

激光与光电子学进展

基于 SERS 光谱技术的滑膜型关节炎研究

董弦虎¹, 汤淑珍¹, 陈孙裕^{2*}, 许建树¹, 林雅敏¹, 高思琪¹, 钟浩然¹, 林婷婷¹, 高佳敏¹

¹医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建省光子技术重点实验室, 福建师范大学光电与信息工程学院, 福建 福州 350007;

²厦门大学附属福州第二医院骨科, 福建 福州 350007

摘要 以银纳米材料作为活性基底构建的表面增强拉曼散射(SERS)检测系统可以改善拉曼技术对生物活性物质检测时信号弱的缺点。本文对 18 例滑膜型关节炎病患的关节液样本和 15 例健康人的关节液样本进行 SERS 检测, 收集 SERS 光谱数据后采用谱峰归属法、主成分分析(PCA)-线性判别分析(LDA)算法对样本数据进行分析。结果表明:关节炎病患关节液样本中的多糖(477 cm^{-1})、DNA(722 cm^{-1})、 $\delta(\text{CH}_2)$ (1439 cm^{-1})、鸟嘌呤(N_3)(1576 cm^{-1})和酰胺 I 带(1676 cm^{-1})比健康人的多,而糖原(490 cm^{-1})、磷脂酰肌醇(596 cm^{-1})、蛋白酪氨酸(640 cm^{-1})、葡萄糖(1071 cm^{-1})和蛋白酰胺吸收(1645 cm^{-1})比健康人低。PCA-LDA 算法对该疾病的诊断特异性和灵敏度分别为 83.3% 和 80%。本研究说明以银纳米材料为活性基底的 SERS 光谱技术对诊断和分析滑膜型关节炎疾病具有一定的可行性和参考价值。

关键词 医用光学; 关节液; 滑膜型关节炎; 表面增强拉曼散射; 谱峰归属; 主成分分析-线性判别分析

中图分类号 O433

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202158.0117001

Study on Synovial Arthritis Based on Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy

Dong Xianhu¹, Tang Shuzhen¹, Chen Sunyu^{2*}, Xu Jianshu¹, Lin Yamin¹, Gao Siqu¹,
Zhong Haoran¹, Lin Tingting¹, Gao Jiamin¹

¹MOE of Key Laboratory of Opto-Electronic Science and Technology for Medicine, Fujian Provincial Key Laboratory for Photonics Technology, College of Photonic and Electronic Engineering of Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China;

²Department of Orthopaedics, Affiliated Fuzhou the Second Hospital of Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350007, China

Abstract Surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection systems based on silver nanomaterials can be used to improve the weak Raman signal in bioactive substances detection. In the present work, SERS technology was used to detect joint fluid samples of 18 synovial arthritis patients and 15 normal people, and the spectral peak assignment methods, principal component analysis (PCA)-linear discriminant analysis (LDA) algorithm were applied to analyze the sample data after collecting SERS spectral data. The results of this study show that higher concentrations of polysaccharide (477 cm^{-1}), DNA (722 cm^{-1}), $\delta(\text{CH}_2)$ (1439 cm^{-1}), guanine (N_3) (1576 cm^{-1}), and amide I bands (1676 cm^{-1}) in arthritis patients compared to normal people, while the glycogen (490 cm^{-1}), phosphatidylinositol (596 cm^{-1}), protein tyrosine (640 cm^{-1}), glucose (1071 cm^{-1}), and protein glutamine

收稿日期: 2020-03-20; 修回日期: 2020-05-20; 录用日期: 2020-06-04

基金项目: 国家自然科学基金 (61775037)、福建省自然科学基金 (2019J01270)

*E-mail: hunson2009@163.com

absorptions (1645 cm^{-1}) were comparatively less than normal people. The specificity and sensitivity of disease diagnosis by PCA-LDA algorithm were 83.3% and 80%, respectively. Consequently, the results of this research demonstrate that SERS spectroscopy based on silver nanomaterials has considerable feasibility and potential value in diagnosis and analysis of synovial arthritis disease.

