

# 非相干拉曼显微技术及其生物医学应用(特邀)

黎钰怡, 干越, 牛犇, 黄静\*, 詹求强\*\*

华南师范大学华南先进光电子研究院, 广东 广州 510006

**摘要** 拉曼技术具有非侵入、分子指纹、不受水干扰、制样简单、光谱分辨率高等优点, 在很多领域都是一种广受欢迎的研究工具。尤其在生物医学领域, 拉曼技术不仅可以本征地捕捉正常生理或病理所携带的不同化学信息, 而且该技术适用于检测各种常见的生物和临床样品(包括细胞、组织、体液和微生物等), 目前很多课题组的研究结果都表明拉曼技术在生物医学领域具有巨大的应用前景。本文首先介绍自发拉曼散射和表面增强拉曼散射的基本工作机理, 接着介绍分析处理拉曼数据(光谱和图像)的步骤和算法, 然后简单总结了近年来非相干拉曼显微技术在生物医学上的研究成果, 最后指出拉曼技术目前面临的挑战并展望了其未来可能的发展方向。

**关键词** 自发拉曼; 表面增强拉曼; 数据分析; 生物医学应用

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP240661

## Noncoherent Raman Spectroscopy and Its Biomedical Application (Invited)

Li Yuyi, Gan Yue, Niu Ben, Huang Jing\*, Zhan Qiuqiang\*\*

South China Academy of Advanced Optoelectronics, South China Normal University,  
Guangzhou 510006, Guangdong, China

**Abstract** Raman spectroscopy has the advantages of being noninvasive, fingerprint free, water background free, simple sampling preparation, and high spectral resolution; therefore, it has become a popular analytical technique in many research fields. In particular, the Raman spectroscopy can intrinsically capture biochemical information related to normal physiology or abnormal pathology in biomedicine. Additionally, various biological and clinical samples, such as cells, tissues, body fluids, and microbiology can be easily studied using the Raman spectroscopy without complex sample preparation. Thus far, the Raman spectroscopy has shown its high potential for biomedical applications. This review mainly includes an introduction to the basic mechanisms of spontaneous Raman and surface-enhanced Raman scatterings, followed by a description of the analysis procedures and algorithms for obtaining Raman data (spectral and imaging). Further, a brief summary of the applications of noncoherent Raman microscopy in biomedicine in recent years is presented, and its current challenges and future directions are discussed.

**Key words** spontaneous Raman; surfaced-enhanced Raman spectroscopy; data analysis; biomedical application

## 1 引言

拉曼光谱(RS)是一种发生在分子层面的非弹性散射现象, 可以本征地探测到分子的振动指纹信息。该现象于1928年首次在实验中被印度科学家Raman等<sup>[1]</sup>观察到, 被命名为“拉曼散射效应”, Raman也因此获得1930年的诺贝尔物理学奖。此后拉曼技术经过了一个相对缓慢的发展时期, 直到20世纪60年代激光器的出现极大地推动了拉曼技术的发展。之后随着高

灵敏探测器、共聚焦显微镜、光纤、计算机等领域相关技术瓶颈的突破, 以及非侵入、分子指纹特征、不受水干扰、制样简单、易与其他光学技术结合、光谱分辨率高等特点, 拉曼技术逐步成为一种广受欢迎的分析工具, 在诸多研究领域发挥着重要的作用。其中, 在生物医学领域, 拉曼技术无需复杂耗时的制样就可以直接检测各种复杂的生物样品, 如细胞、组织、体液、微生物等, 共聚焦拉曼显微镜的问世更是能够帮助获得亚微米量级细胞器的化学成分分布图像, 因此近年来利用

收稿日期: 2024-02-05; 修回日期: 2024-02-15; 录用日期: 2024-02-19; 网络首发日期: 2024-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(62122028, 62335008, 11974123)、广东省基础与应用基础研究基金(2023B1515040018, 2018B030306015)、华南师范大学青年教师科研培育基金(22KJ30)

通信作者: \*jing\_huang@scnu.edu.cn; \*\*zhanqiuqiang@m.scnu.edu.cn

拉曼技术来解答生物医学问题引起越来越多科学家和临床医生的关注和研究。

拉曼技术可以分为非相干和相干两大类,前者包括自发拉曼、表面增强拉曼散射(SERS)和针尖增强拉曼光谱(TERS),后者主要包括相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)和受激拉曼散射(SRS)。自发拉曼是一种较为微弱的现象,借助重金属基底实现信号增强的 SERS 技术能达到单分子的检测灵敏度,二者均容易得到待测样品的全光谱信息并对生物样品的化学成分进行分析,缺点是成像速度不够快;另一方面,基于非线性原理的 CARS 和 SRS 更适用于对生物样品的脂质和蛋白进行快速显微成像,但会丢失其他维度的信息。从实验系统的角度考量,相干拉曼技术和 TERS 对于实验设备的要求较高,例如相干拉曼技术不仅需要高质量双光束输出的脉冲激光器,而且要搭建较为复杂的光路来保证不同非线性现象的发生,TERS 过于依赖针尖探头,这些限制也导致了目前在生物医学领域最主流的拉曼技术仍是自发拉曼和 SERS。

自发拉曼和 SERS 在生物医学领域的应用研究已有一定的历史,取得的成果在相关外文综述中有详细记载。1979 年以来,拉曼显微镜在生物医学中的研究结果表明其在临床上的巨大应用前景, Antonio 等<sup>[2]</sup>着重阐述了 2011 年—2013 年间拉曼显微镜在医学应用的相关研究进展。同年, Opilik 等<sup>[3]</sup>总结了拉曼显微镜与相关成像技术的理论及其在石墨烯和生物细胞学的最新研究工作。为帮助初学者更好地入门拉曼显微成像的研究领域, Zapata 等<sup>[4]</sup>以乙酰氨基酚类药物为例详述了拉曼显微技术的实验条件优化和数据结果分析的过程。Siraj 等<sup>[5]</sup>则详述了拉曼光谱技术与多元回归分析方法的结合在病原体检测方面的工作,重点介绍了其在模式识别和临床样品分类中的最新研究与应用前景。此外,中文综述也有关于拉曼技术在生物医学上的研究工作总结。刘风翔等<sup>[6]</sup>介绍了拉曼光谱技术在基于不同临床样本对不同类型肿瘤早期诊断的应用研究,包括肿瘤组织实体、组织病理切片、患者血清,以及肿瘤单细胞等样本和乳腺肿瘤、消化系统肿瘤、皮肤肿瘤,以及脑胶质瘤等肿瘤。针对体液这一类研究对象,曾琦等<sup>[7]</sup>详述了拉曼光谱技术在流体样本上的应用,并简单描述了拉曼光谱的数据处理。核酸作为生命最基本的遗传物质,如何对它实现灵敏度高的特异性检测是临床医学研究的一个重点和难点,对此,田晖艳等<sup>[8]</sup>综述了非标记和标记 SERS 技术在核酸检测中的应用。目前的大部分综述对自发拉曼和 SERS 的原理、拉曼光谱数据的处理与分析,以及其在生物医学中的应用等都有所涉及,但相关的中文综述不够全面,缺乏从这两种技术的工作原理到完整的数据处理流程和算法再到各种生物样品(包括细胞、组织、体液、微生物等)应用的综述工作,这对于刚入门拉曼生物医学研究领域的科研人员和学生

而言是个亟须填补的空白。

综上所述,本文对非相干拉曼显微技术(自发拉曼和 SERS)及其生物医学研究的工作进行系统介绍。首先阐明技术的工作原理,包括自发拉曼散射的工作机理、共聚焦拉曼显微镜的工作系统、SERS 的增强机制及常见的 SERS 基底制备方法;接着系统地分析了拉曼数据的完整分析流程和常用的具体算法,其中的重点是如何利用机器学习或深度学习的算法进行特征提取和模型建立;然后从各种生物样品的角度出发,全面地介绍了这两种拉曼技术在生物医学领域取得的研究进展;最后,指出了拉曼技术目前面临的挑战和其未来潜在的发展方向。

## 2 基本机理

### 2.1 自发拉曼散射

当光照射到物质时,可能会发生吸收、反射、透射、散射等不同的作用过程。其中,自发拉曼散射可以通过诱导分子极化  $\mu(t)$  来解释,  $\mu(t)$  是入射光场  $\mathbf{E}_m(t) = \mathbf{E}_0 \cos(\omega_0 t)$  和具有可变极化率  $\alpha(x)$  分子的相互作用结果。  $\alpha(x)$  取决于其分子坐标,通常在平衡位置附近扩展为泰勒级数:

$$\alpha(x) = \alpha_0 + \left. \frac{\partial \alpha}{\partial x} \right|_{x=0} x(t) + \dots \quad (1)$$

谐振频率下的原子核振荡运动近似于简谐振荡  $x(t) = x_0 \cos(\omega_R t)$ , 因此

$$\begin{aligned} \mu(t) &= \alpha(x) \mathbf{E}_m(t) = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \\ &\frac{1}{2} \left. \frac{\partial \alpha}{\partial x} \right|_{x=0} x_0 \mathbf{E}_0 \cos(\omega_0 - \omega_R) t + \\ &\frac{1}{2} \left. \frac{\partial \alpha}{\partial x} \right|_{x=0} x_0 \mathbf{E}_0 \cos(\omega_0 + \omega_R) t, \end{aligned} \quad (2)$$

式中:  $\omega_0$  为入射光频率;  $\omega_R$  为分子共振频率。由式(2)可知,诱导极化起着散射辐射源的作用,会产生 3 种不同辐射频率的散射:散射光频率相较于入射光频率  $\omega_0$  没有发生变化的弹性瑞利散射,这一过程中没有发生能量交换;散射光频率大于入射光频率时称为反斯托克斯(anti-Stokes)散射  $\omega_0 + \omega_R$ , 散射光频率小于入射光时称为斯托克斯(Stokes)散射  $\omega_0 - \omega_R$ 。反斯托克斯散射和斯托克斯散射被称为拉曼散射,该现象产生时必须满足  $\left. \frac{\partial \alpha}{\partial x} \right|_0 \neq 0$ 。从能级角度看,处于基态振动

能级的分子由于吸收了外来光子的能量会跃迁到较高能量的虚能级,之后在较短的时间内(皮秒量级)从虚能级跃辐射迁回到低能级,同时产生上述的 3 种情况:瑞利散射  $\omega_0$ 、反斯托克斯散射  $\omega_0 + \omega_R$ 、斯托克斯散射  $\omega_0 - \omega_R$ , 如图 1(a) 所示。根据 Boltzmann 分布定律,常温条件下处于基态的粒子数要远大于处于激发态的粒子数,因此一般情况下产生斯托克斯信号的概率比

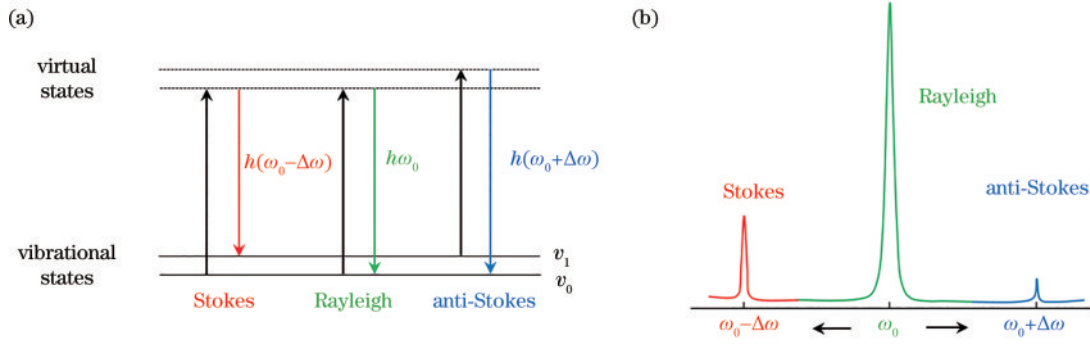


图 1 (a)瑞利散射和拉曼散射过程的能级结构示意图;(b)瑞利散射和拉曼散射光谱示意图

Fig. 1 (a) Schematic diagram of energy level structures for Rayleigh scattering and Raman scattering processes; (b) schematic diagram of Rayleigh scattering and Raman scattering spectra

反斯托克斯的大得多<sup>[9]</sup>,即斯托克斯信号的强度比反斯托克斯的大,如图 1(b)所示,其中,斯托克斯信号的强度可以表示为,

$$I_{\text{Stokes}} = CN I_0 (\omega_0 - \omega_R)^4 \alpha^2, \quad (3)$$

式中: $C$ 为一个常数; $N$ 为待测分子的数量或浓度; $I_0$ 为入射光强度; $\alpha$ 是分子极化率。

## 2.2 共聚焦拉曼显微镜

拉曼光谱技术作为一种常用的光谱检测方法,其工作系统主要由激光器、样品台、光谱仪等部分组成。值得一提的是,为了消除瑞利光和其他背景信号的影响,往往需要在激发光路和收集光路上分别放置对应的滤光片来选出特定的斯托克斯信号,如图 2(a)所示。

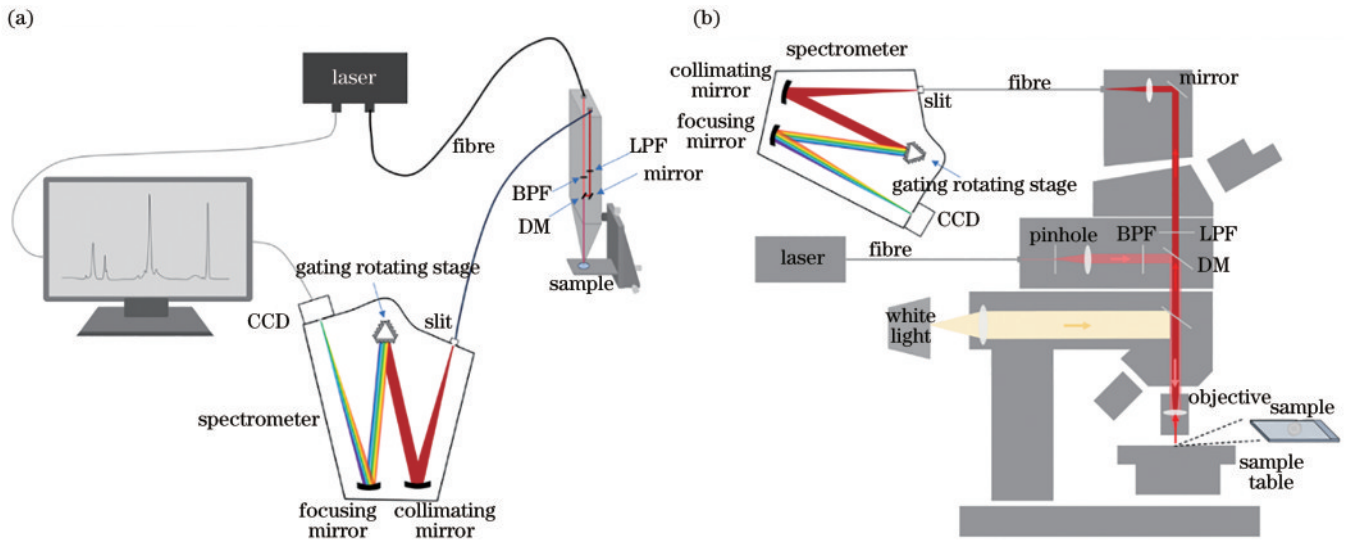


图 2 (a)手持式拉曼光谱检测系统示意图;(b)共聚焦拉曼显微系统示意图

Fig. 2 (a) Schematic diagram of a handheld Raman spectroscopy detection system; (b) schematic diagram of confocal Raman microscopy system

