

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.32.038

人体血液拉曼光谱在癌症检测中的应用*

张明¹综述,高飞¹,罗果^{2△},朱绍玲³审校

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

[关键词] 光谱;肿瘤;生物大分子;蛋白质;表面增强拉曼散射

[中图分类号] O657.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)32-4579-03

癌症是危害人类健康的最主要“杀手”之一。目前,全球每年约有数以千万计人被确诊为癌症,数百万人被癌症夺去生命。不管是发达国家还是发展中国家,癌症发病率都呈现出高发态势。由于我国人口基数大,医疗卫生基础相对不发的,造成了我国癌症发病人数和病死率都高。据 2014 年世界卫生组织在《全球癌症报告 2014》中称:中国新增癌症病例高居第一位,死亡病例世界第一^[1-2]。由于癌症在早期症状不是很明显,当发现确诊为癌症时,往往已经是中晚期了,因此对癌症进行早期的筛查,做到早诊断、早治疗是可以显著提高癌症患者的生存率的,这就需要不断研究和开发关于癌症筛查和早期诊断的方法。

目前,癌症的诊断方法主要有 X 射线摄影、超声检查、CT 检查、MRI 检查、内窥镜检查、组织细胞活检以及相关肿瘤标志物的检出等^[3-4]。采用超声影像诊断的方法通常可以发现具有一定大小的肿瘤包块,内窥镜检查可以发现消化系统及妇科的一些肿瘤,再结合进一步的组织细胞活检来确诊是否是癌症,而通常发现也已经错过了最佳治疗时期。临床研究表明,肿瘤在其代谢过程中会出现一些相关产物可用于作为肿瘤标志物,例如血清癌胚抗原(CEA),正常值小于等于 $3.45 \mu\text{g/L}$,发现在胃癌、肺癌、尿道癌、宫颈癌、卵巢癌等多种癌症患者中出现了 CEA 升高,其中结肠癌患者最为明显;甲胎蛋白(AFP)是最早发现的肿瘤标志物,也是经美国食品药品监督管理局认证的肝癌血清诊断标志物,常用于原发性肝癌的筛选;前列腺特异抗原(PSA),正常值小于 $4 \mu\text{g/L}$,在前列腺癌中,30%~86%的患者都出现了 PSA 的升高。采用单个肿瘤标志物进行判别时,得到的阳性预测值和阴性预测值都不高,从而判别的正确率较低。另外,某些肿瘤标志物在某些生理情况下或其他疾病也可以异常升高,需注意鉴别。采用以上诊断方法也就存在一定的缺陷,如特异性及灵敏度低,操作复杂,有创伤,费用高等,所以研究一种快速、简便、安全的早期癌症检测方法可以为癌症筛查和诊断开辟一条新的途径。

拉曼光谱技术是印度科学家拉曼(C. A. Raman)在研究单色光通过纯苯溶液的散射时,发现了有极少的散射光子出现了频移(拉曼散射)并在此基础上逐渐发展起来的一种分子光谱技术。水的拉曼散射十分微弱,将实验样品溶于水后基本不受其干扰,从而拉曼光谱技术被广泛应用于水溶性分子的研究中,获得分子结构和信息。从生物医学角度,构成细胞的蛋白质、核酸、脂类和糖类大分子都是水溶性的,因此拉曼光谱适合于生物大分子的光谱研究,包括生物大分子的二级结构,如

分子基团如氨基、羧基、芳环和二硫键等,其中值得注意的是,对于维持蛋白质等生物大分子高级结构和化学功能具有重要意义的二硫键,在红外吸收光谱中显示很弱,而在拉曼散射光谱中却有较强的信号。但是生物大分子的拉曼光谱也存在一个问题,散射截面很小,造成拉曼散射的强度就比较微弱,如果要获得较强的拉曼光谱强度就需要通过提高激发光源的功率或者延长取谱时间,而用大功率的激光光源照射样品,往往会样品造成一定的损伤且易受到样品本身自体荧光的干扰,从而影响到对光谱的检测和分析,一定程度上限制了该项技术在生物医学中的应用和发展^[5]。直到 1974 年,Fleischmann 等^[6]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 10^6 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^[7],这就使得这种表面增强拉曼散射光谱技术可以成为研究生物大分子的重要手段^[8]。

