

实时拉曼光谱分析技术及其在临床早期癌症检测中的应用

王爽¹, Haishan Zeng^{2,3*}

¹西北大学光子学与光子技术研究所, 陕西 西安 710069;

²Imaging Unit-Integrative Oncology Department, BC Cancer Agency Research Centre, Vancouver, British Columbia V5Z 1L3, 加拿大;

³Photomedicine Institute, Department of Dermatology and Skin Science, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V5Z 4E8, 加拿大

摘要 拉曼光谱分析技术可以在分子水平上研究物质分子结构和生化组成信息,具有快速、准确、无创(或低创)等优点,已成为临床早期癌症检测和组织病理生理分析的重要工具。近年来,激光技术、光纤探测器件和光电检测技术的发展,不仅极大促进了新型拉曼光谱分析仪器与技术的研发,更进一步扩展了其临床应用的广度和深度,彰显出其独特的科学内涵与应用价值。对临床拉曼光谱分析技术的理论基础进行了阐述,归纳总结了临床快速拉曼光谱分析集成系统设计思路。在此基础上,以作者相关研究工作为例,探讨了拉曼光谱分析技术在临床癌症早期检测与病理分析中的应用特点,为推动相关基础研究及技术创新提供有益参考。

关键词 医用光学;拉曼光谱;早期癌症诊断;临床检测仪器;皮肤癌;肺癌

中图分类号 O433

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207002

Real-Time *in vivo* Raman Spectroscopy and Its Clinical Applications in Early Cancer Detection

Shuang Wang¹, Haishan Zeng^{2,3}

¹Institute of Photonics and Photon-Technology, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China;

²Imaging Unit-Integrative Oncology Department, BC Cancer Agency Research Centre, Vancouver, British Columbia V5Z 1L3, Canada;

³Photomedicine Institute, Department of Dermatology and Skin Science, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V5Z 4E8, Canada

Abstract Raman spectroscopy (RS) is a unique analytical technique that probes molecular vibrations, and provides specific information about the structure and conformation of biomolecular constituents in biological tissues. Its capabilities for fast, accurate, and noninvasive/minimally invasive analysis have facilitated clinical applications in early cancer detection and pathophysiological investigations. Recent technology advancement in lasers, optical fiber probes and photoelectric devices has resulted in new rapid Raman spectroscopy systems with significantly better performance for real-time clinical measurements. Thereby, the scope and depth of its clinical usages have been expanded and deepened with the manifestation of its scientific connotation and diagnostic value. This short review provided an introduction to the theory and technology behind the development of integrated real-time Raman system

收稿日期: 2017-10-08; 收到修改稿日期: 2017-12-12

基金项目: National Cancer Institute of Canada (011031,015053,020352)、Canadian Institutes of Health Research (PPP-79109,PP2-111527,MOP130548,201603PJT-364146-PJT-CAAA-60404)、国家自然科学基金(11404258)、陕西省教育厅科研计划(15JS102)、陕西省重大基础科研项目(2016ZDJC-15)

作者简介: 王爽(1983—),男,博士,副教授,硕士生导师,主要从事生物医学光子学方面的研究。

E-mail: swang@nwu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: hzeng@bccrc.ca

for *in vivo* cancer detection. The perspective of its clinical utility, exemplified with skin and lung cancer detection, was presented with the intention of providing a useful reference for relevant basic research and technical innovation.

Key words medical optics; Raman spectroscopy; early cancer detection; clinical instrument; skin cancer; lung cancer

OCIS codes 170.5660; 180.5655; 150.2520

1 引 言

作为生命科学与光学相互交叉、相互渗透的新兴学科,生物医学光子学的研究内容是光与生物组织之间的相互作用,包括光在生物组织中的运动学(如传播)和动力学(如探测)问题。当光与生物组织相互作用时,发生反射、吸收、荧光、散射(包括弹性散射与拉曼散射)等光学效应和现象。通过记录并对这些光学现象进行分析,在微观领域,可从分子水平来理解疾病,更好地对抗疾病、预防疾病;在宏观领域,可实现重大恶性疾病的早期诊断、早期治疗,避免病情恶化^[1-2]。

拉曼光谱分析技术作为一种快速、定量、无损的光学检测方法,可以获得丰富的分子结构特征和物质组成信息,在生物医学基础研究与临床重大疾病早期诊断应用中具有与其他光学方法不同的独特优势^[3-7]。主要包括:1)可以实现生物组织无接触、无损光谱测量;2)能在分子水平上快速研究物质构成与结构;3)样品无需制备,能够在活体组织(细胞)上无标记检测;4)特别适合含水量较大的生物组织振动光谱信息的检测分析;5)结合内窥镜、显微镜等光学装置,具有广泛的临床应用前景。

本文首先对光与生物组织相互作用及拉曼散射效应机理进行简要概述,其次概述了临床快速拉曼光谱分析集成系统的构成及其数据分析方法,并以作者自身相关研究工作进展为例,阐述了拉曼光谱分析技术在临床癌症早期检测、病理特性分析中的应用。

2 理论基础

如图1所示,当一束光入射到组织表面时,由于组织折射率与周围介质(空气)折射率不匹配,在入射表面同时发生镜面反射与透射。透射进入组织内部的大部分光子,会被散射和吸收,产生不同类型的光学效应。当光子在组织内部传输时,一部分光子经历多次散射后溢出组织表面,发生漫反射。生物分子吸收光子能量后,可由基态跃迁至第一或第二电子激发态中各个不同振动能级和转动能级,处于激发态的分子以无辐射弛豫的形式降至第一电子激

发态的最低振动能级,然后再由此最低振动能级以辐射弛豫的形式跃迁至基态中各个不同的振动能级,产生荧光现象^[8]。当光子被生物分子散射时,除了与入射光频率相同的弹性散射成分(瑞利散射)外,还存在一系列波长发生变化的非弹性散射成分,即拉曼散射。这些光与生物组织相互作用后所产生的光学现象,可以单独/联合用于提取生物组织形貌、结构与生化组成特性^[3,5,8]。

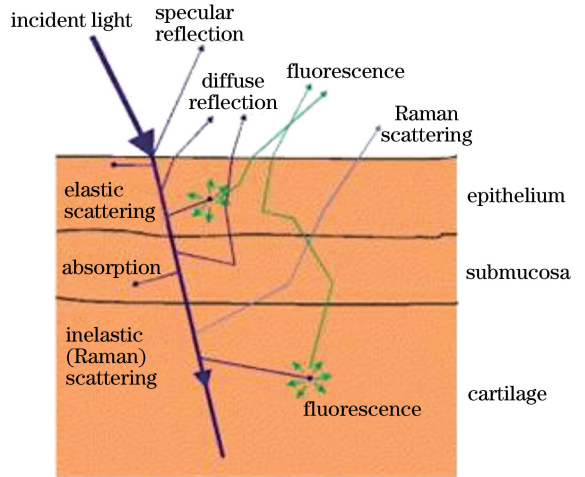


图1 光与生物组织相互作用原理示意图
(以光在肺组织内的传输为例)^[5]

Fig. 1 Schematic of the potential light-tissue interactions, shown specifically in lung tissue^[5]

当入射光子与分子发生非弹性碰撞(拉曼散射)时,光子与分子之间发生能量交换,不仅光子运动方向发生改变,同时光子转移一部分能量给散射分子,转变为分子振动或转动能量,或者从散射分子吸收一部分能量,导致光子波长/频率发生改变。光子得到能量的过程对应于波长减小(频率增大)的反斯托克斯拉曼散射;光子失去能量的过程对应于波长增大(频率减小)的斯托克斯拉曼散射。由其量子能级图(图2)可以看出^[9],斯托克斯和反斯托克斯与瑞利线之间的能量差分别为 $h(\nu_0 - \Delta\nu) - h\nu_0 = -h\Delta\nu$ 和 $h(\nu_0 + \Delta\nu) - h\nu_0 = +h\Delta\nu$ (h 为普朗克常数, ν_0 为激发光频率, $\Delta\nu$ 为拉曼频移),数值相等,符号相反,表明两种拉曼散射光谱对称分布于瑞利线两侧^[9-12]。反斯托克斯谱线强度比斯托克斯谱线强度小,原因在于反斯托克斯拉曼散射的初始态能级位

于振动激发态,根据玻尔兹曼分布,在通常情况下,振动激发态电子分布数小于基态分布数^[13]。此外,从图2还可看出, $h\Delta\nu = E_n - E_0$ 与近红外吸收光谱能级差相同,拉曼散射频移与近红外吸收峰位置相

互对应。并且,对于同一分子,其分子振动能级差 $E_n - E_0$ 不变。因此,不管激发光频率 ν_0 如何选择,拉曼频移 $\Delta\nu$,即散射光相对于激发光波数的差值保持不变,只与分子振动能级之间的跃迁相关。

