

·论 著·

先天性厚甲症-I型患者及正常人指甲的红外光谱对比分析

吕永梅¹, 梁燕华², 杜卫东³

1.安徽医科大学第二附属医院皮肤科,安徽 合肥 230601; 2.南方医科大学南方医院皮肤科,广东 广州 510515;

3.安徽医科大学皮肤病学国家重点实验室培育基地,安徽 合肥 230032

摘要:目的 应用傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared, FTIR)技术和曲线拟合方法,比较先天性厚甲症-I型(PC-1)患者指甲与正常人指甲在红外光谱参数和蛋白质二级结构方面的差异。方法 收集来自3个家系的PC-1患者手指甲7例和正常人手指甲10例,FTIR分析采用溴化钾压片方法进行;红外光谱酰胺I带采用PeakFit v4.12软件处理,求取蛋白质各二级结构百分含量。结果 在红外光谱波数为3 000~1 000 cm⁻¹的范围内,PC-1患者指甲与正常人指甲的光谱参数,如峰位置、峰强度和峰形状等均存在明显差异;另外,与正常人指甲相比,患者指甲蛋白质二级结构最为显著的变化是 α -螺旋的增加和 β -折叠的减少,这显示PC-1患者指甲具有更高的稳定性。结论 PC-1患者和正常人指甲在光谱参数和蛋白质二级结构方面存在显著的差异,不仅为阐明PC-1的生化机制及其治疗提供了微观结构方面的参考,同时也表明红外光谱技术在研究人类皮肤疾病方面有着好的应用前景。

关键词: 傅里叶变换红外光谱;先天性厚甲症;指甲;光谱参数;二级结构

中图分类号: R758.7; O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2014)6-648-05

Comparative FTIR spectra analysis for finger nails of normal donors and patients with type I
pachyonychia congenita

LV Yong-mei, LIANG Yan-hua, DU Wei-dong

1. Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, Anhui, P.R.China;

2. Department of Dermatology, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, P. R.China

3. State Key Laboratory Incubation Base of Dermatology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, P. R.China

Abstract: **Objective** To apply Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy technique combined with a curve-fitting method to compare the differences between normal donor and PC-1 patient fingernails in the spectral parameters and secondary structures of protein. **Methods** Finger nail samples from ten normal donors and seven PC type 1 (PC-1) patients in three pedigrees with PC were collected. Spectral analyses of fingernail samples were accomplished by a Nicolet 6700 FTIR using KBr pellet method. The amide I bands were treated by employing PeakFit v4.12 software to obtain the contents of the protein secondary structures. **Results** In the frequency region 3 000 to 1 000 cm⁻¹, there are obvious differences between FTIR spectra of them in spectral parameters such as peak location, intensity and band shape etc. Furthermore, compared with normal counterparts, the most prominent discriminating changes in the protein secondary structures of PC-1 nails were an increase of α -helices and decrease of β -sheet. This may suggest a higher stabilization in protein of PC-1 nails. **Conclusion** The present results not only might provide a new reference on the microstructure for further clarifying of the biochemical pathways of the abnormality of PC nails, but also suggest the potential use of IR spectroscopy technique as a powerful tool for the analysis of skin diseases.

Key words: FTIR; Pachyonychia congenita; Fingernail; Spectral parameters; Secondary structure

红外光谱技术作为一种方便、快速的分析手段,已经越来越成为研究和检验生物组织细胞成分和结构的重要工具,该技术不仅可以评价生物分子中存在的蛋白质、脂质、碳水化合物和核酸的结构,而且也能评估它们因疾病而产生的化学结构变化,从而可以为监测疾病过程的演化和预测演化过程中的化学路径提供多种研究信息^[1-2]。近年来,应用红外光谱方法检验人体组织细胞变化的文献相继被报道。童义平等^[3]比较了食道癌及相应正常组织的红外光谱差异,并对

