

鼻咽癌离体组织拉曼光谱的测量

黄伟¹, 潘建基², 陈荣^{1*}, 李永增¹, 冯尚源¹, 谢树森¹, 曾海山³

1. 医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建师范大学, 福建 福州 350007

2. 福建省肿瘤医院, 福建 福州 350001

3. Cancer Imaging Department, BC Cancer Agency, Vancouver, Canada V5Z 1L3

摘要 拉曼光谱分析技术在探测与组织病理学相关的分子变化方面具有特别的潜力和优势, 并且使无损、实时、快速的光学诊断成为可能。采用 785 nm 半导体激光器, 透射式的全息光栅, 背向感光、深度耗尽的 CCD 探测器及特殊设计的光纤拉曼探头构建了一台快速拉曼光谱测试装置。所设计的光纤拉曼探头可在减少荧光信号和瑞利散射影响的同时, 最大限度地收集生物组织的拉曼信号, 同时解决了平面光栅衍射光束的谱线弯曲问题, 提高了仪器的信噪比, 使装置具有较高的灵敏度并可快速测量获得人体组织的近红外拉曼信号。通过新鲜猪肉的脂肪和肌肉组织的拉曼光谱信号的检测, 验证了测试装置的良好性能; 在此基础上, 研究了鼻咽癌组织样品存放时间对拉曼光谱的影响, 并在 1~5 s 时间内快速测量获得了人离体鼻咽癌组织的近红外拉曼光谱。

关键词 拉曼光谱; 鼻咽癌; 离体组织; 快速测量

中图分类号: O657.3, R318.5 **文献标识码**: A **DOI** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)05-1304-04

引言

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是危害人类健康和生命的头颈部癌症之一, 其发病率为耳鼻喉科恶性肿瘤之首。世界大部分地区发病率较低, 一般在 1/10 万以下; 但 80% 的鼻咽癌发生在中国^[1], 其中尤以中国南方各省为高发区。大多数鼻咽癌一旦确诊, 即已进入中晚期。由于鼻咽癌症状无明显特征、病变位置隐蔽等原因, 易造成延误诊断。早期诊断是提高鼻咽癌生存率和降低死亡率的关键。目前, 临床上诊断鼻咽癌主要采用鼻咽镜白光检查术、X 射线检查、CT 检查、核磁共振成像检查、血清学诊断等方法, 而病理学上的诊断主要采用鼻咽癌组织取样活检的方法。然而, 采用这些方法, 仍难以诊断早期癌变。

近年来, 新型半导体激光器、探测器件和光谱分析技术的发展, 促进了激光拉曼光谱技术在生物医学上的应用, 目前已在包括皮肤、肺、胃、乳腺等组织器官上进行了实验和研究^[2-7]。结果表明, 拉曼光谱分析技术在探测与组织病理学相关的分子变化方面具有特别的潜力和优势, 并且使无损、实时、快速的光学诊断成为可能, 已成为当代生物医学

光学领域的研究热点之一。但至今为止, 仍鲜见采用拉曼光谱技术检测鼻咽癌组织的报道。本文报道的是采用近红外拉曼光谱技术, 针对鼻咽癌高发区—福建省的若干患者开展研究的初步结果。

1 实验装置

拉曼光谱仪经历了从色散型拉曼光谱仪开始, 发展到傅里叶变换拉曼光谱仪, 共振拉曼光谱仪, 紫外拉曼光谱仪, 到最近的共聚焦显微拉曼光谱系统等, 其测试精度和灵敏度已有极大的提高。传统的傅里叶变换拉曼光谱仪, 采用 1 064 nm 激光激发, 具有组织穿透较深, 灵敏度高, 避免了荧光的干扰等优点, 但要获得一份高质量的图谱, 其收集时间很长, 一般需要约十几分钟, 并且不适合与光纤联用。要在临床上实现拉曼光谱的快速测量与分析, 系统应具有实时、快速呈现结果的特点, 测量最好能在数秒的时间内完成。近年来, 随着高性能小型化近红外半导体激光器以及高灵敏度 CCD 探测器的发展, 构建小型化、方便临床使用、快速获得拉曼光谱的仪器已经成为可能。