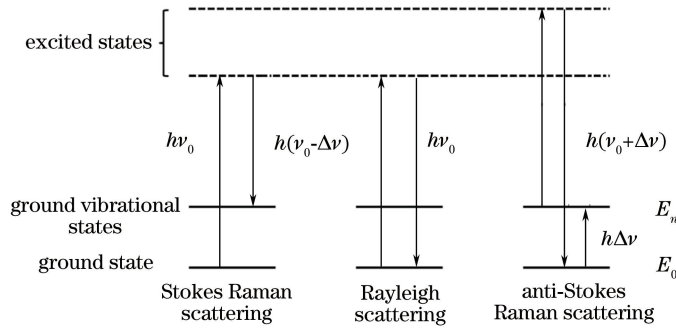


图2 拉曼散射原理示意图

Fig. 2 Schematic of Raman scattering

根据拉曼散射原理可知,拉曼频移与物质分子的振动和转动能级有关。不同物质有不同振动和转动能级,因而有不同的拉曼频移。因此,拉曼频移是表征物质分子振动、转动能级特性的一个物理量,也是利用拉曼光谱进行物质分子结构分析的依据^[14]。拉曼光谱图中含有丰富的分子指纹信息,可以通过拉曼峰频移的位置分析物质生化组成特性;根据拉曼峰位改变确定样品张力/应力;根据拉曼散射光的偏振特性,分析晶体的对称性及其取向;根据拉曼峰的一半全宽量化评价晶体质量;在激发光功率一定的条件下,拉曼谱峰强度与样品内部生化分子浓度之间存在正比关系。与其他光谱分析技术相比,拉曼光谱分析技术应用于生物医学检测,除了具有非侵入、无损伤和特异性高等特点外,通过对比正常与病变组织的拉曼光谱信息,在如实反映组织生化组成的基础上,不但可以用于探讨疾病发生与治疗机制,而且更易实现临床重大恶性疾病的早期量化诊断^[15-20]。

3 仪器系统及数据分析方法

3.1 常用光学装置

激光光源是拉曼光谱仪的重要组成部分。由于其单色性好,激光是最佳的拉曼激发光源。临床快速拉曼光谱分析集成系统所用激光光源,在保证输出波长与功率稳定的前提下,光谱线宽需优于 $30\text{ GHz}(1\text{ cm}^{-1})$,输出功率最低为 100 mW ^[6,21]。这样的光谱线宽保证了激发光谱线在频域空间内不会对瑞利线附近的拉曼光谱信息产生影响,并可有效提高光谱分辨率^[22]。同时,为了实现激光柔性传

输,使其更适用于临床应用环境,需要对激光进行光学处理并耦合进入光纤,耦合过程中激光聚焦光斑尺寸需小于光纤芯径,发散角小于光纤孔径角,以满足光纤传输全反射条件。根据经典电磁场理论,一定激光功率条件下,拉曼散射光强度除了与分子散射截面成正比外,还与激发光波长的四次方成反比。因此,选择合适波长的激光用于活体生物组织光谱激发,对于临床光谱分析测量尤其重要。紫外光照射会引起组织光化学损伤,可见光照射会激发强烈的组织自体荧光,因此,临床拉曼光谱分析装置常使用近红外光作为激发光。相比于紫外光与可见光,近红外光具有更为优越的组织穿透性,从而可实现更大区域内组织光谱的激发。而且,低功率近红外光能产生较少的组织光化学损伤与自体荧光^[23]。常用近红外激发光波长为 785 nm 和 830 nm 。 785 nm 激光条件下,结合近红外波段优化CCD探测器,光谱探测范围可至 3200 cm^{-1} 。临床上也常采用 1064 nm 激光作为激发光源,达到进一步减弱样品荧光背景的目的。在此波长条件下,由于波长增加以及现有仪器性能限制,需要根据具体应用条件增大激光输出功率或相应延长光谱测量时间^[24]。相比于固体激光器、气体激光器(He-Ne)等激光器,近红外半导体激光器以其转换效率高、寿命长、结构紧凑、可靠性高等特点,在临床拉曼光谱检测分析中得到了广泛应用^[25]。

光纤直径仅有数百微米,并具有良好的机械灵活性,它不仅能够有效地将激发光能量传输到探测区域,并且能够收集反射、荧光和拉曼光谱信息,特别适合于管、腔器官早期癌症检测^[26-29]。不同种类

的光纤探测器件(FOP)已成为快速拉曼光谱分析集成系统的重要组成部分(图 3)。由一根多模光纤构成的简易 FOP 结构,既能实现激发光传输,又能实现散射光信号收集。但是,纤芯材料会产生与光纤长度成正比的拉曼背景散射,而其包层与保护层区域又会产生较强的背景噪声,这为探测分析结果带来了很强的干扰^[30-31]。为了减少背景噪声并提高光谱信息收集效率,通常将激发光传输与信号光收集功能相互独立,即利用单根或多根光纤结构实现激发光传输,并在保证最佳探测距离的前提下,尽可能多地增加收集光纤束中的光纤数量。由于 FOP 信号收集效率直接取决于光纤束内光纤的数量、大小、间距、数值孔径(NA 值)以及探测距离等因素^[32-33],因此,实时快速拉曼光谱分析系统光纤探头的构建

方法需考虑以下因素^[6]:

1) 光纤纤芯材料、包覆层、保护层,以及镀膜的材料选择和加工工艺等因素都会引起 FOP 背景噪声,其中,无水熔融石英纤芯、二氧化硅包覆层、丙烯酸酯镀膜与黑色尼龙保护层具有最低量级的背景噪声;

2) 聚焦光学透镜与锥形尖端光纤探头能够有效提高信号光收集效率,但是,锥形尖端探头的光谱测量效果与周围环境介质折射率直接相关;

3) 使用具有较高 NA 值的光纤和干涉滤光片组合会极大地降低光纤探头的应用效果,因此,FOP 顶端滤波是控制石英背景噪声的最有效方法;

4) 信号收集端光纤束的整体芯径尺寸决定了探测拉曼光谱信号的强度,因此,需要将尽可能多的光纤集成为一个紧密排布的六边形区域用于信号收集。

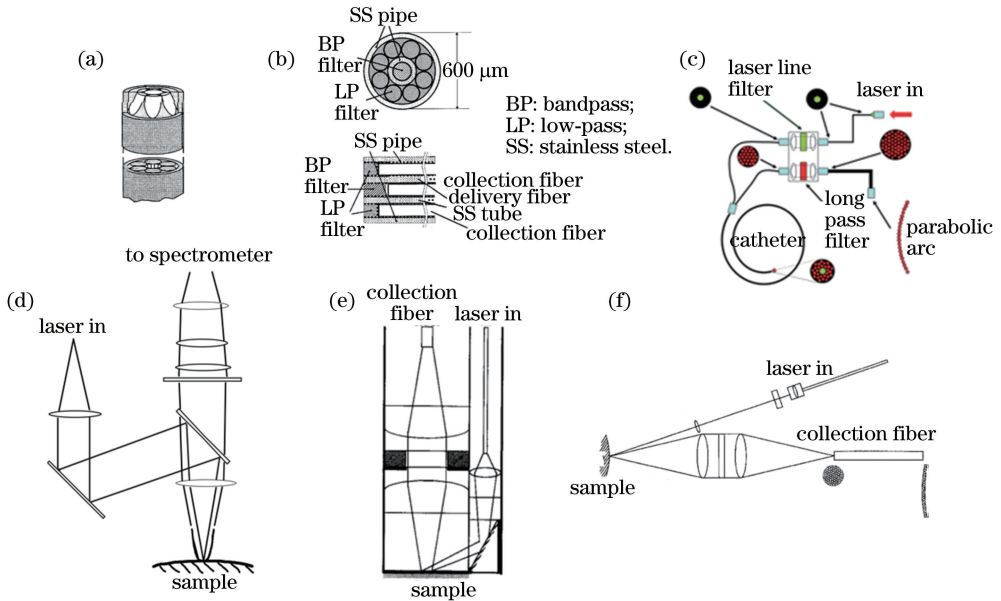


图 3 用于内窥镜系统和生物组织光谱检测的拉曼光纤探头设计示意图^[5]。(a)装有直线型滤镜的斜角收集光纤;(b)前置滤镜光纤探头;(c)顶端镀膜滤波、后端安装滤波模块的内窥镜拉曼光谱分析系统;(d)基于复合抛物面聚光器件的拉曼光纤探头;(e)用于宫颈恶性疾病检测的拉曼光纤探头;(f)用于皮肤恶性疾病检测的拉曼光纤探头

Fig. 3 Raman probe designs for endoscopic and open-field biomedical applications^[5]. (a) Bevelled collection fibers with in-line filter; (b) probe with front mounted filtering; (c) lung endoscopic Raman probe with first stage filtering coating on distal tip and second stage high performance filtering at proximal end; (d) compound parabolic concentrator Raman probe; (e) Raman probe for cervical disease detection; (f) Raman probe for skin disease detection

大型商用拉曼光谱仪为了满足各类科研需求,通常具有较高的光谱分辨率(5 cm^{-1}),虽然具有较高的光谱分辨率,但是由于测量方式和仪器安装的要求,不适合临床现场使用。且临床实际应用中一般希望狭缝处的光纤尺寸尽量大,从而可以增加光纤探头拉曼光谱信息收集效率。通常考虑到生物组织拉曼光谱峰较宽,因此, 8 cm^{-1} 的光谱分辨率,是平衡光谱分辨率和光纤探头收集效率的最佳选择。

