

拉曼光谱成像技术及其在生物医学中的应用

路交¹, 朱姗姗¹, 崔笑宇¹, 陈硕¹, 姚育东^{1,2}

¹东北大学中荷生物医学与信息工程学院, 辽宁 沈阳 110016;

²斯蒂文斯理工学院电气与计算机工程系, 美国 霍博肯 NJ07030

摘要 拉曼光谱是一种用于分析分子化学成分、结构等信息的检测技术,具有信息丰富、制样简单、水的干扰小、非侵入等特点,在生物医学等研究领域中具有广泛应用。拉曼光谱成像作为一种结合拉曼光谱和成像的混合模式,通过采集空间中每个像素处的拉曼光谱信息,将分子信息在空间上展现,并定性、定量与定位地分析物质分子。相对于传统的拉曼光谱测量,拉曼光谱成像可额外提供生物医学应用中极为重要的空间信息,因此,以图像形式观测物质成分与结构等信息的拉曼光谱成像技术在生物样本检测、临床诊断及治疗等生物医学领域具有重要的应用价值。从拉曼光谱原理出发,介绍了拉曼光谱成像技术及其发展,并综述了近年来拉曼光谱成像技术在生物医学领域中的应用,最后总结并展望了拉曼光谱成像技术及其发展趋势。

关键词 医用光学; 拉曼光谱成像; 拉曼光谱; 成像; 生物医学

中图分类号 O433

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0307007

Raman Spectroscopic Imaging Technology and Its Biomedical Applications

Lu Jiao¹, Zhu Shanshan¹, Cui Xiaoyu¹, Chen Shuo¹, Yao Yudong^{1,2}

¹Sino-Dutch Biomedical and Information Engineering School, Northeastern University, Shenyang, Liaoning 110016, China;

²Department of Electrical and Computer Engineering, Stevens Institute of Technology, Hoboken NJ 07030, USA

Abstract Raman spectroscopy is an analytical tool for chemical compositions and structures of molecules. Because it is a non-invasive technique with rich biochemical information, minimal sample preparation and little interference of water, Raman spectroscopy has been widely used in the field of biomedicine. Raman spectroscopic imaging is the combination of Raman spectroscopy and imaging, which collects Raman spectrum at each pixel for the entire region. Thus, both spatial and spectral information can be captured for positioning analysis of material molecules qualitatively and quantitatively. Compared with traditional Raman spectroscopy, Raman imaging can provide additional spatial information about the sample, which is extremely important for biomedical applications. Therefore, Raman spectroscopic imaging technique with both biochemical and spatial information shows significant values in the field of biomedicine, such as biological sample examination, clinical diagnosis, and treatment. The Raman spectroscopy technique and its development are introduced based on the principle of Raman spectroscopy. The application of Raman spectroscopy technique in the field of biomedicine in recent years is summarized. Finally, the summary and prospects of Raman spectroscopic imaging technology are discussed.

Key words medical optics; Raman spectroscopic imaging; Raman spectroscopy; imaging; biology and medicine

OCIS codes 170.5660; 110.4234; 000.1430

1 引言

拉曼光谱是在印度科学家拉曼发现的拉曼散射

效应的基础上发展起来的^[1],是一种用于分析分子化学成分、结构等信息的检测技术,具有信息丰富、制样简单、水的干扰小、非侵入等特点,在生物医学

收稿日期: 2017-09-25; 收到修改稿日期: 2017-11-08

基金项目: 国家自然科学基金(61605025,61501101)、中央高校基本科研业务费专项资金(N162410002-2-6)

作者简介: 路交(1989—),女,博士研究生,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: lujiao_8919@163.com

导师简介: 陈硕(1987—),男,博士,副教授,主要从事生物医学光子学方面的研究。

E-mail: chenshuo@bmie.neu.edu.cn(通信联系人)

等领域应用广泛。传统的拉曼光谱仪多采用显微镜结构或光纤探头结构,通常只能获得待测样本上单点的拉曼信号;然而,待测样本的空间信息在生物医学应用中(如肿瘤边缘界定、细胞成像、药品成分分析等)具有重要意义,传统的测量方式已无法满足生物医学应用中对获取待测样本空间信息的需求。随着激光器、探测技术的发展以及拉曼光谱技术与数据分析技术的结合,拉曼光谱已发展成为可将检测物质的化学结构、成分以及结晶度等信息在空间上展现出来的拉曼光谱成像技术。拉曼光谱成像作为一种结合拉曼光谱和成像的混合模式,通过采集空间中每个像素处的拉曼光谱信息,将分子信息在空间上展现,并定性、定量、定位地分析物质分子。相对于传统的拉曼光谱测量,拉曼光谱成像可额外提供生物医学应用中极为重要的空间信息。因此,以图像形式观测物质成分与结构等信息的拉曼光谱成像在生物样本检测、临床诊断及治疗等生物医学领域中具有重要的应用价值。本文基于拉曼光谱原理介绍拉曼光谱成像技术及其发展,并综述近年来拉曼光谱成像技术在生物医学领域中的应用,最后对拉曼光谱成像技术及其发展趋势进行总结和展望。

2 拉曼光谱及拉曼光谱成像

当单色光照射物质时,入射光子与分子相互作用发生弹性碰撞和非弹性碰撞。在碰撞过程中,大部分光子发生弹性散射(散射光频率与入射光频率 f_0 相同),即瑞利散射;小部分光子发生非弹性散射,与分子发生能量交换,进而获得或损失能量,散射光频率大于或小于入射光频率。小于入射光频率的散射称为斯托克斯拉曼散射,大于入射光频率的散射称为反斯托克斯拉曼散射,斯托克斯拉曼散射与反斯托克斯拉曼散射统称为拉曼散射^[2-3]。瑞利散射及拉曼散射能级跃迁示意图如图1所示。通常情况下,拉曼散射光强约占总散射光强的 $10^{-10} \sim 10^{-6}$ ^[4]。拉曼散射光与入射光频率之差称为拉曼频移,它由入射光子与物质分子振动或转动能量相互交换而产生,因此拉曼频移与分子的振动和转动模式密切相关。分子的振动和转动信息能够反映其结构上的特征,即每一种物质都有其各自的特征拉曼光谱,因此,通过检测物质的拉曼散射并绘制成光谱,分析拉曼光谱的峰位信息便可以鉴定物质,并推导出有关物质的化学和结构等相关信息^[5-6]。

