

拉曼光谱在头颈肿瘤外科中的应用

李龙江 闫冰 李一

〔作者简介〕 李龙江, 现任四川大学华西口腔医院头颈肿瘤外科主任, 教授, 博士生导师。长期从事头颈肿瘤防治及修复重建的研究及临床工作。担任全国头颈肿瘤专业委员会常委, 中华口腔医学会口腔颌面外科专业委员会委员, 口腔颌面肿瘤学组副组长, 涎腺学组副组长, 中国抗癌协会西南地区头颈肿瘤协作委员会副主任委员及秘书长, 四川省头颈肿瘤专业委员会主任委员, 四川省卫生系统学术带头人, 成都市有突出贡献优秀专家。

目前对绝大多数肿瘤的临床诊断而言, 组织病理诊断仍是金标准^[1]。但是, 随着临床肿瘤治疗和研究的不断发展, 传统病理诊断也显现其一些不足, 如无法实时快速诊断, 需要对样品标本进行染色处理及仅能对形态学发生改变的组织进行诊断等, 这些都影响了临床对肿瘤的早期快速的诊断及治疗。随着光谱学在生物医学领域研究的不断深入, 其临床应用价值受到越来越多的关注, 而拉曼光谱是近年来研究的热点之一。拉曼光谱不仅可以应用于临床疾病的诊断, 还可应指导临床的治疗以及应用于一些疾病预后的判断。本文通过复习相关文献, 对拉曼光谱在头颈肿瘤外科中的应用进行综述。

一、拉曼光谱的原理

当一束单色光射向标本组织时, 一部分被反射, 另有一部分在穿越组织时会与其相互作用, 产生四种情况: ①弹性散射; ②吸收; ③产生荧光; ④非弹性散射^[2]。根据量子力学理论, 在光子进入被照射的组织内, 处于基态的分子吸收一部分光子的能量后跃迁至能量级更高的虚态, 但虚态是一种不稳定状态, 处于虚态的分子会立即发射光子回到较低能量级或基态, 从而导致了这部分光子的能量与入射光子不同, 其光线的波长也相应地发生了改变, 即产生了非弹性散射^[2]。这一现象最早是由印度科学家 Raman 于 1928 年发现的, 因此非弹性散射又被称为拉曼散射, 而利用拉曼散射光线得到的光谱称为拉曼光谱^[2]。拉曼散射中非弹性散射后的光线波长发生了改变, 在拉曼光谱中是以波数差的形式表现, 而每条分子链在拉曼光谱上都有特征性的波数差, 可以根据拉曼光谱

波数差来了解样本内分子的组成、分子的结构及分子之间的相互关系等丰富的信息, 因此拉曼光谱又被称为“分子指纹”^[3]。

二、拉曼光谱在疾病诊断中的优势

在病变组织中, 即使在细胞尚未发生镜下可见的形态学改变之前, 由于细胞增殖、分化或恶变以及一些活性因子的分泌等都会引起组织中 DNA、RNA、蛋白质和脂类的结构、成分和含量的改变, 而拉曼光谱可以检测出样本中此类物质的改变, 对肿瘤等疾病早期诊断具有传统病理学诊断所不具备的优势^[4,5]。同时, 相对传统病理学对组织标本的繁琐处理过程, 拉曼光谱可以实时、无创、快速地对疾病进行诊断检测, 其样本无需特殊处理, 方便快捷, 可以反复使用^[6,7]。再有, 某些疾病位于特殊解剖部位而无法或不宜活检, 随着光导纤维在拉曼光谱中的应用, 拉曼光谱可以对这些部位的疾病进行无创的活体诊断检测^[6-8]。此外, 拉曼光谱不仅可以对疾病诊断进行定性分析, 还可以对样本组织中的成分改变进行定量分析, 这对判断预后及疾病分期具有重要意义。相比荧光光谱和红外光谱而言, 拉曼光谱具有无需样本预处理、对样本损伤小、穿透度深、光谱分辨率高等优点, 同时其谱带相对窄, 不易重叠, 能够提供更多的样本信息, 有利于分析^[5,7]。

