

基于小波变换的人血清血卟啉荧光光谱分析法

朱殿明^{1,2}, 杨鸿鹏³, 骆晓森^{2*}, 刘莹², 沈中华², 陆建², 倪晓武²

1. 徐州工业职业技术学院, 江苏 徐州 221006
2. 南京理工大学理学院, 江苏 南京 210094
3. 徐州市第三人民医院, 江苏 徐州 221005

摘要 卟啉是生命活动的重要物质, 原卟啉可做为肿瘤血液标志物。人血清中血卟啉含量很低, 且受多种因素影响。基于小波变换的人血清血卟啉荧光光谱分析法可实现对其弱信号的分辨。用多功能光谱测量系统获取人血清血卟啉荧光光谱, 对获取的荧光光谱通过数次小波变换进行分解, 将噪声与光谱信号分离, 滤波后的荧光光谱进行6次分解后得到了离散逼近信号($a_1 \sim a_6$)和离散细节信号($d_1 \sim d_6$)。信号频率随着分解次数的增加逐步降低。当分解到第6次时, 出现了血卟啉荧光特征峰, 成功地观测到血卟啉的荧光发射峰, 实现了弱信号分辨, 得到了血清中所含血卟啉的准确成份和定量信息, 从而进行定性和定量分析, 为血清荧光光谱用于肿瘤的早期诊断提供了一种方法。

关键词 肿瘤; 血清; 血卟啉; 荧光光谱; 小波变换

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)12-2553-05

引言

肿瘤作为威胁人类健康的重要疾病之一已成为医学事业发展的主要动力和多学科研究的课题。然而, 由于肿瘤本身是基础生物科学研究中最基本又最有争论的领域之一, 要对肿瘤进行正确诊治, 就必须掌握和应用不同学科的知识技能和方法。

癌症的确诊在临床上迄今仍以肿瘤切片的细胞学鉴定为主要依据, 但这种方法对于癌症的早期诊断和微小癌乃至癌前病变诊断就显得无能为力。荧光光谱技术的发展使其在肿瘤的诊断上应用已日渐引起国内外肿瘤专家的关注。在适当波长(405 nm)的紫外光激发下, 血清中许多蛋白质及非蛋白分子均能产生内源性荧光。测量血清内源性荧光光谱, 可间接反映血清中各种荧光分子质和量的变化^[1]。由于癌患血清的组成成份与正常人血清不同, 其荧光光谱也发生相应改变^[2]。在对癌组织荧光光谱研究的基础上, 探讨癌血清与非癌血清的荧光光谱的异同, 建立血清荧光光谱检测方法, 对于癌的诊断是有帮助的。

恶性肿瘤时, 可发生肿瘤部位卟啉类物质的聚积或血中卟啉含量的增高^[3], 其机理较为复杂。恶性肿瘤时体内血卟啉升高的原因与癌组织周围毛细血管的增殖有关, 癌细胞发

展过程中, 释放出“肿瘤血管生成因子”, 刺激周围毛细血管内皮细胞, 长出新的毛细血管使癌组织内血流量增多, 导致血红蛋白分解产物——卟啉在癌组织中聚积。肿瘤细胞分化异常, 增殖速度快, 竞争性地利用卟啉作为能量来源的载体, 引起血中卟啉类物质的增高。肿瘤细胞分化异常增殖速度快, 必然要与正常组织竞争摄取大量能量, 而生物体的能量载体多为卟啉, 故体内卟啉代谢水平要高于健康人。癌症病人的血清中存在着肿瘤相关的细胞因子或肿瘤代谢产物, 对机体的一些生化代谢有重要的影响作用。这些肿瘤相关物质可能刺激或抑制卟啉代谢过程中的某些酶, 导致卟啉代谢的紊乱, 产生大量卟啉, 超过机体的利用, 使血中卟啉类物质增多。但恶性肿瘤患者卟啉类物质增多的确切机制仍有待进一步研究^[4-6]。血清中血卟啉含量及相应的荧光强度与多种因素有关。癌症患者与非癌血清、癌症患者不同阶段、癌症的治疗手段等都可能影响血清中血卟啉含量及相应的荧光强度; 肝病变像肝炎、黄疸、肝硬化病人的健康状况对其有影响^[7-9]。此外, 溶液的pH值, 溶剂的极性及其浓度对血卟啉荧光光谱也有影响^[10]。

