

文章编号:1004-5929(2013)01-035-07

基于表面增强拉曼光谱检测技术的 肺癌早期诊断研究

王 艳¹, 崔子健¹, 王 燕¹, 郑文新¹, 刘春伟²,
郭 涣², 汪 泓², 陈安宇^{1*}

(1. 首都医科大学生物医学工程学院, 北京 100069;
2. 美国欧普图斯公司(OptoTrace Technologies, Inc. cliu@optotrace.com))

摘要: 表面增强拉曼光谱技术是近年来快速发展的一种痕量特征标记性物质检测技术, 以提高检测灵敏度为目的的表面增强拉曼光谱技术非常适合于生命科学研究。本文利用表面增强拉曼光谱技术对肺癌患者及正常人的唾液样本进行检测, 并进行光谱分析, 建立了肺癌患者唾液样本的实验模型, 对该模型系统分析可为肺癌诊断提供辅助依据。统计学分析效果良好, 并发现了分类比较明确的特异性波段 $1015\text{ cm}^{-1}\sim1070\text{ cm}^{-1}$ 和 $1250\text{ cm}^{-1}\sim1280\text{ cm}^{-1}$ 。在找出的 12 个特征峰的基础上应用 K-均值方法验证了其判别准确性, 结果提示提取的 12 个特征峰有一定的代表性, 能够代表近 2000 个波数的拉曼光谱图, 灵敏度较特异度高, 说明该方法适合预防性筛查工作。

关键词: 表面增强拉曼光谱; 唾液; 肺癌诊断

中图分类号:O433.3 R-331 R-319 文献标识码:A

Study on Diagnosis of Lung Cancer by Surface Enhanced Raman Spectroscopy on Human Saliva

WANG Yan¹, CUI Zi-jian¹, WANG Yan¹, ZHENG Wen-xin¹, LIU Chun-wei²,
GUO Xun², WANG Hong², CHEN An-yu^{1*}

(1. Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. OptoTrace Technologies, Inc., cliu@optotrace.com)

Abstract: Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) is a trace amount substance detecting technique developing quickly in recent years. In this paper, surface-enhanced Raman spectroscopy for detection of lung cancer patients and normal saliva samples, established the experimental model of the saliva samples of patients with lung cancer by spectral analysis, the model systems analysis can provide supplementary evidence for the diagnosis of lung cancer. Statistical analysis obtained good results, and found a relatively clear classification of the specific band of $1015\text{ cm}^{-1}\sim1070\text{ cm}^{-1}$ and $1250\text{ cm}^{-1}\sim1280\text{ cm}^{-1}$. Verify its discriminant accuracy of the 12 peaks identified on the basis of the K-means method, the results prompted to extract the 12 peaks, a certain representation, on behalf of nearly 2000 wave number Raman spectra, higher sensitivity than the specificity, indicating that

收稿日期:2012-04-12; 修改稿日期:2012-07-03

基金项目:北京市教育委员会科技计划重点项目(KZ201010025018);国家自然科学基金(81101641)

作者简介:王艳(1989—),女,汉族,安徽,在读研究生,研究方向为生物体参数的测量. E-mail:wangyan2006288@163.com

通讯作者:陈安宇. E-mail:chenay@ccmu.edu.cn

the method is suitable for the preventive screening.

Key words: Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS); saliva; lung cancer diagnosis

1 引言

肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤,绝大多数肺癌起源于支气管粘膜上皮,故亦称支气管肺癌。近年来,由于抽烟人群的增加和环境恶化等因素的影响,肺癌的发病率和死亡率在全世界大多数国家和大城市中已居恶性肿瘤的首位^[1]。对于肺癌的诊断检查,临幊上常用的方法有X线检查、支气管镜检查、放射性核素检查、细胞学检查、ECT检查、纵膈镜检查和剖胸探查术^[2, 3],但都存在一定缺陷,如灵敏度低,操作复杂,有创,费用高等,因此研究一种快速简便安全的早期肺癌检测方法成为提高肺癌患者生存率的关键。

表面增强拉曼光谱技术的出现,为肺癌的早期检测诊断提供了新的途径。拉曼光谱由于能够检测出样品的分子构型和不同的化学键,如C—H,C—N,C=O,N—H和O—H基团分子振动的信息,而这些基团普遍存在于所有生物分子中,因此应用拉曼光谱检测各种癌症是目前研究最活跃的领域之一^[4, 5]。它可以在分子水平反应组织、细胞的化学成分和分子结构的差异,是一种简便灵敏的光谱分析新技术,具有快速、准确、客观、无损等特点^[1, 6]。

