

FTIR-HATR 诊断 α -地中海贫血^{*}

Identification of α -Thalassemia by FTIR-HATR Spectroscopy

郑元涛¹, 彭立新³, 姚辉璐², 黄庶识², 王桂文^{2**}

ZHENG Yuan-tao¹, PENG Li-xin³, YAO Hui-lu², HUANG Su-shi², WANG Gui-wen²

(1. 广西科学院生物研究所, 广西南宁 530007; 2. 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530007; 3. 广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(1. Biology Institute, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. State Key Laboratory of Non-food Biomass Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要: 将傅里叶红外光谱与水平衰减全反射技术(FTIR-HATR)结合, 对 α -地中海贫血样品与正常样品进行检验, 通过改进的相对强度计算方法进行对比分析。结果表明: α -地贫组与正常组间在 I_{1074}/I_{1152} 、 I_{1517}/I_{1074} 、 I_{3295}/I_{3372} 相对强度上存在显著差异; 在峰的指认上, 波数 1074cm^{-1} 、 1152cm^{-1} 、 1517cm^{-1} 和 3295cm^{-1} 分别表征磷酸类化合物、碳水化合物、酪氨酸和 Amide A, 其相对强度差异应主要来源于细胞内增加的高磷化合物 2, 3-二磷酸甘油酸、减少的葡萄糖以及蛋白组分; 由于以上组分的变化被相对强度计算所放大, 在组间呈显著的特异性, 通过相对强度与主成分分析均能将混合的样品正确区分。

关键词: 血红蛋白 α -地中海贫血 FTIR-HATR 相对强度

中图分类号: O657.33, R556 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)03-0228-05

Abstract: FTIR associated with multi-bounce horizontal attenuated total reflectance was used to diagnose α -thalassemia patients. In ranges of $800\sim 1780\text{cm}^{-1}$ and $2480\sim 3600\text{cm}^{-1}$, we calculated all intensity ratios to detect spectra differences between patient and health groups. We found that there are significant differences between α -thalassemia patients and health groups in intensity ratios of I_{1074}/I_{1152} , I_{1517}/I_{1074} and I_{3295}/I_{3372} . At the peaks of 1074cm^{-1} , 1152cm^{-1} , 1517cm^{-1} and 3295cm^{-1} , they are assigned to deformation vibration of O-P=O, C-O stretching vibration of carbohydrate, breathing vibration of tyrosine ring and Amide A, respectively. It suggests that the difference of intensity ratios between two groups may result from increasing 2, 3-diphosphoglycerate, decreasing glucose and hemoglobin in α -thalassemia patients. Furthermore, principal components analysis (PCA) was used to assess these ratios and demonstrated a correct classification on the basis of PC scores.

Key words: hemoglobin, α -thalassemia, FTIR-HATR, intensity ratios

地中海贫血(Thalassaemias, 地贫)是东南亚和中国南部地区常见的遗传性血液疾病, 主要分为 α -

地贫与 β -地贫两种类型。 α -地贫是由于 α -珠蛋白基因突变, 使珠蛋白链合成受到抑制所致。 α -地贫在香港和广东的流行率分别为5%和8.35%, 超过 β -地中海贫血在上述地区3.4%和2.54%的流行率^[1~3], 是我国南部地区主要的地贫类型。临床表现上, 根据 α -珠蛋白减少程度, α -地贫可以分为静止型(Silent Carrier)、 α -地贫特性(α -Thalassaemia Trait)、Hb H

