

## 采用氧合血红蛋白吸收带的漫反射光谱 比率 $R_{540}/R_{575}$ 检测浅表性膀胱癌

魏华江<sup>1</sup>, 邢 达<sup>1\*</sup>, 巫国勇<sup>2</sup>, 鲁建军<sup>2</sup>, 吴荣海<sup>3</sup>, 谷怀民<sup>1</sup>, 何博华<sup>4</sup>, 陈雪梅<sup>5</sup>

1. 华南师范大学激光生命科学研究所, 暨激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631
2. 中山大学第一附属医院心胸外科, 广东 广州 510080
3. 广东省江门市中心医院泌尿外科, 广东 江门 529071
4. 广东药学院临床医学系外科, 广东 广州 510224
5. 中山大学第一附属医院眼科, 广东 广州 510080

**摘 要** 采用氧合血红蛋白在 540 和 575 nm 吸收带的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 对人浅表性膀胱癌进行了鉴别诊断, 实验采用带积分球附件的分光光度计获取组织的漫反射光谱。结果表明: 正常膀胱的粘膜/粘膜下层组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 在组织离体后 2 h 的平均值为 111 %, 3 h 的平均值为 107 %, 4 h 的平均值为 104 %, 5 h 的平均值为 102 %, 而浅表性的膀胱癌的粘膜/粘膜下层组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 在组织离体后 2 h 的平均值为 98.4 %, 3 h 的平均值为 95.5 %, 4 h 的平均值为 93.1 %, 5 h 的平均值为 91.6 %, 正常膀胱与浅表性膀胱癌的粘膜/粘膜下层组织在组织离体后 2, 3, 4 和 5 h 的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 均有显著性的差异 ( $p < 0.05$ ), 分别为 12.6 %, 11.5 %, 10.9 % 和 10.4 %。这结论为快速、低成本、非入侵的浅表性膀胱癌的光活检提供了一种新的方法。

**关键词** 浅表性膀胱癌诊断; 漫反射光谱; 漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ); 血红蛋白吸收峰

**中图分类号:** R73-3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)11-2721-05

### 引 言

早期探测膀胱组织癌变对于改善病人的生活质量及提高生存率是极其重要的, 以非入侵光学法早期探测人体器官组织的病变一直是生物医学光子学的热点课题, 其中漫反射光谱法以其低成本、快速、非入侵的优点为诊断人体器官组织粘膜的恶性损伤提供了极其有利的重要手段。Mourant 等利用恶性的膀胱癌组织和非恶性的膀胱组织细胞的核质比率的差异导致其对 330 和 370 nm 波长的漫反射光的差异鉴别诊断膀胱的恶化, 其灵敏度达到 100 % 而特异性达到 97 %<sup>[1]</sup>。Ge 等利用氧合血红蛋白和去氧血红蛋白的吸收峰的强度通过算法去鉴别诊断结肠肿瘤和非结肠肿瘤组织, 灵敏度达到 86 % 而特异性达到 84 %<sup>[2]</sup>。Feld 采用漫反射光谱进行了 Barrett's 食管病理学检测, 检测结果与 4 位病理学家的诊断结果比较达到 71 % 的一致性<sup>[3]</sup>。Zonios 等使用一个合适的分析模型及所获取的人腺癌的结肠息肉组织的漫反射光的实

验数据, 结果表明, 人腺癌的结肠息肉组织的漫反射光的差异归因于组织中的血红蛋白的浓度及组织中的有效散射体的线度<sup>[4]</sup>。Sokolov 等为减少组织中的血红蛋白的吸收的影响, 采用偏振的弹性光散射光谱对子宫颈和口腔粘膜组织作活检<sup>[5]</sup>。Utizinger 等研究了卵巢癌组织在 530 至 585 nm 范围的漫反射光谱曲线的斜率, 结果表明, 在 510 至 530 nm 范围的卵巢癌组织的漫反射光谱的斜率主要受组织中的氧合血红蛋白和去氧血红蛋白的吸收的影响, 其研究结果为鉴别诊断卵巢癌提供了极其有用的信息<sup>[6]</sup>。漫反射光谱能很好地呈现出组织中的血红蛋白在 430, 542 和 577 nm 波长处的吸收谷, 研究表明, 恶性的组织以及癌变前的损伤组织由于其微脉管的不断增多而导致这些恶性的组织及癌变前的损伤组织中的血红蛋白的含量也显著地增多<sup>[7]</sup>。最新近的研究由 Subhash 等提出的利用氧合血红蛋白的吸收波段、540 ~ 575 nm 光谱范围的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 鉴别诊断离体的口腔鳞状上皮细胞癌的粘膜组织, 研究表明, 不同的口腔鳞状上皮细胞癌变程度的粘膜组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 与