病变组织引起的红外光谱图的变化进行了解释。董勤等^[4]利用红外光谱对鼻咽癌患者指甲进行了辨别。Sakudo等^[5]和Farhan等^[6]利用傅里叶变换红外光谱(FTIR)方法,分别研究了糖尿病和慢性疲劳症患者指甲蛋白质二级结构的变化。然而,关于红外光谱分析技术在人类皮肤疾病研究方面的应用还鲜有报道。

先天性厚甲症(Pachyonychia congenita, PC)是一种罕见的常染色体显性遗传性皮肤病^[7]。目前,还没有找到有效的治疗方法^[8]。该病虽为一种少见病,但

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81201226)

作者简介:吕永梅(1976~),女,医学博士,主治医师,研究方向:遗传性皮肤病、自身免疫性皮肤病方面的研究。

对患者的危害性很大。临床上主要分为I和II两型,其中I型表现为厚甲、口腔黏膜白斑、掌跖角化、掌跖痛性水疱或溃疡、多汗、少毛或斑秃等;II型表现为厚甲、掌跖角化、胎生牙、多发性脂囊瘤和毛发异常等^[9]。虽然人们已经从遗传学的角度对其致病基因和发病机制进行了广泛的研究,但是该病发生后所引起的指甲蛋白质结构变化信息还并不清楚。为此,本文利用高分辨率FTIR仪对7个PC-1型患者指甲和10个正常人的指甲进行了红外光谱的对比研究,并分析了蛋白的二级结构的变化。

1 材料与方法

1.1 实验样品 收集安徽医科大学第一附属医院皮肤科PC-1型患者7例(为作者在该医院学习期间收集),这7例患者分别来自3个不同家系,年龄从1~60岁。所有患者均经过皮肤科医师确诊,并已发现一个与PC相关基因的突变^[10]。10个正常人指甲取自不同年龄、不同性别,正常的学生和教师。用二次蒸馏水将指甲洗干净后,在37℃下干燥,用指甲挫刀将指甲挫成粉末,并置于干燥和消过毒的塑料袋中密闭保存,备用。

1.2 FTIR分析和数据处理 取3mg样本,置于玛瑙研钵中与300mg溴化钾充分研磨至均匀,压片。在Nicolet 6700型FTIR仪(美国热电公司)上进行测试,DTGS检测器,分辨率为4cm⁻¹,扫描64次进行光谱累加。FTIR光谱图用Omnice 8.0软件处理分析;酰胺I带数据用PeakFit v4.12软件进行基线校正、二阶导数、傅里叶去卷积及曲线拟合处理,求得指甲蛋白质中各二级结构的百分含量。

2 结果

2.1 光谱参数的变化 典型的PC-1患者指甲与正常人指甲的FTIR见图1。图1(a)显示,正常人指甲在3000~2800 cm⁻¹波数范围内存在4个吸收峰,其中2960.50 cm⁻¹和2874.72 cm⁻¹处的吸收是由于指甲角蛋白膜脂中甲基团(CH₃)的反对称伸缩振动 $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ 和对称伸缩振动 $\nu_s(\text{CH}_3)$ 所引起的;而在2928.29 cm⁻¹和2854.77 cm⁻¹处的吸收则归因于亚甲基团(CH₂)的反对称伸缩振动 $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ 和对称伸缩振动 $\nu_s(\text{CH}_2)$ ^[11];然而,PC-1型患者的上述4个吸收峰位置分别为2958.44 cm⁻¹、2872.80 cm⁻¹、2921.28 cm⁻¹和2851.20 cm⁻¹,即均向低波数发生了位移,而且相同的现象在7例PC-1型样品中均观察到。另外,从图1(a)中也可以看出,相比正常人指甲,患者指甲CH₃与CH₂的对称和反对称伸缩振动强度的比值,即 $I_s(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$ 和 $I_{as}(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$ 值明显降低。

图1(b)和图1(c)显示了指甲角蛋白核酸分子中磷酸二酯基团(PO₂⁻)的对称伸缩振动 $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ 和反对称伸

