

FTIR-HATR 诊断 β -地中海贫血及其机理研究

彭立新¹, 王桂文^{1*}, 姚辉璐¹, 黄庶识¹, 王一兵¹, 陶站华¹, 黎永青²

1. 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530003

2. 美国东卡罗莱纳大学物理系, Greenville, NC 27858-4353, USA

摘要 为建立简单快速的地中海贫血(简称地贫)诊断方法, 探讨了傅里叶红外光谱结合水平衰减全反射(FTIR-HATR)技术用于 β 地贫患者的检测及其分子机制。检测了 68 份正常与 37 份 β 重型地贫患者样品, 并在群体水平上分析了两者光谱差异变化规律。结果显示: (1) 由于血红蛋白量的减少, β 地贫组的光谱强度显著低于正常组; (2) 在 $1\,750 \sim 1\,500\text{ cm}^{-1}$ 区间, 表征蛋白二级结构的 $1\,652$, $1\,638$ 和 $1\,628\text{ cm}^{-1}$ 在 β 地贫中有明显降低, 而在 $1\,682\text{ cm}^{-1}$ 处略微增强; (3) 在 $1\,350 \sim 1\,500\text{ cm}^{-1}$ 区间, 表征磷脂 CH_3/CH_2 的 $1\,440$, $1\,453$, $1\,479\text{ cm}^{-1}$ 及 $\text{CO}-\text{O}-\text{C}$ 的 $1\,172$ 和 $1\,161\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰在 β 地贫中显著减少; 而在 $1\,000 \sim 1\,200\text{ cm}^{-1}$ 区间, 表征碳水化合物 $\text{C}-\text{O}$ 的 $1\,150\text{ cm}^{-1}$, 2,3-二磷酸甘油酸(DPG)或 ATP 中 $\text{O}-\text{P}=\text{O}$ 的 $1\,081$ 和 $1\,053\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰显著升高。统计表明 DPG 脂类比在 β 重型地贫组中显著高于正常组, 并可作为诊断指标, 将两者完全区分, 避免了复杂数据处理过程, 为地贫的光谱诊断提供了坚实的实验基础与理论依据。

关键词 傅里叶红外光谱; 水平衰减全反射; 地中海贫血; 磷脂; 2,3-二磷酸甘油酸

中图分类号: O621.2 **文献标识码**: A **DOI** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)05-1232-05

引言

地中海贫血(简称地贫)是我国南部地区常见的一种遗传性血液疾病, 主要分为 α 地贫与 β 地贫两种类型^[1-5]。其中, β 地贫是由于 β 珠蛋白基因突变, 珠蛋白链合成受到抑制所致。在临床上可根据 β 珠蛋白减少程度, 分为静止型、轻型、中间型与重型^[1]。其中, β 重型地贫多见于 β 地贫纯合子患者, 是诸多类型中贫血症状最为严重的一种, 患者在出生后 3~6 个月便表现临床症状, 需定期输血维持生命。到目前为止, 筛查与产前诊断是降低 β 重型地贫的发病率及减少患者数量的主要途径。

在地贫的诊断中, 通常以血常规、形态学、生化检验、蛋白电泳方法作为主要诊断依据, 辅助以基因诊断或高效液相法^[6]实施确诊, 其程序繁琐, 诊断周期较长。近几年, 随着光谱技术的发展, 傅里叶变换红外光谱(FTIR)已广泛应用于生物复杂体系的研究之中^[7-11]。更因为实时、快速、无损的检测特点, 可在分子水平反映物质的组成、结构及数量关系, FTIR 已成为医学诊断中富有潜力诊断工具。目前, 红外光谱诊断癌症^[12-15]、白血病^[16, 17]、血糖^[18, 19]等已有众多

成功的报道。在地贫研究中, Liu 等^[20]使用红外透射法, 检测了成膜在 CaF_2 窗片的血红蛋白(hemoglobin, Hb)溶液。通过光谱数据的优化, 基于敏感的光谱区间, 线性判别分析可实现对 β 重型地贫与正常组的有效诊断。但在该区间, 差异的变化及诊断的分子机理并未清楚, 而且复杂的数据预处理也同样桎梏了光谱对地贫的快速诊断。为阐述 β 地贫与正常组光谱间的变化规律及其分子机理, FTIR 结合水平衰减全反射(horizontal attenuated total reflectance, HATR)技术用于 β 地贫研究中, 本文详实地探讨了 β 地贫与正常组的光谱差异及其机理, 并为 β 地贫的诊断提供了简单可靠的定量指标及依据, 使 FTIR 用于 β 地贫大规模筛选成为可能。

