

引用格式: ZENG Qi, LIU Rui, WANG Nan, et al. Research Progress of Raman Spectroscopy in Medical Laboratory Science (Invited)[J]. Acta Photonica Sinica, 2021, 50(10):1017002

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

拉曼光谱技术在医学检验领域中的研究进展 (特邀)

曾琦,刘瑞,王楠,曾婷婷,陈雪利

(西安电子科技大学 生命科学技术学院, 西安 710071)

摘要:拉曼光谱技术以光子的非弹性散射为基础,具有实时、非侵入、快速等优点,作为一种分析工具被广泛应用于各个研究领域。在医学检验领域中,拉曼光谱不仅可以提供细胞和组织的化学成分信息,还能检测发生病变的细胞和组织在生化信息的组成和结构上的差异,在医学检验领域极具应用前景。概述了目前可能应用于医学检验的几种拉曼技术;阐述了拉曼光谱技术应用于生物液体样本和其他样本的一些关键问题。针对生物液体样本,重点评估了血液、尿液和脑脊液等流体样本的适用情况;总结了用于拉曼检测的医学样本的收集和保存方法。同时,介绍了拉曼光谱数据的处理与分析方法,通过光谱的预处理,结合统计学方法、机器学习方法进行特征提取与分类识别,实现拉曼光谱和生化信息的映射。对拉曼光谱应用于医学检验的关键问题进行讨论,探讨了临床转化需要克服的问题及发展前景。

关键词:拉曼光谱;表面增强拉曼散射;疾病诊断;生物液体;机器学习

中图分类号:O657.37

文献标识码:A

doi:10.3788/gzxb20215010.1017002

Research Progress of Raman Spectroscopy in Medical Laboratory Science (Invited)

ZENG Qi, LIU Rui, WANG Nan, ZENG Tingting, CHEN Xueli

(School of Life Science and Technology, Xidian University, Xi'an 710071, China)

Abstract: Raman Spectroscopy (RS), which is based on the inelastic scattering of photons, could be utilized as an analytical tool with the advantages of fast, real-time, and non-intrusive. Nowadays, RS is widely used in various research fields. This spectroscopic technique can provide the chemical composition information of cells and tissues, and detect the differences in the diseased cells and tissues. Thus, RS has a great application prospect in the field of medical laboratory science. This article summarizes variety RS techniques that might be used in the medical laboratory. Key problems in the application of RS on biological fluid samples are summed up. For biological fluid samples, the applicability of RS on blood samples, urine samples and cerebrospinal fluid samples are evaluated. The collection and preservation methods of samples for RS analysis are also summarized. Meanwhile, generalizes the processing and analysis methods of RS data. Through spectral preprocessing, statistical methods and machine learning, the relative features could be extracted and the classification recognition could be carried out. In that case, the mapping of RS could be realized and biochemical information could be collected. At last, the difficulties of RS in the application of medical laboratory and diagnosis are discussed. The problems and development prospects in clinical transformation are highlighted.

基金项目:国家自然科学基金(Nos.81871397),陕西省重点研发计划(No. 2021ZDLSF04-05),陕西省杰出青年科学基金(No.2020JC-27),中央高校基本科研业务费(Nos.QTZX2105,QTZX2185,XJS211202)

第一作者:曾琦(1985—),女,副教授,博士,主要研究方向为拉曼光谱技术在医学药学领域的应用。Email: qzeng@xidian.edu.cn

通讯作者:陈雪利(1984—),男,教授,博士,主要研究方向为多尺度定量光学分子成像与检测技术。Email: xlchen@xidian.edu.cn

收稿日期:2021-07-20; **录用日期:**2021-08-19

<http://www.photon.ac.cn>

Key words: Raman spectroscopy; Surface enhanced Raman scattering; Disease diagnosis; Biological fluid; Machine learning

OCIS Codes: 170.5660; 000.1430; 170.1610

0 引言

血液、尿液和脑脊液等生物液体样本是医学检验中最常见的检测标本。在病理情况下,免疫反应、机体代谢水平变化及脏器功能受损等情况的产生,使得一些能够反映病变水平的生物标志物随着机体循环,富集于生物液体样本之中;因此,液体样本的检验结果将客观地反映机体生理状况,从而辅助医生进行疾病的诊断。常见临床实例包括:尿液成分异常提示泌尿系统异常^[1];外周血和尿液中的葡萄糖异常提示糖尿病风险;脑脊液中的相关蛋白提示有患病毒性脑膜炎的可能性。此外,健康人群和潜在患病人群的血液、尿液、脑脊液等样本的生化信息也存在不同程度的差异^[2],这些差异信息可以辅助医生对疾病进行早期诊断。因此,生物液体标本在医学检测中具有重要意义。一般的临床医学检测方法是以疾病相关生物标志物为分析目标而建立的具有较高精密度、准确度和重复性的方法体系。尿液的常规临床检测方法包括:普通光学显微镜观察法、尿液自动化分析法等^[3-4];血液或血浆的检测方法包括凝集试验、琼脂扩散反应法、生物化学、化学发光、全自动血液细胞分析仪法等^[5-6];脑脊液的检测方法以脑脊液常规以及脑脊液生化检测为主,其中包括分子成分检查、细胞成分检查以及病原微生物检查。在通常的分析过程中,待测样品需要经过预处理,如离心、冻存^[7]及衍生化反应^[8]等。

与常规的化学分析技术相比,拉曼光谱技术具有无损、快速、环保、无需制备试样、化学试剂消耗量小、所需样品量少和可重复性高等优点^[9],适用于目标物质的快速检测;同时还具有免漂白、免闪烁、免自猝灭等优点^[10],能够分析具有荧光背景的生物样本。目前拉曼光谱已经开始应用于临床诊断领域,比如生物液体样本的检测、细胞组织的成像、癌症生物标志物的检测^[11]等。以拉曼散射的效应为基础,又衍生出包括:表面增强拉曼散射技术、相干拉曼散射技术、受激拉曼散射技术、空间位移拉曼技术等^[12]等多种拉曼散射技术。本文从常见生物液体样本检验中的应用,检测过程中样本常用的收集及预处理方法,和拉曼光谱数据的处理与分析方法等方面,对拉曼光谱技术在医学检验领域中的应用进行了较为系统的综述。

1 拉曼相关技术

1.1 传统拉曼散射原理

拉曼散射,最早是由印度科学家拉曼(Chandrasekhara Venkata Raman)于1928年发现的。受海水为何是蓝色这一问题的启发,拉曼就此展开了深入的研究,两年后因其在这一领域做出的突出贡献,拉曼被授予了诺贝尔奖^[13]。光照射到物质时会产生两种类型的散射,弹性散射与非弹性散射;光子与样品分子未发生能量交换,散射光频率不改变的过程为弹性散射又称为瑞利散射。而非弹性散射中散射光不同于入射光源频率,光子与分子之间发生非弹性碰撞,光子的能量和运动方向都会改变,这一过程称为拉曼散射^[14]。拉曼散射又分为两种类型:1)样品分子由基态跃迁到激发态,由于激发态不稳定分子释放能量回到振动态,这一过程中散射的分子能量比原基态能量高,称为斯托克斯散射^[15];2)样品分子从振动态跃迁到虚态能级,释放能量后回到基态,这一过程中散射回来的分子的能级比原基态能量低,称为反斯托克斯散射^[16],其电子能级如图1。在实际应用中,主要以检测斯托克斯散射为主。

