

基于拉曼光谱的鼻咽癌与正常鼻咽细胞株的分类研究

叶宇煌¹ 陈 阳² 李永增³ 冯尚源³ 苏 颖⁴ 邹长梭⁴ 欧 琳³

¹福州大学物理与信息工程学院, 福建 福州 350108

²福州大学至诚学院, 福建 福州 350002

³福建师范大学医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350007

⁴福建省肿瘤医院放射生物研究室, 福建 福州 350014

摘要 高空间分辨率的共聚焦显微拉曼光谱技术从分子水平上提供了生物分子成分和结构的指纹性信息。以鼻咽癌细胞株 C666-1、CNE2 和正常鼻咽细胞株 NP69 为对象, 利用拉曼光谱探索和分析癌细胞株与正常细胞株之间的差别。结果表明: 谱峰比 I_{1449}/I_{1657} (1.10) 可以准确地将鼻咽癌与正常鼻咽细胞株分成两组, 这一结论与相关支气管癌组织的报道结果一致; 此外, 采用主成分分析方法说明 3 种细胞株的拉曼光谱之间存在统计学差异, 并以线性判别分析方法对其进行统计划分, 灵敏度和特异性分别达到 90% 和 100%。这些结论可以为拉曼光谱技术用于 NPC 的临床诊断提供依据, 并有可能为鼻咽癌的早期诊断提供有益参考。

关键词 生物光学; 拉曼光谱; 鼻咽癌; 细胞; 主成分分析; 判别分析

中图分类号 O657.37; R318.51

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201239.0504003

Discrimination of Nasopharyngeal Carcinoma and Normal Nasopharyngeal Cell Lines Based on Confocal Raman Microspectroscopy

Ye Yuhuang¹ Chen Yang² Li Yongzeng³ Feng Shangyuan³ Su Ying⁴
Zou Changyan⁴ Ou Lin³

¹College of Physics and Information, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China

²Zhicheng College, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002, China

³Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China

⁴Department of Radiobiology, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou, Fujian 350014, China

Abstract Raman microspectroscopy can provide molecular-level finger-print information about the biochemical composition and structure of cells and tissues with excellent spatial resolution. Raman spectroscopy of nasopharyngeal carcinoma cell lines C666-1, CNE2 and normal nasopharyngeal cell line NP69 are presented to investigate the differences between them. The ratio of I_{1449}/I_{1657} (1.10) seems to very easily divide tumor and normal cell lines into two groups, and this result is coincident with the existing report about the study of normal and malignant bronchial tissue. Principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA) are also used to classify different cell lines and achieve an exciting result with a sensitivity and specificity of 90% and 100%, respectively. The results of the work may be helpful to the discrimination of normal and tumor cells, which show that Raman spectroscopy can be one of the diagnostic methods of nasopharyngeal carcinoma and do favor to the early diagnosis.

Key words biotechnology; Raman spectroscopy; nasopharyngeal carcinoma; cell; principal component analysis; linear discriminant analysis

OCIS codes 170.5660; 180.5655; 300.6450

收稿日期: 2011-12-30; 收到修改稿日期: 2012-02-20

基金项目: 福州大学科研基金(600105)资助课题。

作者简介: 叶宇煌(1961—), 男, 硕士, 副教授, 主要从事微波技术、微波电路等方面的研究。

E-mail: yeyuhuang@fzu.edu.cn

1 引言

拉曼光谱(RS)技术是一种利用光子与生化材料之间分子特异性的非弹性散射作用的光学技术^[1,2]。当入射激光与材料相互作用时,一小部分的入射光子在能带之间发生非弹性散射,由此使散射光与入射光的频率相比发生变化,也就产生了“拉曼频移”^[3,4]。RS技术可以在没有任何特殊准备和标记的情况下,以非侵入性、非破坏性的方式对诸如细胞、核酸、蛋白质和组织等生化样品进行检测。由于通常情况下生化样品都处于水环境中,而与红外光谱不同的是,水分子仅有非常微弱的RS信号,这使得其非常适宜作为生化样品的检测手段^[5]。