收稿日期: 2011-01-07

作者简介: 郑元涛(1977-), 男, 初级, 主要从事分子生物学研究。

* 国家自然科学基金项目(No. 60868002), 广西科学基金项目(No. 0832022Z)资助。

** 通讯作者: Tel: 0771-2503970; Email: pengpeper@hotmail.com.

(Hemoglobin H disease)、Bart's 胎儿水肿综合征 (Bart's Hydrops Foetus Syndrome) 四种类型^[4]。前两者表现为携带者, 一般无明显的贫血症状; Bart's 胎儿水肿综合征为重症贫血症状, 胎儿常于妊娠晚期死亡; Hb H 病是由于 3/4 α -珠蛋白基因缺失所引起, 其症状表现与基因的突变型相关, 覆盖轻度贫血、中度贫血以及严重贫血三种临床表现型。在 α -地贫研究中, 对 Hb H 的筛查与产前诊断成为有效减少地贫患者数量与发病率的重要手段。常规诊断方法主要以血常规、细胞形态学、蛋白电泳等为依据, 辅助以基因诊断或高效液相法进行确诊, 其诊断程序繁琐而且周期长^[5]。

为探讨快速有效的地贫诊断方法, 本实验室曾将傅里叶红外光谱 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) 与多次衰减全反射技术 (Multi-bounce Horizontal Attenuated Total Reflectance, HATR) 结合, 用于对 β -地贫的研究, 并探索出一种简单稳定的检测手段以及改进的数据处理方法^[6,7]。在该方法中, 由于 HATR 技术的引入, 有效克服了透射光谱 (Transmission) 中样品成膜厚度、半径大小和形状对光路的影响^[8], 增加了光谱灵敏度与重现性, 为地贫的光谱诊断提供可靠保障; 而改进的相对强度的数据处理方法, 可以分辨出地贫患者组与正常组的微小差异, 实现 β -地贫样品与健康样品间的区分。在研究中, 我们将该方法延伸到对 α -地贫的研究中, 旨在进一步完善 FTIR 技术在地贫诊断中的应用, 从光谱角度诠释地贫组与正常组的差异形成机制, 探索 FTIR 对地贫的诊断机理。

1 实验部分

1.1 样品与仪器

在收集样品时, 考虑性别与年龄因素, 使男女比例大体保持一致, 年龄覆盖 2~45 岁的范围。Hb H 患者血液样品 (Hb H 组, 32 份) 和正常血液样品 (正常组, 68 份) 均由广西医科大学提供。

实验仪器为傅里叶红外光谱 (Nicolet 5700, DTGS/B 检测器) 配合 HATR 智能附件 (Thermo)。分辨率为 4cm^{-1} , 扫描范围为 $650\sim 4000\text{cm}^{-1}$, 每个样品扫描 64 次后获得样品光谱。

1.2 样品前处理以及数据处理

样品处理参考 Liu^[9]、彭立新等^[6]的方法。取 200 μl 外周血置于 1.5ml Eppendorf 离心管, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、400 g 离心 10 min, 去上清, 用 400 μl Hanks' 缓冲液洗涤 3 次, 用蒸馏水低渗处理以释放红细胞内含物。 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、20,000 g 离心 30 min, 取上清液 10 μl , 稀释 10

倍, 并将 5 μl 稀释液均匀涂布于 ZnSe 晶体表面 ($50\text{mm}\times 5\text{mm}$), 在干燥条件下成膜。

数据处理的详细方法参考彭立新^[6] 等的方法。用 OMNIC 7.0 软件对光谱进行基本处理, 如 Savitzky Golay 五点平滑、二阶导数光谱和傅里叶去卷积 (Fourier Self-deconvolution, FSD) 处理; 用 Matlab (The Mathworks, USA) 软件处理其余数据。

2 结果与分析

2.1 平均光谱分析

本实验共获得 100 份样品的红外光谱。经过五点平滑处理后, 分别计算 Hb H 组和正常组的平均光谱 (见图 1)。在光谱强度上, Hb H 组显著低于正常组, 这与血常规检测数据一致。在峰的指认上, 波数 1652cm^{-1} 、 1540cm^{-1} 和 3295cm^{-1} 处为血红蛋白的主要吸收峰, 分别归属蛋白 C=O (amide I)、N-H (amide II) 和 amide A; 波数 $800\sim 1450\text{cm}^{-1}$ 为血红蛋白的红外指纹区, 其各个吸收峰的归属见图 1。