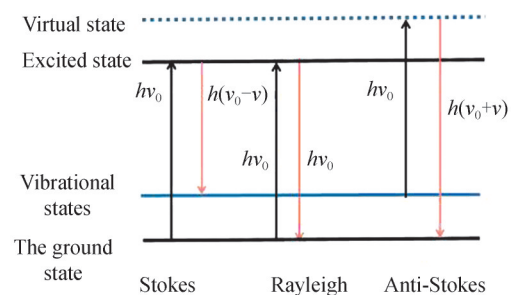


图1 拉曼散射电子能级图
Fig. 1 Raman scattering electron energy level diagram

传统的拉曼光谱仪由激发光源、样品检测外光路、探测器与控制器等部分组成。拉曼系统以及检测过程如图2,激发光通过二向色镜折射到样本上,散射光由二向色镜透射,通过透镜进入光谱仪,将数据导入电脑中进行处理。适合于医学样本分析的拉曼光谱系统,常使用的激发波长包括532 nm、633 nm、785 nm。

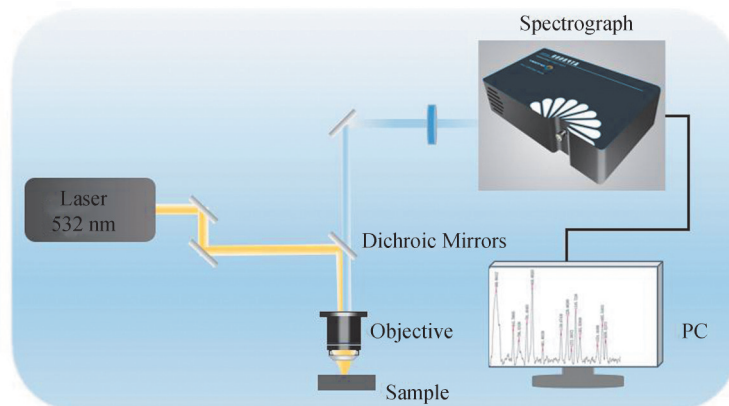


图2 典型的实验室拉曼光谱系统
Fig. 2 Typical laboratory Raman spectroscopy system

拉曼光谱法是一种振动光谱技术,光谱中的谱带能够提供有关生化成分的直接信息,即在化学分析中提供有机分子的结构指纹。该技术的主要优点是它对微小的结构变化高度敏感,微量样品即可进行检测^[17],并对样品基本无损伤,这些优点是该技术在生物流体和人体组织中进行生化分析的保障。MOVASAGHI Z^[18] 建立了一个分子指纹数据库,其中囊括了许多有价值的样本及其特征拉曼光谱信息,如, 614 cm^{-1} 是胆固醇酯的特征峰, $1\ 176\text{ cm}^{-1}$ 是酪氨酸中 C-H 弯曲振动产生的特征峰。拉曼散射被发现及研究后,在物理、化学、生物学和材料科学领域都有广泛的应用,可以用于检测物质的成分,包括有机物、聚合物、半导体、陶瓷和生物分子在内的各种材料的分析^[19],还能结合临床医学手段进行癌症边缘成像检测^[20]。

然而,实际应用时,由于拉曼散射的强度较弱,通常难以达到检验所要求的灵敏度。因此一系列灵敏度

表1 拉曼光谱相关技术的总结对比

Table 1 Summary and comparison of Raman related techniques

Raman related technology	The principle	Advantages & disadvantages	Application	Reference
The traditional Raman	The frequency of the scattered photon is different from that of the incident photon	The system is relatively simple; low sensitivity	Drug and food testing	[23-25]
Surface Enhanced Raman Scattering (SERS)	Use interactions between molecules and coarse metal nanoparticles to enhance Raman signals	Signal enhancement; SERS enhanced reagent is required, which may change the spectrum of endogenous molecules	Tumor edge detection	[26-27]
Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS)	The two beams of incident light illuminate the sample and interact to produce an anti-Stokes signal	Signal enhancement; the equipment is expensive and has a strong non-resonant background	It is sensitive to C-H bond and lipid detection	[28-29]
Stimulated Raman Spectroscopy (SRS)	Like CARS, nonlinear interaction between molecules and lasers	Signal enhancement, fast imaging; equipment expensive	Cell lipid and protein signals were studied by simulated HE staining	[29-31]
Resonant Raman Spectroscopy (RRS)	The excitation wavelength is matched with the molecular electron transition, so the vibration mode is enhanced	Signal enhancement, shorten detection time; lasers with continuously adjustable frequencies are required	Non-destructive detection of pigment molecules such as carotenoids	[14]
Spatially Offset Raman Spectroscopy (SORS)	The scattered light at different depths of the sample produces different shifts	Effectively inhibit fluorescence, provides in-depth organizational information; complex data processing	The application of urinary system, bone, breast and other diseases	[32-34]

更高的拉曼检测技术衍生而出,例如表面增强拉曼散射技术(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)。SERS通过增强试剂与待测物质结合,产生的拉曼信号的强度比原始拉曼信号强度要高出数量级,常见的SERS的增强试剂包括贵金属(金、银和铜),少量半导体以及非金属材料^[21-22]。SERS的出现提高了拉曼检测的灵敏度,实现了微量物质的识别,为拉曼光谱与临床医学的结合提供了良好的技术支撑。除SERS外,还总结了目前已经发展的拉曼光谱技术,如表1。

2 拉曼技术在医学样本检测的应用

2.1 尿液样本的检测

尿液95%的组成成分是水,其余成分是来自血液和泌尿系统的代谢物,包括肌酐、尿酸、尿素、核苷、葡萄糖和蛋白质等^[35]物质。这些物质的变化能反映出相关系统的问题,目前临床上尿液常规检测可以用于呼吸性碱中毒、糖尿病、肾炎和尿路感染等疾病的判定。相比血液而言,尿液样本因可无创性地多次采集,被认为是更加理想的诊断介质^[36]。此外,尿酸、肌酐、尿素和核苷等成分对金属表面具有较高的亲和力,因而可以借助SERS技术来评估肾脏功能^[37]。

MOREIRA L P等^[38]利用830 nm激发光检测久坐人群与有运动习惯人群的尿液样本,获取尿液代谢物的拉曼光谱图,对两种人群进行代谢评估,从而实现个性化营养调整。在另一项研究中,作者ZHU Qingxia^[39]开发了一种基于咖啡环效应的表面增强拉曼光谱检测方法,来检测服用氯氮平人群的尿液样本,结合薄层色谱法区分实际尿液样本中的氯氮平及其代谢物,并首次从尿液样本中检测到抗精神病药物中毒。相较于常规的内窥镜检查 and 病理活检,尿液的SERS检测辅助肿瘤诊断更加简单快捷且具有价格优势,最重要的是可以减轻患者的痛楚。LIN Xueliang等^[36]将亲和色谱法与表面增强拉曼技术相结合检测尿液中的修饰核苷,通过SERS光谱的差异性判别样品来自乳腺癌患者、胃癌患者或是健康志愿者;实验结果表明SERS光谱能够判别胃癌、乳腺癌和健康人群中的尿修饰核苷分子的变化,辅助医生从分子水平进行肿瘤的诊断。FENG Shijian等^[37]利用SERS光谱辨别患有肾脏疾病的大鼠,结合统计学方法定量检测生理浓度下尿液的生物化学成分,该研究开发出的分析方法具有快速、非侵入性和可重复性,并可以基于光纤探针进行测量分析。GU Xin等^[40]开发了一种以3-MPBA(3-mercaptophenylboronic acid)改性的金纳米颗粒(AuPN)探针为增强基底的SERS光谱检测方法,用于评估H₂O₂的水平,该方法能够达到70 nm的检测限。在这一实验的基础上,该检测方法可与葡萄糖氧化酶反应的结合,定量评估人造尿液和人造血清中的葡萄糖水平。

