

基于 NIR-SERS 光谱技术分析宫颈癌氧合血红蛋白

熊 洋¹ 司民真^{1*} 高 飞² 张德清¹

¹楚雄师范学院光谱技术应用研究所, 云南 楚雄 675000

²遵义医学院基础医学院, 贵州 遵义 563003

摘要 采用电解法制备新型、高效纳米银膜作为近红外表面增强拉曼散射(NIR-SERS)基底,检测了22例健康女性和22例宫颈癌患者氧合血红蛋白的NIR-SERS光谱。对比宫颈癌患者与健康女性氧合血红蛋白NIR-SERS光谱,发现两者区别明显。利用多变量统计分析方法得到宫颈癌患者与健康女性氧合血红蛋白的NIR-SERS光谱在472、662、720和1209 cm^{-1} 谱峰处区别最为明显,诊断的特异性与灵敏度均为86.4%。由谱峰归属分析得知,宫颈癌患者血液中高铁血红蛋白吡咯环折叠振动、氧合血红蛋白吡咯环的对称变形振动、反对称变形振动和吡咯环间C_mH基团的变形振动等振动模式与健康女性相比有明显的减少。研究表明,NIR-SERS技术结合多变量统计分析方法可以较好地地区分宫颈癌患者和健康女性氧合血红蛋白,有望发展成为一种新型的宫颈癌临床诊断工具。

关键词 光谱学;近红外表面增强拉曼散射;主成分分析;宫颈癌;氧合血红蛋白

中图分类号 O657.3

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201542.0115001

Study on Cervical Cancer Oxyhemoglobin Using Near-Infrared Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

Xiong Yang¹ Si Minzhen¹ Gao Fei² Zhang Deqing¹

¹Application Institute of Spectroscopy Technology, Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan 675000, China

²Basic Medical School, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563003, China

Abstract A new type of Ag nanofilm with high efficiency is prepared and used here, acting as a near-infrared surface-enhanced Raman spectroscopy (NIR-SERS) substrate to detect oxyhemoglobin (OxyHb) for 22 cervical cancer patients and 22 healthy females. NIR-SERS results show that there is striking spectral difference of the OxyHb between healthy females and cervical cancer patients. Meanwhile, principal component analysis (PCA) combined with independent sample *T*-test analysis is employed to analyze the measured NIR-SERS spectra, and it is found that the measured NIR-SERS spectra of the two groups are separated into two distinct clusters in terms of the sensitivity of 86.4% and the specificity of 86.4%. Tentative assignments of the Raman bands of the measured NIR-SERS spectra are also performed, and the results suggest that cancer specific changes at molecular level, including pyrrole ring and vibration mode of the OxyHb molecules are significant. The NIR-SERS detection of OxyHb for cervical cancer patients based on PCA combined with independent sample *T*-test is expected to develop into a new diagnostic tool for cervical cancer.

Key words spectroscopy; near-infrared surface-enhanced Raman spectroscopy; principal component analysis; cervical cancer; oxyhemoglobin

OCIS codes 300.6450; 300.6170; 290.5860; 240.6695

收稿日期: 2014-06-17; 收到修改稿日期: 2014-07-20

基金项目: 国家自然科学基金(11364001, 10864001, 11064001)、云南省应用基础研究计划青年项目(2013FD044)、楚雄师范学院学术后备人才资助项目(13XJRC19)

作者简介: 熊 洋(1987—),男,硕士,助教,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: Victor_xy2014@163.com

* 通信联系人。E-mail: siminzhen@hotmail.com

1 引言

宫颈癌严重威胁着女性健康,是最常见的妇科恶性肿瘤之一^[1]。据统计,全球每年大约有50万女性被确诊为宫颈癌,有近30万人死于宫颈癌^[1-3]。相比发达国家,宫颈癌在发展中国家更为常见,在我国,每年大约有15万宫颈癌新发病例^[4]。目前检查和诊断宫颈癌的主要方法是巴氏涂片和病理检查,但二者均是对病变组织的形态学观察,受个人主观性影响较大,漏诊、误诊现象较为普遍,这些传统的癌症检测方法具有较高的假阴性率^[5-6]。早期宫颈癌经治疗后5年生存率可达90%,但中、晚期宫颈癌患者5年生存率仅为50%左右。研究表明,拉曼光谱技术可以有效地避免个人主观性缺点,从而有望代替传统的医学方法来检测和诊断宫颈癌^[7-14]。

1974年,英国科学家Fleischmann等^[15]在研究吡啶的电化学实验中发现了表面增强拉曼散射(SERS)现象。表面增强拉曼散射效应是指吸附在具有纳米级粗糙度的金属表面的分子,使其拉曼散射信号获得显著增强的一种现象。SERS技术具有检测灵敏度高的优点^[16],能够用激光功率相对较小的激发光来获得理想的拉曼信号,而且对生物分子的损伤比较小,可以很好地消除荧光对拉曼光谱的干扰,目前该技术已经发展到单分子检测水平^[17]。近年来,SERS光谱技术已开始应用于生物分子结构研究,从脱氧核糖核酸(DNA)、缩氨酸到整个蛋白分子及细胞领域^[18-21]。