血清中血卟啉含量很少, 荧光强度低, 使得对通过血清荧光光谱的定量分析进而进行医学诊断带来较大困难。小波变换是从傅里叶变换发展起来的一种新的信号处理方法。小波分析作为一种新的数学理论和方法, 已成为众多学科关注

收稿日期: 2006-08-26, 修订日期: 2006-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(60578015)和江苏省高校自然科学基金项目(04KJD140183)资助

作者简介: 朱殿明, 1962年生, 南京理工大学理学院博士研究生 *通讯联系人 e-mail: xiaosenluo@yahoo.com.cn

的焦点,在数学、物理、通讯、医学、地质等领域获得了极其广泛的应用。小波变换主要是基于小波的时频局域化特性,并且各频率成份在时间轴上的位置保持不变,频率变换不影响信号的线性。在测定荧光光谱过程中存在许多不稳定因素,使获得的光谱中包含噪声信号。小波变换由于具有多分辨率分析的特性,可将信号分解成一系列不同频率分辨率的子带,而将高频信号与低频信号分离,因而可实现信号的平滑和去噪。噪声频率较高,光谱信号频率较低,可通过数次小波变换进行分解,将噪声与光谱信号分离。该方法比利用传统的采样平均技术进行光谱平滑所得光谱数据的信噪比高,光谱变形小,并能实现重叠峰分辨和弱信号的分辨^[11-13]。本文提出的基于小波变换的人血清血卟啉荧光光谱分析法可实现对其弱信号的分辨,为血卟啉荧光光谱用于对疾病的医学诊断打下基础。

1 小波变换原理

通过小波变换对光谱进行滤波和数据挖掘,可将原来在时域中难以识别的信号转变到频域内进行处理,从而挖掘出大量被原始信号掩盖的特征及细微信息。

小波是满足条件 $\int_{-\infty}^{\infty} \psi(t) dt = 0$ 的函数 $\psi(t)$ 通过平移和伸缩得到的函数族

$$\psi_{a,b}(t) = |\frac{1}{a}|^{-1/2} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad a, b \in R, a > 0 \quad (1)$$

函数 $f(t) \in L^2(R)$ 的连续小波变换(CWT)定义为

$$CWT_{a,b} f = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \overline{\psi_{a,b}(t)} dt = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \overline{|\frac{1}{a}|^{-1/2} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right)} dt \quad (2)$$

对 a, b 进行离散化处理并由计算机进行计算,则小波 $\psi_{a,b}(t)$ 变为

$$\psi_{m,n}(t) = a_0^{m/2} \psi\left(\frac{t-nb_0}{a_0^m}\right) \quad (3)$$

式中, m 和 n 为整数。

离散小波变换(DWT)定义为

$$DWT_{a,b} f = \sum_n \int_m f(t) \overline{\psi_{m,n}(t)} dt \quad (4)$$

对连续函数 $f(t)$ 再进行离散化 $S_2^j f(n)$, 同时将 $\psi_{m,n}(t)$ 离散化后用离散滤波器表示成

$$H = \{h_p\}, G = \{g_q\} \quad p, q \in Z \quad (5)$$

从而得到

$$S_2^j f = H \cdot S_2^{j-1} f \quad (6)$$

$$W_2^j f = G \cdot S_2^{j-1} f \quad (7)$$

式中, $S_2^j f$ 和 $W_2^j f$ 分别表示在 2^j 分辨率下信号的低频部分和高频部分, j 为分解次数。上述分解可表示为

$$S_2^0 f \quad S_2^1 f \quad S_2^2 f \quad \dots \quad S_2^{j-1} f \quad S_2^j f$$