由于拉曼光谱检测对水溶液不敏感,因此尿液是非常好的拉曼检测样本,其优势如下:1)获取途径简单且为非破坏性采集;2)拉曼检测反映出来的多数为生化信息的信号,除了反映泌尿系统状态,还能间接反映胃部的健康状态,以提示患者是否面临胃癌风险^[41]。在目前的研究中,拉曼光谱技术在尿液样本中的检测应用,仅实现了对相关目标物质的检测限分析,而在定量或半定量检测方面仍具有一定的技术局限性。

2.2 血液样本的检测

血液的组成成分以及成分状态的改变对人体各种疾病,特别是心脑血管相关疾病和糖尿病的诊断,有着重要的指导意义。常见的血液生化检测方法以免疫学的方法为主,包括酶联免疫吸附法、荧光免疫分析法以及免疫层析法等^[42-43]。其中酶联免疫吸附法是检测病原体的通用方法,能够检测艾滋病毒^[44]、肝炎病毒^[45]等,但该方法在检测中易受多种成分干扰,应用范围小,且样本需要预处理难以实现液体样品的快速无损检测需求。

拉曼光谱在血液检测方面的应用已有40多年的历史,可对血液样本中的全血、血浆以及血清等进行研究^[46]。血清含有球蛋白、胆固醇、多肽、脂肪、生长因子和激素等成分,在临床检验中能提供多种有意义的临床病理信息,发挥重要的研究作用。SAHU A等^[47]对44名病情程度不等的哮喘患者以及15名正常人的血液成分进行拉曼检测,结果表明不同人群的拉曼光谱结果存在显著差异,主要表现为DNA特异性谱带增宽,实验结果还发现粘多糖特征峰随哮喘严重程度的增加而显著增强。PARASKEVAIDIM等^[48]分别利用拉曼光谱法以及表面增强拉曼技术,检测卵巢癌患者血浆中的癌症标志物CA-125,两项技术的灵敏度分别达到了93%和80%。在LI Nan^[49]的研究中,拉曼光谱技术在检测指尖甲襞位置获取的光谱数据与从血液样本中获取的光谱十分相似,且基于该位置数据构建的糖尿病患者分类的模型R²高达0.97。这种利用非侵

入性手段检测血糖的分析方法,可以大大减轻糖尿病患者的痛苦,被认为是非常有前景的拉曼光谱应用方向。图3为该研究中指尖采集区域及配套的拉曼系统图。

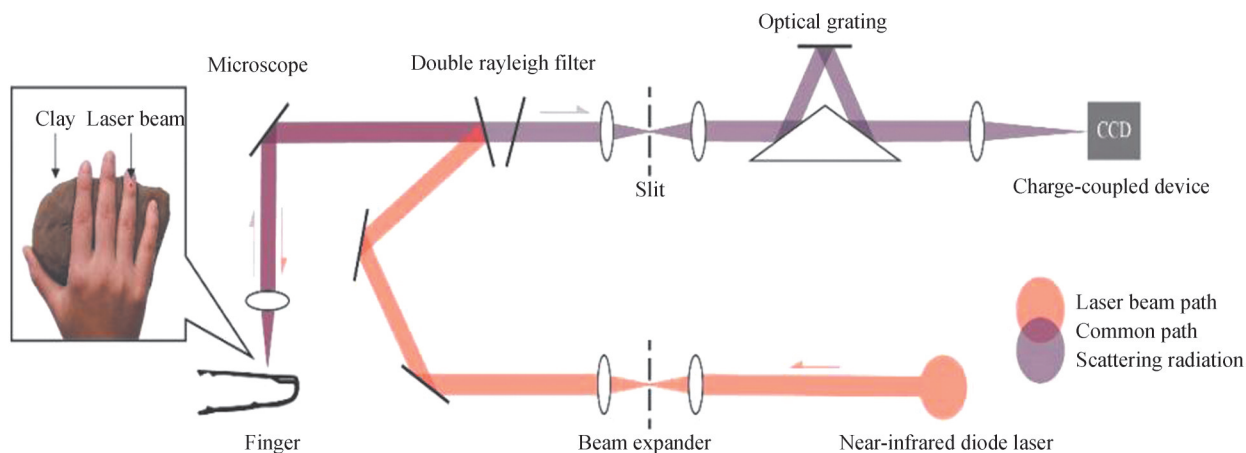


图3 手指甲襞采集区域及所使用的的拉曼系统图^[49]

Fig.3 Raman spectroscopic apparatus for noninvasive glucose measurement^[49]

综上,血液作为最常用的临床检验样本,不仅能够检测呼吸系统疾病和内分泌系统的疾病,还可以为临床大多数疾病的诊断、治疗、预后提供信息。拉曼散射技术,拓展了血液检测的定性分析方法,将激光聚集在皮肤上利用穿透和反射的信息分析血液中的物质,或对微血管血液进行无创性血糖监测,实现非侵入性地检测人体的血液成分。此外,上述基于拉曼光谱检测的研究思路,还可以实现血红蛋白水平的预测和糖化血红蛋白的测量。无创检测血液中的生化成分是拉曼技术针对血液样本检测的一个重要研究方向。

2.3 脑脊液样本的检测

脑脊髓液与人脑组织直接接触,记录其中发生疾病的致命病理过程,一直是寻找中枢神经系统疾病相关生物学标志物的重要样本来源。因此,脑脊液是早期诊断中枢神经系统疾病的最有希望、最具有生物意义的体液^[50]。脑脊液中的基础物质主要有糖、氯化物和蛋白质等;蛋白组主要成分为白蛋白、免疫球蛋白、半胱苷酸蛋白酶抑制剂C和载脂蛋白^[51]。目前阿尔茨海默病诊断以临床行为评估、神经影像检测和心理学检验为主,且仅在疾病发展的后期才能形成定性诊断。如若能够利用光学手段检测脑脊液,在疾病初期就能揭示组成成分的变化趋势,将使得阿尔兹海默症的早期诊断成为可能,为预防性治疗阿尔兹海默症提供机会。