目前,应用SERS技术诊断癌症已经成为医学领域的一个重要方向,Kamemoto等^[22]利用拉曼光谱技术初步检测了宫颈癌患者鳞状上皮细胞的拉曼光谱,但该实验患者例数少,且没有使用统计方法进行分析,实验结果不足以说明宫颈癌患者与健康人拉曼光谱的区别;Lui等^[23]利用拉曼光谱技术对皮肤癌患者黑色素瘤进行检测,利用统计方法对数据进行分析,得到诊断的特异性和灵敏度都大于90%,统计分析方法的可靠性大于0.8;冯尚源等^[16,24]利用SERS技术对胃癌和鼻咽癌患者血浆进行检测,得到了较好的实验结果;刘仁明^[6,25]等将近红外表面增强拉曼散射(NIR-SERS)光谱技术应用于肝癌患者氧合血红蛋白的检测,发现肝癌患者氧合血红蛋白NIR-SERS光谱与健康人区别明显,且采用统计方法对数据进行分析,得到诊断的特异性和灵敏度分别为90%和96.7%。目前,NIR-SERS光谱技术,以其独特优势成为研究生物大分子结构的有力手段^[26-28]。采用近红外激光光源和NIR-SERS基底,一方面可以降低对生物大分子的光致损伤,另一方面可以有效减小荧光效应、增强生物大分子的拉曼信号。

本实验采用课题组自制的新型、高效、重复性好的二维纳米银膜作为NIR-SERS基底检测宫颈癌患者和健康女性氧合血红蛋白。基于NIR-SERS技术结合主成分分析、独立变量 T 检验和判别分析统计方法分析宫颈癌患者和健康女性的氧合血红蛋白NIR-SERS光谱,研究表明,NIR-SERS技术结合多变量统计分析方法有望发展成为一种新型宫颈癌诊断工具。

2 实验

2.1 实验材料

血液样品:22例宫颈癌患者、22例健康女性血液样本均采集于遵义医学院附属医院。

2.2 实验方法

2.2.1 氧合血红蛋白的提取

22例健康女性和22例被确诊为宫颈癌患者的新鲜血液样品,每个样品约为2 mL,加入200 μL 柠檬酸钠溶液(质量分数为3.2%)作为抗凝剂,用小型台式离心机离心10 min,转速为2000 r/min,提取下层红细胞200 μL 。将提取的红细胞加入1800 μL 去离子水中,使红细胞溶血。使用离心机离心10 min,转速为6000 r/min,离心结束后提取中间层氧合血红蛋白500 μL 。将提取好的氧合血红蛋白放置于冰箱中,在0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存待测。

2.2.2 纳米银膜的制备

参照课题组前期二维纳米银膜的制备方法^[29],先将12片载玻片放入装有400 mL浓硫酸(质量分数为98%)的烧杯中浸泡24 h,取出后用去离子水冲洗干净,再放置于双氧水(质量分数为28%)和氨水(质量分数为30%)混合液(体积比为1:1)中浸泡24 h,之后用去离子水冲洗干净,然后将载玻片放置于酒精中用超声波清洗机再次清洗30 min,用去离子水冲洗3~4次,在高纯 N_2 中干燥待用。称取30 mg硝酸银(质量分数为99.8%)

和 50 mg 聚乙烯醇(PVA, 质量分数为 95%)加入 200 mL 去离子水中, 加热使聚乙烯醇溶解, 待溶液冷却后插入银电极(纯度为 99.9%)电解硝酸银和聚乙烯醇的混合液, 在 30 V 电压下电解 1.5 h 得到正电性纳米银胶, 然后将之前准备好的载玻片放入正电性纳米银胶中进行静电自组装 24 h, 即制得纳米银膜。

2.2.3 氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱测定

将之前准备好的 44 例氧合血红蛋白样品各取出 50 μL 分别涂在所制备的纳米银膜上, 形成直径约为 1 cm 的均匀液体膜, 自然干燥后待测; 同时, 另取 50 μL 加入 1.95 mL 浓度为 0.1 mol/L KBr 的纳米银胶中, 充分混合 10 min。使用便携式拉曼光谱仪(R-3000TM, 美国海洋光学公司)检测氧合血红蛋白拉曼光谱, 采用的激光波长为 785 nm, 积分时间为 16 s, 激光功率密度为 $10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。每个样品在其不同位置测试 3 条谱线, 然后取平均谱线作后续分析。

3 结果与讨论

3.1 正电性纳米银胶透射电子显微镜(TEM)、纳米银膜扫描电子显微镜(SEM)形貌图和紫外-可见吸收光谱

实验制得的正电性纳米银胶和纳米银膜, 其 TEM 形貌图和 SEM 形貌图分别如图 1(a)、(b)所示。图 1(a)中胶态纳米银粒子的平均粒径约为 $(50 \pm 6) \text{ nm}$, 纳米银粒子的粒径分布较为均匀, 且呈圆球状形貌, 该胶态纳米银粒子的等离子体共振峰在 420 nm 左右, 如图 2 所示。当使用的激发光为 420 nm 时, 将会有效地引起拉曼散射共振增强效应^[30]。据报道, 在纯银胶中, 银粒子的典型吸收峰在 395 nm 附近, 随着银粒子粒径的增大, 其相应的紫外-可见吸收光谱将会出现红移的现象^[31-32]。图 1(b)是纳米银膜的 SEM 形貌图, 表面银粒子的粒径约为 200 nm, 相邻纳米银粒子间形成了大小约为 200 nm 的纳米微区, 该纳米微区可使电场增强 $10^{12} \sim 10^{14}$ 倍^[17, 33-34]。如图 2 所示, 纳米银膜的等离子体共振带在 400~900 nm, 延伸到近红外区, 与拉曼检测激发光波长 785 nm 很好地匹配。该波长一方面可以避免氧合血红蛋白分子的光致损伤, 降低荧光效应^[16]; 同时处于纳米银膜的等离子体共振带内, 可以更有效地引起拉曼散射共振增强效应。