收稿日期: 2007-09-08, 修订日期: 2007-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470494, 30627003, 60678050)和广东省自然科学基金项目(015012)资助

作者简介: 魏华江, 1961 年生, 华南师范大学激光生命科学研究所副教授 e-mail: weihj@scnu.edu.cn

\*通讯联系人 e-mail: xingda@scnu.edu.cn

正常的口腔粘膜组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 都具有显著性的差异 ( $p < 0.05$ ), 其研究结果提示, 漫反射光谱比率技术 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 如果结合内窥镜技术应用于口腔癌和子宫颈癌以及人体内脏的浅表肿瘤组织的鉴别诊断将潜在极其重大的应用前景<sup>[3]</sup>。膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 在尿路上皮肿瘤中的发病率一直占首位, 其中 90% 以上为移行细胞癌, 首诊时约 70% ~ 80% 为浅表性膀胱肿瘤<sup>[8]</sup>。研究表明, 癌症的 85% 以上都起源于人体的内表面的上皮内层组织, 大多数这些上皮内层组织的损伤如果能在早期得以确诊是容易治疗的<sup>[9]</sup>。膀胱癌是常见的泌尿系统恶性肿瘤, 早期病变多发生在粘膜层, 然后逐渐向粘膜下层及更深层组织入侵<sup>[10]</sup>, 研究表明, 人膀胱上皮内层、粘膜及粘膜下层组织的损伤常常是导致膀胱病变的原因<sup>[11]</sup>。可见, 膀胱癌的早期诊断及早期治疗具有极其重要的意义。本文尝试采用氧合血红蛋白在 540 和 575 nm 吸收带的漫反射光谱比率技术 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 鉴别诊断人浅表性膀胱癌, 并对实验结果作了详细的分析和定量比较, 为非侵入光学法<sup>[12-21]</sup>鉴别诊断浅表性膀胱癌提供一点有益的参考数据。

## 1 实验部分

### 1.1 材料和样品的制备

实验用组织样品来自 9 个手术切除的人新鲜离体浅表性膀胱癌组织及其邻近的正常膀胱组织, 每个手术切除的膀胱组织样品被立即用生理盐水作简单冲洗, 洗掉表面的血液, 并尽快将样品用生理盐水保存, 放至超低温 ( $-75^{\circ}\text{C}$ ) 冰箱速冻冷藏。实验前, 将所有组织样品用冰冻切片器切割, 生成 9 个面积为  $20\text{ mm} \times 25\text{ mm}$ 、厚度为  $(12.56 \pm 0.36)\text{ mm}$  的浅表性膀胱癌组织样品的自然厚度 (平均值) 以及生成 9 个面积为  $20\text{ mm} \times 25\text{ mm}$ 、厚度为  $(10.23 \pm 0.29)\text{ mm}$  的正常膀胱组织样品的自然厚度 (平均值), 然后分别将组织样品在自然状态及室温为  $20^{\circ}\text{C}$  环境下分别进行光学特性的测量, 从手术切除到样品准备和测量全过程在 6 h 内完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 组织漫反射光谱的测量及数据处理

实验采用具有积分球附件的 Lambda 35 紫外-可见分光光度计 (Perkin-Elmer, USA, model: Lambda 35), 该附件中的积分球 (Labsphere, USA, model: RSA-PE-20) 内部直径为 50 mm。分光光度计的狭缝宽度为 2.0 nm, 扫描的波长范围为 300 ~ 900 nm, 测定方式为反射。在积分球的样品反射窗处放置角度为 0 度的样品支架, 将组织样品固定在这个样品支架上, 使得入射光入射到膀胱的粘膜/粘膜下层组织平面上的入射角为 0 度, 积分球所测量的反射率 (不包括镜面反射) 为组织样品的漫反射率  $R_s$ , 移去组织样品并在样品反射窗处放置硫酸钡反射板做参比, 积分球所测量的反射率 (不包括镜面反射) 为百分之百漫反射率  $R_{100}$ , 移开样品反射窗处放置的硫酸钡反射板, 积分球所测量的反射率为零漫反射率  $R_0$ 。9 个浅表性膀胱癌组织样品和 9 个正常膀胱组织样品在同样的实验条件下对膀胱的粘膜/粘膜下层组织进行各项漫反射率的测量, 每个组织样品的测量都使用同一块硫酸

