宫颈脱落细胞的红外光谱研究

高体玉① 李 俊② 慈云祥①* 董建强③ 阚 秀③ 郭振泉④

(①北京大学化学与分子工程学院，北京 100871；②甘肃中医学院，兰州 730000；③北京医科大学人民医院病理科，北京 100044；④北京大学生命科学学院，北京 100871. * 联系人，Email: ciyx@chemms. chem. pku. edu. cn)

摘要 应用 Fourier 红外光谱(FTIR)分析方法，对 354 个宫颈脱落细胞的普查样本进行分析. 根据 970 和 1 170 cm^{-1} 吸收峰出现与否，可将谱图分为两大类：T1 和 T2. T1 占 83. 1%，被诊断为正常细胞或在正常范围内的良性变化的细胞(Pap Ⅰ). T2 占 16. 9%，其中，被诊断为 Pap Ⅰ和不正常的样品分别占 28. 9%和 71. 1%。不正常的样品中有 3 例(占 5. 0%)，分别诊断为严重炎症、宫颈疤痕和宫颈糜烂. 结果表明：(1) FTIR 谱学分析结果与细胞学方法检测结果基本一致. (2) FTIR 谱学方法对监测细胞的改变更灵敏. 从正常到病变细胞，谱图的变化呈现多样化和渐进性. 巴氏分级相同的样本的 FTIR 谱图间仍存在着可识别的差异性. (3) FTIR 谱图提示的疾病状态比细胞学方法检测的早. 上述结果提示 FTIR 对宫颈病变的早期诊断具有一定的应用价值，可望成为宫颈病变普查的重要手段.

关键词 红外光谱 宫颈脱落细胞 宫颈癌普查

红外光谱是物质分子的一个重要的物理特性. 细胞或组织的癌变常常伴随着其生物大分子如蛋白质、核酸、糖、脂等在相对含量、构型、构象及其周围环境的改变，红外光谱能灵敏地探测到这些变化. Fourier 红外光谱(FTIR)已被应用于肿瘤细胞与正常细胞在分子水平上的组成和结构的差异性的研究，并获得了一些很有意义的结果[1~4]. 宫颈癌占女性生殖器官恶性肿瘤的半数以上，其死亡率仅次于胃癌居第 2 位. 宫颈癌是世界公认的通过普查可以明显降低发病率的癌症. 将 FTIR 用于宫颈癌普查的研究已有报道[5~8]，但这些工作主要集中在癌变和正常宫颈脱落细胞的谱图差异性上，对处于正常与癌变之间的病变宫颈脱落细胞的研究未见报道. 而各病变宫颈脱落细胞的研究对宫颈癌早期发现和宫颈癌变机理探讨具有重要的实际应用价值和理论价值. 本文报道 354 例宫颈脱落细胞普查样品的 FTIR 谱的多样性，分析它们与 HeLa 癌细胞谱图的差异性.

1 实验

(ⅰ) 样品收集和制备. 354 个宫颈脱落细胞样品取自到北京医科大学人民医院作宫颈癌普查的妇女，年龄在 35 ~ 75 岁之间，平均 55 岁. 将用 0.9% NaCl 溶液收集到的宫颈刮片细胞分成 2 份，一份作巴氏法固定和染色，供细胞学检查用；另一份滴在特制的红外窗片上，然后放置在干燥器中真空干燥，供光谱测试用.

(ⅱ) HeLa 细胞. 为了作比较，选择培养的 HeLa 细胞作恶性宫颈细胞，由北京大学生命科学中心单克隆实验室提供.

(ⅲ) 仪器与方法. 红外光谱仪器为德国 Bruker 公司 Vector 22 型 FTIR 谱仪，分辨率设定为 4 cm^{-1}，用空气冷却的 DTGS 检测器，每个样品扫描 64 次.

2 结果

2.1 宫颈脱落细胞吸收谱带的归属

典型的 FTIR 谱图如图 1 和 2 所示. 根据从细胞或组织中分离出来的核酸、蛋白质、糖、脂及其他生物大分子的红外光谱研究[5~9], 对主要的吸收谱带归属如下: 970 cm^{-1} 弱吸收峰归属为磷酸化蛋白和核酸中磷酸单酯二价阴离子-PO_4^{2-}基团的对称伸缩振动(ν_s PO_4^{2-}). 1 025 cm^{-1} 附近的强吸收峰主要由糖原分子 C-O 基团伸缩振动引起. 1 081 cm^{-1} 是核酸分子内磷酸二酯基团的对称伸缩振动峰(ν_{as} PO_2^-). 1 240 cm^{-1} 属于核酸分子内磷酸二酯基团的反对称伸缩振动(ν_{as} PO_2^-). 在 1 155 ~ 1 171 cm^{-1} 附近一条较弱吸收谱带主要来自蛋白质分子的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的 C-O(H)伸缩振动. 1 400 和 1 455 cm^{-1} 附近吸收带分别属于蛋白质分子中甲基的对称和反对称弯曲振动峰(d_s CH_3 和 d_{as} CH_3).

