

肺癌细胞物质表达及堆积结构的拉曼位移特征

杨玉¹, 陶正荣¹, 闫静², 吕殊星¹, 王然¹, 刘晓丹¹, 孙续国^{1*}

¹天津医科大学医学检验学院, 天津 300203;

²天津理工大学计算机科学与工程学院, 天津 300384

摘要 分析了肺腺癌细胞和间皮细胞间的拉曼位移及细胞化学染色形态学特征参数间的关系, 为非创伤性检查肿瘤细胞提供参考。选择 A549 和 Met-5A 两种细胞进行拉曼光谱分析, 将两种细胞进行 H&E 和 PAP 染色, 计算其形态学图像特征。两种细胞在 1082, 1155, 1304 cm^{-1} 处存在拉曼位移。通过图像识别 A549 和 Met-5A 细胞的能量标准差, 采用 PAP 染色方法的两种细胞差异具有统计学意义 ($p < 0.05$), 但是采用 H&E 染色方法的两种细胞差异无统计学意义 ($p > 0.05$); 对于颜色均值特征值, 采用两种染色方法的两种细胞差异均具有统计学意义 ($p < 0.05$)。基于化学物质亲和特性, 从肿瘤物质表达及堆积结构方面分析肺癌细胞拉曼位移特征, 实验结果显示, 临床组织病理染色分析核酸及蛋白表达特征, 而拉曼光谱分析发现肺癌细胞存在核酸、蛋白表达及脂质结构的拉曼峰位移, 这为拉曼检测肿瘤细胞物质波峰设定提供参考。

关键词 生物光学; 肺癌细胞; 拉曼光谱; 化学染色

中图分类号 TN247

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP56.151701

Raman Shift Characteristics of Substance Expression and Accumulation Structure in Lung Cancer Cells

Yang Yu¹, Tao Zhengrong¹, Yan Jing², Lü Shuxing¹, Wang Ran¹,
Liu Xiaodan¹, Sun Xuguo^{1*}

¹ School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China;

² School of Computer Science and Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China

Abstract To lay a foundation for the non-invasive examination of tumor cells, the associations between Raman shift characteristics and morphological parameters of cytochemical staining are analyzed in lung adenocarcinoma cells and physiological mesothelial cells. A549 cells and Met-5A cells are analyzed using Raman spectroscopy to calculate the Raman spectral shift characteristics. A549 cells and Met-5A cells are stained with H&E and PAP solutions to calculate their morphological image characteristics. In both cell lines, Raman shifts are observed at 1082, 1155, and 1304 cm^{-1} . Energy standard deviations of A549 and Met-5A cells are recognized by the images. PAP staining results are significantly different ($p < 0.05$), but H&E staining results show no significant differences ($p > 0.05$) between the cell lines. The mean color value of cell image is significantly different ($p < 0.05$) between the two stains. The Raman shift characteristics of lung cancer cells are then analyzed in terms of tumor substance expression and accumulation structure based on the affinity characteristics of the chemical substances. Experimental results show that clinical histopathological staining reveals the characteristics of nucleic acid and protein expression, and Raman spectroscopy reveals Raman peak shifts of nucleic acids, protein expression, and the lipid structure in lung cancer cells, laying a foundation for Raman spectroscopy to be used to set the substance peak of tumor cells.

Key words biotechnology; lung cancer cell; Raman spectroscopy; chemical staining

OCIS codes 170.5660; 170.1530; 170.0110

收稿日期: 2019-01-25; 修回日期: 2019-01-30; 录用日期: 2019-03-06

基金项目: 国家自然科学基金(61703304)

* E-mail: sunxuguo@tmu.edu.cn

1 引言

当入射光照射物质时,基态分子受入射光子激发,跃迁到某一激发态,处于激发态的分子不稳定,小部分激发态分子在短时间内返回到基态,并发出与入射光能量不同的光子,这种现象被称为拉曼散射。拉曼散射光与入射光的频率差被称为拉曼位移^[1-2],拉曼位移与物质的分子振动、转动能级及物质结构有关。因此,拉曼光通过无创伤探测细胞内物质分子官能团的振动光谱反映物质分子结构,可实现分析分子水平细胞的物质表达^[3-4]。