另外,需要设计研发具有一定便携性、耐用性,并符合相关医疗器件规范的集成化拉曼光谱分析系统^[15]。采用高通量衍射光栅与高量子效率 CCD 探测器,搭建的色散型拉曼光谱系统(DLRS)可在短时间内实现较高信噪比的光谱测量与分析,特别适合临床病变诊断^[34-35]。传统 DLRS 通常利用衍射或反射式光栅实现波长选择,而采用声光可调滤光器(AOTF)会进一步提高波长选择的速度与精

度^[36]。但是, AOTF 需要与单元探测器件配合使用, 在大波数范围内的扫描总时间还是过长, 不利于其在临床实时条件下的应用^[37]。因此, 目前临床实际应用的拉曼光谱分析装置, 与其在 20 年前的整体设计没有太大区别。1997 年, 第一台采用 830 nm 激光作为激发光, Y 形光纤作为探测装置, 全息透射光栅与 CCD 作为光谱记录分析器件的医用 DLRS 装置研发成功, 可在数秒内实现动脉硬化斑块的光谱分析检测^[38]。全球首例用于临床活体皮肤光谱分析的快速高通量 DLRS, 由加拿大不列颠哥伦比亚

亚癌症研究中心 Haishan Zeng 教授研发成功, 并实现了皮肤及其恶性疾病的早期诊断与筛查^[39]。在该系统研发过程中, 为了有效提高系统信噪比, 利用硬件校正的方式, 改变传统光纤束与光谱仪狭缝连接处耦合截面形状, 将多束光纤由近似狭缝直线排列转变为弧面排列形式[图 4(b)]^[40-41]。校正之后, 系统信噪比相较于传统 CCD software binning 法提高了 16 倍, 并在 1 s 内实现活体皮肤组织光谱检测与分析, 为皮肤恶性疾病的早期诊断奠定了基础^[6,42]。

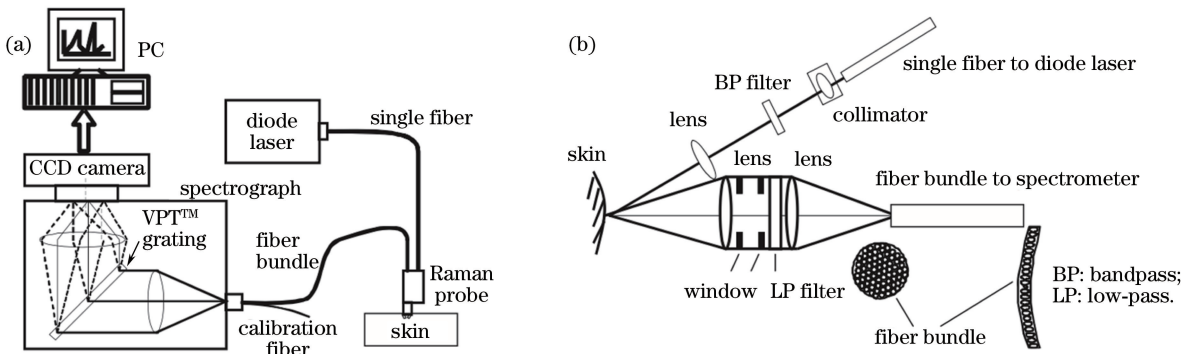


图 4 (a) 用于皮肤恶性疾病早期检测的实时拉曼光谱分析系统结构示意图; (b) 光纤探头结构设计示意图^[43]
 Fig. 4 (a) Diagram of the integrated real-time rapid Raman spectrometer system for skin cancer detection;
 (b) diagram of the specially designed skin Raman probe^[43]

3.2 主要数据分析方法

拉曼光谱含有丰富的分子指纹信息, 能够从峰位、峰值等光谱特征分析组织的生化组成与结构特征。在对大量拉曼光谱数据进行分析的过程中, 结合一定的数据统计方法, 处理多组拉曼光谱数据, 更易获得不同类型生物组织差异化光谱特征。生物医学检测中所采集到的拉曼光谱, 常常伴随生物组织强荧光背景, 需测量仪器自身背景噪声以及来自环境的干扰信息^[44]。其中, 荧光背景噪声是获得高质量拉曼光谱的最大威胁。为了有效减小荧光背景对拉曼信息的干扰, 并准确判定其峰强、峰位等基本光谱参量, 常根据光谱信号与噪声频率、噪声统计特性之间的差异, 选择不同的滤波措施和数据处理方法^[45-48]。其中, 温哥华 (Vancouver) 算法是一种典型的多项式拟合基线校正方法^[48]。该方法从光谱中选择拟合数据点, 再根据最小二乘原理迭代计算这些拟合数据点的最佳逼近函数, 从而准确拟合背景荧光曲线并将其扣除, 获得纯净的拉曼光谱。尽管类似的多项式拟合方法无法完全消除荧光噪声, 且伴随一定的拉曼信息损失, 但已被广泛应用于活体生物组织

的光谱检测与分析。对于信噪比较差的拉曼光谱曲线, 还可针对光谱进行二阶导数运算, 从而达到降低重叠谱带干扰和消除基线漂移的目的^[49-51]。与原始光谱相比, 二阶求导后拉曼峰半峰全宽会变小, 可明显区分原始信号中无法识别的临近峰位, 但是, 二阶求导后会放大背景噪声, 降低光谱测量精度^[49]。在有效剔除背景噪声干扰后, 利用数据统计分析方法对组织内部生化组成与结构信息进行定性、定量归类分析, 并以此为依据对病理变化状态进行准确鉴定。通常采用数据归类分析方法, 将大量的光谱数据约化为可管理且含有丰富信息的形式, 主要包括主成分分析 (PCA) 与聚类分析方法。这些方法都依赖于一个基本假设, 即混合物的拉曼谱可以表示为混合物所含各个成分的拉曼谱的线性组合。PCA 应用正交变换, 将原变量用新互相正交综合指标来代替, 在集合上表现为将原坐标系转换成相互独立的正交坐标系, 再用少数几个新变量的线性组合取代原变量, 从而达到对多维变量系统进行降维处理的目的^[52-54]; 聚类分析方法的基本思想是通过不停迭代判别光谱测量结果相似度, 表征多个光谱中所含相同拉曼光谱成分的多少, 进而代表测

量光谱样品所含相同化学功能基团的多少^[55-58]。

4 快速拉曼光谱分析技术用于皮肤癌早期检测

皮肤是人体最大的器官,位于身体最外层,对人体有保护作用,但长期紫外线照射会导致皮肤癌变。皮肤癌主要包括恶性黑色素瘤(MM)和非黑色素皮肤癌(NMSC),后者主要包括基底细胞癌(BCC)和鳞状细胞癌(SCC)。NMSC仅在局部呈浸润性生长,很少发生转移。MM具有易转移、生长迅速、恶性程度高和预后不良等特点,是一种常见致命性皮肤癌症^[59]。我国虽属MM低发区,但近年来发病率却以3%~8%逐年增加^[60]。由于其危险性高,早期诊断对其治愈具有重要意义。当MM被早期诊断并外科切除后,患者5年生存率可达95%,不需进一步治疗;但如果确诊时已到晚期,患者5年生存率仅为20%^[61]。在临床MM诊断中,根据其表面特性和生长特性,皮肤科医生总结出了ABCD规则^[62],然而,即使是经验丰富的皮肤科专家,单纯依赖ABCD规则对各种病变分类也达不到81%的准确率^[63]。因此,皮肤活检仍然是MM准确诊断的黄金标准。但是临床组织活检取材不合规范或未取到病变组织,易造成诊断困难或漏诊。其次,患者和医生要等待较长时间(3天以上)才能得到诊断报告,对急需确诊者并不适用。为了避免人为判断失误,加快诊断进度,需要研究一种快速实时的定量化床旁诊断方法,用于皮肤癌变的早期诊断。

实时拉曼光谱集成分析系统结构如图5所示。

该系统主要由半导体激光器(785 nm 波长,300 mW 输出功率,Model 8530,SDL,USA)、光纤及光纤束传导装置、手持式光谱探头、全息光栅光谱仪、CCD 相机以及计算机构成。其中,整个光谱分析系统由近红外优化的背照式深耗尽 CCD 芯片(LN/CCD-1024EHRB,Princeton Instruments,USA)与配有全息光栅(HSG-785-LF,Kaiser,USA)的透射式成像光谱仪(HoloSpec-f/2.20NIR,Kaiser,USA)组成。应用过程中,波长为785 nm的半导体激光通过200 μm芯径光纤,经过带通滤波片[(785±2.5) nm]以及聚焦透镜照射到组织表面,形成直径约3.5 mm的激发光斑,其光谱测量深度约1 mm^[39,63-64]。经组织散射后的信号光(包括拉曼散射信号与组织荧光背景),通过光谱探头收集并经光纤束传导至全息光栅光谱仪,CCD相机记录经光栅分光后形成的光谱分布,并由计算机进行后续数据分析。为了提高系统光通量,设计过程中需有效匹配光谱仪 f 值($f = 2.2$)与光纤数值孔径($NA = 0.22$)。此外,特殊设计的光纤束结构,起到了减小光谱仪像差和提高系统信噪比的作用。在信号收集端,由58个100 μm芯径的低OH⁻光纤组成的光纤束,呈直径为1.3 mm的圆形分布;在光谱仪连接端,光纤排列为弧面形状^[44,65]。由光谱校准程序和实时光谱数据处理程序所构成的集成软件,不但能够进行光谱强度校准,而且可以利用5阶多项式拟合方法有效去除荧光背景噪声,实现500~1800 cm⁻¹光谱范围内最小分辨率为8 cm⁻¹的组织拉曼光谱检测^[44]。