不同于生物医学领域常用的其他光学成像方法,如高光谱成像^[7]、荧光成像^[8]和光声成像^[9]等,

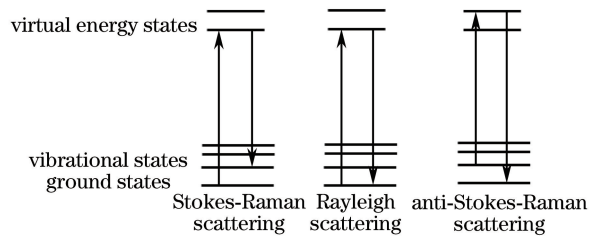


图1 瑞利散射及拉曼散射能级跃迁示意图。

(a) 斯托克斯拉曼散射;(b)瑞利散射;(c)反斯托克斯拉曼散射

Fig. 1 Jablonski diagram of energy transition for Rayleigh

and Raman scattering. (a) Stokes-Raman scattering;

(b) Rayleigh scattering; (c) anti-Stokes-Raman scattering

拉曼光谱成像技术的主要优势在于可提供样品的化学成分、分子结构、结晶度和应变-应力等重要的生化信息。此外,拉曼光谱成像的样品无需提前处理,具有非侵入性、无损害的特点,且测量不受水分子干扰。因此,拉曼光谱成像在生物医学领域具有巨大的潜在应用前景。目前,拉曼光谱成像技术的主要方法包括点扫描式拉曼光谱成像^[10]、线扫描式拉曼光谱成像^[11]、凝视型拉曼光谱成像^[12]、快照型拉曼光谱成像^[13]、基于光谱重建的拉曼光谱成像^[14]等。

图2所示为传统拉曼光谱成像扫描模式^[15]。点扫描式拉曼光谱成像是最早出现的拉曼光谱成像模式,如图2(a)所示,激发光被聚焦到样品表面一点激发拉曼效应,并通过振镜或移动平台控制测量位置,进而记录每一个像素点的拉曼光谱^[16]。利用点扫描式拉曼光谱成像技术可实现目标物质的二维成像,控制点激发光或待测样本在成像区域内单点步进,获取每个样品坐标点 (x, y) 的光谱,进而完成目标样品的二维拉曼光谱成像。虽然单点激发采集的拉曼信号通常相对较强,但由于生物样本对激光强度的限制及其本身相对微弱的拉曼信号,使得获取单点拉曼光谱一般仍需 $1 \sim 10$ s,甚至更长时间。利用逐点扫描方法进行成像,成像时间通常为几十分钟甚至是几小时。因此,基于单点扫描式拉曼光谱成像技术极大地阻碍了拉曼光谱成像技术在生物医学领域的应用。

线扫描式拉曼光谱成像随着探测技术的发展而出现^[17]。在相同的参数条件下,线扫描式拉曼光谱成像速度比点扫描式拉曼光谱成像速度提高了 $300 \sim 600$ 倍^[18]。线扫描式拉曼光谱成像使激发光以直线的形式被聚焦在样品表面,该直线聚焦光激发的光谱信号被二维CCD相机捕获,如图2(b)所示。为了对样品进行二维成像,可利用直线聚焦激发光沿 x 轴照射样品激发拉曼信号,直线聚焦激发光在样品表面沿

y 轴逐线激发拉曼信号,通过获取对应样品每条线的光谱进而成像。虽然线扫描拉曼光谱成像速度有所提高,但该方法存在像场弯曲等问题,且其实际采集速度受限于系统的自动聚焦过程^[19]。

凝视型拉曼光谱成像是一种直接的拉曼光谱成像,如图 2(c)所示,样品二维成像区域被激发光照射,被激发的拉曼信号一次性直接被 CCD 相机捕获^[20-21]。由于 CCD 相机不能区分收集到的散射光波长,因此凝视型拉曼光谱成像通常使用滤光片转轮^[22]或可调谐滤光片,如可调谐液晶滤光片(LCTF)^[23-25]和声光可调谐滤光片(AOTF)^[26-27]等,选择透过拉曼信号的波长,并用 CCD 探测,进而实现一定波长范围内逐个波长拉曼信号的测量,最终得到拉曼光谱图像。该方法的优势在于可以同时获取待测样品的空间及光谱信息。然而,由于使用

分光技术逐波长进行测量,因此当测量的波长数量较多时,拉曼光谱图像的采集速率会受到极大限制。快照型拉曼光谱成像通过一次采集可同时获得待测样品的空间和光谱信息^[28],与传统拉曼光谱成像方法相比,该方法的拉曼光谱图像采集速度得到了显著提高。该方法的核心在于利用二维探测器一次性采集所有的拉曼光谱图像,进而避免了扫描过程导致的伪影。然而,快照型拉曼光谱成像方法通常需要较高分辨率的探测器以及耗时较长的数据后处理等。常见的快照型拉曼光谱成像技术包括多焦点技术^[13, 29-30]、编码孔径拉曼光谱成像^[31]等。图 3 所示为基于编码孔径的快照型拉曼光谱成像^[32],其中 FPA 探测器为焦平面阵列探测器, N_x 和 N_y 为编码孔径 x 和 y 轴方向的数量, L 为光谱通道数量, V 为测量通道数量。

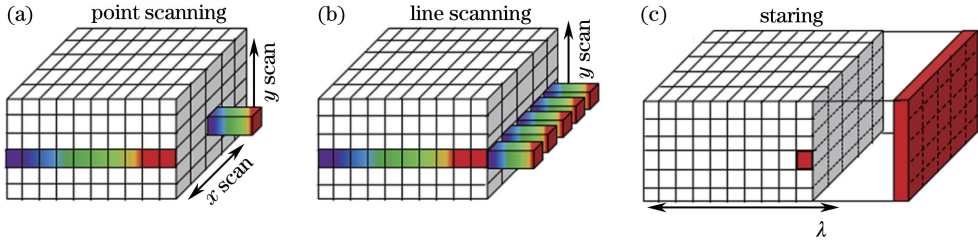


图 2 传统拉曼光谱成像扫描模式。(a)点扫描式;(b)线扫描式;(c)凝视型

Fig. 2 Traditional scanning mode for Raman spectroscopic imaging. (a) Point scanning; (b) line scanning; (c) staring