三、拉曼光谱在头颈部肿瘤诊断中的应用

目前, 光谱学由于具有实时、无创和原位鉴别诊断的优势, 越来越多地被应用于头颈肿瘤诊断的研究^[1]。基底细胞癌是一种最常见的皮肤恶性肿瘤, 多发生在头颈部^[9]。Nijssen 等^[9]选用波长为 850nm 的激光, 分别对手术切除的 15 例经病理诊断证实为基底细胞癌的样本组织中病变部位和正常皮肤进行照射, 通过 10s 收集信号获得相应的拉曼光谱。通过

作者单位: 610041 成都, 四川大学口腔疾病研究国家重点实验室(李龙江、闫冰、李一); 610041 成都, 四川大学华西口腔医院头颈肿瘤外科(李龙江)

对光谱数据分析,拉曼光谱对基底细胞癌的诊断灵敏度可以达到100%而特异性为93%。David等^[8]对鼻咽部黏膜的癌变组织和正常组织的拉曼光谱分析比较发现,癌变组织与正常组织分别在1290~1320 cm^{-1} ,1420~1470 cm^{-1} 和1530~1580 cm^{-1} 等3处波数差存在统计学差异。Das等^[10]利用830nm激光对9例甲状旁腺腺瘤样本及6例增生样本中的焦点区域进行照射,共收集698个拉曼光谱。通过比较两者的平均光谱发现,二者虽然相似,但在酰胺键、脂类、DNA和蛋白质等某些特定波数差处存在不同,建立线性差异分析方法的预测模型可以很好地将两者进行鉴别,其特异性和灵敏度均达90%以上。

口腔癌是头颈部十大恶性肿瘤之一,其发病率和病死率在头颈部恶性肿瘤中较高,5年生存率据报道约为55%,能否早期诊断是其预后的关键^[11]。Oliveira等^[11]和Malini等^[12]通过对口腔黏膜组织切片的拉曼光谱研究发现拉曼光谱可以很好地区分正常组织、炎症组织、癌前病变组织和癌变组织。Schut等^[13]首次利用拉曼光谱对活体小鼠口腔上腭黏膜进行研究,结果表明拉曼光谱对上腭黏膜各种程度的非典型增生及原位癌具有良好的鉴别能力,灵敏度和特异性均在90%以上,特别是对原位癌和重度非典型增生的鉴别灵敏度和特异性均为100%。Li等^[14]以1064nm波长激光为激发光,分别获取了正常口腔黏膜、口腔白斑及口腔癌的特征拉曼光谱各60例,通过对比研究发现,在口腔癌和白斑组织中的蛋白质、DNA及脂质的含量均高于正常口腔黏膜。通过分类模型的分析可以准确地鉴别不同组织的拉曼光谱,特别是口腔癌与正常口腔黏膜鉴别的准确率、特异性及灵敏度均达到了97%以上。

血液是最早应用于诊断学研究的体液,它反应人体内环境的代谢水平,可以用于多种疾病的诊断。Andrew等^[15]利用拉曼光谱技术对20例头颈部肿瘤患者(绝大多数为鳞癌患者)的血清进行研究,以20例呼吸系统疾病患者的血清作为对照,通过主成分分析及线性判别函数(PCA-LDA)相结合的方法进行分析,发现通过拉曼光谱可以较好地鉴别区分头颈部肿瘤患者及对照组患者的血清,其准确度为65.8%,灵敏度为64.9%,特异性66.7%。而一项对鼻咽癌患者血清拉曼光谱的研究发现,表面增强拉曼光谱可以很好地提高血清的拉曼光谱信号强度,更好地反映出鼻炎癌患者血清与对照正常血清之间的差异。在鼻咽癌患者血清与正常血清的拉曼光谱比较中,鼻咽

癌患者血清的拉曼光谱中725、1330、1445和1580 cm^{-1} 对应的谱峰较高,表明其核酸、蛋白质及脂质的含量较高,而正常血清拉曼光谱中638、813、886和1134 cm^{-1} 对应的谱峰较高,表明正常血清中的酪氨酸、乳糖、丝氨酸、谷胱甘肽及甘露糖的含量较高。通过PCA-LDA分析,鉴别诊断的准确率达95.4%^[16]。

四、拉曼光谱诊断头颈部肿瘤治疗并发症的应用

放射性骨坏死或骨髓炎是头颈部恶性肿瘤经过放射治疗后最严重的并发症之一,组织病理学表现为骨组织缺氧、血管减少和细胞坏死。临床上如果能在早期原位鉴别出坏死和正常骨组织就可以减少骨组织的切除范围,减少患者痛苦,为后期修复手术创造便利。

