

## 结合多变量统计分析肝癌氧合血红蛋白表面增强拉曼光谱

熊 洋<sup>1</sup>, 李云涛<sup>1</sup>, 郭 嫣<sup>2</sup>, 饶凤飞<sup>1</sup>, 张建民<sup>1</sup>, 司民真<sup>3</sup>, 刘仁明<sup>3</sup>, 唐伟跃<sup>1\*</sup>

1. 郑州大学物理工程学院, 河南 郑州 450000
2. 郑州大学附属肿瘤医院, 河南 郑州 450000
3. 楚雄师范学院光谱技术应用研究所, 云南 楚雄 675000

**摘要** 采用二维纳米结构银膜作为基底, 检测了30例肝癌患者和30例健康人氧合血红蛋白表面增强拉曼散射(SERS)谱。利用主成分分析(PCA)结合独立变量t检验建立SERS光谱诊断多元统计算法模型, 并用判别分析方法对此统计算法的诊断效果进行评价。实验结果表明, 肝癌患者与健康人氧合血红蛋白SERS光谱有明显区别。采用PCA分析结合独立变量t检验统计分析方法得出SERS光谱PCA得分三维散点图可以很好的区分健康人和肝癌患者。利用判别分析方法得出该统计算法诊断肝癌的特异性和灵敏度分别为90%和96.7%, 总判别正确率为93.3%。与健康人相比, 肝癌患者氧合血红蛋白中吡咯环的呼吸振动模式的数量、酪氨酸和苯丙氨酸的含量相对偏低。研究结果表明, 氧合血红蛋白SERS光谱统计分析有望发展成为一种新型的肝癌诊断工具。

**关键词** 光谱学; 表面增强拉曼散射光谱; 氧合血红蛋白; 肝癌

**中图分类号:** O657.3   **文献标识码:** A   **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2012)09-2427-06

### 引言

拉曼光谱技术简便、快捷、灵敏, 能够提供分子的转动和振动信息, 近些年, 该技术已经成为多种癌症诊断的方法, 而且是生物医学研究的热点之一<sup>[1]</sup>。但拉曼散射存在一个缺陷, 即分子的平均拉曼散射截面小, 特别对于生物大分子而言, 其拉曼信号非常微弱, 难以获得具有良好信噪比的拉曼光谱<sup>[2]</sup>。而表面增强拉曼散射光谱(SERS)具有比常规拉曼光谱大几万倍甚至几十万倍的增益系数, 可以很好地猝灭生物分子的荧光, 能够用相对较小的激光功率去激发生物分子, 获得理想的SERS信号, 而且对生物分子光损伤比较小, 具有极高的检测灵敏度<sup>[3]</sup>。这些优点使得SERS技术成为一种研究生物大分子的重要手段, 在化学、物理、生物医学、药物研究等众多领域广泛应用<sup>[4-9]</sup>。目前, 应用SERS技术诊断癌症已经成为医学领域的一个重要方向, 陈荣<sup>[1]</sup>、刘仁明<sup>[10]</sup>、自发光等<sup>[11]</sup>已经利用SERS技术分别对胃癌患者血浆、肝癌患者血清、白血病患者氧合血红蛋白和皮疹病血清进行了诊断, 效果较好。

肝癌作为一种最常见、死亡率仅次于胃癌的恶性肿瘤, 恶性度高、病情进展快, 早期诊断是提高肝癌患者生存率的最佳途径。目前, 肝癌检测一般都是测定血液中甲种胎儿球蛋白(AFP)和采用B型超声仪检查等方法, 但AFP增高还可见于转移性肝癌、慢性肝病、妊娠及生殖腺胚胎源性肿瘤及良性家族性AFP增高等, 容易误诊或者耽误最佳诊断时机。B型超声仪检查虽然方便, 价格低廉, 无创伤, 但其有很大的缺点, 主要是存在超声检测盲区。因此创建快速、简单、准确检验肝癌方法显得迫切而且重要。