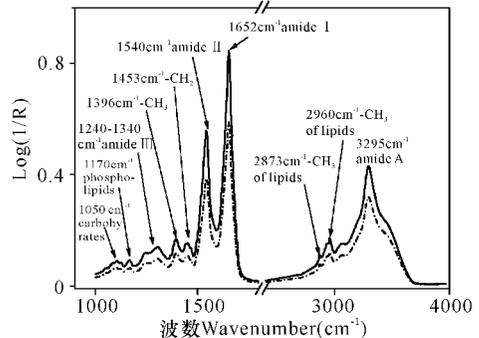


图 1 正常组与 Hb H 地贫组的平均光谱

Fig. 1 Average IR absorption spectra of hemoglobin lysates from normal individuals and patients with Hb H disease —: 正常组, - - -: Hb H 型地贫组, —: Normal group —: Hb H group.

2.2 相对强度分析

参考彭立新等^[6] 数据处理的方法, 我们计算了 Hb H 组与正常组在波数 $800\sim 1780\text{cm}^{-1}$ 与波数 $2480\sim 3600\text{cm}^{-1}$ 两段区间的相对强度, D 值 = $Abs(M_{\text{正常}} - M_{\text{HbH}}) - (SD_{\text{正常}} + SD_{\text{HbH}})(Abs$ 代表绝对值, $M_{\text{正常}}$ 、 M_{HbH} 分别表示正常组和 Hb H 组的平均值, $SD_{\text{正常}}$ 、 SD_{HbH} 表示其标准差) 用来量化相对强度的组间差异。图 2(a) 显示在波数 $800\sim 1780\text{cm}^{-1}$ 内, Hb H 组与正常组间相对强度的 D 值大于零的部分。用 T 检验该部分相对强度检验, 均表现统计显著性 ($P < 0.001$)。

在波数 $800\sim 1780\text{cm}^{-1}$ 内, D 值大于零的部分占整个矩阵的 7.70%, 低于彭立新等^[6] 在 β -地贫研究中的 9.34%, 主要位于波数 $971\sim 1130\text{cm}^{-1}$ 与波

数 $1150 \sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ 内。对矩阵进行投影后(见图 2), 由于相对强度沿其对角线成倒数关系, 其 D 值大于零的区域呈对称分布。但最大的 D 值在两对称的三角矩阵中来源不同, 在低波数比高波数的三角矩阵中, 其最大 D 值(0.0182)来自于 I_{1074}/I_{1152} 的相对强度。其 Hb H 组的比值大于正常组, 并表现强的组间特异性, 两组共 100 个样本, 可以完全的被该相对强度所区分(见图 3)。

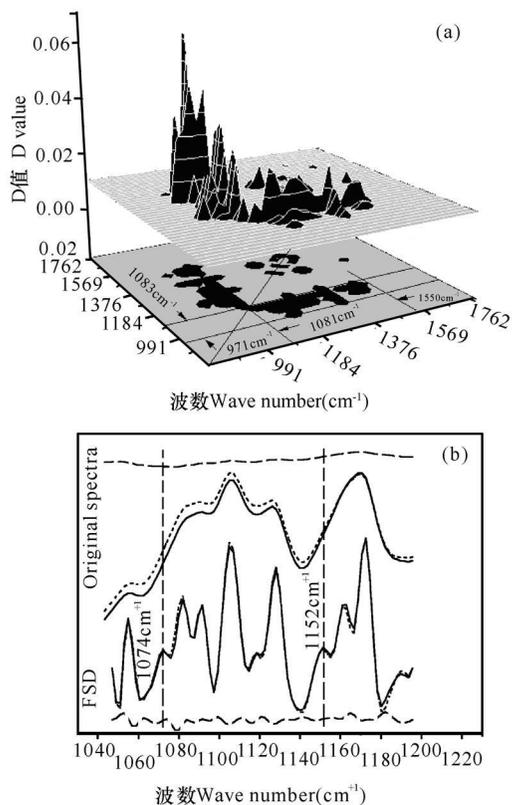


图 2 波数 $800 \sim 1780 \text{ cm}^{-1}$ 时, D 值大于零的分布(a)和波数 $1050 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 的傅里叶去卷积图谱(b)。