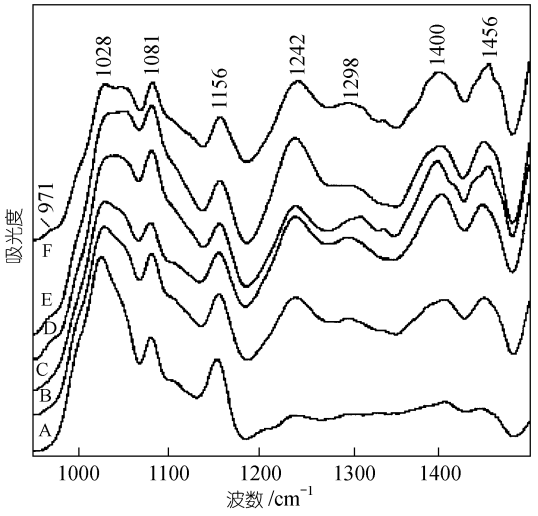


图 1 T1 类宫颈脱落细胞在 950 ~ 1 500 cm^{-1} 的典型谱图

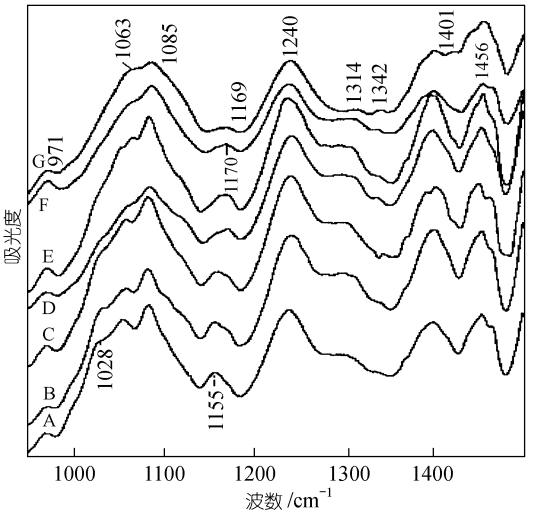


图 2 T2 类(A ~ F)宫颈脱落细胞和 HeLa 细胞(G)在 950 ~ 1 500 cm^{-1} 的典型谱图

2.2 红外光谱谱图分类与病理分类

根据 970 cm^{-1} 吸收峰出现与否, 所测 354 张谱图可分为两大类: T1 和 T2, 如表 1 所示. T1 类, 在 950 ~ 1 500 cm^{-1} 范围, 未见 970 cm^{-1} 吸收峰出现(如图 1 所示), 共有 294 张, 占总谱图数的 83.1%. 镜检结果是巴氏Ⅰ级. T2 类, 970 cm^{-1} 吸收峰出现(如图 2 所示), 共有 60 张, 占总谱图数的 16.9%. 镜检结果是其中的 28.9%为巴氏Ⅰ级, 71.1%为巴氏Ⅱ级和有病变.

根据 1 025, 1 081, 1 150 ~ 1 171 和 1 240 cm^{-1} 附近吸收峰相对强度的变化可将 T1 和 T2 各分为 6 类. 在 T1 中, T1A 占多数, T1B 和 T1F 所占比例最少. 在 T2 中, T2B 占多数, T2F 所占比例最少. T2A, T2B, T2C 和 T2D 中 33.3%属于巴氏Ⅰ级; T2E 中的 7.1%也为巴氏Ⅰ级; T2F 共有 3 例: 宫颈疤痕、宫颈糜烂和宫颈重度炎症各 1 例, 建议治疗或活检. 上述结果表明在检测宫颈脱落细胞的变化方面, 红外光谱比巴氏法更灵敏.