最近,采用拉曼光谱分析各类癌症的光谱特征的报道有许多。梁昊岳等^[5]应用拉曼光谱准确区分急性早幼粒细胞白血病(M3)和急性单核细胞白血病(M5)细胞。叶宇煌等^[6]基于拉曼光谱准确区分鼻咽癌细胞株和正常鼻咽细胞株,灵敏度和特异性分别达到90%和100%。杨文沛等^[7]应用拉曼光谱准确区分正常细胞和肝癌细胞。付莉等^[8]对肺癌组织和正常肺组织进行了拉曼光谱研究,得出两者的拉曼光谱差异具有统计学意义。

肺癌病理细胞是肺癌肿瘤转移及浸润的基础,通过病理细胞免疫组织化学染色辅助鉴别肿瘤细胞^[9-11]。探索肺癌肿瘤细胞及非肿瘤组织细胞的化学染色特征及拉曼光谱特征,可为无创性检测提供实验依据。

本文基于肺腺癌细胞病理特征选择A549细胞系为肿瘤细胞,Met-5A细胞系为非肿瘤组织细胞,分析这两种细胞的拉曼位移特征,并比较病理染色的细胞图像特征。

2 基本原理

2.1 细胞培养

A549细胞系为肺腺癌细胞,来自天津医科大学肿瘤医院;Met-5A细胞系是间皮细胞,来自北纳公司。A549细胞使用Gibco生产的Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培养基,Met-5A细胞使用Solarbio生产的DMEM培养基,在37℃、5%CO₂(体积分数)的温箱中孵育,培养到合适密度后收集待用。

2.2 组织细胞巴氏(PAP)染色

将收集的细胞用磷酸盐缓冲液(0.01 mol, PBS)清洗、涂片,涂片干燥后,使用95%乙醇(体积分数,下同)固定15 min,依次在80%、50%乙醇中30 s,苏木素染色3~5 min,1%盐酸乙醇溶液分化

数秒后,稀碳酸锂水溶液蓝化30 s,依次在50%、80%乙醇中30 s,置于95%乙醇中脱水2 min,橘黄G染液中染2 min,再用95%乙醇洗两次,EA50染液染3 min,95%乙醇洗两次后,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固,镜检。

2.3 细胞H&E染色

将收集的细胞用PBS清洗、涂片,涂片干燥后,用95%乙醇固定,苏木素染色10 min,分化液分化30 s,自来水浸泡,伊红染色1 min,自来水浸泡,脱水,二甲苯透明,中性树胶封固,镜检。

2.4 细胞台盼蓝染色

将收集到的细胞用PBS清洗重悬,细胞悬液与4%台盼蓝染液(Solarbio)以9:1比例混合,染色3 min后细胞冲池计数,计数3次。

2.5 拉曼光谱分析两类细胞

将A549细胞和Met-5A细胞放在培养皿中培养,两种细胞均贴壁生长,待细胞生长状态良好、布满培养皿底层时,用PBS将细胞冲洗干净,使用拉曼光谱仪(Alpha 300R, WITec, 德国)测量拉曼光谱。使用二极管激光器激发532 nm的光源,由于拉曼信号通常非常弱,为了收集到稳定的生物信号,采集时间为6 s,用于记录每个光谱。激光功率为54.3 mW。收集从700 cm⁻¹到1700 cm⁻¹的拉曼光谱,该波段包含最有用的生物学信息。

2.6 图像分析

在医学图像处理中,纹理是鉴定细胞的重要特征。分析图像的纹理,可以描述细胞的空间强度分布和特定颜色。灰度共生矩阵是用于检查纹理的常用统计方法,其考虑了像素之间的空间关系。颜色特征对于从血细胞中获取相关信息非常重要。使用Matlab软件中自行设计的程序分析细胞的特征参数,对H&E、PAP染色的细胞照片进行特征分析,分别分析两种细胞的特征值,即能量标准差和颜色均值。灰度共生矩阵用于表示图像中相距为 d 的两个灰度像素同时出现的联合概率分布。用条件概率来反映纹理,是相邻像素具有灰度相关性的表现。