人体是由大量水分构成,水分占到了体质量的 50%~80%,主要以体液形式存在,包括血液、尿液、唾液和淋巴液等以及存在于细胞质中。体液检测又以血液检测应用得最多,如对血液中低密度胆固醇含量的检测可以判断心血管方面的健康状况,对血液中葡萄糖水平的检测可以用于监测糖尿病患者的状况等。血液是由血浆和血细胞组成,血细胞包括白细胞、红细胞和血小板,血浆中的水占到了 90%~92%,其余为血浆蛋白,血浆蛋白以白蛋白、球蛋白和纤维蛋白为主,并且这 3 类蛋白都为亲水胶体。除此以外,血浆中还含有游离态 DNA、无机盐、脂肪、糖类和激素等化学成分,这些成分的变化都可以反映机体的健康状况。但在利用血浆进行检测时,往往需要加入抗凝剂,造成一些干扰。血细胞中以红细胞为主,红细胞中富含血红蛋白,占到了细胞质量的 32%,脂类、糖类和各种电介质占 4%,其余为水。血红蛋白有珠蛋白和亚铁蛋白组成,血红蛋白在氧浓度高的地方与氧结合形成氧合血红蛋白,在氧浓度低的地方与氧脱离,变为还原血红蛋白。另外,在对血液检测中,经常会提取血清进行分析,血清是新鲜血液在不加入任何抗凝剂的情况下,自然凝固后分离出的淡黄色透明液体,也可通过血浆去除纤维蛋白原而获得。运用血清检测最大的好处就是可以避免抗凝剂的干扰。血清中包含蛋白质、脂肪、糖类、无机盐和和维生素等营养成分以及抗体(免疫球蛋白)。因此通过对血液样品的成分检测可以获得大量关于生物大分子及其基团的振动光谱信息,这些信息可以反映人体在癌变过程中

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460204);遵义医学院硕士启动基金(F-638)。 作者简介:张明(1980-),副教授,硕士,主要从事生物医学光谱学方面的研究。 △ 通讯作者,E-mail:lozens@126.com。

生物分子在构象和数量上发生的某种变化,从而在生物医学上有着重要的意义。

1 以血液为样本的相关研究

1.1 血清样本研究 叶慧帆等^[9]对 20 例卵巢癌患者的血清样本通过激光共聚焦显微拉曼光谱仪进行光谱研究,与健康志愿者进行对比分析。两组血清样本的光谱分别取平均值后,在同一图层中可以进行比较。发现实验组和对照组的光谱形态和谱峰基本相似,但在有些谱峰位置,卵巢癌患者的拉曼光谱强度明显要低于健康人,这些谱峰位于 1 010、1 158、1 283、1 520、1 646、2 307 和 2 661 cm^{-1} 拉曼位移处^[9];而在除此之外的其他谱峰实验组血清的拉曼光谱强度又均高于健康人的。潘建基等^[10]在对血清拉曼光谱研究中发现 900~1 000 cm^{-1} 和 1 600~1 700 cm^{-1} 的两个区间,实验组鼻咽癌患者血清的拉曼光谱强度要低于对照组的;但在 1 200~1 400 cm^{-1} 处,对照组血清的拉曼光谱强度又要低于实验组鼻咽癌患者^[10]。利用 SPSS 软件对实验组鼻咽癌患者与对照组进行主成分分析,经过处理后,在两组光谱中获得 7 个主成分得分,选取具有显著差异的主成分进行判别分析,可得出两组血清样品的灵敏度为 89.7%,特异性为 91.7%,总判别正确率为 90.7%。刘仁明等^[11]对肝癌患者血清的研究表明,实验组肝癌患者血清的拉曼光谱在有些谱峰位置相对于对照组变得很微弱,甚至消失,这些位置位于 630、720、812 和 1 578 cm^{-1} 处^[11],另外在实验组中有几个谱峰相对于对照组发生了一定的频移,比较明显的在 1 130 cm^{-1} 和 1 204 cm^{-1} 处的谱峰,肝癌患者就分别蓝移到 1 135 cm^{-1} 和 1 269 cm^{-1} 处,除此之外,实验组在 558 cm^{-1} 附近出现了一个新的谱峰,可作为肝癌患者的特征峰来考虑。