本实验采用一种新型、高效、光谱重现性好的二维纳米结构银膜做为SERS基底, 其等离子体共振带位于400~900 nm, 一直延伸到近红外区, 可与实验采用的785 nm激光较好匹配。该波长一方面可以避免氧合血红蛋白分子的“光致损伤”, 而且可以降低氧合血红蛋白分子的荧光效应<sup>[12]</sup>。分析了肝癌患者和健康人氧合血红蛋白SERS光谱之间的区别, 并结合主成分分析(PCA)、独立变量t检验和判别分析统计方法对肝癌进行检测和诊断, 其诊断特异性和灵敏度分别为90%和96.7%, 总判别正确率为93.3%, 效果较好。

收稿日期: 2012-03-25, 修订日期: 2012-06-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(11064001, 10864001)和云南省科技厅项目(2008ZC159M)资助

作者简介: 熊 洋, 1987年生, 郑州大学物理工程学院硕士研究生

e-mail: xiongyang19870326@126.com

\*通讯联系人 e-mail: tangwy@zzu.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与样品

小型台式离心机 TGL216G, 紫外-可见吸收光谱仪(UV-3101, 日本岛津公司), 电子扫描显微镜(S-505, 荷兰飞利浦公司); 电子透射显微镜(H-606, 日本日立公司), 便携式拉曼光谱仪(R-3000<sup>TM</sup>, 美国海洋光学公司)。

血液样品: 30例肝癌病人和30例健康人血液样本采集于郑州大学肿瘤医院, 每例样本均为3 mL。

化学试剂(质量分数): 硝酸银(99.8%), 浓硫(98%), 聚乙烯醇(95%), 银电极(99.9%), 双氧水(30%), 载玻片, 氨水(28%), 去离子水(18.0 MΩ·cm)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 提取氧合血红蛋白

取自健康人和确诊为肝癌患者各30例新鲜血液样品, 每个样品取出2 mL, 不加任何抗凝剂, 在37℃室温中放置1 h左右使其凝结, 然后用小型台式离心机设置5 000 r·min<sup>-1</sup>, 血液离心5 min, 使之分层, 提取下层红细胞, 然后将提取的红细胞按体积比为1:9加入到去离子水中, 使之溶血。之后再次使用小型台式离心机设置5 000 r·min<sup>-1</sup>, 血液离心5 min, 使之分层, 提取中间氧合血红蛋白。将其放置与冰箱中, 在0~4℃下保存待测。

#### 1.2.2 纳米银膜的制备

参照课题组前期有关正电性纳米银膜的制备方法<sup>[13]</sup>。先把载玻片放到浓硫酸中浸泡12 h, 之后取出分别用清水和去离子水依次冲洗3~4次。冲洗干净后放置氨水和双氧水体积比为1:1的混合液中浸泡12 h。称取28 mg硝酸银和50 mg聚乙烯醇倒入200 mL去离子水中, 加热使之溶解, 15 min后开始电解硝酸银和聚乙烯醇的混合液, 在30 V电压下电解1 h, 然后把浸泡好的载玻片放入其中, 静置24 h后, 即得到纳米银膜。

#### 1.3 银膜紫外-可见吸收光谱和TEM和SEM形貌图

图1(a)和(b)分别是利用电解法所制得的胶态纳米银粒子TEM形貌图和利用静电自组装技术制得的二维纳米银膜SEM形貌图。从胶态纳米银粒子的TEM形貌图1(a)中可以看出, 大部分纳米银粒子呈现出圆球状, 分布较均匀, 该胶态纳米银粒子的粒径分布约为(50±6) nm; 从二维纳米银膜的SEM形貌图1(b)中可以看出该银膜表面的纳米银粒子的平均粒径约200 nm, 同时相邻的纳米银粒子间形成了大小不一的纳米微区, 其平均大小达到200 nm。这些相邻的纳米银粒子聚合体之间形成“热点”, 导致局域电场增强, 电场增强可以达到10<sup>12</sup>~10<sup>14</sup><sup>[14-16]</sup>。

图2是胶态纳米银粒子和纳米银膜的紫外-可见吸收光谱。可以看出胶态纳米银粒子的等离子体共振峰在420 nm左右, 而纳米银膜的等离子体共振峰在400~900 nm, 一直延长到近红外区, 可与实验采用的785 nm激光较好匹配。