表 1　354 例宫颈脱落细胞红外光谱学特征及其分类

类型	谱带				百分比
	970	1 025, 1 081	1 150 ~ 1 171	1 242	
T1					100.0
T1A	- a)	$D_{1025} >> D_{1081} >> D_{1155}$	1 155	$D_{1155} >> D_{1242} << D_{1081}$	46.4
T1B	-	$D_{1025} > D_{1081} >> D_{1155}$	1 155	$D_{1155} \approx D_{1242} << D_{1081}$	6.0
T1C	-	$D_{1025} > D_{1081} >> D_{1155}$	1 155	$D_{1155} < D_{1242} < D_{1081}$	21.4
T1D	-	$D_{1028} \approx D_{1081} >> D_{1155}$	1 155	$D_{1155} < D_{1242} < D_{1081}$	10.7
T1E	-	$D_{1028} \approx D_{1081} >> D_{1155}$	1 155	$D_{1155} < D_{1242} << D_{1081}$	10.7
T1F	-	$D_{1028} \approx D_{1081} > D_{1155}$	1 155	$D_{1155} < D_{1242} \approx D_{1081}$	4.8
T2					100.0
T2A	+ b)	$D_{1028} < D_{1081}$	$D_{1160} > D_{1170}$	$D_{1242} \approx D_{1081}$	16.7
T2B	+	$D_{1028} < D_{1081}$	$D_{1156} > D_{1170}$	$D_{1242} > D_{1081}$	30.0
T2C	+	$D_{1028} << D_{1081}$	$D_{1155} > D_{1170}$	$D_{1242} > D_{1081}$	16.7
T2D	+	$D_{1025} << D_{1081}$	$D_{1155} < D_{1170}$	$D_{1242} > D_{1081}$	20.0
T2E	+	$D_{1028} << D_{1081}$	$D_{1162} \approx D_{1170}$	$D_{1242} > D_{1081}$	11.6
T2F	+	$D_{1028} << D_{1081}$	$D_{1155} << D_{1170}$	$D_{1242} \approx D_{1081}$	5.0
HeLa	+	$D_{1028} << D_{1085}$	1 170	$D_{1242} \approx D_{1085}$	

a) 970 cm^{-1} 吸收峰不出现; b) 970 cm^{-1} 吸收峰出现

2.3　谱图比较

2.3.1　T1 和 T2 的比较　T1 和 T2 的差异性表现在下列 4 个方面:

(1) T1 谱, 在 950 ~ 1 500 cm^{-1} 范围, 未见 970 cm^{-1} 吸收峰出现, T2 类则出现.

(2) T1 谱型中, D_{1025} 或 $D_{1028} \geqslant D_{1081}$, 但 T2 中, $D_{1028} < D_{1081}$ 甚至 $D_{1028} << D_{1081}$.

(3) T1 所有谱型中, 在 1 140 ~ 1 180 cm^{-1} 范围的吸收峰均出现在 1 155 cm^{-1} 附近(如图 3 所示). 在 T2 中, 1 140 ~ 1 181 cm^{-1} 范围的吸收谱带变宽, 1 155 cm^{-1} 和 1 170 cm^{-1} 或 1 162 cm^{-1} 和 1 170 cm^{-1} 同时出现, 1 155 cm^{-1} 附近吸收谱带的重心移向 1 170 cm^{-1}(如图 4 和 5 所示).

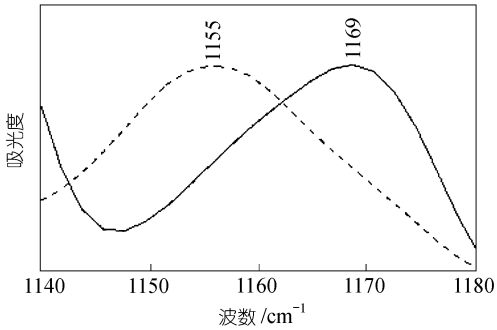


图 3　T1 类宫颈脱落细胞(虚线)与 HeLa 细胞(实线)在 1 140 ~ 1 180 cm^{-1} 吸收谱带的比较

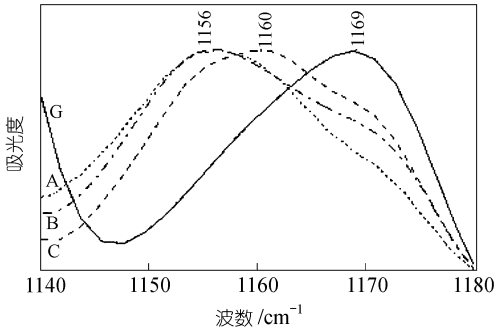


图 4　T2 类宫颈脱落细胞 T2A ~ C 与 HeLa 细胞在 1 140 ~ 1 180 cm^{-1} 吸收谱带的比较
实线为 Hela 细胞, 其他为宫颈脱落细胞

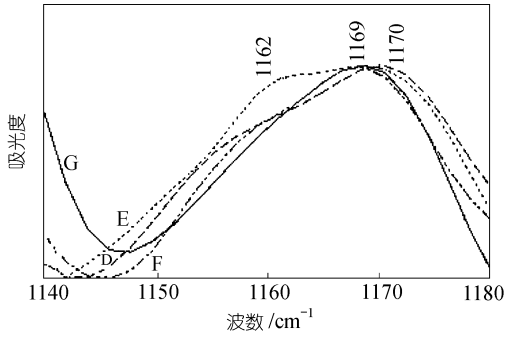


图 5　T2 类宫颈脱落细胞 T2D ~ F 与 HeLa 细胞在 1 140 ~ 1 180 cm^{-1} 吸收谱带的比较
说明同图 4

(4) T1 谱图与 HeLa 细胞谱图差异性显著. 而 T2, 特别是 T2F 与 HeLa 细胞谱图具有一些相近的谱学特征, 如 970 和 1 170 cm^{-1} 吸收带的出现, $D_{1028} < D_{1081}$, 这一结果提示 T2F 细胞发展为癌细胞的几率较高.

