

共振喇曼光谱技术在恶性肿瘤诊断中的应用

于德泉¹ 何中秋¹ 赵岩^{2△}

(1 辽宁省肿瘤研究所 辽宁 沈阳 110042; 2 辽宁省肿瘤医院 胃外科 辽宁 沈阳 110042)

摘要 目的:探讨共振喇曼光谱技术用于早期恶性肿瘤诊断的研究。方法:利用氩离子激光作为线偏振光的特点,采集偏振荧光光谱,对荧光光谱的偏振态进行分析。利用不同荧光物质的荧光可能具有不同偏振态的特点减少其它荧光物质的荧光对光谱分析的影响。血清样品产生的荧光也具有确定的偏振性。对所检测病人血清经激光分析仪进行喇曼光谱技术分析,光谱数据经计算机软件处理,自动显示图谱和数据,并直接给出各项指标及诊断提示。本结果与细胞病理学结果进行了对照研究。结果:恶性肿瘤样本 176 例,检测出阳性病例 141 例,阳性符合率为 80.1%;良性肿瘤样本 52 例,4 例阳性,假阳性率为 7.7%;正常体检样本 248 例,检测结果均为阴性。结论:喇曼光谱技术适用于肿瘤初筛、普查及早期诊断,有推广应用前途。

关键词: 喇曼光谱, 恶性肿瘤, 自体荧光

中图分类号:R730.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-287-02

Application of Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy in Diagnosis of Human Malignancies

YU De-quan¹, HE Zhong-qiu¹, ZHAO Yan^{2△}

(1 Liaoning Cancer Institute, Department for Clinical Research, Liaoning Shenyang, 110042, China;

2 Liaoning Cancer Hospital, Department of Surgery, Liaoning Shenyang, 110042, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the resonance Raman spectroscopy for early diagnosis of malignant tumors. **Method:** Using the characteristics of argon ion laser as linearly polarized light, polarized fluorescence spectra were collected, and the fluorescence polarization spectrum were analyzed. The features of different fluorescent substances having different polarization were utilized to reduce the impact of other fluorescent material on the spectrum. The serum samples also have authentic fluorescence polarization. Raman spectroscopy detection of serum was undertaken by laser analyzer. The spectral data were processed by application software to show data and display spectra patterns. The indicators and diagnostic tips were automatically given. **Results:** In 176 malignant tumor samples, 141 cases showed positive data, the positive consistent rate was 80.1%. In 52 benign tumor samples, 4 cases were positive, the false positive rate was 7.7%. The 248 normal samples were uniformly negative. **Conclusion:** Raman spectroscopy was a promising application for cancer screening and early diagnosis.

Key words: Raman spectroscopy; malignancies; autofluorescence

Chinese Library Classification(CLC): R730.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)02-287-02

癌症是危害人类健康最严重的疾病之一,据统计,在各种疾病死亡中,癌症的死亡率仅次于冠心病,位居第二。全球每年约有几百万人被癌症夺去生命。癌症的早期发现,早期诊断,是提高对恶性肿瘤治愈水平或改善生存质量的关键。因此,如何提高对恶性肿瘤的早期诊断水平成为国内外众多学者研究的首要课题之一。

激光光谱在国际上已被广泛用于对多种人类疾病的诊断,例如,血清自体荧光运用于早期癌症诊断的研究^[1,2],近红外光谱和傅立叶变换红外光谱进行结肠癌及胃组织恶性肿瘤的研究^[3,4]。此外,时间飞行质谱也用于寻找血清肿瘤标记物^[5,6]。其中对于早期癌症的激光诊断一直是光物理学与生物医学交叉领域的前沿课题。近年来,共振喇曼光谱技术应用于医学中已显示出它在灵敏度、分辨率、无损伤等方面的优势,克服了荧光光谱技术区分病变组织时由于生物大分子的荧光带较宽、易于重叠等因素对准确诊断带来的影响。随着激光光谱技术在医学

领域应用研究的深入开展,一门有发展潜力和应用前景的"医学光谱学"逐渐形成。本研究采用共振喇曼光谱技术对恶性肿瘤患者血清进行了光谱技术分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 激光光谱分析仪 电源输入:AC380±38 V,50HZ±1 HZ;工作电流:10~35 A;输入功率:20±2 KVA,冷却水流量:1T/h;水压:1 kg/cm²。