在发病机制最早的阶段,拉曼光谱法也有可能检测到特异性的微小变化。目前该方面的研究多采用785 nm的激发光,其光谱范围控制在 $200\sim 1\ 800\text{ cm}^{-1}$ 以内。RYZHIKOVA E等^[50]通过分析阿尔兹海默症患者和健康人群的脑脊液拉曼光谱,发现在 $1\ 035\sim 1\ 050\text{ cm}^{-1}$ 处有显著性差异,依此推测,在 $1\ 045\text{ cm}^{-1}$ 的拉曼光谱峰被认为是阿尔兹海默症的特征峰,可能与tau蛋白引起的甘氨酸和脯氨酸增加有关。实验中还发现阿尔兹海默症患者的拉曼光谱中 $1\ 065\text{ cm}^{-1}$ 处的峰值强度降低,图4为该研究中所采集的拉曼光谱对比图,黑线与绿线分别为患者与健康人群,红色与紫色分别为经过遗传算法处理后选择的峰值。脑脊液除了可以检测出阿尔兹海默症的生化变化外,还能用于诊断结核性脑膜炎。常规检测脑膜炎需要经过细菌的抗酸染色,Lowenstein Jensen微生物培养或聚合酶链式反应等分子生物学检测分析来诊断,这与光学手段相比会导致结果的滞后性。MAURER M H^[52]使用了较为特殊的514.5 nm风冷氩离子激光器作为激发源,以反向散射的形式收集拉曼散射光,建立了诊断临床脑脊液样本中的结核性脑膜炎的方法,并以拉曼光谱中获得的硅酸盐特征峰作为诊断脑膜炎的替代标志物,从而实现了脑膜炎的快速诊断。

鉴于脑脊液采样在临床检验中的普及性、样本的稀有性和病理样本收集的难度,利用拉曼散射检测脑脊液样本是比较新的研究方向。相关技术、实验流程仍需进一步研究,检测到的拉曼信息也值得深入研究,这将有益于神经退行性疾病及其他恶性疾病的早期诊断。

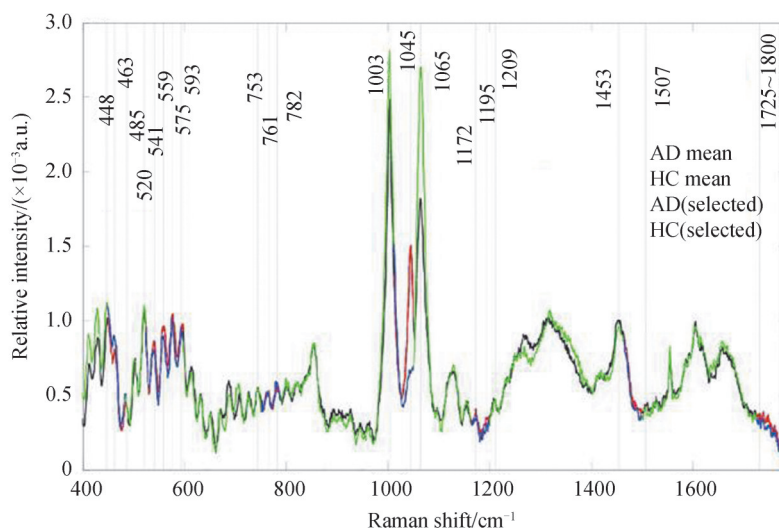


图4 阿尔兹海默症患者于健康人群的拉曼光谱图^[50]

Fig.4 Raman spectra of Alzheimer's disease patients and healthy people^[50]

2.4 唾液样本的检测

人的唾液中含有丰富的蛋白质和代谢物,成分复杂且具有多种生物学功能。由于容易采集且对患者无损伤性,唾液检测逐渐进入人们的视角,目前已经逐渐用于口腔疾病^[53]、心血管疾病^[54]以及其他疾病的筛查诊断。唾液样本有着更加方便的采集过程与低廉的成本,因此应用SERS技术分析唾液样本可应用于肿瘤筛查。QIAN Kun等^[55]利用SERS分析健康人群和肺癌人群的唾液,研究表明,在两种人群的拉曼光谱中12个唾液特征峰出现的明显的差异,证明SERS技术在利用唾液在肺癌诊断中有潜力。FALAMAS A等^[56]探索了利用基于金纳米颗粒的表面增强试剂来增强唾液的拉曼光谱,并确定 736 cm^{-1} 处的拉曼光谱峰为硫氰酸盐。

2.5 其他样本的检查

除了检测液体类的物质,拉曼光谱还能分析固体类物质的相关生化成分,但利用拉曼散射检测固体样品时,需考虑穿透深度与分辨率等问题。空间位移拉曼技术可以反应不同深度的散射信号,目前已被应用于骨形成不全、骨关节炎、类风湿性关节炎和糖皮质激素诱导的骨质疏松症等与骨相关的疾病的检测中^[57]。PEZZOTTI G等^[58]在一项研究中,去除小鼠卵巢从而诱导小鼠构建骨质疏松模型,再使用空间位移拉曼技术分别检测对左侧股骨远端进行检测,实验结果表明,骨质疏松小鼠的拉曼光谱在磷灰石矿物和胶原纤维的分子尺度上呈现结构性差异。该研究用拉曼光谱测定了皮质骨的化学成分,并识别骨矿物和骨基质的特征谱带,从而实现骨磷灰石导致的骨质疏松症的判别。关节滑液位于关节腔内,其中的蛋白及多糖等成分会随着骨关节炎的发展而变化。ZHU Yongkang等^[59]使用表面增强拉曼散射技术检测关节滑液,实验结果发现关节炎患者的蛋白谱带和透明质酸等多糖对应的拉曼峰强度明显增强。该研究实现了对关节滑液的微量检测分析,为早期关节炎识别和病变规律的探究以及关节滑液等组织液的微量检测开辟了新的路径。FENG Guanping等^[57]对小鼠骨骼的研究中,依据空间位移拉曼信号的偏移量与测量样品的深度有关,较小的偏移量测量样品表面部分,较大的偏移量测量深的部分这一原理进行实验设计。实验中模拟检测过程如图5,激光照射在模拟骨上,不同深度处的骨髓散射光的位移不同,再处理收集的相关拉曼光谱,研究结果表明SORS能够灵敏实现小鼠和家兔长骨中的皮质下骨组织检测。

近年来,拉曼光谱结合其他成像手段,配合化学计量学以及机器学习的数据处理方法,在区分恶性肿瘤和良性肿瘤方面也显示出极大的应用潜力。通过检测组织切片中的脂肪含量可以诊断癌症以及癌症分期^[60]。基于拉曼光谱能够对乳腺组织疾病的重要诊断指标如微钙化的化学成分进行分析和分型^[61]。STONE N等^[62]将近红外拉曼光谱应用于上皮癌和癌前病变的分类,甄别样品的灵敏度和特异度均达到90%以上。MIN Y K等^[63]报道了新鲜人肺组织的近红外 1064 nm 多通道拉曼光谱,证实了 1064 nm 是进行新鲜肺组织拉曼研究的最佳激发波长,可用于正常状态和癌变状态肺组织的甄别,除了胃癌和乳腺癌,SERS光谱还可以用于食道癌检测、鼻咽癌、宫颈癌、胃癌和结直肠癌的分析研究中^[64-70]。

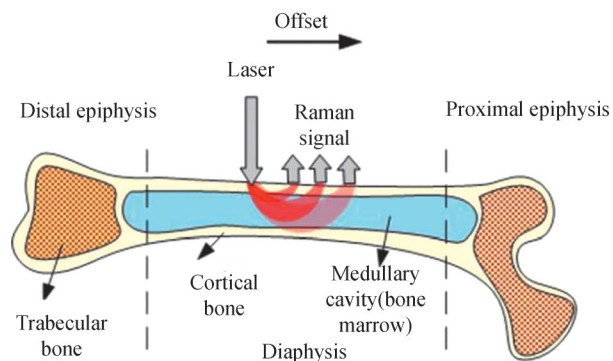


图5 空间位移拉曼技术检测宏观骨^[57]