2.3.2 T1 谱图之间的比较 从图 1 可看出, T1 类谱图从 T1A 到 T1F, 1 081, 1 242, 1 400 和 1 456 cm^{-1} 吸收峰的强度逐渐增加到或超过糖原 1 025 cm^{-1} 吸收峰的强度. 该结果说明糖原的含量相对于核酸和蛋白质的含量逐渐降低.

2.3.3 T2 谱图之间的比较 T2 类谱图中, 1 028 cm^{-1} 吸收峰的强度降低直至消失; 1 140 ~ 1 180 cm^{-1} 吸收谱带变宽, 中心吸收频率逐渐移向 1 170 cm^{-1}, 相对强度逐渐增加.

3 讨论

在所测的 354 个宫颈脱落细胞的 FTIR 谱图中, 根据 970 cm^{-1} 吸收峰出现与否, 可分为两大类: T1 和 T2. T1 占 83.1%, 为正常细胞或在正常范围内的良性变化的细胞(Pap Ⅰ), 它们的谱图与 HeLa 细胞谱图之间存在着显著的差异性. T2 占 16.9%, 其中, 诊断为 Pap Ⅰ和不正常的样品分别占 28.9%和 71.1%; 不正常的样品中有 3 例(占 5.0%)分别诊断为严重炎症、宫颈疤痕和宫颈糜烂. 这 3 例样品的谱图与 HeLa 细胞谱图具有一定的相似性. 根据 1 025, 1 081, 1 150 ~ 1 171 和 1 240 cm^{-1} 附近吸收峰相对强度的变化可将 T1 和 T2 各分为 6 类. 上述结果表明: (1) FTIR 谱学分析结果与细胞学方法检测结果相一致, 但谱学方法对监测细胞的改变更灵敏. FTIR 谱图提示的疾病状态比细胞学方法检测的早, 如宫颈糜烂的样品在一些吸收谱带上表现出与癌细胞吸收峰相似的特性. 这些结果提示 FTIR 对宫颈病变的早期诊断具有一定的应用价值. (2) 宫颈刮片细胞 FTIR 谱呈现出多样性, 吸收频率和相对强度的变化呈现出一定的渐进性, 这可能提示宫颈病变的渐进性. FTIR 方法快速、灵敏、自动化程度高, 有望成为宫颈癌普查的重要工具.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 39730160).

参 考 文 献

1 Benedetti E, Teodori L, Trinca M L, et al. A new approach to the study of human solid tumor cells by means of FT-IR microspectroscopy. Appl Spectrosc , 1990, 44: 1276~1280

2 慈云祥, 高体玉, 冯 军, 等. 乳腺癌变组织的 Fourier 变换红外光谱研究. 1998, 43(24): 2627 ~ 2630

3 慈云祥, 高体玉, 董建强, 等. 乳腺良、恶性组织中蛋白质二级结构的 Fourier 变换红外光谱研究. 科学通报, 1999, 44(17): 1861 ~ 1866

4 Fabian H, Jackson M, Murphy L, et al. A comparative infrared spectroscopic study of human breast tumor and breast tumor cell xenografts. Biospectroscopy, 1995, 1: 37~45

5 Ge Z, Brown C W, Kisner H J. Screening Pap smears with near-infrared spectroscopy. Appl Spectrosc, 1995, 49: 432~436

6 Wood B R, Quinn M A, Burden F R, et al. An investigation into FTIR spectroscopy as a diagnostic tool for cervical cancer. Biospectroscopy, 1996, 2:154~164

7 Morris B J, Lee C, Nightingale B N. FTIR of dysplastic, papillomavirus-positive cervicovaginal lavage speciments. Gynecologic Oncology, 1995, 56: 245~249

8 Cohenford M A, Godwin T A, Cahn F, et al. Infrared spectroscopy of normal and abnormal cervical smears. Gynecologic Oncology, 1997, 66: 59~65

9 Timesheff S N, Frasman C D. Structure and Stability of Biological Macromolecules. New York: Marcel Dekker, 1969. 641~659

(2000-03-17 收稿, 2000-06-15 收修改稿)