设 I 为一幅二维数字图像,其大小为 $M \times N$,灰度级别为 L ,图像中每一点的灰度级可以表示为 $I(x, y)$,在图像中任取两点 (k, l) 、 (m, n) ,两点形成一个点对,设该点对的灰度值为 (i, j) ,即 $I(k, l) = i, I(m, n) = j$,则灰度共生矩阵 P 是一个 $L \times L$ 的方阵,其方阵中元素定义为

$$P(i, j, d, \theta) = \# \{ [(k, l), (m, n)] \in \Omega \mid I(k, l) = i, I(m, n) = j \}, \quad (1)$$

式中: $d = \max(|l - m|, |k - n|)$, 即两个像素点的横、纵坐标距离的最大值; θ 为两个像素点之间的角度, 通常选取东-西、西北-东南、南-北、东北-西南 4 个方向(以左上角为起点), 即 $0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ 。

能量即灰度共生矩阵中平方元素的和, 也是对图像纹理的灰度变化稳定程度的度量, 反映了图像灰度分布均匀程度和纹理粗细度。能量值越大, 表明当前纹理是一种变化稳定的纹理, 也称为一致性。

$$E = \sum_{i=0}^{L-1} \sum_{j=0}^{L-1} [P(i, j)]^2, \quad (2)$$

式中: $P(i, j)$ 为灰度共生矩阵中第 i 行、第 j 列元素的值; L 表示分成的总的灰度等级。

颜色直方图表示不同颜色在整幅图像中占据的比例, 是表征颜色分布的常用方法。颜色均值可表示为

$$H(i) = \frac{n_i}{N}, i = 0, 1, \dots, L - 1, \quad (3)$$

$$u = \sum_{i=0}^{L-1} iH(i), \quad (4)$$

式中: i 表示像素的灰度等级; n_i 表示具有灰度级 i 的像素数目; N 表示图像中总的像素数目。

2.7 统计学分析

使用 SPSS 19.0 统计学软件对所有数据进行分析, 结果以均值 ± 标准差 ($x \pm s$) 形式体现, 两种细胞间图像特征比较采用独立样本 t 检验, $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 观察 A549 细胞和 Met-5A 细胞的生长状态

A549 细胞和 Met-5A 细胞均是可以体外培养的细胞, 其生长经历了新分化到细胞老化的过程。本实验同时培养 A549 和 Met-5A 两种细胞系细胞。从培养第一天开始, 每天取细胞进行台盼蓝染色, 重复 3 次记录细胞成活率, 在 3 d 后, A549 和 Met-5A 细胞成活率分别达到 $96\% \pm 0.41\%$ 和 $94\% \pm 0.52\%$, 如图 1 所示。经过台盼蓝染色后计数存活细胞, A549 细胞的最高成活率为 $96\% \pm 0.41\%$, Met-5A 细胞的最高成活率为 $94\% \pm 0.52\%$ 。另外, 利用光学显微镜观察培养细胞形态学特征, A549 细胞为不规则圆形及部分细胞呈现细胞纤维突出状, 细胞的遮光程度比较均匀; Met-5A 细胞多数呈现纤维状, 细胞遮光程度也比较均匀, 如图 2 所示。