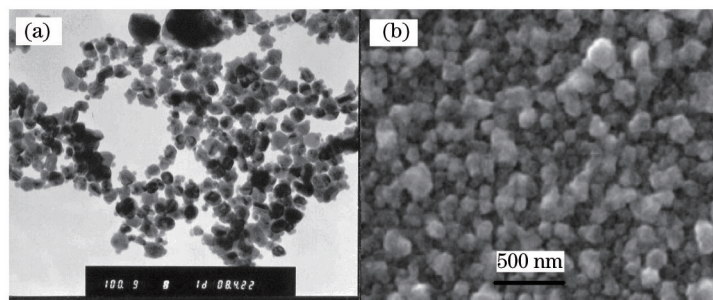


图 1 (a) 利用电解法制得的胶态纳米银粒子的 TEM 形貌图; (b) 利用静电自组装技术制得的二维纳米银膜 SEM 形貌图

Fig.1 (a) TEM image of Ag colloidal nanoparticles; (b) SEM image of Ag nanofilm prepared by electrostatic self-assembly

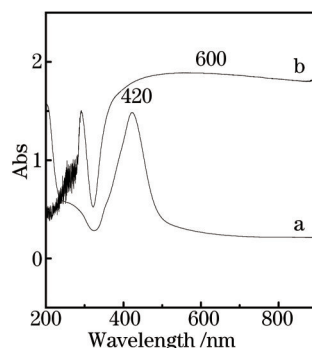


图 2 纳米银膜(谱线 a)和胶态纳米银粒子(谱线 b)的紫外-可见吸收光谱

Fig.2 UV-vis absorption spectra of Ag colloidal nanoparticles (spectrum a) and Ag nanofilm (spectrum b)

3.2 氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱

图 3 中谱线 a 和 b 是一位健康女性氧合血红蛋白分别在纳米银膜上的 NIR-SERS 光谱和正电性纳米银胶

中的 SERS 光谱;谱线 c 和 d 分别是氧合血红蛋白的常规拉曼光谱和银膜的拉曼光谱。从谱线 a 和 b 可以看出,使用纳米银膜检测氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱,其拉曼信号强度比使用银胶基底要强很多,银膜对氧合血红蛋白有很强的增强效果;加入 KBr 作为凝聚剂的银胶拉曼信号虽然有所增强,但还是较弱。谱线 c 是氧合血红蛋白的普通拉曼光谱,基本没有任何有效拉曼信号,这与生物大分子的荧光背景强、不易检测到有效的拉曼信号有关。谱线 d 是银膜表面的拉曼光谱,可以看出银膜拉曼信号很弱,基本没有杂质信号的干扰。

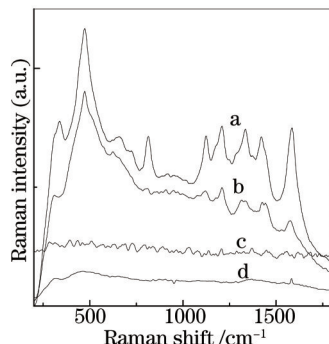


图 3 a: 氧合血红蛋白在银膜上的 NIR-SERS 光谱;b: 氧合血红蛋白和正电性银胶 1:1 混合后的 SERS 光谱;
c: 氧合血红蛋白的普通拉曼光谱;d: 银膜表面的拉曼光谱

Fig.3 a: NIR-SERS spectra of OxyHb adsorbed on Ag nanofilm; b: SERS spectra of OxyHb adsorbed on colloidal Ag nanoparticles;
c: normal Raman spectra of OxyHb; d: Raman spectra of the surface of Ag nanofilm

图 4(a)中,谱线 a 和 b 分别是 22 个健康女性和 22 个宫颈癌患者氧合血红蛋白的 NIR-SERS 光谱。为了更好地对比两组数据,图中谱线经过上下平移处理。从图中可以看出,健康女性氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱强度与宫颈癌患者相比,谱峰强度都要大很多。图 4(b)是 22 个健康女性(谱线 a)和 22 个宫颈癌患者(谱线 b)氧合血红蛋白平均 NIR-SERS 光谱。从图中可以看出,健康女性和宫颈癌患者氧合血红蛋白拉曼光谱共有的谱峰主要是在 472、662、720、815、1124、1209、1336、1424、1584 cm^{-1} ;从谱峰强度可以看出,健康女性氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱强度都比宫颈癌患者要大,尤其在 472 cm^{-1} 处;健康女性氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱在 662、720、812 cm^{-1} 有较明显的拉曼谱峰,而宫颈癌患者在 662、720、812 cm^{-1} 处谱峰基本消失。健康女性氧合血红蛋白平均 NIR-SERS 光谱在 662、720、815、1124、1584 cm^{-1} 的谱峰在宫颈癌患者中分别蓝移到 656、709、812、1121、1579 cm^{-1} ,健康女性氧合血红蛋白平均 NIR-SERS 光谱在 1336 cm^{-1} 的谱峰红移到 1338 cm^{-1} 。

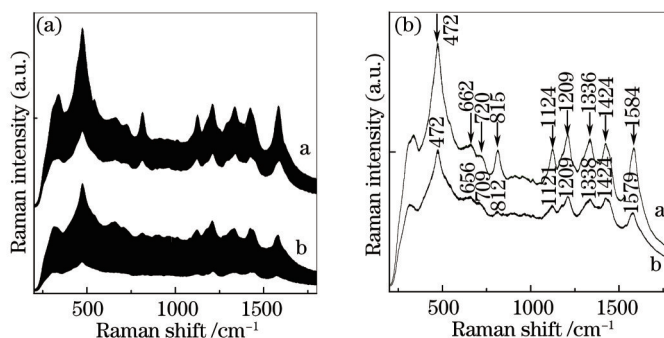


图 4 (a) 22 个健康女性(谱线 a)和 22 个宫颈癌患者(谱线 b)氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱;(b) 22 个健康女性(谱线 a)和 22 个宫颈癌患者(谱线 b)氧合血红蛋白平均 NIR-SERS 光谱

