

文章编号:1001-5078(2007)03-0244-04

大白鼠乳腺药物致癌的傅里叶红外光谱研究

张晓冬¹, 刘素芳², 付涛², 葛向红³, 潘聪⁴

(1. 郑州轻工业学院技术物理系; 2. 郑州铁路职业技术学院信息工程系; 3. 中原工学院数理系; 4. 河南省实验中学; 河南 郑州 450002)

摘要:运用傅里叶变换红外光谱技术对二甲基苯蒽(DMBA)药物致乳腺癌的大白鼠的正常、增生和癌变组织进行了检测。其分析结果表明:大白鼠乳腺正常与癌变组织的红外光谱存在着明显差异。某些特征谱带(如:1745 cm^{-1} , 1378 cm^{-1} , 1465 cm^{-1} , 970 cm^{-1})发生频移, 谱带强度发生改变。探讨这些差异为医生进一步研究人乳腺癌变的机理提供了一些依据。

关键词:大白鼠; 乳腺癌组织; 傅里叶变换红外光谱

中图分类号:R73-3; Q95-33 **文献标识码:**A

Research in FTIR of the White Mice's Malignant Mammary Tissue with DMBA Injected into

ZHANG Xiao-dong¹, LIU Su-fang², FU Tao², GE Xiang-hong³, PAN Cong⁴

(1. Department of technology and physics, Zhengzhou University of Light Industry; 2. Department of information engineering, Zhengzhou Railway Vocational & Technical College; 3. Department of Mathematics and Physics, Zhongyuan University of Technology; 4. Experimental school of Henan, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Fourier transform infrared spectroscopy technology was applied to measure the normal, hyperplastic, malignant mammary tissue of albino rat which DMBA was injected into. The analytic results indicate: there are distinct difference between FTIR of the normal mammary tissue and its malignant mammary tissue. Some characteristic spectrums are shifted (for example: 1745 cm^{-1} , 1378 cm^{-1} , 1465 cm^{-1} , 970 cm^{-1}), and the intensity of them have changed. Discussing the difference can provide doctor with some gist of researching the reason in human's malignant mammary tissue.

Key words: white mice; malignant mammary tissue; FTIR

1 引言

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一, 探讨乳腺癌发生过程及其机制具有重要的理论和现实意义。目前对乳腺癌发生中的细胞生物学及分子生物学变化及其影响因素等诸多方面的机制尚不清楚, 其中很多研究工作尚难以在人体上进行实验^[1]。用实验动物模型模拟人体乳腺肿瘤的发生、发展过程进行乳腺癌发生机制的研究和进行各种可能的干预性实验是乳腺癌研究的重要方法之一^[2-3]。

2 实验部分

实验准备:我们采用健康雌性大白鼠共30只,

由河南省动物实验中心提供。鼠龄40~60d, 体重80~120g, 每个单独置于笼内, 室温(23±3)℃, 自由饮水, 标准饲料喂养。将大白鼠分成三组: 一组为灌胃致癌组: 通过灌胃方法给予化学致癌剂二甲基苯蒽(DMBA)诱导乳腺癌; 一组为灌胃对照组: 通过灌胃方法给予橄榄油; 另一组为正常饲养。当饲养到第24周时, 将大白鼠全部去眼球放血处死, 用

作者简介: 张晓冬(1980-), 男, 教师, 2003~2006年, 在郑州大学物理工程学院光学专业攻读硕士研究生, 研究方向为光子生物学。
E-mail: zxdqingyuan@163.com

收稿日期: 2006-08-26; **修订日期:** 2006-10-23

8% 硫化钠脱去胸腹部毛,观察记录乳腺数量、外观、发育情况及有无乳房下结节。并将每个乳腺癌组织连同周围皮肤、皮下组织一同解剖,自乳头部对半切开乳腺行大体观察、记录肿块数量、形态及大小。整个实验模型、方法参照第三军医大学西南医院乳腺疾病中心姜军等所作研究工作^[4-5]。

实验样品:采取大白鼠乳腺致癌、增生和正常的组织,并将所取样品经冰冻机(德国产 CHRIST 冰冻干燥机,型号:ALPHA1-2 LD)干燥后 12h 碾成粉末,与 KBr 粉末混合后压制成薄膜状,压制比例为 1mg 样品 + 150mgKBr。