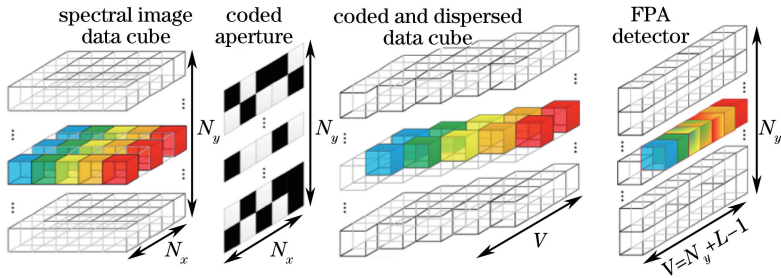


图 3 基于编码孔径的拉曼光谱成像

Fig. 3 Schematic of coded-aperture Raman spectroscopic imaging

基于光谱重建的拉曼光谱成像方法如图 4 所示,其中 $I_{channel,i}$ 为第 i 个通道的窄带测量, n 为窄带测量通道的总数量, $I_{\lambda,i}$ 为第 i 个波长下的强度值, m 为测量波长的总数量。其中,窄带测量通道的总数量远小于测量波长的总数量。该方法结合了凝视型及快照型拉曼光谱成像的优点,通过测量几个窄带测量图像并利用其重建每个像素点的拉曼光谱,有效地降低了对探测器及数据后处理的要求,实现了较高的光谱及空间分辨率^[14, 33-34]。窄带测量是指采集的光信号通过滤光片后被光电探测所采集到的信号。由于拉曼光谱数据的稀疏性^[35],因此可通过

几个特定光谱透过率的滤光片采集对应的窄带测量对拉曼光谱信息进行压缩,然后利用特定的光谱重建算法恢复每个像素点的拉曼光谱信息。该方法使用窄带测量代替逐波长测量,采集的拉曼信号的信噪比远高于传统的拉曼光谱成像方法^[36]。但是由于该方法需通过建立标准数据库才能获得光谱重建的模型,因此只能用于测量与标准数据库同类的样本。

表 1 所示为点扫描式、线扫描式、凝视型、快照型和基于光谱重建的拉曼光谱成像技术这 5 种拉曼光谱成像技术的原理及优缺点。成像分辨率和成像信噪比也是评价成像技术的主要标准,但是分辨率

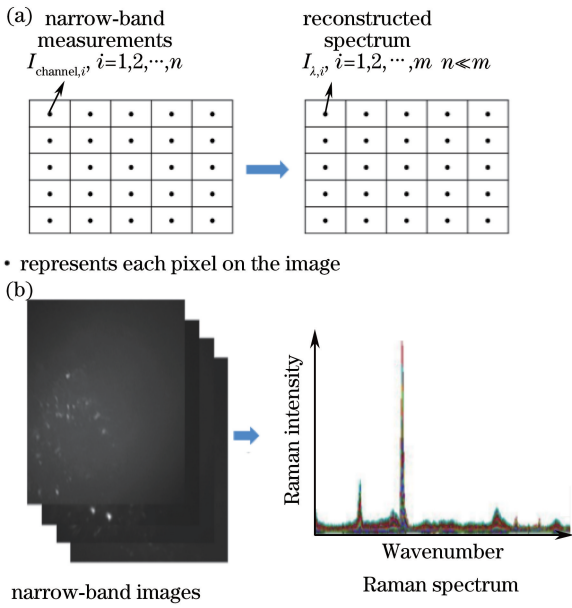


图 4 基于光谱重建的拉曼光谱成像方法
Fig. 4 Raman spectroscopic imaging method based on spectral reconstruction

和信噪比受成像系统所用元件参数及实验环境等因素的影响,因此仅讨论在样本极限^[37](即待测样本处于可承受的最大功率密度的状态)情况下各成像技术分辨率和信噪比的比较。受限于激光束的直径及采集时间等因素,点扫描式和线扫描式拉曼光谱成像技术通常采用略小于激光束直径的步进长度,以避免过采样或采样不足^[37],因此凝视型、快照型和基于光谱重建的拉曼光谱成像技术的成像分辨率

表 1 拉曼光谱成像技术比较

Table 1 Comparison on Raman spectroscopic imaging techniques

| Raman imaging mode | Principle | Advantage | Limitation |
|-------------------------|--|---|---|
| Point scanning | Point-by-point collection | Strong Raman signal | Slow data acquisition |
| Line scanning | Line-by-line collection | Moderate data acquisition speed | Field-curvature artifacts |
| Staring | Wavelength-by-wavelength collection | Spectral and spatial information is obtained simultaneously | Slow data acquisition when the required spectral resolution is high |
| Snapshot | Spectral and spatial information is obtained in one shot | Ultra-fast data acquisition speed | Requiring large detector array and slow post-processing |
| Spectral reconstruction | Spectral reconstruction followed by narrow-band measurements | Fast data acquisition and post-processing | Requiring calibration dataset |

3 拉曼光谱成像技术在生物医学中的应用

拉曼光谱成像技术能够提供分子的化学成分、结构及空间信息,在生物医学领域具有广阔的应用

前景。不同状态的细胞、组织及器官具有不同的生物化学成分及光谱特性,通过分析拉曼光谱图像可以提供待测样本的病理状况,并能有效地分辨正常组织与病变组织,因此拉曼光谱成像技术在生物样本检测、临床诊断、术中指导等生物医学领域发挥着通常优于前 2 种拉曼光谱成像技术。关于信噪比,点扫描式拉曼光谱成像技术的信噪比主要受散粒噪声影响;线扫描式拉曼光谱成像技术由于激发光以直线的形式被聚焦在样品表面,因此其信噪比优于点扫描模式^[38];凝视型拉曼光谱成像技术由于使用可调滤波器导致光损失较大,因此其信噪比最低;而快照型及基于光谱重建的拉曼光谱成像技术通过压缩并采集多个波段或空间位置的信息后再进行重建恢复,其信噪比通常最优^[36]。

