

• 综 述 •

拉曼光谱分析技术在肿瘤诊断中的研究进展*

沈阳洋^{1,2}, 崔 凯¹综述, 李 胜^{1,3,△}审校

(1. 山东省肿瘤防治研究院, 山东济南 250117; 2. 济南大学医学与生命科学学院, 山东济南 250200;

3. 山东省医学科学院, 山东济南 250062)

关键词: 拉曼; 光谱分析; 肿瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.22.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)22-3287-03

1928 年印度物理学家 Raman 发现拉曼光谱, 用于研究分子振动及分析物质内部结构。经过引入激光光源、提高微弱信号检测技术并结合计算机, 拉曼光谱分析技术在医学、生物学、化学、药学、物理学、宝石鉴定、矿物检测等诸多领域取得很大进展^[1-6]。近 20 年来, 随着拉曼光谱技术的持续改进, 以及其自身高精度、高制动化、不用任何处理等优点令它在生物医学领域迅速发展。特别是在肿瘤诊断中得到广泛应用^[7], 可以对固态或液态的组织、细胞、蛋白质、核酸等样本进行检测分析。

1 拉曼光谱技术概述

当单色入射光作用于分子时可发生弹性与非弹性 2 种碰撞。弹性碰撞时, 入射光光子运动方向改变而频率不变, 它与分子间没有交换能量, 这种散射称为瑞利散射。非弹性碰撞是指光子与分子之间碰撞时交换了能量, 光子在改变运动方向的同时将一部分能量传递给分子或吸收了分子的振动或转动能量, 使光子频率受到改变, 这就是拉曼散射。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。也就是说, 分子的转动及振动能级的变化, 可以使散射光与入射光的频率发生变化。因此, 不同物质间由于其内部分子结构不同而导致拉曼光谱也不同^[8-9]。拉曼光谱仪主要由样本台、控制器(聚焦入射光)、开关(激光与白光的切换)、滤光片(过滤瑞利散射)、观察标本图像(CCD1)、观察标本拉曼散射(CCD2)构成。其检测技术主要是通过一定波长的激光聚焦标本后一方面可通过 CCD1 采集样本图像, 另一方面可由滤光片过滤瑞利散射并由 CCD2 收集拉曼散射的过程。拉曼光谱技术能够以不同分子间的振动光谱区分不同的结构。比如蛋白质、脂肪、糖类及核酸因为结构不同, 它们各自的拉曼光谱也不同。而当组织中某种物质浓度发生变化时, 其拉曼光谱也会表现出差异。癌变都是从分子阶段的突变开始, 如基因的突变导致核酸的改变进而导致其编码的蛋白质的改变, 进而组织中脂类及碳水化合物成分的改变, 都归结于各生物分子的构型、构象及各成分的构成比的变化。细微的突变在早期往往没有临床表现, 并且常规手段无法检测出这些变化。而拉曼光谱技术通过分析光谱物质组成及浓度变化来推测生物内部分子的细微变化。这项技术已成为诊断早期癌症的潜在途径。