实验仪器:美国 NICOLET 公司的 NEXUS-470 傅里叶红外光谱仪。

实验参数:波数范围 $4000 \sim 400\text{cm}^{-1}$,分辨率 4cm^{-1} ,采集样品的透射光谱(如图 1~7 所示)。

实验结果与分析:

图 1~图 6 分别为大白鼠乳腺正常、增生和癌变组织在 $4000 \sim 400\text{cm}^{-1}$ 的傅里叶变换红外光谱,参考凌晓锋等对人乳腺组织的傅里叶红外光谱的分析,对大白鼠乳腺组织的傅里叶红外光谱进行对比分析^[6-8]。根据从细胞或组织中分离出来的核酸、

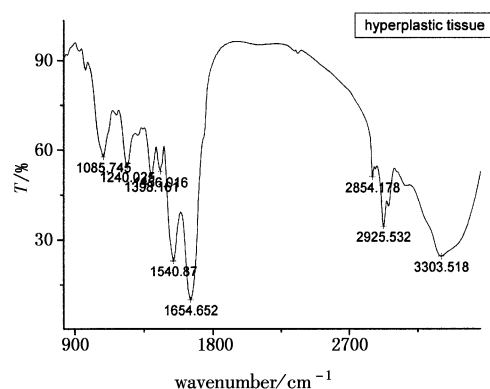


图 3 乳腺增生组织透射率

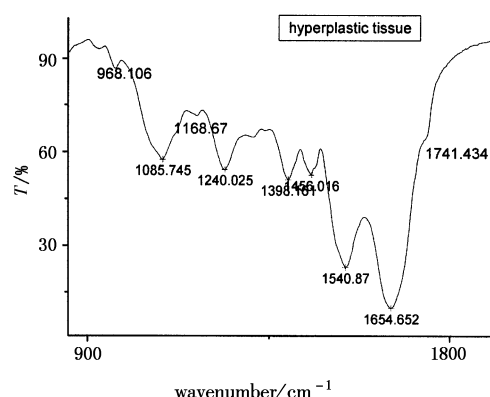


图 4 图 3 的局部放大

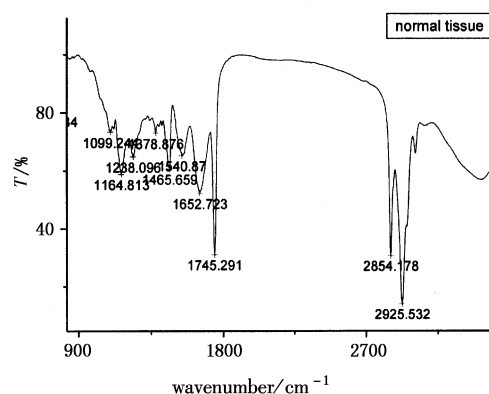


图 1 乳腺正常组织透射率

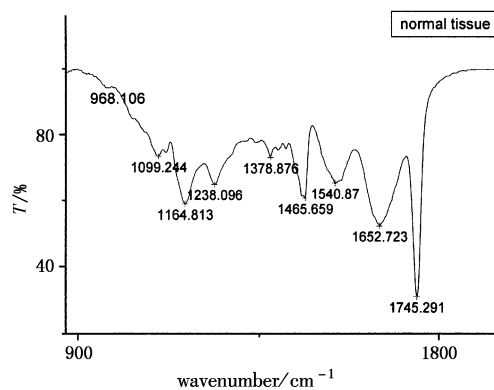


图 2 图 1 的局部放大

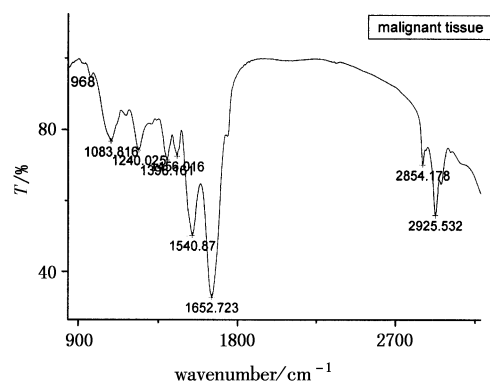


图 5 大白鼠乳腺癌组织透射率

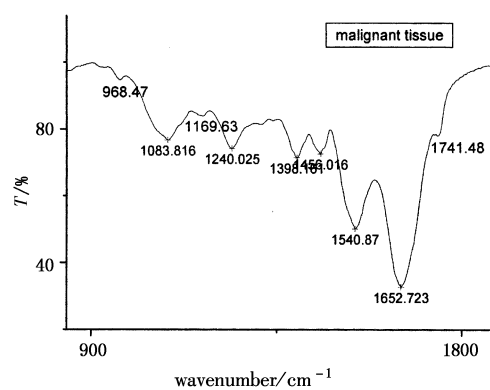


图 6 图 5 的局部放大

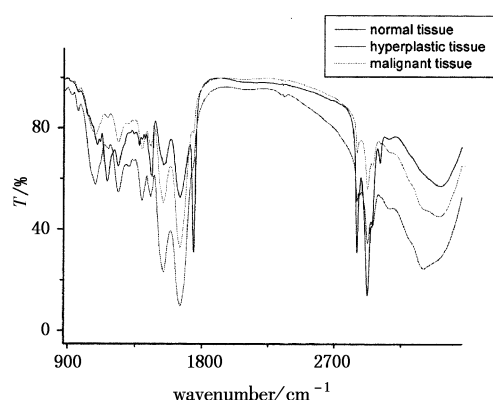


图7 大白鼠乳腺正常组织、增生组织与乳腺癌组织透过率比较

蛋白质、糖、脂及其他生物大分子的红外光谱研究^[9-11],大白鼠乳腺组织的 FTIR 主要的吸收谱带归属如下: 968cm^{-1} 可归属为磷酸化蛋白。 1084cm^{-1} 是核酸分子内磷酸二酯基团的对称伸缩振动峰($\nu \text{ sPO}_2^-$)。 1239cm^{-1} 属于核酸分子内磷酸二酯基团的反对称伸缩振动($\nu \text{ asPO}_2^-$)和胶原分子 C-O 基团伸缩振动。