钡标准板作  $R_{100}$  的定标, 将 18 个组织样品分别按照上述过程在 400 ~ 600 nm 光谱范围内重复测量 10 次作统计分析处理。由于硫酸钡标准板的表面的非理想性以及微量的水分, 标准板在这个波长范围的反射率不能达到百分之百的反射率, 为此, 采用商业用的、已知的高反射率标准板 (Lab-sphere, USA, model: SRS-99-010) 作为标准, 用分光光度计对硫酸钡的反射率 ( $R_{\text{BaSO}_4}$ ) 作测量来校准硫酸钡标准板的实际的反射特性<sup>[22]</sup>。实验测量的数据由电子计算机数字化后进行数据处理, 积分球所测量的各项实验数据分别用下列方法进行校准, 组织的漫反射率由下式进行计算<sup>[22]</sup>

$$R_{ds} = (R_s - R_0) / [(R_{100}/R_{\text{BaSO}_4}) - R_0] \quad (1)$$

从实验数据可计算出 9 个正常膀胱和 9 个浅表性膀胱癌的粘膜/粘膜下层组织样品在 400 ~ 600 nm 光谱范围的漫反射率及其平均值。由于考虑到组织样品在外科手术切除后随着组织样品切除时间的延迟, 离体的组织样品会迅速地发生坏死退化, 考虑到离体组织样品的坏死退化的特性, 分别在组织样品手术切除后的 2, 3, 4 和 5 h 重复测量上述的测量实验, 获取了组织样品离体后 2, 3, 4 和 5 h 的漫反射光谱及其平均值, 并分别计算其漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ), 组织样品的漫反射光谱比率的计算方法见文献<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.2 统计学处理方法

组织光学参数以均数和标准差 ( $\bar{X} \pm SD$ ) 表示, 采用  $t$  检验,  $p < 0.05$  为有显著性差异, 利用统计软件 SPSS10 作统计处理。

## 2 结果与讨论

在相同的实验条件下获取了 9 个正常膀胱和 9 个浅表性膀胱癌的粘膜/粘膜下层组织在离体后 2, 3, 4 和 5 h 的、在 400 ~ 600 nm 光谱范围的漫反射率及其平均值。每个组织样品在同样实验条件下被重复测量 10 次来获取每个测量值, 每次测量后便改变样品上被光辐照的光斑位置进行下一次测量, 对于特定的样品和特定的光谱范围以及特定的组织离体时间的测量结果具有很好的重复性, 每一组样品 (例如, 正常膀胱的粘膜/粘膜下层组织) 所有测量得到的组织光学特性参数用 ( $\bar{X} \pm SD$ ) 表示。图 1 和图 2 分别表示正常膀胱和浅表性膀胱癌的粘膜/粘膜下层组织在离体后 2, 3, 4 和 5 h 的、在 400 ~ 600 nm 的漫反射光谱, 图中的所有实验数据的波长间隔取 10 nm, 表 1 列出了 9 个正常膀胱的粘膜/粘膜下层组织样品和 9 个浅表性膀胱癌的粘膜/粘膜下层组织样品在组织离体后不同的离体时间相应的漫反射光谱比率的平均值及其差异。

从实验结果和图 1 和图 2 以及表 1 可见, 在 400 ~ 600 nm, 正常膀胱和浅表性膀胱癌的粘膜/粘膜下层组织的漫反射光谱分别在 415, 542, 577 nm 都处有一个波谷, 其中, 在 415 nm 处的波谷是由组织样品中的氧合血红蛋白和去氧血红蛋白分别在 415 和 430 nm 处的吸收所共同引起的, 在 542 和 577 nm 处的波谷是由组织样品中的氧合血红蛋白以及去氧血红蛋白分别在 542 和 577 nm 以及 555 nm 处的吸收所共同引起的。正常膀胱和浅表性膀胱癌的粘膜/粘膜下层组织

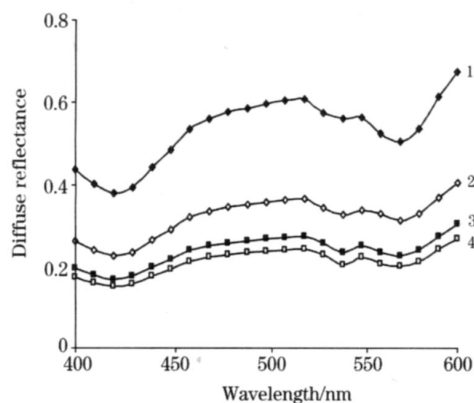


Fig. 1 Diffuse reflectance spectra of normal human bladder mucosa/submucosa tissues in spectral range from 400 to 600 nm