$$W_2^1 f \quad W_2^2 f \quad \dots \quad W_2^j f$$

用小波实现滤波平滑、重叠峰分辨和弱信号分辨,要求小波的边缘尽量光滑,其支集是紧的,因此在小波分析中选取 Daubechies 小波。Daubechies 滤波器包括从高度局域到高度光滑的各种滤波器,最简单(即最局域)一种情况是 db4,

即仅 4 个系数的小波滤波器。

2 实验材料与方法

2.1 血清样品的制备

取癌症患者静脉血 5 mL,不加抗凝剂,经 2 000 r · min⁻¹、旋转半径为 12 cm 的高速离心机 10 min 分离,取其上清液。对照组为正常人,用同样方法获取其血清样品。

2.2 实验器材

采用美国 Roper Scientific Inc. 生产的 SP-2558 多功能光谱测量系统。实验装置示意图如图 1。

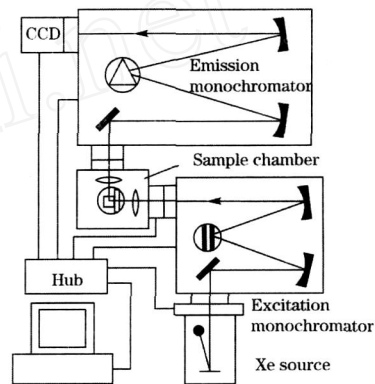


Fig 1 SP-2558 multi-function spectrum measuring system

2.3 获取荧光的方法

用不发荧光的石英比色皿盛装被测样品 2 mL,并将其置于荧光池内中心位置,所有样品的荧光光谱检测过程均在室温(28~30 ℃)下进行,扫描范围为 550~720 nm,扫描间隔为 10⁻¹ nm 量级,每 1 次扫描全过程需要 1 min,每一样品均进行 3 次扫描测试,3 次测得的实验结果都基本稳定一致。

2.4 数据处理

针对光谱信号的特点,用 Daubechies(db4)小波对光谱信号进行 4 级分解。图 2(a)为原始信号,谱图上的毛刺具有高频特征。图 2(b)为直接利用 Mallat 算法将信号分解为高频和低频信息。设定一个截断尺度,使频率高于此尺度下的小波空间向量全部置为零,然后进行信号重构即可达到去噪的作用。从图中可以看出它对含噪的低频信号有良好的去噪能力。利用小波多分辨率分析的特点能有效地去除信号中的高频噪声,得到平滑的不失真的信号。

图 3 为滤波后的重构荧光光谱 S 进行 6 次分解后得到的离散逼近信号($a_1 \sim a_6$)和离散细节信号($d_1 \sim d_6$)。从图中可以看出荧光光谱中的高频成份已被滤除,随着分解次数的增加,信号频率降低。当分解到第 6 次时,出现了血卟啉荧光特征峰。

2.5 小波变换对血清中血卟啉荧光发射峰的提取

图 2 是胃癌患者血清荧光光谱。从该图中可以看出血清中血卟啉含量很少,荧光强度低,使得对通过血清中血卟啉荧光光谱这样的弱信号的分辨进而进行医学诊断带来较大困难。通过小波变换在 d_6 中可以成功地观测到血卟啉的荧光发射峰,得到了血清中所含血卟啉的准确成份和定量信息,

