

· 综 述 ·

拉曼光谱技术在肝病中的研究进展^{*}李 倩, 廖星富 综述, 李承彬[△] 审校

(长江大学第二临床医学院荆州市中心医院检验科, 湖北荆州 434020)

关键词: 拉曼光谱; 鉴别诊断; 肝脏疾病

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.20.025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)20-2867-03

肝脏是人体内最大的消化腺, 是体内物质能量代谢的中心站。常见的肝病有肝炎、原发性肝癌、肝硬化、酒精肝、肝脓肿等, 肝病是一类常见的危害性极大的疾病。在我国, 危害性最大最为广泛的是乙型病毒性肝炎(简称乙肝), 以慢性携带为主, 若长期迁延不愈易导致肝硬化甚至肝癌发生。据报道, 我国目前 HBV 携带率为 7.2%^[1], 肝癌每年发病人数占全世界的 55%。冯大作等^[2]提出病毒性乙型肝炎是“癌前状态”。因此, 学者们普遍认为, 对于高危人群的监测和筛查是早期诊断肝癌的最主要方法。

随着激光技术的进步和新型探测器电荷耦合器件(CCD)工艺及应用的逐渐成熟, 拉曼光谱技术已被广泛应用到各领域, 如材料分析、宝石鉴定、安检、爆炸物分析、生化、药物、食品在线质量控制等等^[3-6]。拉曼光谱技术通过物质的分子振动光谱来识别和区分不同的物质结构, 能够灵敏地反映组织内部生化信息的改变, 并且具有制样简单、分析快速、非侵袭性、水干扰小、样品需求量少以及实时等众多优点^[6], 近年来已成为生物医学和医疗诊断中研究物质分子结构及变异的有效手段, 并显示出了良好的应用前景。本文通过文献复习, 将对拉曼光谱技术在肝病中的研究进展作一综述。

1 拉曼光谱概况

拉曼散射也称作拉曼效应, 是由印度物理学家拉曼于 1928 年发现的一种物理现象, 他因此获得了 1930 年的诺贝尔物理学奖。拉曼散射是指, 当单色光束的入射光光子与分子相互作用时, 光子与分子发生弹性碰撞和非弹性碰撞。其中发生的非弹性碰撞过程中, 光子不仅改变运动方向, 同时光子的一部分能量还传递给了分子, 或者分子的振动及转动能量传递给光子, 从而改变了光子的频率, 发生了光子与分子之间发生能量交换, 这种散射过程就是拉曼散射。简而言之, 就是散射分子的转动能级和振动能级发生了变化, 导致入射光子频率发生改变。所以, 不同物质的拉曼光谱只与其分子结构有关, 不会受入射光的频率干扰^[7-9]。因此, 生物体内的蛋白质、脂质、糖类和核酸等分子结构, 会产生出不同的拉曼图谱, 这就是“分子指纹”的由来^[10]。这些大分子通常都有其相对应的频移谱带, 分析这些谱带就可能明确知道分子的结构和数量改变情况,

不同的拉曼光谱仪组成及结构有些许不同, 但一般都由五个部分组成: 光源、外光路、色散系统、接收系统和信息处理与显示系统。随着对拉曼光谱的不断深入研究, 相关学术、仪器、技术得到了极大的发展, 目前已发展出多种不同的分析技术, 如显微拉曼光谱技术、表面增强拉曼光谱技术(SERS)、共聚焦显微拉曼光谱技术、激光共振拉曼光谱技术(RRS)、光声拉曼

技术、傅里叶拉曼光谱技术(FT-Raman)、高温高压原位拉曼光谱技术等^[7]。在医学领域, 疾病的发生往往是从分子内部细微的变异开始, 临幊上变异几乎没有任何改变, 常规手段又很难检测出来, 比如蛋白质、脂肪、糖类及核酸结构的改变。但是, 通过拉曼光谱技术就能够很好的推测出生物内部分子细微的改变, 从而为疾病早期诊断提供极大的指导和帮助。目前, 拉曼光谱技术已成为分析物质分子结构的有效手段, 在肝脏疾病的早期诊断、鉴别诊断及病情评估等方面的应用也受到越来越多的关注。