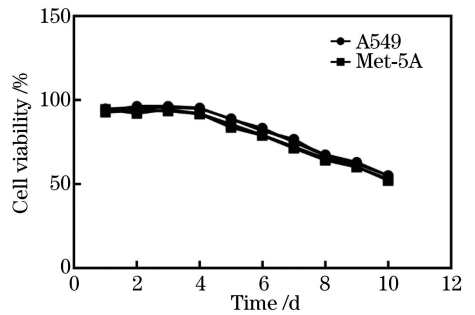


图 1 细胞培养天数与细胞存活率的趋势

Fig. 1 Trends in cell culture days and cell viability

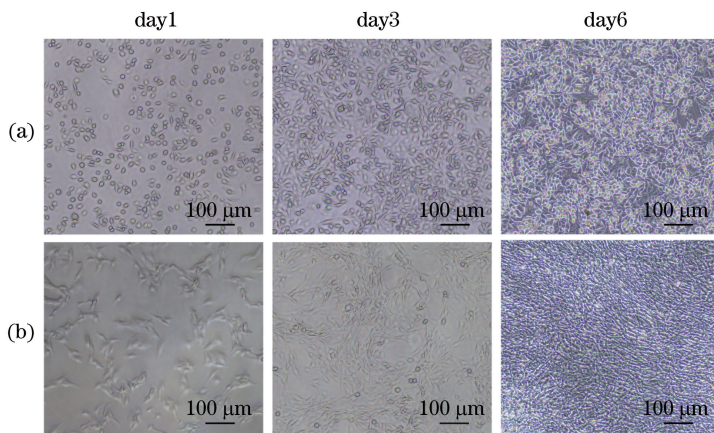


图 2 光学显微镜观察 A549 和 Met-5A 两种细胞随培养时间的延长生长形态学特征。(a) A549; (b) Met-5A

Fig. 2 Morphological characteristics of A549 and Met-5A cells in optical microscopy with extension of culture time.

(a) A549; (b) Met-5A

3.2 分析 A549 和 Met-5A 细胞的拉曼位移

A549 细胞是肺癌肿瘤细胞中被广泛使用的细胞系, 能够体现肺癌肿瘤细胞生物分子表达; 而

Met-5A 细胞为正常间皮细胞系, 可以显示正常间皮细胞生物分子表达。探讨两种细胞生物分子表达的差别有利于临床诊断肺癌。迄今为止, 临床病理

组织采用细胞化学染色的方法鉴别肿瘤细胞,作为临床诊断的金标准,但是属于创伤性检测方法。探讨肺癌细胞拉曼光谱特征,有利于探索非创伤性检测方法。本实验对 A549 细胞和 Met-5A 细胞培养 3 d,细胞繁殖层数均匀,严密覆盖培养皿底层,采用拉曼光谱仪显微镜观察到 A549 细胞和 Met-5A

细胞均严密填充培养皿底层,如图 3 所示。采用拉曼光谱仪测定所有被检细胞,拉曼光谱仪结果显示, A549 细胞与 Met-5A 细胞在拉曼特征峰 1082 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} 及 1304 cm^{-1} 处出现拉曼峰移现象,如图 4 所示。拉曼光谱特征峰值归属如表 1 所示。

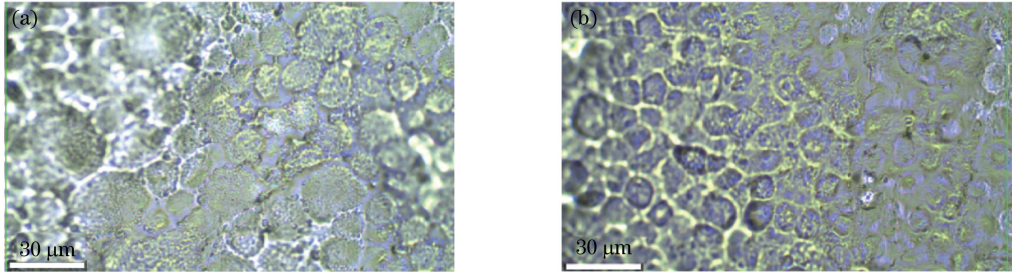


图 3 拉曼仪器下的 A549 和 Met-5A 细胞光学图像。(a) A549;(b) Met-5A

Fig. 3 Optical images of A549 and Met-5A cells under Raman instruments. (a) A549; (b) Met-5A

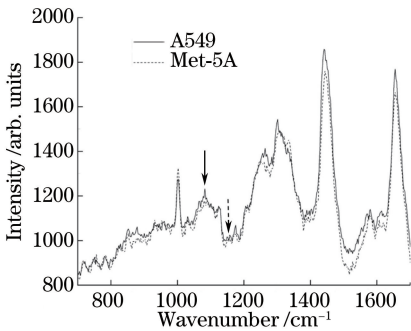


图 4 A549 和 Met-5A 细胞的拉曼位移特征比较。实箭头指示 1082 cm^{-1} 拉曼峰,虚箭头指示 1155 cm^{-1} 拉曼峰

Fig. 4 Comparison of Raman shift characteristics between A549 and Met-5A cells. Solid arrow indicates Raman peak at 1082 cm^{-1} , and dotted arrow indicates Raman peak at 1155 cm^{-1}