1.1.2 血清样本 恶性肿瘤患者组 176 例、良性肿瘤患者组 52 例(同步留取血清做双盲试验),均来自辽宁省肿瘤医院首诊、术前住院且未接受任何治疗的患者。正常人对照组 248 例,来自辽宁大学新生入学体检学生、武警部队战士、及健康体检的公司员工。以上对照组体检肺透视正常,肝功能正常、乙肝表面抗原阴性。对所有检测对象均空腹采取静脉血 3.0 ml,标准设备室温 3000 转/分离心 10 分钟,分离血清备用。

1.2 方法

利用氩灯作为激发光源的荧光光谱仪在 200 nm 至 800

△通讯作者:赵岩, E-mail: zhaoyan@medmail.com.cn

(收稿日期:2010-10-02 接受日期:2010-10-25)

nm 范围扫描,寻找癌症患者血清的自体荧光光谱的最佳激发波长。利用氩离子激光作为线偏振光的特点,采集偏振荧光光谱,对荧光光谱的偏振态进行分析,利用不同荧光物质的荧光可能具有不同偏振态的特点减少其它荧光物质的荧光对光谱分析的影响。研究它们在不同种癌症中的变化规律及它们所产生的荧光光谱之间的相互影响,消除或降低不同荧光物质的光谱干扰。取血清 0.5 ml 置比色皿中,经激光光谱分析仪进行血清自体荧光-共振喇曼光谱分析,激光器单谱线输出功率:514.5 nm 0.5 W,488.0 nm 0.5 W;单色仪分辨率:0.05 nm。光谱数据经计算机相应软件处理,自动显示图谱和数据,并由计算机直接给出各种指标和诊断结果,再与病理细胞学结果相对照。

2 结果

2.1 正常对照

248 例检测结果均为阴性。正常对照共振喇曼光谱中,在 514.5 nm 和 488.0 nm 激光激发的共振喇曼峰有三个,其喇曼位移分别为 1010cm^{-1} 、 1160cm^{-1} 和 1525cm^{-1} 。喇曼峰信号是迭加在荧光信号上的,正常人血清经激光处理后 514.5 nm 激光激发的喇曼峰相对与荧光的强度大于 488.0 nm 激光激发的喇曼相对于荧光的强度。称之为喇曼光谱正常。

2.2 良性肿瘤病人

其中乳腺纤维瘤 20 例,子宫肌瘤 20 例,结果全部阴性;肝胆息肉血管瘤 6 例(其中肝硬化 1 例呈阳性反应);肺部良性肿瘤 6 例(其中 2 例炎性假瘤、1 例结核呈阳性)。良性肿瘤 52 例中有 4 例呈阳性反应,假阳性率为 7.7%。

2.3 恶性肿瘤病人

喉癌 9 例光谱检测全部呈阳性,符合率为 100%;食道癌 18 例(其中 15 例呈阳性),符合率为 83.33%;胃癌 26 例(其中 21 例呈阳性)符合率为 80.77%;肠癌 39 例(其中 31 例呈阳性),符合率为 79.49%;肝癌 14 例(其中 13 例呈阳性),符合率为 92.86%;肺癌 53 例(其中 41 例呈阳性),符合率为 77.36%;泌尿系恶性肿瘤 17 例(其中 11 例呈阳性),符合率为 64.71%。总计共检测恶性肿瘤患者血清 176 例,其中阳性 141 例符合率为 80.11%。恶性肿瘤患者血清自体荧光光谱经激光作用处理后,如果在 514.5 nm 和 488.0 nm 激光激发的血清自体荧光光谱上没有共振喇曼峰存在,则称之为喇曼光谱异常。