2 拉曼光谱技术在肝病中的应用

2.1 在病毒性肝炎及相关肝病中的研究 病毒性肝炎是由多种肝炎病毒引起的以肝脏病变为主的一类传染病。根据病原学分型可分为甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎和戊型肝炎。其中, 乙型和丙型肝炎在人群中的患病率最高, 对于二者的研究也最广泛和深入。拉曼光谱技术因检测时间短、所需样本量少, 且无需对样本特殊处理等优点, 已应用在乙型和丙型肝炎及相关肝病的诊断和鉴别诊断的研究中, 而在其他类型肝炎中的应用暂未见报道。

在乙型肝炎及相关肝病的研究中, 邵丽婷等^[11]利用表面增强拉曼光谱技术(SERS)在 785 nm 激发波长下, 将 30 例正常人与 48 例慢性乙肝、48 例肝硬化和 46 例肝癌患者血清的拉曼光谱进行比较分析后发现, 正常人与 3 组肝病患者血清在 625、725、806、947、1 018、1 219、1 131、1 329、1 440、1 580、1 660 cm⁻¹ 位移处均有拉曼峰且峰强弱存在差异。肝病患者在 806、1 018、1 219、1 131 cm⁻¹ 位移处拉曼峰强于正常人, 这些拉曼峰主要归属于氨基酸和酰胺类; 正常人血清在 725 cm⁻¹ 位移处拉曼峰明显强于肝病患者 4~5 倍, 该拉曼峰归属于辅酶 A; 与 3 种肝病患者相比, 正常人血清在 1 096、1 395 cm⁻¹ 位移处有较明显的特征峰, 其归属为鸟嘌呤、腺嘌呤和胸腺嘧啶; 肝病患者血清在 887 cm⁻¹ 位移处有归属为色氨酸的强峰。三组肝病经曲线拟合的方法加以区分, 其诊断准确性分别为 98.1%、96.9% 和 98.4%。该研究表明血清 SERS 图谱可作为乙型肝炎及相关性肝病早期诊断的一种辅助手段。

在丙型肝炎及相关肝病的研究中, Gaggini 等^[12]采用近红外拉曼光谱技术(激发波长为 830 nm)对 11 名丙型肝炎患者的肝活检组织进行检测, 并结合基于组织病理学的 METAVIR 评分系统综合分析后发现, 根据组织炎性坏死和纤维化程度的不同, 拉曼谱带在位移 1 006、1 159、1 203、1 442、1 595、1 634、1 658 cm⁻¹ 处存在显著差异, 进一步对拉曼图谱数据进行主成分分析(PCA)后发现, 组织炎性坏死程度高的谱带对应的是血

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2015AA021107)。

△ 通信作者, E-mail: lcb1234@126.com。

红蛋白的特征峰,组织纤维化程度高的谱带则对应的是胶原蛋白的特征峰,而胶原蛋白是纤维化组织的主要成分。研究中, Gaggini 等^[12]还发现一种预示着早期肝脏损伤的重要生物标志物-苯醌,其拉曼特征峰位于 1595 cm^{-1} 处,最早出现在丙肝病毒感染后肝脏早期轻微损伤的组织中,此时峰值最强。随着损伤程度和纤维化程度的加深,峰强逐渐变弱直至消失。组织病理活检一直被认为是评价肝脏损伤程度的金标准。而拉曼光谱技术作为一种实时、非侵入式的检测方式,一方面可以收集并分析同一组织不同部位的光谱带,另一方面可以降低如组织活检时人为主观因素引起的医源性风险,将来有望取代组织活检成为筛查早期肝脏损伤和评定损伤程度的有效手段。

2.2 拉曼光谱在肝癌诊断及鉴别诊断中的应用 肝癌致死率在所有癌症中高居第二^[13],对于高危人群而言,早发现、早诊断和早干预,是提高肝癌治愈率和五年生存率,减少死亡率的重要手段。随着拉曼光谱技术在其他系统肿瘤诊断和鉴别诊断中优势的体现,其很快被应用到肝脏肿瘤的研究中。