Key words medical optics; articular fluid; synovial arthritis; surface-enhanced Raman scattering; spectral peak assignment; principal component analysis-linear discriminant analysis

OCIS codes 170.5660; 300.6450

1 引言

关节炎一般是指在人体关节及其周围组织中,由于创伤、感染、炎症、退化或其他一些因素产生的疾病^[1]。目前全世界大概有 3.55 亿关节炎患者,中国大约有一亿以上的关节炎患者,比例高达 28.2%^[2]。据了解,目前对滑膜型关节炎的诊断采用的检测方法有核磁共振、关节穿刺抽液检查、超声显像^[3]、X 射线^[4]、计算机断层扫描^[5]。但这些传统检测方法往往存在着对人体伤害大、效率低、需要多种方法结合起来检查等缺点。因此,急需一种快速、无损或轻微创伤的方法进行诊断。

拉曼光谱技术^[6-7]以其巨大的临床应用潜力,引起了人们极大的研究兴趣。基于非弹性光散射的拉曼光谱技术是一种无创、灵敏的光学分析技术。每个分子有属于自己的振动、转动方式,因此分子可以提供蛋白质、核酸和脂类等大分子的重要生化信息^[8]。但是测量得到的拉曼光谱存在两个主要缺点:一是拉曼散射信号本身非常微弱。通常只有 $10^6\sim 10^8$ 个光子与样品相互作用时才能发生非弹性拉曼散射,因此就需要使用强激光功率或长时间收集数据来获取光谱,这样造成的结果就是损害生物样本。二是自荧光的干扰。生物样本的拉曼光谱经常与强烈的荧光背景相叠加,这使得获取拉曼信号变得比较困难^[9]。这两个缺点使得常规拉曼光谱在医学诊断中的应用面临巨大挑战。

基于纳米技术的表面增强拉曼光谱(SERS)^[10-11]可以克服传统拉曼光谱技术的缺点,目前已被应用于许多分析系统中。SERS 技术具有无损伤、超灵敏的优点,它可应用的领域很广泛,从生物大分子(如氨基酸、蛋白质和 DNA/RNA)到细胞或组织等复杂生物样品中都有涉及^[12]。当探测分子与金或银纳米粒子接近时,自荧光背景就会降低,而相对弱的拉曼信号则可大大增强。所查资料显示,目前还没有利用 SERS 光谱对关节液进行检测的相关报道。鉴于此,本文主要采用 SERS 技术

对关节液进行检测,以验证 SERS 技术无损、快速、灵敏地诊断关节炎的可行性。

2 材料与方法

2.1 银胶与关节液样本的制备

本文主要根据 Leopold 和 Lendl 提出的脱氧法制备银胶,主要包括以下几个步骤:

1) 将 0.017 g 硝酸银溶于 90 mL 蒸馏水中,配制出 $1.1\times 10^{-3}\text{ mol/L}$ 的硝酸银溶液;

2) 将 0.42 g 盐酸羟胺溶于 100 mL 蒸馏水中,配制成 $6\times 10^{-2}\text{ mol/L}$ 的盐酸羟胺溶液;

3) 将 0.4 g 氢氧化钠溶于 100 mL 蒸馏水中,配制成 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液;

4) 将 4.5 mL 氢氧化钠溶液倒入 5 mL 盐酸羟胺溶液中,然后将混合物快速加入到 90 mL 的硝酸银溶液中,一直振荡直到溶液呈现乳灰色,此溶液即为银胶溶液;

5) 以 10000 r/min 的速度对银胶溶液进行离心处理,时间为 10 min,然后除去部分上清液,取底部的浓缩液与关节液样本混合后进行 SERS 测量。该关节液样本采集于厦门大学附属福州第二医院,并且已获得该机构伦理委员会的批准。关节液样本包括 18 例病患的关节液样本和 15 例健康人的关节液样本。将所取得的关节液以 2000 r/min 的速度离心 5 min,然后取上清液进行实验。