除上述拉曼光谱成像技术之外,为了实现更快速的拉曼光谱成像,相干拉曼散射成像应运而生。相干拉曼散射成像技术通过相干激励增强相干散射信号,缩短了数据采集时间,从而提高了成像速度^[39]。表面增强拉曼光谱成像技术通过检测吸附在粗糙金属或金属溶胶颗粒表面上的分子,以获取比普通拉曼散射更强的信号,进而更灵敏地探测拉曼信号并进行成像^[40]。为了提高拉曼光谱成像的空间分辨率,拉曼光谱成像技术与基于最大似然法的图像处理技术相结合,利用基于 Poisson-Markov 约束的最大似然超分辨率原算法对共焦拉曼光谱图像进行超分辨图像复原,从而恢复拉曼光谱图像的高频成分,改善了共焦拉曼光谱系统的空间分辨能力,实现了拉曼光谱的超分辨成像^[41]。另外,随着数据分析处理方法的不断发展,拉曼光谱图像的采集方法已由传统的分析特征峰^[42]或主成分分析^[43]方法逐渐转变为机器学习方法^[44-45],甚至深度学习方法^[46]。

前景。不同状态的细胞、组织及器官具有不同的生物化学成分及光谱特性,通过分析拉曼光谱图像可以提供待测样本的病理状况,并能有效地分辨正常组织与病变组织,因此拉曼光谱成像技术在生物样本检测、临床诊断、术中指导等生物医学领域发挥着

重要作用。目前,受限于光学成像的穿透深度,拉曼光谱成像方法主要适用于活体浅表以及离体组织检测,体内检测(如消化道等)需结合内窥方法来实现。因此,以下主要综述拉曼光谱成像在基础医学以及脑部、乳房、泌尿系统、眼部、骨骼、皮肤等人体组织中的应用。

3.1 基础医学

细胞作为生物结构体及功能的基本单位,分析细胞内分子结构信息及生化成分是揭示生命奥秘和战胜疾病的关键。拉曼光谱成像技术通过探测分子自身的振动特性,不仅能够提供细胞内分子的结构信息,而且能够显示细胞之间的生化成分差别及动态变化,并且拉曼光谱成像具有无需荧光染色、不受水影响和对细胞伤害性低等优点。Zhang 等^[47]根据从人发中获得的拉曼光谱信息描述了人发蛋白质的空间分布及其结构、脂质的空间分布及脂链构象的顺序,从分子层面研究了头发的组织结构。Lu 等^[48]利用拉曼光谱分析研究了人发中蛋白质的二级结构,探讨了蛋白质二级结构的治疗诱导变化及其空间分布。孟令晶等^[49]利用拉曼光谱成像技术绘制出了单个人体肝癌细胞中 DNA 以及脂类、蛋白质在细胞中的分布情况。Kang 等^[50]利用表面增强拉曼光谱成像技术对单个活细胞进行成像,并利用纳米粒子检测细胞内细胞质等粒子的分布。Stiebing 等^[51]利用拉曼光谱成像技术研究了人类巨噬细胞间的特异性以及脂质摄取动态,为早期动脉粥样硬化提供了检测手段。

3.2 脑 部

大脑是人体器官中最为复杂的组织,病变通常伴随着组织细胞内部结构和生物化学成分的变化。拉曼光谱成像具有对分子进行成像和鉴别的能力,能发现分子细微的生物学组分变化。例如,颅内转移瘤是身体其他部位恶性肿瘤转移到颅内所引发的疾病,会导致一系列复杂的生物分子化学变化,拉曼光谱成像可通过检测分子信息来诊断颅内转移瘤的病况。Kirsch 等^[52]利用拉曼光谱成像对小鼠脑转移瘤模型进行成像,通过检测体内蛋白质及脂质等参数对皮质和皮下组织的转移瘤进行定位。Bergner 等^[44]实现了利用拉曼光谱成像技术对正常脑组织、坏死组织以及脑转移瘤组织的区分,并预测了脑转移的主要肿瘤。Zhou 等^[53]将拉曼光谱成像与空间频谱分析相结合,研究了正常组织和肺癌脑转移瘤组织的区分,并用图像显示了转移性脑肿瘤组织和正常组织在结构上的差异。除此之外,脑胶

质瘤是较为常见的脑部肿瘤之一,相对于正常细胞,胶质瘤细胞内部蛋白质和核酸的含量较多,脂质成分相对较少,拉曼光谱成像技术可在分子水平上对肿瘤细胞进行成像及光谱分析,进而判断肿瘤的存在、位置、大小和生长状态,为后期肿瘤的一系列治疗提供了精确的诊断信息^[54-57]。Freudiger 等^[58]利用拉曼光谱成像对小鼠脑胶质瘤模型进行成像,在正常组织中分辨胶质瘤,验证了拉曼光谱成像技术诊断脑胶质瘤的可行性。Kast 等^[59]利用拉曼光谱成像技术对冷冻组织切片进行成像,区分了胶质瘤和坏死组织中的灰质和白质区域,为医生在肿瘤切除时提供了可靠的分子信息。

3.3 乳 房

人体乳房主要由腺体、导管、脂肪组织和纤维组织等构成。在乳腺组织中,乳腺癌是最常见的疾病之一,拉曼光谱成像技术可从分子水平分析乳腺癌引起的组织异常。Hartsuiker 等^[60]采用共焦显微拉曼光谱成像技术,针对单个细胞检测乳腺癌细胞的特异性受体的化学成分。Brozek-Pluska 等^[61]利用拉曼光谱成像检测乳房组织中胡萝卜素、脂质和蛋白质的信息,进而诊断细胞是否发生癌变。Lee 等^[62]利用表面增强拉曼光谱成像技术检测和量化了细胞表面乳腺癌细胞表型标志物,并用于乳腺癌的早期诊断。Harmsen 等^[63]利用表面增强拉曼光谱成像技术对原发性乳腺癌病变细胞的边缘进行可视化,并对入侵到周围组织的微小肿瘤细胞以及癌症前期病变细胞进行成像,能够更精确地显示肿瘤的位置。表皮生长因子受体在细胞生长过程中起调节作用,Manciu 等^[64]利用拉曼光谱成像技术研究了细胞中表皮生长因子受体的活性,用以诊断乳腺癌和非乳腺癌细胞。在整形手术中,拉曼光谱成像也可作为一种检测手段,Schaerberle 等^[65]利用拉曼光谱成像技术对乳房植入组织病理学进行了组织活检。