3 讨论

自从 Policard 首先发现癌症肿瘤组织能积聚卟啉类物质,并在特定光激发下能产生荧光以来,人们便开始用外源性卟啉(HPD)荧光光谱法诊断癌症。同时,研究者发现,肿瘤组织含有内源性荧光物质,这些物质所产生的自体荧光的变化与人体从正常状态→癌前病变→癌变→癌细胞增殖这一连续的变化过程相关。在此期间主要由于细胞的代谢状态和化学结构的改变,癌细胞的代谢产物与遗传物质进入外周血,引起血清中荧光物质成份及含量发生变化,这同时也会使血清中生物大分子所处的微环境发生改变。

本研究通过荧光和喇曼光谱无创性检测的方法获得了较高的阳性符合率,及较低的假阳性率。在正常对照,全例未出现假阳性。获得这样良好的检测结果其原因考虑有以下两点。任何分子都有特征振动膜,喇曼散射是激发光波长与待测分子

的振动膜耦合产生的效应,因此带有后者的特征指纹。不同分子的振动模式是不同的,所产生的喇曼散射光谱也是不同的,因而喇曼光谱成为标识分子、探测分子结构的标准之一^[7-9]。在组织细胞的病变过程中,生物大分子(如蛋白质)的变化将引起其喇曼光谱的改变,这使运用喇曼光谱探测组织病变的存在成为可能。一般来说,存在于正常血液中的 DNA 分子并不多,但由于癌细胞分裂速度迅速,DNA 的复制速度快,所以如果患有癌症或者出现癌症复发,血液 DNA 水平就可能增高而作为检测的一个窗口。意大利国家肿瘤研究所分子细胞遗传学研究室对 1000 名长期吸烟人士(无癌症症状,但均为肺癌高风险人群)进行的研究得出血液 DNA 含量测试能对肺癌早期检测或肺癌复发提供有说服力的证据^[10]。部分癌症病例在患病初期,还无法从影像学水平检测到病变时就已经能够从血液检测出 DNA 量的增高。

另外,由于癌细胞代谢与正常细胞不同,癌细胞特有代谢产物进入到血液中也引起人体血清中荧光生物分子成份及含量发生变化。癌症患者血清的自体荧光-共振喇曼光谱与正常人血清的自体荧光-共振喇曼光谱必然会存在差别,这些差异能够被灵敏的喇曼光谱检测方法所捕捉。

综上所述,利用荧光和喇曼光谱简便易行,且属无创检查,它能够在一定程度上达到恶性肿瘤在细胞分子水平早期诊断的需要,值得在更广泛的肿瘤筛查和临床诊断中加以验证和推广应用。

参考文献(Refences)

- [1] James V, Kearsley J, Irving I, et al. Using hair to screen for breast cancer [J]. Nature, 1999, 4; 398(6722):33-34
- [2] Manoharan R, Shafer K, Perelman L, et al. Raman spectroscopy and fluorescence photon migration for breast cancer diagnosis and imaging [J]. Photochem Photobiol, 1998, 67(1):15-22
- [3] Xie C, Dinno MA, Li YQ. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically of rapped biological cell [J]. Optics letters, 2002, 27 (4): 249-251
- [4] Xie C, Li Y. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cell using optical trapping and shifted excitation difference techniques [J]. J Appl Phys, 2003, 93(5): 2982- 2986
- [5] Yazdi Y, Ramanujam N, Lotan R, et al. Resonance raman spectroscopy at 257 nm excitation of normal and malignant cultured breast and cervical cells [J]. Applied Spectroscopy, 1999, 53(1): 82-85
- [6] Mirabal YN, Chang SK, Atkinson EN, et al. Reflectance spectroscopy for in vivo detection of cervical precancer [J]. J Biomed, 2002, 7(4), 587-594
- [7] Nordstrom RJ, Burke L, Niloff JM, et al. Identification of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) using UC-excited fluorescence and diffuse-reflectance tissue spectroscopy [J]. Lasers Surg Med, 2001, 29 (2): 118-127
- [8] Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, et al, Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy [J]. Cancer Research, 2002, 62:5373-5380
- [9] Shafer-Peltier KE, Haka AS, Fitzmaurice M, et al., Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo [J]. J Raman Spectrosc, 2001, 33:552-563
- [10] Zonios GI, Cothren RM, Arendt JT, et al, Morphological Model of Human Colon Tissue Fluorescence [J]. IEEE, Transactions on Biomedical Engineering, 1996, 43, (2):113-122.