2 拉曼光谱技术在肿瘤诊断中的应用

2.1 肿瘤组织诊断的应用 拉曼光谱技术因其对样本的无损害性及无需对样本预处理等优点, 较早应用在肿瘤组织与正常组织的鉴别诊断。

(1) 在皮肤癌的研究中, Nijssen 等^[10]在 850nm 激光器下,

分别照射 15 份基底细胞癌组织和正常皮肤进行照射, 并分析相应拉曼光谱。对于两者的鉴别其灵敏度和特异度分别为 100%、93%, 能较好鉴别两者性质。(2) 在头颈肿瘤的研究中, Lau 等^[11]对鼻咽癌组织和正常组织的拉曼光谱进行分析, 分别发现在 1 290~1 320、1 420~1 470、1 530~1 580 cm^{-1} 等 3 处的波数差异有统计学意义($P>0.05$)。Li 等^[12]以 1 064 nm 激发光, 分别照射口腔癌、口腔白斑及正常口腔黏膜各 60 例, 对比 3 类拉曼光谱发现, 相对于正常口腔黏膜口腔癌和白斑组织中的蛋白质、核酸及脂类的浓度均不同程度升高。通过分类模型分析, 3 种组织间拉曼光谱显著不同, 其中口腔癌与正常口腔黏膜的鉴别, 其准确率、特异性及灵敏度均超过 97%。(3) 在乳腺癌的研究中, Abramczyk 等^[13]在 514 nm 激光器下检测了 67 例患者乳腺组织的拉曼光谱, 发现一些正常乳腺组织中特有的光谱带: 类胡萝卜素的 C-C、C=C 键、脂质带等。并且发现恶性乳腺组织的荧光光谱明显高于正常乳腺组织和良性乳腺组织。在乳腺癌显微拉曼光谱的研究中, 与正常乳腺组织相比, 癌变组织的核酸骨架磷酸离子 $\text{vs}(\text{PO}_2^-)$ 、蛋白质酰胺 I 和酰胺 III、氨基酸残基的 C-O 特征谱线均发生了位移且强度发生了变化。Saha 等^[14]用便携式拉曼光谱仪检测了 159 份新鲜乳腺穿刺活检组织, 并分析光谱, 组织中的 I 类钙化的主要成分草酸钙的峰值位于 912 cm^{-1} 和 1 477 cm^{-1} , II 类钙化的主要成分羟磷灰石的峰值主要位于 960 cm^{-1} , 并根据钙化灶不同成分鉴别肿瘤性质。(4) 在肺癌的研究中, Hiroya 等^[15]利用近红外拉曼光谱检测甲醛浸泡的肺癌组织, 结果显示肺癌组织在 1 610 cm^{-1} 的拉曼特征峰的强度明显高于正常组织, 为肺癌快速而简便的诊断提供了方向。(5) 在胃癌的研究中, Chen 等^[16]对比分析胃健康黏膜和癌变黏膜的拉曼光谱。结果显示: 特征峰 1 444、1 555、1 660、1 098 cm^{-1} 等在胃癌组织中发生了移位, 平均位移 $(2.57 \pm 1.28) \text{cm}^{-1}$, 以红移为主; 癌变组织中相对峰强比 $\text{I}_{1087} \text{cm}^{-1} / \text{I}_{1027} \text{cm}^{-1} \geq 1.87$, 其区别胃癌和正常胃黏膜组织的准确率、灵敏度和特异度分别为 87.1%、83.3%、89.5%; 1 262、1 586 cm^{-1} 的增强表明胃癌组织中的表征蛋白质增加, 1 172 cm^{-1} 的降低表明脂质减少。拉曼光谱在胃癌的早期筛查中体现出了良好前景, 它不仅可以区分胃癌组织与正常组织, 而且可以探测癌变相关的分子生化改变。(6) 在膀胱癌的研究中, Wang 等^[17]在对膀胱癌与正常膀胱黏膜组织的研究中发现膀胱癌与正常膀胱组织的拉曼光谱存在明显差异。对膀胱癌诊断的灵敏度、特异度分别为 86.7%、87.5%。Draga 等^[18]首先利用微光纤探针进行了 RS

* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2011CB504302)。 作者简介: 沈阳洋, 男, 硕士研究生在读, 主要从事肿瘤性质鉴别研究。 △ 通讯作者, E-mail: drlisheng@sohu.com。

的体内试验,他们利用内镜的活检工作道进行膀胱癌与正常膀胱组织拉曼光谱的检测,鉴别 2 者时得到了 85% 的灵敏度和 79% 的特异度。

综上所述,在肿瘤组织的鉴别诊断中拉曼光谱技术已经得到了很好的应用,并且通过拉曼光谱能够较方便、快捷地鉴别良恶性肿瘤,指导临床进一步治疗。

2.2 肿瘤病理切片诊断的应用 随着拉曼光谱技术在各系统肿瘤组织鉴别诊断中优势的体现,其很快被用于肿瘤病理切片上。Eoghan 等^[19]探索了病理切片过程中冷冻、甲醛固定、石蜡包埋和脱蜡等对组织拉曼光谱的干扰,结果表明冷冻和甲醛固定有它们的特征峰。但经过实验结果分析后得出,通过拉曼光谱鉴定肿瘤病理切片中组织良恶性的方法是可行的,并且由于组织病理切片易获取,且保存时间长的优点,使拉曼光谱更加便捷地获取肿瘤信息。