Fig.5 Detection of macroscopic bone by spatial displacement Raman technique^[57]

2.6 小结

本节主要介绍了拉曼技术在医学液体样本中的应用。大部分关于液体样本检测的研究均基于传统拉曼技术与表面增强拉曼技术开展。在临床诊断中,尿液样本相关的生物标志物主要包括肌酐和尿素,可用于辅助呼吸碱中毒、糖尿病、胃癌等疾病的诊断。此外,针对于尿液成分的分析,目前拉曼技术已能达到临床标准检测限。血液样本中主要的生物标志物包括球蛋白、白蛋白与胆固醇等,基于拉曼技术的检测能够实现哮喘、卵巢癌等疾病的判别。脑脊液样本中主要生物标志物为 $A\beta$ 肽与 τ 蛋白,结合拉曼技术可用于诊断脑神经相关的疾病。唾液中的相关生物标志物常用SERS技术检测,可用于辅助判别肺癌等疾病。除液体样本外,本节还介绍了拉曼技术在其他类样本如脂肪类、骨类等固体样本中的应用,均显示出拉曼在医学领域中的应用前景。

3 医学检验样本的预处理

医学检验样本特别是液体样本在检测前仍需进行简单的预处理,如离心操作获取所需上清液或者是沉淀物,冷冻保存和运输以保证其完整度和防止变异。尿液样本的处理相对比较简单,受试者依据诊断要求不禁食或过夜禁食12 h,在获得尿液样本后一般采取离心的手段以去除杂质^[36]。也有实验人员^[37]将尿液样本以3 000 r/min离心10 min,接着将获取的纯净尿液样品在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的情况下冻存以避免活性物质变质^[36-37]。血液样本的预处理大致与尿液相似:受试者禁食12 h后,收集外周血,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下高速离心(3 000 r/min)10 min,收集上清液即血清,并在进一步制备之前将该血清样品在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存^[71]。唾液类样本收集前受试者要使

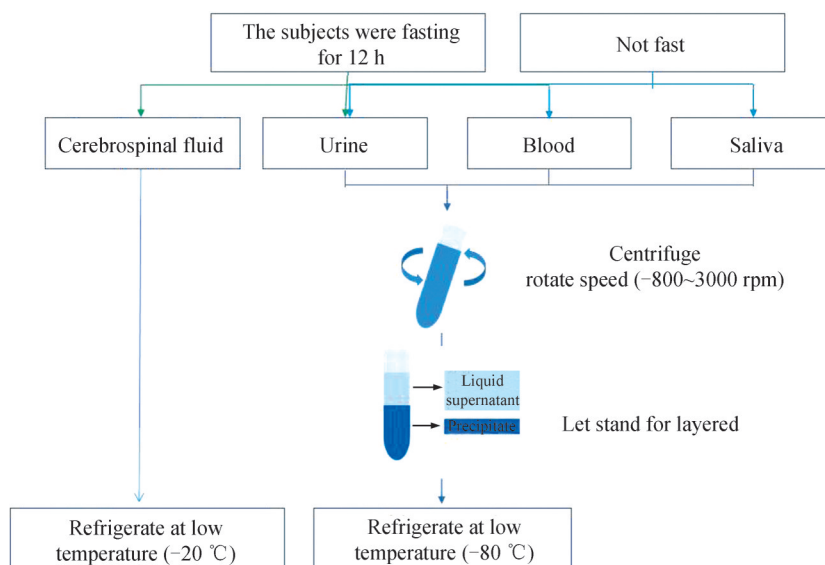


图6 液体类样本处理方法

Fig.6 Treatment methods of liquid samples

用漱口水排除口腔残留物的干扰,使用 Salimetrics 试剂盒收集保存在 -80°C 下,直到分析当天解冻,在 $9\,000\text{ g}$ 和 10°C 下离心 20 min ,以去除上皮细胞和其他碎屑得到纯净的唾液^[56],液体类样本处理过程如图 6。根据天然脑脊液易变性的特点,获取的脑脊液必须在 5 h 内进行处理,在 -20°C 的条件下冷冻储存,用于检测时,未使用的样品需在 10 min 内冷冻。

4 医学检验样本采集后的数据处理

4.1 光谱数据的预处理

获取到的原始拉曼光谱,一般存在荧光和散射干扰等情况,需要对光谱进行荧光背景去除,以及噪声抑制和基线校正等常规预处理,为后续定量分析模型提供高质量的数据。拉曼光谱数据预处理可以分为以下两个部分:

1) 去噪去基线。主要是去除环境噪声、荧光背景等的干扰。常用移除噪声的方法为 SAVITZKY-GOLAY 算法、滑动窗口平均法和小波阈值滤波法。平滑完的光谱数据利用多项式拟合的算法去除荧光背景,一般常用五项多项式算法和最小二乘算法去除荧光背景获得纯净拉曼光谱^[37]。图 7(a)为搭建的拉曼系统采集的对乙酰氨基苯酚的拉曼光谱图,图 7(b)中利用 S-G 算法去除噪声,接着使用非对称最小二乘算法去除荧光背景。

