

乳腺癌氧合血红蛋白表面增强拉曼光谱研究

张 明¹, 朱绍玲², 高 飞¹, 罗 果³

- (1. 遵义医学院 物理学教研室, 贵州 遵义 563003;
2. 遵义医学院附属医院 检验科, 贵州 遵义 563003;
3. 遵义医学院 医学与生物医学研究中心, 贵州 遵义 563003)

摘 要: 采用重复性及生物兼容性较好的二维纳米银膜作为氧合血红蛋白表面增强拉曼散射光谱的(SERS)基底, 利用具有较好匹配的近红外激光作为激发光源, 通过引起共振拉曼效应分别对健康女性和女性乳腺癌患者的氧合血红蛋白进行 SERS 光谱研究。比较两组氧合血红蛋白平均 SERS 光谱, 发现存在差异。利用 SPSS 软件的主成分分析(PCA)方法和独立变量 T 检验统计分析方法, 发现两组光谱在 659、813 和 1 122 cm^{-1} 拉曼频移处的谱峰有着极显著的区别。对主成分进行归属分析, 女性乳腺癌患者氧合血红蛋白分子中, 吡咯环的反对称变形振动、对称变形振动以及吡咯环的呼吸振动的强度、相对于健康女性显著减少, 从而造成图谱谱峰有明显差异。除此以外, SERS 技术结合 SPSS 统计分析方法能够较好地地区分健康女性和乳腺癌患者的氧合血红蛋白, 从而有望发展成为一种新型的乳腺癌临床诊断技术。

关键词: 拉曼光谱; 乳腺癌; 氧合血红蛋白; 纳米银膜

中图分类号: O657.3 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201746.0433001

Breast cancer oxyhemoglobin surface enhanced Raman spectroscopy

Zhang Ming¹, Zhu Shaoling², Gao Fei¹, Luo Guo³

- (1. Physics Teaching and Research Section, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China;
2. Clinical Laboratory, Zunyi Medical College Affiliated Hospital, Zunyi 563003, China;
3. Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Based on the repeatability and good biological compatibility two-dimensional nano silver membrane as oxyhemoglobin near infrared surface enhanced Raman scattering (SERS), a study on oxyhemoglobin used SERS spectra was carried out by using near infrared laser with good match as excitation light source, which caused resonance Raman effect respectively of healthy women and women with breast cancer. The study found that obvious differences existed between healthy women and female breast cancer patients' oxyhemoglobin. By using the method of principal component analysis (PCA) and independent variable T test statistical analysis through SPSS, an extremely significant difference was found between the two spectra in 659, 813 and 1122 cm^{-1} Raman shift spectrum peak. By attribution analysis on the principal component, a significant reduction was found, compared with the healthy

收稿日期: 2016-08-05; 修订日期: 2016-09-03

基金项目: 国家自然科学基金(81460204); 遵义医学院硕士启动基金(F-638)

作者简介: 张明(1980-), 男, 副教授, 硕士, 主要从事光谱学方面的研究。Email: zhangmingzmc80@126.com

通讯作者: 罗果(1980-), 男, 副教授, 硕士, 主要从事细胞生物学方面的研究。Email: lozens@126.com

women, in the female breast cancer patients' oxygenated hemoglobin molecules, pyrrole ring vibration, and symmetric deformation of antisymmetric deformation and pyrrole ring breathing vibration intensity, which resulted in an obvious difference in the graph spectral peaks. In addition, SERS technique can be combined with SPSS statistical analysis method to distinguish the oxygenated hemoglobin between healthy women and patients with breast cancer, which is expected to develop into a new type of clinical diagnosis technology for breast cancer.

Key words: Raman spectrum; breast cancer; oxyhemoglobin; nano silver film

0 引言

乳腺癌是大多数国家女性最常见的恶性肿瘤之一,据美国癌症协会2014年公布的数据,女性癌症患者中,乳腺癌、肺癌和结肠癌最为常见,而乳腺癌占到了所有女性癌症发病中的29%,死亡率占第二位(15%)。近年来,国内乳腺癌的发病率呈逐年上升的趋势,并且发病人群呈现出年轻化的特点。目前,乳腺癌的诊断方法主要有立体定向乳腺穿刺活检、钼靶X线摄影、MRI检查及相关肿瘤标志物检测等。但也都存在一定的缺陷,如灵敏度低,操作复杂,有创伤,费用高等,并且医学上传统的癌症检测方法具有假阴性或者存在检测盲区的缺点,所以研究一种快速、简便、安全的早期乳腺癌检测方法可以为乳腺癌的诊断开辟一条新的途径。