Fig.4 (a) NIR-SERS spectra of OxyHb for 22 healthy females (spectrum a) and 22 cervical cancer patients (spectrum b);
(b) average NIR-SERS spectra of OxyHb for 22 healthy females (spectrum a) and 22 cervical cancer patients (spectrum b)

3.3 氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱的统计分析

为了更准确地区别宫颈癌与健康女性氧合血红蛋白,采用主成分(PCA)分析结合独立变量 T 检验和判别分析统计方法来分析宫颈癌和健康女性氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱。该统计分析方法可以提取几个具有显著差异的变量来反映两组数据的区别,从而得到诊断宫颈癌的特异性和灵敏度,并对诊断的可靠性进行评价。

运用统计分析方法之前,首先对两组拉曼光谱扣除荧光背景,由于光谱中信息主要来自谱峰的相对强度和形状,故将两组拉曼光谱在472、662、720、815、1124、1209、1336、1424、1584 cm^{-1} 的谱峰面积进行面积归一化,面积归一化可以消除由于样品浓度不同和实验条件的微小差异对实验结果的影响^[16]。面积归一化即把所有谱峰的面积相加得到谱峰总面积,然后求出每一个谱峰面积所占面积比。将得到的两组数据输入SPSS软件进行PCA统计分析,将会得到9个主成分得分(PCs)。

使用独立变量 T 检验对9个主成分得分进行分析,发现具有显著差异的主成分得分分别是PC1、PC2、PC3和PC6($p < 0.05$),其对应的谱峰分别是472、662、720和1209 cm^{-1} ,其中最具差异的主成分得分分别是PC1、PC2、PC3($p < 0.35$)。图5(a)、(b)分别是宫颈癌患者和健康女性氧合血红蛋白NIR-SERS光谱最具差异的主成分得分PC1、PC3和PC2、PC3二维散点图。图5(a)为宫颈癌患者和健康女性氧合血红蛋白NIR-SERS光谱主成分得分PC1、PC3得分散点图,图中直线为 $X_{PC1} = 0.15X_{PC3} + 0.12$,利用该直线进行判别分析,其特异性与灵敏度分别为86.4%和77.3%,总判别正确率为81.8%。图5(b)是主成分得分PC2、PC3得分散点图,图中直线为 $X_{PC2} = -0.34X_{PC3} - 0.15$,利用该直线进行判别分析,其特异性与灵敏度分别为77.3%和77.3%,总判别正确率为77.3%。图6是宫颈癌患者和健康女性氧合血红蛋白NIR-SERS光谱主成分得分PC1、PC2和PC3三维散点图,从图中可以看出健康女性和宫颈癌患者分布在空间的不同区域,可以很好地得以区别,虽然有少数重叠。基于健康女性与宫颈癌患者氧合血红蛋白NIR-SERS光谱最具差异的PCA得分进行判别分析,得到的特异性与灵敏度分别为86.4%和86.4%,总判别正确率为86.4%;利用交叉验证得到的特异性与灵敏度分别为81.8%和86.4%,总判别正确率为84.1%。

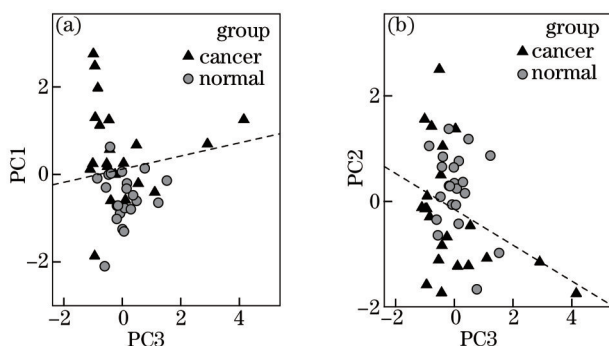


图5 22个健康女性(小球)与22个宫颈癌患者(三角形)主成分得分散点图。(a) PC1、PC3散点图; (b) PC2、PC3散点图
Fig.5 Plots of (a) PC1 versus PC3 and (b) PC2 versus PC3 for 22 healthy females (ball) and 22 cervical cancer patients (triangle)

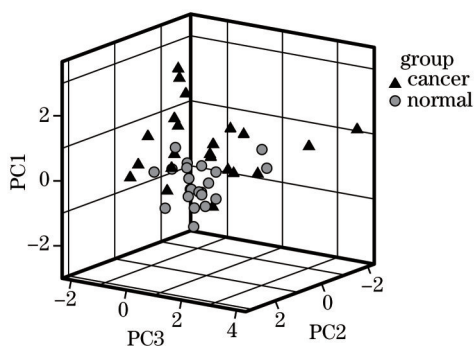


图6 22个健康女性(小球)和22个宫颈癌患者(三角形)主成分得分PC1、PC2、PC3三维散点图
Fig. 6 3D scatter plots of PC1、PC2 versus PC3 for 22 healthy females (ball) and 22 cervical cancer patients (triangle)

图7是健康女性和宫颈癌患者氧合血红蛋白NIR-SERS光谱最具差异的主成分得分PC1、PC2、PC3和PC6利用判别分析方法得到的判别式得分图。从图中可以看出,健康女性判别式得分大多小于0,分布在-4~0区域;宫颈癌患者判别式得分大多大于0,主要分布在0~4区域。故判别式得分可以以0为界限来区分宫颈癌患者和健康女性。图中健康女性和宫颈癌患者判别式得分标准偏差分别为0.909和1.083,宫颈癌患者标准偏差比健康女性大,和图6中健康女性分布较集中,宫颈癌患者分布较松散相对应。