缩振动 $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ 模式的变化,从中可以看出正常人指甲的 $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ 谱峰位于1077.54 cm⁻¹附近, $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ 谱峰位于1237.97 cm⁻¹附近,而患者指甲的相应峰则向高波数移动,分别为1079.33 cm⁻¹和1242.15 cm⁻¹。

图1(d)表明正常人指甲CH₃和CH₂弯曲振动谱带 $\delta(\text{CH}_3)$ 和 $\delta(\text{CH}_2)$,分别位于1395.45 cm⁻¹和1450.88 cm⁻¹附近。然而,在所有PC-1型患者指甲样品中, $\delta(\text{CH}_3)$ 稍微向高波数位移,而 $\delta(\text{CH}_2)$ 则向高波数发生了较大的位移。

由图1(e)可知,正常指甲样品C-O键的伸缩振动发生在1173.29 cm⁻¹附近;而PC-1型指甲样品的这一吸收则位于大约1171.60 cm⁻¹处,其相对吸收强度也显著增强,这一现象在所有的正常人指甲样品和患者指甲样品中均被观察到。

由图1(f)可看出,正常指甲的红外光谱图中,在大约1654.99 cm⁻¹和1534.49 cm⁻¹处存在两个强的吸收峰,分别被称为酰胺I带(Amide I band)和酰胺II带(Amide II band)^[12]。在本研究中,我们发现与正常指甲相比较,虽然PC-1型患者指甲酰胺I带的位置基本没有变化,但是酰胺II带却明显向高波数位移,且这两谱带的峰形都明显变尖。

2.2 蛋白质二级结构的变化 图2为红外光谱的酰胺I带经PeakFit v4.12软件处理后得到的9个子峰,其中,1613~1637 cm⁻¹和1682~1689 cm⁻¹为 β -折叠,1645~1662 cm⁻¹为 α -螺旋,1662~1682 cm⁻¹为 β -转角,1637~1645 cm⁻¹为无规则卷曲^[13]。根据曲线的拟合结果,由每一个子峰的峰面积,可以得到各二级结构的含量。10个正常人指甲和7个PC-1患者指甲蛋白质二级结构含量的平均值及其标准偏差如表1所示。PC-1型患者指甲蛋白质各二级结构含量分别为: α -螺旋33.15%, β -折叠29.36%, β -转角21.71%,无规则卷曲15.78%;而正常人指甲蛋白质各二级结构含量则分别为: α -螺旋30.35%, β -折叠32.98%, β -转角21.41%,无规则卷曲15.26%。

表1 正常人和PC-1患者指甲蛋白质二级结构含量比较

Table 1 Comparison of content of secondary structure of protein between normal and PC-1 nails

子峰/cm ⁻¹ Sub-peaks	二级结构(%) Secondary structures	正常人指甲 (n=10) Normal nails	PC-1患者指甲 (n=7) PC-1 Nails
1613,1620, 1630,1688	β -折叠 β -sheet	32.98±1.09	29.36±0.51
1639	无规则卷曲 Random coil	15.26±0.29	15.78±0.28
1649,1659	α -螺旋 α -helix	30.35±0.47	33.15±0.66
1668,1677	β -转角 β -turn	21.41±0.93	21.71±0.64