唾液中含有大量的蛋白质和人体代谢产物,很多疾病可以通过对唾液成分的分析进行诊断。与血清标本相比,唾液采集安全方便,无创伤,无血源性疾病传播的危险,患者无痛苦,易于接受。与尿液标本相比,唾液还具有可实时采样的优点^[7-9]。拉曼光谱技术用于医学诊断具有非破坏性、非侵入性、快速、测量条件要求低、可重复性好、无污染等优点,可以快速地对唾液进行检测,二者的结合,有可能成为一种癌症早期诊断的新方法。

2 实验部分

2.1 实验仪器

本研究采用美国欧普图斯公司(OptoTrace Technologies, Inc.)研发的便携式表面增强拉曼检测系统(RamTracerTM-200)。设备参数分

别为:稳频激光功率0~300 mW,波长785 nm;半导体冷却,2048像素CCD;光谱分辨率<6 cm⁻¹;光谱范围250~2400 cm⁻¹。本研究选用的芯片型号为GDA0401。

2.2 样本的采集与制备

与北京宣武医院检验科合作,取已确诊,尚未接受任何治疗的肺癌患者唾液样本53例,其中男31例,女22例,40岁以下年龄段1例,40~49年龄段6例,50~59年龄段14例,60~69年龄段6例,70~79年龄段22例,80岁以上年龄段4例;采集正常人唾液样本18例,作为对照。

唾液提供人在唾液收集前1小时开始禁食水。用清水漱口后静坐于牙椅上。前5分钟内的唾液自然吞下后开始收集,口腔唾液积聚至一定量后,在干净容器中留取1~1.5毫升,采集时间为10~15分。目测唾液状态,包括颜色,粘稠度,气泡,是否带有血丝等,记录具有特殊状况的样本。样品放入冰壶后,立即转送实验室,将样本移至1.5毫升离心管,以每分一万四千转的速度离心10分钟,对于粘稠唾液进行第二次离心操作。小心转移上清液到另一离心管(如有浑浊现象进行再次离心),取上清液时将样品管成45°角以减少搅动底部沉淀物的机会。

2.3 实验方法

用微量移液管取上清液5微升左右并小心点至纳米芯片上(移液管顶尖不得触碰芯片表面),略干后待测。将制备好的样本芯片置于显微镜下,使焦点聚焦到唾液清晰边缘处,设置仪器参数,采集数据。

3 实验结果

3.1 样本的表面增强拉曼光谱检测

3.1.1 乙腈矫正和基底信号的检测

实验前进行仪器的矫正,乙腈矫正激光输出功率取200 mW,扫描时间为5秒,扫描次数为1次,调整峰位至波长378、918、1374、2252 cm⁻¹处。

进行芯片基底信号的扫描,并保存图像,参

数为扫描时间为 4 秒,扫描次数为 3 次。

3.1.2 唾液样本的检测

表面增强拉曼检测系统(RamTracerTM-200)的激光输出功率取 200 mW,扫描时间为 20 秒,扫描次数为 5 次,扫描范围为 250 cm⁻¹~

2400 cm⁻¹。扫描获取光谱信号,再经过相应的信号处理就可获得与样本分子结构相关的拉曼光谱,横坐标是拉曼频移(以波数 cm⁻¹为单位),纵坐标是拉曼散射相对强度,肺癌患者唾液拉曼光谱曲线如图 1 所示。

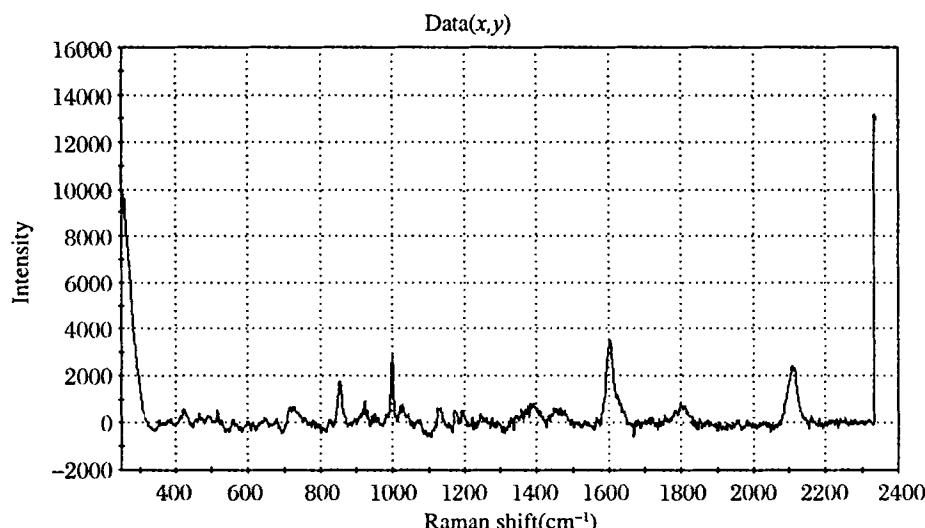


Fig. 1 Raman spectra of lung cancer patients saliva

3.2 实验数据的预处理分析

3.2.1 样本统计学分析

本研究中所采集的全部 71 例样本全部为一

段时间内随机采集得到的结果,无统计学意义,我们对 53 例肺癌患者的基本信息进行了分类和整理如表 1。

Table 1 Statistics of the basic information of the sample

性别						
	男			女		
	31			22		
年龄	40 岁以下	40~50	51~60	61~70	71~80	80 岁以上
	1	6	14	6	22	4
吸烟史	无	10 万(支/天 X 天数)	20 万支以下	30 万支以下	50 万支以下	
	20	3	5	10	15	