2.2.1 在研究肝肿瘤细胞特征变化方面的应用 根据病理组织学分型,肝细胞肝癌(HCC)是肝癌中最常见的一种类型,占90%以上^[14]。在我国,HCC是成人中致死率和患病率最高的恶性肿瘤之一。因此,对HCC的早期诊断显得尤为重要。正常细胞向肿瘤细胞转变的过程中,细胞内发生着巨大变异。肿瘤细胞的基本构成元素如蛋白、核酸、碳水化合物及脂质与正常细胞一致的,但是在转变的过程中,细胞内各组分的含量、理化性质和空间构象在二者之间存在显著差异。如相关研究表明,肝癌细胞在癌变过程中苯丙氨酸等分解代谢减弱造成氨基酸含量增高;同时,DNA合成及核酸代谢也较正常细胞旺盛^[15-16]。Guo等^[17]利用显微拉曼光谱技术对比正常肝细胞株HL-7702和HCC肿瘤细胞株BEL-7420的拉曼光谱后发现,肿瘤细胞中代表DNA磷酸骨架O-P-O的特征峰 786 cm^{-1} 和代表苯丙氨酸的特征峰 1004 cm^{-1} 均比正常细胞的升高,说明HCC肿瘤细胞在异常增殖过程中除了核酸异常分裂外,还伴有蛋白质的大量翻译。用此方法可有效鉴别正常细胞与HCC肿瘤细胞的表达情况,准确率可达100%。Huang等^[18]用SERS技术分析了正常肝细胞株QSG-7701和HCC肿瘤细胞株SMMC-7721光谱图像,结果显示代表蛋白质分子构象改变的由C-C弯曲振动、C-C-N+伸缩振动和CH3形变振动产生的特征峰 $644, 877, 978\text{ cm}^{-1}$,和代表核酸组分的特征峰 $1518, 1586$ 和 1662 cm^{-1} 仅出现在HCC肿瘤细胞株中。此方法也可有效区分这两类细胞,灵敏度和特异度分别可达95%和90%。

2.2.2 在肝癌病理切片诊断中的应用 肝脏组织具有强烈的近红外自身荧光信号特性,为消除大块肝脏组织自身强荧光信号的干扰,Pence等^[19]运用联合砷化镓(InGaAs)探测器的红外拉曼检测技术(激发波长 1064 nm)对正常人、继发性肝癌(肠癌转移)和原发性肝细胞癌患者组织切片进行检测。结果显示:代表胆绿素、类胡萝卜素和苯醌类生物大分子的拉曼峰 $1485, 1595, 1706\text{ cm}^{-1}$ 位移在正常肝组织中有较强的峰值,特别是特征峰 1595 cm^{-1} 仅出现在正常组织中,而两组肿瘤组织中则没有。在继发性肝癌组织中代表乳酸、DNA、酪氨酸、糖类和脂质等物质的拉曼峰在 $747, 789, 838, 1356, 1348, 1734\text{ cm}^{-1}$ 位移处的峰高较其他两组的升高。而原发性肝癌组的特征谱带出现在 $855, 873, 981, 1184, 1279, 1485, 1524, 1685\text{ cm}^{-1}$ 位移处,其表示的是白蛋白、胶原蛋白、羟脯氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、酰胺类、核酸、视黄醇和血色素等相关分子

的振动波谱。在 1064 nm 激发波长的照射下,3种组织间的拉曼光谱显著不同,该方法用于3种组织鉴别的灵敏度为100%,特异性为89.2%,且组织分型准确度可达90.3%。由此表明,通过拉曼光谱判别肝肿瘤病理切片良恶性的方法是可行的。

2.2.3 在肝癌血清诊断中的应用 人体内各种物质代谢都要通过血液循环运送到机体的各个部位,血清内含有蛋白质、脂类、核酸、无机盐、糖、维生素等各种成分,机体疾病的发生与这些分子的构象、组成和相互作用有着密切的联系。拉曼光谱可从分子水平研究新陈代谢的小分子在血清中的浓度变化从而判断机体功能变化。Li等^[20]研究了SERS技术在肝癌、肝硬化和正常人血清中检测的可行性。对44例正常人、45例肝癌、42例肝癌术后和45例肝硬化患者进行血清SERS检测,结果显示尽管四组血清在 $590, 820, 886, 1021, 1073, 1132, 1323, 1355, 1582\text{ cm}^{-1}$ 位移处的拉曼峰在大体形态和趋势上十分相近,表明各组血清的分子构成并非完全不同,但拉曼峰的强度存在显著差异。正常血清在 $820, 1132, 1323, 1355\text{ cm}^{-1}$ 处相对肝病组最强,而在 $590, 886, 1021, 1073, 1582\text{ cm}^{-1}$ 处相对最弱。利用统计学方法进一步分析后发现四组血清中蛋白质、核酸和脂质等生物分子的含量发生改变。