在 1169cm^{-1} 附近一条较弱的吸收谱带主要来自蛋白质的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的 C-O(H) 伸缩振动。 1398cm^{-1} 和 1455cm^{-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($\delta \text{ sCH}_3$ 和 $\delta \text{ asCH}_3$)。 2854cm^{-1} , 2925cm^{-1} 分别来自脂类分子的 $\nu \text{ sCH}_2$, $\nu \text{ asCH}_2$ 。各谱带的初步指认见表 1。

表 1 大白鼠乳腺正常、增生和癌变组织的
红外光谱吸收峰振动模式的初步指认

大白鼠乳腺正常组织吸收峰位置/ cm^{-1}	大白鼠乳腺癌组织吸收峰位置/ cm^{-1}	频移/ cm^{-1}	振动模式初步指认
2925, 2854	2925, 2854	0, 0	分别为脂类分子亚甲基非对称/对称伸缩 $\nu \text{ asCH}_2$ $\nu \text{ sCH}_2$
2959, 2872	2959, 2872	0, 0	分别为脂类分子甲基非对称/对称振动 $\nu \text{ asCH}_3$ $\nu \text{ sCH}_3$
1745	1741	3	脂类分子的 $\nu \text{ C=O}$ 振动
1652	1652	0	蛋白质酰胺 I 带
1540	1540	0	蛋白质酰胺 II 带
1378, 1465	1398, 1456	20, 9	蛋白质分子中甲基的对称和反对称弯曲振动 $\delta \text{ sCH}_3$ 和 $\delta \text{ asCH}_3$
1099, 1238	1083, 1240	16, 2	磷酸二酯基团对称及反对称伸缩振动 $\nu \text{ asPO}_2^-$ $\nu \text{ sPO}_2^-$
1164	1169	5	蛋白质分子中丝氨酸、苏氨酸、氨酸残基的 C-O(H) 伸缩振动
970	968	2	磷酸化蛋白