#### 1.4 氧合血红蛋白的SERS光谱测定

采用便携式拉曼光谱仪R-3000<sup>TM</sup>对人氧合血红蛋白的SERS谱进行检测, 激光波长785 nm, 垂直照射在样品上的

激光功率密度为 $J=10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 扫描积分时间设置为16 s。将氧合血红蛋白与去离子水按体积比1:9稀释后, 取出100 μL均匀地涂在所制备银膜上, 形成直径约为1.5 cm均匀液体膜, 自然干燥; 同时另取100 μL加入2.8 mL浓度为10<sup>-1</sup> mol·L<sup>-1</sup> KBr的纳米银胶中, 充分混合5 min, 然后进行SERS光谱的测定。每个样品在不同位置测试3条谱线, 取其平均谱线作后续分析。

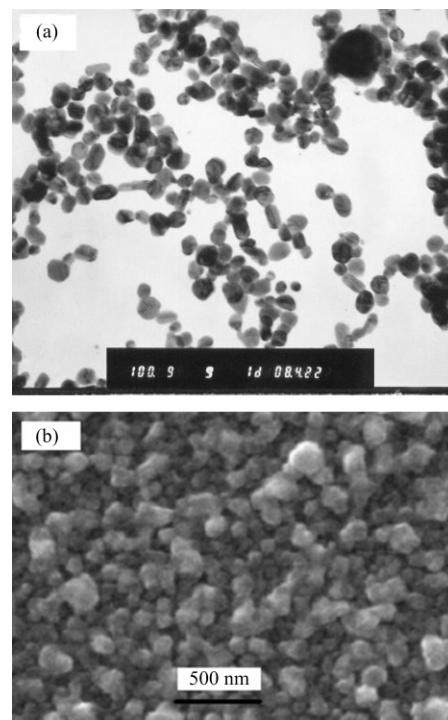


Fig. 1 (a) TEM image of Ag colloidal nanoparticles and (b) SEM image of Ag nanofilm prepared by using electrostatic self-assembly

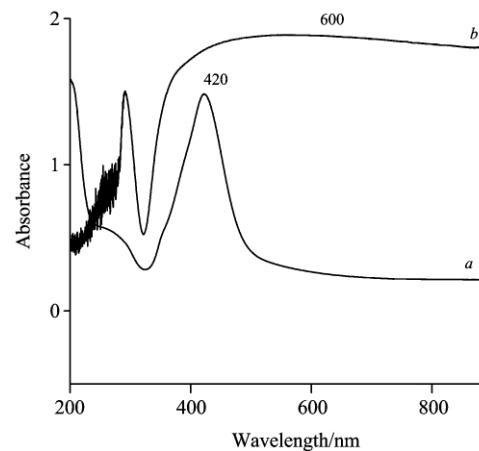


Fig. 2 UV-Vis absorption spectra of a Ag colloidal nanoparticles and b Ag nanofilm

## 2 结果与讨论

### 2.1 氧合血红蛋白SERS光谱

图3中a, b, c, d四条谱线分别是同一健康人氧合血红

蛋白在银膜上 SERS 光谱、银胶中 SERS 光谱、其常规拉曼光谱和银膜的拉曼光谱背景信号。从 *a*, *b*, *c* 光谱图对比可发现：银膜对氧合血红蛋白有很强的增强效果，得到很强的 SERS 信号；银胶虽然有所增强，但是信号仍然比较微弱，不利于观察和分析；谱线 *c* 几乎没有拉曼信号。谱线 *d* 是实验制得纳米银膜表面的拉曼光谱，从谱线 *d* 可以看出该银膜基本没有杂质信号的影响，效果较好。