20世纪90年代最初的一份有关单个细胞和染色质的报道就表明RS技术能够作为一种以非破坏性的方式检测生化样品的理想光学手段^[6]。从那时起,在过去的20年里,RS被广泛应用于各种各样的生化样品研究,尤其是对肿瘤的研究。有关正常和变异细胞和组织之间的差异及细胞内某些组分的分析,如经射线照射前后的食管癌细胞比较、血小板内的类胡萝卜素分析及结直肠癌组织中的脂类分子结构分析等^[7~9],一方面通过RS谱峰所提供的物理振动模式特征的指纹性归属来获得;另一方面还可结合各种统计学分析方法如主成分分析(PCA)、线性判别分析(LDA)、聚类分析等进行统计分析。所有这些研究都说明RS能够作为癌症检测的有效手段。但是,目前有关鼻咽癌(NPC)和正常鼻咽细胞株的RS分类研究还很少,除本课题组之外,姚辉璐等^[10]已对NPC细胞株CNE2和正常鼻咽细胞株HBE的RS进行了研究,也为本文提供了有益的参考。鉴于此,本文以与之不同的细胞株作为对象进一步研究NPC和正常细胞株之间的差异并加以分类。

本文以NPC细胞株C666-1、CNE2和正常鼻咽细胞株NP69为对象,利用RS进行分析和归类,目的在于获取三种细胞株的RS,并结合PCA和LDA建立一个能够对其准确分类的判别模型。

2 材料和方法

2.1 样品准备

人鼻咽癌细胞株C666-1(广州泰盛生物科技有限公司)、CNE2(由福建省肿瘤医院提供),均生长于各加100 U/ml青霉素和链霉素、质量分数为10%新生牛血清(美国Invitrogen公司)的RPMI-

1640培养液中;人正常鼻咽细胞株NP69(中南大学湘雅中心实验室)生长于Keratinocyte-SFM培养液中,所有细胞均在37℃,体积分数为5%的CO₂培养箱中培养。当细胞株处于对数生长期时利用胰酶消化并在培养液中吹悬,以尽可能地保持细胞活性,进而用于拉曼测量。

2.2 单个细胞的RS测量

采用的拉曼光谱仪是InVia型共聚焦显微拉曼光谱仪(英国Renishaw公司),仪器的分辨率为2 cm⁻¹,激发光源为20 mW、785 nm的半导体激光器。仪器内部主要部分的光路示意图如图1所示,入射激光经由扩束镜和两块反射镜到达全息滤光片,使入射激光的绝大多数能量被反射,再经过显微镜内部反射,由物镜聚焦至待测样品表面,反射光、散射光及其它杂散光一起沿着相反的方向返回到全息滤光片上,在此激光线以及靠近激光频率的瑞利散射光和杂散光被两片全息滤光片所阻挡而不能透过,而拉曼散射光可以透过,透射光再依次经过聚焦透镜、狭缝、另一聚焦透镜、反射棱镜到达衍射光栅表面,经由光栅分光后聚焦到CCD探测器上,通过信号放大和转换后输入到计算机处理,最后得到样品的RS。

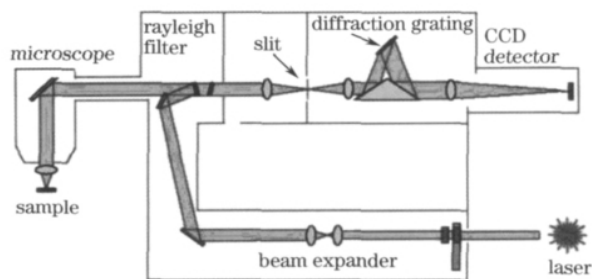


图1 InVia 拉曼光谱系统的组成和光路图

Fig.1 Structure and light path of the Raman system

取对数生长期的细胞,消化吹悬后,吸取约50 μ l细胞悬液滴在铝片上,将液滴铺展开,置于共聚焦显微拉曼光谱仪的载物台上,待液滴内部停止流动后,细胞的相对位置将比较固定,此时选择细胞进行聚焦,由低倍到高倍逐步聚焦于单个细胞上,最后在50倍物镜下进行RS测量,RS的收集范围为300~3200 cm⁻¹,曝光时间20 s,有研究表明该功率条件下测量不会对细胞造成显著的损伤^[11]。选定一个细胞之后,在细胞内选取3个不同位置进行光谱测量,并且记录RS,随后将这3条光谱做平均处理来作为所测的单个细胞的RS。对C666-1、CNE2和NP69 3种细胞株分别选取了30、31、46个样品