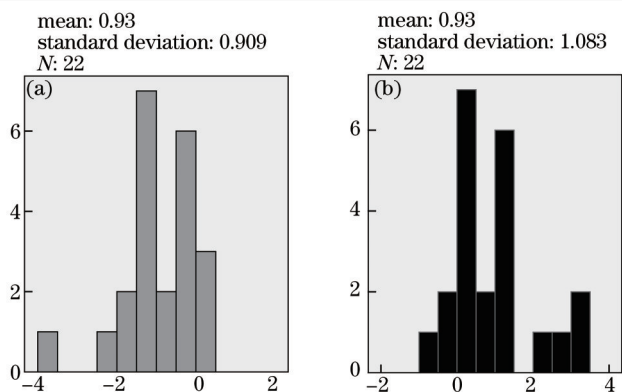


图7 判别式得分图。(a) 22个健康女性; (b) 22个宫颈癌患者

Fig.7 Plots of discriminate scores. (a) 22 healthy females; (b) 22 cervical cancer patients

为验证统计分析方法的可靠性,利用样品的工作特质(ROC)曲线进行评价,ROC曲线将利用统计分析方法诊断宫颈癌的特异性与灵敏度很好地结合在一起,利用曲线与坐标轴所围的面积判断统计分析方法的有效性^[16]。图8是基于统计分析方法得出的健康女性与宫颈癌患者氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱判别结果的 ROC 曲线图,曲线下的面积为 0.85,表明统计分析方法具有较高的可靠性。

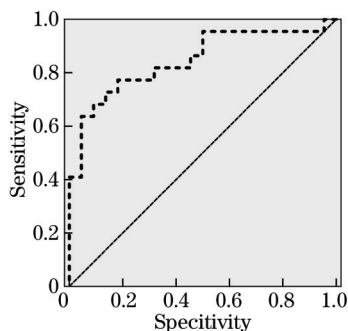


图8 基于统计分析方法得出的健康女性与宫颈癌患者氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱判别结果的 ROC 曲线图

Fig.8 Receiver operating characteristic (ROC) curves of the discrimination result of OxyHb NIR-SERS spectra for healthy females and cervical cancer patients based on statistical analysis

3.4 讨 论

拉曼散射增强效应与基底的关系十分密切,基底制作的好坏直接影响拉曼散射增强效果,尤其与金属纳米颗粒的表面等离子体局域电场增强效果有很大关系^[35-36]。以前多数实验中经常使用银胶作为 SERS 基底,但溶胶有其自身的缺点,如吸附分子必须是可溶的分子;而且金属溶胶稳定性差,加入分析物质后容易形成易沉降的聚集体,溶胶的聚集程度难以控制,因而分析物的光谱重现性较差^[37]。为了避免溶胶稳定性差的缺陷,通常向溶胶中加入一些稳定剂如聚乙烯吡咯烷酮、十二烷基磺酸钠来阻止溶胶的进一步凝聚,但这些稳定剂有时会对 SERS 检测产生干扰^[38-39]。本实验在制作纳米银膜基底的过程中加入无 SERS 活性的材料 PVA 作为修饰剂,PVA 可以很好地将银粒子包裹起来,包裹厚度约为 18 nm^[40],这样一方面可以避免银粒子被氧化,而且可以有效防止银粒子的凝聚;同时氧合血红蛋白吸附在银粒子表面时,并没有与银粒子直接接触,避免了蛋白质被氧化的情况^[41-42]。基于该 NIR-SERS 基底检测了健康女性和宫颈癌患者氧合血红蛋白,光谱重复性很好,等离子体共振带在 400~900 nm,一直延伸到近红外区,与实验采用的 785 nm 激光波长较好地匹配,可以更有效地引起拉曼散射共振增强效应。同时该激光波长可以有效地避免氧合血红蛋白分子的光致损伤,而且可以降低氧合血红蛋白分子的荧光效应。

对比健康女性与宫颈癌患者氧合血红蛋白平均 NIR-SERS 光谱[图 4(b)]可以看到,宫颈癌患者氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱谱峰强度都比健康女性小,其原因主要是肿瘤组织变异性地异常长大,需要大量的养料,其上皮粘膜组织由于微血管不断增生,微血管中氧的含量将大大地减少,导致癌变组织中去氧血红蛋白的增加,而其杂乱的新陈代谢使得肿瘤组织中氧合血红蛋白的含量明显降低,从而在宫颈癌患者氧合血红