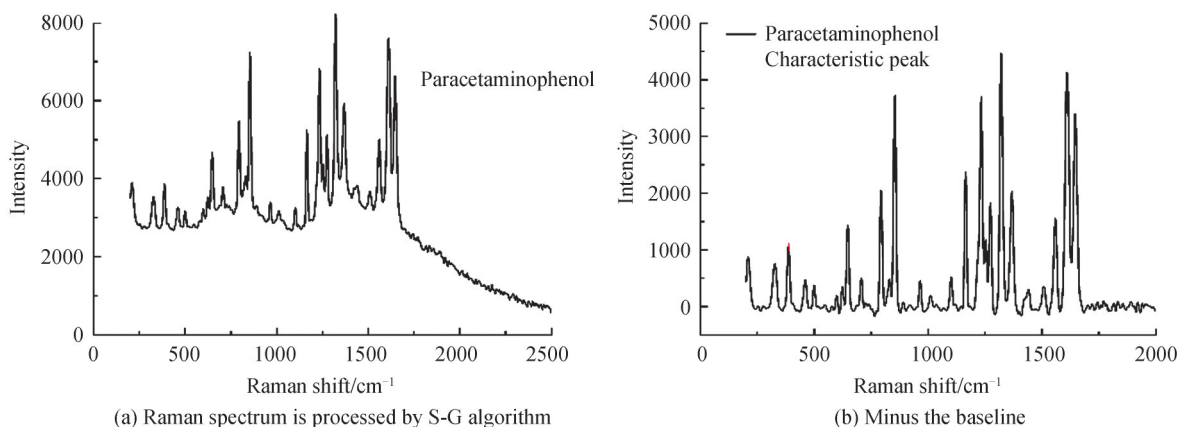


图 7 对乙酰氨基苯酚预处理
Fig. 7 The progress of acetaminophen

2) 归一化。样本本身的差异性以及环境变化等因素可能导致光谱变化差异大,因此需要对获得的拉曼光谱进行归一化处理,以更好比较不同样本之间的光谱形状和相对峰的强度。

研究中主要采用的光谱预处理流程如图 8。

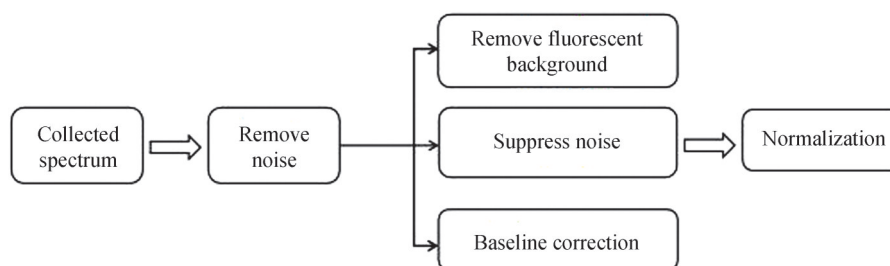


图 8 光谱预处理流程
Fig. 8 Spectral pretreatment process

4.2 光谱数据特征提取

特征提取旨在选出光谱信号中最有意义的数据,从而提高分类的准确性。目前临床医学领域常用来做拉曼光谱特征提取的有主成分分析法 (Principal Component Analysis, PCA)、神经网络以及遗传算法

(Genetic Algorithm, GA)等。

4.2.1 基于主成分分析的诊断算法

PCA是一种广泛使用的数据约简技术,用于提取一组正交的主成分,主要用于降低数据集的维数,提取数据集中对方差贡献度最大的特征,去掉多余部分,使得降维后的数据信息丢失量最少^[36]。其优点是计算方法简单,为拉曼光谱里最常用的无监督分类方法之一^[27]。PCA应用方向非常广泛,CEBIN等^[72]利用PCA和层序聚类分析(Hierarchical Cluster Analysis, HCA)的方法结合拉曼光谱检测小麦粉样品中的半胱氨酸,实现定性和定量分析。SHIN H等^[73]通过PCA来分析晚期非小细胞肺癌的癌细胞外泌体和潜在的蛋白标记物之间的相关性。LI Nan等^[49]利用PCA提取有效主成份,再将PCA输出作为BP-ANN神经网络的输入从而构建糖尿病患者分类模型。此外,采用PCA降低原始拉曼数据集的维度可以用于区分宫颈癌与前列腺癌,诊断胃发育不良以及实现细胞分类^[74-77]等,由此可见PCA能将多变量的数据进行最佳的综合简化,是解释拉曼光谱数据的标准工具。

4.2.2 利用神经网络算法分类光谱数据

机器学习相比于传统统计学方法更加灵活,且能够提高构建模型的准确度。RYZHIKOVA E等^[78]使用人工神经网络ANN方法成功的对阿尔兹海默症患者,其他类型的痴呆患者以及健康人群的血清样品进行了分类和辨别。除此之外,ANNs已被用于帮助临床诊断神经变性障碍和阿尔兹海默症等^[79]。

4.2.3 遗传算法

遗传算法是一种专为特征选择和提取而设计机器学习技术,能够识别测量变量的最有用的子集,用于辨别和分类任务。RYZHIKOVA E^[50]使用遗传算法将原始拉曼光谱数据集简化为具有最佳鉴别能力的波数子集,获得了比仅使用PCA更好的预测性能。

5 总结与展望

目前,拉曼光谱技术已成体系性地应用于医学检验样本特别是生物流体样本的检测分析中,并发挥其快速、样本无损、精度高等优点。针对拉曼信号较弱的这一短板,诸如表面增强拉曼、空间位移拉曼、受激拉曼以及相干拉曼等技术相继被开发出来。不同的技术手段能够适应不同情景下的应用需求,对于特定目标的检测也有不同的效果。本文特别关注了拉曼技术在医学检验样本中的应用,众多的研究表明,拉曼技术作为无损快速的分析技术在医学应用上有很大的潜力。

然而,拉曼技术的应用也有一定的局限,大部分基于拉曼光谱的研究均能达到定性检测生化信息,但并不能进行精准定量测量。此外,拉曼检测设备相对昂贵和较为精密,将相关技术应用在医学临床检测还需要更多的努力。随着拉曼技术的成熟发展和实验体系的完整,该项技术不仅可以检测样本,更能够监测癌组织的位置和大小,在术中进行实时的测量和反馈,辅助医生开展临床手术。拉曼技术在医学检验领域的研究和临床应用中仍具备很大的发展空间,其分析及成像技术在未来十年仍将是一个充满活力的研究领域。

参考文献

- [1] YANG Jing, WANG Ran, HUANG Lin, et al. Urine metabolic fingerprints encode subtypes of kidney diseases [J]. *Angewandte Chemie*, 2020, 59(4): 1703-1710.
- [2] CAVANAUGH C, PERAZELLA M A. Urine sediment examination in the diagnosis and management of kidney disease: Core Curriculum 2019 [J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2019, 73(2): 258-272.
- [3] ZHOU Qirui. Clinical application of the three detection methods in renal and non-renal hematuria [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2006, (12): 1142-1144.
周奇瑞. 三种检测方法在肾性与非肾性血尿中的临床应用 [J]. *国际检验医学杂志*, 2006, (12): 1142-1144.
- [4] YANG Maigui, YANG Zheng, YANG Yang, et al. Clinical study of routine urinalysis in the diagnosis of renal diseases [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2016, 13(3): 391-392.
杨麦贵, 杨铮, 杨阳, 等. 尿常规检测方法对肾脏疾病诊断的临床研究 [J]. *临床检验与医学*, 2016, 13(3): 391-392.
- [5] TIAN Ping. Discussion on the related factors affecting the accuracy of the test results in the analysis of clinical blood biochemical test specimens [J]. *China Health Standard Management*, 2016, 7(16): 150-151.
田平. 临床血液生化检验标本分析过程中影响检验结果准确性的相关因素分析 [J]. *中国卫生标准管理*, 2016, 7(16): 150-151.
- [6] CHEN Hao. Clinical value of using automatic blood cell analyzer to detect nucleated red cells [J]. *The Journal of Medical*