目前拉曼光谱较多应用于乳腺癌的病理切片诊断中。研究发现细胞核上的拉曼峰 860 cm^{-1} 处较其他位置明显并出现明显蓝移;并且在 1610 cm^{-1} 与 1525 cm^{-1} 处的峰值比能区别乳腺癌与正常乳腺组织,以此提出判断乳腺组织是否癌变的标准即: $I_{1610\text{ cm}^{-1}}/I_{1525\text{ cm}^{-1}}$ 是否大于 1.015。Chowdary 等^[20]研究发现在乳腺正常组织、纤维腺瘤、浸润性导管癌中脂肪带(1301 、 1440 cm^{-1}),胶原带(1246 、 1271 、 1671 cm^{-1})和核酸带(1340 、 1480 cm^{-1})都出现了特征峰,并且通过曲线拟合的方法可以将 3 者加以区别。

2.3 对肿瘤细胞特征变化的研究 在肿瘤组织与病理切片的研究中,由于标本中间质成分或标本的甲醛固定、石蜡包埋等影响并不能准确的分析肿瘤细胞内核酸、蛋白质、脂类等浓度及变化,因此引入了单细胞拉曼光谱技术。

(1)以乳腺癌为例,相关研究表明乳腺癌细胞在癌变过程中 DNA 磷酸根骨架的断裂而表现为 DNA 磷酸骨架峰 782 、 810 cm^{-1} 消失, 1084 cm^{-1} 特征峰的减弱,脱氧核糖-磷酸特征峰 1155 cm^{-1} 及 1262 cm^{-1} 也明显减弱。分子构象的改变表现为代表 DNA 构象的特征峰 668 cm^{-1} 、 812 cm^{-1} 、 979 cm^{-1} 的消失,并出现新的特征峰 1175 cm^{-1} 。乳腺癌细胞中代表蛋白质的特征峰 936 、 1002 和 1445 cm^{-1} 及代表脂类的特征峰 1298 cm^{-1} 的峰高均比正常乳腺细胞的升高。说明乳腺癌在异常增殖过程中,除了 DNA 异常分裂外,还伴有蛋白质的大量翻译及脂类转运失调。Zoladek 等^[21]用显微共聚焦拉曼光谱仪分析了人乳腺癌细胞在凋亡过程中最初 6 h 的光谱图像,结果显示 DNA 缩合使得在细胞凋亡时 DNA 的拉曼光谱带信号增强。Yang 等^[22]在用表面增强拉曼光谱区分 Her-2(+)乳腺癌细胞株(SKBR3)及 Her-2(-)乳腺癌细胞株 MCF7 时运用了 p-对巯基苯甲酸为媒介的抗 Her-2 抗体共轭银纳米粒子探针。该研究表明,SKBR3 细胞与 MCF7 细胞的 SERS 信号存在显著差异,可以用此探针来区分不同乳腺癌细胞的 Her-2 表达情况。(2)在胃癌的研究中,Dai 等^[23]提用拉曼光谱分析了正常胃黏膜、肠化胃黏膜及胃腺癌细胞提取的 DNA,结果显示 3 种 DNA 的磷酸骨架链由稳定、不稳定发展到断裂。(3)结直肠癌的单细胞拉曼光谱研究中,结肠癌细胞与正常细胞之间在 1002 cm^{-1} 和 1300 cm^{-1} 处存在明显差异。核酸峰 1350 、 1458 、 1576 、 1662 cm^{-1} 的峰强增加及脂类峰 1300 、 1442 、 1647 、 1739 cm^{-1} 的峰强减小,也能有效地判别这两类细胞。

2.4 对肿瘤患者分子改变的研究 在一项以鼻咽癌患者于健康人血清为基础的研究中发现,在鼻咽癌患者血清的拉曼光谱

中 725 、 1330 、 1445 、 1580 cm^{-1} 对应的峰强较高,相对应的该血清中蛋白质、核酸及脂类的浓度较健康人血清高;而正常血清拉曼光谱中 638 、 813 、 886 、 1134 cm^{-1} 对应的峰强比鼻咽癌患者血清高,表明健康人血清中的酪氨酸、丝氨酸、谷胱甘肽、乳糖及甘露糖的浓度较高。表面增强拉曼光谱可以很好地反映鼻咽癌患者血清与正常血清之间的差异。准确率可达 95.4%^[24]。