Fig. 2 Distribution of the D values greater than zero in range from 800 cm^{-1} to 1780 cm^{-1} (a) and the original spectra, FSD spectra and their respective difference spectra between normal and Hb H groups covering 1050 cm^{-1} to 1200 cm^{-1} range (b)

—: 正常组, —: Hb H 型地贫组, - - -: 正常组减 Hb H 的差谱。 —: Normal groups, —: Hb H groups, - - -: The difference spectra between normal and Hb H group.

由于红细胞裂解物成分复杂, 在峰的指认中, 平均光谱在波数 1074 cm^{-1} 和 1152 cm^{-1} 的峰位重叠严重(见图 2), 对隐含峰特征的提取, 还依赖于如 FSD 和二阶导数光谱等分峰技术的应用。在波数 $1040 \sim 1190 \text{ cm}^{-1}$ 内, 我们以去卷积半高度 (Bandwidth at Half Height, FWHH) 20 cm^{-1} 、分辨提高因子 2.0 对其去卷积处理以提高光谱分辨率。图 2(b)中, FSD 图谱显现出 1074 cm^{-1} 、 1152 cm^{-1} 的小肩峰, 其中 1074 cm^{-1} 主要归属磷酸二酯基团 (O-P=O) 的对称

伸缩振动^[10], 应主要来源于红细胞中大量存在的高能磷酸类化合物, 如 2, 3-二磷酸甘油酸 (2, 3-diphosphoglycerate, DPG)、NADPH 和 ATP; 而 1152 cm^{-1} 则归属碳水化合物的 C-O 的伸缩振动^[10], 应主要来自于如葡萄糖及或中间产物。成熟红细胞中, 由于线粒体和微粒体的缺失, 细胞的供能只能来源于以葡萄糖为底物的糖酵解过程, 其产物为 DPG、NADPH 和 ATP。该类高能磷酸化合物一方面用于供能与离子平衡等; 另一方面用于维持高浓度的 DPG 水平。其浓度与血红蛋白相当, 主要功能是作为血红蛋白氧亲合力的调节因子, 通过浓度调节血红蛋白对氧的结合与释放能力。而 Hb H 地贫中, 由于有效血红蛋白量减少, 为满足组织对氧的正常摄取, 红细胞通过增加葡萄糖的代谢能力, 使 DPG 在细胞内呈代偿性升高, 促使氧离曲线右移, 增强组织对氧的摄取, 从而缓解机体的缺氧状态^[11, 12]。这与彭立新等^[6]对 β -地贫的研究结果一致。

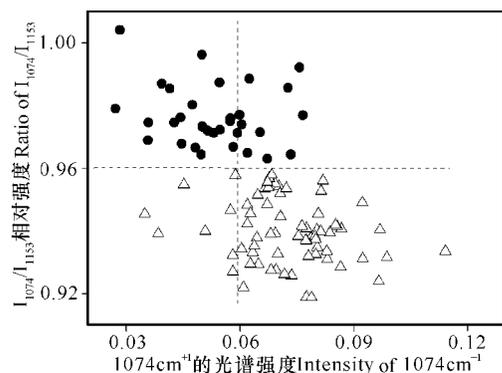


图 3 正常组与 Hb H 组的点状分布

Fig. 3 Scatter plot of normal and Hb H group.

●: Hb H 组, △: 正常组。●: Hb H group, △: Normal group.