1.2 血浆样本研究 冯尚源等^[12]通过对采集来的 32 例胃癌患者的新鲜血液加入抗凝剂后,离心去除血细胞后获得血浆样本进行拉曼光谱研究。通过实验组与对照组的拉曼光谱的比较,发现实验组胃癌患者血浆的拉曼光谱存在着 3 个谱峰强度明显高于对照组,这些谱峰分别位于 1 330、1 445、1 580 cm^{-1} 。通过对谱峰归属的进一步研究,1 330 cm^{-1} 的谱峰归属于血浆中游离态的核酸,说明胃癌患者血浆中的核酸相对于健康人要高,从而可以用来检测癌症的发生与发展。而 1 445 cm^{-1} 谱峰则归属于胶原或磷脂 C-H 键的弯曲振动,在相关研究文献中,该谱峰曾作为胃癌患者的特征峰来考虑^[12]。1 580 cm^{-1} 的谱峰则归属于苯基丙氨酸 C=C 的弯曲振动,表面实验组胃癌患者血浆中的苯基丙氨酸相对于健康人要高。但在其他 5 个谱峰位置,胃癌患者血浆的拉曼光谱强度明显要低于健康人对照组,这些谱峰位于 589、638、813、1 134 cm^{-1} 处^[12]。这些谱峰主要归属于糖类和氨基酸,说明胃癌患者在癌变过程中造成体内糖类和氨基酸的消耗比较大,造成血浆中的含量减少。再利用 SPSS 软件对实验组与对照组进行统计分析,可获得诊断特异性与灵敏度可以分别为到 91% 与 79.5%,总判别正确率为 85.2%。

1.3 血细胞样本研究 乔世宝等^[13]对 7 例白血病患者血液中的红细胞的拉曼光谱进行研究,通过实验组白血病患者红细胞与健康人的拉曼光谱的对照发现,两组光谱具有八个明显的谱峰,其中位于 1 385 cm^{-1} 的谱峰,实验组相对于对照组强度明显减弱甚至消失,而 1 425 cm^{-1} 的谱峰却变宽,变强。周雪等^[14]应用血红蛋白的拉曼光谱进行食管癌诊断的研究发现,实验组食管癌患者的光谱强度相对于健康人要弱,特别是在位于 1 562 cm^{-1} 谱峰处;另外,对照组血红蛋白拉曼光谱在 1 639

cm^{-1} 处的光谱强度明显比 1 591 cm^{-1} 处要大,而对于实验组食管癌患者来说,这两处谱峰的强度非常接近。

熊洋等^[15]通过与遵义医学院基础医学院及其附属医院合作,利用宫颈癌患者的氧合血红蛋白开展基于表面增强拉曼散射的光谱研究。图 1 为两组氧合血红蛋白平均拉曼光谱 A 及经过平滑处理后 B 的对比图,可以看出光谱主要存在 9 个谱峰,但实验组宫颈癌患者的谱峰强度明显要比健康人要弱,并且在 662、720 和 815 cm^{-1} 的位置,实验组的谱峰基本消失;除此之外,实验组的一些谱峰相对于对照组来说也发生了较明显的频移。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 3 个 PCA 得分 PC1、PC1 和 PC3^[15],利用此 3 个 PCA 得分做出的 SERS 光谱 PCA 得分三维散点图可以很好的区分健康女性和宫颈癌患者,诊断的特异性与灵敏度^[16]都分别为 81.8% 和 86.4%,总判别正确率为 84.1%。