进行测量。测量过程也得到很好的信噪比。

2.3 数据处理

实验中对每个细胞样品(C666-1、CNE2 和 NP69 3 种细胞株各选取了 30、31、46 个样品)所测的 3 条光谱先进行荧光背景去除^[12],然后再对三条光谱取平均后作为单个样品的样品光谱,最后将这些样品光谱分别取平均并归一化后用于表示 3 种细胞株的 RS;另外,也将样品光谱用于 PCA 和 LDA 中,以此获取相关统计信息和进行统计划分。

3 结果和讨论

3.1 单个癌细胞和正常细胞的 RS

根据上述实验条件得到 3 种细胞株及其液体环境——培养液的平均拉曼光谱如图 2 所示。图中省略了 2000~2600 cm^{-1} 的光谱,这是由于在该范围

内的光谱仅仅是背景光谱,没有测到明显的拉曼信号。由图可见,3 种细胞株的 RS 轮廓基本上相似,这就意味着 3 种细胞株均是由相同的物质所构成,此外,RPMI-1640 和 Keratinocyte-SFM 培养液的 RS 对细胞的 RS 未造成干扰,因而所得的细胞 RS 可以作为所研究细胞株的有效 RS。相对于正常鼻咽细胞株而言,鼻咽癌细胞株 C666-1 和 CNE2 在归属为苯丙氨酸的 1003 cm^{-1} 拉曼峰强明显较强,表 1 列出了相应的峰值归属。值得一提的是,所测得 CNE2 的 RS 与姚辉璐等^[10]已报道的结果相比,一方面是谱线宽度更大,因而所包含的谱带信息更丰富;另一方面在对应的谱线区域内,谱带基本相同,但也有若干谱带出现缺失,这可能是由不同仪器测得的信号强弱不同而造成的。

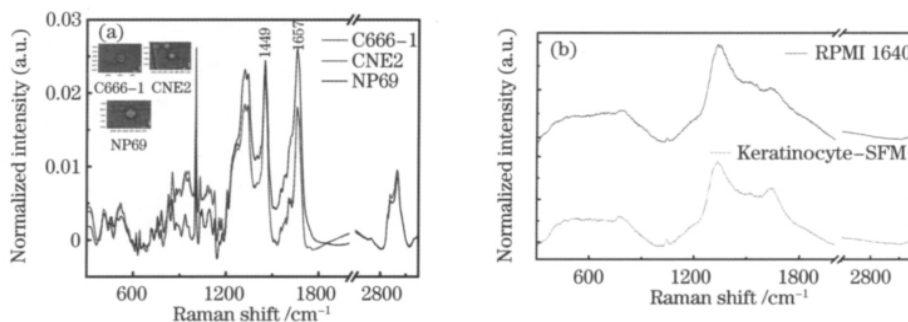


图 2 (a)鼻咽癌细胞株 C666-1、CNE2 和正常鼻咽细胞株 NP69 的平均 RS 及其显微图像;(b) RPMI-1640 和 Keratinocyte-SFM 培养液的 RS

Fig. 2 (a) Average Raman spectra and the microscopic image of NPC and normal nasopharyngeal cell lines C666-1, CNE2 and NP69; (b) Raman spectra of RPMI-1640 and Keratinocyte-SFM mediums

表 1 C666-1、CNE2 和 NP69 的拉曼谱带及归属

续表 1

Band / cm^{-1}			Assignments
C666-1	CNE2	NP69	
621	620	621	Phe. ^[6]
643	642	643	C-C twist, Tyr. ^[13]
721	718	717	A ^[14]
758	757	758	T ^[6]
780	780	782	C/U ring br. ^[15]
828	828	828	O-P-O ⁻ ^[4]
853	852	852	Tyr., C-C ske. modes ^[15]
879	879	878	L-Proline ^[16]
935	939	936	α -helix, C-C ske. modes ^[15]
1003	1002	1003	Phe. ^[17]
1031	1031	1032	Phe., C-N str. ^[3]
		1043	G ^[16]
1081	1081	1081	O-P-O ⁻ ^[6]
1125	1125	1126	C-N, C-C str. ^[18]

Band / cm^{-1}			Assignments
C666-1	CNE2	NP69	
1157	1157	1158	C-N, C-C str. ^[19]
1173	1171	1174	Tyr., Phe., C-H bend ^[19]
1207	1207	1208	A, T, Amide III ^[19]
1317	1316	1318	G ^[20]
1337	1337	1339	A,G,C-H def. ^[19]
1449	1449	1449	C-H def. ^[18]
1606	1605	1609	Phe., Tyr. ^[15]
1658	1658	1657	Amide I ^[17]
2876	2875	2878	CH ₂ str. ^[21]
2931	2931	2934	CH ₃ str. ^[22]
3068	3070	3068	(C=C-H) _{arom.} str. ^[21]