拉曼光谱技术是在拉曼散射效应的基础上发展起来的一种光谱技术^[1],该项技术有许多应用领域并发展成为多种不同的拉曼光谱分析技术,如固体光声拉曼光谱、激光共振拉曼光谱、傅里叶拉曼光谱、高温高压原位拉曼光谱、共聚焦显微拉曼光谱及表面增强拉曼光谱(SERS)^[2-5]。固体光声拉曼光谱主要应用于固体、液体、气体介质特性的分析;激光共振拉曼光谱主要应用于微量生物大分子样品的检测;傅里叶拉曼光谱主要应用于样品结构的分析;高温高压原位拉曼光谱主要应用于晶体生长、冶金熔渣、地质岩浆等物质的高温结构研究;共聚焦显微拉曼光谱主要应用于电化学研究;表面增强拉曼光谱是Fleischmann在1974年观测到在粗糙的银电极表面吡啶分子上,获得了高强度的拉曼散射信号,经过检测,发现拉曼散射强度增大了106倍,而现在通过利用纳米银制备基底上观测标本的拉曼散射强度可获得较常规拉曼光谱大几万甚至几十万倍的增益^[6-7],目

前该项技术应用于分子的理化研究,病理分析,药物分析等研究领域。陈荣、韩洪文、刘仁明、熊洋等人已经利用该项技术分别对胃癌患者的血浆、皮疹病人血清、肝癌患者血清、宫颈癌患者的氧合血红蛋白进行了光谱研究^[8-10],研究中运用Origin软件的谱峰分析结合SPSS软件的统计分析可以对健康人与患者进行区分,从而得出诊断结果。表面增强拉曼光谱运用于乳腺癌的研究,具有检测快、灵敏度高、所需样品浓度低、无破坏性等优点,随着拉曼光谱技术的不断发展,该项技术有望发展成为用于医学诊断的重要方法。拉曼光谱的激发光源要求单色性好,即线宽要窄,所以实验中采用激光作为光源,波长在近红外785 nm附近。这样,一方面可以有效降低荧光效应^[11]的影响,另一方面由于表面增强后的拉曼散射可以用小功率的激光去激发生物分子,从而大大降低了对生物大分子的光致损伤、获得较完整的生物大分子的拉曼信号。

该实验采用静电自组装技术使得表面经过特殊处理的玻璃基底上形成纳米银膜,经过重复性试验且具有较好的重复性。该纳米银膜基底的等离子区处于350~850 nm,能够与实验中的激光光源较好匹配引起共振拉曼效应。同时还能减少光子能量对蛋白质大分子造成的光损,并且可以更好的降低荧光效应。实验中将采集来的每例血样中的氧合血红蛋白提取出均匀地涂在所制备的纳米银膜基底上,结合SPSS多变量统计分析健康女性与女性乳腺癌患者的氧合血红蛋白NIR-SERS光谱。

1 材料与方法

1.1 实验材料

该实验中的血液样品采集于遵义医学院附属医院,血液样中有15例健康女性和15例女性乳腺癌患者。

1.2 实验方法

首先分离出氧合血红蛋白：在采集的血液样品中将健康女性和女性乳腺癌患者的分别用对照组和实验组表示，并每个样品取出约 3 mL，在不加入任何抗凝剂的情况下，放置在 37°C 的环境温度下 1 h 左右，使其凝结；然后采用离心机进行离心，设置转速为 5 000 r/min，离心 5 min 后，在分层的血液中提取下层红细胞 300 μ L；接下来，按照体积比 1:9 将红细胞与去离子水混合均匀，再次使用离心机，同样设置 5 000 r/min 的转速，离心 5 min；最后，提取中间层氧合血红蛋白溶液 500 μ L，将其放置于 0~3°C 冰箱中以备使用。

然后制备出实验所需的二维纳米银膜基底：参照冯尚源、刘仁民和熊洋等制备 SERS 基底的方法^[12]，先用浓硫酸浸泡玻璃载玻片 10 h，取出后用去离子水反复冲洗干净，再放置于氨水和双氧水混合液中浸泡 8 h，取出后用去离子水将其再次冲洗干净；接下来依次放在乙醇和去离子水中，用超声波清洗机分别清洗 30 min 后，置于高纯 N₂ 中干燥待用。将 50 mg 聚乙烯醇和 30 mg 硝酸银加入到 200 mL 的去离子水中，通过加热，使聚乙烯醇充分溶解，溶解后使混合溶液冷 30 min 后，在 30 V 电压下对溶液进行电解，1.5 h 后即获得带正电性的纳米银胶，最后把经过处理载玻片放入正电性纳米银胶中进行静电自组装 24 h，即获得待使用的二维纳米银膜基底。

