

轻型地中海贫血红细胞红外光谱分析与判别

吴忻禹¹ 张陆成² 黎永青^{1*}

1. 广西医科大学再生医学与医用生物资源开发应用省部共建协同创新中心 广西南宁 530021

2. 广西地中海贫血防治重点实验室 广西南宁 530021

摘要: 为建立简单快速的轻型地中海贫血诊断方法, 探讨了傅里叶变换红外成像系统用于轻型地中海贫血患者的红外光谱分析与判别。检测了26名轻型地贫患者与29名健康人, 每人30个红细胞的红外光谱, 并分析了其平均红外光谱差异。结果显示, (1) 轻型地贫患者在酰胺 I 带与酰胺 II 带光谱强度低于健康人, 核酸谱带强度则高于健康人; (2) 以酰胺 I 带+酰胺 II 带建立的 PLS-DA 联合模型, 能够有效区分轻型地中海贫血患者与健康人, 其 $R^2=0.738$, $Q^2=0.688$, $RMSECV=0.279$, 其灵敏度、特异性和准确率分别为 83.33%、88.89%、86.67%, 为地贫的红外光谱人群筛查提供了实验基础和理论依据。

关键词: 傅里叶变换红外光谱显微成像; 地中海贫血; 诊断模型

引言

地中海贫血 (Thalassemia), 是一种遗传性血液疾病, 其发病机制主要是由于血红蛋白的珠蛋白肽链基因丢失或突变, 造成珠蛋白肽链合成减少或完全缺失^[1]。地中海贫血根据病情的严重程度, 可分为重型、中间型和轻型。其中, 轻型地贫患者血红蛋白水平通常大于 90g/L, 一般无临床症状或轻度贫血, 容易漏诊, 导致患者有生育地中海贫血子代的风险^[2, 3]。而地中海贫血诊断的金标准基因检测因为检查时间长、成本高, 不适用于轻型地中海贫血的大人群筛查。

傅里叶变换红外 (Fourier Transform Infrared, FTIR) 技术是一种广泛应用的物质结构分析和定量分析手段。根据样品的红外光谱, 我们可以对其内部化学物质进行定性定量分析^[4]。近年来, 傅里叶变换红外成像 (Fourier Transform Infrared imaging, FTIRI) 系统的应用, 弥补了传统 FTIR 光谱技术无法对样品进行空间结构观察的不足^[5]。

在医学领域中, FTIRI 光谱技术已被用于生物样品单细胞的研究中^[5]。2019年 Vongsvivut 等人将 FTIRI 系统应用于疟疾感染红细胞的成像研究, 获得了单个细胞的高质量红外光谱图像^[6]。本研究将利用 FTIRI 系统收集单个红细胞的红外光谱并比较分析其差异, 并通过偏最小二乘法判别建立轻型地中海。

一、材料与方法

1. 实验仪器与实验样品

傅里叶变换红外光谱仪显微成像系统 (BRUKER

VERTEX 70)。轻型地中海贫血患者 (26例) 与健康人 (29例) 血液样品来自广西医科大学附属第一医院。其中, 轻型地中海贫血患者样品选取基因检测诊断为地中海贫血, 血常规血红蛋白浓度 > 90g/L 的患者。患者相关信息见于表 1。

表 1 地中海贫血患者与健康人信息

Table 1 Information of Thalassemia Patients and Healthy Individuals

	血红蛋白浓度 ± 标准差	平均年龄 ± 标准差	性别	
			男性 (人数)	女性 (人数)
地贫患者	135 ± 8	25 ± 3	9	17
健康人	144 ± 12	31 ± 5	13	16

2. 样品预处理与光谱检测

取 300 μl 外周血置于 1.5ml EP 管, 4℃, 400 g, 离心 10 min 去除上清液, 加入 600 μl 0.9% NaCl 溶液。重复该步骤三次后, 取 50 μl 样品置于 1.5ml EP 管, 加入 500 μl 0.9% NaCl 溶液后取 2 μl 均匀涂抹于基底。红外光谱仪测定扫描分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描范围为 4000–400 cm⁻¹, 扫描 32 次获得单个红细胞光谱。每个样品于显微成像系统中挑选 30 个红细胞进行采集。