3.4 泌尿系统

泌尿系统包括肾脏、输尿管、膀胱及尿道等,其主要功能为排泄人体新陈代谢过程中产生的无用或有害物质。Maier 等^[66]利用基于可调谐滤光片的拉曼光谱成像技术获得了特定波长下肾脏结构的拉曼图像,据此能检测肾脏结构及功能的异常,从而辅助医生对肾脏进行诊断。膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,Yosef 等^[67]利用拉曼光谱成像技术鉴别了膀胱癌细胞与正常细胞。前列腺癌也是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,Li 等^[68]利用拉曼光谱成像对前列腺细胞进行成像,实现了对肿瘤边缘的可视化。

3.5 眼 部

白内障是眼组织中最常见的疾病,是因晶状体代谢紊乱导致脂质变化而引发的,因此白内障疾病可以利用拉曼光谱成像技术从分子结构的角度来研究晶状体发生的特征性变化。Duindam 等^[69]利用共焦显微拉曼光谱成像技术分析晶状体切片中脂质的分布。Sijtsema 等^[70]利用拉曼光谱成像技术检测了小鼠眼晶状体中胆固醇及蛋白质的分布。黄斑病变是易出现在老年群体中的眼组织疾病之一,由集中在视网膜黄斑区及中心凹处的黄斑色素病变而引起。Gellermann 等^[71]通过拉曼光谱成像检测黄斑色素中的类胡萝卜素的成分及结构来分析黄斑病变。近年来,Ammar 等^[72]还利用拉曼光谱成像技术,通过检测脂质膜中 C—H 键的振动特征,对小鼠眼睛中角膜的细胞和非细胞结构进行成像,研究表明拉曼光谱成像技术能够用于角膜组织的成像。Kaji 等^[73]利用拉曼光谱成像技术实现了对小鼠眼角膜中脂质、蛋白质、核酸等生物分子的定位,为角膜相关疾病的诊断提供了必要的病理信息。

3.6 骨 骼

骨骼是一种具有复杂结构的结缔组织,具有负重、储存矿物质和承受机械压力等多种功能。骨骼是由矿物质和胶原纤维等物质组成的复合材料,其成分在一定情况下是不均匀分布的。通过拉曼光谱成像可以有效检测骨骼中各种成分的分布情况。Timlin 等^[74]利用拉曼光谱成像测量了松质骨磷酸因子与磷酸氢根因子在松质骨和皮质骨中的分布。颅缝早闭症是婴儿出生时常见的一种疾病,其症状为颅缝发育紊乱,颅骨的骨缝过早闭合,颅骨不能继续生长、扩大。Crane 等^[75-76]通过拉曼光谱成像技术研究了引起颅缝早闭的原因,这对于颅缝早闭疾病的研究具有重要意义。拉曼光谱成像技术还可用于骨位异化的诊断,Papour 等^[20]利用拉曼光谱成像技术从软组织中区分骨组织,实现了骨组织的可视化以及对其进行定位,为下一步的治疗提供了有力依据。

3.7 皮 肤

皮肤主要用于保护体内器官和组织不受物理、化学、病原体等的影响,由于其直接与外界接触,因此皮肤易受损且病种繁多。拉曼光谱成像技术可对皮肤的成分及病理状态进行成像和分析,进而对皮肤疾病进行诊断。拉曼光谱成像技术在皮瓣移植手术中可对整个皮瓣区域的成活度、成活面积、成活趋势等进行客观评价,从而为医生对皮瓣坏死情况采

取应对预防及治疗措施提供客观依据^[77-78]。在皮肤癌中,基底细胞癌是常见的恶性肿瘤之一。Gniadecka 等^[79]应用拉曼光谱技术研究了基底细胞癌和健康皮肤的拉曼光谱,对比了癌变组织蛋白质及脂质分子在结构及形态上的差异。Nijssen 等^[80]利用拉曼光谱成像对皮肤癌患者的组织样品进行测量,通过检测组织中脂质和核酸的浓度实现了基底癌细胞边界的可视化。Piredda 等^[81]的研究表明,拉曼光谱成像技术可对细胞中的核酸及色氨酸进行成像,并进一步区分正常皮肤细胞和致瘤角化细胞。在皮肤疾病的治疗中,药物外敷治疗是主要的治疗手段,拉曼光谱成像技术也可作为检测药物疗效的一种手段。Saar 等^[82]利用拉曼光谱成像技术观察了不同皮肤药物在皮肤中的渗透途径及渗透率,并对药物在皮肤表面形成的晶体进行了定位。

3.8 其 他

除上述应用外,拉曼光谱成像技术还被广泛地应用于食品和制药领域。目前食物中存在的食品添加剂及其他有害物质是复杂多样的,为了确保食品安全,快速、灵敏、可靠的拉曼光谱成像技术能够将添加剂的位置、浓度、成分等相关信息检测出来,并进行空间成像^[83-84]。片剂药物的药效不仅取决于药物的浓度,而且与药物颗粒大小、结晶度,以及各成分在片剂中的分布等也有一定的关系。快速、无损、无污染的拉曼光谱成像技术能够测定固体药物中活性成分、配剂颗粒大小及分布等参数^[85-86]。另外,拉曼光谱成像还可应用于环境监测和植物学等研究领域^[87-88]。

4 结 束 语

拉曼光谱成像技术作为一种结合拉曼光谱和成像的混合模式,可同时获得待测物质的空间特征与光谱信息,并且具有信息丰富、制样简单、水的干扰小和非侵入等特性。拉曼光谱成像技术能够从细胞和分子水平上定性、定量和定位地分析物质成分,从而为生物样本检测、疾病诊断及治疗等提供理论支持。拉曼光谱成像技术在生物医学等领域表现出了巨大的应用前景,但拉曼光谱成像在生物医学领域的主要应用还处于研究阶段,尚需解决一系列问题才能应用于临床。目前的拉曼光谱成像技术缺乏大面积检测和实时检测的特性,且数据采集及处理时间也较长,无法在短时间内得到诊断结果。因此,如何实现快速、实时的拉曼信号采集,并在短时间内给出检测结果是拉曼光谱成像技术今后的发展方向。

目前的拉曼光谱成像系统结构较为复杂且成本较高,因此小型化、低成本的拉曼光谱成像方法对于推广其应用范围具有重要意义。另外,拉曼光谱成像具有其他成像方法所不具备的优势特性,可与其他成像技术相结合,以获得更为精确的生物样本检测及临床诊断等。拉曼光谱成像技术的不断发展与改进必将使其在生物医学领域获得广泛的应用,并在该领域发挥巨大作用。