1: 2 h; 2: 3 h; 3: 4 h; 4: 5 h

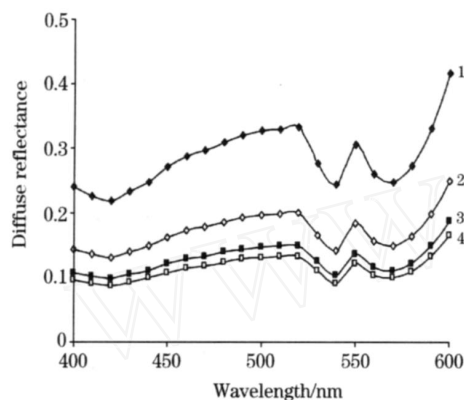


Fig. 2 Diffuse reflectance spectra of superficial human bladder cancer mucosa/submucosa tissues in spectral range from 400 to 600 nm

1: 2 h; 2: 3 h; 3: 4 h; 4: 5 h

Table 1 Mean reflectance spectral ratio  $R_{540}/R_{575}$  of surgically excised normal bladder mucosa/ submucosa tissue and superficial bladder cancer mucosa/ submucosa tissue from 9 patients within 2, 3, 4 and 5 h of tissue removal

| Tissue type                       | N | Period of tissue removal/ h | Mean $R_{540}/R_{575}/\%$ |
|-----------------------------------|---|-----------------------------|---------------------------|
| Normal bladder mucosa             | 9 | 2                           | 111                       |
|                                   |   | 3                           | 107                       |
|                                   |   | 4                           | 104                       |
|                                   |   | 5                           | 102                       |
| Superficial bladder cancer mucosa | 9 | 2                           | 98.4                      |
|                                   |   | 3                           | 95.5                      |
|                                   |   | 4                           | 93.1                      |
|                                   |   | 5                           | 91.6                      |

的漫反射光谱特性主要是受到膀胱组织中的血红蛋白的吸收的影响的, 离体的正常膀胱粘膜/ 粘膜下层组织在离体后的 2, 3, 4 和 5 h 的漫反射光谱的光谱特性是相同的, 但其漫反

射光谱曲线轮廓却是随着组织离体的时间延长而不断地下降, 且其下降的速度是随着时间的延长而逐渐缓慢的, 而离体的浅表性的膀胱粘膜/ 粘膜下层组织在离体后的 2, 3, 4 和 5 h 的漫反射光谱的光谱特性也是相同的, 其漫反射光谱曲线轮廓也是随着组织离体的时间延长而不断地下降, 其下降的速度也是随着时间的延长而逐渐缓慢的, 其漫反射光谱曲线轮廓随离体时间的延长而逐渐缓慢下降的原因主要是受到离体的组织样品不断发生的坏死退化过程中组织的组分的变性的影响, 在受到组织离体后迅速坏死退化变性的影响下, 正常膀胱的粘膜/ 粘膜下层组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 在组织离体后 2 h 的平均值为 111 %, 3 h 的平均值为 107 %, 4 h 的平均值为 104 %, 5 h 的平均值为 102 %, 而浅表性的膀胱癌的粘膜/ 粘膜下层组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 在组织离体后 2 h 的平均值为 98.4 %, 3 h 的平均值为 95.5 %, 4 h 的平均值为 93.1 %, 5 h 的平均值为 91.6 %, 正常膀胱的粘膜/ 粘膜下层组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 的平均值是随着组织离体的时间的延长而逐渐缓慢减小, 且其漫反射光谱比率都是大于百分之百的, 而浅表性膀胱癌的粘膜/ 粘膜下层组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 的平均值也是随着组织离体的时间的延长而逐渐缓慢减小, 但其漫反射光谱比率却是小于百分之百的, 离体的正常膀胱与浅表性膀胱癌的粘膜/ 粘膜下层组织在组织离体后 2, 3, 4 和 5 h 的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 均有显著性的差异 ( $p < 0.05$ ), 正常膀胱与浅表性膀胱癌的粘膜/ 粘膜下层组织在组织离体后 2 h 的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 的差异为 12.6 %, 其在组织离体后 3 h 的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 的差异为 11.5 %, 其在组织离体后 4 h 的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 的差异为 10.9 %, 其在组织离体后 5 h 的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 的差异为 10.4 %。可见, 导致出现这种显著性差异的主要原因之一就是癌变的浅表性膀胱癌的粘膜/ 粘膜下层组织由于其微血管的大量增多导致这些恶性的组织中的血红蛋白的含量也显著地增多<sup>[7]</sup>, 从而导致了正常膀胱与浅表性膀胱癌的粘膜/ 粘膜下层组织对光的吸收强度也存在显著的差异, 致使正常膀胱与浅表性膀胱癌的粘膜/ 粘膜下层组织的漫反射光谱曲线轮廓也存在显著的差异, 具体表现在其漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 的所存在的显著性差异。