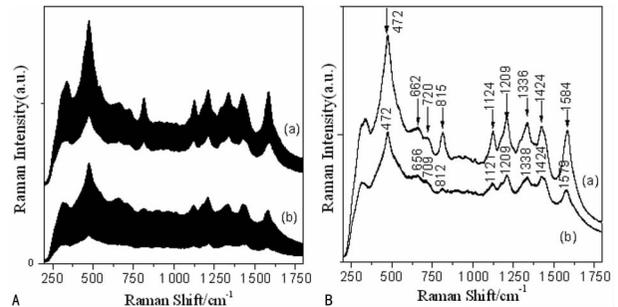


图 1 对照组(a)和实验组(b)的氧合血红蛋白平均 SERS 光谱对比图

2 展 望

通过对人体血液样本中血清、血浆和红细胞拉曼光谱的研究等方面做了综述,表明拉曼光谱技术在临床上检测早期癌症具有一定的发展前景。由于血液样品包含有大量有关人体健康状况的生物大分子信息且易于采集,决定了通过利用血液的拉曼光谱分析可以筛查癌症的可行性。但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。随着拉曼光谱技术的不断成熟和完善,该项技术将会有重大突破。目前对生物大分子的拉曼光谱研究一般都需要采用表面增强技术,也就是自制表面增强基底,基底的自制主要采用一些纳米级的金属微粒子,如金、银等吸附在载玻片上,然后再对样品进行检测。但对最适合于水溶生物大分子的表面增强基底没有统一的技术标准。最重要的是由于该研究处于分散研究状况,采用的样品独立,癌症类型独立,研究方法也有差异,采集的实验组数据独立且很分散,光谱研究人员不能和临床医院开展大数据的采集研究,形成具有真正价值的数据库及诊断标准。从临床诊断上,拉曼光谱技术筛查与其他临床诊断技术相结合,全面完整地解析癌症信息,充分发挥其简便、快捷、无损的特点,可以作为癌症早期筛查的重要手段。

参考文献

- [1] Noh MS, Jun BH, Kim S, et al. Magnetic surface-enhanced Raman spectroscopic (M-SERS) dots for the identification of bronchioalveolar stem cells in normal and lung cancer mice [J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (23/24): 3915-3925.
- [2] Liu Y, Wang M. Advances in early diagnosis of lung cancer[J]. *Chinese J Lung Cancer*, 2011, 14(5): 429-434.

- [3] Lee SM, Park CM, Paeng JC, et al. Accuracy and predictive features of FDG-PET/CT and CT for diagnosis of lymph node metastasis of T1 non-small-cell lung cancer manifesting as a subsolid nodule[J]. Eur Radiol, 2012, 22(7):1556-1563.
- [4] 刘振华, 徐美金. 恶性肿瘤研究的现状和对策[J]. 人民军医, 2002, 45(5):269-270.
- [5] Qi D, Berger AJ. Chemical concentration measurement in blood serum and urine samples using liquid-core optical fiber Raman spectroscopy[J]. Appl Opt, 2007, 46(10):1726-1734.
- [6] Fleishchmann M, Hendra PJ, Mcquillan AJ. Raman spectra of pyridine absorbed at Silver electrode[J]. Chem Phys Lett, 1974, 26(2):163-166.
- [7] Han HW, Yan XL, Ban G, et al. Surface-Enhanced Raman spectra analysis of serum from diabetes mellitus and complication[J]. Acta Optica Sinica, 2010, 30(1):102-104.
- [8] 刘仁明, 自兴发, 武延春, 等. 二维纳米结构银膜表面增强拉曼散射基底的制备与研究[J]. 中国激光, 2009, 36(10):2657-2661.
- [9] 叶慧帆, 王艳云, 刘力山, 等. 卵巢癌患者血清的拉曼光谱研究初探[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(12):2309-2310, 2301.
- [10] 潘建基, 陈奇松, 黄伟, 等. 血清拉曼光谱检测在鼻咽癌早期诊断中的应用价值研究[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(9):708-712.
- [11] 刘仁明, 刘瑞明, 武延春, 等. 基于新型 NIR-SERS 基底的肝癌血清 NIR-SERS 光谱研究[J]. 光学学报, 2011, 31(6):277-282.
- [12] 冯尚源, 潘建基, 伍严安, 等. 基于 SERS 技术结合多变量统计分析胃癌患者血浆拉曼光谱[J]. 中国科学(生命科学), 2011, 41(7):550-557.
- [13] 乔世宝, 康颐璞, 司民真. 人血红细胞在纳米银膜上的表面增强拉曼光谱研究[J]. 光散射学报, 2010, 22(2):133-136.
- [14] 周雪, 陈光意, 张建民, 等. 应用血红蛋白的拉曼光谱进行食管癌诊断的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(11):2989-2992.
- [15] 熊洋, 司民真, 高飞, 等. 基于 NIR-SERS 技术分析宫颈癌联合血红蛋白拉曼光谱[J]. 中国激光, 2015, 42(1):332-341.
- [16] 熊洋, 李云涛, 郭燕, 等. 结合多变量统计分析肝癌患者联合血红蛋白 SERS 光谱[J]. 光谱学与光谱分析[J], 2012, 32(9):2427-2432.