参 考 文 献

- [1] Raman C V. A change of wave-length in light scattering[J]. *Nature*, 1928, 121(3051): 619.
- [2] Asher S A. UV resonance Raman spectroscopy for analytical, physical, and biophysical chemistry: Part 2[J]. *Analytical Chemistry*, 1993, 65(4): 201A-210A.
- [3] 张延会, 吴良平, 孙真荣. 拉曼光谱技术应用进展[J]. *化学教学*, 2006(4): 32-35.
- [4] Tunnell J W, Haka A S, McGee S A, *et al.* Diagnostic tissue spectroscopy and its applications to gastrointestinal endoscopy [J]. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, 2003, 5(2): 65-73.
- [5] Xu B, Lin M M, Yao H L, *et al.* Measurement of hemoglobin concentration of single red blood cell using Raman spectroscopy [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2016, 43(1): 0115003.
徐斌, 林漫漫, 姚辉璐, 等. 拉曼光谱技术测量单个红细胞的血红蛋白浓度 [J]. *中国激光*, 2016, 43(1): 0115003.
- [6] Zheng J W, Yang T W. Classification method of biological tissues based on Raman spectrum features [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2017, 54(5): 053001.
郑家文, 杨唐文. 基于拉曼光谱特征的生物组织识别方法 [J]. *激光与光电子学进展*, 2017, 54(5): 053001.
- [7] Gong X J, Wang G, Ou Z H, *et al.* The application of hyperspectral imaging technique in biomedicine [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2016, 25(4): 289-294.
龚小进, 王刚, 欧中华, 等. 高光谱成像技术在生物医学中的应用 [J]. *激光生物学报*, 2016, 25(4): 289-294.
- [8] Zhu X J, Song X L, Wang D F, *et al.* Introduction of fluorescence molecular imaging technology and its development [J]. *Chinese Journal of Medical Instrumentation*, 2008, 32(1): 1-5.
朱新建, 宋小磊, 汪待发, 等. 荧光分子成像技术概述及研究进展 [J]. *中国医疗器械杂志*, 2008, 32(1): 1-5.
- [9] Tan B, Hu J M, Yang P, *et al.* Photoacoustic tomography imaging: An emerging detection way [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2013, 50(4): 040005.
谭波, 胡建明, 杨盼, 等. 光声成像: 一种新兴的检测方式 [J]. *激光与光电子学进展*, 2013, 50(4): 040005.
- [10] Dhakal S, Chao K L, Qin J W, *et al.* Identification and evaluation of composition in food powder using point-scan Raman spectral imaging [J]. *Applied Sciences*, 2017, 7(1): 7010001.
- [11] Qin J W, Kim M S, Chao K L, *et al.* Line-scan Raman imaging and spectroscopy platform for surface and subsurface evaluation of food safety and quality [J]. *Journal of Food Engineering*, 2017, 198: 17-27.
- [12] Pappas D, Smith B W, Winefordner J D. Raman imaging for two-dimensional chemical analysis [J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2000, 35(1/2): 1-23.
- [13] Samuel A Z, Yabumoto S, Kawamura K, *et al.* Rapid microstructure characterization of polymer thin films with 2D-array multifocus Raman microspectroscopy [J]. *Analyst*, 2015, 140(6): 1847-1851.
- [14] Chen S, Ong Y H, Liu Q. Fast reconstruction of Raman spectra from narrow-band measurements based on Wiener estimation[C]. *SPIE*, 2012, 8553: 85531R.
- [15] Lohumi S, Kim M S, Qin J W, *et al.* Raman imaging from microscopy to macroscopy: Quality and safety control of biological materials [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2017, 93: 183-198.
- [16] Opilik L, Schmid T, Zenobi R. Modern Raman imaging: Vibrational spectroscopy on the micrometer and nanometer scales [J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2013, 6(1): 379-398.
- [17] Bowden M, Gardiner D J, Rice G, *et al.* Line-scanned micro Raman spectroscopy using a cooled CCD imaging detector [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1990, 21(1): 37-41.
- [18] Ode T. Nanophoton—the latest laser microscope manufacturing company [J]. *The Review of Laser Engineering*, 2006, 34(7): 519-521.
- [19] Stewart S, Priore R J, Nelson M P, *et al.* Raman imaging [J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2012, 5(1): 337-360.
- [20] Papour A, Kwak J H, Taylor Z, *et al.* Wide-field Raman imaging for bone detection in tissue [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(10): 3892-3897.