2.3 拉曼光谱在肝纤维化诊断和疗效评价中的应用 肝纤维化是各种慢性肝病进展中由于肝内纤维生成与降解失衡,致使过多的胶原在肝内沉积,常伴有炎症并可发展为肝硬化^[21]。肝星状细胞激活是肝纤维化形成的中心环节,有效地快速诊断、鉴别肝星状细胞的表型特征对于肝纤维化的预防、诊治以及抗肝纤维化药物的筛选具有重要意义。权日浩等^[22]尝试使用拉曼光谱技术研究了CCl4肝损伤动物模型组织,揭示了肝星状细胞体外活化过程中胞内分子组成和结构的变化,并发现可依据两个蛋白质酰胺振动谱带相对强度的比值判断肝组织的损伤程度,即 I_{1640}/I_{1660} 值越大,肝损伤的可能性以及损伤程度越大,反之越小;肝星状细胞体内激活程度的大小也可以通过此比值的大小来判断。拉曼光谱技术能快速、灵敏地反映肝星状细胞体内和体外活化过程中的分子变化,可为肝纤维化的早期诊断提供依据,将来有望成为肝纤维化早期诊断的临床手段。肝脏抗纤维化治疗过程中,很难通过后期肝组织形态的表现来判断疗效的好坏。Galler等^[23]对CCl4肝损伤动物模型的肝组织切片进行研究时发现,拉曼光谱技术能够很好地区分纤维化肝组织、恢复期肝组织和正常肝组织。纤维化肝组织中代表脂质的特征峰 1660 cm^{-1} (C=C)、 1450 cm^{-1} (CH₂)及 $1200\sim1300\text{ cm}^{-1}$ (=CH和CH₂)峰值较正常组织和恢复期组织显著增高,表明纤维化肝组织中脂质的含量明显升高;而正常组织与恢复期肝组织虽然在组织形态上差异显著,但代表二者化学组成成分的拉曼峰却高度相似。拉曼光谱技术一方面规避了肝脏活检带来的固有风险,另一方面满足了临床抗纤维化治疗的监测需求,是评估抗肝纤维化治疗效果的一种可行的方法。

2.4 在酒精肝、肝脓肿诊断和疗效评价中的应用 拉曼光谱技术在此类肝病中的研究甚少,在此暂不作综述。

3 小结与展望

细胞由蛋白质、糖类、碳水化合物、核酸、脂质、无机盐等成分组成,是构成生命的最基本单元,由于每个分子都会有其对应的特征拉曼峰。因此,早期应用拉曼光谱技术,就能够有效发现生物体内分子的改变情况,从而判断疾病的发生情况,在常规手段还没有诊断出疾病时,拉曼光谱就可以早期鉴别出疾

病。按照拉曼散射效应原理,当入射光频率不同时,通过对散射光谱进行分析以得到分子振动和转动方面信息,并应用于分子结构研究的一种方法,就能够反映生物样本内核酸、蛋白质、脂质的含量及其化学结构的微小变化,具有实时快速、不破坏细胞、分辨率高、敏感性强、能够定性定量等优势。目前已有大量研究证明拉曼光谱技术可用于分析不同的组织^[24]、细胞^[25]及各生物大分子^[26]等的结构信息,尤其在细胞和组织癌变方面的检测取得了巨大进展^[27]。

肝病是一类常见的危害性极大的疾病,早期诊断是肝病预防和控制的一个关键因素。尽管拉曼光谱技术在病毒性肝炎、原发性肝癌和肝纤维化等肝病的研究中取得了一定的成果,但由于拉曼散射光强度较弱、肝组织自身强烈的荧光特性以及相关研究数据仍较少等因素,其在肝病中的研究仍需依赖于在其他检测手段确诊的前提下进行,致使拉曼技术在实际应用中还存在诸多困难和不足。随着拉曼检测设备的改进、各个领域优势的结合和研究数据的不断积累,更快、更简便、更可靠的用于肝病检测的拉曼方法也将随之建立起来。未来,拉曼光谱技术在肝病的早期诊断以及病情评估方面必将发挥重要作用。