3. 数据处理

使用 OMNIC 9 软件对红外光谱进行 Savitzky-Golay 平滑, 基线处理等基本光谱预处理^[7]。

二、结果与分析

1. 单个红细胞平均红外光谱对比

图 1 是轻型地贫患者与健康人单个红细胞平均红

外光谱比对图, 结合参考文献分析谱峰可以发现, 单个红细胞内的主要成分是蛋白质、脂质和核酸^[8]。二者的差异主要表现在蛋白质酰胺 I (1700–1600 cm^{-1}) 谱带、蛋白质酰胺 II (1580–1480 cm^{-1}) 谱带与核酸 (1250–1000 cm^{-1}) 谱带。表明轻型地贫患者较健康人红细胞中蛋白质浓度减少, 而核酸浓度增高, 这可能是源于轻型地中海贫血患者血液中血红蛋白的减少以及 DPG 的代偿性增加共同导致^[9]。

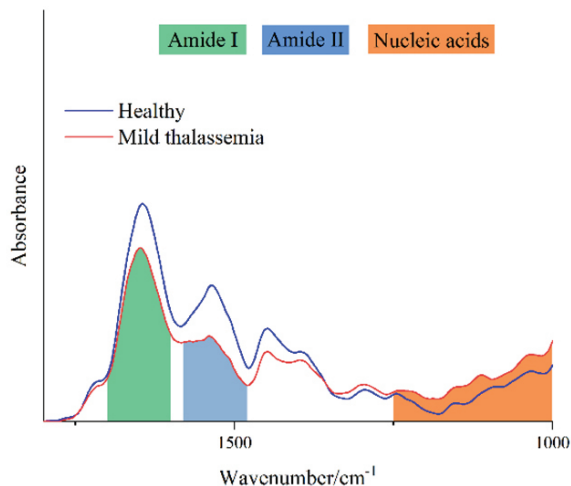


图1 轻型地贫患者与健康人单个红细胞特征红外谱带
Figure1 Infrared band of single red blood cell characteristics between mild thalassemia and healthy people

2. 血红蛋白浓度变化

1700–1600 cm^{-1} 的谱带主要来源于血红蛋白的特征吸收。其中 α 螺旋结构位于 1643 cm^{-1} 处, C–N 官能团位于 1529 cm^{-1} 处, 是酰胺 I 带与酰胺 II 带的主要特征峰。轻型地贫患者较健康人 1700–1600 cm^{-1} 的谱带强度下降, 表明其血红蛋白浓度下降。然而轻型地贫患者外周血样品血红蛋白浓度较健康人并无太大变化, 这可能是由于轻型地贫患者长期处于轻度贫血的状态下, 红细胞代偿性

增多, 从而导致全血中血红蛋白浓度总体变化不大, 但于单个红细胞中, 其浓度变化明显。

3. 磷酸化合物变化

1250–1000 cm^{-1} 谱带与核酸 PO_2^- 中 1243 cm^{-1} 的 P=O 不对称伸缩振动和 1079 cm^{-1} 的 P=O 对称伸缩振动相关。轻型地贫患者红细胞中磷酸浓度的下降可能是由于其长期轻度贫血状态下, 红细胞中葡萄糖代谢活跃, 从而造成 DPG 在红细胞内代偿性升高, 以增强红细胞对 O_2 的摄取。

4. 单个红细胞平均红外光谱的偏最小二乘法判别分析

综合以上分析, 将 26 名轻型地贫患者与 29 名健康人平均红细胞红外光谱分为训练集 (20 份轻型地贫样本与 20 份健康样本) 与测试集 (6 份轻型地贫样本与 9 份健康样本), 结合交叉检验对三个特征谱带进行 PLS–DA 分析。 R^2 和 Q^2 是评价 PLS–DA 模型性能的两个指标。其中, R^2 用于评估模型的拟合程度, R^2 值接近 1, 则表明模型对数据拟合效果好。 Q^2 则是用于评估模型在未知或新数据上的预测表现。若 Q^2 值为 1, 则表示模型具有卓越的预测能力; 若值为 0, 则意味着预测能力与随机预测相当; 若出现负值, 则表明预测能力不佳。

交叉验证是一种广泛应用于模型选择和性能评估的技术。交叉验证均方根误差 (Root Mean Square Error of Cross–Validation, RMSECV) 是用于衡量模型预测精度的指标, 其值越低, 通常意味着模型的预测性能越好。

表 2 显示了 PLS–DA 的训练和测试结果。可以看到在 PLS–DA 模型下, 各特征谱带判别模型均具有一定的分类效果, 其中酰胺 I + 酰胺 II 带模型 $R^2=0.738$, $Q^2=0.688$, RMSECV=0.279。该模型的测试结果显示了 83.33% 的灵敏度、88.89% 的特异性和 86.67% 的准确率, 相较于单个特征光谱展现了更高的判别效率。