蛋白 NIR-SERS 光谱上体现出来^[43]。氧合血红蛋白的普通拉曼光谱的特征峰分别为 1638、1621、1600、1581、1563、1546、1224、1208、1170、997、979、797、754 和 676 cm^{-1} ^[44]；实验中氧合血红蛋白的 NIR-SERS 光谱检测到的拉曼谱峰主要有 1584、1424、1336、1209、1124、815、720、662、472 cm^{-1} ，其中 1584 cm^{-1} 和 1209 cm^{-1} 处的拉曼谱峰正好与氧合血红蛋白的普通拉曼光谱相对应，而且在 1124、815、720、662 cm^{-1} 与氧合血红蛋白普通拉曼光谱 1170、797、754、676 cm^{-1} 处的谱峰基本相对应。由此可以基本确定实验检测的样品属于氧合血红蛋白。为了更好地了解宫颈癌血红蛋白 NIR-SERS 光谱变化的机理，表 1 列出了血红蛋白拉曼谱峰的归属^[45-48]。位于 1584 cm^{-1} 和 1424 cm^{-1} 附近的拉曼谱峰分别由氧合血红蛋白分子乙烯基团($\text{C}_\alpha\text{C}_m$)的反对称、对称伸缩振动引起；位于 1336 cm^{-1} 和 1126 cm^{-1} 附近的拉曼谱峰分别归属于吡咯半环的对称和反对称伸缩振动；位于 1290 cm^{-1} 和 1209 cm^{-1} 附近的拉曼谱峰都归属于吡咯环间 C_mH 基团的变形振动；966 cm^{-1} 和 815 cm^{-1} 附近的拉曼谱峰分别归属于吡咯环的反对称变形振动和呼吸振动；位于 720 cm^{-1} 和 662 cm^{-1} 附近的拉曼谱峰分别归属于氧合血红蛋白分子吡咯环的反对称和对称变形振动；位于 472 cm^{-1} 附近的拉曼谱峰是水合高铁血红蛋白吡咯环折叠振动的特征峰^[48]。

表 1 氧合血红蛋白的 NIR-SERS 光谱谱峰的初步归属^[45-48]

Table 1 Assignments for the NIR-SERS bands of OxyHb^[45-48]

Raman bands of OxyHb / cm^{-1}	Preliminary assignments
472	pyr, fold
662	δ_s (pyr, deformation)
720	δ_s (pyr, deformation)
815	ν (pyr, breathing)
966	δ_{as} (pyr, deformation)
1124	ν_{as} (pyr, half ring)
1209	δ (C_mH)
1290	δ (C_mH)
1336	ν_s (pyr, half ring)
1424	ν_s ($\text{C}_\alpha\text{C}_m$)
1584	ν_{as} ($\text{C}_\alpha\text{C}_m$)

进行 PCA 统计分析过程中，得到健康女性与宫颈癌患者氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱具有显著差异的主成分得分分别是 PC1、PC2、PC3 和 PC6，最具显著差异的是 PC1、PC2 和 PC3。主成分 PC1、PC2、PC3 和 PC6 对应的拉曼谱峰分别是 472、662、720 和 1209 cm^{-1} ，由此可知宫颈癌患者氧合血红蛋白的 NIR-SERS 光谱在 472、662、720 和 1209 cm^{-1} 的区别明显，尤其是在 472、662、720 cm^{-1} 处的 3 个谱峰。由谱峰归属分析得知，这 4 个谱峰分别归属于氧合血红蛋白水合高铁血红蛋白吡咯环折叠振动、氧合血红蛋白吡咯环的对称变形振动、吡咯环的反对称变形振动和吡咯环间 C_mH 基团的变形振动，而且从图 4(b)可以看出，宫颈癌患者氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱谱峰强度都比健康女性小，由此可知宫颈癌患者与健康女性相比，血液中高铁血红蛋白吡咯环折叠振动、氧合血红蛋白吡咯环的对称变形振动、吡咯环的反对称变形振动和吡咯环间 C_mH 基团的变形振动的数量有较明显的减少，前 3 种振动模式的减少更为明显。另外，健康女性氧合血红蛋白平均 NIR-SERS 光谱在 662、720、815、1124、1584 cm^{-1} 处的谱峰在宫颈癌患者中分别蓝移到 656、709、812、1121、1579 cm^{-1} ，健康女性氧合血红蛋白平均 NIR-SERS 光谱在 1336 cm^{-1} 处的谱峰红移到 1338 cm^{-1} ，这些谱峰都与氧合血红蛋白吡咯环和 $\text{C}_\alpha\text{C}_m$ 基团的振动有关，因此与健康女性氧合血红蛋白相比，宫颈癌患者氧合血红蛋白吡咯环和 $\text{C}_\alpha\text{C}_m$ 基团的振动模式和构象发生了变化，这些变化很大可能是由于宫颈癌患者杂乱的新陈代谢以及癌组织或癌细胞的基因产物和代谢产物进入血液引起的^[43,49]。

4 结 论

利用自制新型、高效的纳米银膜基底检测了 22 例健康女性和 22 例宫颈癌患者氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱，发现两者的 NIR-SERS 光谱具有较明显的差异性。同时利用统计分析方法发现宫颈癌患者与健康女

性氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱在 472、662、720 和 1209 cm^{-1} 的谱峰有较明显的区别,尤其是在 472、662 和 720 cm^{-1} 的谱峰。统计分析方法诊断宫颈癌的特异性与灵敏度都为 86.4%。由谱峰归属分析得知宫颈癌患者血液中高铁血红蛋白吡咯环折叠振动、氧合血红蛋白吡咯环的对称变形振动、吡咯环的反对称变形振动和吡咯环间 C_mH 基团的变形振动模式与健康女性相比有较明显的减少,而前 3 种振动模式的减少更为明显,这些变化很大可能是由于宫颈癌患者体内杂乱的新陈代谢以及癌组织或癌细胞的基因产物和代谢产物进入血液引起。NIR-SERS 技术结合多变量统计分析方法可以很好地区别宫颈癌患者和健康女性氧合血红蛋白, NIR-SERS 技术结合多变量统计分析有望发展成为一种新型的宫颈癌临床诊断工具。