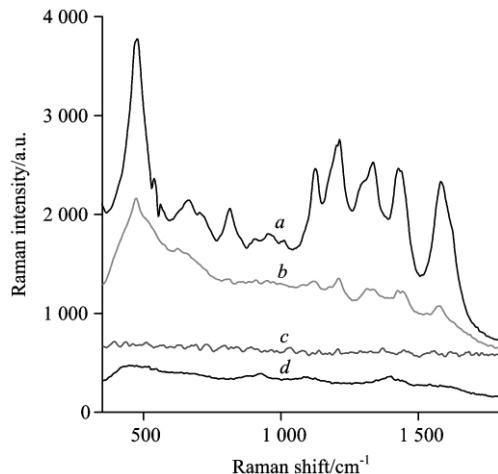


Fig. 3 SERS spectra of oxyHb adsorbed on Ag nanofilm *a* and colloidal Ag nanoparticles *b*, normal Raman spectra of oxyHb *c* and the surface of Ag nanofilm *d*

为了减少不同样本的光谱强度的差异带来的影响，能够更准确的分析，所有光谱线扣除荧光背景，提取纯 SERS 信号<sup>[17]</sup>。所有 SERS 光谱取拉曼位移在 200~2 000 cm<sup>-1</sup> 作为分析谱段。图 4 是 30 个健康人 *a* 和 30 个肝癌患者 *b* 氧合血红蛋白所有谱线处理后的平均 SERS 光谱。从图中可以看出，实验所制得的纳米银膜的光谱重现性比较好。健康人和肝癌患者氧合血红蛋白 SERS 光谱有相似点，但也有很大的区别。两者共有的主要谱峰：475, 657, 814, 1 123, 1 212, 1 336, 1 420, 1 591 cm<sup>-1</sup>。健康人氧合血红蛋白 SERS 光谱在 475, 814, 1 123, 1 212, 1 336, 1 420, 1 591 cm<sup>-1</sup> 处谱峰都

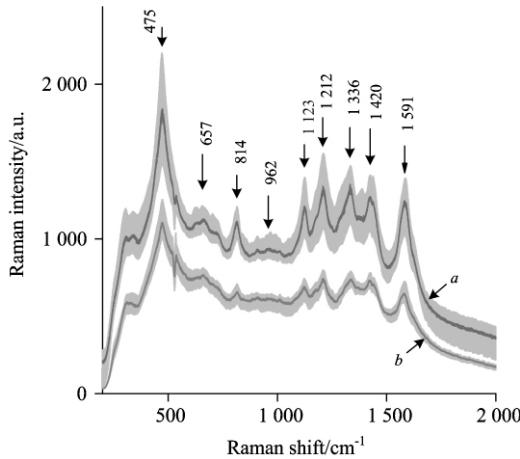


Fig. 4 Average SERS spectra of oxyHb for 30 healthy persons *a* and 30 liver cancers *b*

很强，而肝癌患者氧合血红蛋白 SERS 光谱在此几处都很弱，尤其在 814, 1 212, 1 591 cm<sup>-1</sup> 处。健康人氧合血红蛋白 SERS 光谱强度比肝癌患者大很多；健康人在 657 和 962 cm<sup>-1</sup> 处的拉曼峰虽然较弱，但在肝癌患者此处谱峰基本消失；而且可以看到健康人氧合血红蛋白 SERS 光谱形状要比肝癌患者 SERS 谱线形状规则。这些谱峰强度的变化，说明氧合血红蛋白结构发生了变化，氧合血红蛋白已经变性。

## 2.2 氧合血红蛋白 SERS 光谱的统计分析

为了更好的分析健康人和肝癌患者氧合血红蛋白 SERS 谱线的区别，下面将采用主成分分析(PCA)结合独立变量 *t* 检验和判别分析统计方法对健康人和肝癌患者氧合血红蛋白 SERS 谱进行统计分析。主成分分析是数学上处理降维的一种方法，是设法将原来变量重新组合成一组新的互相无关的几个综合变量，同时根据实际需要从中可以取出几个较少的综合变量尽可能多地反映原来变量的信息的统计方法。独立变量 *t* 检验可以提取最具差异的几个变量来反映实际问题。判别分析得出主成分分析结合独立变量 *t* 检验诊断肝癌的特异性与灵敏度，对其诊断可靠性进行评价。特异性是健康人中得出阴性检测的样本占健康人总数的百分比，灵敏度是病人中得出阳性检测的样本占病人总数的百分比。