参考文献

- [1] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Reprint of: epidemiological serosurvey of hepatitis B in China-declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination[J]. Vaccine, 2013, 31 (Suppl 9):J21-J28.
- [2] 冯大作,赵华,雷三林.从病毒性肝炎的病理状态来选择肝细胞癌的治疗方法[J].中华肝胆外科杂志,2000,6 (1):47.
- [3] Bozlee BJ, Misra AK, Sharma SK, et al. Remote raman and fluorescence studies of mineral samples[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2005, 61(10):2342-2348.
- [4] Smith GP, McGoverin CM, Fraser SJ, et al. Raman imaging of drug delivery systems[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 89:21-41.
- [5] Smith GD, Clark RJ. Raman microscopy in archaeological science[J]. J Archaeol Sci, 2004, 31(8):1137-1160.
- [6] Carey P. Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopes [M]. New York: Academic Press, 1982.
- [7] Zhu XQ, Xu T, Lin QY, et al. Technical Development of Raman Spectroscopy: From Instrumental to Advanced Combined Technologies[J]. Appl Spectrosc Rev, 2014, 49 (1):64-82.
- [8] Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of instrumental analysis [M]. 5th edition. Stanford, Connecticut, USA: Cengage Learning, 1997.
- [9] Smith E, Dent G. Modern Raman Spectroscopy-A Practical Approach [M]. Gemma Alvarez, Spain: Wiley Online Library, 2005.
- [10] Lakshmi RJ, Alexander M, Kurien J, et al. Osteoradionecrosis (ORN) of the mandible: A laser Raman spectroscopic study[J]. Appl Spectrosc, 2003, 57(9):1100-1116.
- [11] 邵丽婷,肖瑞,王升启.基于表面增强拉曼光谱的肝病血清检测技术研究[J].军事医学,2016,40(11):888-891.
- [12] Gaggini MC, Navarro RS, Stefanini AR, et al. Correlation between METAVIR scores and Raman spectroscopy in liver lesions induced by hepatitis C virus: a preliminary study[J]. Lasers Med Sci, 2015, 30(4):1347-1355.
- [13] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [14] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2012, 379(9822):1245-1255.
- [15] Huang JS, Chao CC, Su TL, et al. Diverse cellular transformation capability of overexpressed genes in human hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(4):950-958.
- [16] Lee JS, Thorgeirsson SS. Genetic profiling of human hepatocellular carcinoma[J]. Semin Liver Dis, 2005, 25(2):125-132.
- [17] Jy G, Du B, Qian M, et al. Raman spectroscopic identification of normal and malignant hepatocytes[J]. Chin Optics Letters, 2009, 7(1):60-63.
- [18] Huang J, Liu S, Chen Z, et al. Distinguishing cancerous liver cells using Surface-Enhanced raman spectroscopy [J]. Technol Cancer Res Treat, 2016, 15(1):36-43.
- [19] Pence IJ, Patil CA, Lieber CA, et al. Discrimination of liver malignancies with 1064 nm dispersive Raman spectroscopy[J]. Biomed Opt Express, 2015, 6(8):2724-2737.
- [20] Li X, Yang T, Li S, et al. Noninvasive liver diseases detection based on serum surface enhanced Raman spectroscopy and statistical analysis[J]. Opt Express, 2015, 23(14):18361-18372.
- [21] Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story[J]. Gut, 2015, 64 (5):830-841.
- [22] 权日浩,沈爱国,廖长秀,等.鼠肝星状细胞体内与体外激活的显微拉曼光谱[J].高等学校化学学报,2007,28(9):1645-1650.
- [23] Galler K, Fröhlich E, Kortgen A, et al. Hepatic cirrhosis and recovery as reflected by Raman spectroscopy: information revealed by statistical analysis might lead to a prognostic biomarker[J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408 (28):8053-8063.
- [24] Koljenovic S, Bakker Schut TC, Wolthuis R, et al. Tissue characterization using high wave number Raman spectroscopy[J]. J Biomed Opt, 2005, 10(3):31116-31127.
- [25] Puppels GJ, De Mul FF, Otto C, et al. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microscopy[J]. Nature, 1990, 347(6290):301-303.
- [26] Wachsmann-Hogiu S, Weeks T, Huser T. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy—from single cells to humans[J]. Curr Opin Biotechnol, 2009, 20 (1):63-73.
- [27] Kallaway C, Almond LM, Barr H, et al. Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2013, 10 (3):207-219.