随着技术的不断发展和创新,拉曼光谱和共聚焦显微成像技术结合的共聚焦拉曼显微镜出现了,其不仅可以有效地避免杂散光的干扰,而且具有接近衍射极限的高空间分辨率,特别适用于研究生物样品。如图 2(b)所示,在共聚焦拉曼显微镜系统中,激光器发出的光扩束后经过光阑小孔、带通滤波片,以及二向色镜被高数值孔径的物镜聚焦在样品上,样品发出的拉曼散射信号被同一物镜收集,随后再次通过二向色镜和长通滤波片后被传输到光谱仪的入口狭缝处。在共聚焦成像系统中,激发光路的光阑小孔和收集光路的光谱仪入口狭缝的共聚焦保证了只有位于焦平面上的样品信号才能被有效采集,其他非共焦位置产生的散

射信号会被阻挡掉,因此最终获得的图像具有更加清晰丰富的细节、更高的空间分辨率、更大的信息量。并且为了能对样品实现全方位的观测和三维重建,通常需要在扫描过程中沿着载物台的水平或垂直方向移动激光束或样品。其中,XY平面上的扫描可以获得样品的二维平面信息,Z轴方向上的扫描则可以提供样品不同深度的三维结构形貌特征<sup>10</sup>。

## 2.3 表面增强拉曼散射

### 2.3.1 SERS 的增强机理

自发拉曼是一种比较微弱的现象,每 $10^8$ 个光子中约有一个光子会发生拉曼散射<sup>[11]</sup>。为了更好地利用拉曼技术,往往需要对拉曼信号进行增强。目前较为灵



敏的拉曼增强技术是 SERS,其借助重金属纳米颗粒可以将拉曼信号至少提高  $10^6$  倍<sup>[12]</sup>,甚至达到单分子的检测水平。SERS 的增强机制主要包括电场增强和化学增强,具体的增强原理如下。

### 2.3.1.1 电场增强

SERS 的电场增强能力依赖于金属纳米颗粒的等离激元特性<sup>[13]</sup>。如图 3 所示,当光照射到金属纳米颗粒表面时,金属表面的大量自由电子会产生集体振荡,当自由电子的固有振动频率与入射光频率相同时,会产生局限在金属颗粒表面一定范围内的局域等离激元

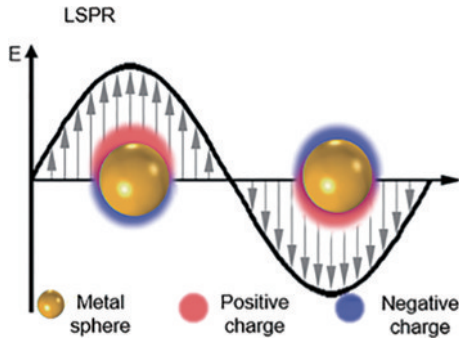


图 3 局域表面等离激元共振<sup>[13]</sup>

Fig. 3 Localized surface plasmon resonance<sup>[13]</sup>

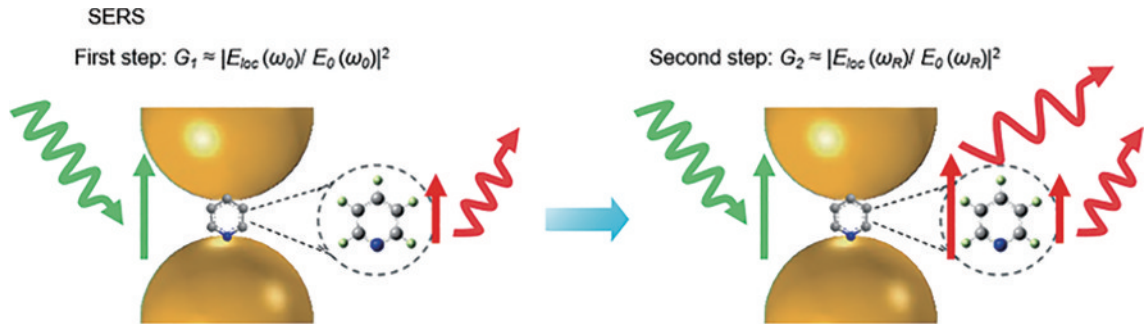


图 4 SERS 的电场增强机制<sup>[13]</sup>

Fig. 4 Electric field enhancement mechanism of SERS<sup>[13]</sup>

### 2.3.1.2 化学增强

此外,有研究者提出了基于化学增强的机理来解释 SERS 的增强效果<sup>[15]</sup>,如图 5 所示,主要分为 3 种化学增强的情况,这 3 种机制并非独立存在<sup>[16]</sup>:

1) 基态化学增强:待测分子和金属纳米颗粒之间的基态化学相互作用导致的增强,这一种机制认为增强主要取决于待测分子和金属纳米颗粒的结构和性质。

2) 激发共振增强:激发光与待测分子的电子跃迁能量相匹配时才发生的共振增强,拉曼信号的增强与激发光和待测分子有关,与金属纳米颗粒无关。

3) 电荷转移增强:待测分子与金属纳米颗粒接触后会形成新的电荷转移激发态,激发光能量与新的电荷转移激发跃迁能相匹配时,会发生由电荷转移导致的类共振增强,极化率增大,从而导致拉曼散射截面的增加,拉曼信号被增强。这一化学增强机制是由于入

共振(LSPR)现象,使得金属纳米颗粒表面的局部电磁场强度提高约  $10^5 \sim 10^6$  倍,这是 SERS 电场增强的关键。

SERS 的电场增强机理可分为两步,如图 4 所示,被入射光  $\omega_0$  照射的金属纳米颗粒作为信号接收源,将入射光远场接收变为近场,形成局部的电场增强  $E_{loc}(\omega_0) = G_1 E_0$ ,其中,  $G_1$  是近场电场的增强因子,  $E_0$  是入射光  $\omega_0$  的电场强度。增强来自分子的诱导偶极矩和金属纳米颗粒的偶极矩之间的相互激发,此时金属纳米颗粒作为辐射发射源,将来自分子的拉曼近场信号  $\omega_R$  转移到容易被探测到的远场,产生被放大的拉曼信号  $E_{loc}(\omega_R) = G_2 E_0$ ,其中,  $G_2$  是远场电场的增强因子。则 SERS 的整体电场增强同时取决于激发场和发射场的增强因子,当入射激光的波长接近斯托克斯拉曼信号,即  $G_1 = G_2$  时, SERS 的增强因子  $G$  与局域电场增强的四次方成正比<sup>[14]</sup>:

$$G = G_1 \omega_0 G_2 \omega_R = \frac{[E_{loc}(\omega_0)]^2 [E_{loc}(\omega_R)]^2}{[E_0(\omega_0)]^2 [E_0(\omega_R)]^2} \approx \frac{[E_{loc}(\omega_R)]^4}{[E_0(\omega_0)]^4} \quad (4)$$

射光与金属纳米颗粒及待测分子复合体系间的电荷转移引起的共振增强,也是最被认可的化学增强机制<sup>[17]</sup>。

化学增强的增强能力较弱,一般只能把信号提高  $10^2 \sim 10^3$  倍<sup>[18]</sup>。

### 2.3.2 SERS 基底

在被证明具有 SERS 效应的金属中, Au、Ag、Cu 是目前广泛用于制备 SERS 基底的金属材料,它们不仅在可见光区域有很强的共振效应,而且可以较为容易地找到其对应的激发光源,能满足大多数情况的拉曼检测。这 3 种材料各有优缺点: Ag 对信号的增强能力最强, Cu 最弱;在含氧环境中 Au 稳定性最好,其次是 Ag;但 Au、Ag、Cu 的成本依次减小。SERS 研究的难点和热点之一,是如何制备出稳定性好和重现性高的基底,这与基底材料、形貌尺寸、排列方式、制备方法等因素都密切相关。其中,常见的 SERS 基底制备方法主要有以下 4 种:

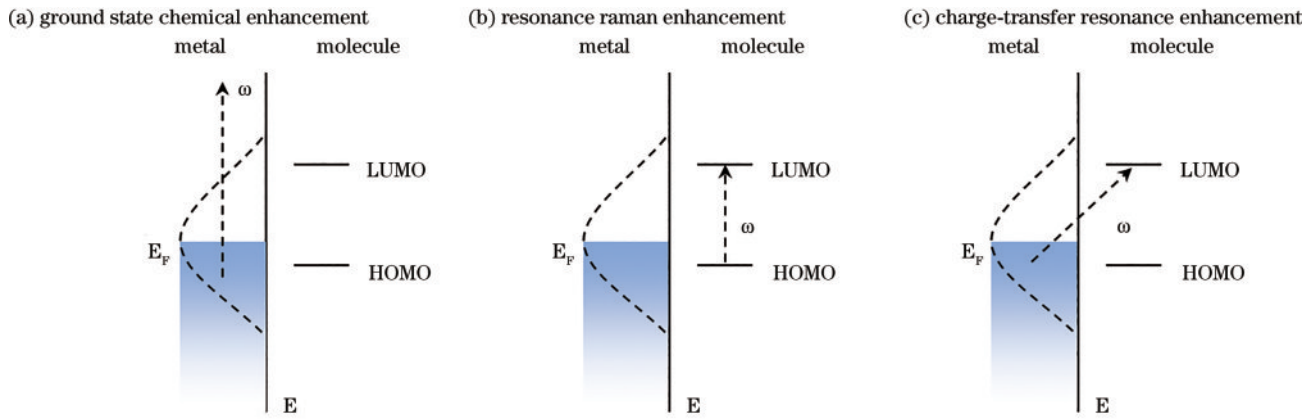


图 5 SERS 的化学增强机制, 修改自参考文献 [16]。(a) 待测分子与金属纳米颗粒的非共振增强, 与激发无关; (b) 激光能量与待测分子内的电子跃迁形成的共振增强; (c) 光诱导的电荷转移的类共振增强

Fig. 5 Chemical enhancement mechanism of SERS, modified from reference [16]. (a) The non resonant enhancement between the tested molecule and metal nanoparticles is independent of excitation; (b) resonance enhancement formed by laser energy and electronic transitions within the tested molecule; (c) class resonance enhancement of photo induced charge transfer

1) 电化学法: 将金属基底作为电极, 通过改变电极的电位, 使金属电极在氧化还原的循环过程中表面粗糙化。在氧化过程中, 施加氧化电压使金属被氧化为金属盐; 在还原过程中, 施加还原电压, 被还原的金属又重新沉积在金属表面, 从而获得具有一定粗糙度的金属, 但是由于其表面的形貌不可控, 电化学法逐渐被后续的其他方法替代<sup>[19]</sup>。

2) 真空蒸镀金属薄膜法: 先在目标基底上镀一层厚度均匀的金属薄膜, 随后再进行退火处理, 金属薄膜的厚度以及退火温度等都会影响金属纳米颗粒的粒径, 因此可以获得分布均匀的不同粒径金属纳米颗粒<sup>[20]</sup>。需要注意的是, 该方法在实验过程中对设备的控制精度、真空环境等有较高要求<sup>[21]</sup>。

3) 纳米结构压印法: 先在衬底上附上一层聚合物

涂层, 随后将带有纳米图案的模板与聚合物涂层接触, 再进行精确压印定型。在一定时间、温度、光照等条件处理后进行脱模, 将模板与聚合物涂层分离, 去除多余的聚合物, 再利用刻蚀或者薄膜沉积技术将图案转移到衬底上。该技术目前具有成本低、效率高、通量高的优点, 且分辨精度已小于 5 nm<sup>[22]</sup>。

4) 金属溶胶法: 将可溶性金属盐通过化学还原法还原成金属胶体, 通过改变不同种类反应物的用量制备出具有不同结构形貌金属纳米颗粒<sup>[23]</sup>。金属溶胶法可以提高 SERS 基底的增强效率和均匀性, 是最易制备也是用得最广泛的一类基底, 其所需设备简单、操作简便、金属颗粒形貌和粒径容易控制。目前, 金属溶胶法制备的最受欢迎纳米结构包括棒状、星状以及三角形等具有更多“热点”的各向异性纳米结构<sup>[24]</sup>, 如图 6 所示。

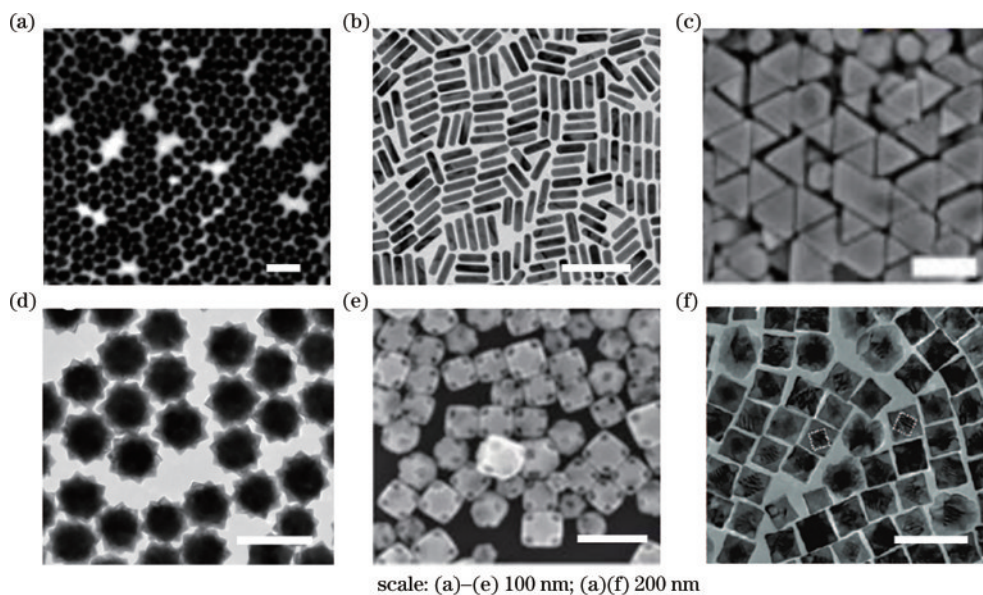


图 6 不同几何结构的贵金属纳米颗粒。(a) 球形<sup>[25]</sup>; (b) 棒状<sup>[26]</sup>; (c) 三角片<sup>[27]</sup>; (d) 星形<sup>[28]</sup>; (e) 笼<sup>[29]</sup>; (f) 核-壳笼<sup>[30]</sup>

Fig. 6 Precious metal nanoparticles with different geometric structures. (a) Spherical<sup>[25]</sup>; (b) rod-shaped<sup>[26]</sup>; (c) triangular<sup>[27]</sup>; (d) star-shaped<sup>[28]</sup>; (e) cage<sup>[29]</sup>; (f) core-shell cage<sup>[30]</sup>