(收稿日期:2016-05-08 修回日期:2016-08-06)

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.32.039

骨膜蛋白在肿瘤中的作用研究进展*

赵佐芳¹, 刘英²综述, 王大庆^{3△}审校

(1. 川北医学院眼视光学系, 四川南充 637000; 2. 川北医学院口腔医学系, 四川南充 637000;
3. 川北医学院附属医院眼科, 四川南充 637000)

[关键词] 骨膜蛋白; 肿瘤; 上皮-间质转化

[中图分类号] R735

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)32-4581-04

骨膜蛋白 (periostin, POSTN 或 PN) 最早是 Takeshita 等^[1]在鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 的 cDNA 文库中通过减法杂交和微分筛选技术发现和鉴定的一种新型骨黏附分子, 主要由成骨细胞及其前体分泌产生并在骨形成中起重要作用, 被称为成骨细胞特异性因子 2 (osteoblast-specific factor-2, OSF-2)。由于它在骨膜和牙周韧带的定位表达及其在骨和牙齿的形成和结构维持中扮演重要角色, 故被命名为“骨膜蛋白”^[2]。

骨膜蛋白为含有 811 个氨基酸残基的蛋白质, 相对分子量约为 90.2×10^3 , 主要是由成骨细胞及其前体分泌产生的, 后来发现也可由肿瘤细胞及肿瘤间质细胞分泌^[3]。骨膜蛋白属于成束蛋白家族成员, 虽与昆虫细胞黏附分子成束蛋白 1 (fasciclin I) 具有同源性蛋白结构, 但没有糖基磷脂酰乙醇脂质膜锚定点, 是一种分泌性的细胞外基质蛋白^[1]。它包含 NH₂-末端信号肽序列、半胱氨酸结构域、特征性的 4 个同源重复结构域和亲水性的 COOH-结构域四部分结构; 其中氨基端结构高度保守, 通过同源重复结构 (FAS 结构域) 绑定细胞质

膜整合素参与对细胞功能进行调节, 羧基端存在同型异构, 通过黏合细胞外基质蛋白 (ECM) 调节细胞外基质的组成与相互作用^[4]。

1 人骨膜蛋白的分布、功能与调节因子

人骨膜蛋白含有 836 个氨基酸残基, 相对分子量约为 93.3×10^3 , 基因约为 36 kb, 定位于染色体 13q13.3, 与鼠的氨基酸同源性约为 89.2%, 具有高度保守性。目前发现的人类组织中骨膜蛋白共有 8 种同源异构体, 其不同的表达方式与人体组织的发育^[5]和某些肿瘤的发生发展^[6]密切相关。Tilman 等^[7]发现骨膜蛋白在人体多种正常组织中表达, 表达量可能与组织纤维原细胞数量呈正相关, 如人外周血和脾脏极低表达, 唾液腺和胸腺低表达, 皮肤、乳腺和卵巢高表达且波动性显著, 而胰腺、肝脏、淋巴结、肺、结肠的组织表达较均匀。在功能上, 骨膜蛋白不仅参与了骨、牙齿、心脏等组织的形成与结构的维持, 还在体内机械应力增加时, 获得性地高表达于富含胶原纤维的缔结组织, 促进组织损伤修复与重塑, 参与了人体的病理