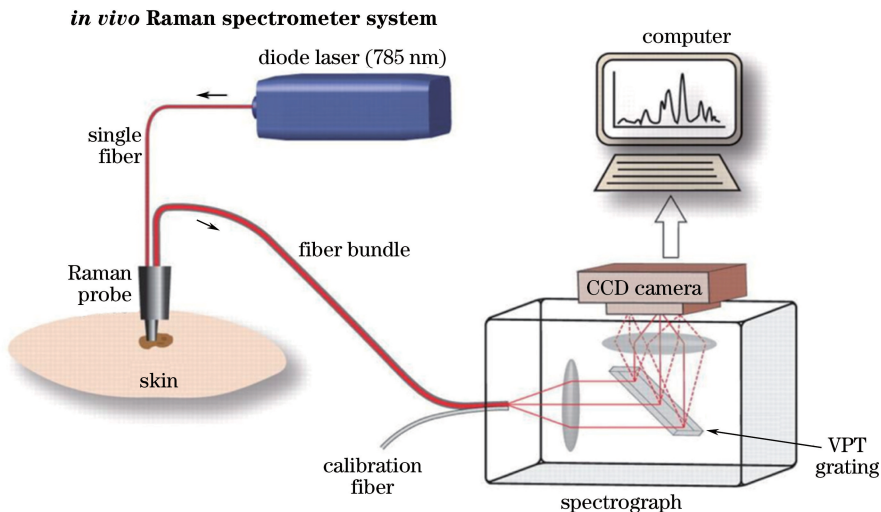


图5 用于皮肤肿瘤临床诊断的实时拉曼光谱集成分析系统结构图^[42]

Fig. 5 Schematic configuration of the real-time Raman system for skin cancer diagnosis^[42]

临床拉曼光谱测量过程中,手持式光谱探头垂直于组织/病灶表面接收拉曼信号,一般而言,每个可疑病灶测量1次,但对于形态不均匀的病灶(如MM,SCC),在其内部不同位置分别测量3次,单次光谱测量时间一般为1s。此外,同时测量病灶附近5cm范围的正常皮肤组织光谱信息作为参考。临床共获得1022例不同皮肤病变的拉曼光谱^[42]。这些光谱数据先按其光谱曲线下的面积进行归一化,再根据不同病变种类进行数据平均,用以代表某一病变类型特征光谱信息^[42],如图6所示。从图中可以看出,大部分皮肤病变拉曼光谱的谱峰位置和光谱形状基本一致,主要差异表

现在谱峰相对强度变化,其中 1445 cm^{-1} 峰(酯类 CH_2 剪切振动)的强度最大,其他主要的拉曼谱峰分布于 855 cm^{-1} (脯氨酸)、 936 cm^{-1} (胶原蛋白脯氨酸)、 1002 cm^{-1} (苯基丙氨酸)、 1271 cm^{-1} (蛋白质Amide III)、 1302 cm^{-1} (酯类)、 1655 cm^{-1} (蛋白质Amide I)、 1745 cm^{-1} (酯类)等波数位置处^[66-67]。可以看出,尽管拉曼光谱归属和相对强度之间的差异反映了不同病变组织内部生化物质组成差异,但是没有任何一个拉曼谱特征峰或谱带能够特异性区分皮肤病变的具体种类^[42]。在此情况下,需要利用多变量分析方法,对数据进行降维,并提取探测光谱范围内的主要信息。

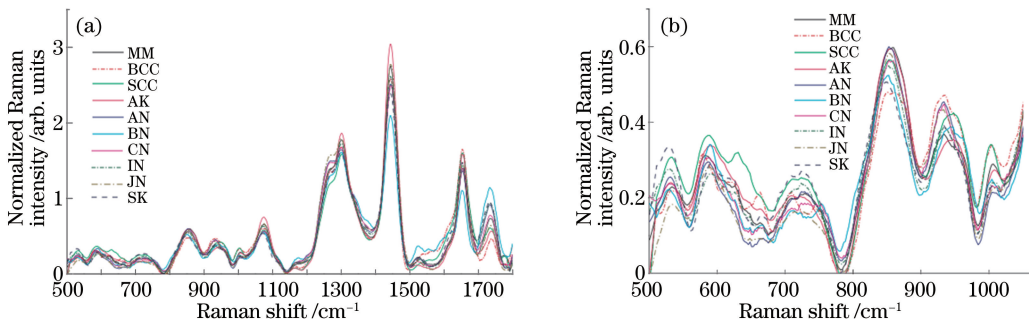


图6 临床所测不同皮肤病变组织平均光谱^[42]。(a)全波段($500\sim 1800\text{ cm}^{-1}$)光谱;(b)低波数范围($500\sim 1055\text{ cm}^{-1}$)光谱。

AK,光化性角化病;AN,非典型痣;BCC,基底细胞癌;BN,蓝色痣;CN,复合痣;
IN,真皮内痣;JN,交界痣;MM,恶性黑色素瘤;SCC,鳞状细胞癌;SK,脂溢性角化病

Fig. 6 Mean Raman spectra of different skin lesions^[42]. (a) Full-range spectral results displayed from 500 cm^{-1} to 1800 cm^{-1} ; (b) spectral results plotted for lower frequency range only ($500\text{--}1055\text{ cm}^{-1}$)

show variability according to lesion diagnosis. AK, actinic keratosis; AN, atypical nevus; BCC, basal cell carcinoma; BN, blue nevus; CN, compound nevus; IN, intradermal nevus; JN, junctional nevus; MM, malignant melanoma; SCC, squamous cell carcinoma; SK, seborrheic keratosis

利用多变量分析方法对大量光谱数据进行归类处理,将广义判别分析(GDA)技术与PCA相结合,建立PC-GDA数据处理方法,在有效预处理原始光谱数据且保留其足够特征的前提下,对数据进行降维处理,提高光谱特征判别的准确性^[42,62,68-69]。其次,运用偏最小二乘法(PLS)提取光谱矩阵中相互正交的成分,反映光谱信息与物性变量间的联系,预测样品内部组分浓度^[70-71]。在应用PC-GDA和PLS方法对临床光谱数据进行分析时,基于交叉验证(LOO-CV)方法检验算法预测能力,并采用受试者工作特征(ROC)曲线方法,对所构建的光谱测量与数据分析方法进行评价^[72-74]。ROC曲线通过改变诊断阈值,将灵敏度与特异性以图示的方式加以描述,以敏感性为纵坐标代表真阳性率,以1和特异性的差值为横坐标代表假阳性率,可准确反映某一分析方法得到的特异性和灵敏度之间的关系,是诊

断算法准确性的综合代表之一。ROC曲线越靠近左上角,分析的准确性越高。此外,也可通过计算得出ROC曲线下面积(AUC),AUC越接近于1,说明诊断效果越好。AUC为0.5时,说明诊断方法完全不起作用,无诊断价值。数据分析结果表明(图7),快速拉曼光谱分析技术能够准确鉴别恶性肿瘤、癌前病变和良性病理变化特征,其灵敏度可达90%,准确度可达66%,如图7(d)所示。特别是临床实践中鉴别MM与黑色素相关皮肤病变,灵敏度可达90%,准确率可达68%,如图7(e)所示。将该方法应用于MM与脂溢性角化病(SK)等的病变特征鉴别,灵敏度可达90%,准确度可达68%^[42,67]。

基于785nm半导体激光器,透射式全息光栅,背向照射、深度耗尽CCD探测器及特殊设计构成的拉曼光纤探头,构建的实时拉曼光谱集成分析系统,不但能够有效提高光谱采集信噪比,还可在1s内

实现皮肤恶性病变的无损快速检测。此外,采用多变量统计分析方法(如 PC-GDA 和 PLS),进一步从统计学上对皮肤恶性肿瘤和良性病变组织进行准确鉴别与归类分析,其灵敏度和特异性与皮肤科专家诊断结果相当,是一种有效、可靠的皮肤恶性病变早

期诊断和检测方法。这一技术已由加拿大 Verisante Technology Inc.公司商业化,其皮肤癌诊断系统(Verisante Aura™)已获得加拿大、澳大利亚和欧盟医疗器械监管部门的批准,进入了临床应用。