### 3 数据处理与分析

从海量繁杂的光谱数据里面提取出有用的信息,是拉曼技术应用的关键环节。数据处理主要分为预处理

和后处理两部分,预处理主要是对采集到的原始光谱进行优化校准和提高信噪比,后处理包括对预处理过的数据进行特征提取和进一步的数据分析,如图 7 所示。

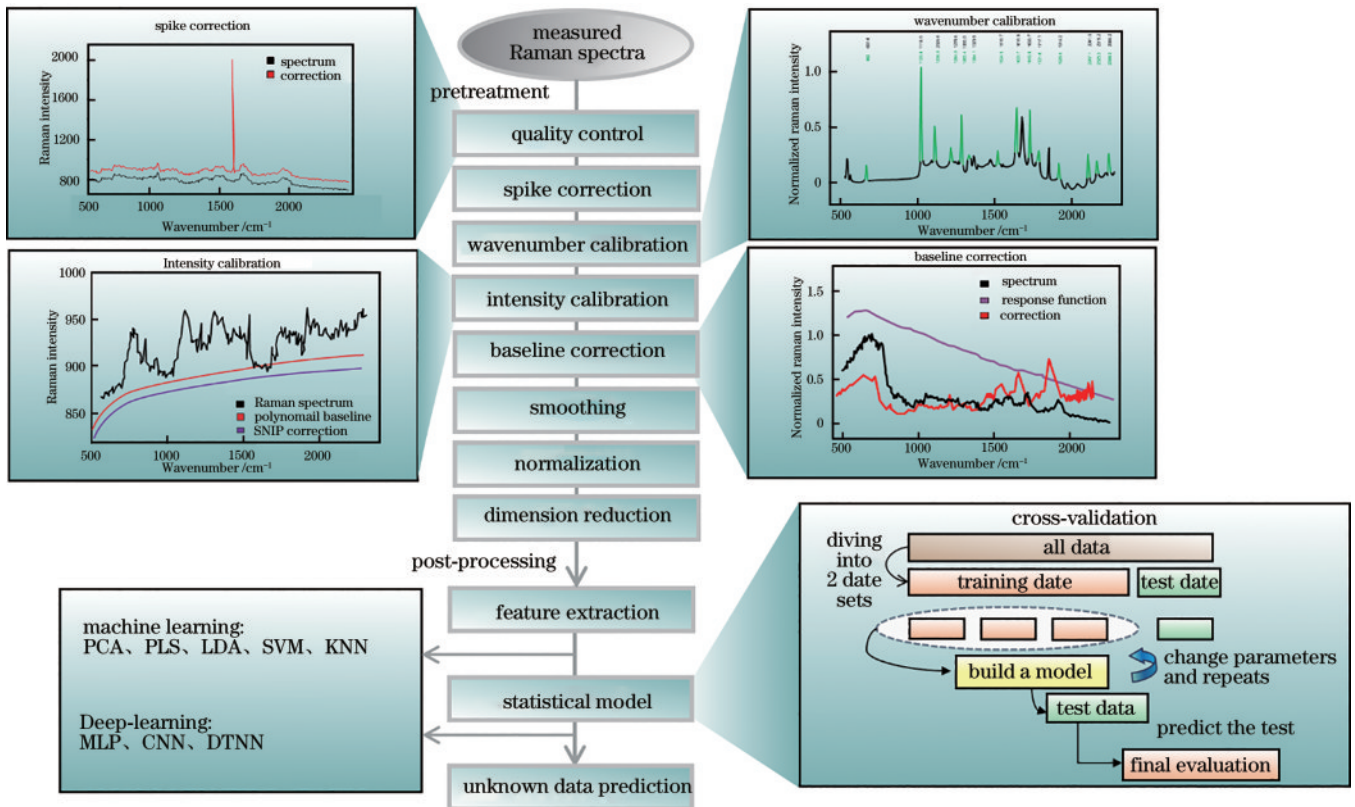


图 7 拉曼光谱数据处理的一般流程

Fig. 7 General process of Raman spectroscopy data processing

#### 3.1 光谱的预处理

上文提到,拉曼散射是一种较为微弱的现象,实验中得到的拉曼光谱容易受到其他因素如宇宙射线、仪器噪声、荧光背景、基线漂移等的干扰<sup>[31]</sup>,影响光谱的质量,降低数据的准确性。因此,不仅需要原始数据进行预处理,尽可能剔除干扰信号的影响,还需要通过后处理提取出数据特征,为后续的进一步数据分析提供依据。

##### 3.1.1 质量控制

数据预处理一般要先对数据集进行质量控制,确定光谱质量并去除主要的测量误差,选出满足训练要求的数据集。一方面,来自严重的燃烧效应、器件伪影或污染等的异常光谱数据在此处会被剔除。另一方面,对于噪声明显高于平均值且拉曼信号几乎不可见的光谱,也会作为异常值去除。实际应用中可以通过同一种方法同时检测出不同类型的异常值,最简单的方法是基于一个预定义的标记进行阈值化,如马氏距离、Q 残差等<sup>[32]</sup>。

马氏距离是一种度量多维数据之间相似度的方法,通过数据的协方差矩阵,可以消除各个维度之间的

相关性和尺度差异的影响。在数据处理过程中可以用来检测数据的异常值,即那些与正常数据分布相差较大的数据点。

Q 残差是一种度量数据在主成分分析(PCA)中的残差平方和的方法,它反映了数据在主成分空间(PCS)之外的变异。Q 残差可以用来检测数据的非线性变化,即那些与主成分模型不符合的数据点。

##### 3.1.2 尖峰校正

尖峰是指在拉曼光谱中突然出现的高强度峰,通常是由于激光在电荷耦合器件(CCD)等仪器中随机产生的宇宙射线引起的<sup>[33]</sup>,在拉曼光谱中表现出随机分布、高强度、狭窄的特征。由于宇宙射线引起的高强度尖峰会干扰正常的拉曼光谱,影响拉曼峰的认识和定量分析<sup>[34]</sup>,因此在选出符合质量要求的数据集之后,需要对光谱数据进行尖峰校正。尖峰校正的第一步也是关键的一步是进行尖峰检测,尖峰检测的最佳方法是通过多次检测波数轴和测量数据中急剧变化的拉曼信号来找到尖峰。找到尖峰信号后,有多种方法可以进行尖峰剔除,如中值滤波法<sup>[35]</sup>、插值法<sup>[36]</sup>、小波变换<sup>[37]</sup>等,它们主要利用相邻点的平均值或插值来替代

尖峰点,或者用该尖峰相同波数处的连续测量值来代替这个尖峰,从而消除尖峰的影响。

### 3.1.3 波数校正

波数校正的目的是尽可能减小外界环境对不同仪器或不同条件下测量结果的影响,便于光谱数据的比较和分析。波数校正可分为相对波数校准和绝对波数校准,它们都是利用长时间内拉曼峰稳定的标准样品(例如硅片等)作为参考,测试时通过调整硅片二阶拉曼峰的波数位置,使其与标准波数位置(约  $521\text{ cm}^{-1}$ )一致,来保证检测系统波数的校准。其中:相对波数校准是将标准样品的参考波数设置为零,对其他点的波数相对于这个参考点进行标定,主要是用于比较不同实验条件下不同样品之间的光谱;绝对波数校准使用已知波数的标准样品来确定每一个点的绝对波数值,主要用于精确的定量分析<sup>[38]</sup>。波数校正应该在尖峰去除之后进行,否则尖峰变宽,这将会使得它们更难去除。

### 3.1.4 强度校准

强度校准的目的在于确保光谱强度的准确性和可比性,因为在实际测量中,不同仪器、不同测量条件,以及不同样品都可能导致光谱强度变化,所以需要进行强度校准以消除这些差异,通常是通过测量标准光源确定光谱仪在不同波长处的响应,建立校准曲线或校准系数来对样品完成强度校准<sup>[39]</sup>。强度校准并不能完全达到消除光谱强度变化的目的。一方面,有些仪器相关的光谱变化可能在校准之后依然残留,另一方面,光谱变化还可能受到其他因素的影响,如样品的重复性和稳定性等。这些因素导致的光谱变化也无法通过强度校准来消除。

强度校准一般不需要经常进行,然而,如果出现以下情况,则要考虑进行强度校准:1)要进行峰值对比;2)强度响应曲线不光滑,在测量的拉曼光谱中引入了假带或改变了拉曼光谱的形状;3)需要进行不同仪器的光谱数据分析。

### 3.1.5 基线校正

基线通常是由于荧光或其他散射现象的背景引起的光谱线型变化,往往会掩盖或扭曲光谱的真实分布,影响对信号峰的识别和分析,因此需要利用底物信息去除背景信号的影响,复原与待测样品有关的光谱原始分布,突出待测样品的特征信息。可用于基线校正的方法有很多,主要是通过对光谱数据进行拟合或变换,消除基线的偏移或形变,具体算法包括多项式拟合法<sup>[40]</sup>、小波变换法<sup>[41]</sup>、扩展反向信号校正<sup>[42]</sup>和正交信号校正<sup>[43]</sup>等,这些方法具有使用方便、无需调节仪器等优点,并且在大部分情况下效果良好。然而,当荧光信号过强,无法通过数学方法消除时,就需要优化检测仪器后再进行光谱的采集。优化的方法包括时间门控拉曼光谱<sup>[44]</sup>、调制拉曼光谱<sup>[45]</sup>,以及位移激发拉曼差分光谱<sup>[46]</sup>等。

### 3.1.6 平滑化

平滑化是指对光谱数据进行平滑处理,增强信号的连续性和平滑性,提高信噪比。Savitzky-Golay(S-G)法是常用的平滑化方法<sup>[47]</sup>,通过对光谱数据进行加权平均或滤波处理,去除高频噪声,保留低频信号,但S-G法在光谱测量中会引起光谱数据的畸变,导致原本光谱中的重要信息被“平滑化”,所以在使用S-G法时需要仔细选择参数,使得光谱测量中的噪声不被放大,原始信号不会失真。

平滑化可以去除光谱中混杂的背景噪声,但同时也会弱化光谱本身的数据特征,与原始测量数据相比,因为没有考虑到相关噪声,大多数多变量技术在平滑后的效果可能更差,所以平滑化不是光谱数据处理中的必要步骤。平滑化通常和基线校准同步进行,完成平滑化后也可以对光谱进行截断处理,即将光谱中不需要的波数范围去除,可以减少后续数据处理的工作量<sup>[48]</sup>。

### 3.1.7 归一化

归一化的目的是消除由于样品数量、形状、表面粗糙度等因素引起的光谱强度的波动变化,这是一种粗略的特征提取方法。归一化的主要实现方法是对光谱数据进行缩放或变换,突出待测样品的拉曼信号特征。常用的归一化方法包括最大-最小归一化、0-1归一化、矢量归一化、标准峰归一化等。归一化一般在基线校正之后进行,作为数据预处理的最后一个步骤。

需要注意的是,预处理的各个步骤是相互影响的,整个预处理过程是作为一个整体进行的,没有标准化的预处理流程。不同的目的应采用不同的处理顺序,往往需要根据后一步骤的反馈来调整前一步的预处理步骤和算法选择。

## 3.2 数据后处理

数据后处理是为了从预处理过的光谱数据中提取有用的信息,建立分类或回归模型,为进一步的定性或定量分析提供依据。光谱数据后处理通常包括特征提取和模型建立,其中,特征提取又包括特征构建和特征选择,而模型建立则是根据所提取的数据特征将原始数据通过建模的方法达到分析目的。数据后处理的具体实现可以借鉴机器学习或深度学习的相关算法,因为这两类算法在处理复杂、非线性、高维数据方面表现出色,能够从大量数据中学习特征,提高光谱数据的分析和解释能力。

### 3.2.1 特征提取

特征提取往往需要对光谱数据进行变换或运算,将原始光谱数据转换成新的低维空间坐标表示的新光谱数据,得到具有物理或化学意义的特征向量,提取出有用信息,去除冗余的信息,提高信噪比,可视化光谱数据,为后续的数据处理提供更简单有效的输入。特征提取首先要构建合适的特征,并通过特征的选取实现对光谱的降维和变换。常用的特征提取方法有主成



分析(PCA)、偏最小二乘法(PLS)、线性判别分析(LDA)等<sup>[49]</sup>。

PCA 是一种无监督方法,用方差来衡量数据的差异性,并将差异性较大的高维数据投影到低维空间中进行表示。PCA 可以用来探索光谱数据的结构,发现数据的潜在模式,识别数据的异常点,简化数据的复杂性,为后续的分析提供基础<sup>[50]</sup>。

PLS 是一种有监督的多元回归方法<sup>[51]</sup>,用于处理多个自变量与一个或多个因变量之间的关系,主要用在存在高度共线性和维度高于样本数量的数据集以及需要处理多个因变量的情况中。PLS 通过最大协方差来构建多个相关因子,然后利用这些因子进行回归分析。与 PCA 类似,PLS 也是一种线性降维的方法,其不仅考虑了自变量的方差,还考虑了与因变量之间的相关性<sup>[49]</sup>。通过最大化自变量和因变量之间的协方差,PLS 提取出最具预测能力的维度来建立回归模型。与传统的多元回归方法相比,PLS 能够在降低维度的同时保留最多的信息。

LDA 属于有监督算法,可以将高维的光谱数据转化为低维的判别向量,最大化数据类间方差的同时最小化数据的类内方差,主要用于在高维数据中找到最具判别能力的低维表示。LDA 可以有效地提高分类的准确性,并帮助解决维度灾难的问题。值得注意的是,区别于 PCA, LDA 是一种有监督学习方法,因此需要借助类别信息来进行降维,但如果采集到的光谱数据量不够,则可能会出现过拟合现象。

### 3.2.2 模型的建立和评价

模型的建立需要对光谱数据进行划分,以此获得用于建立模型的训练集和用于模型测试评价的验证集,随后通过选择合适的机器学习或深度学习算法进行多次迭代,得到最优的模型完成后续的数据处理。为了提高统计模型的鲁棒性,在模型建立的时候往往

要进行评价和优化,常见的评价优化方法包括交叉验证(CV)<sup>[52]</sup>、学习曲线法<sup>[53]</sup>等。

交叉验证对原始数据进行不同的训练集和验证集分离,并进行多次迭代,最终选出最优的参数完成建模,避免模型的过拟合或欠拟合,得到稳定性和可重复性都高的统计模型。交叉验证评价的优点是能够充分利用数据,避免数据划分的偶然性,提高模型的泛化能力,缺点是计算量较大。

学习曲线法通过观察不同训练集大小对模型性能的影响,来判断模型是否存在欠拟合或过拟合的问题。学习曲线法可以绘制出训练集和验证集的误差随着训练集大小变化而变化的曲线,从而分析模型的偏差和方差。学习曲线法的一般步骤如下:1)将数据集划分为训练集和验证集;2)从训练集中选取不同大小的子集,对模型进行训练,并计算训练误差和验证误差;3)绘制训练误差和验证误差随着训练集大小变化而变化的曲线,分析曲线的趋势和收敛情况;4)根据曲线的形状,判断模型是否存在欠拟合或过拟合的问题,以及是否需要增加或减少训练数据。

### 3.2.3 机器学习

机器学习通过让计算机从数据中学习规律或模式,从而实现分类、回归、聚类、降维等目的,具体流程如图 8 所示<sup>[54]</sup>。根据是否需要数据的标签,机器学习可以分为监督学习、无监督学习和半监督学习等 3 种类型<sup>[11]</sup>。有监督算法与无监督算法的主要区别在于是否需要人工对训练集样本的标签进行干预;半监督学习则利用少量的标签数据和大量的无标签数据进行学习。适用于拉曼光谱的机器学习算法包括支持向量机法(SVM)、K 近邻算法(KNN)等<sup>[55-57]</sup>。

SVM 是一种用于分类和回归的算法<sup>[58]</sup>,其基本思想是将光谱数据( $X$ )和类别标签( $Y$ )之间的非线性关系转化为高维特征空间中的线性关系,通过寻找最优

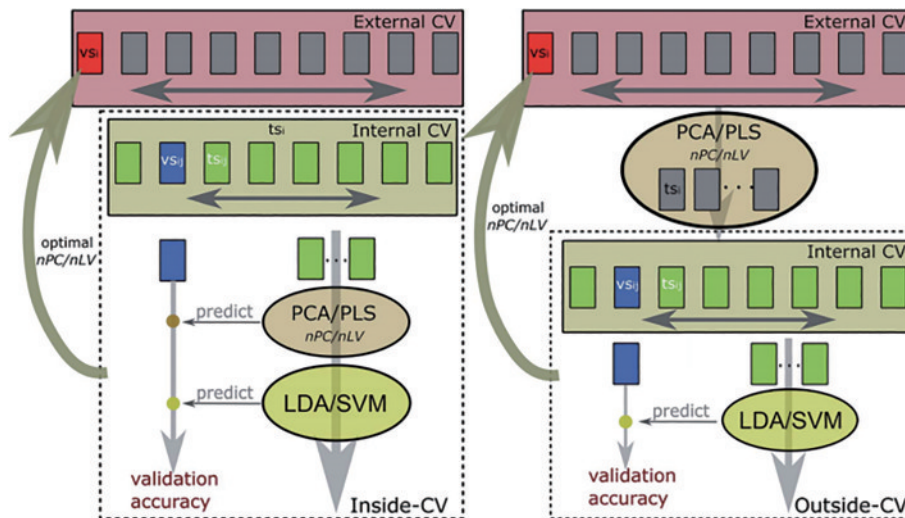


图 8 机器学习的工作流程<sup>[54]</sup>

Fig. 8 Workflow of machine learning<sup>[54]</sup>



的超平面来进行分类,该超平面可以将不同类别的样本点尽可能地分开,并保持与最近距离训练样本的最大间隔。SVM可以用来进行光谱数据的定性分析,识别样品的类型、来源、状态等。