2.2 SERS 的测量

将制备好的关节液与银胶以体积比为 1:1 的比例混合,滴在长方形铝板上进行 SERS 测量。本实验使用共聚焦拉曼显微光谱仪在 785 nm 二极管激光激发下测量 SERS 光谱,波数范围为 $400\sim 1800\text{ cm}^{-1}$ 。使用 Peltier 冷却电荷耦合器件(CCD)相机在 10 s 积分时间内以 20 倍的物镜和 2 cm^{-1} 的分辨率记录拉曼散射光。硅晶片的 520 cm^{-1} 振动峰用于频率的校准;采用软件包 WIRE 2.0 进行光谱的采集和分析。

2.3 数据的处理与分析

SERS 光谱分析主要分为以下几个步骤:

1) 扣除荧光。因为初始光谱是由 SERS 信号和自发荧光背景信号组成的^[13]。

2) 归一化。目的是减小激光功率波动产生的光谱强度变化的影响以及更好地比较峰值强度和光谱形状^[14-15]。

3) 采用 Origin 软件进行平均谱和差谱的绘制。

4) 采用 PCA-LDA 方法对归一化数据进行处理。主成分分析(PCA)用于确定一组新的正交变量(该变量能够反映不同组之间的差异),而线性判别分析(LDA)就是采用交叉验证的方法识别每一组的区别^[16-18]。

5) 采用接收操作特征(ROC)曲线评估 PCA-LDA 方法的性能。

3 结果与讨论

3.1 关节液 SERS 光谱分析

为了降低不同光谱强度的差异以及更好地对比分析光谱的形状,将所测得的 SERS 光谱数据扣除荧光背景后进行归一化处理,得到 400~1800 cm^{-1} 范围内光谱曲线下的积分面积。由图 1 所示的 18 例病患关节液样本和 15 例健康人关节液样本的平均 SERS 光谱可以看出,它们在 496, 592, 638, 725, 810, 885, 1004, 1073, 1129, 1206, 1330, 1506, 1576, 1606, 1653 cm^{-1} 处均有较高的 SERS 谱峰。然而,两组关节液样本也存在显著的拉曼光谱差异。由病患关节液和健康人关节液的 SERS 差谱可以看出,病患关节液样本在 477, 722, 1439, 1576,

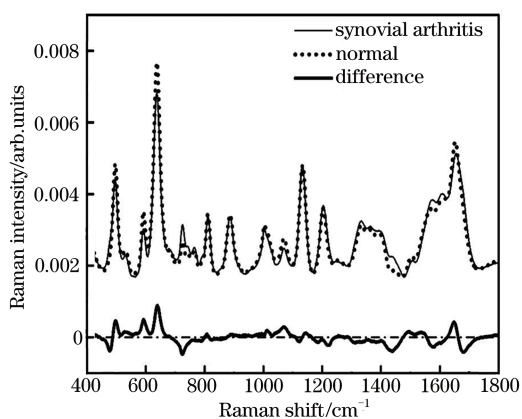


图 1 病患关节液($n=18$)和健康人关节液($n=15$)的平均 SERS 光谱与差谱图

Fig. 1 SERS average spectra and different spectra of joint fluid from arthritis patients($n=18$) and normal people($n=15$)

1676 cm^{-1} 处的特征峰强度要高于健康人关节液样本对应位置的峰强度,在 490, 596, 640, 1071, 1645 cm^{-1} 处的特征峰强度要低于健康人关节液样本对应位置的峰强度。也就是说,患有关节炎的病患的多糖(477 cm^{-1})、DNA(722 cm^{-1})、 $\delta(\text{CH}_2)$ (1439 cm^{-1})、鸟嘌呤(N_3)(1576 cm^{-1})、酰胺 I 带(1676 cm^{-1})比健康人的多^[19-22],而糖原(490 cm^{-1})、磷脂酰肌醇(596 cm^{-1})、蛋白酪氨酸(640 cm^{-1})、葡萄糖(1071 cm^{-1})、蛋白酰胺吸收(1645 cm^{-1})比健康人的低^[23-27],如表 1 所示。这些峰位以及相对峰强度的差异反映了病患关节液与健康人关节液在组成成分和结构上存在差异。