1 实验部分

1.1 仪器与样本

傅里叶红外光谱仪(Nicolet 5700, DTGS/B 检测器)配合 HATR 智能附件。健康血样(68 份)和 β 重型地贫患者血样(37 份), 由广西医科大学提供。在样品收集中考虑性别与年龄因素, 男女比例保持一致, 两组年龄相当。

1.2 样本前处理及光谱检测

收稿日期: 2008-02-08, 修订日期: 2008-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30660063)和广西科学基金项目(0575027)资助

作者简介: 彭立新, 1980 年生, 广西科学院生物物理实验室研究实习员 *通讯联系人 e-mail: wguwen@126.com

取 200 μL 外周血置于 1.5 mL 离心管, 4 $^{\circ}\text{C}$, 400 g 离心 10 min 去上清, 400 μL Hanks 缓冲液洗涤 3 次, 蒸馏水低渗处理释放红细胞内含物。4 $^{\circ}\text{C}$, 20 000 g 离心 30 min 取上清液, 置于 -20°C 作长期保存。取血红蛋白溶液 5 μL 稀释液均匀涂布于 ZnSe 晶体表面 (50 mm $\times$ 5 mm), 在干燥条件下成膜。红外光谱仪测定分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描范围为 800 ~ 4 000 cm^{-1} , 扫描 64 次获得样品光谱。

1.3 实验条件的优化

为确定适合的样品浓度, 观察光谱强度与浓度的相关性, 我们用高浓度样品做系列稀释, 结果显示当 1 652 cm^{-1} 处光谱强度小于 1.5 时 (即透射率 $T > 4\%$ 时), 各个峰高与浓度呈良好的线性相关 ($r > 0.995$)。此外, HA TR 的多次反射可减少红外透射法中血红蛋白成膜厚度、半径大小、形状对光路的影响, 改善实验重现性 ($\text{RSD} < 4\%$)。因此本实验对血红蛋白采用十倍的稀释, 使 HA TR 谱在 1 652 cm^{-1} 处强度低于 1, 成膜的厚度远小于 0.5 μm 。

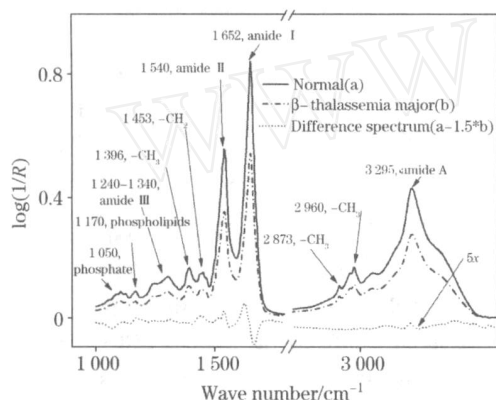


Fig. 1 Plots of the average IR absorption spectra of hemoglobin lysates from normal individuals (solid line), patients with β -thalassemia major (dashed line), as well as the difference spectrum (dotted line) between normal and magnified β -thalassemia major spectra by a factor of 1.5

1.4 数据处理

OMNIC 7.0 软件用于光谱的 Savitzky Golay 五点平滑, 二阶导数光谱及傅里叶去卷积 (fourier self-deconvolution, FSD) 等基本处理。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱分析

样本的红外光谱经 5 点平滑处理后, 分别计算了两组样品的平均光谱 (见图 1)。在谱形上两组光谱大体上保持一致, 在 1 652, 1 542 和 3 295 cm^{-1} 处有 3 个强吸收峰, 分别归属为血红蛋白的 $\text{C}=\text{O}$ (amide I), $\text{N}-\text{H}$ (amide II) 和 amide A, 为蛋白结构研究的重要区域。但在强度上, 在主要的吸收峰上两组光谱存在明显差异。在样品溶液中, 所释放的 Hb 量 (Q , $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 主要由平均细胞 Hb 浓度 (MCHC)、平均

细胞体积 (MCV) 及红细胞数 (N , 个 $\cdot \text{L}^{-1}$) 决定。在正常组中, 由于红细胞数及平均细胞 Hb (MCH), 即 $\text{MCHC} \cdot \text{MCV}$ 大于贫血患者, 在 Hb 总量上明显高于 β 重型地贫组。因此, 地贫组的光谱强度显著低于正常组 ($p < 0.001$), 可做为红外对地贫诊断的量化指标之一。