参 考 文 献

- 1 F X Bosch, S de Sanjose. Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality[J]. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003, 2003(31): 3–13.
- 2 M Granadillo, I Torrens. Human papillomavirus vaccines: Current status and perspectives[J]. Biotechnologia Aplicada, 2008, 25(1): 1–6.
- 3 D M Parkin, F Bray, J Ferlay, *et al.*. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74–108.
- 4 Lu Xiaomei, Zhang Zhen, Lu Huaiwu, *et al.*. Characteristic spectrum analysis of Raman microspectroscopy in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia tissues[J]. Lingnan Journal of Emergency Medicine, 2009, 14(1): 41–43.
陆晓楣, 张 珍, 卢淮武, 等. 宫颈癌及宫颈重度上皮内瘤变拉曼光谱的特征分析[J]. 岭南急诊医学杂志, 2009, 14(1): 41–43.
- 5 Xiong Yang, Li Yuntao, Guo Yan, *et al.*. Analysis of surface enhanced Raman scattering spectra of oxyhemoglobin for liver cancer with combined multivariate statistics[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2012, 32(9): 2427–2432.
熊 洋, 李云涛, 郭 嫵, 等. 结合多变量统计分析肝癌氧合血红蛋白表面增强拉曼光谱[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(9): 2427–2432.
- 6 R Liu, Y Xiong, W Tang, *et al.*. Near infrared surface-enhanced Raman spectroscopy studies on OxyHb of liver cancer based on PVA-Ag nanofilm[J]. J Raman Spectrosc, 2014, 44(3): 362–369.
- 7 A Mahadevan-Jansen, M F Mitchell, N Ramanujam, *et al.*. Near-infrared Raman spectroscopy for *in vitro* detection of cervical[J]. Precancers Photochem, 1998, 68(1): 123–132.
- 8 A Robichaux-Viehoever, E Kanter, H Shappell, *et al.*. Characterization of Raman spectra measured *in vivo* for the detection of cervical dysplasia[J]. Appl Spectrosc, 2007, 61(9): 986–993.
- 9 U Utzinger, D L Heintzelman, A Mahadevan-Jansen, *et al.*. Near-infrared Raman spectroscopy for *in vivo* detection of cervical precancers [J]. Appl Spectrosc, 2001, 55(8): 955–959.
- 10 C M Krishna, N B Prathima, R Malini, *et al.*. Raman spectroscopy studies for diagnosis of cancers in human uterine cervix[J]. Vib Spectrosc, 2006, 41(1): 136–141.
- 11 M S Vidyasagar, K Maheedhar, B M Vadhiraja, *et al.*. Prediction of radiotherapy response in cervix cancer by Raman spectroscopy: A pilot study[J]. Biopolymers, 2008, 89(6): 530–537.
- 12 C M Krishna, G D Sockalingum, M S Vidyasagar, *et al.*. An overview on applications of optical spectroscopy in cervical cancers[J]. J Cancer Res, 2008, 4(1): 26–36.
- 13 F M Lyng, E O Faolain, J Conroy, *et al.*. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool[J]. Exp Mol Pathol, 2007, 82(2): 121–129.
- 14 P R T Jess, D D W Smith, M Mazilu, *et al.*. Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy[J]. Int J Cancer, 2007, 121(12): 2723–2728.
- 15 M Fleishchmann, P J Hendra, A J Mcquillan. Raman spectra of pyridine absorbed at silver electrode[J]. Chem Phys Lett, 1974, 26(2): 163–166.
- 16 Feng Shangyuan, Pan Jianji, Wu Yan'an, *et al.*. Study on gastric cancer blood plasma based on surface-enhanced Raman spectroscopy combined with multivariate analysis[J]. Scientia Sinica, 2011, 41(7): 550–557.
冯尚源, 潘建基, 伍严安, 等. 基于 SERS 技术结合多变量统计分析胃癌患者血浆拉曼光谱[J]. 中国科学, 2011, 41(7): 550–557.
- 17 H X Xu, J Aizpurua, M Käll, *et al.*. Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering [J]. Phys Rev E, 2000, 62: 4318–4324.