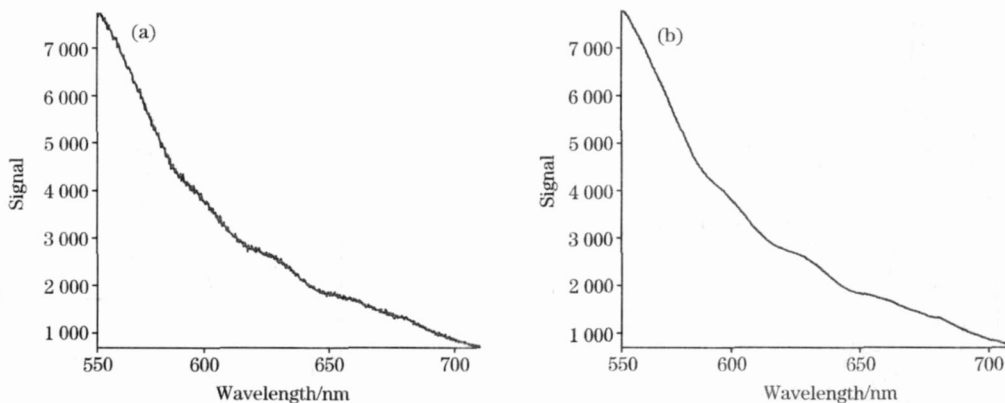


Fig. 2 Fluorescence spectra of a stomach cancer patient

(a): Original signal; (b): Filtered signal

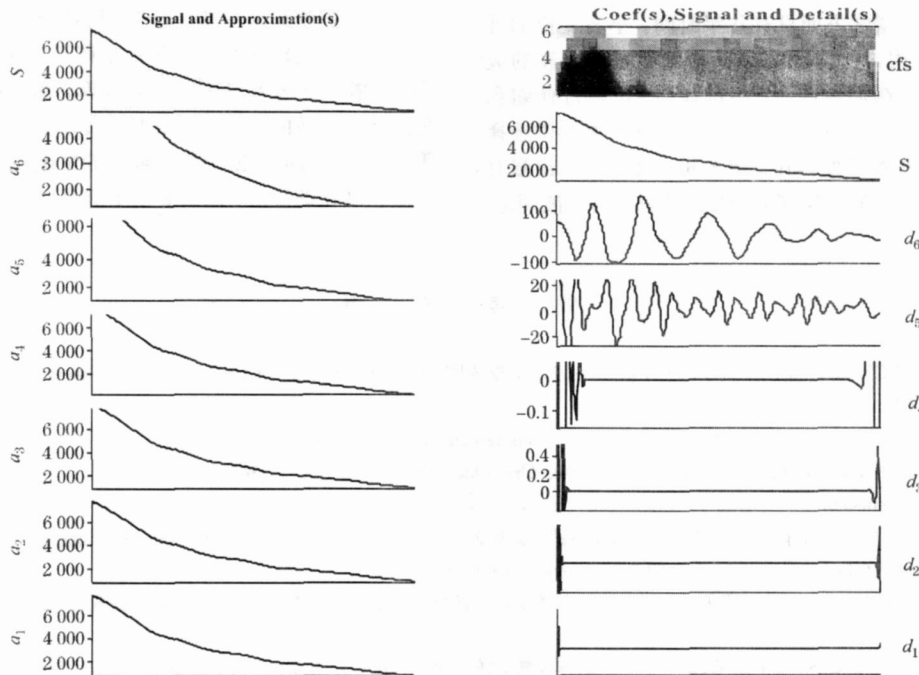


Fig. 3 Corresponding discrete approximations ($a_1 \sim a_6$) and discrete details ($d_1 \sim d_6$)

从而进行定性和定量分析。

d_6 信号中从 590 到 700 nm 之间的四个荧光峰分别是 595 nm 锌卟啉荧光峰, 630, 662 和 687 nm 的原卟啉荧光峰 (图 4)。这与图 5 protoporphyrin IX 荧光光谱峰值位置基本相同。