KNN 是一种概念简单的分类方法,可以有效地处理低维问题,但需要进行仔细的有限元分析来减少分类前的变量数。KNN 模型中,唯一的可调节参数  $K$  用于确定类别归属时考虑的最邻近点数量,模型的效果在很大程度上取决于  $K$  值的选择<sup>[59]</sup>。KNN 分类根据数据的相似性进行划分,不依赖于任何预先建立的模型,适用于对数据的分布情况不清楚或无法获取的情况。

机器学习算法通常需要手动提取光谱数据中峰的位置、强度、形状等特征,需要一定的专业知识,其模型相对简单,计算资源需求相对较低,模型更容易理解和解释,更适用于数据特征明显、维度较低的情况。

### 3.2.4 深度学习

深度学习属于复杂的机器学习算法,是近年来一个崭新的研究方向,其在图像识别和语音方面的效果远超传统的机器学习算法,解决了很多复杂的模式识别难题,其中最常被研究的算法当属神经网络。神经网络可以用很少或没有特征的输入来表达目标空间的复杂映射关系,这里介绍 3 种常用的神经网络模型,如图 9 所示<sup>[60]</sup>。

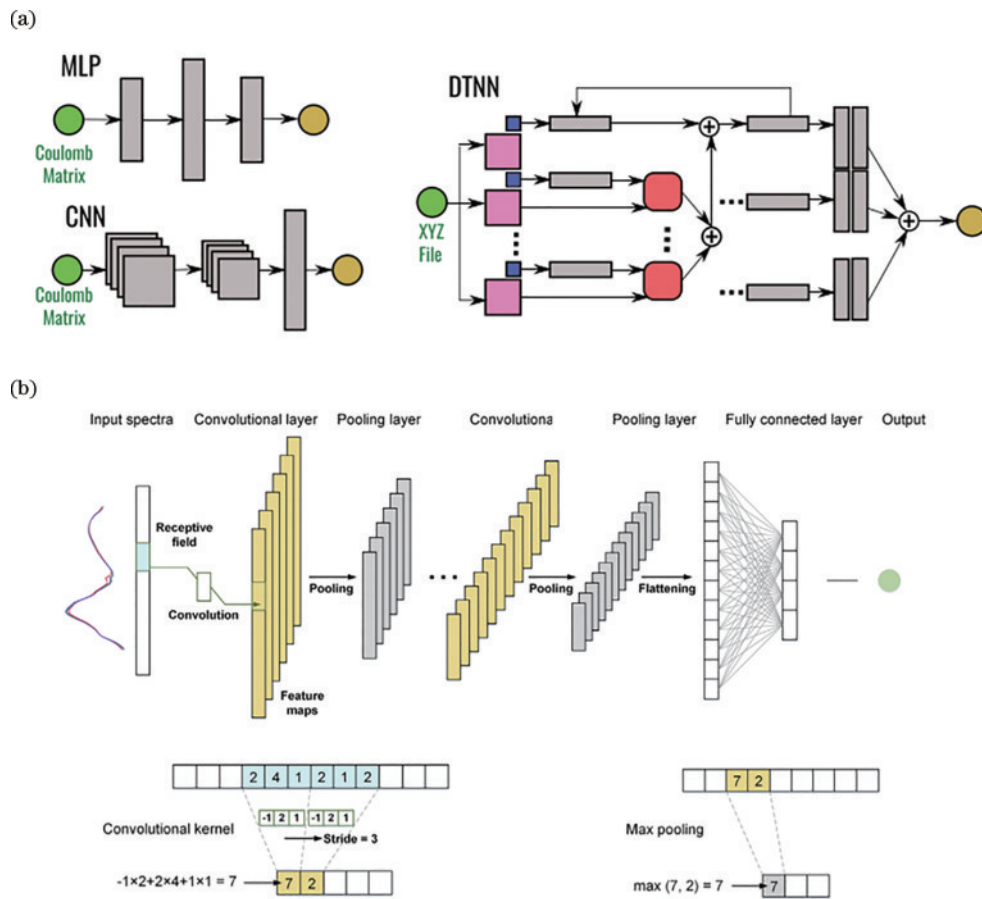


图 9 3 种常见的神经网络模型。(a) 多层感知器、卷积神经网络和深度张量神经网络<sup>[60]</sup>; (b) 卷积神经网络的组成<sup>[61]</sup>

Fig. 9 Three common neural network models. (a) Multilayer perceptrons, convolutional neural networks, and deep tensor neural networks<sup>[60]</sup>; (b) composition of convolutional neural network<sup>[61]</sup>

多层感知器 (MLP), 是深度学习中最简单的一种架构, 一组输入映射一组输出, 可以看作是一个由多个节点层组成的每一层都全连接到下一层的有向图, 属于前向结构的人工神经网络。除了输入节点, 其他每个节点都是一个带有非线性激活函数的神经元。MLP 可以用于从光谱数据中提取特征, 建立样品的分类或回归模型, 预测样品的类别或属性。其优点是能够逼近任意复杂的函数, 适用于高维和非线性的数据, 缺点则是需要大量的训练数据, 容易出现过拟合和局

部最优的问题, 且模型的可解释性较差。

卷积神经网络 (CNN) 是深度学习中最常见的算法, 如图 9(b) 所示, 其主要组成部分包括输入层、卷积层、池化层、全连接层和输出层<sup>[61]</sup>。CNN 只需训练小规模的核, 然后通过稀疏连接和权值共享的方式来处理多维数据, 可以有效降低参数的规模, 提高训练速度。CNN 具有自动特征提取、局部连接、参数共享、空间不变性、多任务学习等优点, 特别适用于处理图像数据, 其缺点为对计算资源需求高、数据需求量大、过拟

合风险高、模型解释性差等、调参复杂等。尽管存在以上缺点, CNN 因在多种任务中表现出的卓越性能, 已经成为深度学习领域的重要算法。

深度张量神经网络(DTNN)是一种基于张量网络的深度学习模型,能有效处理高维和非线性的数据,将一个高阶张量分解为多个低阶张量的缩并,从而降低数据的复杂度和冗余度,提取数据的特征。DTNN 的优点是能够适应不同类型和来源的数据,且具有较好的精度和效率;缺点与 MLP 类似,需要大量的训练数据,容易出现过拟合和局部最优的问题,且模型的可解释性较差。

相较于机器学习,深度学习模型更为复杂,并能够自主学习数据特征,无需手动提取。在处理复杂、高维,且存在非线性关系的数据时,深度学习会更为有效,对计算资源的需求也相对较高。

深度学习是实现人工智能(AI)的一种强大方法,通过模拟神经网络的结构和学习方式,实现对大规模复杂数据的高效处理和学习。利用人工智能算法处理拉曼光谱数据时,使用卷积神经网络或其他特征提取模型作为前处理步骤,将从拉曼光谱数据中提取的特征输入到 Transformer 或循环神经网络(RNN)中进行进一步的建模。未来,可以尝试将多个网络结构集成在一起,获得更好的性能。

拉曼光谱数据可以看作是一系列波长上的强度值,每个波长都可以作为序列中的一个位置,因此 RNN 和 Transformer 等序列模型也非常适合处理拉曼光谱数据,因为它们能够捕捉序列中的长距离依赖关系。

RNN 是一类专门用于处理序列数据的神经网络架构。相比于传统的神经网络,RNN 引入了循环连接,允许信息在网络中传递并保持状态。RNN 的主要特征是在网络的隐藏层之间添加了循环连接,使得网络在处理序列数据时能够保留先前时间步的信息。但 RNN 在处理长序列时容易遇到梯度消失问题,即在反向传播过程中,梯度逐渐减小,导致难以学习到远距离依赖关系。

Transformer 引入了自注意力机制,允许模型在处理序列数据时同时关注输入序列中的所有位置,提高了模型的并行性<sup>[62]</sup>。Transformer 中的每个注意力机制被分为多个头,允许模型学习多个不同的注意力权重,从而允许模型根据输入序列中不同位置的重要性动态地分配注意力权重,而在 RNN 的循环连接中,权重是共享的,即在每个时间使用相同的权重。

## 4 非相干拉曼显微技术的生物医学应用

正常生理或病理情况下生物分子携带不一样的化学信息,这些信息的差异性可以被拉曼光谱本征地捕

获,此外,拉曼技术适用于不同的生物样品,例如细胞、组织、体液和微生物等。近年来的研究表明,非相干拉曼显微技术在生物医学上表现出巨大的应用前景。

### 4.1 细胞层面的应用

研究不同细胞状态下的拉曼显微光谱有助于加深我们对许多生理或病理过程的认识。根据检测方式的不同,细胞的拉曼检测可分为静态和动态两种。静态检测主要研究细胞的识别和分类,动态检测的重点则是监测细胞诸如分裂、分化等的变化过程。自发拉曼和 SERS 显微技术在细胞层面的一些应用如图 10 所示。

#### 4.1.1 静态过程

细胞的主要组成成分包括蛋白质、核酸、脂质、磷脂和碳水化合物等,这些生物大分子的官能团产生的分子振动决定了细胞的拉曼指纹特征。该光谱特征可用于细胞的具体分类,为疾病的早期临床诊断提供可能。例如,免标记的自发拉曼显微光谱和 PCA 算法的结合,可以鉴别不同类型的白血病细胞<sup>[67]</sup>。除了可以进行光谱分析,拉曼技术结合显微成像技术还能对细胞进行可视化研究,如 Volkov 等<sup>[65]</sup>使用密度泛函理论和 Koopmans 定理模拟了血红蛋白的光学吸收和圆二色性行为,该研究结果表明,通过对单个红细胞不同拉曼显微图像的分析,可以探究正常生理浓度下不同种类血红蛋白在红细胞上的分布。此外,拉曼显微技术还实现了对细胞核和细胞质等亚细胞器和生物大分子的可视化分析,提高了肿瘤的诊断率,得到更高的敏感性、特异性和稳定性<sup>[63]</sup>。Roman 等<sup>[68]</sup>利用拉曼显微技术研究了前列腺癌细胞中脂滴的化学成分分布以及辐射对脂滴的影响,发现辐射后 24 h 由于脂解活性和脂肪氧化的增加会引起脂滴的减少,辐射后 48 h 脂滴的显著增加可能是由于内质网的应激反应或凋亡,揭示了脂代谢可能是放射治疗的潜在靶点,同时也展示了拉曼显微技术用于分析生物大分子的潜力。

#### 4.1.2 动态过程

对细胞发育状态的认识有助于实现对疾病的早期诊断,其中,细胞生命周期的每个阶段有不同的化学特征,可以通过拉曼显微镜对其进行监测。例如,肝癌的自然病程大约只有两年,但其确诊和临床症状大多在最后半年才出现,如何实现肝癌早筛一直困扰着医生和患者,Wu 等<sup>[69]</sup>尝试使用拉曼显微技术来实时监测间充质基质细胞(MSCs)在肝脏分化过程中的成熟度,发现经过肝脏分化 7 天和 21 天的 MSCs 与原代肝细胞更接近,而未分化的 MSCs 则与其差异较大。通过分析高光谱( $2800\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ )拉曼信号,可以实时定量评估 MSCs 在肝脏分化过程中的成熟度,有望帮助肝癌早筛。将拉曼光谱与机器学习结合分析细胞的动态过程,往往能获得更高的效率和准确率,Geng 等<sup>[70]</sup>结合拉曼光谱和机器学习算法追踪了人类神经干



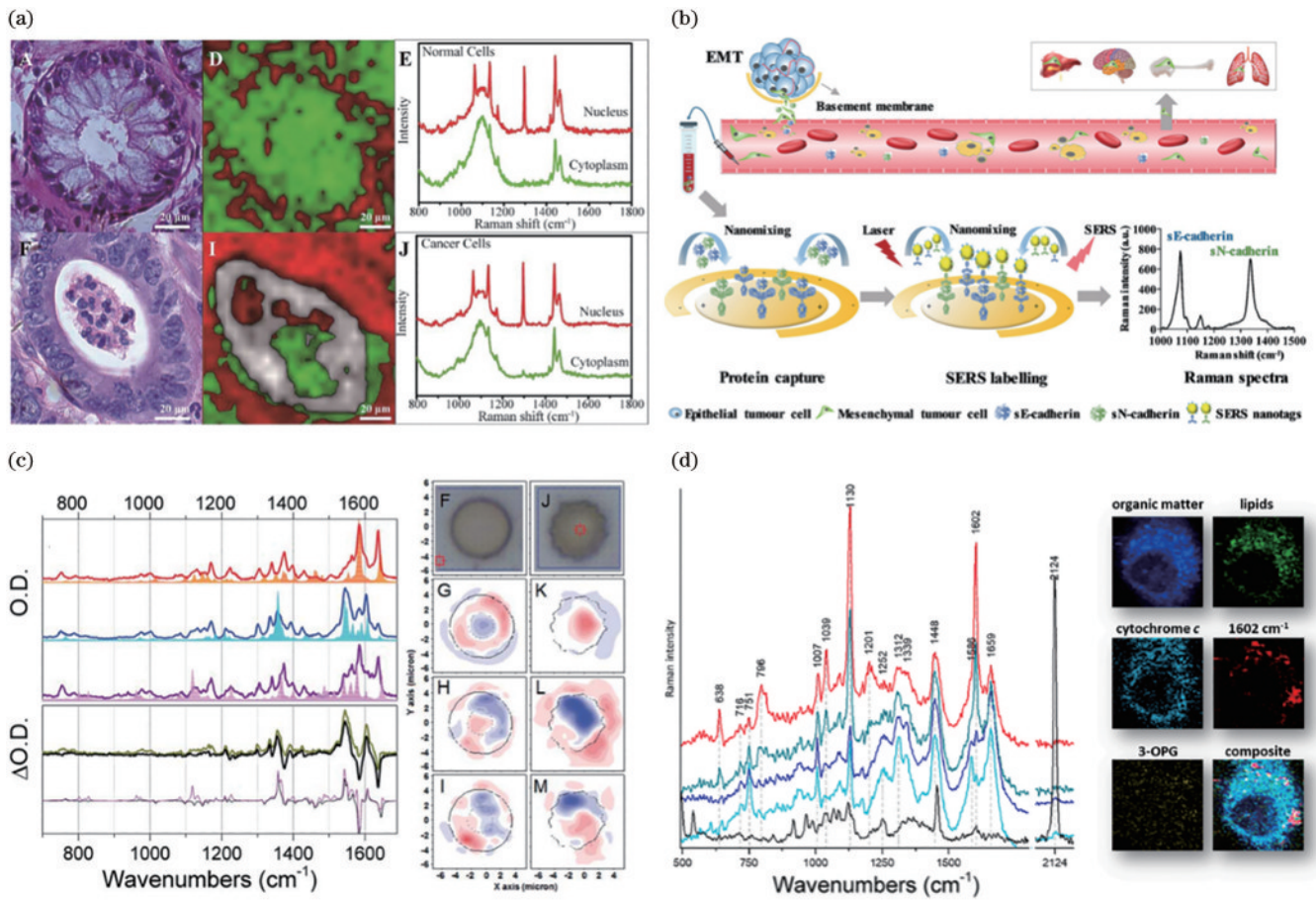


图 10 非相干拉曼显微光谱技术在细胞层面上的应用。(a)正常结肠组织(上)和癌病变结肠组织(下)的H&E染色图,蛋白、脂质分布图,及其自发拉曼光谱和经典最小二乘拟合<sup>[63]</sup>; (b)上皮-间质转化的SERS免疫检测原理图<sup>[64]</sup>; (c)自发拉曼显微光谱在细胞水平上绘制的血液生化图谱<sup>[65]</sup>; (d)利用自发拉曼探针追踪内皮细胞代谢变化的图谱<sup>[66]</sup>