- [21] Puppels G J, Grond M, Greve J. Direct imaging Raman microscope based on tunable wavelength excitation and narrow-band emission detection [J]. *Applied Spectroscopy*, 1993, 47(8): 1256-1267.
- [22] Baronti S, Casini A, Lotti F, *et al.* Multispectral imaging system for the mapping of pigments in works of art by use of principal-component analysis [J]. *Applied Optics*, 1998, 37(8): 1299-1309.
- [23] Turner J F, Treado P J. LCTF Raman chemical imaging in the near infrared [C]. *SPIE*, 1997, 3061: 280-283.
- [24] Morris H R, Hoyt C C, Miller P, *et al.* Liquid crystal tunable filter Raman chemical imaging [J]. *Applied Spectroscopy*, 1996, 50(6): 805-811.
- [25] Schaeberle M D, Tuschel D D, Treado P J. Raman chemical imaging of microcrystallinity in silicon semiconductor devices [J]. *Applied Spectroscopy*, 2001, 55(3): 257-266.
- [26] Morris H R, Hoyt C C, Treado P J. Imaging spectrometers for fluorescence and Raman microscopy: Acousto-optic and liquid crystal tunable filters [J]. *Applied Spectroscopy*, 1994, 48(7): 857-866.
- [27] Oshima Y, Sato H, Kajiura-Kobayashi H, *et al.* Light sheet-excited spontaneous Raman imaging of a living fish by optical sectioning in a wide field Raman microscope [J]. *Optics Express*, 2012, 20 (15): 16195-16204.
- [28] Johnson W R, Wilson D W, Bearman G. All-reflective snapshot hyperspectral imager for ultraviolet and infrared applications [J]. *Optics Letters*, 2005, 30(12): 1464-1466.
- [29] Schmäzlin E, Moralejo B, Rutowska M, *et al.* Raman imaging with a fiber-coupled multichannel spectrograph [J]. *Sensors*, 2014, 14 (11): 21968-21980.
- [30] Okuno M, Hamaguchi H. Multifocus confocal Raman microspectroscopy for fast multimode vibrational imaging of living cells [J]. *Optics Letters*, 2010, 35(24): 4096-4098.
- [31] McCain S T, Gehm M E, Wang Y, *et al.* Coded aperture Raman spectroscopy for quantitative measurements of ethanol in a tissue phantom [J]. *Applied Spectroscopy*, 2006, 60(6): 663-671.
- [32] Feng W Y, Rueda H, Fu C, *et al.* 3D compressive spectral integral imaging [J]. *Optics Express*, 2016, 24(22): 24859-24871.
- [33] Wei D, Chen S, Ong Y H, *et al.* Fast wide-field Raman spectroscopic imaging based on simultaneous multi-channel image acquisition and Wiener estimation [J]. *Optics Letters*, 2016, 41(12): 2783-2786.
- [34] Chen S, Wang G, Cui X Y, *et al.* Stepwise method based on Wiener estimation for spectral reconstruction in spectroscopic Raman imaging [J]. *Optics Express*, 2017, 25(2): 1005-1018.
- [35] Chen S, Ong Y H, Lin X Q, *et al.* Optimization of advanced Wiener estimation methods for Raman reconstruction from narrow-band measurements in the presence of fluorescence background [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(7): 2633-2648.
- [36] Chen S, Lin X, Yuen C, *et al.* Recovery of Raman spectra with low signal-to-noise ratio using Wiener estimation [J]. *Optics Express*, 2014, 22 (10): 12102-12114.
- [37] Schlücker S, Schaeberle M D, Huffman S W, *et al.* Raman microspectroscopy: A comparison of point, line, and wide-field imaging methodologies [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(16): 4312-4318.
- [38] Ramsey J, Ranganathan S, McCreery R L, *et al.* Performance comparisons of conventional and line-focused surface Raman spectrometers [J]. *Applied Spectroscopy*, 2001, 55(6): 767-773.
- [39] Chen T, Yu Z L, Zhang X N, *et al.* Coherent Raman scattering microscopy [J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2012, 42(1): 1-16.
陈涛, 虞之龙, 张先念, 等. 相干拉曼散射显微术 [J]. *中国科学: 化学*, 2012, 42(1): 1-16.
- [40] Zhou M H, Liao C Y, Ren Z Y, *et al.* Bioimaging technologies based on surface-enhanced Raman spectroscopy and their applications [J]. *Chinese Optics*, 2013, 6(5): 633-642.
周明辉, 廖春艳, 任兆玉, 等. 表面增强拉曼光谱生物成像技术及其应用 [J]. *中国光学*, 2013, 6(5): 633-642.
- [41] Cui H, Wang Y, Qiu L R, *et al.* Confocal Raman image method with maximum likelihood method [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2017, 37(5): 1571-1575.
崔晗, 王允, 邱丽荣, 等. 基于最大似然法的共焦拉曼光谱成像方法 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2017, 37(5): 1571-1575.
- [42] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I U. Raman spectroscopy of biological tissues [J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2007, 42(5): 493-541.
- [43] Zhang L, Henson M J, Sekulic S S. Multivariate data analysis for Raman imaging of a model pharmaceutical tablet [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 545(2): 262-278.
- [44] Bergner N, Bocklitz T, Romeike B F M, *et al.* Identification of primary tumors of brain metastases by Raman imaging and support vector machines [J].

- Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012, 117(6): 224-232.
- [45] Tolstik T, Marquardt C, Matthäus C, *et al.* Discrimination and classification of liver cancer cells and proliferation states by Raman spectroscopic imaging[J]. *Analyst*, 2014, 139(22): 6036-6043.
- [46] Weng S, Xu X Y, Li J S, *et al.* Combining deep learning and coherent anti-Stokes Raman scattering imaging for automated differential diagnosis of lung cancer[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(10): 1-10.
- [47] Zhang X, Roeffaers M B J, Basu S, *et al.* Label-free live-cell imaging of nucleic acids using stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Chemphyschem*, 2012, 13(4): 1054-1059.
- [48] Lu F K, Basu S, Igras V, *et al.* Label-free DNA imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(37): 11624-11629.
- [49] Meng L J, Ji X L, Li Z D, *et al.* Monohepatocellular carcinoma by Raman mapping [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, 48(2): 021703.
孟令晶, 纪晓露, 李自达, 等. 单个肝癌细胞的拉曼成像研究[J]. *激光与光电子学进展*, 2011, 48(2): 021703.
- [50] Kang J W, So P T C, Dasari R R, *et al.* High resolution live cell Raman imaging using subcellular organelle-targeting SERS-sensitive gold nanoparticles with highly narrow intra-nanogap[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(3): 1766-1772.
- [51] Stiebing C, Meyer T, Rimke I, *et al.* Real-time Raman and SRS imaging of living human macrophages reveals cell-to-cell heterogeneity and dynamics of lipid uptake[J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(9): 1217-1226.
- [52] Kirsch M, Schackert G, Salzer R, *et al.* Raman spectroscopic imaging for *in vivo* detection of cerebral brain metastases [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398(4): 1707-1713.
- [53] Zhou Y, Liu C H, Pu Y, *et al.* Optical pathology of human brain metastasis of lung cancer using combined resonance Raman and spatial frequency spectroscopies[C]. *SPIE*, 2016, 9703: 97031R.
- [54] Wang Y C, Li Y, Wu X Y, *et al.* Research progress of application of Raman imaging technology in detection of brain glioma [J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacy*, 2016, 25(6): 398-401.
王宇宸, 李杨, 吴歆怡, 等. 拉曼成像技术在脑胶质瘤检测中的研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 25(6): 398-401.
- [55] Koljenović S, Choo-Smith L P, Bakker Schut T C, *et al.* Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by Raman spectroscopy[J]. *Laboratory Investigation*, 2002, 82(10): 1265-1277.
- [56] Amharref N, Beljebbar A, Dukic S, *et al.* Discriminating healthy from tumor and necrosis tissue in rat brain tissue samples by Raman spectral imaging [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1768(10): 2605-2615.
- [57] Krafft C, Sobottka S B, Schackert G, *et al.* Raman and infrared spectroscopic mapping of human primary intracranial tumors: A comparative study[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006, 37(1/2/3): 367-375.
- [58] Freudiger C W, Pfannl R, Orringer D A, *et al.* Multicolored stain-free histopathology with coherent Raman imaging[J]. *Laboratory Investigation*, 2012, 92(10): 1492-1502.
- [59] Kast R, Auner G, Yurgelevic S, *et al.* Identification of regions of normal grey matter and white matter from pathologic glioblastoma and necrosis in frozen sections using Raman imaging[J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2015, 125(2): 287-295.
- [60] Hartsuiker L, Zeijen N J L, Terstappen L W M M, *et al.* A comparison of breast cancer tumor cells with varying expression of the Her2/neu receptor by Raman microspectroscopic imaging [J]. *Analyst*, 2010, 135(12): 3220-3226.
- [61] Brozek-Pluska B, Musial J, Kordek R, *et al.* Raman spectroscopy and imaging: Applications in human breast cancer diagnosis[J]. *Analyst*, 2012, 137(16): 3773-3780.
- [62] Lee S, Chon H, Lee J, *et al.* Rapid and sensitive phenotypic marker detection on breast cancer cells using surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 51: 238-243.
- [63] Harmsen S, Huang R, Wall M A, *et al.* Surface-enhanced resonance Raman scattering nanostars for high-precision cancer imaging [J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(271): 271ra7.
- [64] Manciu F S, Ciubuc J D, Parra K, *et al.* Label-free Raman imaging to monitor breast tumor signatures [J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2017, 16(4): 461-469.
- [65] Schaeberle M D, Kalasinsky V F, Luke J L, *et al.* Raman chemical imaging: Histopathology of inclusions in human breast tissue [J]. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(11): 1829-1833.
- [66] Maier J, Panza J, Drauch A, *et al.* Raman molecular