本文以 785 nm 半导体激光, 透射式的全息光栅, 后向照

收稿日期: 2007-10-06, 修订日期: 2008-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (60778046), 福建省科技项目 (2005 J009) 和 the Canadian Institutes of Health Research/National Science Foundation of China International Scientific Exchange Program (60711120031) 资助

作者简介: 黄伟, 1984年生, 福建师范大学物理与光电信息科技学院硕士研究生 *通讯联系人 e-mail: chenr@fjnu.edu.cn

明、深度耗尽的 CCD 探测器及特殊设计的光纤拉曼探头构建了一台快速拉曼光谱测试装置, 装置结构如图 1 所示。其工作原理是: 半导体激光通过光纤、准直系统和带通滤波器 (785 ± 2.5 nm) 以及聚焦透镜照射到组织表面上, 形成约 3.5 mm 的光斑。以上部分作为激发端封装在密闭的镜筒里面, 其和待测样品的角度约为 40° ; 经组织散射后的光通过探测头的收集端和光纤束到达全息光栅光谱仪, 经全息光栅分光产生色散, 形成光谱分布, 最后到达 CCD 探测器, 并被其接收。

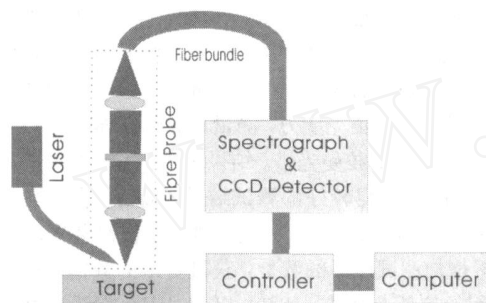


Fig. 1 Schematics of the Raman detection system

采用光纤收集来自探头的光谱信号, 有减少外界干扰、充分聚集信号和适合远距离测量等优点。为尽可能多地收集和传送微弱的拉曼信号, 在 CCD 探测器所能允许的高度范围内, 把多根光纤集合到一起, 形成光纤束。在实际的光谱仪中, 入射狭缝都是有一定高度, 从狭缝上不同点发出的平行光束以不同的角度倾斜入射到光栅面上, 经光栅衍射后的衍射光束会发生谱线弯曲。谱线的弯曲对拉曼信号的收集导致非常不利的影响, 不但降低了光谱仪的分辨率, 还导致了信噪比的下降, 另外还给波长的定标带来困难。为解决这个问题, 在与前面所提的信号收集探头相连接的一端, 多根光纤按圆形排列, 而与光谱仪相连接的一端, 将光纤弧形排列。采用此方法, 很好地解决了光栅衍射光束的谱线弯曲问题, 提高了仪器的信噪比, 并可在 $1 \sim 5$ s 快速测量获得人体组织的近红外拉曼信号 (实验中我们在 $1 \sim 2$ s 时间内也可获较清晰的拉曼信号)。测量时间的减少将有效地降低其他因素的影响, 从而有利于人体组织的测量。

2 组织样品和数据处理方法

所有的组织样品取自福建省肿瘤医院。研究了已确诊为鼻咽癌的 7 例病人的鼻咽癌组织样品。患者的年龄范围从 30 ~ 70 岁之间, 平均年龄为 43 岁。

为了验证仪器的性能, 先后测量了猪脂肪和肌肉组织的拉曼光谱, 研究了组织样品远离激发焦点时, 光谱信号的变化情况, 同时测量鼻咽组织在存放不同时间后, 其光谱信号的变化情况。在完成以上实验并确保仪器性能稳定后, 初步测量获得了鼻咽癌组织的拉曼光谱。

人体组织的荧光光谱非常强, 而拉曼光谱信号仅为荧光信号的万分之一或更低, 因此往往被荧光所淹没。为了更加清晰和明显地表示出拉曼光谱, 研制的实验装置应具有足够

的灵敏度和分辨本领。此外, 正确的数据处理方法也至关重要。本研究中, 利用一个多项式拟合原始数据中的组织自体荧光背景信号, 然后从测得的信号中减去拟合的数据, 以获得拉曼信号^[8, 9]。