Fig. 10 The application of incoherent Raman microscopy spectroscopy technology at the cellular level. (a) H&E staining maps, protein and lipid distribution maps, as well as spontaneous Raman spectra and classical least squares fitting of normal colon tissue (upper) and cancerous colon tissue (lower)<sup>[63]</sup>; (b) SERS immunoassay principle diagram for epithelial mesenchymal transition<sup>[64]</sup>; (c) a blood biochemical map drawn at the cellular level using spontaneous Raman microscopy spectroscopy<sup>[65]</sup>; (d) mapping metabolic changes in endothelial cells using spontaneous Raman probes<sup>[66]</sup>

细胞的分化状态,发现核酸、苯丙氨酸、脂质和蛋白质等多个特征峰存在显著差异。为了得到更好的拉曼信号进行生物检测,Wang等<sup>[71]</sup>利用SERS技术捕获了骨髓干细胞在细胞分化过程中的分子特征,发现碱性磷酸酶和牙本质唾液磷蛋白在细胞分化的前期阶段明显表达,细胞核内色氨酸的含量在整个分化过程中达到最高水平,说明色氨酸在细胞分化过程中起着重要作用。拉曼显微光谱技术还被证明可以用来追踪细胞内的代谢过程和纳米颗粒的运输情况,Pieczara等<sup>[66]</sup>就利用改性葡萄糖实现了拉曼技术对单个活体内皮细胞新陈代谢变化的追踪。除此之外,拉曼显微技术与其他技术结合,能更好地追踪动态过程,例如微流控和SERS技术的结合可以实现对乳腺癌中药物诱导的上皮间质转化过程的追踪<sup>[64, 72]</sup>,而对细胞内双重纳米探针(荧光和SERS)的量化有望解答纳米材料在细胞内的定位和运输过程问题<sup>[73]</sup>。

## 4.2 组织层面的应用

在组织层面上,拉曼技术主要推动了对癌变和正常组织的定性和定量分析的发展,表现出作为化学组织病理学技术的潜力,有望成为目前组织病理学金标准H&E染色的有力补充。该技术在组织中的应用大体可分为离体检测和在体检测两方面,如图11所示。

### 4.2.1 离体检测

目前癌症诊断的金标准是H&E染色病理分析,但该方法的样本制备过程繁琐、耗时长,不太符合实际临床上制样简单、耗时短的要求。拉曼技术无需对样本进行复杂处理,测试和数据分析时间短,因此是癌症诊断的有力工具。乳腺癌是女性最常见的癌症之一,早期研究表明拉曼光谱技术可以区分乳腺恶性肿瘤和健康的乳腺组织<sup>[76]</sup>。最近,Shang等<sup>[77]</sup>使用拉曼显微技术和二维卷积神经网络(2D-CNN)进行了乳腺癌的结构分析和种类判别,揭示了胶原纤维的定向变化与乳腺癌变过程之间的关系,对乳腺癌组织和正常组织

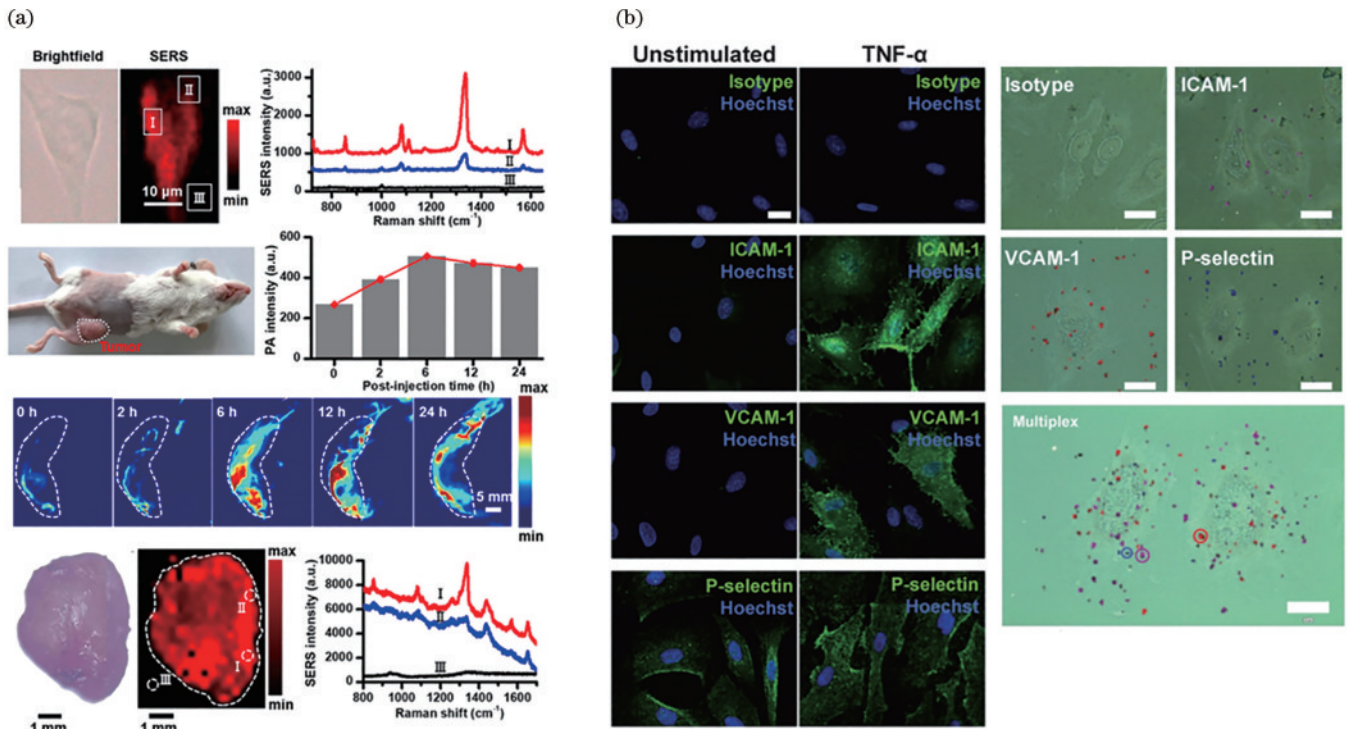


图 11 拉曼显微光谱技术在组织层面的应用。(a)乳腺癌小鼠模型肿瘤组织的SERS光谱、SERS成像和光声成像的图像<sup>[74]</sup>；(b)冠状动脉内皮细胞组织的单重和多重SERS成像检测<sup>[75]</sup>

Fig. 11 Application of Raman microscopy spectroscopy technology at the tissue level. (a) SERS spectrum, SERS imaging, and photoacoustic imaging images of tumor tissue in breast cancer mouse model<sup>[74]</sup>; (b) single and multiple SERS imaging detection of coronary artery endothelial cell tissue<sup>[75]</sup>

的平均鉴别准确率达96.01%。乳腺微钙化常在乳腺X线检查中发现,被认为是乳腺癌的可疑体征,需要进行乳房活检,但只有少数患者被诊断出癌症。为了减少不必要的活检并快速表征乳腺微钙化,Vanna等<sup>[78]</sup>研究了乳腺微钙化的生化组成与组织病理特征之间的相关性,首次描述了微钙化中的无机成分,并将其与病理状态进行了关联,该研究有望通过乳腺微钙化提高乳腺癌的诊断率。肺癌则是引起男性发病率和死亡率最高的癌症,早在2003年就可以利用1445 cm<sup>-1</sup>和1655 cm<sup>-1</sup>处的拉曼特征峰来区分正常支气管组织、鳞状细胞癌和腺癌<sup>[79]</sup>,将其与判别分析算法结合,能以更高的敏感性和特异性对肺肿瘤进行分类<sup>[80]</sup>。近期,单点拉曼光谱技术与机器学习算法结合,不仅可以在不到1 s的时间内捕捉到与肺癌相关的生物分子的变化,而且能达到94%的灵敏性和80%的特异性<sup>[81]</sup>。前列腺癌作为另一种常见于男性的癌症,约占男性所有新发癌症病例的1/4,拉曼光谱技术在前列腺疾病中的首次应用由Crow等<sup>[82]</sup>提出。前列腺组织的光谱表型(DNA和RNA的拉曼光谱信息)会随时间发生变化,利用拉曼显微光谱技术检测前列腺癌已经可以达到较高的准确率,最近还有研究者提出结合染色的数字组织病理学和未染色的拉曼化学多模态图像来自动识别前列腺癌<sup>[83-85]</sup>。

#### 4.2.2 在体检测

拉曼技术最大的优点之一就是具有非侵入性和高特异性,这种无创的检测技术能帮助一些处于特殊时期的人群减少被感染风险。例如,拉曼显微光谱技术对女性孕期宫颈的体内检测和对分娩和产后修复生化标志物的鉴定,有望实现无创性早产风险评估,减少早产引起的发病率和死亡率<sup>[86]</sup>。近些年,SERS探针在术中指导展现出了巨大潜力,对此开发出许多不同的探针,其中,基于金材料的纳米探针是应用较多的SERS探针。Wen等<sup>[74]</sup>设计了一种“三合一”的纳米探针(包括一个金纳米星核、一个拉曼分子层和一个二氧化硅外层),融合光声成像、SERS检测,以及光热肿瘤消融的优势来消除残留的微肿瘤。这种“三合一”纳米探针的有效吸收,不仅因为肿瘤的高渗透长滞留效应(EPR效应),还归因于PEG修饰和探针的表面负电荷。他们还通过CCK-8评价该探针对4T1-luc细胞的体外细胞毒性,在不同浓度探针、无激光照射作用下,4T1-luc细胞的细胞活力保持约100%,表明细胞毒性可以忽略不计。此外,Gao等<sup>[87]</sup>开发了一种新型的血脑屏障渗透性金纳米探针,可以通过酸环境触发的MRI/SERS信号来引导胶质母细胞瘤的术前定义和肿瘤切除手术。研究中利用 low-density lipoprotein-receptor-related protein 1



(LRP1)的双向血脑屏障穿越能力,增强了肿瘤对金纳米探针的摄取,同时快速消除对正常脑组织的非特异性传递。文中还提到,该探针在正常脑组织中摄取最小、排泄率快、全身毒性较低。目前常见的SERS探针主要由金、银等重金属制成,无法在组织中自行清除,不利于体内应用,因此具备光降解能力的CuS SERS探针被开发出来用于术中残留肿瘤的检测、消融和自清除<sup>[88]</sup>。研究人员通过合成CuS纳米颗粒,将其修饰在肿瘤细胞上,利用其SERS效应进行肿瘤检测。由于肿瘤的EPR效应,CuS SERS探针具有良好的靶向能力,具有3.6%的ID/g(每克组织注射剂量的百分比)。作者通过在PC3肿瘤模型中的系统递送,评估了它们的生物分布和消除。在

注射后30天,仅在心、肝、脾、肺和肾中保留0.6%、0.4%、0.9%、0.5%、0.3%的ID/g。这一结果证实了CuS SERS探针的生物安全性。同时,CuS SERS探针还具有光热效应,通过激光照射时产生的热能杀死肿瘤细胞,达到肿瘤消融的目的,具有良好的治疗效果。

### 4.3 体液方面的应用

体液活检作为一种新兴的无损检测技术,具有最小侵入性和可重复采样的优势,方便实时监测疾病的状态、评估预后及治疗效果。近年来,基于体液样品的拉曼技术因其快速、便宜、高灵敏度、高特异性等优点,表现出巨大的生物临床应用潜力,其中的一些应用研究如图12所示。

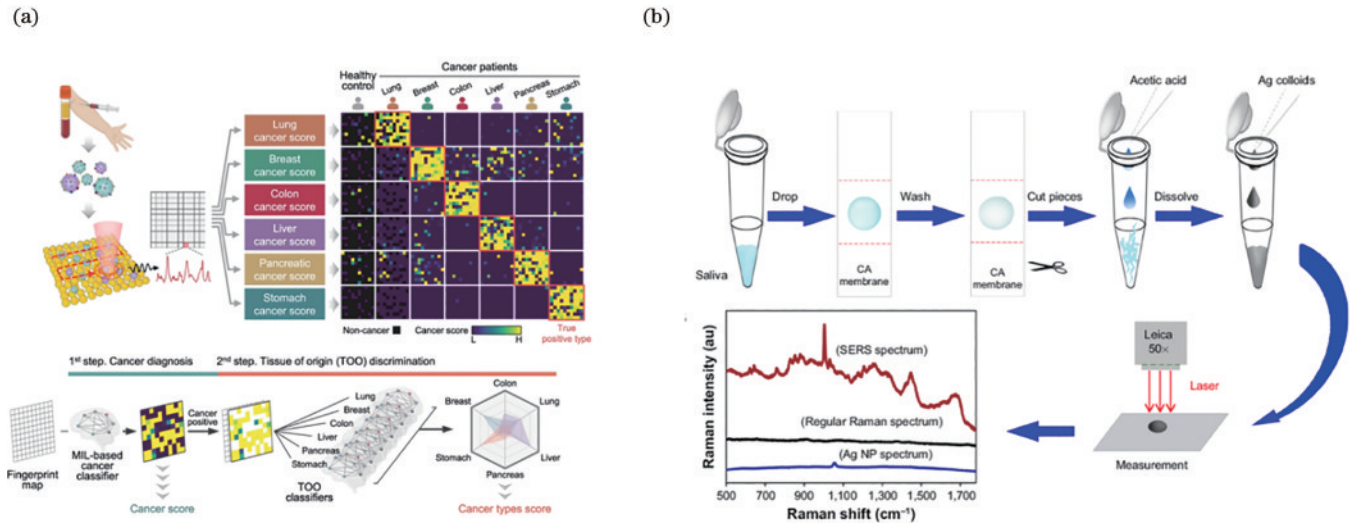


图12 拉曼显微光谱技术在体液活检方面的应用。(a)SERS技术与人工智能结合利用血浆中的外泌体检测多种癌症的示意图<sup>[89]</sup>;

(b)唾液蛋白-银纳米颗粒混合物的制备工艺示意图,及该混合物与不含银的唾液蛋白、银纳米颗粒的SERS谱比较<sup>[90]</sup>

Fig. 12 The application of Raman microspectral technology in body fluid biopsy. (a) Schematic diagram of SERS technology combined with artificial intelligence using exosomes in plasma to detect various cancers<sup>[89]</sup>; (b) schematic diagram of the preparation process of saliva protein silver nanoparticles mixture, and comparison of SERS spectra of the mixture with saliva protein and silver nanoparticles without silver<sup>[90]</sup>

#### 4.3.1 血液检测

血液参与人体循环,含有许多反映生理和病理变化的信息,具有采样便捷、感染风险小、单次检测样品量少等优势,是目前临床应用最多的检测样本。糖尿病的检测与血液密切相关,血糖容易受饮食摄入的影响,糖尿病患者必须每天定期监测血糖水平,这对患者来说极为不便。拉曼光谱特征峰值早已被证明与血清中葡萄糖、尿素、蛋白质等的浓度有良好的相关性<sup>[91-92]</sup>。基于此,Barman等<sup>[93-94]</sup>首次利用滴涂沉积拉曼(DCCR)技术来定量分析糖化血红蛋白和糖化血清蛋白,实现了远低于最低生理浓度的检测灵敏度。为了得到更好的信号,最近越来越多的课题组开始研究SERS技术在糖尿病诊断中的应用。例如,以巯基苯硼酸(4-mPBA)作为探针分子的多尺度银SERS基底<sup>[95]</sup>,基于银包覆的无序硅纳米线SERS传感平台<sup>[96]</sup>,

金纳米颗粒和二氧化硅纳米颗粒构建的SERS基底<sup>[97]</sup>等均有助于糖化血清蛋白的高灵敏度和高特异性检测。此外,基于血液的拉曼显微技术在癌症早期诊断与术后评估方面也具有很大潜力。白血病是一种造血干细胞恶性克隆性疾病,495、725、1002、1070、1616、1653  $\text{cm}^{-1}$ 处的SERS峰可以帮助区分急性髓系白血病的亚型<sup>[98]</sup>。拉曼光谱技术还可以借助对血液来源生物样品的检测,实现对非血液病的诊断,Shin等<sup>[89,99]</sup>利用深度学习分析外泌体的拉曼显微光谱,实现了对肺癌的早期诊断,并且在近期研究中该课题组将SERS与人工智能结合,通过分析血浆中外泌体的SERS光谱,利用人工智能算法确定癌症以及其组织来源,并使用520个未用于训练的测试样本展示了该系统的诊断性能,最终的预测模型敏感性为90.2%,特异性为94.4%。在术后评估方面,SERS技术近期被用来评