Barbara等^[17]分别对发生过骨折的股骨头组织标本及正常的股骨头组织标本的拉曼光谱研究发现,发生过骨折的标本其骨组织成分与正常组有明显差异,表明拉曼光谱可以鉴别骨组织内的病理生理改变。Draper等^[18]利用时间分辨技术穿透皮肤的拉曼光谱对小鼠活体的骨骼进行检测,发现所得到的光谱与直接暴露的骨骼光谱相似。该技术是在普通拉曼光谱仪中加入4ps间隔的滤波器,将首先由皮肤和肌肉散射回到探头的拉曼光过滤掉,而只接收更深部位散射回来的拉曼光谱^[18]。这项技术的应用,使得拉曼光谱应用于临床检测体内深部组织或器官如骨骼组织等成为可能。

Lakshmi等^[19]在对下颌骨放射性骨坏死的研究中,发现拉曼光谱对骨组织中矿物质和有机物等成分的改变敏感,可以用来评价其有机和无机基质的破坏或改变。Lakshmi等将实验样本分为正常骨组织、放射治疗后正常骨组织和发生放射性骨坏死的骨组织3组进行光谱研究,拉曼光谱显示发生放射性骨坏死样本的无机基质结构发生改变,胶原蛋白变性,成骨细胞和破骨细胞减少,将所得的拉曼光谱通过主成分分析法(PCA)进行计算,结果表明3组之间的拉曼光谱存在明显差异,即拉曼光谱可以很好地鉴别经过放射治疗的骨组织是否发生放射性骨髓炎或骨坏死。

五、拉曼光谱的应用前景

拉曼光谱技术在头颈肿瘤外科中的应用,不仅包括头颈部肿瘤的早期诊断和放射性骨坏死的鉴别,还可以辅助确定恶性肿瘤手术切除的范围、移植皮瓣术后血供的监测以及化疗药物病灶内浓度的评估等。但是,目前由于技术原因所限,实验室级拉曼光谱仪尚不能直接用于肿瘤组织活体原位检测,而配备了光

纤探头的便携式拉曼光谱仪用于临床原位检测尚不能达到满意的信号强度。相信随着技术的不断改进,拉曼光谱技术终将会在头颈肿瘤外科领域表现出巨大潜力,拥有广泛的应用前景。

参考文献

- 1 Swinson B, Jerjes W, El - Maaytah M, *et al.* Optiocal techniques in diagnosis of head and neck malignancy. *Oral Oncol*,2006,42(3):221 - 228
- 2 Tunnell JW, Haka AS, McGee SA, *et al.* Diagnostic tissue spectroscopy and its applications to gastrointestinal endoscopy. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy* 2003, 5(2):65 - 73
- 3 Wills H, Kast R, Stewart C, *et al.* Diagnosis of wilms' tumor using near - infrared Raman spectroscopy. *Journal of Pediatric Surgery*, 2009,44:1151 - 1158
- 4 Hogiu SW, Weeks T, Huser T. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy from single cells to humans. *Current Opinion in Biotechnology*,2009,20:63 - 73
- 5 Short KW, Carpenter S, Freyer JP, *et al.* Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell culture. *Biophysical Journal*,2005,88: 4274 - 4288
- 6 Manoharan R, Wang Y, Feld MS, *et al.* Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*,1996,52:215 - 249
- 7 Wills H, Kast R, Stewart C, *et al.* Raman spectroscopy detects and distinguishes neuroblastoma and related tissues in fresh and (banked) frozen specimens. *Journal of Pediatric Surgery*,2009,44:386 - 391
- 8 Lau DP, Huang Z, Lui H, *et al.* Raman spectroscopy for optical diagnosis in normal and cancerous tissue of the nasopharynx - preliminary findings. *Lasers in surgery and medicine*,2003,32:210 - 214
- 9 Nijssen A, Schut TCB, Heule F, *et al.* Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. *J Invest Dermatol*,2002,119:64 - 69