表 1 SERS 峰位置对应的主要成分^[19-27]

Table 1 Raman peak positions and tentative assignments^[19-27]

| Peak position / cm^{-1} | Tentative assignment |
|----------------------------------|--|
| 477 | Polysaccharides |
| 490 | Glycogen |
| 596 | Phosphatidylinositol |
| 640 | C-S stretching & C-C twisting of proteins tyrosine |
| 722 | DNA |
| 1071 | Glucose |
| 1439 | $\delta(\text{CH}_2)$ (lipids) |
| 1576 | Guanine(N_3) |
| 1645 | Amide I |
| 1676 | Amide I |

3.2 PCA-LDA 分析

为了检验 SERS 光谱区分健康人与关节炎病患的能力,本文采用 PCA-LDA^[28-30] 方法对所获得的光谱数据进行分析。本文首先采用 PCA-LDA 方法分析关节炎病患和正常人的关节液,然后采用 SPSS 软件进行精细处理,得到光谱主成分得分(PCs),根据主成分得分选出具有显著差异的主成分(最好是 $p < 0.05$),对其进行 t 检验。分析得出具有显著差异的 3 个主成分(即 PC1、PC2 和 PC3)后,绘制三维图谱。

图 2(a)是基于 PCA-LDA 分析,采用交叉验证方法得出的健康人与关节炎病患关节液样本的后验概率散点图,可以看出,当鉴别阈值为 0.5 时,对应的诊断灵敏度为 80%,特异性为 83.3%。图 2(b)对应的是基于 PCA-LDA 分析,采用交叉验证方法得出的结果在不同鉴别阈值下的 ROC 曲线图,ROC 曲线下方面积(AUC)为 0.922。

为了更直观地观察 PCA-LDA 诊断模型的最佳效果,本文分别以三个主成分 PC1、PC2、PC3 为坐

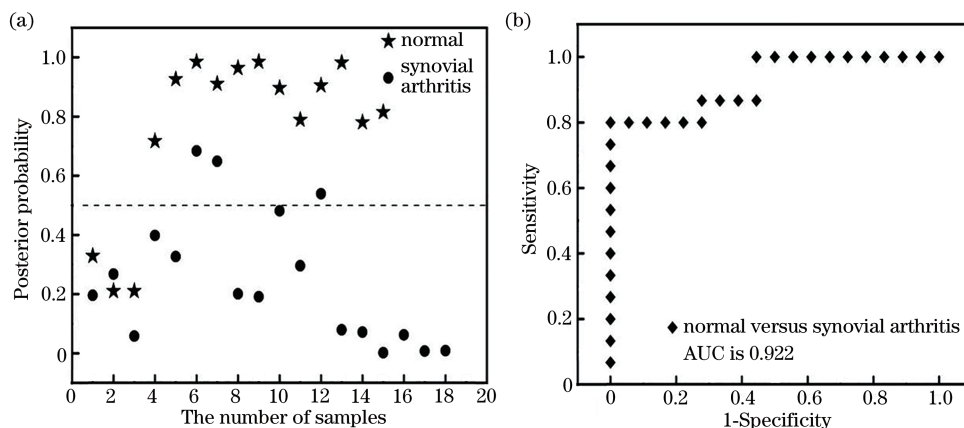


图 2 后验概率与 ROC 曲线。(a)基于 PCA-LDA 分析,采用交叉验证方法得出的关节炎病患与健康人关节液样本 SERS 光谱的后验概率散点;(b)不同鉴别阈值下的 ROC 曲线

Fig. 2 Posterior probability and ROC curves. (a) Posterior probability scatter of SERS spectra of joint fluid from arthritis patients and normal people based on PCA-LDA analysis and cross-validation method; (b) ROC curves under different identification thresholds