近几年来,国内外研究人员运用表面增强拉曼放射或近红外拉曼光谱检测分析了肺癌患者与健康人的支气管组织、唾液的拉曼光谱,结果表明,拉曼光谱能明显区别两者^[25-26]。刘文艳^[27]对比分析了肺癌患者与健康人唾液的拉曼光谱,结果显示两者之间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。在糖类分子上,肺癌患者与健康人唾液的光谱在 422 、 1247 、 1450 cm^{-1} 三处峰位上,峰强变化不大,说明肺癌患者和健康人唾液中含糖量无明显差别。在蛋白质分子上,肺癌患者比健康人唾液的光谱在 1034 cm^{-1} 和 1247 cm^{-1} 特征峰峰强有较大变化,它们代表了蛋白质的空间结构;代表氨基酸的 548 、 853 、 999 、 1559 、 1603 cm^{-1} 等均发生了改变。在核酸分子上,其种类及浓度均发生了改变,表现为 579 、 717 cm^{-1} 处峰强的降低及 1383 、 1527 cm^{-1} 处峰强的升高,它们分属于胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤谱线。

Shapiro 等^[28]利用拉曼光谱检测尿液标本中的肿瘤上皮细胞,其诊断膀胱癌的灵敏度为 96% (高级别肿瘤为 100%),特异度为 90%。该实验展示了其在膀胱癌分子诊断中的应用前景,将来有望取代尿液脱落细胞学检查作为膀胱癌的初筛试验。

3 小结与展望

拉曼光谱技术是一种原位分析的检测方法,具有无创、检测速度快、诊断灵敏度高等特点。其在生物医学中的应用无疑依靠于显微拉曼、共振拉曼光谱和近红外拉曼等新技术的发展及应用。当组织细胞发生癌变时,虽然有可能肉眼无法分辨,但微观分子层面核酸、蛋白质、脂类及碳水化合物等物质都在发生细微的变化,通过对比正常组织细胞的拉曼光谱,可以反映微观生化结构及物质浓度的变化。从细胞乃至分子水平的变化诊断疾病,便于分析癌变原因。在组织癌变的同时,其代谢产物也发生了相应的变化,如血液中营养物质的变化,以及唾液、尿液等代谢产物的变化,均可用于分析诊断肿瘤。

目前,拉曼光谱在肿瘤诊断方面应用尚较少。其本身必须依赖于其他检测方法以明确诊断的病灶,其优势在于无创、实时监测及给出接近病理诊断的预测。与光纤技术相结合,可直接探查消化道、呼吸道、泌尿生殖道等部位并实时检测,有利于肿瘤的早期筛查及术中恶性肿瘤切除范围的判断。

总之,随着拉曼设备的改进、各个领域优势的结合及分类运算模式的优化,无疑将在生物医学领域,尤其在肿瘤的诊断中,拉曼光谱技术将发挥更大的优势。

参考文献

- [1] Zeid A, Nima AB, Ilker S, et al. Applications of surface-enhanced Raman scattering in advanced bio-medical technologies and diagnostics[J]. Drug Metab Rev, 2014, 46(2): 155-175.
- [2] Shan-Yang L. Biochemical and molecular aspects of spectral diagnosis in calcinosis cutis[J]. Mole Med, 2014, 6(16): 1-17.
- [3] Smith GP, McGoverin CM, Fraser SJ, et al. Raman imaging of drug delivery systems, Adv[J]. Drug Deliv, 2015, 111(2): 255-