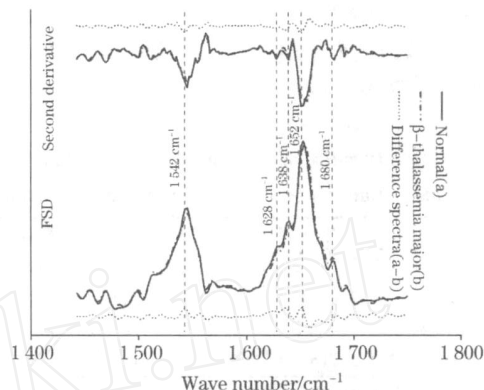


Fig. 2 Second derivative spectra, FSD and their respective difference spectra in amide regions. The solid line, short dash dot line and dotted line represent normal group, β -thalassemia major group and their difference spectra respectively

由于正常组与 β 重型地贫样品蛋白浓度的差异, 在比较各生化组分及蛋白结构之前, 先对其蛋白浓度进行了校正。图 1 中显示了以 1 652 cm^{-1} 作为参比峰, 正常组与校正后 β -重型地贫的差谱。两者差异主要存在于 1 750 ~ 1 500 cm^{-1} , 1 350 ~ 1 500 cm^{-1} , 800 ~ 1 200 cm^{-1} 光谱区间, 这与 Liu 等^[20]结果一致, 也是本文中重点讨论的对象。

2.2 蛋白结构变化

在 1 652 与 1 542 cm^{-1} 附近 (见图 2), 其谱带主要来源于蛋白的特征吸收, 为傅里叶红外研究蛋白质二级结构特征最多的一个谱带。但由于众多子带重叠, 对其结构的研究需要二阶导数、FSD、曲线拟合等分峰技术。因此, 在该区域用二阶导数确定其峰数及位置, 再以去卷积半高宽 (bandwidth at half height, FWHH) 20 cm^{-1} , 分辨率提高因子 2.0 对其进行去卷积处理以提高光谱分辨率。在表征 α 螺旋结构的 1 652 cm^{-1} 处, 其光谱的强度略低于正常组。在正常血红蛋白中其二级结构以 α 螺旋为主, 但两种肽链在数目上有所不同, β 珠蛋白为 8 个, 而 α 珠蛋白仅为 7 个。在 β 重型地贫中, 由于 β 珠蛋白的相对缺失, 蛋白中所含 α 螺旋结构会相应减少。此外, 由于分辨率的提高, 二阶导数谱和 FSD 谱显示了原始光谱中 1 680, 1 638, 1 628 cm^{-1} 处隐含的子峰, 在 β 重型地贫中前者呈强吸收, 而后两者与之相反呈弱的吸收强度。由于血红蛋白不含有 β 折叠结构, 附近的谱带应来源于两段螺旋间的短肽^[21, 22], 推测应与 β 珠蛋白缺失相关。

2.3 脂类变化

图 3(a) 显示了 1 350 ~ 1 500 cm^{-1} 区间正常组和 β 重型地贫的原始光谱及二阶导数谱。在 1 440, 1 453, 1 479 cm^{-1} 处, 重叠的吸收峰在导数谱中被明显的区分, 谱带归属为脂

类的 CH_3/CH_2 的弯曲振动, 主要来源于红细胞膜所释放的磷脂或胆固醇类成分^[23]。在 β 重型地贫中, 由于 β 珠蛋白的缺失, 易使过剩的 α 珠蛋白及降解物沉积于膜上, 导致膜的释放能力下降, 从而溶液中脂类含量降低。为定量描述这种变化, 我们以 Amide 区域的 $1\,303\text{ cm}^{-1}$ 作为参比峰, 计算了表征脂类/蛋白比的 $1\,453$ 与 $1\,303\text{ cm}^{-1}$ 的相对强度。 t 检验显示两组数据差异显著 (见表 1), 表明 β 地贫组中脂类物质相对于蛋白的减少趋势更为强烈。

Table 1 Intensity ratios of controls to patients with β thalassemia major, shown as mean and standard deviation

强度比	正常对照 ($n=37$)	β 重型地贫 ($n=68$)
$I_{1\,453}/I_{1\,303}$	$1.101\,6 \pm 0.012\,1$	$1.085\,7 \pm 0.015\,6^a$
$I_{1\,440}/I_{1\,303}$	$1.057\,4 \pm 0.006\,9$	$1.038\,0 \pm 0.011\,7^a$
$I_{1\,052}/I_{1\,172}$	$0.435\,8 \pm 0.012\,9$	$0.532\,3 \pm 0.026\,7^a$
$I_{1\,081}/I_{1\,172}$	$0.778\,8 \pm 0.019\,8$	$0.898\,1 \pm 0.037\,6^a$