通过图 1 ~ 图 6 可以看出大白鼠乳腺癌、增生与正常组织的红外光谱主要差异反映在其蛋白质、核酸、脂类等谱带的吸收位置、强度及形状的变化上。

从图 5、图 6 可以看出 968cm^{-1} 附近的吸收带从大白鼠乳腺正常组织到增生组织再到乳腺癌组织, 它们的谱带吸收强度逐渐减弱。该谱带起因于磷酸化蛋白振动。磷酸化蛋白是指磷酸基离子(PO_4^{3-})转移到了一些蛋白质的某些氨基酸(如酪氨酸)残基上, 使磷酸化氨基酸在细胞中含量显著增加, 从而导致该谱带发生明显变化。磷酸化氨基酸可使细胞的正常调节功能失调, 细胞增殖失控和细胞的黏着性丧失^[12]。

在癌变组织的红外光谱中, 变化较明显的是核酸中的磷酸二酯基团的对称和非对称伸缩振动 [$\nu \text{ sPO}_2^-$ ($\sim 1084\text{cm}^{-1}$), $\nu \text{ asPO}_2^-$ ($\sim 1239\text{cm}^{-1}$)]。虽然, 组织中的磷脂也含有磷酸二酯基团, 但是当用乙醇抽提出脂类物质时, 磷酸二酯基团的这两个谱带并无变化。至于组织中其他分子中含有的磷酸二酯基团, 其含量远小于磷脂^[13]。这说明红外光谱中磷酸二酯基团的谱带主要来自核酸。在大白鼠乳腺正常、增生和癌变组织中核酸的磷酸二酯基团的 $\nu \text{ sPO}_2^-$ 谱带吸收强度明显增强。虽然胶原蛋白在 1084cm^{-1} 附近有吸收, 但是癌变时随着胶原蛋白含量的减少, 该谱带强度反而呈增强趋势, 并且增强幅度较大。这说明该谱带主要是核酸的贡献。因为在癌变时, 细胞无限增殖, DNA 大量复制, 导致细胞中的 DNA 含量增加, 从而使其 $\nu \text{ sPO}_2^-$ 强度(细胞中 DNA 含量的重要指标之一)明显增加。

蛋白质分子的 $\nu \text{ C-O(H)}$ 谱带在正常乳腺组织中分别在 1162cm^{-1} 和 1164cm^{-1} 附近呈现吸收, 而乳腺癌组织的该谱带位移到 1169cm^{-1} 附近。该宽且弱的谱带来源于蛋白质中的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的 C-O(H) 伸缩振动 [$\nu \text{ C-O(H)}$]^[14]。其去卷积光谱由位于 1169cm^{-1} , 1160cm^{-1} 和 1152cm^{-1} 附近的 3 个谱带组成, 低波数和中波数谱带来源于组织中氢键化的 C-O(H), 高波数谱带来源于非氢键化的 C-O(H)。癌变时 1170cm^{-1} 谱带吸收强度明显增加。这与 Wong^[11] 等对结肠癌组织的研究结果一致。光谱的这一变化表明: 发生癌变时大白鼠乳腺组织中上述氨基酸残基

的大部分氢键化的 C - O(H) 基团的氢键被破坏。

研究发现,当用乙醇处理样品后,位于 1741cm^{-1} , 2925cm^{-1} , 2854cm^{-1} , 1456cm^{-1} 附近的 4 条谱带均不同程度地减弱, 1741cm^{-1} 谱带甚至消失,而谱图中其他谱带无变化,这说明 4 条谱带中有脂类的贡献。这些脂类分子可能来源于组织中的脂肪。其中, 1741cm^{-1} 谱带起因于脂类分子的 $\nu\text{C}=\text{O}$, 而 2925cm^{-1} , 2854cm^{-1} 和 1456cm^{-1} 谱带分别为脂类分子的非对称/对称伸缩和弯曲振动 (νasCH_2 、 νsCH_2 和 δCH_2) 的贡献。其中 2854cm^{-1} 和 2925cm^{-1} 归属于 CH_2 的对称伸缩和非对称伸缩振动。 2872cm^{-1} 和 2959cm^{-1} 归属于 CH_3 的对称伸缩和反对称伸缩振动。与正常组织相比,在大白鼠乳腺癌变组织中,亚甲基的非对称/对称伸缩振动谱带吸收强度明显降低^[15-16],这可能与细胞脂质中亚甲基链结构发生改变有关^[17],脂质中亚甲基链变得更无序^[18]。