3 实验结果与分析

3.1 拉曼光谱检测装置灵敏度测试

为了验证所研发实验装置的灵敏度, 我们先后测试了新鲜猪脂肪、肌肉组织的拉曼光谱 (图 2)。猪脂肪和肌肉组织分别放置在拉曼激发光的聚焦点以及距离焦点约 2, 4, 6 mm 处, 获得图 2(a) 和 (b) 所示结果, 测试时间均为 5 s。相对于焦点处的光谱 [图 2(a) a], [图 2(b) a], 远离焦点处 [图 2(a) b, c, d], [图 2(b) b, c, d] 的光谱虽然在强度上有所下降, 但仍然可以较好的进行分辨与分析, 具有较高的质量。这说明即使远离焦点约 6 mm, 研制的拉曼测试系统仍然具有较好的收集能力和分辨能力, 可以获得较高质量的生物组织的拉曼信号。

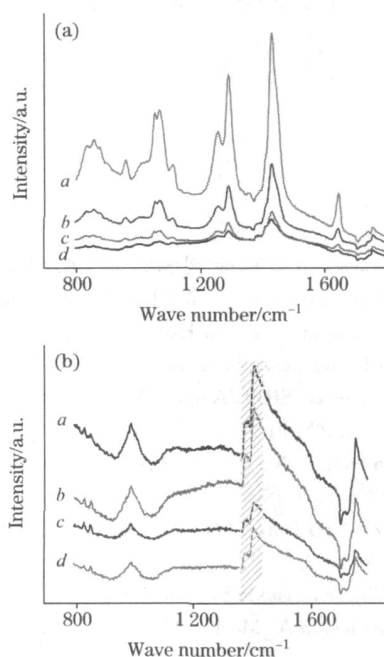


Fig. 2 Raman spectra of pig's (a) fat and (b) muscle tissue ex vivo

a: In focus; b: 2 mm above focus;

c: 4 mm above focus; d: 6 mm above focus

3.2 鼻咽癌离体组织拉曼光谱的测量

样品组织在离体后, 不管是形态上还是功能上, 都会随着时间而有所变化, 这些变化对实验结果带来的误差或者影响程度需要进行研究。我们测量了不同存放时间下, 同一组鼻咽癌离体组织拉曼光谱信号。在取得样品后即进行第一次测量 (约手术后 1 h), 随之每隔 1 h 测量一次, 每次测量 5 s 共测量 4 次, 两次实验间隔期间, 样品存放于冰箱内, 保存温度为 4°C 。实验结果如图 3 所示。随着存放时间的加长,

虽然有些峰位显得更为强烈,但其他部分变得较为平滑而缺少了变化。图 3a 中,虽然 1440 cm^{-1} 等处拉曼峰的强度不如其他谱图中表现的明显,但无论是其拉曼峰的相对强度还是拉曼谱峰的数量,都要较其他 3 个谱图好。从实验结果来看,以在取得样品约 2 h 内效果最好。

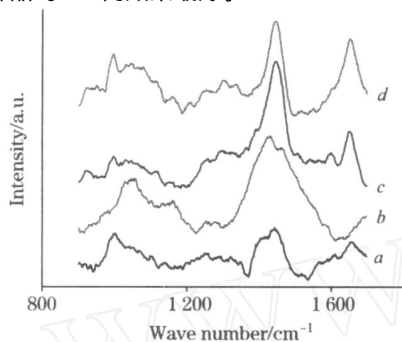


Fig. 3 Raman spectra of nasopharyngeal cancerous tissue at different time after removing from human body