- 18 C Fang, A Agarwal, K D Buddharaju, *et al.*. DNA detection using nanostructured SERS substrates with Rhodamine B as Raman label [J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24(2): 216–221.
- 19 B L Mitchell, A J Patwardhan, S M Ngola, *et al.*. Experimental and statistical analysis methods for peptide detection using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *J Raman Spectrosc*, 2008, 39(3): 380–388.
- 20 X Huang, I H E Sayed, W Qian, *et al.*. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 2115–2120.
- 21 Lin Juqiang, Ruan Qiuyong, Chen Guannan, *et al.*. Research progress of surface enhanced Raman spectroscopy for cancer detection [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2013, 50(8): 080020.
林居强, 阮秋咏, 陈冠楠, 等. 基于表面增强拉曼散射技术的癌症检测研究进展[J]. *激光与光电子进展*, 2013, 50(8): 080020.
- 22 L E Kamemoto, A Misra, S Sharma, *et al.*. Near-infrared micro-Raman spectroscopy for *in vitro* detection of cervical cancer[J]. *Appl Spectrosc*, 2010, 64(3): 255–261.
- 23 H Lui, J Zhao, D McLean, *et al.*. Real-time Raman spectroscopy for *in vivo* skin cancer diagnosis[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(10): 2491–2500.
- 24 S Feng, R Chen, J Lin, *et al.*. Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(11): 2414–2419.
- 25 Liu Renming, Liu Ruiming, Wu Yanchun, *et al.*. Investigations on NIR-SERS spectra of serum for liver cancer based on NIR-SERS substrate[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, 31(6): 0630001.
刘仁明, 刘瑞明, 武延春, 等. 基于新型 NIR-SERS 基底的肝癌血清 NIR-SERS 光谱研究[J]. *光学学报*, 2011, 31(6): 0630001.
- 26 S Y Feng, J Q Lin, M Cheng, *et al.*. Gold nanoparticle based surface-enhanced Raman scattering spectroscopy of cancerous and normal nasopharyngeal tissues under near-infrared laser excitation[J]. *Appl Spectrosc*, 2009, 63(10): 1089–1094.
- 27 S Mahajan, M Abdelsalam, Y Suguwara, *et al.*. Tuning plasmons on nano-structured substrates for NIR-SERS[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2007, 9(1): 104–109.
- 28 S Keren, C Zavaleta, Z Cheng, *et al.*. Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy[J]. *PNAS*, 2008, 105(15): 5844–5849.
- 29 Liu Renming, Zi Xingfa, Wu Yanchun, *et al.*. Studies and preparation of surface enhanced Raman scattering substrate of two-dimensional silver nanofilms[J]. *Chinese J Lasers*, 2009, 36(10): 2657–2661.
刘仁明, 自兴发, 武延春, 等. 二维纳米结构银膜表面增强拉曼散射基底的制备与研究[J]. *中国激光*, 2009, 36(10): 2657–2661.
- 30 G L Liu, L P Lee. Nanowell surface enhanced Raman scattering arrays fabricated by soft-lithography for label-free biomolecular detections in integrated microfluidics[J]. *Appl Phys Lett*, 2005, 87(7): 074101.
- 31 S S Cortes, J V G Ramos, G Morcillo, *et al.*. Morphological study of silver colloids employed in surface-enhanced Raman spectroscopy: Activation when exciting in visible and near-infrared regions[J]. *J Colloid Interface Sci*, 1995, 175(2): 358–368.
- 32 Y Du, Y Fang. Assignment of charge transfer absorption band in optical absorption spectra of the adsorbate-silver colloid system[J]. *Spectrochim Acta*, 2004, 60(3): 535–539.
- 33 K Kneipp, Y Wang, H Kneipp, *et al.*. Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)[J]. *Phys Rev Lett*, 1997, 78(9): 1667–1670.
- 34 S R Emory, S Nie. Screening and enrichment of metal nanoparticles with novel optical properties[J]. *J Phys Chem B*, 1998, 102(3): 493–497.
- 35 D Derkacs, S H Lim, P Matheu, *et al.*. Improved performance of amorphous silicon solar cells via scattering from surface plasmon polaritons in nearby metallic nanoparticles[J]. *Appl Phys Lett*, 2006, 89(9): 093103.
- 36 J T Bahns, A Imre, V K Vlasko-Vlasov, *et al.*. Enhanced Raman scattering from focused surface plasmons[J]. *Appl Phys Lett*, 2007, 91(8): 081104.
- 37 C Jing, Y Fang. Simple method for electrochemical preparation of silver dendrites used as active and stable SERS substrate[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2007, 314(1): 46–51.
- 38 O Siiman, L A Bumm, R Callaghan, *et al.*. Surface-enhanced Raman scattering by citrate on colloidal silver[J]. *J Phys Chem*, 1983, 87(6): 1014–1023.
- 39 P C Lee, D Meisel. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols[J]. *J Phys Chem*, 1982, 86(17): 3391–3395.

- 40 R M Liu, M J Feng, D Q Zhang, *et al.*. A facile route of microwave to fabricate PVA-coating Ag nanofilm used as NIR-SERS active substrate[J]. *App Surf Sci*, 2013, 270: 495-502.
- 41 R M Liu, M Z Si, Y P Kang, *et al.*. A simple method for preparation of Ag nanofilm used as active, stable, and biocompatible SERS substrate by using electrostatic self-assembly[J]. *J Colloid and Interface Science*, 2010, 343(1): 52-57.
- 42 Z Q Tian, B Ren, J F Li, *et al.*. Expanding generality of surface-enhanced Raman spectroscopy with borrowing SERS activity strategy [J]. *Chem Commun*, 2007, 34: 3514-3534.
- 43 R K Jain. Determinants of tumor blood flow: A review[J]. *Cancer Res*, 1988, 48(10): 2641-2658.
- 44 Cen Yan, Zhang Ren, Yao Wenhua, *et al.*. Raman spectral study of nitrosyhemoglobin and several other hemoglobins[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2005, 25(3): 405-408.
岑 剡, 张 人, 姚文华, 等. 一氧化氮血红蛋白等几种血红蛋白的拉曼光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(3): 405-408.
- 45 M Abe, T Kitagawa, Y Kyogoku. Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinato-Ni(II) and meso-deuterated and ^{15}N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis[J]. *J Chem Phys*, 1978, 69(10): 4526-4534.
- 46 S Z Hu, K M Smith, T G Spiro. Assignment of protoheme resonance Raman spectrum by heme labeling in myoglobin[J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 118(50): 12638-12646.
- 47 R Geßner, C Winter, P Rösch, *et al.*. Identification of biotic and abiotic particles by using a combination of optical tweezers and *in situ* Raman spectroscopy[J]. *Chemphyschem*, 2004, 5(8): 1159-1170.
- 48 T Yamamoto, G Palmer, D Gill, *et al.*. The valence and spin state of iron in oxyhemoglobin as inferred from resonance Raman spectroscopy[J]. *J Biol Chem*, 1973, 248(14): 5211-5213.
- 49 Liu Shupeng, Zhu Hongfei, Chen Na, *et al.*. Surface enhanced Raman scattering spectrum analysis of nude mouse serum with Au nanoparticles active substrate[J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(5): 0504004.
刘书朋, 朱鸿飞, 陈 娜, 等. 金颗粒为活性基底的裸鼠血清表面增强拉曼散射光谱分析[J]. *中国激光*, 2012, 39(5): 0504004.

栏目编辑: 吴秀娟