首先对所有 SERS 谱线扣除荧光背景，在 350~1 800 cm<sup>-1</sup> 范围内谱峰面积进行归一化。由于氧合血红蛋白的浓度和分子振动等在 SERS 光谱中主要是用谱峰的相对强度、形状和位置来显示出来的，因此采用主成分分析方法(PCA)算出健康人和肝癌患者氧合血红蛋白的 SERS 光谱峰归一化面积的 PCA 得分。算出的得分会有十多个，再用独立变量 *t* 检验提取最具差异的 3 个 PCA 得分，分别为 PC2, PC4, PC7，其检验显著水平值  $p \leq 0.05$ ，做出 PCA 得分散点图，如图 5 所示。图中 30 个健康人用三角形表示，肝癌患者用圆点表示。从图中可以看出健康和肝癌患者分布在不同的区域，可以很好的区分开，有极少数重叠。健康人分布较松散，而肝癌患者分布比较集中。由此可以看出利用主成分分析结合独立变量 *t* 检验统计方法来诊断肝癌具有很好的效果。

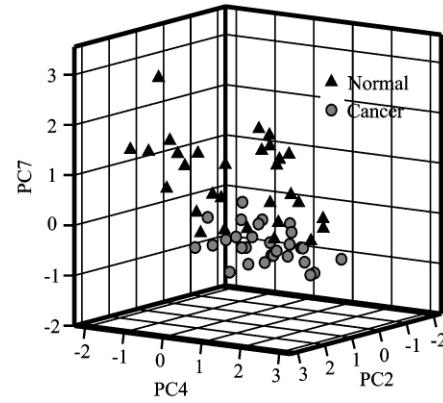


Fig. 5 3D scatter plot of PCA score of oxyHb SERS spectra for 30 healthy persons (triangle) and 30 liver cancers (circle)

为进一步检验利用主成分分析结合独立变量 *t* 检验统计

方法的诊断效果，将利用判别分析得出诊断的特异性与灵敏度来观察，并做出分类结果表和单独组图。如表一可以看出，判别分析得出的特异性为90%，灵敏度为96.7%，总判别正确率为93.3%。为得到更可靠的结果，还利用交叉验证分析，发现得出特异性为86.7%，灵敏度为96.7%，总判别正确率为91.7%。由此可以看出该判别正确率很高，诊断效果较好。图6为30个健康人和30个肝癌患者PC2、PC4和PC7判别式得分单独组图。从图6中可以很清楚的看到健康人和肝癌患者分布在各自表的不同位置，健康人大都分布在判别式得分大于零的区域，而肝癌患者则分布在小于零区域。而且可以看到健康人的标准偏差比肝癌患者的大，正如散点图中的分布，健康人较松散，而肝癌患者较集中。由此可知利用主成分分析结合独立变量t检验统计方法具有很好的诊断效果，利用此统计方法可以非常好的区分健康人和肝

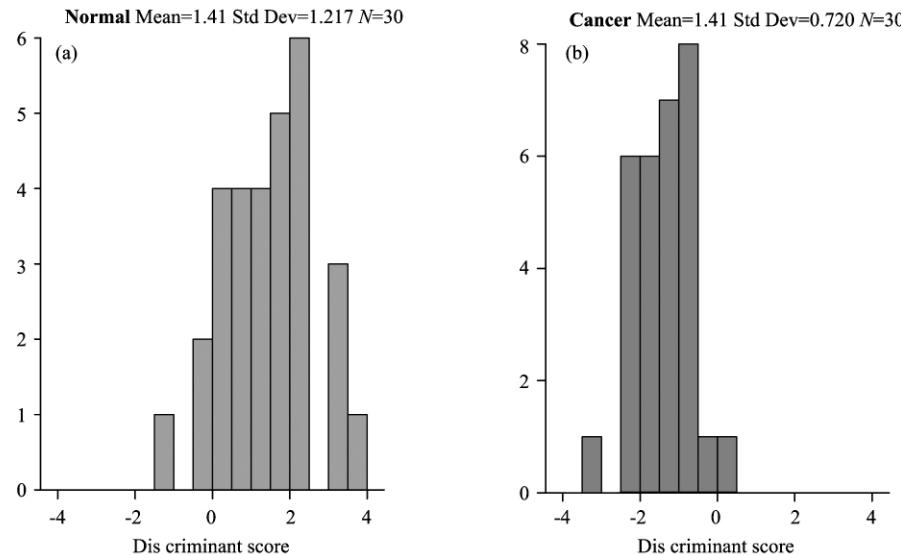


Fig. 6 Separate-groups plots of 30 healthy persons (a) and 30 cancers (b) discriminant score