- imaging of tissue and cell samples using tunable multiconjugate filter [C]. SPIE, 2006, 6380: 638009.
- [67] Yosef H K, Krauß S D, Lechtonen T, *et al.* Noninvasive diagnosis of high-grade urothelial carcinoma in urine by Raman spectral imaging [J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(12): 6893-6899.
- [68] Li M, Banerjee S R, Zheng C, *et al.* Ultrahigh affinity Raman probe for targeted live cell imaging of prostate cancer [J]. Chemical Science, 2016, 7(11): 6779-6785.
- [69] Duindam H J, Vrensen G F, Otto C, *et al.* New approach to assess the cholesterol distribution in the eye lens: Confocal Raman microspectroscopy and filipin cytochemistry [J]. Journal of Lipid Research, 1995, 36(5): 1139-1146.
- [70] Sijtsema N M, Duindam J J, Puppels G J, *et al.* Imaging with extrinsic Raman labels [J]. Applied Spectroscopy, 1996, 50(5): 545-551.
- [71] Gellermann W, Ermakov I V, McClane R W, *et al.* Raman imaging of human macular pigments [J]. Optics Letters, 2002, 27(10): 833-835.
- [72] Ammar D A, Lei T C, Kahook M Y, *et al.* Imaging the intact mouse cornea using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) [J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2013, 54(8): 5258-5265.
- [73] Kaji Y, Akiyama T, Segawa H, *et al.* Raman microscopy: A noninvasive method to visualize the localizations of biomolecules in the cornea [J]. Cornea, 2017, 36(s1): 67-71.
- [74] Timlin J A, Carden A, Morris M D, *et al.* Spatial distribution of phosphate species in mature and newly generated mammalian bone by hyperspectral Raman imaging [J]. Journal of Biomedical Optics, 1999, 4(1): 28-34.
- [75] Crane N J, Morris M D, Ignelzi M A, *et al.* Raman imaging demonstrates FGF2-induced craniosynostosis in mouse calvaria [J]. Journal of Biomedical Optics, 2005, 10(3): 031119.
- [76] Crane N J, Popescu V, Morris M D, *et al.* Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization [J]. Bone, 2006, 39(3): 434-442.
- [77] Chan K L A, Zhang G J, Tomic-Canic M, *et al.* A coordinated approach to cutaneous wound healing: Vibrational microscopy and molecular biology [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008, 12(5b): 2145-2154.
- [78] Braiman-Wiksman L, Solomonik I, Spira R, *et al.* Novel insights into wound healing sequence of events [J]. Toxicologic Pathology, 2007, 35(6): 767-779.
- [79] Gniadecka M, Wulf H C, Mortensen N N, *et al.* Diagnosis of basal cell carcinoma by Raman spectroscopy [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 1997, 28(2/3): 125-129.
- [80] Nijssen A, Bakker Schut T C, Heule F, *et al.* Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2002, 119(1): 64-69.
- [81] Piredda P, Berning M, Boukamp P, *et al.* Subcellular Raman microspectroscopy imaging of nucleic acids and tryptophan for distinction of normal human skin cells and tumorigenic keratinocytes [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(13): 6778-6785.
- [82] Saar B G, Contreras-Rojas L R, Xie X S, *et al.* Imaging drug delivery to skin with stimulated Raman scattering microscopy [J]. Molecular Pharmaceutics, 2011, 8(3): 969-975.
- [83] Smith G P S, Holroyd S E, Reid D C W, *et al.* Raman imaging processed cheese and its components [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2017, 48(3): 374-383.
- [84] Tan Z, Lou T T, Huang Z X, *et al.* Single-drop Raman imaging exposes the trace contaminants in milk [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(30): 6274-6281.
- [85] Brodard P, Roth S, Vorlet O. Non-destructive localization and identification of active pharmaceutical compounds by Raman chemical imaging [J]. Chimia, 2013, 67(12/13): 923-924.
- [86] Bhogadi R K, Satyanarayana A, Rao N S, *et al.* Simple, fast and economic way for estimation of calcipotriene crystal size and particle distribution in its drug product. Raman microscope particle size verses pre-calci content-an approximation by HPLC analysis [J]. Analytical Chemistry Letters, 2017, 7(1): 1-10.
- [87] Batonneau Y, Sobanska S, Laureyns J, *et al.* Confocal microprobe Raman imaging of urban tropospheric aerosol particles [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(4): 1300-1306.
- [88] Colares C J G, Pastore T C M, Coradin V T R, *et al.* Exploratory analysis of the distribution of lignin and cellulose in woods by Raman imaging and chemometrics [J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2015, 26(6): 1297-1305.