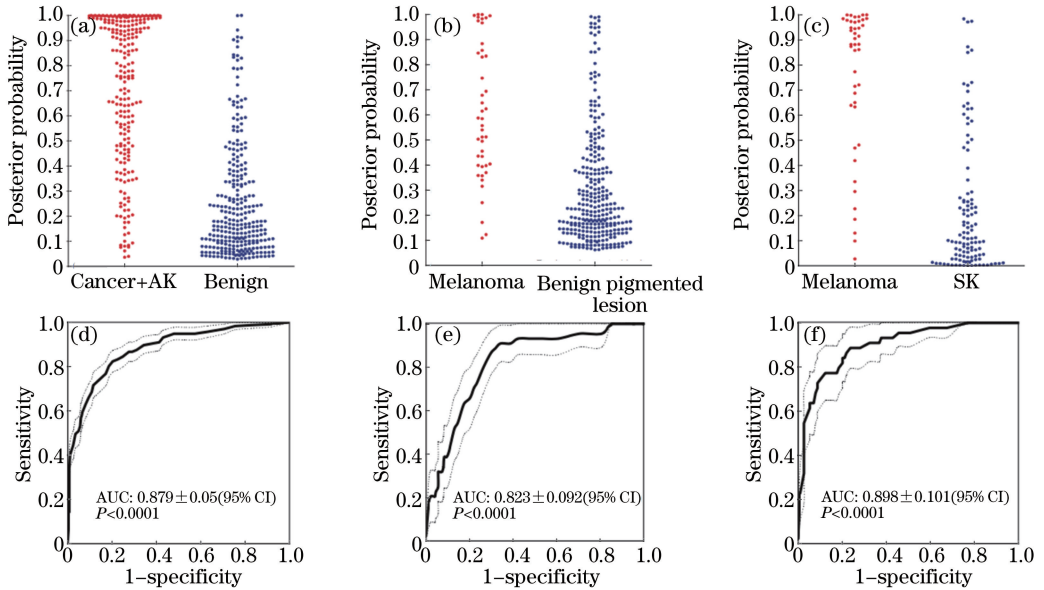


图 7 基于 PC-GDA 数据处理方法的拉曼光谱鉴别不同皮肤组织病变种类^[42]。(a)皮肤癌症/癌前病变(皮肤肿瘤和 AK 共计 232 例,包括 MM、BCC、SCC、AK)与良性皮肤病变(共计 286 例,包括 AN、CN、IN、JN、SK);(b)黑色素瘤(共计 44 例)与良性皮肤病变(共计 286 例,包括 AN、CN、IN、JN、SK);(c)黑色素瘤(共计 44 例)与脂溢性角化病(共计 114 例);(d)(e)(f)分别为(a)(b)(c)鉴别结果的 ROC 曲线($P < 0.0001$)

Fig. 7 Lesion classification by Raman spectroscopy based on PC-GDA. Posterior probabilities for discriminating (a) skin cancers and precancers (cancer+actinic keratosis, including MM, BCC, SCC, AK, $n=232$) from benign skin disorders (including atypical nevi, blue nevi, compound nevi, intradermal nevi, junctional nevi, seborrheic keratosis, $n=286$), (b) melanoma ($n=44$) from benign pigmented skin diseases (including atypical nevi, blue nevi, compound nevi, intradermal nevi, junctional nevi, seborrheic keratosis, $n=286$), and (c) melanoma ($n=44$) from seborrheic keratosis ($n=114$); (d)(e)(f) ROC curves corresponding to (a)(b)(c), respectively^[42]

5 快速拉曼光谱分析技术用于肺癌早期检测

肺癌发生于支气管黏膜上皮,亦称支气管癌。近 50 年来,其发病率和死亡率在全世界大多数国家中均显著增高,其中,我国肺癌发病率每年增长 26.9%,肺癌已成为我国首位恶性肿瘤死亡原因。预计到 2025 年,我国肺癌病患将达到 100 万人次,成为世界第一肺癌大国^[75-76]。目前,临床上开展了许多针对性的诊断和治疗方法,但肺癌患者 5 年生存率仍不超过 20%,提高生存率的最有效途径是早期、及时、准确诊断^[77]。目前,临床上诊断肺癌常用 X 射线、计算机断层扫描成像(CT)、核磁共振和病理学活检等方法,其中病理学活检检查作为黄金标

准广泛应用于肺癌诊断和鉴别诊断,但这一技术受到操作者经验和早期病变表现不够典型等因素的制约,会影响其对早期肺癌患者的诊断准确度。CT、核磁共振虽然诊断准确率高,但是由于肿瘤形成的演变过程首先是基因发生变化,导致相应分子结构改变,进一步演化为癌细胞,直至形成肿块产生占位效应后,才能使用核磁共振、CT 等方法检测出来。尽管白光支气管镜(WLB)和自体荧光支气管内窥镜(AFB)技术相结合,可以实现高灵敏度定位检测中心气道区域内肺癌,但是,其诊断特异性大大下降(假阳性增加)。文献^[78]显示,联合使用 WLB 与 AFB 后灵敏度为 79%时,特异性降至 30%;灵敏度为 93%时,特异性降至 21%。因此,WLB 与 AFB 在临床联合应用实践中,高灵敏度与低特异性并存

的应用瓶颈严重制约了 AFB 的推广应用。拉曼光谱作为一种分子振动光谱,结合 WLB 与 AFB 技术,建立内窥镜拉曼光谱分析系统^[73](图 8),实时检测活体人肺部组织生化组成与结构异常,可在肿瘤发生早期就检测出癌变信息,是一种早期肺癌诊断的有效方法^[51,79-81],能在 WLB 与 AFB 高灵敏度运行时增加诊断特异性。

内窥镜拉曼光谱分析系统(图 8)主要由 785 nm 半导体激光器、拉曼光谱仪和 CCD 探测器构成,并在光谱仪与光纤连接处将多束光纤排列为弧面形状,以提高系统信噪比。该系统研发过程中,选用了具有较低近红外波段干涉效应的热电制冷 CCD 探测器,以及具有波长选择功能的全息反射式光栅结构^[82]。同时,设计研制了一个可通过支气管镜活检通道的拉曼探头(口径 1.8 mm,图 8 中 Raman catheter),用以传输激发光(图 8 中红色所示)和实现拉曼散射信号收集(图 8 中绿色所示),并采用二次滤波的方法减小来自光纤与组织表面的背景噪声^[83]。光纤束导管内含有超低 OH⁻ 光纤,一根芯

径为 200 μm 的光纤用于传导激发光,被 27 根芯径为 100 μm 的信号收集光纤所围绕。激发光纤侧壁含有一层镀金薄膜以防止信号串扰;在激发光纤端面镀有短通滤光薄膜(<820 nm)以滤除光纤自发荧光与拉曼信号;收集光纤端面镀有长通滤光薄膜(>820 nm)以减弱反射的激发光光子强度(785 nm)。导管前端直接激发并收集病灶处拉曼散射光子,导管后端激发光纤与信号收集光纤分别耦合进光学滤波模块(图 8)。该模块在激发光路上安装一个带通滤波片[(785±3) nm],在收集光路上安装一个长通滤波片(>820 nm)。临床应用中,为了减小低波数区域的荧光背景噪声,通过调整光谱仪光栅,检测分析 2050~3100 cm⁻¹ 范围内的拉曼光谱信息^[79,81]。该系统光谱分辨率为 8 cm⁻¹,可在 2 s 内完成活体人肺部病灶区域光谱采集^[73,80]。光谱数据采集后,采用集成分析软件,运用多项式拟合方法剔除荧光背景噪声,并实现光谱校正。同时,采用 PC-GDA 与 PLS 等多变量分析方法,从统计学角度对不同病变组织光谱特性进行鉴别与归类^[73,80]。

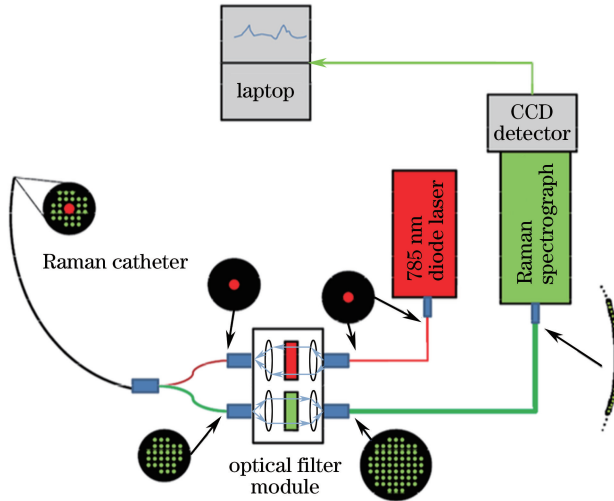


图 8 内窥镜拉曼光谱分析系统示意图^[73]。红色表示激发光路,绿色表示收集光路。

收集光纤与光谱仪连接处呈弧面排布以提高系统信噪比

Fig. 8 Schematic of the endoscopic laser Raman spectroscopy system^[73]. The inserts show the arrangement of the excitation (red) and collection (green) fibers. The collection fibers were connected to the spectrograph through a special round to parabolic fiber bundle to achieve better signal-to-noise ratio

临床应用中,拉曼探头经内径为 2.2 mm 的活检通道与支气管镜对接,借助支气管镜的插入管将激发光引入支气管镜,实现活体、无损条件下激发组织的拉曼散射信号;同时,通过该探头收集组织拉曼光谱信息,并传导至光谱仪进行采集和后续分析^[73,81]。临床医师利用 WLB 和 AFB 的白光与荧

光成像功能对病灶位置进行实时筛选后,在距组织 5~10 mm 位置处获取可疑位点(直径 2~4 mm)的拉曼光谱,如图 9 所示,从而在缩小活检范围、减少次数的基础上获得活体状态下病变组织更多的病理信息,并参考位点区域的病理活检结果验证测量分析结果的准确性^[73,79,81,83]。