- Theory and Practice, 2021, 34(2): 309-310.
- 陈浩. 应用全自动血液细胞分析仪检测有核红细胞的临床价值[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(2): 309-310.
- [7] CONG Zhiqiang. Several problems in clinical application of lumbar puncture and cerebrospinal fluid examination[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 1995, (11): 692-694.
丛志强. 腰椎穿刺和脑脊液检查临床应用中的几个问题[J]. 中国实用内科杂志, 1995, (11): 692-694.
- [8] MALLIK A K, QIU H, TAKAFUJI M, et al. High molecular-shape-selective stationary phases for reversed-phase liquid chromatography: A review[J]. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2018, 108: 381-404.
- [9] YIMIN Adili, WUSHUER Ainiwaer, DAWULAITI Shayifujianali. Research progress of Raman spectroscopy[J]. West Leather, 2017, 39(12): 6-7.
阿迪力·伊敏, 艾尼瓦尔·吾术尔, 沙依甫加马力·达吾来提. 拉曼光谱的研究进展[J]. 西部皮革, 2017, 39(12): 6-7.
- [10] LIU Xuehui, LIU Xiaoman, RONG Pengfei, et al. Recent advances in background-free Raman scattering for bioanalysis [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 123: 115765.
- [11] AUNER G W, KOYA S K, HUANG C, et al. Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2018, 37(4): 691-717.
- [12] GUO Xiaoyuan, YASHENG Paierhati, LIU Chenyang, et al. Development of Raman spectroscopy and its application in biomedicine[J]. Journal of Fuzhou University(Natural Science Edition), 2021, 49(1): 135-142.
郭晓媛, 排尔哈提·亚生, 刘晨阳, 等. 拉曼光谱技术的发展及其在生物医学领域中的应用[J]. 福州大学学报(自然科学报版), 2021, 49(1): 135-142.
- [13] EMBER K J I, HOEVE M A, MCAUGHTRIE L, et al. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review[J]. Regenerative Medicine, 2017, 2(1): 12.
- [14] DAS R S, AGRAWAL Y K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications[J]. Vibrational Spectroscopy, 2011, 57(2): 163-176.
- [15] WANG Nan, CAO Honghao, WANG Lin, et al. Recent advances in spontaneous Raman spectroscopic imaging: instrumentation and applications[J]. Current Medicinal Chemistry, 2020, 27(36): 6188-6207.
- [16] RYGUL A A, MAJZNER K, MARZEC K M, et al. Raman spectroscopy of proteins: a review[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2013, 44(8): 1061-1076.
- [17] MOREIRA L P, SILVEIRA L J R, PACHECO M T T, et al. Detecting urine metabolites related to training performance in swimming athletes by means of Raman spectroscopy and principal component analysis[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2018, 185: 223-234.
- [18] MOVASAGHI Z, REHMAN S, REHMAN I U. Raman spectroscopy of biological tissues[J]. Applied Spectroscopy Reviews, 2007, 42(5): 493-541.
- [19] YIN Pengkun, LIN Qingyu, DUAN Yixiang. Applications of Raman spectroscopy in two-dimensional materials [J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2020, 13(5): 2030010.
- [20] CHENG Hui, TONG Shen, DENG Xiangquan, et al. In vivo deep-brain imaging of microglia enabled by three-photon fluorescence microscopy[J]. Optics Letters, 2020, 45(18): 5271-5274.
- [21] LI Dan, YAO Dongmei, LI Chongning, et al. Nanosol SERS quantitative analytical method: A review[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2020, 127: 115785.
- [22] LIN Jie, ZHENG Jianping, WU Aiguo. An efficient strategy for circulating tumor cell detection: surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2020, 8(16): 3316-3326.
- [23] WEN Zaiqing. Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, 96(11): 2861-2878.
- [24] LIU Yan, YIN Lihui, LU Feng, et al. Progress of Raman spectroscopy in fast detection of counterfeit drugs[J]. Journal of Pharmaceutical Practice, 2012, 30(6): 401-404.
柳艳, 尹利辉, 陆峰. 拉曼光谱法在假药快检中的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(6): 401-404.
- [25] WANG Nan, REN Feng, NIE Xu, et al. Drug detection in different pharmaceutical dosage forms with Bessel beam-based Raman spectroscopy[C]. SPIE, 2021.
- [26] FABRIS L. SERS tags: The next promising tool for personalized cancer detection? [J]. ChemNanoMat, 2016, 2: 249-258.
- [27] TU Qiang, CHANG Chang. Diagnostic applications of Raman spectroscopy[J]. Nanomedicine, 2012, 8(5): 545-558.
- [28] LI Shaowei, LI Yangping, YI Rongxing, et al. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and its applications [J]. Frontiers in Physics, 2020, 8: 598420.
- [29] LI Ziling, LI Shaowei, ZHANG Silu, et al. Coherent Raman scattering microscopy technique and its biomedical Applications[J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 81-91.
李姿霖, 李少伟, 张思鹭, 等. 相干拉曼散射显微技术及其在生物医学领域的应用[J]. 中国激光, 2020, 47(2): 81-91.
- [30] HUANG Wengya, JIN Hui, LIU Xuan, et al. Research progress of Raman spectroscopy in medical diagnosis[J]. Journal

- of Southeast University(Medical Science Edition), 2017, 36(6): 1031-1035.
- 黄雯雅, 金晖, 刘璇, 等. 拉曼光谱技术在医学诊断中的研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2017, 36(6): 1031-1035.
- [31] CHEN Xueli, WANG Xinyu, WANG Lin, et al. Stimulated Raman scattering signal generation in a scattering medium using self-reconstructing Bessel beams[J]. *Photonics Research*, 2020, 8(6): 929-939.
- [32] GALA U, CHAUHAN H. Principles and applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical drug discovery and development[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2015, 10(2): 187-206.
- [33] NICOLSON F, KIRCHER M F, STONE N, et al. Spatially offset Raman spectroscopy for biomedical applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(1): 556-568.
- [34] ZHANG Yumin, LIN Li, HE Jing, et al. Optical penetration of surface-enhanced micro-scale spatial offset Raman spectroscopy in turbid gel and biological tissue[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2021, 14(4): 2141001.
- [35] SARIGUL N, KORKMAZ F, KURULTAK I. A new artificial urine protocol to better imitate human urine[J]. *Science Report*, 2019, 9: 20159.
- [36] LIN Xueliang, WANG Lingna, LIN Huijing, et al. A novel urine analysis technique combining affinity chromatography with Au nanoparticle based surface enhanced Raman spectroscopy for potential applications in non-invasive cancer screening [J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(4): e201800327.
- [37] FENG Shijian, ZHOU Lan, LIN Duo, et al. Assessment of treatment efficacy using surface-enhanced Raman spectroscopy analysis of urine in rats with kidney transplantation or kidney disease [J]. *Clinical and Experimental Nephrology*, 2019, 23(7): 880-889.
- [38] MOREIRA L P, SILVEIRA L, SILVA D A G, et al. Raman spectroscopy applied to identify metabolites in urine of physically active subjects[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2017, 176: 92-99.
- [39] ZHU Qingxia, YU Xiaoyan, WU Zebing, et al. Antipsychotic drug poisoning monitoring of clozapine in urine by using coffee ring effect based surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1014: 64-70.
- [40] GU Xin, WANG Hao, SCHULTZ Z D, et al. Sensing glucose in urine and serum and hydrogen peroxide in living cells by use of a novel boronate nanoprobe based on surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(14): 7191-7197.
- [41] PARK J H, KIM Y C, KOO H S, et al. Estimated amount of 24-hour urine sodium excretion is positively correlated with stomach and breast cancer prevalence in Korea[J]. *Journal of Korean Medical Science*, 2014, 29(2): S131-138.
- [42] 周光炎. 免疫学原理第三版[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- [43] 李贵贞. 医用免疫学[M]. 吉林: 人民出版社, 1979.
- [44] 曾劲峰, 郑欣, 许晓绚. ELISA 检测与 NAT 在血液筛查应用中的互补性研究[M]. 广州: 中国输血协会第六届输血大会, 2012.
- [45] LIU Zhongfu, LI Zhijun, LIU Shiliang, et al. Analysis on detecting HIV-1 antibody in paired urine and serum specimens from drug users by ELISA[J]. *Journal For China Aids/Std Prevention And Control*, 2001, 7(1): 35-36.
- 刘中夫, 李志军, 刘世亮, 等. 在吸毒人群中应用 ELISA 检测尿液及血液标本中 HIV-1 抗体结果分析[J]. *中国性病艾滋病防治*, 2001, 7(1): 35-36.
- [46] ATKINS C G, BUCKLEY K, BLADES M W, et al. Raman spectroscopy of blood and blood components[J]. *Applied Spectroscopy*, 2017, 71(5): 767-793.
- [47] SAHU A, DALAL K, NAGLOT S, et al. Serum based diagnosis of asthma using Raman spectroscopy: An early phase pilot study[J]. *Plos One*, 2013, 8(11): e78921.
- [48] PARASKEVAIDI M, ASHTON K M, STRINGFELLOW H F, et al. Raman spectroscopic techniques to detect ovarian cancer biomarkers in blood plasma[J]. *Talanta*, 2018, 189: 281-288.
- [49] LI Nan, ZANG Hang, SUN Huiming, et al. A noninvasive accurate measurement of blood glucose levels with Raman spectroscopy of Blood in microvessels[J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1500.
- [50] RYZHIKOVA E, RALBOVSKY N M, SIKIRZHYTSKI V, et al. Raman spectroscopy and machine learning for biomedical applications: Alzheimer's disease diagnosis based on the analysis of cerebrospinal fluid [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 248: 1386-1425.
- [51] XIE Wei, Wang Li, ZHANG Yuying, et al. Nuclear targeted nanoprobe for single living cell detection by surface-enhanced Raman scattering[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2009, 20(4): 768-773.
- [52] MAURER M H, BERGER C, WOLF M, et al. The proteome of human brain microdialysate[J]. *Proteome Science*, 2003, 1(1): 7-15.
- [53] JAVAID M A, AHMED A S, DURAND R, et al. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases[J]. *Journal of Oral Biology and Craniofacial*, 2016, 6(1): 66-75.
- [54] OZBAY Y, AYDIN S, DAGLI A F, et al. Obestatin is present in saliva: alterations in obestatin and ghrelin levels of saliva and serum in ischemic heart disease[J]. *Bmb Reports*, 2008, 41(1): 55-61.

