所改变,且并不与照射剂量成正相关。对于上述讨论的几个峰位处所对应的物质含量,低剂量照射2 Gy组的改变均不显著,而4 Gy照射组的含量均显著增多;6 Gy以上的照射剂量使得C-S、C-H以及电离态羧酸 $\text{O}=\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动显著减少;而对于L-苯丙氨酸的含量,除了4 Gy组外,其余的各剂量组改变不显著;对于72 h后提取的总蛋白,各照射组中,C-S伸缩振动均恢复到未照射水平,而L-苯丙氨酸含量均显著增加;6 Gy以上组中的电离态羧酸的 $\text{O}=\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动和C-H伸缩振动增加。

2.2 统计分析

在T检验的同时,为进一步验证上述的均谱分析,以差异较为明显的相关谱带为对象,用支持向量机作为分类工具进行识别预测。根据C-SVM算法分别从拉曼谱带和照射剂量的两个角度对照射组和对照组样本进行训练和识别。识别预测结果为:在 716 cm^{-1} 谱峰处各剂量组与对照组之间的识别准确率均较低,平均预测准确率只有54.66%;在 951 cm^{-1} 和 2930 cm^{-1} 谱峰处剂量组与对照组之间的识别准确率相对较高,其中8 Gy照射组的识别准确率分

别达到83.33%和80%;在 1419 cm^{-1} 谱峰处的识别准确率次之,平均预测准确率为75.33%,其中,10 Gy照射组的识别准确率为79.67%。说明较高剂量照射后,L-苯丙氨酸、电离态羧酸 $\text{O}=\text{C}-\text{O}$ 和C-H含量与对照组之间确实存在显著的差异,与上述的光谱分析基本一致。由此可见,C-SVM算法的识别准确率可以反映出谱峰强度之间的差异情况。

3 讨论与结论

从实验中可以看出X射线的照射,特别是4 Gy以上剂量,对蛋白质中不同的化学物质产生的效应不一致,而且照射后培养72小时产生的效应也不同于0 h组。72 h后细胞总蛋白中的L-苯丙氨酸含量、电离态羧酸的 $\text{O}=\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动和C-H伸缩振动增加;而C-S伸缩振动恢复到未照射水平。这可能是由于射线导致DNA双链或单链断裂使得细胞发生损伤或死亡,同时也激发了DNA的修复功能,其生物学效应一般发生在数小时之后。在继续培养过程中,射线在分子水平引起细胞的某些内在变化能够在细胞增殖过程中稳定传给子代,影响细胞总蛋白质的合成,导致相关蛋白质含量的改变。L-苯丙氨酸是人体所需8种必需氨基酸之一,是蛋白质的主要构建模块,在人体的代谢过程中起着重要作用。射线作用细胞后,引起L-苯丙氨酸含量的变化,与细胞中蛋白质以及细胞的那些生物学变化有关,是否涉及与细胞的辐射敏感性等目前尚未见到相关的研究报道,本实验的分析结果可能为细胞放射敏感性的生物学研究中寻找分子靶点或切入点提供相关信息。

参考文献

- [1] FENG X P, YI H, *et al.* Identification of biomarkers for predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy by proteomics [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9): 3450-3462.
- [2] CHANG C C, LIN C J. LIBSVM: a library for support vector machines [J]. *ACM TIST*, 2011, 2(27): 1-27.
- [3] DIETER N. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research [J]. *Appl Spectrosc*, 2001, 36(2, 3): 239-298.
- [4] AI G S, YONG Y, JI W Z, *et al.* Screening of gastric carcinoma cells in the human malignant gastric mucosa by confocal Raman microspectroscopy [J]. *Vib Spectrosc*, 2005, 37: 225-231.
- [5] IOAN N, GAVIN J, PETRONELA LN, *et al.* Multivariate analysis of Raman spectra for in vitro non-invasive studies of living cells [J]. *J Mol Struct*, 2005, 744-747: 179-185.
- [6] JAMES W C, DOUGLAS S T, *et al.* Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal (下转第106)

- [4] ONG Y H , LIU Q. Fast depth-sensitive fluorescence measurements in turbid media using cone shell configuration [J]. *Journal of Biomedical Optics* , 2013 , 18(11) : 110503.
- [5] ZHU C , LIU Q. Numerical investigation of lens based setup for depth sensitive diffuse reflectance measurements in an epithelial cancer model [J]. *Optics Express* , 2012 , 20 (28) : 29807-29822.
- [6] RADOSEVICH A J , MUTYAL N N , TURZHITSKY V , *et al.* Measurement of the spatial backscattering impulse-response at short length scales with polarized enhanced backscattering [J]. *Optics Letters* , 2011 , 36(24) : 4737-4739.
- [7] VITKIN E , TURZHITSKY V , QIU L , *et al.* Photon diffusion near the point-of-entry in anisotropically scattering turbid media [J]. *Nature Communications* , 2011 , 2: 587-595.
- [8] ZHU C , LIU Q. Review of Monte Carlo modeling of light transport in tissues [J]. *Journal of Biomedical Optics* , 2013 , 18 (5) : 050902.
- [9] WANG L V , LIANG G. Absorption distribution of an optical beam focused into a turbid medium [J]. *Applied Optics* , 1999 , 38(22) : 4951-4958.
- [10] HIDOVIĆ-ROWE D , CLARIDGE E. Modelling and validation of spectral reflectance for the colon [J]. *Physics in Medicine and Biology* , 2005 , 50(6) : 1071-1093.
- [11] BOHREN C F , HUFFMAN D R. Absorption and scattering of light by small particles [M]. John Wiley & Sons , 2008: 290-320.
- [12] MEGLINSKI I V , MATCHER S J. Quantitative assessment of skin layers absorption and skin reflectance spectra simulation in the visible and near-infrared spectral regions [J]. *Physiological Measurement* , 2002 , 23(4) : 741-753.
- [13] WANG L , JACQUES S L , ZHENG L. MCML-Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues [J]. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* , 1995 , 47 (2) : 131-146.

(上接第 112 页)

- hematopoietic cells [J]. *BIOPHYS J* , 2006 , 90: 648-656.
- [7] JOKE D G , KRIS D G , PETER V , *et al.* Reference database of Raman spectra of biological molecules [J]. *J Raman Spectrosc* , 2007 , 38: 1133-1147.
- [8] CHRISTIAN M , TATYANA C , *et al.* Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy [J]. *Biophys J* , 2007 , 93: 668-673.
- [9] NATALLIA U , AUFRIED L , *et al.* Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells [J]. *Biopolymers* , 2003 , 72: 1-9.
- [10] WARNER LP. Raman spectroscopy of DNA and proteins [J]. *Methods Enzymol* , 1995 , 246: 389-416.