(str.: stretching, Phe.: phenylalanine, br.: breathing, Tyr.: tyrosine, sym.: symmetric, ske.: skeletal, def.: deformation vibration, A: Adenine, C: Cytosine, G: Guanine, T: Thymine, arom.: aromatic)

鼻咽癌细胞株 C666-1、CNE2 相对于正常鼻咽细胞株 NP69 而言,在 1043 cm^{-1} (谷氨酸盐) 处出现缺失,这可能是由于这种物质在鼻咽癌细胞内的信号太弱,以致于本拉曼光谱仪无法清楚地检测到。此外,归属为 C—H 变形振动的 1449 cm^{-1} 及氨基化合物的 1658 cm^{-1} 处峰强的相对比值经过 t 检验检查其均值是否存在显著差异。每条谱的相应两个峰强比值描点如图 3, 比值为 $I_{1449}/I_{1657} = 1.10$ 的直线可以将鼻咽癌细胞株和正常鼻咽细胞株划分为两块区域,而 t 检验的结果也验证了这一点,结果表明:在检验值为 $I_{1449}/I_{1657} = 1.23$ 时,得到具有显著性差异的检验值,从而使上述划分进一步数值化,对于 C666-1 和 CNE2 来说, $P > 0.05$, 即认为 I_{1449}/I_{1657} 与 1.23 没有显著性差异,其 95% 置信区间分别为 (1.1796, 1.2565) 和 (1.2271, 1.3212); 而对于 NP69 来说, $P < 0.05$, 即认为 I_{1449}/I_{1657} 与 1.23 存在显著性差异,其 95% 置信区间为 (0.6248, 0.678)。这一结果与已知报道的关于支气管癌组织研究结果一致。由此可见,不仅在正常和支气管癌组织中存在上述比值差异^[10],在正常和鼻咽癌细胞中也存在同样的差异。

3.2 多变量分析 PCA 与 LDA

采用多变量分析方法 PCA 对所测的细胞株 RS 进行统计分析。首先,通过 PCA 分析所得的第一、第二和第三主成分得分绘制二维(2D, 依据第一和第二主成分得分,累计方差贡献比为 67.6%)和三

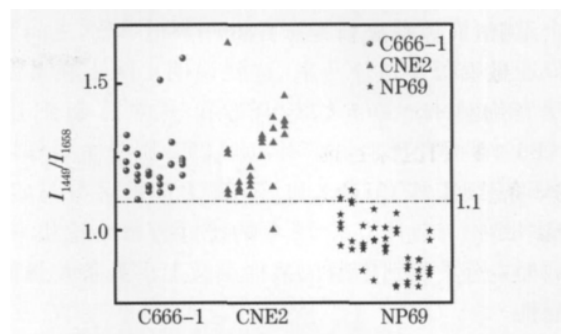


图 3 鼻咽癌细胞株和正常鼻咽细胞株的 I_{1449}/I_{1658} 比值

Fig. 3 Intensity ratio of I_{1449}/I_{1658} for NPC and normal cell lines

维(3D, 依据第一、第二和第三主成分得分, 累计方差贡献比为 78.6%)散点图, 所得散点图见图 4。可见, 2D 和 3D 的散点图均可将鼻咽癌细胞株和正常鼻咽细胞株归为两块区域, 从而进一步证实鼻咽癌细胞株和正常鼻咽细胞株之间存在显著的差异。并且从 2D 和 3D 散点图上可以看出, 鼻咽癌细胞株和正常鼻咽细胞株之间的界线比较明显, 统计划分显著, 而鼻咽癌细胞株 C666-1 和 CNE2 之间的界线就很不明显, 两种鼻咽癌细胞株的 2D 和 3D 散点图几乎融合在一起, 说明相对于正常鼻咽细胞株 NP69 而言, 鼻咽癌细胞株 C666-1 和 CNE2 之间并没有显著的统计学差异。换言之, 鼻咽癌细胞株 C666-1 和 CNE2 与正常鼻咽细胞株 NP69 之间的统计差异占主导地位。