价手术对乳腺癌的治疗效果,通过多元诊断算法可以实现对术前和术后的乳腺癌患者,以及术前乳腺癌患者和健康志愿者的区分,准确率分别为 95% 和 100%<sup>[100]</sup>。

#### 4.3.2 尿液检测

尿液是完全非侵入性的理想活检样本,携带了大量能够反映疾病特异性的代谢物或潜在生物标志物。基于尿液样本的拉曼光谱技术可以开展对泌尿生殖系统癌症的研究,Cui等<sup>[101]</sup>将 SERS 技术和 PCA-LDA 算法结合,利用尿液诊断膀胱癌和前列腺癌,能有效地区分健康志愿者、膀胱癌患者,以及前列腺癌患者,分类准确率为 91.9%。结肠直肠癌则是胃肠道中常见的恶性肿瘤,早期症状不明显,将 SERS 技术和 PCA-SVM 算法结合,对尿液进行分析,大大提高了对结肠直肠癌在不同阶段的识别能力,整体准确率达到 93.65%<sup>[102]</sup>,有助于癌症的早期发现和及时诊断。基于尿液的拉曼光谱技术还可以用来评估肾的功能状态,将其与生物信息学分析方法结合,可以快速诊断无症状高尿酸血症患者的早期肾损伤<sup>[103]</sup>。Huang等<sup>[104]</sup>使用 SERS 技术来评估肾移植术后的肾功能,发现光谱中尿液的尿蛋白、尿素和血液中的如血清肌酐、尿素氮之间存在强相关性。此外,借助于尿液的拉曼光谱还可以进行冠心病<sup>[105]</sup>、糖尿病<sup>[106]</sup>等的诊断,最近拉曼光谱技术还被用来检测 COVID-19 患者尿液的分子组成变化<sup>[107]</sup>,研究发现 COVID-19 患者的尿液与疾病的严重程度有关,基于尿液的 COVID-19 确诊率为 93.5%。

#### 4.3.3 唾液检测

唾液属于另一种非侵入性的生物临床样本,其中富含的生物化学成分反映出与生理或病理状态有关的情况,唾液检测具有无创无痛、快速便捷、可重复等优点。近年来发展了基于唾液样本的拉曼光谱技术,通过定量检测唾液中生物标志物水平,有望为疾病筛查提供更可靠的标准。Feng等<sup>[90,108]</sup>讨论了一种结合膜蛋白纯化和 SERS 技术的唾液分析方法,用于非侵入性鼻咽癌检测,诊断准确率达到 90.2%,该课题组还利用唾液蛋白的 SERS 光谱对良/恶性乳腺肿瘤进行了区分,证明了基于唾液蛋白的 SERS 技术具有作为一种无标记、非侵入性和便捷的乳腺癌检测和筛查工具的潜力。唾液是最适合进行口腔癌早期检测的液体样本,Connolly等<sup>[109]</sup>于同期利用唾液 SERS 光谱和多元分析实现了对口腔鳞状细胞癌高达 89% 的灵敏性检测,这项研究表明,基于唾液和口腔细胞的 SERS 技术结合 PCA-LDA 或 PCA-LR 诊断算法具有潜在的临床应用前景,可用于非侵入性口腔癌的检测。此外,唾液样本的拉曼光谱技术还可用于儿童哮喘生物标志物的早期检测<sup>[110]</sup>、溃疡性结肠炎和克罗恩病的区分<sup>[111]</sup>等。

## 4.4 微生物方面的应用

近年来,拉曼技术在微生物研究中的优势日益凸显,许多课题组基于细菌和病毒这两类样品对微生物进行了定性分类、定量检测等方面的研究。图 13 是非相干拉曼显微光谱技术在微生物方面的一些具体应用研究。

### 4.4.1 细菌

就生物医学应用而言,快速鉴别临床常见细菌样本是十分重要的。将拉曼光谱技术与机器学习结合,不仅可以快速准确地识别临床样本是否被细菌感染<sup>[114]</sup>,还可以用来辨别病原菌种类<sup>[112]</sup>。Das等<sup>[115]</sup>利用 SERS 纳米线芯片和机器学习技术对野生型和抗生素耐药细菌进行物种和菌株级别的分类,结果表明 SERS 芯片的检测灵敏度比尿路感染等临床细菌感染的临床阈值低非常多。近期一种基于拉曼光谱转换模型的机器学习技术被开发出来,能准确快速地识别出最小处理的细菌表型<sup>[116]</sup>,而在病原体预测准确性方面,CNN 算法表现最好,准确率达到 99.86%<sup>[117]</sup>。近年来,有许多研究人员利用拉曼光谱技术进行抗生素敏感性的检测,并得到了较好的结果。利用拉曼辅助抗生素敏感性测试,不仅具有很高的准确性和可靠性,而且测试时间大大缩短,从传统方法的 72 h 缩短到 3 h<sup>[118]</sup>。当单细胞拉曼光谱被用来与重水标记结合时,能更快速地进行临床应用的抗生素敏感性测试,整个测试时间从接收样本到 S/R 读数仅需 2.5 h<sup>[119]</sup>。

### 4.4.2 病毒

目前用于病毒检测的手段主要包括核酸检测和免疫学检测,前者价格昂贵,后者需要症状出现后数天至数周的时间才可能发展出可检测的抗体水平,因此便宜、快速、敏感的病毒检测对疾病的防控具有重要意义。乙肝病毒是有最完全特征的和复杂的肝炎病毒,Tong等<sup>[120]</sup>使用拉曼光谱技术结合自适应迭代加权惩罚最小二乘法 (airPLS)、主成分分析 (PCA)、粒子群优化 (PSO),以及支持向量机 (SVM) 等方法,建立了一个乙型肝炎病毒感染血清模型,结果显示该模型具有很好的灵敏度和特异性。通过化学计量学方法分析拉曼光谱,结合 PLSR 模型和 PCA-SVM 模型,不仅能实现对乙型肝炎病毒感染的诊断,并且能预测未知样本中的乙型肝炎病毒感染<sup>[121]</sup>。由于新冠疫情的影响,许多研究者将目光聚焦到呼吸道病毒的研究上,利用 SERS 结合机器学习的方法能检测多种呼吸道病毒,并成功区分阳性和阴性样本<sup>[122,113]</sup>。另一部分研究者则聚焦于 SARS-CoV-2 病毒的检测,例如:Rumaling等<sup>[123]</sup>研究了拉曼光谱技术对 SARS-CoV-2 快速检测的可能性,确定了与阳性样本相关的拉曼峰;Akdeniz等<sup>[124]</sup>利用 SERS 技术对 SARS-CoV-2 病毒颗粒中的刺突蛋白进行了表征和区分;Samodelova等<sup>[125]</sup>则基于 DNA 修饰的 SERS 传感器来检测 SARS-CoV-2 病毒。



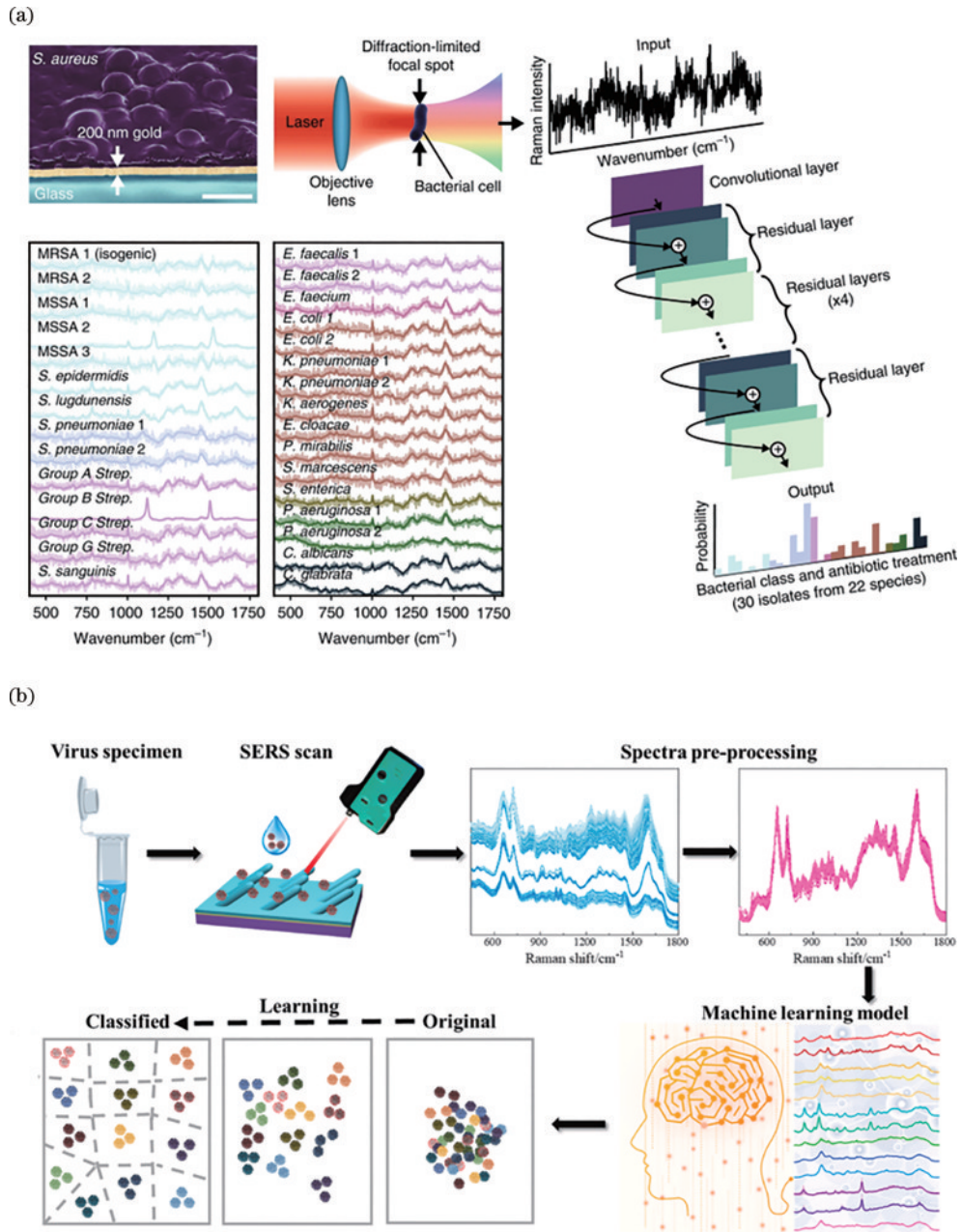


图 13 非相干拉曼显微技术在微生物方面的应用。(a)用 CNN 算法从拉曼光谱中识别细菌的示意图<sup>[112]</sup>; (b)SERS 技术结合机器学习算法对唾液中病毒进行分类的示意图<sup>[113]</sup>

Fig. 13 Application of incoherent Raman microscopy in microbiology. (a) Schematic diagram of identifying bacteria from Raman spectra using CNN algorithm<sup>[112]</sup>; (b) schematic diagram of SERS technology combined with machine learning algorithms for classifying viruses in saliva<sup>[113]</sup>

## 5 拉曼光谱技术面临的挑战与发展

综上所述,得益于高特异性、不受水干扰、制样简单、易定量等优点,自发拉曼和 SERS 技术在生物医学领域具有广泛的应用前景。与此同时,这两种技术仍然面临的挑战也决定了其未来的发展方向。

生物样品的拉曼散射截面较小,最终导致拉曼显微成像的速度相对缓慢,因此如何提高成像速度这一重要挑战,将成为拉曼显微技术未来的主要发展方向之一。近年来不同课题组也报道了相关的研究成果,

主要通过拉曼宽场显微技术提高显微成像的速度。Heitzmann 课题组<sup>[126]</sup>首次通过结合光片显微技术把传统自发拉曼显微镜的成像速度提高了 5 倍,实现了 17 min 内对单张斑马鱼组织切片的拉曼成像。此后, Dunn 等<sup>[127]</sup>报道了通过 Airy 光片显微与拉曼技术的结合完成了对单个微生物细胞三维代谢活动的实时可视化追踪。此外, Yang 等<sup>[128]</sup>借助计算机视觉位置跟踪系统结合光度立体增强和混合化学现实,研究了光纤拉曼成像系统在近表面组织的实时成像。光片显微和拉曼技术的结合,不仅能提高其成像速度,而且可以得

到更大深度内的样品信息,有助于采集到更全面的三维信息。

另一方面,生物体系一般使用可见或红外光源来获得拉曼信号,其拉曼图像同样面临分辨率受限于衍射极限的问题,因此如何把拉曼图像看得更清晰或者从更精细的区域得到信号是拉曼技术亟待解决的另一个难题。受荧光超分辨技术的启发,近年来,拉曼超分辨成像逐渐引起人们的关注,相关领域的研究处于初期阶段,该技术在生物体系中的应用逐渐受到重视。利用单分子 SERS 强度和光谱的时空波动特性<sup>[129-131]</sup>,结合单分子定位的 STORM 算法,可以精准捕捉和描绘纳米尺度单分子 SERS 的质心位置<sup>[130-132]</sup>。由于单分子 SERS 信号只出现在局域电场超强的热点区域,因此单分子 SERS 超分辨成像的一个重要应用是对 SERS 热点的研究<sup>[132-133]</sup>。当利用该技术研究生物样品时,可以分辨出直径约 20 nm 心肌细胞中的原纤维结构<sup>[134]</sup>,还揭示了大概 50 nm 厚的细胞壁特征<sup>[135]</sup>,并追踪了结肠癌细胞膜上  $\alpha_v\beta_3$  整合素与蛋白肽链的相互作用<sup>[136]</sup>。结构光照明自发拉曼超分辨技术也被报道将一维方向上的空间分辨率提高了 1.4 倍,可清晰分辨出小鼠脑组织内胼胝体中富含脂质的髓鞘结构<sup>[137]</sup>。利用结构光照明 SERS,分别在一维和二维方向达到 97 nm 与 120 nm 的分辨率<sup>[138]</sup>,还完成对 3T3 细胞 109 nm 的三色成像<sup>[139]</sup>。

拉曼光谱作为一种无标记技术,对具体特定的生物目标物(例如某种蛋白)缺乏特异性,而这往往是解密生物医学问题的关键,因此,近十多年来逐步发展并壮大了拉曼探针领域的研究和应用。在生物拉曼静默区( $1800\sim 2700\text{ cm}^{-1}$ )引入具有高拉曼散射截面的探针,不仅能规避掉生物样品的内源性荧光背景,还能对感兴趣的目标蛋白或结构进行特异性检测。常见的拉曼探针包括同位素和生物正交化学小分子。其中,炔烃( $\text{C}\equiv\text{C}$ )作为生物正交化学领域中广受欢迎的小分子探针(例如二炔单体仅由两个原子组成),在  $1800\sim 2700\text{ cm}^{-1}$  区域的拉曼散射截面几乎高于免标记拉曼成像中的所有内源化学键,不仅具有很窄的拉曼光谱线宽( $15\text{ cm}^{-1}$ ),而且拥有很好的生物兼容性和光稳定性,已被逐渐广泛地应用到生物拉曼成像领域<sup>[140-141]</sup>。针对拉曼多复用成像,目前有两类在生物拉曼静默区域( $1800\sim 2700\text{ cm}^{-1}$ )表现出强烈拉曼特征峰的探针调色盘脱颖而出。第一类是基于三键偶联近红外荧光染料的 MARS 调色盘<sup>[142]</sup>;第二类是通过调控炔烃( $\text{C}\equiv\text{C}$ )的共轭长度、掺杂  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  同位素和改变苯基封端等方式制备的共轭多炔化合物 Carbow 调色盘<sup>[143]</sup>,实现了仅 10 nm 范围的 20 复用通道选择。