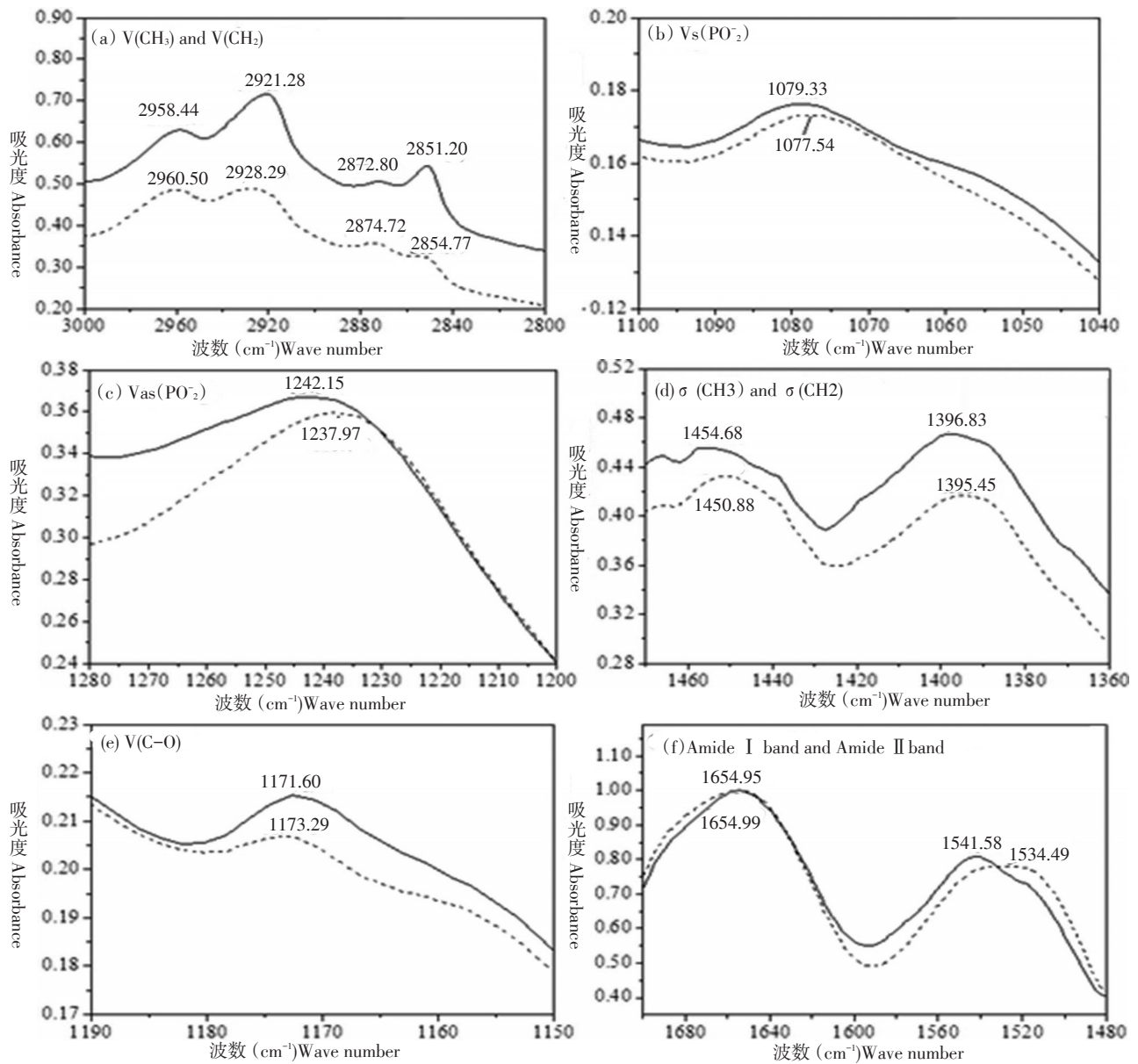


图1 PC-1型患者指甲和正常人指甲的傅立叶变换红外光谱图(—PC-1指甲, ----正常指甲)

Fig.1 FTIR spectra of a PC-1 nail(—) and a normal nail(----)