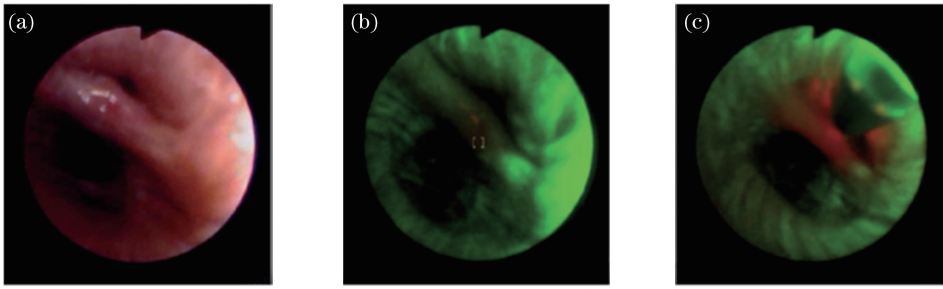


图 9 支气管内窥镜拉曼光谱分析系统探测图像示意图^[79]。(a)白光支气管内窥镜图；
(b)相同位置处的自体荧光内窥镜图，其中绿色表示正常组织，图像中心暗红色区域为病变组织；
(c)同一病变位置处同时使用蓝光激发荧光和 785 nm 近红外光激发的拉曼光谱示意图，
其中红色区域为拉曼散射激发区，其视场大小约为 2 cm

Fig. 9 Pictures showing images acquired by a bronchoscopy Raman system^[79]. (a) White light bronchoscopic image;
(b) blue light excited fluorescence image of the same location as (a), green is representative of normal tissue,
and dark red (center of image) is diseased tissue; (c) same lesion being excited simultaneously with blue light to
generate a fluorescence image and with 785 nm light from the Raman catheter, the field of view is about 2 cm

人体肺部组织癌变的拉曼光谱特征主要表现为 2775~3040 cm^{-1} 波数范围内的 CH 拉伸振动模式，如图 10 所示。临床测试过程中，共从 80 位病患处收集到 280 例肺部癌变拉曼光谱，并对其中的 214 例进行了组织病理活检分析。这些临床样本中，并未收集到微浸润癌症病变病例，但考虑到轻度不典型增生与组织化生都属于癌前组织病变，故将两者归为一类进行光谱特征分析；同样，中度和重度组织增生属于高度癌前病变，具有相同概率发展为浸润性癌症，也将这两者归为一类进行考虑；此外，由于原位癌(CIS)所占采样比率较小($n=2$)，且更易恶化为浸润性癌症，故将其与浸润性癌症病例归为一类。6 类组织光谱特征曲线中(图 10)，主要的拉曼峰分布于 2850 cm^{-1} (脂肪酸与脂类 CH_2 对称拉伸模)、2885 cm^{-1} (脂肪酸与脂类 CH_3 对称拉伸模)、2940 cm^{-1} (蛋白质 CH 振动模和脂肪酸与脂类 CH_3 对称拉伸模)、2965 cm^{-1} (脂肪酸与脂类 CH_3 面内/外反对称拉伸模)、2990 cm^{-1} (脂肪酸与脂类 CH_3 面内/外反对称拉伸模)和 3020 cm^{-1} ($\text{RCH}=\text{CHR}$ 细胞内 $=\text{C}-\text{H}$ 的不对称伸缩振动模，其中 R 代表烯烃官能团)位置处^[84-87]。

从图 10 可以看出，不同肺组织病理变化表现出较为相似的光谱特性，如果仅从个别拉曼峰值、峰位等表面信息分析的话，无法准确反映肺癌具体的病理特性。同时，在光谱测量过程中，影响因素众多，即便是相同测量位点，在连续多次测量中也不可能获得完全相同的拉曼光谱，更何况生物组织生化组成与结构还存在个体复杂性和不均匀性。因此需要

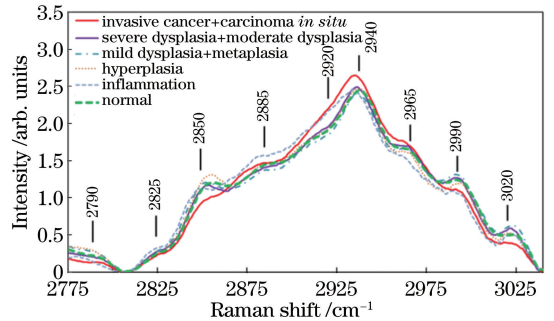


图 10 临床测得不同肺病变组织的平均拉曼光谱
(所有光谱均按其曲线下面积进行归一化处理)^[73]

Fig. 10 Mean Raman spectra by diagnosis (all spectra normalized to their respective area under curve before averaging by diagnosis)^[73]

采用 PC-GDA 和 PLS 方法，并结合逐步回归 (STEP)^[88]、绝对收缩最小选择算子 (LASSO)^[88]、遗传算法 (GA)^[89] 等方法进行变量筛选^[73]，从而得到具有统计性质的肺癌组织光谱特性，如图 11 所示。结果表明，快速拉曼光谱分析技术根据不同组织类别的光谱特性差异，能够以 90% 以上的灵敏度和 65% 的特异性，实现高度异性增生 (HGD)、恶性肺癌的有效鉴别。相比于传统 WLB 与 AFB 等视觉分级诊断方式^[90]，结合拉曼光谱分析方法的内窥镜诊断方法，能够在 2 s 内快速获取肺部病变组织的高质量拉曼光谱信号，并将 HGD 和恶性肺癌的检测灵敏度提高 1.89 倍，准确度可提高 3.82 倍^[73]。

6 结 语

组织癌变过程总是从基因改变开始，以致构成

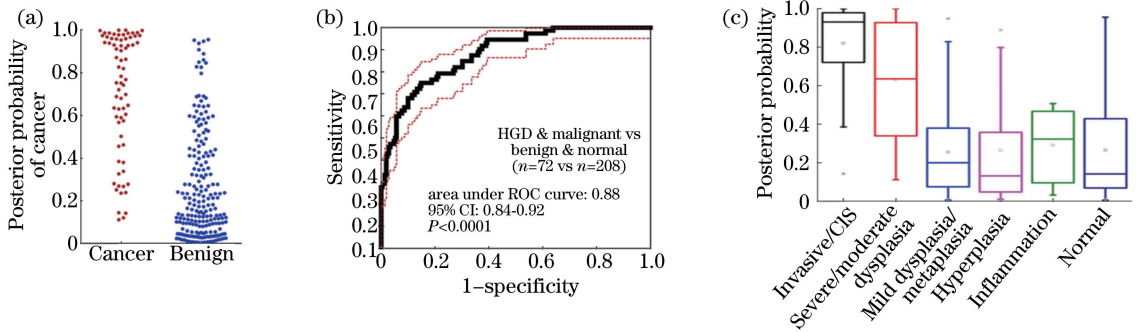


图 11 基于 STEP PC-GDA 方法的拉曼光谱鉴别肺组织病变种类^[73]。(a) 归类鉴别癌变病灶(共计 72 例, 包括 HGD、CIS 和浸润性癌症)和良性病变(共计 208 例, 包括轻度增生、组织化生、增生、炎症和正常组织)后验概率图; (b) 衍生自后验概率的 ROC 曲线与 95% CI 值; (c) 根据病灶次种类作出的用于表示后验概率分布的箱线图

Fig. 11 Lesion classification by Raman spectroscopy based on STEP PC-GDA^[73]. (a) Posterior probability plot for distinguishing cancerous lesions (HGD, CIS and invasive cancer; $n=72$) from benign lesions (mild dysplasia, metaplasia, hyperplasia, inflammation and normal; $n=208$); (b) ROC curves and 95% CIs derived from the posterior probabilities; (c) box plot representation of the posterior probability distributions according to lesion subcategories

组织和细胞的化学物质种类、数量、结构、构象及存在状态在一定程度上发生变化, 这些变化为肿瘤早期诊断提供了理论依据。拉曼光谱分析技术凭借其无损(非侵入、无需样品制备)、快速(1~2 s 光谱采集时间)、高灵敏性和高特异性等特征, 从分子层面上鉴别癌前病变、良性病变和正常组织, 实现癌症的早期诊断。将现有的光谱分析方法与其他多种光学技术衔接, 例如内窥镜成像技术、共聚焦光学技术、荧光成像技术等, 从单光谱探测与分析(例如 DLRS, 傅里叶变换拉曼光谱)到多种光谱成像技术(例如腔衰荡光谱, 表面增强拉曼散射光谱等), 由单光谱特性分析到多变量光谱分析方法, 极大地扩展了快速拉曼光谱分析技术在医学领域应用的深度和广度。其次, 开发新型床旁光谱分析仪器, 提高系统信噪比, 减少光谱测量时间, 极大改善了拉曼光谱分析仪器的临床适用性。且应用多种光谱数据分析手段和生物信息提取方法, 建立了一种更便于临床医生掌握与使用的智能化临床诊断手段。随着激光技术、光谱测量与分析技术、光纤探头设计与制备方法的不断进步, 快速拉曼光谱分析技术已成为一个具有独立研究价值和应用前景的研究领域。目前, 拉曼光谱技术已用于绝大多数人体器官的早期癌症检测研究, 其中包括肺、气管、支气管、鼻腔、胃、口腔、肠道、肝脏、大脑、宫颈、血液、甲状腺和淋巴。其中, 皮肤癌拉曼诊断技术商业化已经开始, 在加拿大的几家诊所进入了临床应用。实时拉曼光谱分析技术在生物学中的应用推广, 特别是癌症的临床早期检测仍然是一项富有挑战性的工作。要推进这一工