### 2.3 讨论

由以上分析可知健康人和肝癌病人氧合血红蛋白SERS谱线有很大的区别，用主成分分析结合独立变量t检验统计方法可以很好的区分健康和肝癌病人氧合血红蛋白。统计分析中对所有光谱峰面积进行归一化，因为谱峰的相对强度和形状反应氧合血红蛋白浓度、分子结构及振动模式等信息。人体各器官的生理和病理一旦发生变化，往往就会引起血液成分的改变。肝癌患者与健康人相比，随着病情的开始，血液中氧合血红蛋白的浓度、结构等可能发生变化，这些变化在其氧合血红蛋白SERS谱线上表现出来。通过面积归一化，就可以消除实验中不同样本氧合血红蛋白的浓度不同造成的影响。

为了更好的了解生物分子变化引起血红蛋白SERS光谱变化的机理，表2列出了血红蛋白谱峰的归属。从表2可以看出，位于 $657\text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼峰归属于氧合血红蛋白分子吡咯环的对称弯曲变形振动；位于 $814$ 和 $962\text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼谱峰分别归属于氧合血红蛋白分子吡咯环的呼吸振动和反对称伸缩变形振动；位于 $1123\text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼谱峰归属于

癌患者。

Table 1 Classification results (93.3% of original grouped cases correctly classified and 91.7% of cross-validation grouped cases correctly classified)

Original	Count	Predicted group membership			
		Group	0	1	Total
% Original	0	27	3	30	30
	1	1	29	30	30
	0	90	10	100	100
	1	3.3	96.7	100	100
Count	0	26	4	30	30
	1	1	29	30	30
	0	86.7	13.3	100	100
	1	3.3	96.7	100	100

Cancer Mean=1.41 Std Dev=0.720 N=30

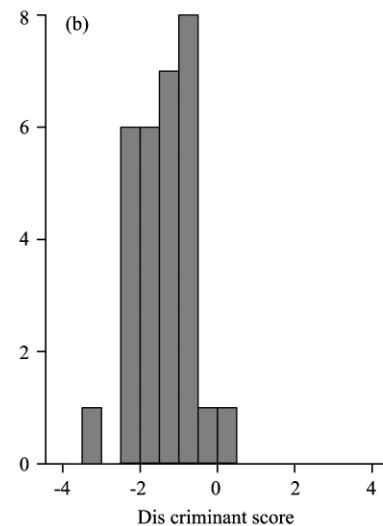


Table 2 Assignments for the SERS bands of oxyHb  
(based on Refs. [23, 24])

拉曼位移/ $\text{cm}^{-1}$	初步归属	拉曼位移/ $\text{cm}^{-1}$	初步归属
657	$\delta_{\text{pyr}}$	1 290	$\delta_{\text{C}-\text{H}}$
814	$\nu_{\text{pyr}}$	1 336	DNA
962	$\delta_{\text{pyr}}$	1 420	$\nu_{\text{C}-\text{C}}$
1 123	$\nu_{\text{C}-\text{N}}$	1 591	Phe $\nu_{\text{C}-\text{C}}$
1 212	Trp, Phe		

C—N的伸缩振动；位于 $1212\text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼谱峰源于铬氨酸和苯丙氨酸的共同贡献；位于 $1290\text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼谱峰是由C—H的弯曲振动引起；位于 $1336\text{ cm}^{-1}$ 附近拉曼峰源于DNA中核苷酸链的贡献；位于 $1420\text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼谱峰则分别由C—C的对称伸缩振动引起的；位于 $1591\text{ cm}^{-1}$ 附近是由苯丙氨酸中C—C的反对称伸缩振动引起。位于 $1591\text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼谱峰还与铁离子的自旋状态有关<sup>[18-22]</sup>。在血红蛋白的拉曼光谱中， $1555\sim1600\text{ cm}^{-1}$ 区域的谱峰对铁离子自旋态敏感，在 $1591\text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼峰表