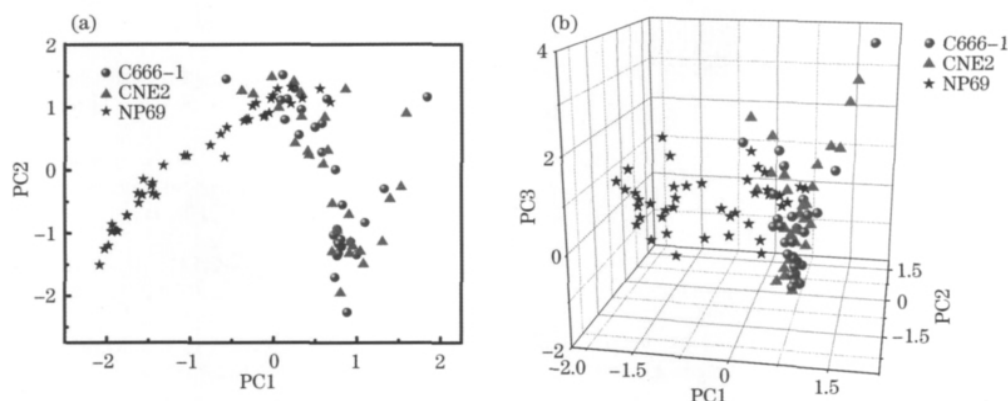


图 4 PCA 分析的 (a) 前两个与 (b) 前三个主成分得分散点图

Fig. 4 (a) First two and (b) first three components' scores of PCA analysis

为了建立起一种切实、有效、可靠的鼻咽癌细胞株鉴别模型, 也使其更具有临床实用性, 利用 LDA 方法建立分类判别模型, 分别随机选取 C666-1、CNE2 和 NP69 各 10 条 RS 作为待判样本, 剩余的作为标准样本。通过各样本对线性判别函数(LDF)

LDF1 和 LDF2 的相关系数绘制散点图, 如图 5 所示。根据标准样本建立判别模型对剩余样本进行判别的灵敏度和特异性分别为 90% 和 100%。从图中还可以看出, 沿着 LDF1 方向可以将鼻咽癌细胞株 C666-1、CNE2 和正常鼻咽细胞株 NP69 划分为两

个组群,而鼻咽癌细胞株 C666-1 和 CNE2 之间又可以通过 LDF2 划分开来,这就说明 LDF1 在鉴别鼻咽癌细胞株 C666-1、CNE2 和正常鼻咽细胞株 NP69 方面发挥主要作用,而 LDF2 则是主要作用于鼻咽癌细胞株 C666-1 和 CNE2 之间的区分与鉴别。这一结论与前述有关 PCA 的统计分析结论相一致,因而本分类判别模型从某种意义上讲具备较强的可靠性。

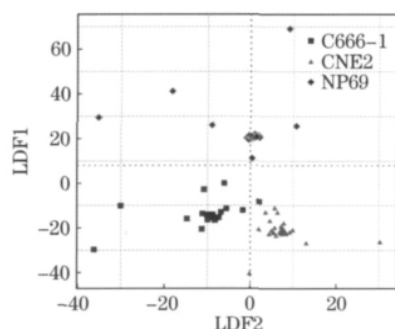


图5 LDA分析中各样本对应LDF1与LDF2系数散点图

Fig.5 Scatter plot of the corresponding efficient of LDF1 versus LDF2 in LDA analysis

4 结 论

通过对鼻咽癌细胞株 C666-1 和 CNE2 及正常鼻咽细胞株 NP69 的 RS 进行均谱分析和统计分析,表明 3 种细胞株均是由相同的物质所构成,而在某些谱带的相对组成上存在差异,PCA 分析也证实了 3 种细胞株之间存在统计差异;最后由 LDA 分析建立判别模型对未知的细胞株样本进行了准确的分类,从而为 RS 技术用于鼻咽癌的临床诊断提供有益的参考和实验依据。