- 10 Das Kaustuv, Stone Nicholas, Kendall Catherine. Raman spectroscopy of parathyroid tissue pathology. *Lasers Med Sci*,2006,21:192 - 197
- 11 Oliveira AP, Bitar RA, Silveira L, *et al.* Near - infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis. *Photomedicine and Laser surgery*,2006,24(3):348 - 353
- 12 Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J, *et al.* Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. *Biopolymers*,2006, 81:179 - 193
- 13 Schut TCB, Witijes MJH, Sterenborg HJCM, *et al.* In vivo detection of dysplastic tissues by Raman spectroscopy. *Anal Chem*,2000,72:6010 - 6018
- 14 Li Y, Wen ZN, Li LJ, *et al.* Research on the Raman spectral character and diagnostic value of squamous cell carcinoma of oral mucosa. *Journal of Raman spectroscopy*,2010,41:142 - 147
- 15 Harris AT, Lungari A, Needham CJ, *et al.* Potential for Raman spectroscopy to provide cancer screening using a peripheral blood sample. *Head and Neck Oncology*,2009,1:34
- 16 Feng SY, Chen R, Lin JQ, *et al.* Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface - enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biosensors and Bioelectronics*,2010,25:2414 - 2419
- 17 McCreddie BR, Morris MD, Chen Tso - ching, *et al.* Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture. *Bone*,2006,39:1190 - 1195
- 18 Draper ER, Morris MD, Camacho NP, *et al.* Novel assessment of bone using time - resolved transcutaneous raman spectroscopy. *J Bone Miner Res*,2005,20(11):1968 - 1972
- 19 Lakshmi RJ, Alexander M, Kurien J, *et al.* Osteoradionecrosis (ORN) of the mandible: a laser Raman spectroscopic study. *Applied spectroscopy*,2003,57(9): 1100 - 1116

(收稿:2011 - 01 - 21)

(接第 16 页)

- 6 Reed SD, Cushing - Haugen KL, Daling JR, *et al.* Postmenopausal estrogen and progestogen therapy and the risk of uterine leiomyomas. *Menopause*, 2004, 11(2): 214 - 222
- 7 Polatti F, Viazzi F, Colleoni R, *et al.* Uterine myoma in postmenopause: a comparison between two therapeutic schedules of HRT. *Maturitas*, 2000, 37(1): 27 - 32
- 8 Palomba S, Sena T, Morelli M, *et al.* Effect of different doses of progestin on uterine leiomyomas in postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2002, 102(2): 199 - 201
- 9 Friedman AJ, Daly M, Juneau - Norcross M, *et al.* Long - term medical therapy for leiomyomata uteri: a prospective, randomized study of leuprolide acetate depot plus either oestrogen - progestin or progestin 'add - back' for 2 years. *Hum Reprod*, 1994, 9(9): 1618 - 1625
- 10 Palomba S, Sena T, Noia R, *et al.* Transdermal hormone replacement therapy in postmenopausal women with uterine leiomyomas. *Obstet Gynecol*, 2001, 98(6): 1053 - 1058
- 11 Sener AB, Se? kin NC, Ozmen S, *et al.* The effects of hormone replacement therapy on uterine fibroids in postmenopausal women. *Fertil Steril*, 1996, 65(2): 354 - 357

- 12 Yang CH, Lee JN, Hsu SC, *et al.* Effect of hormone replacement therapy on uterine fibroids in postmenopausal women—a 3 - year study. *Maturitas*, 2002, 43(1): 35 - 39
- 13 Fedele L, Bianchi S, Raffaelli R, *et al.* A randomized study of the effects of tibolone and transdermal estrogen replacement therapy in postmenopausal women with uterine myomas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000, 88(1): 91 - 94
- 14 Gregoriou O, Konidaris S, Botsis D, *et al.* Long term effects of Tibolone on postmenopausal women with uterine myomas. *Maturitas*, 2001, 40(1): 95 - 99
- 15 Pinkerton JV, Goldstein SR. Endometrial safety: a key hurdle for selective estrogen receptor modulators in development. *Menopause*, 2010, 17(3): 642 - 653
- 16 Spitz IM. Clinical utility of progesterone receptor modulators and their effect on the endometrium. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2009, 21(4): 318 - 324
- 17 Gavai M, Berkes E, Takacs ZF, *et al.* Can myomectomy be suggested for perimenopausal women before administering hormone replacement therapy? *Maturitas*, 2007, 58(1): 107 - 110

(收稿:2010 - 12 - 20)