最后测定氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱：将 15 例健康女性和 15 例被确诊的女性乳腺癌患者的氧合血红蛋白样品取出 100 μ L 均匀地涂在所制备的银膜基底上^[12]，待其自然干燥后进行检测；使用便携式拉曼光谱仪(R-3000TM, Ocean Optics)检测，采用近红外波长为 785 nm 的半导体^[13]激光光源，激光功率密度为 $J=10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，垂直照射在基底液膜上(设置扫描积分时间为 16 s)进行 SERS 光谱的测定。每个样品测定时，分别在液膜上任意选取三个不同点得出谱线，然后取平均谱线运用 Origin 8.0 和 SPSS 19.0 进行谱峰和统计分析。

2 结果与讨论

2.1 氧合血红蛋白 NIR-SERS 光谱

应用 Origin8.0 软件对光谱图进行比较，如图 1

所示，谱线(a)和谱线(b)分别展示了 15 例健康女性(对照组)和 15 例女性乳腺癌患者(实验组)氧合血红蛋白的平均 SERS 光谱。为了更好的进行对比，两组数据的谱线作了上下平移处理，以便在同一图层中更好地反应出两组的差异。图中对照组和实验组主要的谱峰在 472、659、813、1 122、1 209、1 334、1 424、1 584 cm^{-1} 处，并且两组谱峰的强度存在差别，相比于乳腺癌患者，健康人氧合血红蛋白 SERS 光谱强度要大，尤其在 659、813、1 122 cm^{-1} 处，健康女性氧合血红蛋白 SERS 光谱有较明显的拉曼谱峰，而乳腺癌患者的谱峰基本消失。除此以外，从两组谱峰拉曼位移的区分来看，存在两处明显区别，即健康女性氧合血红蛋白平均 SERS 光谱在 1 334 cm^{-1} 处的谱峰在乳腺癌患者上红移^[13]到 1 338 cm^{-1} ，而在 1 584 cm^{-1} 的谱峰在乳腺癌患者上蓝移^[13]到 1 576 cm^{-1} 。

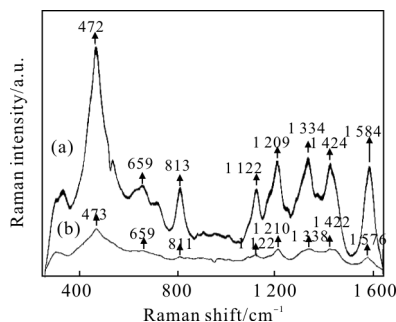


图 1 15 例健康女性(a)和 15 例乳腺癌患者(b)的氧合血红蛋白平均 NIR-SERS 光谱

Fig.1 Average NIR-SERS spectra of oxyhemoglobin for 15 healthy women (spectrum a) and 15 breast cancers(spectrum b)

2.2 氧合血红蛋白 SERS 光谱的 SPSS 统计分析

为了得到区分健康女性和女性乳腺癌患者的客观依据，文中采用 SPSS 软件进行统计分析。在运用统计分析前，所有 SERS 光谱线需将荧光背景扣除，选择拉曼频移在 250~1 650 cm^{-1} 的范围，观察到两组拉曼光谱存在八个明显的谱峰，分别位于 472、659、813、1 122、1 209、1 334、1 424、1 584 cm^{-1} 处。接下在 Origin 软件中分别将每个样品光谱中的八个谱峰的面积求出，将得到的谱峰面积分别以对照组和实验组输入到 SPSS 软件中进行归一化处理^[7]，利用 PCA 主成分分析方法可以得到八个主成分，结合独立变量 T 检验对主成分进行分析发现具有显著差异的主成分得分分别是 PC1 和 PC7($p<0.05$)，具有极显著差

异的主成分得分的是 PC2、PC3、PC4 和 PC8 ($p < 0.01$), 图 2(a)、(b) 是对照组和实验组 SERS 光谱选取的具有极显著差异主成分 PC2 和 PC3、PC3 和 PC4 的二维散点图。在图 2(a) 的二维散点图中, 直线 $Y_{PC2} = -3.95X_{PC3} - 0.88$ 为诊断线, 可以看出对照组分布在右边, 而实验组全部集中在左边。在图 2(b) 的二维散点图中, 直线 $Y_{PC3} = 0.33X_{PC4} + 0.03$ 为诊断线, 可以看出对照组主要分布在左上方, 而实验组全部集中在右下方。数据表明特异性与灵敏度都分别为 93.3% 和 100%, 总判别正确率为 96.6%。