^a: statistical significant ($p=0$, t test)

2.4 碳水化合物及磷酸化合物变化

在 $1\,172\text{ cm}^{-1}$ 附近, 谱带为 $1\,172$, $1\,161$ 和 $1\,150\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰重叠所致^[24, 25] [见图 3(b)]。前两者主要归属为脂类 $\text{CO}-\text{O}-\text{C}$ 对称伸缩振动^[26], 与 $1\,453\text{ cm}^{-1}$ 处一致, 其光谱强度在 β 重型地贫组呈现明显降低, 为 β 重型地贫磷脂释放减少所致。而 $1\,150\text{ cm}^{-1}$ 谱带则与 $1\,080$ 和 $1\,053\text{ cm}^{-1}$ 的变化趋势一致, 在 β 重型地贫组中表现较强的吸收强度。在峰的指认上, $1\,150\text{ cm}^{-1}$ 主要归属为碳水化合物的 $\text{C}-\text{O}$ 的伸缩振动, 如葡萄糖及其中间产物^[27]; 而 $1\,080$ 和 $1\,053\text{ cm}^{-1}$ 主要归属为 $\text{O}-\text{P}=\text{O}$ 对称伸缩振动, 来自于血红蛋白中游离的 DPG 或 ATP, 三者在代谢上存在一定的相关性。在成熟红细胞中, 由于线粒体和微粒体的缺失, 以葡萄糖为底物的糖酵解过程是红细胞供能的主要途径, 其最终产物为 ATP, NADPH 与 DPG。除前两者用于供能、离子平衡等功能外, 细胞内还维持高水平的 DPG, 其浓度与 Hb 相当, 其功能主要是作为血红蛋白氧亲合力的调节因子, 通过浓度方式调制血红蛋白对氧的结合与释放能力^[28]。在 β 地贫中, 由于有效血红蛋白量减少, 红细胞内葡萄糖代谢活跃^[29], 使得 DPG 在胞内呈代偿性升高, 促使氧离曲线发生右移, 增强组织对氧的摄取, 以缓解机体的缺氧状态。这与 Labotka 等^[30] 用核磁共振对 β 重型地贫的 DPG 检测结论一致。

结合以上分析, 分别计算了 $1\,081$ 和 $1\,053\text{ cm}^{-1}$ 与 $1\,172\text{ cm}^{-1}$ 的相对强度来表征 DPG 磷脂的变化关系, 统计显示在 β 重型地贫中 DPG 磷脂比显著高于正常组 (见表 1), 并且能将两组数据完全区分。图 4 其横坐标为 $1\,172\text{ cm}^{-1}$ 处原始光谱强度, 可作为血红蛋白浓度的指示, 显示大部分 β 地贫患者的血红蛋白浓度减少; 而在表示 $1\,053$ 与 $1\,172\text{ cm}^{-1}$ 相对强度的纵坐标上, 所有的样本可被正确的区分。以上结果大大简化了数据处理过程, 可为红外光谱诊断 β 地贫提供更直观的量化指标。

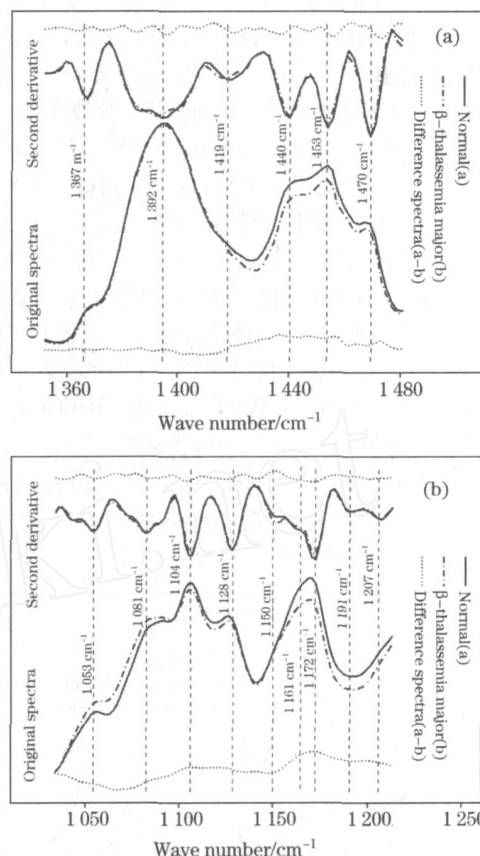


Fig. 3 Original spectra, second derivative spectra and their respective differencespectra in $1\,350\sim1\,500\text{ cm}^{-1}$ (a) and $1\,000\sim1\,200\text{ cm}^{-1}$ (b) regions