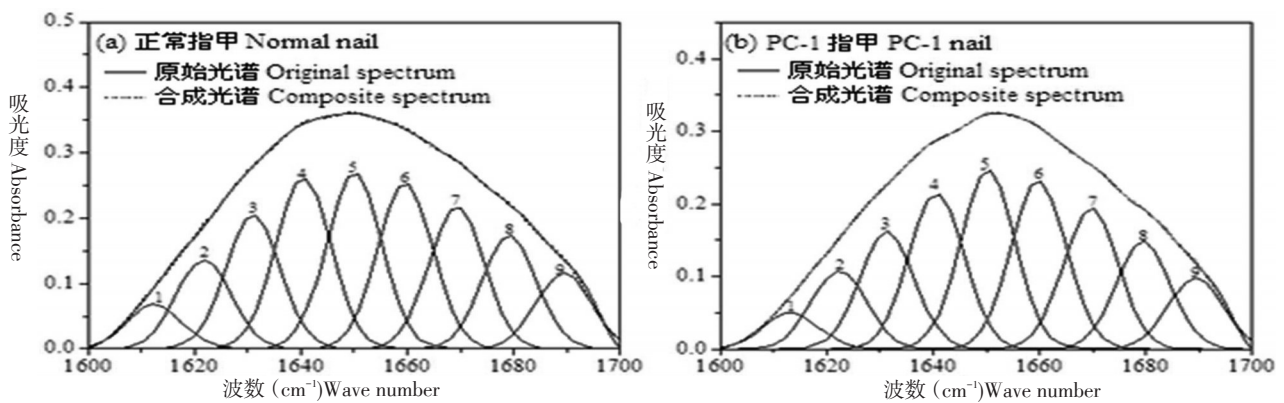


图2 正常人指甲和PC-1患者指甲酰胺I带的原始光谱和合成光谱

Fig 2 Amide I region (original and composite) of FTIR spectra of nails from a normal donor and a PC-1 patient

3 讨论

人类的指甲主要由坚硬的 α -角蛋白组成^[14],因此,指甲的红外光谱具有蛋白质的光谱特征^[5-6]。红外光谱对比研究表明,二者谱带的频率、强度、形状等光谱参数均存在较为明显的差异。由于在FTIR光谱图中波数大于 3300 cm^{-1} 和波数小于 1000 cm^{-1} 的吸收峰容易受到 H_2O 的羟基伸缩振动(3300 cm^{-1})和 CO_2 弯曲振动(667 cm^{-1})的红外吸收影响,而指甲中核酸、蛋白质、脂类、碳水化合物等主要振动谱带均集中在 $3000\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ 范围内^[2],所以本文重点分析该范围内的振动谱带的变化。

指甲中 CH_2 基团伸缩振动谱带反应出膜脂分子内碳氢链构象的有序化程度,其波数增加反映出膜脂碳氢链旁式构型增多^[15]。因此,我们的上述观察结果显示,PC-1患者指甲膜脂中碳氢链中旁式结构有明显降低。另外,在红外光谱中,吸收峰的强度依赖于分子中化学键偶极距的变化,偶极距的变化越大,吸收峰的强度越强;在材料和基团相同的情况下,吸收峰的强度与基团的含量呈现正相关^[16]。患者指甲的 $I_s(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$ 和 $I_{as}(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$ 值明显降低,表明PC-1型患者指甲中 CH_3 基团有更低的含量,而 CH_2 基团则有更高的含量。

Wong等^[17]在采用红外光谱研究人体组织时认为, PO_2^- 伸缩振动主要来自细胞中核酸的贡献,其波数的改变反映了核酸骨架上磷酸二酯基团氢键结构的变化。通常在没有氢键的情况下, $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ 位于 1240 cm^{-1} 以上,完全氢键化后, $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ 位于 1220 cm^{-1} 。因此,我们的结果表明PC-1型患者指甲样品中核酸骨架上 PO_2^- 中氧原子形成氢键的程度有所变弱。

疾病的影响导致了指甲角蛋白膜脂分子 CH_3 和 CH_2 弯曲振动谱带的高波数位移,因此,PC-1患者指甲膜脂中亚甲基链的无序状态较正常人的增大^[14,15]。