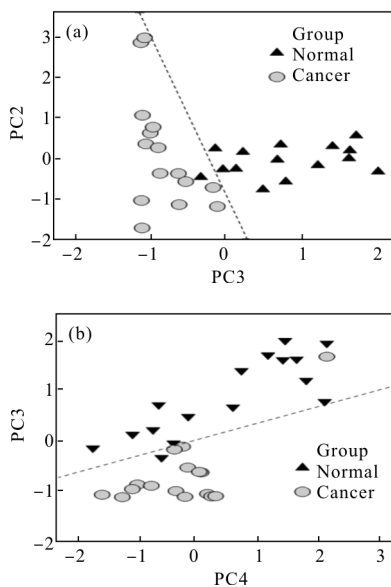


图 2 (a)、(b) 分别是 15 例健康女性(三角形)与乳腺癌患者(球形)主成分得分 PC2、PC3 散点图和 PC3、PC4 散点图

Fig.2 Plots of PC2 versus PC3(a) and PC3 versus PC4(b) for 15 healthy women (triangle) and 15 breast cancers (ball)

如图 3 中所示, 结合二维散点图中选用的具有极显著差异的主成分(PC2、PC3、PC4)即得到对照组和实验组的 SERS 光谱判别式得分图。图 3(a) 为对照组的 SERS 光谱判别式得分图, 可以看出, 健康女性(对照组)判别式得分大多大于 0, 分布于 0~4 的区域; 图 3(b) 为实验组的 SERS 光谱判别式得分图, 可以看出, 乳腺癌患者(实验组)判别式得分大多小于 0, 主要分布于 -3~0 的区域。对照组与实验组的判别式得分显然可以以 0 为界限来区分, 即得分小于 0 患乳腺癌的几率就大。图中标出了对照组和实验组判别式得分标准偏差分别为 1.11 和 0.86, 健康女性(对照组)标准偏差比乳腺癌患者(实验组)大。

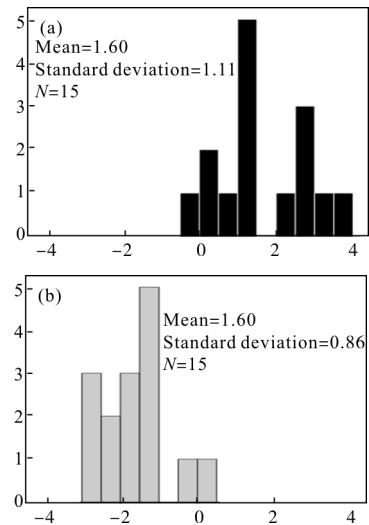


图 3 15 例健康女性(a)和 15 例乳腺癌患者(b)的判别式得分图

Fig.3 Plots of discriminating scores of 15 health women (a) and 15 breast cancers (b)

3 结论

该实验通过对比 15 例健康女性(对照组)和 15 例乳腺癌患者(实验组)氧合血红蛋白的拉曼光谱来找出两者的差异, 从而得到乳腺癌患者的诊断判别。为了得到较强的拉曼信号, 参照 SERS 光谱相关技术, 选取纳米银膜作为增强光谱的基底。对制备的纳米银膜基底进行重复性试验, 证实该纳米银膜基底具有较好的生物兼容性和稳定性。结合使用 785 nm 的近红外激光光源作为激发光源, 可以获得比较理想和完整的拉曼信号。利用 Origin 软件对数据处理后, 可以看出对照组与实验组的光谱在 659 、 813 和 1122 cm^{-1} 的谱峰有较明显的区别。采用 SPSS 软件的 PCA 分析结合独立变量 T 检验统计分析方法得到最具差异的三个 PCA 得分 PC2、PC3 和 PC4, 利用此三个 PCA 得分做出的 SERS 光谱 PCA 得分二维散点图可以很好的区分健康女性和乳腺癌患者, 诊断的特异性与灵敏度都分别为 93.3% 和 100%, 总判别正确率为 96.6%。通过归属分析, 女性乳腺癌患者氧合血红蛋白分子中, 吡咯环的对称弯曲变形振动、反对称伸缩变形振动以及 C-N 的伸缩振动与健康人是不同的。导致这些变化是由于乳腺癌在癌变的过程中造成体内组织细胞中的物质如: 糖、氨基酸的消耗与正常人是不同的。根据癌变过程组织生化分析的一些结论也可以印证这一变化。因此, 表面增