3 实验结论

通过以上实验研究可以看出,大白鼠乳腺正常、增生和癌变组织的 FTIR 光谱存在明显差异:一些特征谱带(如: 1745cm^{-1} , 1378cm^{-1} , 1465cm^{-1} , 970cm^{-1}) 发生频移,谱带强度发生改变。这些差异来源于组织中生物大分子功能基团振动方式的改变,反映组织细胞中高分子组成、构象的变化。具体表现在:在大白鼠乳腺癌组织中,核酸的相对含量明显增加;胶原的含量降低;脂类的增加;蛋白质被磷酸化,分子间的氢键受到破坏,蛋白质变得松散和无序,这些结果与有关人乳腺癌的文献报道相符,同时也为医生进一步研究人乳腺癌变机理提供了一些依据。

参考文献:

- [1] Schnitt S J, Connolly J L, Tavassoli F A, et al. Interobserver reproducibility in the diagnosis of ductal proliferative breast lesions using standardized criteria[J]. Am. J. Surg Pathol, 1992, 16(12): 1133 - 1143.
- [2] Harper G R, Engle B H. Prevention and screening for breast cancer[J]. Cancer Detect Prev., 1993, 17(4 - 5): 551 - 555.
- [3] 杨光伦. 乳腺癌致癌剂的研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 1997, 22(2): 176 - 178.
- [4] 姜军, 张毅. 二甲基苯蒽皮下注射法及灌胃法制作大白鼠乳腺癌模型比较研究[J]. 乳腺病杂志, 2003, 1(2): 35 - 37.
- [5] 姜军, 陈意生. 二甲基苯蒽诱导大鼠多发性原发性恶性肿瘤模型的观察[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18: 423 - 425.
- [6] 霍红, 王幸福, 车迅, 等. 乳腺癌组织中蛋白质与核酸分子氢键特征的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, 21(5): 614 - 616.
- [7] 凌晓峰, 徐智, 徐怡庄, 等. 傅里叶变换红外光谱应用于乳腺癌临床诊断的探索[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(2): 198 - 200.
- [8] 沈世杰, 刘炳玉, 李清, 等. 人乳腺癌组织的特征红外光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(1): 28 - 30.
- [9] Fung M F K, Senterman M K, Mikhael N Z, et al. Pressure-tuning FTIR spectroscopic study for carcinogenesis in human endometrium[J]. Biospectroscopy, 1996, 2: 155 - 165.
- [10] Parker F S. Application of infrared spectroscopy in biochemistry biology and medicine[M]. New York: Plenum, 1971.
- [11] Susi H. Infrared spectra of biological macromolecules and related systems[C]. //Timesheff S N, Frasman C D eds. Structure and Stability of Biological Macromolecules. New York: Marcel Dekker, 1969: 641 - 659.
- [12] ZHAI Zhong-He. Cytobiology [M]. Beijing: High Education Press, 1995: 344 - 348 (in Chinese).
- [13] Wong P T T, Papaavassilion E D, Riges B. Phosphodiester stretching bands in the infrared spectra of human tissues. Applied Spectroscopy[J]. 1991, 45: 1563 - 1567.
- [14] Parker F S. Application of infrared, raman, and resonance raman spectroscopy in biochemistry[M]. New York: Plenum, 1983: 349 - 398.
- [15] Wong P T T, Lacelle S, Yazdi H M. Normal and malignant human colonic tissues investigated by pressure-tuning FT-IR spectroscopy. Applied Spectroscopy[J]. 1993, 47: 1830 - 1836.
- [16] 吴瑾光. 近代傅里叶变换红外光谱技术及应用[M]. 下卷. 北京: 科学技术文献出版社, 1994: 234.
- [17] 沈世杰, 刘炳玉, 李清, 等. 人乳腺癌组织的特征红外光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(1): 28 - 30.
- [18] 谷志远. 现代医学分子生物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1998.