### 3 结 论

在 400 ~ 600 nm, 正常膀胱和浅表性膀胱癌的粘膜/ 粘膜下层组织的漫反射光谱分别在 415, 542, 577 nm 都处有一个波谷, 正常膀胱的粘膜/ 粘膜下层组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 在组织离体后 2 h 的平均值为 111 %, 3 h 的平均值为 107 %, 4 h 的平均值为 104 %, 5 h 的平均值为 102 %, 而浅表性的膀胱癌的粘膜/ 粘膜下层组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 在组织离体后 2 h 的平均值为 98.4 %, 3 h 的平均值为 95.5 %, 4 h 的平均值为 93.1 %, 5 h 的平均值为 91.6 %, 正常膀胱的粘膜/ 粘膜下层组织的漫反射光谱比率 ( $R_{540}/R_{575}$ ) 的平均值是随着组织离体的时间的延长而逐渐缓

慢减小,而浅表性膀胱癌的粘膜/粘膜下层组织的漫反射光谱比率( $R_{540}/R_{575}$ )的平均值也是随着组织离体的时间的延长而逐渐缓慢减小,离体的正常膀胱与浅表性膀胱癌的粘膜/粘膜下层组织在组织离体后 2, 3, 4 和 5 h 的漫反射光谱比率( $R_{540}/R_{575}$ )均有显著性的差异( $p < 0.05$ ),分别为 12.6%,

11.5%, 10.9%和 10.4%。这结论为快速、低成本、非入侵的浅表性膀胱癌的光活检提供了一条新思路,同时也为以组织的漫反射光谱鉴别诊断浅表性膀胱组织的病变提供一点有益的参考。

## 参 考 文 献

- [1] Mourant J R, Bigio I J, Boyer J, et al. Lasers Surg. Med., 1995, 17: 350.
- [2] Ge Z, Schomacker K T, Nishioka N S. Appl. Spectrosc., 1998, 52: 833.
- [3] Feld M S. Technical Digest, 1998, 2: 1.
- [4] Zonios G, Perelmann L T, Bacjmann V, et al. Appl. Opt., 1999, 38: 6628.
- [5] Sokolov K, Drezek R, Gossage K, et al. Opt. Express. 1999, 5: 302.
- [6] Utzinger U, Brewer M, Silva E, et al. Lasers Surg. Med., 2001, 28: 56.
- [7] Zijlstra W G, Buursma A, Meeuwse-van der Roest W P. Clinical. Chem., 1991, 37(9): 1633.
- [8] Crawford E D, Wood D P, Petrylak D P, et al. Cancer, 2003, 97(8 Suppl): 2099.
- [9] Kim Y L, Liu Y, Wali R K, et al. IEEE J. Select. Topics Quantum Electronics, 2003, 9: 243.
- [10] Chen D, Song D, Wientjes M G, et al. Clinical Cancer Research, 2003, 9: 363.
- [11] Lu Z, Yeh T K, Tsai M, et al. Clinical Cancer Research, 2004, 10: 7677.
- [12] LI Bu-hong, ZHANG Zhen-xi, XIE Shu-sen, et al(李步洪, 张镇西, 谢树森, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(7): 1310.
- [13] HUANG Bao-hua, CHEN Rong, ZENG Hai-shan, et al(黄宝华, 陈荣, 曾海山, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(1): 95.
- [14] WEI Hua-jiang, GUO Zhou-yi, XIE Shu-sen, et al(魏华江, 郭周义, 谢树森, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(9): 1757.
- [15] WEI Hua-jiang, XING Da, HE Bo-hua, et al(魏华江, 邢达, 何博华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(5): 868.
- [16] FENG Shang-yuan, CHEN Rong, LI Yong-zeng, et al(冯尚源, 陈荣, 李永增, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(5): 712.
- [17] WEI Hua-jiang, XING Da, WU Guo-yong, et al(魏华江, 邢达, 巫国勇, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(11): 1296.
- [18] ZHU Dan, LUO Qing-ming, ZENG Shao-qun, et al(朱丹, 骆清铭, 曾绍群, 等). Acta Optica Sinica(光学学报), 2002, 22(3): 369.
- [19] CHEN Rong, XIE Shu-sen, CHEN Yan-jiao, et al(陈荣, 谢树森, 陈艳娇, 等). J. Optoelectronics · Laser(光电子 · 激光), 2002, 13(1): 92.
- [20] WANG L H. J. Opt. Soc. Am. A, 1998, 15(4): 936.
- [21] Hammer M, Schweitzer D. Phys. Med. Biol., 2002, 47: 179.
- [22] Parsa P, Jacques S L, Nishioka N S. Appl. Opt., 1989, 28(12): 2325.