作, 需要进一步加强物理、生物和医学等领域的协同创新, 在促进相关基础研究工作的基础上, 研发用于不同种类癌症早期检测的新型拉曼光谱分析装置。其中最核心的两个问题为设计、制备新型拉曼光纤探头和建立智能化数据分析方法。快速拉曼光谱分析与高灵敏度光学成像方法相结合(例如内窥镜光学系统), 与多种成像技术紧密结合, 实现“光学活检”, 形成了一种用于体内癌变检测的图(图像)谱(拉曼光谱)结合分析平台。

参 考 文 献

- [1] Vodinh T. Biomedical photonics handbook [J]. Journal of Biomedical Optics, 2003, 9(5): 1110-1111.
- [2] Zhang Z X. New technologies and applications of biomedical photonics [M]. Beijing: Science Press, 2008.
张镇西. 生物医学光子学新技术及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [3] McGregor H C, Wang W, Short M, *et al.* Clinical utility of Raman spectroscopy: Current applications and ongoing developments[J]. Advanced Health Care Technologies, 2016, 2(17): 13-29.
- [4] Ellis D I, Cowcher D P, Ashton L, *et al.* Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool [J]. Analyst, 2013, 138(14): 3871-3884.
- [5] Wang W, Zhao J, Short M, *et al.* Real-time *in vivo* cancer diagnosis using Raman spectroscopy [J]. Journal of Biophotonics, 2015, 8(7): 527-545.

- [6] Popp J. Clinical biophotonics [J]. Optics & Optoelectronic Technology, 2016, 14(6): 9-12.
Popp J. 临床生物医学光子学[J]. 光学与光电技术, 2016, 14(6): 9-12.
- [7] Xu Z H, Huang W, Lin D, *et al.* Advances in Raman spectroscopy for nasopharyngeal carcinoma tissue[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2016, 36(8): 2518-2521.
许智宏, 黄伟, 林多, 等. 鼻咽癌组织拉曼光谱研究进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(8): 2518-2521.
- [8] Zeng H, McWilliams A, Lam S. Optical spectroscopy and imaging for early lung cancer detection: A review [J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2004, 1(2): 111-122.
- [9] Eldiasty F. Coherent anti-Stokes Raman scattering: Spectroscopy and microscopy [J]. Vibrational Spectroscopy, 2011, 55(1): 1-37.
- [10] Holtom G R, Zumbusch A, Xie X S. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[C]. Conference on Lasers and Electro-Optics, 1999.
- [11] Rodriguez L, Lockett S, Holtom G R. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: A biological review[J]. Cytometry Part A, 2006, 69(8): 779-791.
- [12] Cheng J. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. Applied Spectroscopy, 2007, 61(9): 197-208.
- [13] Lord R C. Introduction to infrared and Raman spectroscopy[J]. Journal of the American Chemical Society, 1965, 87(5): 1155-1156.
- [14] Ball D W. Theory of Raman spectroscopy [J]. Spectroscopy, 2001, 16(11): 32-34.
- [15] Hanlon E B, Manoharan R, Koo T, *et al.* Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy [J]. Physics in Medicine and Biology, 2000, 45(2): R1.
- [16] Zhao W L, Zhang Y, Li R, *et al.* Study of Raman spectrum in diagnosis of malignant cancer[J]. Laser Journal, 2008, 29(3): 72-73.
赵万利, 张毅, 李睿, 等. 拉曼光谱快速诊断恶性肿瘤研究[J]. 激光杂志, 2008, 29(3): 72-73.
- [17] Motz J T, Gandhi S J, Scepanovic O R, *et al.* Real-time Raman system for *in vivo* disease diagnosis[J]. Journal of Biomedical Optics, 2005, 10(3): 031113.
- [18] Zeng H. Real-time *in vivo* Raman spectroscopy-technology development and clinical applications in early cancer detection [C]. Bio-Optics: Design and Application, OSA, Hawaii, 2013: BM2A.1.
- [19] Jermyn M, Desroches J, Aubertin K, *et al.* A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology [J]. Physics in Medicine and Biology, 2016, 61(23): R370-R400.
- [20] Culha M. Raman spectroscopy for cancer diagnosis: How far have we come? [J]. Bioanalysis, 2015, 7(21): 2813-2824.
- [21] McCreery R L. Raman spectroscopy for chemical analysis[J]. Measurement Science and Technology, 2001, 12(5): 653-654.
- [22] Matousek P, Morris M D. Emerging Raman applications and techniques in biomedical and pharmaceutical fields [M]. New York: Springer, 2010.
- [23] Boustany N N, Crawford J M, Manoharan R, *et al.* Effects of freeze-thaw and photobleaching on the ultraviolet resonance Raman spectra of human colon biopsies[J]. Applied Spectroscopy, 2001, 55(11): 1506-1513.
- [24] Patit C A, Pence I J, Lieber C A, *et al.* 1064 nm dispersive Raman spectroscopy of tissues with strong near-infrared autofluorescence [J]. Optics Letters, 2014, 39(2): 303-306.
- [25] Wang W, Major A, Paliwal J. Grating-stabilized external cavity diode lasers for Raman spectroscopy—A review[J]. Applied Spectroscopy Reviews, 2012, 47(2): 116-143.
- [26] Huang Z, McWilliams A, Lui H, *et al.* Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer [J]. International Journal of Cancer, 2003, 107(6): 1047-1052.
- [27] Teh S K, Zheng W, Ho K Y, *et al.* Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: Differentiating dysplasia from normal tissue [J]. British Journal of Cancer, 2008, 98(2): 457-465.
- [28] Lyng F M, Faolain E O, Conroy J, *et al.* Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool [J]. Experimental and Molecular Pathology, 2007, 82(2): 121-129.
- [29] Zeng H. Basics of endoscopy and light-tissue interactions [M]//Diagnostic endoscopy. Abingdon: Taylor & Francis, 2013: 1-2.
- [30] Schwab S D, McCreery R L, Gamble F T. Normal and resonance Raman spectroelectrochemistry with fiber optic light collection[J]. Analytical Chemistry, 1986, 58(12): 2486-2492.
- [31] Myrick M L, Angel S M. Elimination of background in fiber-optic Raman measurements [J]. Applied Spectroscopy, 1990, 44(4): 565-570.
- [32] Chong C K, Shen C, Fong Y, *et al.* Raman spectroscopy with a fiber-optic probe[J]. Vibrational