参 考 文 献

- 1 P. Crow, N. Stone, C. A. Kendall *et al.*. The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro[J]. *British J. Cancer*, 2003, **89**(1): 106~108
- 2 P. Crow, N. Stone, C. A. Kendall *et al.*. Optical diagnostics in urology: current applications and future prospects[J]. *British J. Urology Int.*, 2003, **92**(4): 400~407
- 3 J. W. Chan, D. Taylor, T. Zwerdling *et al.*. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells[J]. *Biophys. J.*, 2006, **90**(2): 648~656
- 4 P. Crow, B. Barrass, C. Kendall *et al.*. The use of Raman spectroscopy to differentiate between different prostatic adenocarcinoma cell lines[J]. *British J. Cancer*, 2005, **92**(12): 2166~2170
- 5 C. M. Krishna, G. Kegelaer, I. Adt *et al.*. Characterisation of uterine sarcoma cell lines exhibiting MDR phenotype by vibrational spectroscopy[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, **1726**(2): 160~167

- 6 G. J. Puppels, F. F. M. de Mul, C. Otto *et al.*. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy[J]. *Nature*, 1990, **347**(6290): 301~303
- 7 Zhang Guangshui, Chen Changqing, Qi Jian *et al.*. Raman spectroscopic study on EC9706 cells irradiated by X-ray with different dose[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(2): 509~512
- 8 张广水, 陈长青, 齐健等. EC9706 细胞经不同剂量 X 射线辐照后的拉曼光谱[J]. *中国激光*, 2009, **36**(2): 509~512
- 9 Wang Guiwen, Peng Lixin, Shen Weidong *et al.*. Raman spectroscopic analysis of carotenoids of single human blood platelet[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(6): 0630002
- 10 王桂文, 彭立新, 申卫东等. 拉曼光谱分析人类单个血小板的类胡萝卜素[J]. *光学学报*, 2011, **31**(6): 0630002
- 11 Gao Zehong, Yu Jingong, Liu Fuxiang *et al.*. Micro-Raman spectra for lipids C-H in colorectal tissue[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(2): 605~608
- 12 高泽红, 于晶功, 刘福祥等. 结直肠癌组织中脂类伸缩振动的拉曼光谱[J]. *中国激光*, 2010, **37**(2): 605~608
- 13 Yao Huilu, Zhu Miao, Wang Guiwen *et al.*. Study of Raman spectra of single carcinoma of nasopharynx cell[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(9): 1761~1764
- 14 姚辉璐, 朱森, 王桂文等. 单个鼻咽癌细胞的拉曼光谱分析的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(9): 1761~1764
- 15 Z. Huang, A. McWilliams, H. Lui *et al.*. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer[J]. *Int. J. Cancer*, 2003, **107**(6): 1047~1052
- 16 J. Zhao, H. Lui, D. I. Mclean *et al.*. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy[J]. *Appl. Spectrosc.*, 2007, **61**(11): 1225~1232
- 17 M. D. Mannie, T. J. McConnell, C. Xie *et al.*. Activation-dependent phases of T cells distinguished by use of optical tweezers and near infrared Raman spectroscopy [J]. *J. Immunological Methods*, 2005, **297**(1-2): 53~60
- 18 C. Xie, N. Nguyen, Y. Zhu *et al.*. Detection of the recombinant protein in single transgenic microbial cell using laser tweezers and Raman spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, **79**(24): 9269~9275
- 19 G. J. Puppels, H. S. P. Garritsen, G. M. J. Segers-Nolten *et al.*. Raman microspectroscopic approach to the study of human granulocytes[J]. *Biophys. J.*, 1991, **60**(5): 1046~1056
- 20 J. de Gelder, K. de Gussem, P. Vandenabeele *et al.*. Reference database of Raman spectra of biological molecules[J]. *J. Raman Spectrosc.*, 2007, **38**(9): 1133~1147
- 21 C. Matthäus, T. Chernenko, J. A. Newmark *et al.*. Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy [J]. *Biophys. J.*, 2007, **93**(2): 668~673
- 22 I. Nottingher, S. Verrier, H. Romanska *et al.*. In situ characterisation of living cells by Raman spectroscopy [J]. *Spectroscopy*, 2002, **16**(2): 43~51
- 23 J. W. Chan, D. S. Taylor, D. L. Thompson. The effect of cell fixation on the discrimination of normal and leukemia cells with laser tweezers Raman spectroscopy [J]. *Biopolymers*, 2008, **91**(2): 132~139
- 24 W. L. Peticolas. Raman spectroscopy of DNA and proteins[J]. *Methods in Enzymology*, 1995, **246**(17): 389~416
- 25 D. Naumanm. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research[J]. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2001, **36**(2-3): 239~298
- 26 K. Hamada, K. Fujita, N. I. Smith *et al.*. Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2008, **13**(4): 044027

栏目编辑:韩 峰