拉曼显微成像技术的发展与光谱仪的性能息息相关,近几年许多课题组致力于光谱仪的研究。窄缝是光谱仪以降低吞吐量为代价提高光谱分辨率的关键部分,光谱仪的光谱分辨率和吞吐量之间的矛盾是一个

需要解决的关键问题,这个问题限制了传统光谱仪对弱信号的检测,有研究者指出将数字投影狭缝(DPS)方法应用于光纤光谱仪和拉曼光谱仪中,可以在不改变物理狭缝或不需要仪器光学参数的情况下,提高光谱仪的光谱分辨率和吞吐量<sup>[144]</sup>。在众多光谱检测技术中,空间外差拉曼光谱是一种特别适用于拉曼测量的技术,但传统空间外差拉曼光谱仪的光谱范围受到其光谱分辨率和探测器元件数量的限制。具有阶梯镜结构的空外差光谱仪和单镜的空外差光谱仪被开发出来,实现了广泛的光谱覆盖和高光谱分辨率,获得了满足拉曼检测要求的宽光谱范围,并且仪器光学系统的调整更加方便<sup>[144-146]</sup>。光学光谱仪的小型化一直是一个活跃的研究领域,因为对便携式表征工具的需求一直很高。近期, Kim 等<sup>[147]</sup>将智能手机与拉曼光谱仪结合,研究人员利用集成在 CCD 或 CMOS 图像传感器上的光子晶体、超表面、量子点和硅纳米线取代传统光栅,该微型光谱仪获得的光谱条形码实现了药物分类。此外,与智能手机光谱仪中的人工智能功能集成,用户可以在不同的地点和情况下分析光谱,这将提高该光谱仪在包括药物分类在内的许多学科中的可移植性和可用性。拉曼光谱虽然是现代化学实验中的主要分析工具,但商业拉曼光谱仪的造价仍非常昂贵,所以还有许多研究者致力于打造成本低效益高的光谱仪,例如带有鲍威尔透镜的紧凑型线检测光谱仪<sup>[148]</sup>,利用光学拾卡器和脉冲功率制造的拉曼光谱仪<sup>[149]</sup>等。

把拉曼技术真正用起来的关键之一是如何从海量的光谱数据里面进行特征提取和模型建立,因此对拉曼数据的处理分析是另一个很重要的研究内容。近年来基于机器学习和深度学习的大数据分析算法在很多领域都取得了重大突破,其和拉曼数据(光谱和图像)的结合也取得了一些进展。对拉曼数据的处理分析,一方面可以识别细胞中生物分子的复杂模式,譬如基于拉曼显微光谱和生物分子成分算法相结合的拉曼组学技术可以对活细胞内的单个细胞器进行生物分子分析,对其在亚微米空间进行定性和定量分析,有助于揭示不同正常生理和病理状态下细胞代谢的特征<sup>[150-151]</sup>;另一方面,拉曼组学还可以与其他组学技术配合使用,不同组学技术的融合有可能提供以前无法获得的多维信息,进而发现更多疾病相关的新型生物标志物,助力精准医学的发展,大步推进生物学和医学的研究<sup>[152]</sup>。

综上所述,非相干拉曼显微技术(自发拉曼和 SERS)虽已被广泛应用在生物医学研究领域,但这两种技术还有较大发展和改进的空间,如何获得更快、更深、更精准、更复用、更多维、特异性更强的拉曼显微图像或显微光谱已经成为其未来发展的方向,以上挑战的突破将极大地推进拉曼显微技术在生物医学上的应用和临床转化。



## 参 考 文 献

- [1] Raman C V, Krishnan K S. A new type of secondary radiation[J]. *Nature*, 1928, 121: 501-502.
- [2] Antonio K A, Schultz Z D. Advances in biomedical Raman microscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(1): 30-46.
- [3] 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: 379-398.
- [4] Zapata F, López-Fernández A, Ortega-Ojeda F, et al. A practical beginner's guide to Raman microscopy[J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2020, 56(6): 439-462.
- [5] Siraj N, Bwambok D K, Brady P N, et al. Raman spectroscopy and multivariate regression analysis in biomedical research, medical diagnosis, and clinical analysis[J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2021, 56(8/9/10): 615-672.
- [6] 刘凤翔, 张礼豪, 黄霞. 拉曼光谱技术在肿瘤诊断中的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617016.  
Liu F X, Zhang L H, Huang X. Application of Raman spectroscopy in cancer diagnosis[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617016.
- [7] 曾琦, 刘瑞, 王楠, 等. 拉曼光谱技术在医学检验领域中的研究进展(特邀)[J]. *光子学报*, 2021, 50(10): 1017002.  
Zeng Q, Liu R, Wang N, et al. Progress of Raman spectroscopy in medical laboratory science (Invited) [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2021, 50(10): 1017002.
- [8] 田晖艳, 刘羽, 黄姣祺, 等. 表面增强拉曼散射技术在核酸检测中的研究进展及应用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2020, 40(10): 3021-3028.  
Tian H Y, Liu Y, Huang J Q, et al. Research progress and application of surface-enhanced Raman scattering technique in nucleic acid detection[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2020, 40(10): 3021-3028.
- [9] Wang W T, Zhang H, Yuan Y, et al. Research progress of Raman spectroscopy in drug analysis[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19(7): 2921-2928.
- [10] Abramczyk H, Brozek-Pluska B. Raman imaging in biochemical and biomedical applications. Diagnosis and treatment of breast cancer[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(8): 5766-5781.
- [11] Butler H J, Ashton L, Bird B, et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11: 664-687.
- [12] Abu Bakar N, Yusoff N N, Nor Azmi F S, et al. A review of metal nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering substrates for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) detection[J]. *Aggregate*, 2023, 4(5): e339.
- [13] Zong C, Xu M X, Xu L J, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(10): 4946-4980.
- [14] Ding S Y, Yi J, Li J F, et al. Nanostructure-based plasmon-enhanced Raman spectroscopy for surface analysis of materials[J]. *Nature Reviews Materials*, 2016, 1: 16021.
- [15] Furtak T E, Roy D. The short-range mechanism of surface enhanced Raman scattering[J]. *Surface Science*, 1985, 158(1): 126-146.
- [16] Jensen L, Aikens C M, Schatz G C. Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering [J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(5): 1061-1073.
- [17] Morton S M, Jensen L. Understanding the molecule-surface chemical coupling in SERS[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(11): 4090-4098.
- [18] Han X X, Ji W, Zhao B, et al. Semiconductor-enhanced Raman scattering: active nanomaterials and applications [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(15): 4847-4861.
- [19] Han X X, Rodriguez R S, Haynes C L, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2022, 1: 87.
- [20] Chang J F, Young T F, Yang Y L, et al. Silicide formation of Au thin films on (100) Si during annealing [J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2004, 83(2/3): 199-203.
- [21] de Los Santos V L, Lee D, Seo J, et al. Crystallization and surface morphology of Au/SiO<sub>2</sub> thin films following furnace and flame annealing[J]. *Surface Science*, 2009, 603(19): 2978-2985.
- [22] 刘泽文. 大有可为的纳米印刻技术[J]. *电子世界*, 2005(6): 4-6.  
Liu Z W. Promising nanoimprinting technology[J]. *Electronics World*, 2005(6): 4-6.
- [23] Wang A X, Kong X M. Review of recent progress of plasmonic materials and nano-structures for surface-enhanced Raman scattering[J]. *Materials*, 2015, 8(6): 3024-3052.
- [24] Moram S S B, Byram C, Soma V R. Gold-nanoparticle- and nanostar-loaded paper-based SERS substrates for sensing nanogram-level Picric acid with a portable Raman spectrometer[J]. *Bulletin of Materials Science*, 2020, 43(1): 53.
- [25] Jana N R, Gearheart L, Murphy C J. Seeding growth for size control of 5–40 nm diameter gold nanoparticles[J]. *Langmuir*, 2001, 17(22): 6782-6786.
- [26] Ye X C, Zheng C, Chen J, et al. Using binary surfactant mixtures to simultaneously improve the dimensional tunability and monodispersity in the seeded growth of gold nanorods[J]. *Nano Letters*, 2013, 13(2): 765-771.
- [27] Langille M R, Personick M L, Zhang J, et al. Defining rules for the shape evolution of gold nanoparticles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(35): 14542-14554.
- [28] Niu W X, Chua Y A A, Zhang W Q, et al. Highly symmetric gold nanostars: crystallographic control and surface-enhanced Raman scattering property[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(33): 10460-10463.
- [29] Skrabalak S E, Chen J Y, Sun Y G, et al. Gold nanocages: synthesis, properties, and applications[J].

- Accounts of Chemical Research, 2008, 41(12): 1587-1595.
- [30] Fan F R, Liu D Y, Wu Y F, et al. Epitaxial growth of heterogeneous metal nanocrystals: from gold nano-octahedra to palladium and silver nanocubes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(22): 6949-6951.
- [31] Prats-Montalbán J M, de Juan A, Ferrer A. Multivariate image analysis: a review with applications[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2011, 107(1): 1-23.
- [32] Penny K I, Jolliffe I T. A comparison of multivariate outlier detection methods for clinical laboratory safety data[J]. Journal of the Royal Statistical Society: Series D (the Statistician), 2001, 50(3): 295-307.
- [33] Ehrentreich F, Sümmchen L. Spike removal and denoising of Raman spectra by wavelet transform methods [J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(17): 4364-4373.
- [34] Zhang L, Henson M J. A practical algorithm to remove cosmic spikes in Raman imaging data for pharmaceutical applications[J]. Applied Spectroscopy, 2007, 61(9): 1015-1020.
- [35] Cannistraci C V, Montevecchi F M, Alessio M. Median-modified Wiener filter provides efficient denoising, preserving spot edge and morphology in 2-DE image processing[J]. Proteomics, 2009, 9(21): 4908-4919.
- [36] Behrend C J, Tarnowski C P, Morris M D. Identification of outliers in hyperspectral Raman image data by nearest neighbor comparison[J]. Applied Spectroscopy, 2002, 56(11): 1458-1461.
- [37] Du P, Kibbe W A, Lin S M. Improved peak detection in mass spectrum by incorporating continuous wavelet transform-based pattern matching[J]. Bioinformatics, 2006, 22(17): 2059-2065.
- [38] Tseng C H, Ford J F, Mann C K, et al. Wavelength calibration of a multichannel spectrometer[J]. Applied Spectroscopy, 1993, 47(11): 1808-1813.
- [39] Bocklitz T W, Guo S X, Ryabchykov O, et al. Raman based molecular imaging and analytics: a magic bullet for biomedical applications!? [J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(1): 133-151.
- [40] Brennan J F III, Wang Y, Dasari R R, et al. Near-infrared Raman spectrometer systems for human tissue studies[J]. Applied Spectroscopy, 1997, 51(2): 201-208.
- [41] Pelletier M J. Quantitative analysis using Raman spectrometry[J]. Applied Spectroscopy, 2003, 57(1): 20A-42A.
- [42] Dyrby M. Towards on-line monitoring of the composition of commercial carrageenan powders[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 57(3): 337-348.
- [43] Sohn M, Himmelsbach D S, Barton F E II. A comparative study of Fourier transform Raman and NIR spectroscopic methods for assessment of protein and apparent amylose in rice[J]. Cereal Chemistry, 2004, 81(4): 429-433.
- [44] Knorr F, Smith Z J, Wachsmann-Hogiu S. Development of a time-gated system for Raman spectroscopy of biological samples[J]. Optics Express, 2010, 18(19): 20049-20058.
- [45] Praveen B B, Ashok P C, Mazilu M, et al. Fluorescence suppression using wavelength modulated Raman spectroscopy in fiber-probe-based tissue analysis[J]. Journal of Biomedical Optics, 2012, 17(7): 0770061.
- [46] Guo S X, Chernavskaia O, Popp J, et al. Spectral reconstruction for shifted-excitation Raman difference spectroscopy (SERDS)[J]. Talanta, 2018, 186: 372-380.
- [47] Savitzky A, Golay M J E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures[J]. Analytical Chemistry, 1964, 36: 1627-1639.
- [48] Guo S X, Popp J, Bocklitz T. Chemometric analysis in Raman spectroscopy from experimental design to machine learning-based modeling[J]. Nature Protocols, 2021, 16(12): 5426-5459.
- [49] Trevisan J, Angelov P P, Carmichael P L, et al. Extracting biological information with computational analysis of Fourier-transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: current practices to future perspectives[J]. The Analyst, 2012, 137(14): 3202-3215.
- [50] Chen G Y, Qian S N. Denoising of hyperspectral imagery using principal component analysis and wavelet shrinkage[J]. IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing, 2011, 49(3): 973-980.
- [51] Wolthuis R, Tjiang G C H, Puppels G J, et al. Estimating the influence of experimental parameters on the prediction error of PLS calibration models based on Raman spectra[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2006, 37(1/2/3): 447-466.
- [52] Kohavi R. A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection[C]//Proceedings of the 14th International Joint Conference on Artificial Intelligence, August 20-25, 1995, Montreal, Quebec, Canada. San Francisco: Morgan Kaufmann Publishers Inc., 1995: 1137-1143.
- [53] Cawley G C, Talbot N L C. On over-fitting in model selection and subsequent selection bias in performance evaluation[J]. Journal of Machine Learning Research, 2010, 11: 2079-2107.
- [54] Guo S X, Bocklitz T, Neugebauer U, et al. Common mistakes in cross-validating classification models[J]. Analytical Methods, 2017, 9(30): 4410-4417.
- [55] Li S X, Li L F, Zeng Q Y, et al. Characterization and noninvasive diagnosis of bladder cancer with serum surface enhanced Raman spectroscopy and genetic algorithms[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9582.
- [56] Zheng X X, Lü G D, Zhang Y, et al. Rapid and non-invasive screening of high renin hypertension using Raman spectroscopy and different classification algorithms [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 215: 244-248.
- [57] Otange B, Birech Z, Rop R, et al. Estimation of HIV-1 viral load in plasma of HIV-1-infected people based on the associated Raman spectroscopic peaks[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2019, 50(5): 620-628.
- [58] Cortes C, Vapnik V. Support-vector networks[J]. Machine Learning, 1995, 20(3): 273-297.