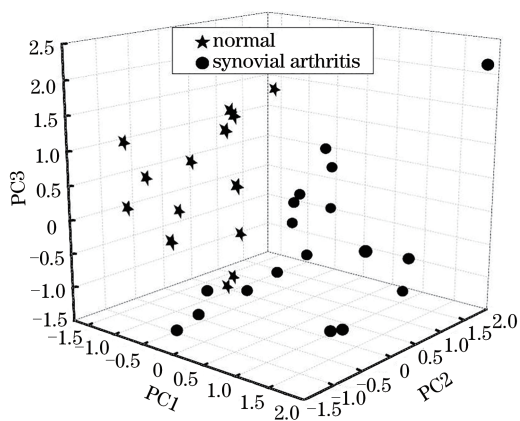


图 3 基于 PCA-LDA 分析,采用交叉验证方法得出的关节炎病患(圆点)与健康人(五角星)关节液样本 SERS 光谱的三维散点图

Fig. 3 Three-dimensional scatter plot of SERS spectra of joint fluid from arthritis patients (dot) and normal people (pentagram) based on PCA-LDA analysis and cross-validation method

标轴,绘制了三维散点图,如图 3 所示。可以看出,代表健康人关节液样本的五角星和代表关节炎病患关节液样本的圆点可以明显地区分开,这说明基于 SERS 光谱建立的 LDA 判别模型方法对检测关节炎具有一定的可行性。

4 结 论

本文主要基于银纳米材料与 SERS 拉曼光谱的结合,采用 PCA-LDA 方法对关节炎病患($n=18$)和健康人($n=15$)的关节液样本进行了检测与分析。

比较两者的差谱可以发现,关节炎患者关节液中的多糖、DNA、 $\delta(\text{CH}_2)$ 、鸟嘌呤、酰胺 I 带高于健康人,而糖原、磷脂酰肌醇、蛋白酪氨酸、葡萄糖、蛋白酰胺吸收则低于健康人。结合 PCA-LDA 与 ROC 的分析方法的诊断灵敏度可以达到 80%,特异性可以达到 83.3%,说明该技术能够快速高效地检测和区分关节炎疾病。

参 考 文 献

- [1] Shen M. Clinical and imaging characteristics of risk factors for rheumatoid arthritis-associated pulmonary interstitial lesions [J]. *Journal of Imaging Research and Medical Applications*, 2019, 3(12): 87-88.
申明. 类风湿关节炎相关肺间质病变的危险因素、临床和影像学特点 [J]. *影像研究与医学应用*, 2019, 3(12): 87-88.
- [2] Li X M. Advances in conservative treatment of osteoarthritis [J]. *Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2013, 29(10): 153-156.
李雪梅. 骨性关节炎的保守治疗进展 [J]. *湖南中医杂志*, 2013, 29(10): 153-156.
- [3] Li X L. Diagnostic value of MRI in hip synovitis period [J]. *Journal of Guiyang Medical College*, 2016, 41(1): 106-108.
李晓兰. MRI 在髋关节病滑膜炎期的诊断价值 [J]. *贵阳医学院学报*, 2016, 41(1): 106-108.
- [4] Liang C J, Wang J Q. The value of X-ray diagnosis of gouty arthritis and imaging performance analysis [J]. *Renowned Doctor*, 2018(8): 110.
梁春景, 王金清. X 线诊断痛风性关节炎的价值与