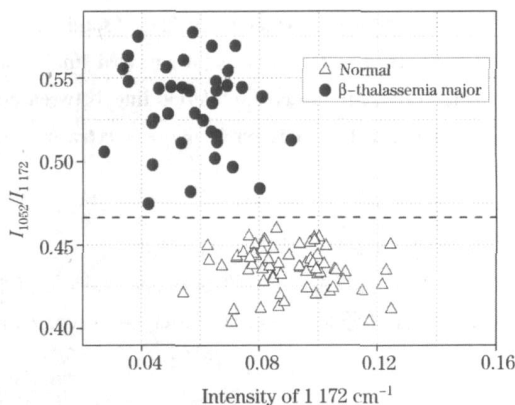


Fig. 4 Two-dimensional plot of the intensities at band $1\,172\text{ cm}^{-1}$ and the intensity ratio of $I_{1\,053}/I_{1\,172}$. The triangles represent control group and dots represent patients with β -thalassemia major. Plots illustrate substantial distinguishing in cluster diversity

3 结 论

应用 FTIR-HATR 技术检测了 β 地贫与正常组的红外光谱, 在群体水平上寻找出两组光谱差异的变化规律, 并探讨

了其变异的分子机制。表明光谱中正常组与 β 重型地贫患者主要存在 3 方面差异, 一是 β 重型地贫在血红蛋白表达量上显著低于正常组; 二是表现为两者在血红蛋白结构差异, 即 $1\,750 \sim 1\,500\text{ cm}^{-1}$ (Amide) 区内, β 重型地贫在 $1\,682$, $1\,638$, $1\,628\text{ cm}^{-1}$ 处吸收强度变化; 最后是 $1\,453$ 及 $1\,170\text{ cm}^{-1}$ 附近表征磷脂成分的特征峰在 β 重型地贫中显著降低,

而在表征 DPG 的 $1\,107\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰却显著增加, 其 DPG 磷脂比表现为显著的组间特异性, 可将两组样本完成分开, 为红外光谱诊断地贫提供了可靠的理论依据。