3.3 H&E 及 PAP 分别染色 A549 和 Met-5A 细胞

相同条件下,同时培养 A549 细胞和 Met-5A 细胞,收集培养 3 d 后的细胞,制备细胞涂片,利用 H&E 及 PAP 两种染色方法分别对 A549 细胞和 Met-5A 细胞进行染色,如图 5 所示。对每个细胞进行 CCD 图像采集,共计采集 200 个细胞图像。光学显微镜下分析细胞特征参数,采用自行设计的细胞特征计算程序,分别计算 A549 细胞和 Met-5A 细胞在 H&E 及 PAP 染色方法后的能量标准差及颜色均值^[12-13]。对于能量标准差特征值,采用 PAP 染色方法的两种细胞差异具有统计学意义,但是采用 H&E 染色方法的两种细胞差异无统计学意义($p > 0.05$);对于颜色均值特征值,采用两种染色方法的

两种细胞差异均具有统计学意义($p < 0.05$),如表 2 所示。

表 1 拉曼光谱的特征峰值分配

Table 1 Characteristic peak assignments for Raman spectra

Peak position / cm^{-1}	Major assignments	PAP stain affinity	H&E stain affinity
786	DNA:O—P—O	+	+
1082	O—P—O ⁻ stretch	+	+
1155	C—N stretching (protein)	++	+
1258	Amide III	-	-
1304	CH ₂ deformation (lipid)	-	-
1450	CH ₂ CH ₃ twisting mode(lipid)	-	-
1658	Amide I (C=O stretching mode of proteins, α -helix conformation)	-	-

Note: + and ++ indicate affinity degree of H&E and PAP dyes with corresponding chemical groups; - indicates that H&E and PAP dyes are negatively colored with corresponding chemical groups.

在临床研究肺癌肿瘤拉曼特征时,采用肺癌组织及肿瘤旁组织进行对照研究,这些研究基于细胞的物质表达差异。肺癌细胞物质表达以及堆积结构对拉曼光谱的影响均需要系统的研究。A549 细胞(体外培养生长附着或紧贴培养皿底)是广泛应用于 II 型肺上皮细胞模型的肿瘤细胞,为肿瘤细胞模型;而 Met-5A 细胞为肺组织中存在的非肿瘤细胞。分别观察两种细胞的物质表达及堆积结构的改变对拉曼光谱的影响。实验同时培养 A549 和 Met-5A 两种细胞,细胞生长状态良好,在培养皿底部厚度均

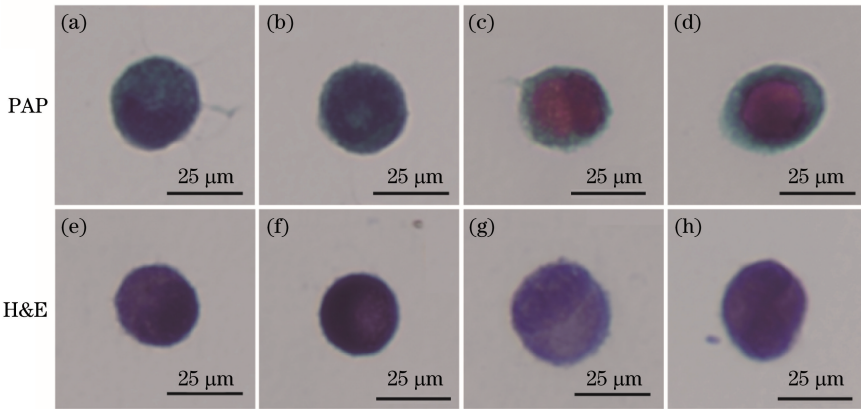


图5 用PAP和H&E分别染色A549和Met-5A的结果。(a)(b)(e)(f) A549;(c)(d)(g)(h) Met-5A
Fig. 5 Staining results of A549 and Met-5A cells with PAP and H&E, respectively. (a)(b)(e)(f) A549;
(c)(d)(g)(h) Met-5A

表2 两种染料分别染色A549和Met-5A两种类型细胞的图像特征参数

Table 2 Image characteristic parameters of A549 and Met-5A cells stained by two dyes