在生物组织中,C-O键的伸缩振动谱带通常是较弱的,其主要来自于蛋白质分子中的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的残基C-O伸缩振动^[2]。指甲的生理性病变更通常会导致其蛋白质中氢键结构的变化,氢键的存在会引起参与形成氢键基团的红外吸收向低波数移动。PC-1型指甲样品的 $\nu(\text{C-O})$ 向低波数位移,且吸收强度增强,这一现象表明PC-1患者指甲中的C-O键所处的环境发生了明显的变化,而且C-O键形成氢键的能力有所增强。

酰胺I带主要由C-O键的伸缩振动所引起,直接与指甲蛋白质的骨架构型相关;而酰胺II带则与N-H键的弯曲振动或C-N键的伸缩振动相关。酰胺I带通常被认为是蛋白质二级结构 α -螺旋, β -折叠, β -转

角和无规则卷曲的重叠,其峰形反映了蛋白质二级的含量^[18]。PC-1型患者指甲酰胺I带峰形的变化暗示了蛋白质二级结构发生了显著的变化。

我们进一步的蛋白质二级结构分析显示:PC-1患者指甲蛋白质二级结构最为显著的变化是 α -螺旋的增加和 β -折叠的减少。坚硬的 α -角蛋白是一种纤维状的蛋白质,其中含有丰富的 α -螺旋,而 α -螺旋能够对蛋白质结构起稳定作用^[5,14]。因此,在PC-1型患者指甲蛋白质中, α -螺旋的增加或许导致了其蛋白质的稳定性升高,这种高的稳定性可能与PC-1型指甲的增厚、硬化和角质化等临床表现相关。

综上所述,PC-1型患者及正常人指甲的光谱参数和蛋白质二级结构均存在显著差异,这些差异可以反映出PC-1型指甲组织细胞中分子结构、构象和排列状态的变化信息,而分子结构上的改变是导致PC-1型指甲一些临床表现的基本原因。本文的研究结果为进一步阐明PC-1型疾病发生的化学机制及其治疗提供了微观结构方面的参考,同时也表明红外光谱技术在研究人类皮肤疾病方面有着美好的前景。

参考文献

- [1] Komalkumar J, Devi Prasad AG. Fourier Transform Infrared Spectroscopy an Advanced Technique for Identification of Biomolecules[J]. Drug Invention Today, 2012, 4(12):616-618.
- [2] Rehman IU, Movasaghi Z, Rehman S. Vibrational Spectroscopy for Tissue Analysis[M]. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2012.
- [3] 童义平, 林燕文, 肖育龙,等.傅里叶变换红外光谱对食道癌及相应正常组织的研究[J]. 分析化学, 2002, 30(6): 726-728.
- [4] 董勤,刘刚,刘天惠.鼻咽癌患者指甲的红外光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004,24(12):1543-1545.
- [5] Sakudo A, Kuratsune H, Kato YH,et al. Secondary structural changes of proteins in fingernails of chronic fatigue syndrome patients from Fourier-transform infrared spectra[J]. Clin Chim Acta, 2009, 402(1-2):75-78.
- [6] Farhan KM, Sastry TP, Mandal AB. Comparative study on secondary structural changes in diabetic and non-diabetic human finger nail specimen by using FTIR spectra[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(3-4): 386-389.
- [7] Jadassohn VJ, Lewandowski F. Pachyonychia congenita. In : Neisser A, Jacobi E, editors. Ikonographia dermatologica: Keratosis disseminata circumscriptum (follicularis). Tylomata. Leukokeratosis linguae[M]. Berlin, Urban and Schwarzenberg 1906. Quoted by Smith DM, Jones KL. Pachyonychia congenita. In : Recognizable patterns human malformation 3rd ed. WB Saunders Company: Philadelphia; 1982.
- [8] Goldberg I, Fruchter D, Meilick A, et al. Best treatment practices for pachyonychia congenita[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013, doi: 10.1111/jdv.12098.
- [9] Leachman SA, Kaspar RL, Fleckman P,et al. Clinical and pathological features of pachyonychia congenita[J]. J Invest Dermatol Symp Proc 2005,10:3-17.