结果表明, 通过红细胞红外光谱测量, 对酰胺 I +

表 2 单个红细胞光谱数据在 PLS–DA 模型下的训练和测试结果

Table 2 Training and testing results of single red blood cell samples' spectrum under the PLS–DA model

	R^2	Q^2	RMSECV	Sensitivity	Specificity	Accuracy
酰胺 I 带	0.71	0.697	0.275	83.33%	66.67%	73.33%
酰胺 II 带	0.595	0.579	0.324	83.33%	66.67%	73.33%
核酸谱带	0.499	0.294	0.433	66.67%	66.67%	66.67%
核酸+酰胺 II 带	0.631	0.578	0.323	83.33%	66.67%	73.33%
核酸+酰胺 I 带	0.721	0.668	0.287	83.33%	77.78%	80.00%
酰胺 I + 酰胺 II 带	0.738	0.688	0.279	83.33%	88.89%	86.67%
三特征谱带联合	0.699	0.657	0.291	83.33%	66.67%	73.33%

酰胺Ⅱ带联合谱带建立PLS-DA模型,能够在单个红细胞样本中区分轻型地中海贫血患者和健康人,相应的PLS-DA结果显示了83.33%的灵敏度,88.89%的特异性和86.67%的准确率。

三、讨论

在傅里叶变换红外成像系统中,通过对单个红细胞红外光谱的采集与分析。参考相关文献,应用谱带面积积分分析其蛋白质谱带与核酸谱带强度变化,其轻型地中海贫血患者血红蛋白浓度下降的结论与相关研究结果相同^[10]。同时,轻型地贫患者红细胞中磷酸谱带红外光谱强度增加,提示其磷酸化合物浓度的下降,这与红细胞内DPG出现代偿性增加相关,这也与郑元涛等人对 α 型地中海贫血患者全血样品红外光谱的研究结果吻合^[11]。

本研究使用PLS-DA对蛋白质酰胺Ⅰ、酰胺Ⅱ带与核酸谱带三个特征谱带建立轻型地中海贫血诊断模型。其中,酰胺Ⅰ+酰胺Ⅱ带联合模型83.33%的灵敏度,88.89%的特异性和86.67%的准确率说明该模型相较于其他单一特征谱带模型与多谱带联合模型对轻型地中海贫血患者的区别效果更好。该结论表明能够通过傅里叶变换红外成像系统对轻型地中海贫血患者与健康人进行较好的区分,展现出红外光谱在地中海贫血大人群筛查中的巨大潜力。

参考文献

[1] KATTAMIS A, KWIATKOWSKI J L, AYDINOK Y. Thalassaemia [J]. Lancet, 2022, 399(10343): 2310-24.
[2] 李莉艳, 王志坚. 妊娠期地中海贫血的管理与遗传咨询[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2022, 38(12):

1159-63.

[3] 胡莹, 孙强. 红细胞参数在轻型地中海贫血和轻度缺铁性贫血诊断中的应用[J]. 实用医技杂志, 2023, 30(11): 778-81+837.

[4] 张小青, 孙小亮, 潘庆华, et al. 衰减全反射傅里叶变换红外光谱技术的临床应用研究进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(02): 408-11.

[5] ANDREW CHAN K L, KAZARIAN S G. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells [J]. Chem Soc Rev, 2016, 45(7): 1850-64.

[6] VONGSVIVUT J, PEREZ-GUAITA D, WOOD B R, et al. Synchrotron macro ATR-FTIR microspectroscopy for high-resolution chemical mapping of single cells [J]. Analyst, 2019, 144(10): 3226-38.

[7] 朱思聪, 高西娅, 张朱珊莹, et al. 红外光谱数据集划分比例及预处理方法研究[J]. 分析化学, 2022, 50(09): 1415-29.

[8] 丘家杵, 阮萍, 雍军光, et al. 健康人血红蛋白紫外可见吸收光谱和FTIR光谱[J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(05): 1425-30.

[9] 杨锡恩. 肝癌及肺癌患者血清的红外与拉曼光谱研究[D], 2022.

[10] 彭立新, 王桂文, 姚辉璐, et al. 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(05): 1232-6.

[11] 郑元涛, 彭立新, 姚辉璐, et al. FTIR-HATR诊断 α -地中海贫血[J]. 广西科学, 2011, 18(03): 228-32.