明铁离子处在低自旋态( $S=1/2$ )，而在约 $1560\text{ cm}^{-1}$ 的拉曼峰表明铁离子处在高自旋态( $S=5/2$ )。而且在 $1500\sim1620\text{ cm}^{-1}$ 区域与血红蛋白的组成和结构有关，其中 $1545\text{ cm}^{-1}$ 是amide II蛋白骨架的N—H键振动， $1582$ 和 $1603\text{ cm}^{-1}$ 来自苯丙氨酸、酪氨酸的乙烯基团( $\text{C}=\text{C}$ )， $1619\text{ cm}^{-1}$ 来自酪氨酸和色氨酸的乙烯基团( $\text{C}=\text{C}$ )。

在进行统计分析过程中得到最具差异的3个PCA得分PC2, PC4和PC7，其对应的谱峰分别是： $814, 1212, 1591\text{ cm}^{-1}$ ，对应的归属分别是蛋白质分子吡咯环的呼吸振动、铬氨酸和苯丙氨酸、苯丙氨酸中C—C的反对称伸缩振动。而且在肝癌患者氧合血红蛋白平均SERS光谱中，在此3处的谱峰强度明显小于健康人，由此表明肝癌患者氧合血红蛋白中吡咯环的呼吸振动模式的数量、酪氨酸和苯丙氨酸的含量明显低于健康人。

### 3 结 论

#### 利用SERS技术结合多变量统计分析肝癌患者与健康人

#### References

- [1] Feng S Y, Pan J J, Wu Y A, et al. Sci. China Life Sci., 2011, 54(9): 828.
- [2] Ellis D I, Goodacre R. Analyst, 2006, 131: 875.
- [3] YAN Xue, ZHANG Xue-jiao, YUAN Ya-xian, et al(颜 雪, 张雪姣, 袁亚仙, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2010, 68(13): 1267.
- [4] Ren Wen, Liu Jiyang, Guo Shaojun, et al. Sci. China Life Sci., 2011, 54(8): 1334.
- [5] CAO Xiao-wei, LIU Wen-hua, LI Xin-ran, et al(曹晓卫, 刘文华, 李欣然, 等). Acta Phys.-Chim. Sin. (物理化学学报), 2011, 27(7): 1600.
- [6] JIA Shao-jie, XU Shu-ping, ZHENG Xian-liang, et al(贾少杰, 徐抒平, 郑先亮, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2006, 3(27): 523.
- [7] HU Juan, ZHANG Chun-ying(胡 娟, 张春阳). Progress in Chemistry(化学进展), 2010, 22(8): 1641.
- [8] GE Ming, BAO Fang, YAO Jian-lin, et al(葛 明, 鲍 芳, 姚建林, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2009, 67(20): 2285.
- [9] CHEN Shuai, YAO Jian-lin, HAN San-ying, et al(陈 帅, 姚建林, 韩三阳, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2010, 68(21): 2151.
- [10] LIU Ren-ming, LIU Rui-ming, WU Yan-chun, et al(刘仁明, 刘瑞明, 武延春, 等). Acta Optica Sinica(光学学报), 2011, 31(6): 063001-1.
- [11] ZI Xing-fa, LIU Ren-ming, WU Yan-chun, et al(自兴发, 刘仁明, 武延春, 等). The Journal of Light Scattering(光散射学报), 2010, 22(4): 298.
- [12] Feng S Y, Chen R, Lin J Q, et al. Biosens. Bioelectron., 2010, 25(11): 2414.
- [13] LIU Ren-ming, ZI Xing-fa, WU Yan-chun, et al(刘仁明, 自兴发, 武延春, 等). Chinese J. Lasers(中国激光), 2009, 36(10): 2657.
- [14] Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, et al. Phys. Rev. Lett., 1997, 78(9): 1667.
- [15] Emory S R, Nie S J. Phys. Chem. B, 1998, 102(3): 493.
- [16] Xu Hongxing, Javier Aizpurua, Mikael Käll, et al. Phys. Rev. E, 2000, 62(3): 4318.
- [17] Zhao J, Lui H, Mclean D I, et al. Appl. Spectrosc., 2007, 61(11): 1225.
- [18] Tomoko Yamamoto, Graham Palmer. The Journal of Biological Chemistry, 1973, 248(14): 5211.
- [19] Hu S, Smith K M, Spiro T G, et al. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118(50): 12638.
- [20] Denis L Rousseau, Yuanchin Ching, Maurizio Brunori, et al. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(14): 7878.
- [21] WANG Gui-wen, PENG Li-xin, CHEN Ping, et al(王贵文, 彭立新, 陈 萍, 等). Chinese J. Lasers(中国激光), 2009, 36(10): 2651.
- [22] Abe M, Kitagawa T, Kyogoku Y. J. Chem. Phys., 1978, 69(10): 4526.