- [59] Dingari N C, Barman I, Saha A, et al. Development and comparative assessment of Raman spectroscopic classification algorithms for lesion discrimination in stereotactic breast biopsies with microcalcifications[J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, 6(4): 371-381.
- [60] Ghosh K, Stuke A, Todorović M, et al. Deep learning spectroscopy: neural networks for molecular excitation spectra[J]. *Advanced Science*, 2019, 6(9): 1801367.
- [61] Yang J, Xu J F, Zhang X L, et al. Deep learning for vibrational spectral analysis: recent progress and a practical guide[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1081: 6-17.
- [62] Vaswani A, Shazeer N, Parmar N, et al. Attention is all you need[EB/OL]. (2017-06-12)[2023-11-12]. <https://arxiv.org/abs/1706.03762v3>.
- [63] Liu W J, Wang H B, Du J J, et al. Raman microspectroscopy of nucleus and cytoplasm for human colon cancer diagnosis[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 97: 70-74.
- [64] Zhang Z, Wang J, Shanmugasundaram K B, et al. Tracking drug-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by a microfluidic surface-enhanced Raman spectroscopy immunoassay[J]. *Small*, 2020, 16(13): 1905614.
- [65] Volkov V V, McMaster J, Aizenberg J, et al. Mapping blood biochemistry by Raman spectroscopy at the cellular level[J]. *Chemical Science*, 2022, 13(1): 133-140.
- [66] Pieczara A, Borek-Doros A, Buda S, et al. Modified glucose as a sensor to track the metabolism of individual living endothelial cells - Observation of the  $1602\text{cm}^{-1}$  band called "Raman spectroscopic signature of life" [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 230: 115234.
- [67] Jiang L Y, Ren M X, Niu G, et al. Label-free, rapid and highly accurate identification and categorization of leukemia cells via Raman spectroscopy[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 395: 134497.
- [68] Roman M, Wrobel T P, Panek A, et al. Lipid droplets in prostate cancer cells and effect of irradiation studied by Raman microspectroscopy[J]. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(9): 158753.
- [69] Wu H H, Ho J H, Lee O K. Detection of hepatic maturation by Raman spectroscopy in mesenchymal stromal cells undergoing hepatic differentiation[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2016, 7: 6.
- [70] Geng J N, Zhang W, Chen C, et al. Tracking the differentiation status of human neural stem cells through label-free Raman spectroscopy and machine learning-based analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(30): 10453-10461.
- [71] Wang J F, Qi G H, Qu X Z, et al. Molecular profiling of dental pulp stem cells during cell differentiation by surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(5): 3735-3741.
- [72] Gravely M, Roxbury D. Multispectral fingerprinting resolves dynamics of nanomaterial trafficking in primary endothelial cells[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(7): 12388-12404.
- [73] Lenzi E, Henriksen-Lacey M, Molina B, et al. Combination of live cell surface-enhanced Raman scattering imaging with chemometrics to study intracellular nanoparticle dynamics[J]. *ACS Sensors*, 2022, 7(6): 1747-1756.
- [74] Wen Y, Truong V X, Li M. Real-time intraoperative surface-enhanced Raman spectroscopy-guided thermosurgical eradication of residual microtumors in orthotopic breast cancer[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(7): 3066-3074.
- [75] Noonan J, Asiala S M, Grassia G, et al. In vivo multiplex molecular imaging of vascular inflammation using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Theranostics*, 2018, 8(22): 6195-6209.
- [76] Haka A S, Shafer-Peltier K E, Fitzmaurice M, et al. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(35): 12371-12376.
- [77] Shang L W, Tang J L, Wu J J, et al. Polarized micro-Raman spectroscopy and 2D convolutional neural network applied to structural analysis and discrimination of breast cancer[J]. *Biosensors*, 2022, 13(1): 65.
- [78] Vanna R, Morasso C, Marcinnò B, et al. Raman spectroscopy reveals that biochemical composition of breast microcalcifications correlates with histopathologic features[J]. *Cancer Research*, 2020, 80(8): 1762-1772.
- [79] Huang Z W, 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.
- [80] Zhang K, Hao C Y, Huo Y Y, et al. Label-free diagnosis of lung cancer with tissue-slice surface-enhanced Raman spectroscopy and statistical analysis[J]. *Lasers in Medical Science*, 2019, 34(9): 1849-1855.
- [81] Leblond F, Dallaire F, Tran T, et al. Subsecond lung cancer detection within a heterogeneous background of normal and benign tissue using single-point Raman spectroscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2023, 28(9): 090501.
- [82] Crow P, Stone N, Kendall C A, et al. The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro[J]. *British Journal of Cancer*, 2003, 89(1): 106-108.
- [83] Theophilou G, Lima K M G, Briggs M, et al. A biospectroscopic analysis of human prostate tissue obtained from different time periods points to a trans-generational alteration in spectral phenotype[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13465.
- [84] Aubertin K, Trinh V, Jermyn M, et al. Raman spectroscopy for prostate cancer detection and characterization[J]. *Biophysical Journal*, 2017, 112(3): 584a.
- [85] Doherty T, McKeever S, Al-Attar N, et al. Feature fusion of Raman chemical imaging and digital histopathology using machine learning for prostate cancer detection[J]. *Analyst*, 2021, 146(13): 4195-4211.

- [86] O'Brien C M, Vargis E, Rudin A, et al. In vivo Raman spectroscopy for biochemical monitoring of the human cervix throughout pregnancy[J]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2018, 218(5): 528.e1-528.e18.
- [87] Gao X H, Yue Q, Liu Z N, et al. Guiding brain-tumor surgery via blood-brain-barrier-permeable gold nanoprobes with acid-triggered MRI/SERRS signals[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(21): 1603917.
- [88] Qiu Y Y, Lin M, Chen G X, et al. Photodegradable CuS SERS probes for intraoperative residual tumor detection, ablation, and self-clearance[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(26): 23436-23444.
- [89] Shin H, Choi B H, Shim O, et al. Single test-based diagnosis of multiple cancer types using Exosome-SERS-AI for early stage cancers[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 1644.
- [90] Feng S Y, Huang S H, Lin D, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of saliva proteins for the noninvasive differentiation of benign and malignant breast tumors[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10: 537-547.
- [91] Rohleder D, Kiefer W, Petrich W. Quantitative analysis of serum and serum ultrafiltrate by means of Raman spectroscopy[J]. *The Analyst*, 2004, 129(10): 906-911.
- [92] Qi D H, Berger A J. Chemical concentration measurement in blood serum and urine samples using liquid-core optical fiber Raman spectroscopy[J]. *Applied Optics*, 2007, 46(10): 1726-1734.
- [93] Barman I, Dingari N C, Kang J W, et al. Raman spectroscopy-based sensitive and specific detection of glycosylated hemoglobin[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(5): 2474-2482.
- [94] Dingari N C, Horowitz G L, Kang J W, et al. Raman spectroscopy provides a powerful diagnostic tool for accurate determination of albumin glycation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32406.
- [95] Nechaeva N L, Boginskaya I A, Ivanov A V, et al. Multiscale flaked silver SERS-substrate for glycosylated human albumin biosensing[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1100: 250-257.
- [96] Paria D, Convertino A, Mussi V, et al. Silver-coated disordered silicon nanowires provide highly sensitive label-free glycosylated albumin detection through molecular trapping and plasmonic hotspot formation[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10(3): e2001110.
- [97] Slipchenko E A, Boginskaya I A, Safiullin R R, et al. SERS sensor for human glycosylated albumin direct assay based on machine learning methods[J]. *Chemosensors*, 2022, 10(12): 520.
- [98] Ye M L, Chen Y, Wang Y T, et al. Subtype discrimination of acute myeloid leukemia based on plasma SERS technique[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 271: 120865.
- [99] Shin H, Oh S, Hong S, et al. Early-stage lung cancer diagnosis by deep learning-based spectroscopic analysis of circulating exosomes[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(5): 5435-5444.
- [100] Lin D, Wang Y Y, Wang T Y, et al. Metabolite profiling of human blood by surface-enhanced Raman spectroscopy for surgery assessment and tumor screening in breast cancer[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(7): 1611-1618.
- [101] Cui X Y, Liu T, Xu X S, et al. Label-free detection of multiple genitourinary cancers from urine by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 240: 118543.
- [102] Lin J Y, Feng S Y, Zhang X Z. Combining urine surface-enhanced Raman spectroscopy with PCA-SVM algorithm for improving the identification of colorectal cancer at different stages[J]. *Optoelectronics Letters*, 2023, 19(2): 101-104.
- [103] Kong X D, Liang H Y, An W, et al. Rapid identification of early renal damage in asymptomatic hyperuricemia patients based on urine Raman spectroscopy and bioinformatics analysis[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2023, 11: 1045697.
- [104] Huang Z L, Feng S J, Guan Q N, et al. Correlation of surface-enhanced Raman spectroscopic fingerprints of kidney transplant recipient urine with kidney function parameters[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 2463.
- [105] Yang H N, Zhao C, Li R, et al. Noninvasive and prospective diagnosis of coronary heart disease with urine using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *The Analyst*, 2018, 143(10): 2235-2242.
- [106] Roman M, Kamińska A, Drożdż A, et al. Raman spectral signatures of urinary extracellular vesicles from diabetic patients and hyperglycemic endothelial cells as potential biomarkers in diabetes[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2019, 17: 137-149.
- [107] Robertson J L, Senger R S, Talty J, et al. Alterations in the molecular composition of COVID-19 patient urine, detected using Raman spectroscopic/computational analysis[J]. *PLoS One*, 2022, 17(7): e0270914.
- [108] 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.
- [109] Connolly J M, Davies K, Kazakeviciute A, et al. Non-invasive and label-free detection of oral squamous cell carcinoma using saliva surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2016, 12(6): 1593-1601.
- [110] Zamora-Mendoza B N, Espinosa-Tanguma R, Ramírez-Eliás M G, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a non invasive alternative procedure for early detection in childhood asthma biomarkers in saliva[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2019, 27: 85-91.
- [111] Buchan E, Majumder S, Nardone O, et al. P263 Raman



- spectroscopy analysis of saliva combined with an artificial neural network algorithm could discriminate between Ulcerative Colitis and Crohn's disease[J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2023, 17(Supplement\_1): i411-i412.
- [112] Ho C S, Jean N, Hogan C A, et al. Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4927.
- [113] Yang Y J, Xu B B, Murray J, et al. Rapid and quantitative detection of respiratory viruses using surface-enhanced Raman spectroscopy and machine learning[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 217: 114721.
- [114] Wang L, Zhang X D, Tang J W, et al. Machine learning analysis of SERS fingerprinting for the rapid determination of Mycobacterium tuberculosis infection and drug resistance[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2022, 20: 5364-5377.
- [115] Das S, Saxena K, Tinguely J C, et al. SERS nanowire chip and machine learning-enabled classification of wild-type and antibiotic-resistant bacteria at species and strain levels[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(20): 24047-24058.
- [116] Thomsen B L, Christensen J B, Rodenko O, et al. Accurate and fast identification of minimally prepared bacteria phenotypes using Raman spectroscopy assisted by machine learning[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 16436.
- [117] Tang J W, Li J Q, Yin X C, et al. Rapid discrimination of clinically important pathogens through machine learning analysis of surface enhanced Raman spectra[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 843417.
- [118] Yi X F, Song Y Z, Xu X G, et al. Development of a fast raman-assisted antibiotic susceptibility test (FRAST) for the antibiotic resistance analysis of clinical urine and blood samples[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(12): 5098-5106.
- [119] Yang K, Li H Z, Zhu X, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing of pathogenic bacteria using heavy-water-labeled single-cell Raman spectroscopy in clinical samples[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(9): 6296-6303.
- [120] Tong D N, Chen C, Zhang J J, et al. Application of Raman spectroscopy in the detection of hepatitis B virus infection[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2019, 28: 248-252.
- [121] Saleem M, Ali S, Khan M B, et al. Optical diagnosis of hepatitis B virus infection in blood plasma using Raman spectroscopy and chemometric techniques[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2020, 51(7): 1067-1077.
- [122] Garsuault D, El Messaoudi S, Prabakaran M, et al. Detection of several respiratory viruses with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy coupled with Artificial Intelligence[J]. *Clinical Spectroscopy*, 2023, 5: 100025.
- [123] Rumaling M I, Chee F P, Bade A, et al. Biofingerprint detection of corona virus using Raman spectroscopy: a novel approach[J]. *SN Applied Sciences*, 2023, 5(7): 197.
- [124] Akdeniz M, Al-Shaebi Z, Altunbek M, et al. Characterization and discrimination of spike protein in SARS-CoV-2 virus-like particles via surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Biotechnology Journal*, 2024, 19(1): 2300191.
- [125] Samodelova M V, Kapitanova O O, Meshcheryakova N F, et al. Model of the SARS-CoV-2 virus for development of a DNA-modified, surface-enhanced Raman spectroscopy sensor with a novel hybrid plasmonic platform in sandwich mode[J]. *Biosensors*, 2022, 12(9): 768.
- [126] Müller W, Kielhorn M, Schmitt M, et al. Light sheet Raman micro-spectroscopy[J]. *Optica*, 2016, 3(4): 452-457.
- [127] Dunn L, Luo H K, Subedi N R, et al. Video-rate Raman-based metabolic imaging by Airy light-sheet illumination and photon-sparse detection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(9): 2210037120.
- [128] Yang W, Knorr F, Latka I, et al. Real-time molecular imaging of near-surface tissue using Raman spectroscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2022, 11: 90.
- [129] dos Santos D P, Temperini M L A, Brolo A G. Intensity fluctuations in single-molecule surface-enhanced Raman scattering[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(2): 456-464.
- [130] Willets K A. Super-resolution imaging of SERS hot spots [J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(11): 3854-3864.
- [131] Lindquist N C, de Albuquerque C D L, Sobral-Filho R G, et al. High-speed imaging of surface-enhanced Raman scattering fluctuations from individual nanoparticles[J]. *Nature Nanotechnology*, 2019, 14(10): 981-987.
- [132] Stranahan S M, Willets K A. Super-resolution optical imaging of single-molecule SERS hot spots[J]. *Nano Letters*, 2010, 10(9): 3777-3784.
- [133] de Albuquerque C D L, Hokanson K M, Thorud S R, et al. Dynamic imaging of multiple SERS hotspots on single nanoparticles[J]. *ACS Photonics*, 2020, 7(2): 434-443.
- [134] Ayas S, Cinar G, Ozkan A D, et al. Label-free nanometer-resolution imaging of biological architectures through surface enhanced Raman scattering[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2624.
- [135] Olson A P, Spies K B, Browning A C, et al. Chemically imaging bacteria with super-resolution SERS on ultra-thin silver substrates[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 9135.
- [136] de Albuquerque C D L, Schultz Z D. Super-resolution surface-enhanced Raman scattering imaging of single particles in cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(13): 9389-9398.
- [137] Watanabe K, Palonpon A F, Smith N I, et al. Structured line illumination Raman microscopy[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 10095.
- [138] Chen H K, Wang S Q, Zhang Y Q, et al. Structured illumination for wide-field Raman imaging of cell membranes[J]. *Optics Communications*, 2017, 402: 221-225.
- [139] Chen H K, Wu X J, Zhang Y Q, et al. Wide-field in situ

- multiplexed Raman imaging with superresolution[J]. *Photonics Research*, 2018, 6(6): 530.
- [140] Bakthavatsalam S, Dodo K, Sodeoka M. A decade of alkyne-tag Raman imaging (ATRI): applications in biological systems[J]. *RSC Chemical Biology*, 2021, 2(5): 1415-1429.
- [141] Zhao Z L, Shen Y H, Hu F H, et al. Applications of vibrational tags in biological imaging by Raman microscopy[J]. *Analyst*, 2017, 142(21): 4018-4029.
- [142] Wei L, Chen Z X, Shi L X, et al. Super-multiplex vibrational imaging[J]. *Nature*, 2017, 544(7651): 465-470.
- [143] Hu F H, Zeng C, Long R, et al. Supermultiplexed optical imaging and barcoding with engineered polyynes [J]. *Nature Methods*, 2018, 15: 194-200.
- [144] Ma X Y, Wang H J, Wang Y, et al. Improving the resolution and the throughput of spectrometers by a digital projection slit[J]. *Optics Express*, 2017, 25(19): 23045-23050.
- [145] Qiu J, Qi X D, Li X T, et al. Development of a spatial heterodyne Raman spectrometer with echelle-mirror structure[J]. *Optics Express*, 2018, 26(9): 11994-12006.
- [146] Egan M J, Acosta-Maeda T E, Angel S M, et al. One-mirror, one-grating spatial heterodyne spectrometer for remote-sensing Raman spectroscopy[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2020, 51(9): 1794-1801.
- [147] Kim U J, Lee S, Kim H, et al. Drug classification with a spectral barcode obtained with a smartphone Raman spectrometer[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 5262.
- [148] Cai F H, Tang R N, Wang S W, et al. A compact line-detection spectrometer with a Powell lens[J]. *Optik*, 2018, 155: 267-272.
- [149] Cho Y C, Ahn S I. Fabricating a Raman spectrometer using an optical pickup unit and pulsed power[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 11692.
- [150] Sigle M, Rohlfing A K, Kenny M, et al. Translating genomic tools to Raman spectroscopy analysis enables high-dimensional tissue characterization on molecular resolution[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 5799.
- [151] Pliss A, Kuzmin A N, Lita A, et al. A single-organelle optical omics platform for cell science and biomarker discovery[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(23): 8281-8290.
- [152] Cutshaw G, Uthaman S, Hassan N, et al. The emerging role of Raman spectroscopy as an omics approach for metabolic profiling and biomarker detection toward precision medicine[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(13): 8297-8346.