Characteristic parameter	Cell	PAP ($n=100$)	H&E ($n=100$)
Energy variance	A549	7.91419 ± 1.66525	7.98664 ± 1.68421
	Met-5A	4.62469 ± 1.37511	8.16944 ± 1.83352
	t	10.771	-0.519
	p	<0.001	0.605
Color mean	A549	7.06792 ± 0.04892	7.11570 ± 0.04107
	Met-5A	7.10321 ± 0.03602	7.05825 ± 0.02611
	t	-4.109	8.347
	p	<0.001	<0.001

匀,台盼蓝染色显示了细胞存活率,A549细胞成活率为 $96\% \pm 0.41\%$,Met-5A细胞成活率为 $94\% \pm 0.52\%$,两种细胞生长情况近似。为比较肺癌肿瘤细胞与对照细胞的拉曼特征,对培养了3d的A549细胞和Met-5A细胞进行拉曼光谱仪检测,结果显示,两类细胞系在 $1082, 1155, 1034 \text{ cm}^{-1}$ 附近出现拉曼峰移现象。根据基础研究报告^[14-16], 1082 cm^{-1} 附近处为核酸分子磷酸二脂基团 PO_2^- 的反对称伸缩振动, 1155 cm^{-1} 附近为蛋白质C—N分子伸缩振动, 1304 cm^{-1} 附近为脂肪酸链 CH_2 变形振动。巴氏染色中的染料苏木素带正电荷,是碱性染料,能够与细胞核内的脱氧核糖核酸(DNA)双螺旋结构链中带负电荷的磷酸基亲和;EA50染料包括伊红和亮绿,属于酸性染料,在溶解媒介中为负离子发色基团,可与蛋白质中带正电的氨基(C—N)亲和,从而使胞浆显蓝色、绿色、橘黄色或红色,胞浆颜色分明,易于分辨。H&E染色也是采用核酸、蛋白与染料基团的亲和性辅助鉴别细胞物质表达。

细胞H&E染色结果显示,A549细胞核酸量高于对照组细胞,如表2所示。两种细胞系的核酸及

细胞浆表达蛋白量出现差异,支持肿瘤细胞与对照细胞在 1082 cm^{-1} 和 1155 cm^{-1} 附近出现峰移。另外 1304 cm^{-1} 附近为脂肪酸键,PAP染色及H&E染色方法均不能够对细胞脂质进行染色,难以对肿瘤细胞脂质紊乱进行分析。本实验拉曼峰移分别出现核酸(DNA)、蛋白及脂质分子拉曼峰移三类特征,提示肿瘤细胞在核酸复制、蛋白表达及脂质方面均存在异常的可能。

肺癌组织细胞H&E和PAP染色方法常用于肺癌的临床病理诊断,但临床病理学家诊断的难点是肿瘤细胞与非肿瘤细胞之间可能出现特征重叠,导致临床诊断难度增大。本研究对A549细胞和Met-5A细胞同时进行PAP及H&E染色,对染色细胞图像特征进行分析,对于细胞图像特征参数能量标准差,采用PAP染色方法的两种细胞差异具有统计学意义,而采用H&E染色方法的两种细胞差异无统计学意义。这说明两种细胞在表达酸性染料的亲和成分时有差异,但在表达嗜苏木素染料的亲和成分时没有差异。而对于以图像识别为基础的反映物质表达均一性的颜色均值,采用两种染色方法

的两种细胞差异均具有统计学意义,如表 2 所示。以细胞物质表达堆积结构,结合化学物质染色进行图像分析,肿瘤细胞与非肿瘤细胞间存在差异,本文方法只能分析细胞的核酸及蛋白质的差异两个因素。通过对肺癌细胞(A549)的拉曼分析,能够获得细胞核酸、蛋白表达以及脂质三类物质的结构特征,比传统临床病理分析增加了一个因素,同时拉曼光谱具有非创伤性检查的潜能。

4 结 论

采用 PAP 和 H&E 化学染色方法对肺癌肿瘤细胞进行染色,分析肿瘤细胞的核酸及蛋白表达特征,同时利用拉曼光谱分析肿瘤细胞在核酸、蛋白及脂质成分的物质表达和堆积结构方面存在的拉曼位移,实验结果表明,利用拉曼光谱分析肺癌肿瘤细胞,有可能发现传统组织化学染色难于发现的病理特征。