致谢: 感谢广西医科大学陈萍、贾文广提供实验样本, 广西工业生物技术研究中心杨登峰、孙靓、孙菲菲和肖代俊对本文的支持。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Jun-wu, LONG Gui-fang (张俊武, 龙桂芳). The Hemoglobin & Hemoglobinopathies (血红蛋白与血红蛋白病). Nanning: Guangxi Science & Technology Press (南宁: 广西科技出版社), 2003.
- [2] Yong KN, Wadsworth D, Langlois S, et al Clin Genet, 1999, 55(1): 20.
- [3] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517.
- [4] Li D, Liao C, Li J, et al Eur J Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology, 2006, 128(1-2): 81.
- [5] Lau YL, Chan LC, Chan YY, et al New England Journal of Medicine, 1997, 336(18): 1298.
- [6] Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij R, et al Clin Chem, 1998, 44(4): 740.
- [7] Arrondo JL, Goni FM. Prog Biophys Mol Biol, 1999, 72(4): 367.
- [8] Barth A, Zschem C. Q. Rev Biophys, 2002, 35(4): 369.
- [9] Gilmanish R, Williams S, Callender RH, et al Biochemistry, 1997, 36(48): 15006.
- [10] Iwaki M, Osyczka A, Moser CC, et al Biochemistry, 2004, 43(29): 9477.
- [11] WU Jin-guang (吴瑾光). Techniques and Application of FTIR Spectra in Recent Time (近代傅里叶变换红外光谱技术及应用). Beijing: Scientific and Technical Documents Press (北京: 科学技术文献出版社), 1994.
- [12] Li QB, Sun XJ, Xu YZ, et al Clin Chem, 2005, 51(2): 346.
- [13] Argov S, Ramesh J, Salman A, et al J Biomed Opt, 2002, 7(2): 248.
- [14] LING Xiao-feng, XU Yi-zhuang, WANG Li-xin, et al (凌晓锋, 徐怡庄, 王立新, 等). Chem J Chinese Universities (高等学校化学学报), 2007, 28(3): 445.
- [15] PAN Qing-hua, WANG Bing-bing, LAI Guo-qiao, et al (潘庆华, 王冰冰, 来国桥, 等). Chem J Chinese Universities (高等学校化学学报), 2007, 28(5): 843.
- [16] Benedetti E, Palatresi M P, Vergamini P, et al Leukemia Research, 1985, 9(8): 1001.
- [17] Schultz CP, Liu KZ, Johnston JB, et al Leukemia Research, 1996, 20(8): 649.
- [18] Petibois C, Rigalleau V, Melin AM, et al Clin Chem, 1999, 45(9): 1530.
- [19] Petrich W, Dolenko B, Fruh J, et al Applied Optics, 2000, 39(19): 3372.
- [20] Liu KZ, Tsang KS, Li CK, et al Clin Chem, 2003, 49(7): 1125.
- [21] Byler DM, Susi H. Biopolymers, 1986, 25(3): 469.
- [22] Byler DM, Broutille JN, Susi H. Spectroscopy, 1986, 1(3): 29.
- [23] Cheung LC, Storm CB, Gabriel BW, et al Analytical Biochemistry, 1984, 137(2): 481.
- [24] Wong PT, Wong RK, Caputo TA, et al Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(24): 10988.
- [25] Cohenford MA, Rigas B. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(26): 15327.
- [26] Melin AM, Perromat A, Deleris G. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 394(2): 265.
- [27] Lasch P, Pacifico A, Diem M. Biopolymers, 2002, 67(4-5): 335.
- [28] WANG Jing-yan, ZHU Sheng-geng, XU Chang-fa (王镜岩, 朱圣庚, 徐长法). Biochemistry (生物化学). Beijing: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 2002.
- [29] Ting YL, Naccarato S, Quattieri A, et al British Journal of Haematology, 1994, 88(3): 547.
- [30] Labotka RJ, Honig GR. American Journal of Hematology, 1980, 9(1): 55.

FTIR-HATR to Identify β -Thalassemia and Its Mechanism Study

PENG Li-xin¹, WANG Gui-wen^{1*}, YAO Hui-lu¹, HUANG Shu-shi¹, WANG Yi-bing¹, TAO Zhan-hua¹, LI Yong-qing²

1. Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530003, China

2. Department of Physics, East Carolina University, Greenville, NC 27858-4353, USA

Abstract Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) associated with horizontal attenuated total reflectance (HATR) was firstly used to diagnose β -thalassemia patients. With excellent linearity ($r=0.997$) and reproducibility ($RSD < 4\%$), FTIR-HATR shows an order-of-magnitude increase in IR absorption bands over the single-path transmission FTIR. Based on above, spectra from 37 patients' and 68 health samples indicated several observable differences in IR vibrational spectra of the Hb lysates between the β -thalassemia major patients and control: (1) Because of decreasing hemoglobin, the peak intensities are obviously lower in β -thalassemia group that is consistent with index from routine hemoglobin diagnosis. (2) In $1\,750\text{--}1\,500\text{ cm}^{-1}$ region, slight decrease at $1\,652\text{ cm}^{-1}$ (α -helix), $1\,638$ and $1\,628\text{ cm}^{-1}$ bands but mild increase at $1\,682\text{ cm}^{-1}$ all demonstrate structure changes by both Fourier self-deconvolution and second derivative spectra. (3) More importantly, difference spectra substantially demonstrate decreased intensities at $1\,440$, $1\,453$, $1\,479\text{ cm}^{-1}$ bands arising from CH_2/CH_3 deformation vibration of phospholipids but increased intensities at $1\,150\text{ cm}^{-1}$ band originating from C—O stretching vibration of carbohydrate and at $1\,081$ and $1\,053\text{ cm}^{-1}$ bands that are attributed to 2,3-diphosphoglycerate (DPG) in β -thalassemia major group. Statistical analysis demonstrates significant difference of DPG/phospholipids ratio between two groups. All the samples can be 100% correctly classified into groups on the basis of this ratio. These finding could help understand possible mechanism for diagnosing thalassemia. It makes large-scale screening of thalassemia by FTIR a possibility.

Keywords FTIR; HATR; Thalassemia; Phospholipids; 2, 3-Diphosphoglycerate

(Received Feb. 8, 2008; accepted May 12, 2008)

* Corresponding author