a, b, c, d: Represents the spectra at 1, 2, 3 and 4 h, respectively

4 结果与讨论

本文采用 785 nm 半导体激光,透射式的全息光栅,背向感光、深度耗尽的 CCD 探测器及特殊设计的光纤拉曼探头构建了一台快速拉曼光谱测试装置。所设计的光纤拉曼探头可在减少荧光信号和瑞利散射影响的同时,最大限度地收集生物组织的拉曼信号,而光纤导光系统很好地解决了光栅衍射光束的谱线弯曲问题,提高了仪器的信噪比,使装置具有较高的灵敏度并可快速测量获得人体组织的近红外拉曼信号(时间 1~5 s)。采用研制实验装置,测量了激发光聚焦点及离焦处猪脂肪与肌肉组织的拉曼光谱,验证了测试系统具有较高的灵敏度和集光能力,测量了鼻咽癌样品离开人体 1, 2, 3 和 4 h 后的拉曼光谱。结果表明,缩短被测样品离开人体的时间,可获得较好的测试结果。最后,快速测量获得了鼻咽癌组织的拉曼光谱。我们拟进一步提高装置的灵敏度和性能,增加测试样品的数量,获得更多的数据,并与正常鼻咽组织的拉曼光谱进行比较,以期发现具有统计意义的特征规律,使其有益于鼻咽癌或其他肿瘤的早期诊断与治疗。

致谢:本研究源于陈荣教授 2002 年访问加拿大 BC 癌研究中心期间,在黄志伟博士指导帮助下开展的工作,为此,陈荣教授特向黄志伟博士表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] M N Hua-qing, GUO Xiang (闵华庆, 郭翔). Foreign Medical Sciences, Oncology Section (国外医学肿瘤分册), 2000, 27(1): 11.
- [2] Caspers P J, Lucassen G W, Wolthuis R, et al. Biospectroscopy, 1998, 4: 31.
- [3] Huang Z, Haishan Z, Lilefat Hamzav, et al. Optics Letter, 2001, 26(22): 1782.
- [4] Yamazaki H, Kaminaka S, Kohda E, et al. Radiation Medicine, 2003, 21(1): 1.
- [5] ZHANG Jing-wei, SHEN Ai-guo, WEI Yun, et al (张京伟, 沈爱国, 魏芸, 等). Journal of Biomedical Engineering (生物医学工程学杂志), 2004, 21(6): 910.
- [6] YAN Xun-ling, DONG Rui-xin, WANG Qiu-guo, et al (闫循领, 董瑞新, 王秋国, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(1): 58.
- [7] YU Ge, ZHANG Pan, TAN En-zhong, et al (于戈, 张攀, 谭恩忠, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2007, 27(2): 295.
- [8] Li Y Z, Chen R, Zeng H S, et al. Chin. Opt. Lett., 2007, 5(2): 105.
- [9] Mahadevan-Jansen A, Mitchell M F, Ramanujam N, et al. Photochemistry and Photobiology, 1998, 68: 123.

Measurement of Nasopharyngeal Carcinoma Tissue *ex vivo* by Raman Spectroscopy

HUANG Wei¹, PAN Jian-ji², CHEN Rong^{1*}, LI Yong-zeng¹, FENG Shang-yuan¹, XIE Shu-sen¹, ZENG Hai-shan³

1. Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine (Fujian Normal University), Ministry of Education, Fuzhou 350007, China
2. Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350001, China
3. Cancer Imaging Department, BC Cancer Agency, Vancouver, Canada V5Z 1L3

Abstract Raman spectroscopy has shown its potential and advantages in detecting molecular changes associated with tissue pathology, which makes it possible to diagnose with optical methods non-invasively and real-time. A compact and rapid near-infrared (NIR) Raman system was developed using 785 nm diode laser, volume phase technology (VPT) holographic grating system and NIR intensified charge-coupled device (CCD) with a specially designed Raman fibre probe which can effectively reduce the interference of fluorescence and Rayleigh scattering, maximize the ability of Raman collection as well as correct the image aberration of a planar grating diffraction. Adopting this method, signal-to-noise ratio has been greatly improved and human tissue signals can be acquired in a short time. Raman signals from fat and musculature of fresh pork were measured and referenced for further optimization, then Raman spectra of nasopharyngeal carcinoma *in vitro* and the effect of storage time on them were measured in 1-5 s and discussed. The sensitivities and performance of the system will be further enhanced and more Raman data will be acquired and compared between normal and cancerous nasopharyngeal tissue, expecting to discover the statistical characteristics, which will benefit the diagnosis and treatment of early nasopharyngeal carcinoma or other tumors.

Keywords Raman spectroscopy; Nasopharyngeal carcinoma; Tissue *ex vivo*; Rapid detection

(Received Oct 6, 2007; accepted Jan 8, 2008)

* Corresponding author