- Spectroscopy, 1992, 3(1): 35-45.
- [33] Bhowmick G K, Gautam N, Gantayet L M. Design optimization of fiber optic probes for remote fluorescence spectroscopy [J]. Optics Communications, 2009, 282(14): 2676-2684.
- [34] Frank C J, Redd D C B, Gansler T S, *et al.* Characterization of human breast biopsy specimens with near-IR Raman spectroscopy [J]. Analytical Chemistry, 1994, 66(3): 319-326.
- [35] Baraga J J, Feld M S, Rava R P. Rapid near-infrared Raman spectroscopy of human tissue with a spectrograph and CCD detector [J]. Applied Spectroscopy, 1992, 46(2): 187-190.
- [36] Gupta N, Dahmani R. AOTF Raman spectrometer for remote detection of explosives [J]. Spectrochimica Acta Part A, 2000, 56(8): 1453-1456.
- [37] Cullum B M, Mobley J, Stokes D L, *et al.* Development of a portable Raman spectrometer for medical diagnostics [C]. SPIE, 2002, 4615: 82-90.
- [38] Tanaka K, Pacheco M T T, Brennan J F, *et al.* Compound parabolic concentrator probe for efficient light collection in spectroscopy of biological tissue [J]. Applied Optics, 1996, 35(4): 758-763.
- [39] Huang Z, Zeng H, Hamzavi I, *et al.* Rapid near-infrared Raman spectroscopy system for real-time *in vivo* skin measurements [J]. Optics Letters, 2001, 26(22): 1782-1784.
- [40] Zeng H, Lui H, Huang Z. Apparatus and methods related high speed Raman spectroscopy: US6485948 [P]. 2002-11-26.
- [41] Esmondewhite F W L, Esmondewhite K A, Morris M D. Minor distortions with major consequences: Correcting distortions in imaging spectrographs [J]. Applied Spectroscopy, 2011, 65(1): 85-98.
- [42] Lui H, Zhao J, McLean D I, *et al.* Real-time Raman spectroscopy for *in vivo* skin cancer diagnosis [J]. Cancer Research, 2012, 72(10): 2491-2500.
- [43] Zhao J, Lui H, McLean D I, *et al.* Integrated real-time Raman system for clinical *in vivo* skin analysis [J]. Skin Research and Technology, 2008, 14(4): 484-492.
- [44] Yi W S, Jiang H M. Application and research progress of Raman spectroscopy diagnosis in the gastric cancer [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2011, 20(2): 280-284.
易伟松, 江厚敏. 拉曼光谱在胃癌诊断中的应用与研究进展 [J]. 激光生物学报, 2011, 20(2): 280-284.
- [45] Cao A, Pandya A K, Serhatkulu G K, *et al.* A robust method for automated background subtraction of tissue fluorescence [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2007, 38(9): 1199-1205.
- [46] Clupek M, Matejka P, Volka K. Noise reduction in Raman spectra: Finite impulse response filtration versus Savitzky-Golay smoothing [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2007, 38(9): 1174-1179.
- [47] Aarchibald D D, Kays S E, Himmesbach D S, *et al.* Raman and NIR spectroscopic methods for determination of total dietary fiber in cereal foods: A comparative study [J]. Applied Spectroscopy, 1998, 52(1): 22-31.
- [48] Zhao J, Lui H, McLean D I, *et al.* Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy [J]. Applied Spectroscopy, 2007, 61(11): 1225-1232.
- [49] Rowlands C J, Elliott S R. Automated algorithm for baseline subtraction in spectra [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2011, 42(3): 363-369.
- [50] Rieppo L, Saarakkala S, Narhi T, *et al.* Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of Fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2012, 20(5): 451-459.
- [51] Short M, Lam S, McWilliams A, *et al.* Using laser Raman spectroscopy to reduce false positives of autofluorescence bronchoscopies: A pilot study [J]. Journal of Thoracic Oncology, 2011, 6(7): 1206-1214.
- [52] Cluff G M, Short M A, Lui H, *et al.* Comparison of connective tissue invaded by Lewis lung carcinoma to healthy connective tissue by means of micro-Raman spectroscopy [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2009, 40(8): 1087-1090.
- [53] Feng S, Chen R, Lin J, *et al.* Gastric cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy excited by polarized laser light [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(7): 3167-3174.
- [54] Huang Z, Lui H, McLean D I, *et al.* Raman spectroscopy in combination with background near-infrared autofluorescence enhances the *in vivo* assessment of malignant tissues [J]. Photochemistry and Photobiology, 2005, 81(5): 1219-1226.
- [55] Bonnier F, Byrne H J. Understanding the molecular information contained in principal component analysis of vibrational spectra of biological systems [J]. Analyst, 2012, 137(2): 322-332.
- [56] Li Y Z, Feng S Y, Lin J Q, *et al.* Statistical analysis of tissue Raman spectroscopy [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2011, 20(1): 130-133.
李永增, 冯尚源, 林居强, 等. 生物组织拉曼光谱数据的统计分析 [J]. 激光生物学报, 2011, 20(1): 130-133.

- [57] Brun N, Poncot M, Bourson P. Raman correlation spectroscopy: A method studying physical properties of polystyrene by the means of multivariate analysis [J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2013, 128(10): 77-82.
- [58] Jiang C Z. Research on data processing and qualitative analysis of Raman spectrum [D]. Changchun: Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, 2014: 78-80.
姜承志. 拉曼光谱数据处理与定性分析研究[D]. 长春: 中科院长春光学精密机械与物理研究所, 2014: 78-80.
- [59] Godar D E. Worldwide increasing incidences of cutaneous malignant melanoma[J]. *Journal of Skin Cancer*, 2011, 2011: 858425.
- [60] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2016, 66(2): 115-132.
- [61] Vollmer R T. The dynamics of death in melanoma [J]. *Journal of Cutaneous Pathology*, 2012, 39(12): 1075-1082.
- [62] Fox G N. ABCD-EFG for diagnosis of melanoma[J]. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2005, 30(6): 707.
- [63] Zhao J, Lui H, Kalia S, *et al.* Real-time Raman spectroscopy for automatic *in vivo* skin cancer detection: An independent validation [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(27): 8373-8379.
- [64] Wang S, Zhao J, Lui H, *et al.* Monte Carlo simulation of *in vivo* Raman spectral measurements of human skin with a multi-layered tissue optical model[J]. *Journal of Biophotonics*, 2014, 7(9): 703-712.
- [65] Wang S. Study on cutaneous melanin near-infrared autofluorescence and Raman spectrum properties[D]. Xi'an: Northwest University, 2011: 37-39.
王爽. 人体皮肤黑色素近红外荧光及拉曼光谱特性研究[D]. 西安: 西北大学, 2011: 37-39.
- [66] Zhao J, Mclean D I, Zeng H. Real-time Raman spectroscopy for noninvasive *in vivo* skin analysis and diagnosis [M]//Campolo D. *New developments in biomedical engineering*. Rijeka, Croatia: INTECH Open Access Publisher, 2010.
- [67] Zhao J, Zeng H, Kalia S, *et al.* Wavenumber selection based analysis in Raman spectroscopy improves skin cancer diagnostic specificity [J]. *Analyst*, 2016, 141(3): 1034-1043.
- [68] Ong Y H, Lim M, Liu Q. Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells[J]. *Optics Express*, 2012, 20(20): 22158-22171.
- [69] Xu X, Yang J F, Wu F C, *et al.* Spectra classification based on generalized discriminant analysis [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, 26(10): 1960-1964.
许馨, 杨金福, 吴福朝, 等. 基于广义判别分析的光谱分类 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(10): 1960-1964
- [70] Berger A J, Koo T, Itzkan I, *et al.* Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy [J]. *Applied Optics*, 1999, 38(13): 2916-2926.
- [71] Barker M L, Rayens W S. Partial least squares for discrimination [J]. *Journal of Chemometrics*, 2003, 17(3): 166-173.
- [72] Provost F, Fawcett T. Robust classification for imprecise environments [J]. *Machine Learning*, 2001, 42(3): 203-231.
- [73] Mcgergor H C, Short M, Mcwilliams A, *et al.* Real-time endoscopic Raman spectroscopy for *in vivo* early lung cancer detection [J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(1): 98-110.
- [74] Adams N M, Hand D J. Comparing classifiers when the misallocation costs are uncertain [J]. *Pattern Recognition*, 1999, 32(7): 1139-1147.
- [75] Chen W, Zheng R, Zeng H, *et al.* Epidemiology of lung cancer in China [J]. *Thoracic Cancer*, 2015, 6(2): 209-215.
- [76] Yan L, Xu L. Global efforts in conquering lung cancer in China [J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2015, 34(7): 320-322.
- [77] Yang F H, Zhang C D. Research status of lung cancer [J]. *China Continuing Medical Education*, 2015, 7(2): 30-31.
杨付红, 张春娣. 肺癌的研究现状 [J]. *中国继续医学教育*, 2015, 7(2): 30-31.
- [78] Hirsch F R, Franklin W A, Gazdar A F, *et al.* Early detection of lung cancer: Clinical perspectives of recent advances in biology and radiology [J]. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7: 5-22.
- [79] Zeng H, Petek M, Zorman M T, *et al.* Integrated endoscopy system for simultaneous imaging and spectroscopy for early lung cancer detection [J]. *Optics Letters*, 2004, 29(6): 587-589.
- [80] Fawzy Y, Petek M, Terceelj M, *et al.* *In vivo* assessment and evaluation of lung tissue morphologic and physiological changes from non-contact endoscopic reflectance spectroscopy for improving lung cancer detection [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, 11(4): 044003.

- [81] Short M, Lam S, McWilliams A, *et al.* Development and preliminary results of an endoscopic Raman probe for potential *in vivo* diagnosis of lung cancers[J]. Optics Letters, 2008, 33(7): 711-713.
- [82] Pawluk H C, Short M, Lam S, *et al.* Improvements to a laser Raman spectroscopy system for reducing the false positives of autofluorescence bronchoscopies [C]. SPIE, 2012, 8207: 820737.
- [83] Lam S, Kennedy T C, Unger M, *et al.* Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy[J]. Chest, 1998, 113(3): 696-702.
- [84] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I. Raman spectroscopy of biological tissues [J]. Applied Spectroscopy Reviews, 2007, 42(5): 493-541.
- [85] Hill I R, Levin I W. Vibrational spectra and carbon-hydrogen stretching mode assignments for a series of n-alkyl carboxylic acids [J]. Journal of Chemical Physics, 1979, 70(2): 842-851.
- [86] Krafft C, Neudert L, Simat T J, *et al.* Near infrared Raman spectra of human brain lipids [J]. Spectrochimica Acta Part A, 2005, 61(7): 1529-1535.
- [87] Baeten V, Hourant P, Morales M T, *et al.* Oil and fat classification by FT-Raman spectroscopy [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(7): 2638-2646.
- [88] Streiner D L. Regression in the service of the superego: The do's and don'ts of stepwise multiple regression[J]. The Canadian Journal of Psychiatry, 1994, 39(4): 191-196.
- [89] Leardi R, Gonzalez A L. Genetic algorithms applied to feature selection in PLS regression: How and when to use them [J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1998, 41(2): 195-207.
- [90] Sun J, Garfield D H, Lam B, *et al.* The value of autofluorescence bronchoscopy combined with white light bronchoscopy compared with white light alone in the diagnosis of intraepithelial neoplasia and invasive lung cancer: A meta-analysis[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2011, 6(8): 1336-1344.