# Superficial Bladder Cancer Detection Using Diffuse Reflectance Spectral Ratio $R_{540}/R_{575}$ of Oxygenated Hemoglobin Bands

WEI Hua-jiang<sup>1</sup>, XING Da<sup>1\*</sup>, WU Guo-yong<sup>2</sup>, LU Jian-jun<sup>2</sup>, WU Rong-hai<sup>3</sup>, GU Huai-min<sup>1</sup>, HE Bo-hua<sup>4</sup>, CHEN Xue-mei<sup>5</sup>

1. MOE Key Laboratory of Laser Life Science and Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China
2. Department of Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China
3. Department of Urology, Central Hospital of Jiangmen, Jiangmen 529071, China
4. Department of Surgery, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510224, China
5. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China

**Abstract** A low-cost, fast, and noninvasive method for early diagnosis of malignant lesions of mucosa tissue based on diffuse reflectance spectra was applied in the study of the optical biopsy of superficial human bladder cancer. In the present paper, differential diagnosis of superficial human bladder cancer was studied using the diffuse reflectance spectral ratio ( $R_{540}/R_{575}$ ) of the oxygenated hemoglobin absorption bands at 540 and 575 nm *in vitro*. Diffuse reflectance spectra for mucosa/ submucosa tissues of normal bladder and superficial bladder cancer were measured using a spectrophotometer with an integrating sphere attachment. The results of measurement showed that there were three the diffuse reflectance spectral dips at 415, 542 and 577 nm respectively for mucosa/ submucosa tissues of normal bladder and superficial bladder cancer in the spectral range from 400 to 600 nm. The mean diffuse reflectance spectral ratio ( $R_{540}/R_{575}$ ) of normal bladder mucosa/ submucosa tissue decreased slowly with time increase after surgical excision, and the mean diffuse reflectance spectral ratio ( $R_{540}/R_{575}$ ) of superficial bladder cancer mucosa/ submucosa tissue also decreased slowly with time increasing after surgical excision. The mean diffuse reflectance spectral ratios ( $R_{540}/R_{575}$ ) of normal bladder mucosa/ submucosa tissue were 111%, 107%, 104% and 102% after 2, 3, 4 and 5 h after surgical excision respectively, and those of superficial bladder cancer mucosa/ submucosa tissue were 98.4%, 95.5%, 93.1% and 91.6% after 2, 3, 4 and 5 h after surgical excision respectively. There were significant differences in mean diffuse reflectance spectral ratio ( $R_{540}/R_{575}$ ) for mucosa/ submucosa tissues between normal bladder and superficial bladder cancer after 2, 3, 4 and 5 h after surgical excision respectively ( $p < 0.05$ ). Differences in mean diffuse reflectance spectral ratio ( $R_{540}/R_{575}$ ) for mucosa/ submucosa tissues between normal bladder and superficial bladder cancer were 12.6%, 11.5%, 10.9% and 10.4% after 2, 3, 4 and 5 h after surgical excision respectively. It is obvious that pathological changes in bladder mucosa/ submucosa tissues induced changes in the component and structure of the tissues, and especially quantitative changes in oxyhemoglobin and de-oxyhemoglobin of tissues obviously. Conclusion of the study provides a new method that can be applied to rapid, low-cost and noninvasive optical biopsy of superficial bladder cancer.

**Keywords** Superficial bladder cancer diagnosis; Diffuse reflectance spectroscopy; Diffuse reflectance spectral ratio ( $R_{540}/R_{575}$ ); Hemoglobin absorption peaks

(Received Sep. 8, 2007; accepted Dec. 18, 2007)

\* Corresponding author