- 259.
- [4] Wang Y, Irudayaraj J. Surface-enhanced Raman spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology [J]. Phil Trans R Soc B, 2012, 368(4): 26.
- [5] Lore K, Stefanos K. Use of the Raman spectrometer in gemmological laboratories; Review [J]. Spectrochimica Acta Part A, 2011, 80(3): 119-124.
- [6] Fernando R, Alberto V, Sansano A, et al. Analysis of arctic ices by remote raman spectroscopy [J]. Spectrochimica Acta Part A, 2011, 80(1): 148-155.
- [7] Charlotte KL, Max A, Catherine K, et al. Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics [J]. Photod Photody Ther, 2013, 10(1): 207-219.
- [8] Andrew D, Alistair E. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine [J]. Sensors, 2010, 10(1): 1871-1889.
- [9] Yin Z, Hao H, Weibo C. Imaging with Raman Spectroscopy. Curr Pharm Biotechnol [J]. 2010, 11(6): 654-661.
- [10] Nijssen A, Schut TCB, Heule F, et al. Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy [J]. J Invest Dermatol, 2002, 119(5): 64-69.
- [11] Lau DP, Huang Z, Lui H, et al. Raman spectroscopy for optical diagnosis in normal and cancerous tissue of the nasopharynx-preliminary finding [J]. Las Surg Med, 2003, 32(11): 210-214.
- [12] Li Y, Wen ZN, Li LJ, et al. Research on the Raman spectral character and diagnostic value of squamous cell carcinomas of oral mucosa [J]. J Ram Spectr, 2010, 41(4): 142-147.
- [13] Abramczyk H, Placek I, Kurczewski K, et al. Human breast tissue cancer diagnosis by Raman spectroscopy [J]. Spectroscopy, 2008, 22(4): 113-121.
- [14] Saha A, Barman I, Dingari NC, et al. Raman spectroscopy: a real-time tool for identifying microcalcifications during stereotactic breast core needle biopsies [J]. Biomed Opt Express, 2011, 2(10): 2792-2803.
- [15] Hiroya Y, Shoji K, Ehiuchi K, et al. The diagnosis of lung cancer using 1064-nm excited near-infrared [J]. Ultrachannel Raman Spectroscopy, 2003, 21(1): 1-6.
- [16] Chen Y, Dai JH. Normal and cancerous gastric mucosa of confocal Raman spectroscopy [J]. Laser Biology, 2014, 23(1): 45-50.
- [17] Wang L, Fan JH, Guan ZF, et al. Study on Bladder Cancer Tissues with Raman Spectroscopy [J]. Spectr Spec Ana, 2012, 32(2): 123-126.
- [18] Draga RO, Grimbergen MG, Vijverberg PL, et al. In vivo bladder cancer diagnosis by high-volume Raman spectroscopy [J]. J Photochem Photobiol B, 2009, 95(4): 170-176.
- [19] Eoghan OF, Mary BH, Joe MB, et al. A study examining the effects of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy [J]. Vibrat Spect, 2005, 38(12): 121-127.
- [20] Chowdary MV, Kumar KK, Mathew S, et al. Biochemical correlation of raman spectra of normal, benign and malignant breast tissues: a spectral deconvolution study [J]. Biopolymers, 2009, 91(7): 539-546.
- [21] Zoladek A, Pascut FC, Patel P, et al. Non-invasive time-course imaging of apoptotic cells by confocal Raman micro-spectroscopy [J]. J Raman Spectr, 2011, 42(3): 251-258.
- [22] Yang J, Wang Z, Zong S, et al. Distinguishing breast cancer cells using surface-enhanced Raman scattering [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402(3): 1093-100.
- [23] Dai JH, Peng GY, Ran ZL, et al. A study of normal mucosa and gastric carcinoma cell genome DNA using surface enhanced raman spectroscopy [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2011, 20(3): 299-303.
- [24] Feng SY, Chen R, Lin JQ, et al. Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis [J]. Bios Bioele, 2010, 25(3): 2414-2419.
- [25] Huang Z, Lui H, Williams A, et al. Nearinfrared Raman spectroscopy detects lung cancer [J]. Inter J Cancer, 2003, 107(6): 134-138.
- [26] Li XZ, Yang TY, Ding JH, et al. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) of saliva for the diagnosis of lung cancer [J]. Spectr Spectral Anal, 2012, 32(1): 391-393.
- [27] 刘文艳. 基于数据挖掘技术的表面增强拉曼光谱诊断肺癌的研究 [J]. 北京生物医学工程, 2014, 33(2): 35-40.
- [28] Shapiro A, Gofrit ON, Pizov G, et al. Raman molecular imaging: a novel spectroscopic technique for diagnosis of bladder cancer in urine specimens [J]. Eur Urol, 2011, 59(4): 106-112.

(收稿日期: 2015-05-08)



• 综 述 •

空腹血糖水平与冠心病的关系*

黄学亮^{1,2}综述, 田亚平^{1△}审校

(1. 中国人民解放军总医院生化科, 北京 100853; 2. 武警河北省总队医院检验科, 河北石家庄 050081)

关键词: 冠心病; 血糖; 危险因素

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.22.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)22-3289-03

血糖代谢异常在冠心病患者中相当普遍, 表现为空腹血糖、餐后血糖和糖化血红蛋白的异常^[1]。针对既往糖尿病或新

* 基金项目: 国家高技术研究发展(“863”计划)重点项目(2011AA02A11)。 作者简介: 黄学亮, 男, 博士研究生在读, 主要从事心血管病诊断研究。 △ 通讯作者, E-mail: tianyp@301hospital.com.cn。