的氧合血红蛋白SERS光谱区别。对比两组谱线发现，肝癌患者氧合血红蛋白SERS谱线在 $475, 814, 1123, 1212, 1336, 1420, 1591\text{ cm}^{-1}$ 处的谱峰强度都比健康人弱。采用主成分分析(PCA)结合独立变量t检验统计分析方法得出SERS光谱PCA得分(PC2, PC4, PC7)三维散点图可以很好的区分健康人和肝癌患者。采用判别分析得出主成分分析(PCA)结合独立变量t检验诊断肝癌的特异性和灵敏度分别为90%和96.7%，总判别率为93.3%，诊断效果较好。通过分析归属发现，肝癌患者氧合血红蛋白中吡咯环的呼吸振动模式的数量、酪氨酸和苯丙氨酸的含量明显低于健康人。分析表明，SERS光谱技术结合主成分分析和独立变量t检验统计分析方法可以很好的区分健康人和肝癌患者氧合血红蛋白，氧合血红蛋白的SERS光谱统计分析有望发展成为一种新型的肝癌诊断工具。

# Analysis of Surface Enhanced Raman Scattering Spectra of Oxyhemoglobin for Liver Cancer with Combined Multivariate Statistics

XIONG Yang<sup>1</sup>, LI Yun-tao<sup>1</sup>, GUO Yan<sup>2</sup>, RAO Feng-fei<sup>1</sup>, ZHANG Jian-min<sup>1</sup>, SI Min-zhen<sup>3</sup>, LIU Ren-ming<sup>3</sup>, TANG Wei-yue<sup>1\*</sup>

1. College of Physical Science and Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

2. Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

3. Application Institute of Spectroscopy Technology, Chuxiong Normal University, Chuxiong 675000, China

**Abstract** Investigation of surface-enhanced Raman spectra of oxyhemoglobin for 30 liver cancers and 30 normal persons based on the silver nanofilm was reported. Principal components analysis (PCA) and independent variable T test were employed to develop effective diagnostic algorithms for distinguishing liver cancer from normal. Discriminant analysis was used to evaluate the diagnostic efficiency and the result indicates that SERS spectra of the oxyhemoglobin are obviously different between normal persons and liver cancers. PCA and independent variable T test were employed to get a three-dimensional scatter plot of PC scores for the healthy and cancer groups, and it can be learned that they are distributed in separate areas. By using the method of discriminant analysis, it was found that the diagnostic algorithm separates the two groups with sensitivity of 96.7% and diagnostic specificity of 90%, the overall diagnostic accuracy was 93.3%. By analyzing the assignments of the SERS bands, it was found that the content of asparagine, tyrosine and phenylalanine in the hemoglobin are significantly lower than healthy people. The results from this exploratory study demonstrate that SERS detection of oxyhemoglobin for liver cancers based on the method of PCA combined with independent variable T test is expected to develop into a new type of liver cancer diagnostic tool.

**Keywords** Spectroscopy; SERS; Oxyhemoglobin; Liver cancer

(Received Mar. 25, 2012; accepted Jun. 20, 2012)

\* Corresponding author