3 讨论

卟啉是生命活动的重要物质, 原卟啉可作为肿瘤血液标志物。人患了疾病会对机体代谢与调节产生影响造成代谢物失衡, 通过代谢物的分析可以对疾病进行有效的诊断^[14]。健康状况影响卟啉代谢, 恶性肿瘤影响原卟啉与类胡萝卜素的相对含量。健康人血中只能测出锌卟啉, 而原卟啉甚微, 一

般不能测出。在健康人体血液中发现有少量的原卟啉, 其含量是每 100 mL 血液中有 15 ~ 40 μg , 一般不超过 30 μg , 采用一般的生化技术很难将其分离。但病理血液中每 100 mL 红血球中原卟啉可达 600 μg 。本文利用小波分析对人血清血卟啉荧光光谱进行了滤波和血卟啉特征荧光峰的提取。通过小波变换成功地观测到血卟啉的荧光发射峰, 实现了弱信号分辨, 得到了血清中所含血卟啉的准确成份和定量信息, 从而可进行定性和定量分析。此方法对血清荧光光谱用于医学诊断有很高的实用价值。但是当为恶性肿瘤时, 肿瘤部位卟啉类物质的聚积或血中卟啉含量的增高机理较为复杂, 目前还不够明确, 加之人血清中血卟啉的含量受多种因素的影响, 要提高血清荧光光谱用于医学诊断的敏感度、特异度和准确性还有许多工作有待进一步研究。

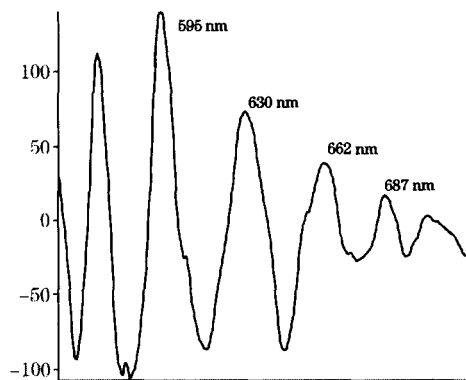


Fig 4 Enlarged detail signals

小波变换由于其优良的局部分析能力,使其在光谱学信号的滤噪、数据压缩、谱峰的分离等方面得到了很好的应用。将小波应用到光谱学方面只有几年时间。小波变换的理论在光谱学中的应用,目前已取得一些倍受人们关注的成果。小波变换具有时频局域性、方向选择性、可通过伸缩和平移对信号进行多分辨率分析、计算简单且有大量可供选择的基函数等诸多突出特性使其在光谱分析中逐渐显示出强有力的信号处理能力,小波变换作为预处理方法,将小波理论

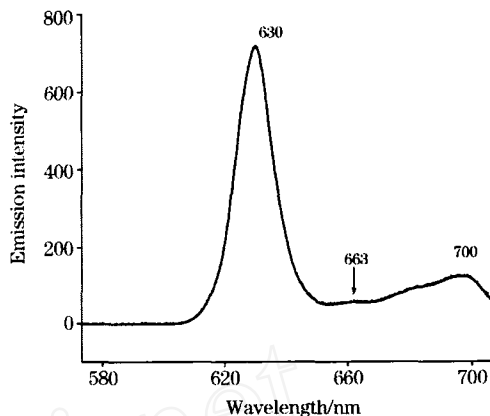


Fig 5 Protoporphyrin IX fluorescence spectrum excited by 405 nm light

与其他的理论和算法结合起来,可望取得更有效的结果。

然而小波较深的数学背景是科研人员面临的一个困难。小波变换在去噪和弱信号的分辨等方面也存在不足,需要人为地选定合适的去噪中的截断尺度参数以及小波分解的次数等,需要人为地根据小波分解后的情况凭经验选定,而没有一个客观化的标准,而且算法不能自动进行。