强拉曼光谱技术结合 SPSS 统计分析方法能够很好的区分乳腺癌患者和健康女性的氧合血红蛋白;另外,该项技术整体还处于分散实验研究阶段,没有形成统一的技术、筛查和诊断标准,需要建立诊断数据库及诊断标准,更加全面准确地解析早期乳腺癌信息。充分发挥表面增强拉曼光谱技术其简便、快捷、无损的特点,有望发展成为一种新型的乳腺癌临床诊断技术。

参考文献:

- [1] Li Wenchao, Zhang Jingru, Sun Yuchao, et al. Design and typical application of silicon Raman laser [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2013, 21(2): 308–315. (in Chinese)
李文超, 张景茹, 孙宇超, 等. 硅拉曼激光器的设计与典型应用[J]. *光学精密工程*, 2013, 21(2): 308–315.
- [2] Feng S Y, Pan J J, Wu Y A, et al. Study on gastric cancer blood plasma based on surface-enhanced Raman spectroscopy combined with multivariate analysis [J]. *China Life Sci*, 2011, 41(7): 550–557.
- [3] Zhang Fang, Wang Zhengping, Xu Xinguang. Anisotropy of stimulated Raman scattering in SrWO₄ crystal[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2014, 22(1): 39–43. (in Chinese)
张芳, 王正平, 许心光. SrWO₄ 晶体受激拉曼散射的各向异性[J]. *光学精密工程*, 2014, 22(1): 39–43.
- [4] Hu Xianwei, Yu Zongxin, Gao Bingliang, et al. Equilibrium between NO₃⁻ and NO₂⁻ in KNO₃-NaNO₂ melts: a Raman spectra study [J]. *Chinese Optics Letters*, 2014, 12(9): 093001.
- [5] Wu Bin, Chen Kunfeng, Wang Hengfei. Composition dependence of molecular interactions in ethanol-water mixture studied by laser Raman spectra [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2013, 42(S1): 68–73. (in Chinese)
- [6] Fan Xianguang, Wang Xin, Xu Yingjie, et al. Design of Raman spectroscopy measurement system based on SHINERS [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2013, 42(7): 1798–1803. (in Chinese)
- [7] Zhou Minghui, Liao Chunyan, Ren Zhaoyu, et al. Bioimaging technologies based on surface-enhanced Raman spectroscopy and their applications[J]. *Chinese Optics*, 2013, 6(5): 633–642. (in Chinese)
周明辉, 廖春艳, 任兆玉, 等. 表面增强拉曼光谱生物成像技术及其应用[J]. *中国光学*, 2013, 6(5): 633–642.
- [8] Harvey Lui, Jianhua Zhao, David McLean, et al. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis [J]. *Cancer Research*, 2012, 72(10): 2491–2500.
- [9] Liu Renming, Xiong Yang, Tang Weiyue, et al. Near infrared surface-enhanced Raman spectroscopy studies on OxyHb of liver cancer based on PVA-Ag nanofilm [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2014, 44(3): 362–369.
- [10] Xiong Yang, Li Yuntao, Guo Yan, et al. Analysis of surface enhanced Raman scattering spectra of oxyhemoglobin for liver cancer with combined multivariate statistics [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2012, 32(9): 2427–2432. (in Chinese)
熊洋, 李云涛, 郭燕, 等. 结合多变量统计分析肝癌患者氧合血红蛋白 SERS 光谱 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2012, 32(9): 2427–2432.
- [11] Wang Xin, Wu Jinglin, Fan Xianguang, et al. Design of Raman spectroscopy measurement system based on shifted excitation method using two laser diodes with different wavelengths [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2016, 45(1): 0106005. (in Chinese)
王昕, 吴景林, 范贤光, 等. 双波长激光移频激发拉曼光谱测试系统设计[J]. *红外与激光工程*, 2016, 45(1): 0106005.
- [12] Yang Xiong, Si Minzhen, Gao Fei, et al. Study on cervical cancer oxyhemoglobin using near-infrared surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2015, 42(1): 0115001. (in Chinese)
熊洋, 司民真, 高飞, 等. 基于 NIR-SERS 技术分析宫颈癌氧合血红蛋白拉曼光谱 [J]. *中国激光*, 2015, 42(1): 0115001.
- [13] Wang Reng, Jiao Cuiling, Xu Guoqing, et al. Growth and Raman spectrum of Au-doped Hg_{1-x}Cd_xTe epitaxial crystals [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2014, 43(9): 3046–3050. (in Chinese)
王仍, 焦翠灵, 徐国庆, 等. 金掺杂碲镉汞外延材料生长及拉曼光谱研究[J]. *红外与激光工程*, 2014, 43(9): 3046–3050.