- 影像学表现分析[J]. 名医, 2018(8): 110.
- [5] Li H Q. Application of ultrasound imaging technology in the diagnosis and treatment of inflammatory joint disease [J]. Journal of Imaging Research and Medical Applications, 2019, 3(11): 98-99.
李红琼. 超声影像技术在炎性关节病变诊疗中的应用研究[J]. 影像研究与医学应用, 2019, 3(11): 98-99.
- [6] Kudelski A. Analytical applications of Raman spectroscopy[J]. Talanta, 2008, 76(1): 1-8.
- [7] Wu J B, Lin M L, Cong X, et al. Raman spectroscopy of graphene-based materials and its applications in related devices[J]. Chemical Society Reviews, 2018, 47(5): 1822-1873.
- [8] Lin D, Zheng Z, Wang Q, et al. Label-free optical sensor based on red blood cells laser tweezers Raman spectroscopy analysis for ABO blood typing [J]. Optics Express, 2016, 24(21): 24750-24759.
- [9] Feng S Y, Chen R, Lin J Q, et al. Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(11): 2414-2419.
- [10] Feng S Y, Chen R, Lin J Q, 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.
- [11] Zong C, Xu M, Xu L J, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges[J]. Chemical Reviews, 2018, 118(10): 4946-4980.
- [12] Lin D, Chen G N, Feng S Y, et al. Development of a rapid macro-Raman spectroscopy system for nasopharyngeal cancer detection based on surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Applied Physics Letters, 2015, 106(1): 013701.
- [13] Zhao J H, Lui H, McLean D I, et al. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy [J]. Applied Spectroscopy, 2007, 61(11): 1225-1232.
- [14] Feng S Y, Lin D, Lin J Q, et al. Saliva analysis combining membrane protein purification with surface-enhanced Raman spectroscopy for nasopharyngeal cancer detection [J]. Applied Physics Letters, 2014, 104(7): 073702.
- [15] Lin X L, Lin D, Ge X S, et al. Noninvasive detection of nasopharyngeal carcinoma based on saliva proteins using surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Journal of Biomedical Optics, 2017, 22(10): 105004.
- [16] Lin D, Huang H, Qiu S, et al. Diagnostic potential of polarized surface enhanced Raman spectroscopy technology for colorectal cancer detection[J]. Optics Express, 2016, 24(3): 2222-2234.
- [17] Lin D, Pan J, Huang H, et al. Label-free blood plasma test based on surface-enhanced Raman scattering for tumor stages detection in nasopharyngeal cancer[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 4751.
- [18] Wang J, Lin D, Lin J Q, et al. Label-free detection of serum proteins using surface-enhanced Raman spectroscopy for colorectal cancer screening [J]. Journal of Biomedical Optics, 2014, 19(8): 087003.
- [19] Shetty G, Kendall C, Shepherd N, et al. Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus [J]. British Journal of Cancer, 2006, 94(10): 1460-1464.
- [20] Lakshmi R J, Kartha V B, Murali Krishna C, et al. Tissue Raman spectroscopy for the study of radiation damage: brain irradiation of mice [J]. Radiation Research, 2002, 157(2): 175-182.
- [21] Ruiz-Chica A J, Medina M A, Sánchez-Jiménez F, et al. Characterization by Raman spectroscopy of conformational changes on guanine-cytosine and adenine-thymine oligonucleotides induced by aminoxy analogues of spermidine [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2004, 35(2): 93-100.
- [22] Binoy J, Abraham J P, Joe I H, et al. NIR-FT Raman and FT-IR spectral studies and *ab initio* calculations of the anti-cancer drug combretastatin-A4 [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2004, 35(11): 939-946.
- [23] Stone N, Kendall C, Smith J, et al. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers [J]. Faraday Discussions, 2004, 126: 141-157.
- [24] Stone N, Kendall C, Shepherd N, et al. Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2002, 33(7): 564-573.
- [25] Krafft C, Neudert L, Simat T, et al. Near infrared Raman spectra of human brain lipids [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2005, 61(7): 1529-1535.
- [26] Chan J W, Taylor D S, Zwerdling T, et al. Micro-

- Raman spectroscopy detects Individual neoplastic and normal hematopoietic cells [J]. *Biophysical Journal*, 2006, 90(2): 648-656.
- [27] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I U. Raman spectroscopy of biological tissues [J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2007, 42(5): 493-541
- [28] Xu C X. Surface-enhanced Raman spectroscopy of serum proteins from different digestive system cancers [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2016.
徐朝贤. 消化系统癌症患者血清蛋白表面增强拉曼光谱研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2016.
- [29] Yu Y, Lin Y, Xu C, et al. Label-free detection of nasopharyngeal and liver cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy and partial least squares combined with support vector machine [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(12): 6053-6066.
- [30] Gualerzi A, Kooijmans S A A, Niada S, et al. Raman spectroscopy as a quick tool to assess purity of extracellular vesicle preparations and predict their functionality [J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2019, 8(1): 1568780.