参 考 文 献

- [1] LIN San-ren, LI Cheng-gang, ZHOU Li-ya, et al (林三仁, 李成刚, 周丽雅, 等). J. of Beijing Medical University (北京医科大学学报), 1997, 29(4): 341.
- [2] Masilamani V, Al-Zhrani K, Al-Salhi M, et al. J. of Luminescence, 2004, 109: 143.
- [3] Kojiro Onizawa, Naomichi Okamura, Hideo Saginoyac. Oral Oncology, 2002, 38(4): 343.
- [4] MENG Ji-wu, Nishisaka T, Fukami T. Chin. Sci. Bull., 1995, 40: 1144.
- [5] MENG Ji-wu, HOU Shang-gong, XU Xu-rong (孟继武, 侯尚公, 徐叙蓉). Chinese Science Bulletin (科学通报), 1988, 33: 630.
- [6] Meng J W, Wang X J, Lin T, et al. J. of Luminescence, 1999, 83-84: 271.
- [7] MENG Ji-wu, GU Huai-min, ZHENG Rong-er, et al (孟继武, 谷怀民, 郑荣儿, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2003, 23(2): 325.
- [8] LIAN Shao-hui, YANG Shi-zhen, WANG Jia-ping (连少辉, 杨士珍, 王家平). Bulletin of National Natural Science Foundation of China (中国科学基金), 1997, 11: 288.
- [9] Michael Vogeser, Karl Jacob, Reinhart Zchoval. Clinical Biochemistry, 2000, 33(5): 387.
- [10] LI Shao-hua, HAO Ying-hua, GAO Shan-ling, et al (李少华, 郝英华, 高善玲, 等). Chinese Journal of Oncology (中华肿瘤杂志), 1996, 18(1): 34.
- [11] QIN Xia, SHEN Lan-sun (秦 侠, 沈兰荪). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2000, 20(6): 892.
- [12] WANG Shu-tao, WANG Yu-tian, CHE Ren-sheng, et al (王书涛, 王玉田, 车仁生, 等). J. Applied Optics (应用光学), 2005, 26(1): 49.
- [13] WANG Ying, MO Jin-yuan (王 瑛, 莫金垣). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(1): 124.
- [14] CHEN Li-na, GAO Zhi-wen, LI Kong-ning (陈丽娜, 高治文, 李孔宁). J. of Harbing Medical University (哈尔滨医科大学学报), 1995, 29(1): 1.

Fluorescence Spectrum Analysis System for Protoporphyrin IX in Serum Based on Wavelet Transform

ZHU Dian-ming^{1,2}, YANG Hong-peng³, LUO Xiao-sen^{2*}, LIU Ying², SHEN Zhong-hua², LU Jian², NI Xiao-wu²

1. Department of Physics, Xuzhou Institute of Industry Technology, Xuzhou 221006, China

2. School of Science, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China

3. The Third People's Hospital of Xuzhou, Xuzhou 221005, China

Abstract Protoporphyrin IX is an important kind of organic compound for vital movement, and can be used as the sign of tumour blood. Human protoporphyrin IX content in serum is very low, and affected by various factors. The serum fluorescence spectrum analysis system based on wavelet transform was used to discriminate the protoporphyrin IX weak signals. The protoporphyrin IX fluorescence spectrum was obtained by a multi-function spectrum measuring system, and decomposed several times by wavelet transform to distinguish the noise and spectrum signals. The fluorescence spectrum can be divided into corresponding discrete approximations signals (a_1 - a_6) and discrete details signals (d_1 - d_6) by six times of decomposition, showing the signal frequency decreasing with decomposition times increasing and the protoporphyrin IX fluorescence character peak appears here. The weak signals were discriminated and the exactly component and quantity can be acquired for further analysis. So it can be analysed quantitatively. The researches in the present paper provide the potential application in the diagnosis of incipient tumours using the serum fluorescence spectrum.

Keywords Tumour; Serum; Protoporphyrin IX; Fluorescence spectrum; Wavelet transform

(Received Aug. 26, 2006; accepted Nov. 28, 2006)

*Corresponding author