在高波段比低波段的三角矩阵中, 最大 D 值 (0.0661) 来自于 I_{1517}/I_{1074} 的相对强度, 其正常组的相对强度显著大于 Hb H 组。在峰的指认上, 由于 1540 cm^{-1} (Amide II) 强峰所掩盖, 需要用傅里叶自卷积对其进行分峰处理。Liu (2003) 等^[9]对该峰在 α -地贫、 β -地贫与健康组的蛋白构造变化进行探讨, 认为该峰应来自于血红细胞蛋白的侧链上酪氨酸的呼吸振动 (Tyrosine ring breathing vibration)。在 α -地贫中, 血红蛋白的减少以及磷酸类化合物的增加, 均导致 I_{1517}/I_{1074} 在地贫组中其相对强度的减小, 这与 Liu 等^[9]在 β -地贫的研究一致。

波数 $2480 \sim 3600 \text{ cm}^{-1}$ 在蛋白结构解析中同样占据重要地位^[13-15]。在本研究中, 其所有比值都通过 T 检验, 均在 0.001 水平上显著, 其大于零的 D 值仅占整矩阵的 1.04%, 并呈现不对称的分布形式(见图 4(a))。其最大 D 为 0.0076, 来自于 I_{3295}/I_{3372} 相对

强度,其值在正常组中要显著大于 Hb H 组。由于该区域位于 Amide A 的 N-H 振动(3295cm^{-1})的强吸收峰之下,波形较宽,呈多峰叠加。通过对二阶导数谱的获得,可分辨出 3372cm^{-1} 处的小肩峰(见图 4 (b))。在峰的指认上, 3372cm^{-1} 常归属 O-H, 其减少的 I_{3295}/I_{3372} 值应与 Hb H 组中减少的 Amide A 相关。

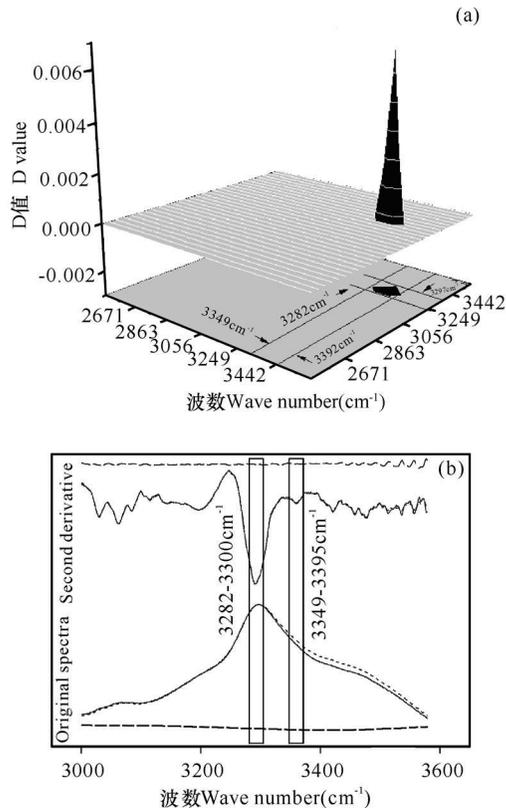


图 4 波数 $2480\sim 3600\text{cm}^{-1}$ 时 D 值大于零的分布 (a) 和波数 $3000\sim 3600\text{cm}^{-1}$ 的平均图谱与其对应的二阶导数图谱 (b)

Fig. 4 Distribution of the D values greater than zero in range from 2480cm^{-1} to 3600cm^{-1} (a) and average spectra, second derivative spectra and their respective difference spectra of normal and Hb H groups covering 3000cm^{-1} to 3600cm^{-1} range (b)

—: 正常组, —: Hb H 型地贫组, - - -: 正常组减 Hb H 的差谱。 —: Normal groups, —: Hb H groups - - -: The difference spectra between normal and Hb H groups.