参 考 文 献

- [1] Wang S, Zeng H S. Real-time *in vivo* Raman spectroscopy and its clinical applications in early cancer detection [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207002.
王爽, Haishan Zeng. 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 [J]. 中国激光, 2018, 45(2): 0207002.
- [2] Lu J, Zhu S S, Cui X Y, *et al.* Raman spectroscopic imaging technology and its biomedical applications [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(3): 0307007.
路交, 朱姗姗, 崔笑宇, 等. 拉曼光谱成像技术及其在生物医学中的应用 [J]. 中国激光, 2018, 45(3): 0307007.
- [3] 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.
- [4] Kang J, Luo S, He J, *et al.* Preliminary exploration on diagnosis of laryngeal carcinoma based on Raman spectroscopy [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2017, 54(11): 111701.
康竞, 罗昱, 何剑, 等. 拉曼光谱诊断喉癌的初步探究 [J]. 激光与光电子学进展, 2017, 54(11):

111701.

- [5] Liang H Y, Cheng X L, Dong S X, *et al.* Ultrastructure and Raman spectral characteristics of two kinds of acute myeloid leukemia cells [J]. Journal of Experimental Hematology, 2018, 26(1): 1-7.
梁昊岳, 程雪莲, 董树旭, 等. 两种急性髓系白血病细胞的超微结构和拉曼光谱特征研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(1): 1-7.
- [6] Ye Y H, Chen Y, Li Y Z, *et al.* Discrimination of nasopharyngeal carcinoma and normal nasopharyngeal cell lines based on confocal Raman microspectroscopy [J]. Chinese Journal of Lasers, 2012, 39(5): 0504003.
叶宇煌, 陈阳, 李永增, 等. 基于拉曼光谱的鼻咽癌与正常鼻咽细胞株的分类研究 [J]. 中国激光, 2012, 39(5): 0504003.
- [7] Yang W P, Yao H L, Zhu M, *et al.* Raman spectrums of mono-hepatocellular carcinoma [J]. Laser & Infrared, 2007, 37(9): 824-827.
杨文沛, 姚辉璐, 朱森, 等. 单个肝癌细胞的拉曼光谱分析研究 [J]. 激光与红外, 2007, 37(9): 824-827.
- [8] Fu L, Liu W H, Li L X, *et al.* Raman spectroscopic statistics analysis on tissues of lung cancer [J]. Applied Laser, 2007, 27(6): 508-511.
付莉, 刘婉华, 李立祥, 等. 肺癌组织拉曼光谱的统计分析 [J]. 应用激光, 2007, 27(6): 508-511.
- [9] Dorantes-Heredia R, Ruiz-Morales J M, Cano-García F. Histopathological transformation to small-cell lung carcinoma in non-small cell lung carcinoma tumors [J]. Translational Lung Cancer Research, 2016, 5(4): 401-412.
- [10] Ishikawa K, Miyamoto M, Yoshioka T, *et al.* Method for the validation of immunohistochemical staining using SCID mouse xenografts: expression of CD40 and CD154 in human non-small cell lung cancer [J]. Oncology Reports, 2013, 29(4): 1315-1321.
- [11] Bando K, Haba R, Kushida Y, *et al.* Utility of immediate cytologic diagnosis of lung masses using ultrafast Papanicolaou stain [J]. Lung Cancer, 2011, 72(2): 172-176.
- [12] Zhao M, Wu A G, Song J J, *et al.* Automatic screening of cervical cells using block image processing [J]. BioMedical Engineering OnLine, 2016, 15: 14.
- [13] Zhao M Z, Chen L, Bian L J, *et al.* Feature quantification and abnormal detection on cervical

- squamous epithelial cells [J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2015, 2015: 941680.
- [14] Meng L J, Ji X L, Li Z D, *et al.* Mono-hepatocellular 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.
- [15] Stone N, Kendall C, Smith J, *et al.* Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers[J]. *Faraday Discussions*, 2004, 126: 141-157.
- [16] Yan X L, Dong R X, Zhang L, *et al.* Raman spectra of single cell from gastrointestinal cancer patients[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11 (21): 3290-3292.