- [55] QIAN Kun, WANG Yan, HUA Lin, et al. New method of lung cancer detection by saliva test using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Thoracic cancer*, 2018, 9(11): 1556-1561.
- [56] FALAMAS A, ROTARU H, HEDESIU M. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) investigations of saliva for oral cancer diagnosis[J]. *Lasers in Medical Science*, 2020, 35(6): 1393-1401.
- [57] FENG Guangping, OCHOA M, MAHER J R, et al. Sensitivity of spatially offset Raman spectroscopy (SORS) to subcortical bone tissue[J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(8): 990-996.
- [58] PEZZOTTI G, RONDINELLA A, MARIN E, et al. Raman spectroscopic investigation on the molecular structure of apatite and collagen in osteoporotic cortical bone[J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical*, 2017, 65: 264-273.
- [59] ZHU Yongkang, MA Danying, LU Yanfei, et al. Study on synovial fluid of osteoarthritis by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(4): 484-490.
朱勇康, 马丹英, 陆燕飞, 等. 早期骨关节炎滑液的表面增强拉曼散射研究[J]. *分析化学*, 2020, 48(4): 484-490.
- [60] LI Lin, DU Jia, LING Zhi, et al. Progress on applications of saliva test in diagnosis and treatment of cardiovascular disease [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine University Of Hunan*, 2018, 38(5): 593-595.
李琳, 杜佳, 凌智, 等. 唾液检测在心血管疾病诊疗中的应用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(5): 593-595.
- [61] WILLIE C Z, SCHMOLAZ D, JONES V, et al. Raman spectroscopy for rapid evaluation of surgical margins during breast cancer lumpectomy[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 14639.
- [62] STONE N, KENDELL 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.
- [63] MIN Y K, TATSUYA Y, EHIICHI K, et al. 1064 nm near-infrared multichannel Raman spectroscopy of fresh human lung tissues[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2005, 36(1): 73-76.
- [64] FENG Shangyuan, CHEN Rong, LIN Juqiang, 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.
- [65] HUANG Shaohua, Wang Lan, CHEN Weisheng, et al. Potential of non-invasive esophagus cancer detection based on urine surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Laser Physics Letters*, 2014, 11(11): 115604.
- [66] LIN Xueliang, LIN Duo, GE Xiaosong, 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.
- [67] FENG Shangyuan, LIN Duo, LIN Juqiang, et al. Blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy for non-invasive optical detection of cervical cancer[J]. *The Analyst*, 2013, 138(14): 3967-3974.
- [68] FENG Shangyuan, CHEN Rong, LIN Juqiang, et al. Gastric cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy excited by polarized laser light[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26(7): 3167-3174.
- [69] LIN Duo, FENG Shangyuan, PAN Jianji, et al. Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis[J]. *Optics Express*, 2011, 19(14): 13565-13577.
- [70] LI Shaoxin, ZENG Qiuyao, LI Linfang, et al. Study of support vector machine and serum surface-enhanced Raman spectroscopy for noninvasive esophageal cancer detection[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(2): 27008.
- [71] LU Xia, LU Jingjing, CHEN Zhilin, et al. Identifying benign and malignant thyroid nodules based on blood serum surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Nanomedicine*, 2020, 32: 102328.
- [72] CEBI N, DOGAN C E, DEVELIOGLU A, et al. Detection of L-Cysteine in wheat flour by Raman microspectroscopy combined chemometrics of HCA and PCA[J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 116-124.
- [73] HYUNKU S, JEONG H, PARK J, et al. Correlation between cancerous exosomes and protein markers based on surface-enhanced raman spectroscopy (SERS) and principal component analysis (PCA) [J]. *ACS Sensors*, 2018, 3(12): 2637-2643.
- [74] VIDYASAGAR M S, MAHEEDHAR K, VADHIRAJA B M, et al. Prediction of radiotherapy response in cervix cancer by Raman spectroscopy: a pilot study[J]. *Biopolymers*, 2008, 89: 530-537.
- [75] TEH S K, ZHENG W, HO K Y, et al. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue[J]. *British Journal of Cancer*, 2008, 98: 457-465.
- [76] JESS P R T, SMITH D D W, MAZILU M, et al. Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy [J]. *International Journal of Cancer*, 2007, 121(12): 2723-2728.
- [77] SCHLUCKER S K B, PUNGE A, BONFIG R, et al. Immuno-Raman microspectroscopy: in situ detection of antigens in tissue specimens by surface-enhanced Raman scattering[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006, 37: 719-721.
- [78] RYZHIKOVA E, KAZAKOV O, HALAMKOVA L, et al. Raman spectroscopy of blood serum for Alzheimer's disease diagnostics: specificity relative to other types of dementia[J]. *Journal of Biophotonics*, 2015, 8(7): 584-596.
- [79] LITVAN L, DELEO J M, HAUW J J, et al. What can artificial neural networks teach us about neurodegenerative disorders with extrapyramidal features[J]. *Brain*, 1996, 119(3): 931-939.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81871397), Key Research and Development Program of Shaanxi (No. 2021ZDLSF04-05), Shaanxi Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 2020JC-27), Fundamental Research Funds for Central Universities (Nos. QTX2105, QTZX2185, XJS211202)