2.3 主成分分析

在以上分析中,我们仅遴选了 3 个具有显著差异的相对比值,用于比较正常组与 Hb H 组间在物质组成与蛋白结构的差异。为了进一步挖掘相对比值中隐含的信息、提取主要因素,我们将主成分分析法作用于以上的相对比值。在该计算中,以 D 值为标准,设定 0.005、0.012 和 0.015 三个不同的阈值,即仅当相对比值的 D 值大于阈值时才进入相应阈值的主成分分析(Principal Components Analysis, PCA)计算。其目的是观察在主成分分析中,数据的特异性对两组样

品区分的影响。通过主成分提取,主成因子 1 与主成因子 2 用于对两组样品的区分(见图 5)。在图 5 中,两组间的区分随阈值的增加而增强。在 0.012 的阈值分析中,仅一 Hb H 样品与正常组发生混合。该结果也提示我们,在以后的检测中,将其对应的相对强度输入主成分分析中,即可区分样品,实现对地贫样品的判断。

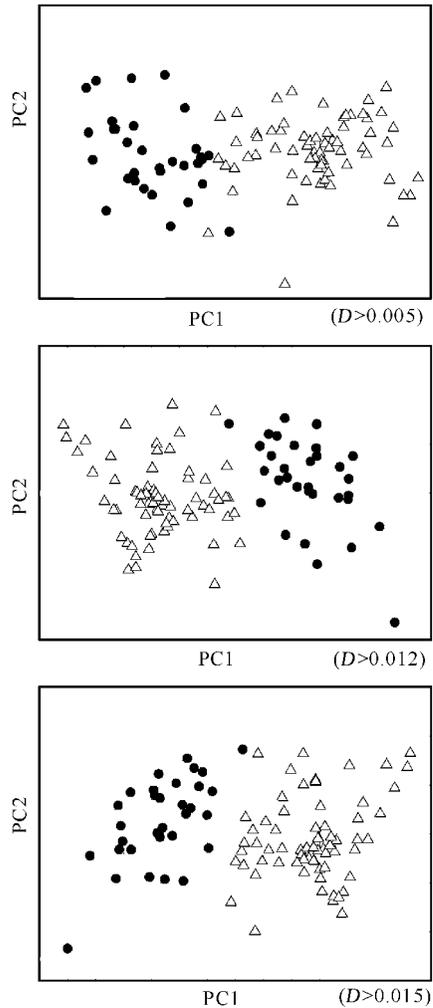


图 5 不同阈值条件下的主成分分析中主成因子 1 与主成因子 2 构成的点状分布

Fig. 5 PC1 vs. PC2 scatter plots of all samples

●: Hb H 组, △: 正常组。●: Hb H group, △: Normal group.

3 结论

通过分析,可以观察到 α -地贫组与正常组在蛋白、高能磷酸化合物以及碳水化合物的组成与结构上的差异,其主要体现在:(1)与正常组相比, I_{1074}/I_{1152} 比值在 Hb H 组中显著增加,该结果应源于 α -地贫中 DPG 的代偿性增加与碳水化合物的减少;(2)血红蛋白的减少以及磷酸类化合物的增加,共同导致

致谢:

感谢广西医科大学陈萍教授、贾文广对本实验的支持。

参考文献:

[1] Lau Y L, Chan L C, Chan Y Y, et al. Prevalence and genotypes of alpha- and beta-thalassemia carriers in Hong Kong - implications for population screening[J] . N Engl J Med 1997, 336(18): 1298-1301.

[2] Yong K N, Wadsworth D, Langlois S, et al. Thalassemia carrier screening and prenatal diagnosis among the British Columbia (Canada) population of Chinese descent[J] . Clin Genet, 1999, 55(1): 20-25.

[3] Xu X M, Zhou Y Q, Luo G X, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong Province; implications for the future health burden and population screening[J] . J Clin Pathol 2004, 57(5): 517-522.

[4] 张俊武, 龙桂芳. 蛋白与血红蛋白病[M] . 南宁: 广西科学技术出版社, 2003.

[5] Arrondo J L, Goni F M. Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy [J] . Prog Biophys Mol Biol, 1999, 72(4): 367-405.

[6] 彭立新, 王桂文, 姚辉璐, 等. 傅里叶变换红外光谱诊断地中海贫血症[J] . 分析化学, 2008, 10: 1369-1374.

[7] 彭立新, 王桂文, 姚辉璐, 等. FTIR-HATR 诊断 β -地中海贫血及其机理研究[J] . 光谱学与光谱分析, 2009, 29(5): 1232-1236.

[8] 吴瑾光. 近代傅里叶变换红外光谱技术及应用[M] . 北

京: 科学技术文献出版社, 1994.

[9] Liu K Z, Tsang K S, Li C K, et al. Infrared spectroscopic identification of β -thalassaemia[J] . Clin Chem, 2003, 49(7): 1125-1132.

[10] Zanyar M, Shazza R, Ihtesham R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues[J] . Applied Spectroscopy Reviews, 2010, 43(2): 134-179.

[11] Labotka R J, Honig G R. 31P NMR spectroscopy of erythrocytes in congenital hemolytic anemias; detection of heterogeneous erythrocyte populations and quantification of intracellular 2, 3-diphosphoglycerate[J] . Am J Hematol, 1980, 9(1): 55-65.

[12] Ting Y L, Naccarato S, Qualtieri A, et al. In vivo metabolic studies of glucose, ATP and 2, 3-DPG in beta-thalassaemia intermedia, heterozygous beta-thalassaemic and normal erythrocytes: 13C and 31P MRS studies[J] . Br J Haematol, 1994, 88(3): 547-54.

[13] Paluszkiwicz C, Kwiatek W M, Bana A, et al. SR-FTIR spectroscopic preliminary findings of non-cancerous, cancerous, and hyperplastic human prostate tissues[J] . Vibrational Spectroscopy, 2007, 43(1): 237-242.

[14] Gazi E, Dwyer J, Lockyer N P, et al. A Study of cytokinetic and motile prostate cancer cells using synchrotron based FTIR - microspectroscopic imaging[J] . Vibrational Spectroscopy, 2005, 38(2): 193-201.

[15] Eckel R, Huo H, Guan H W, et al. Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue[J] . Vibrational Spectroscopy, 2001, 27(2): 165-173.

(责任编辑: 陈小玲)

(上接第 227 页 Continue from page 227)

续表 1

Continue table 1

编号 No.	时间 Time(min)	化合物 Compounds	分子式 Formular	相对含量 Percent(%)
25	39.98	二十六烷 Hexacosane	$C_{26}H_{54}$	0.65
26	40.19	二十三烷酸 Tricosanoic acid	$C_{24}H_{48}O_2$	0.89
27	41.33	十六基环氧乙烷 Oxirane, hexadecyl-	$C_{18}H_{36}O$	2.71
28	41.93	二十四烷酸 Tetracosanoic acid	$C_{25}H_{50}O_2$	3.78
29	43.77	(角)鲨烯 Squalene	$C_{30}H_{50}$	1.65
30	43.90	二十五烷酸 Pentacosanoic acid	$C_{26}H_{52}O_2$	0.34
31	45.94	三十六烷 Hexatriacontane	$C_{36}H_{74}$	0.82

3 结论

通过毛细管气相色谱和气相色谱-质谱-计算机分析, 从田皂角醇提取物石油醚部位的油状物中检出 53 个组分, 确认出其中的 31 个成分。这些成分均为首次在该植物中报道, 为其进一步开发和利用提供了科学的资料。

参考文献:

[1] 覃迅云, 罗金裕, 高志刚. 中国瑶药学[M] . 北京: 民族出版社, 2002, 570-571.

(责任编辑: 邓大玉)