表现为性别比例男:女 = 1.4:1,发病主要集中在 60~79 岁之重度吸烟者是肺癌的高发人群,和不吸烟者相比,重度吸烟者得肺癌的概率比不吸烟者高 5.7 倍。这一人群主要集中在 35 岁到 55 岁之间的中青年人。

3.2.2 光谱分析

肺癌患者唾液与正常人唾液的平均拉曼光谱如图 2 所示:

由图 2 可以看到:肺癌患者唾液与正常人唾液的拉曼特征峰主要出现在 400 cm⁻¹~1800 cm⁻¹的波数范围内,一共找出 13 个明显的特征峰,通过资料检索它们的归属如表 2 所示。其中 I_L 为肺癌患者平均光谱强度, I_c 为对照组平均光谱强度且

$$\Delta I = \frac{I_L - I_c}{I_c}$$

Table 2 The materials of the Raman spectrum peaks

拉曼频移/ cm^{-1}		$\Delta I\%$	生物分子
正常	肺癌		
423±2	425±3	-2.82	D-葡萄糖, 氟代葡萄糖 ^[10]
528±1	529±2	-38.01	S-S 二硫键扭曲-扭曲-反式构象 ^[11]
636±2	632±2	-30.99	C-S 扭曲 ^[12, 13]
676±2	678±2	-32.82	胸腺嘧啶, 鸟嘌呤 ^[11, 14]
727±3	728±1	16.52	C-S 反式、腺嘌呤 ^[12-15]
854±1	854±1	-12.05	酪氨酸 ^[16, 17]
924±2	925±3	-17.12	脱氧核糖、C-C、D-甘露糖 ^[10, 18]
1000±2	1001±2	-19.48	苯丙氨酸单基取代苯基环 ^[18, 19]
1030±3	1026±1	-2.25	环的伸缩振动、C-H 平面内变形 ^[16, 18, 19]
1046±4	1050±2	-60.40	N-乙酰基葡萄糖、氟代 N-乙酰基葡萄糖 ^[17]
1263±2	1264±3	-31.12	胞嘧啶、腺嘌呤(DNA)、酰胺Ⅲ无规卷曲 ^[16-18]
1450±2	1450±2	-5.71	CH ₂ 弯曲、D-葡萄糖、D-葡萄糖醛酸、D-甘露糖, 氟代葡萄糖 ^[16, 17, 20]
1604±2	1604±2	-33.21	酪氨酸、苯丙氨酸残基 C-N 伸缩振动 ^[16, 18, 20]

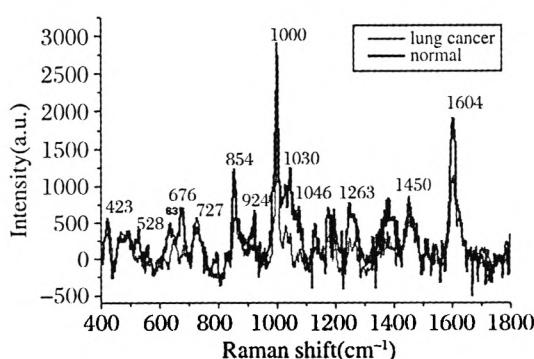


Fig. 2 The average Raman spectra of the lung cancer patients and the healthy individuals respectively. Excitation wavelength = 785 nm, Exposure time = 20 s

3.3 实验数据的统计学分析

3.3.1 SVM 及随机森林分类

SVM 方法是通过一个非线性映射 p , 把样本空间映射到一个高维乃至无穷维的特征空间中(Hilbert 空间), 使得在原来的样本空间中非线性可分的问题转化为在特征空间中的线性可分的问题, 该方法适用于解决小样本高维数据的二分类问题。本研究中采用国际通行的 R 软件对拉曼光谱数据在使用支持向量计算法的基础上

上使用留一法检验, 即轮流将其中一个样本作为测试集, 其他样本作为训练集, 增加统计分析的科学性。

随机森林即是采用有放回抽样法构建不同的样本集进行训练, 对每个样本集构建决策树, 从而形成随机森林, 根据所有树的投票数确定样本的类别。很多数据分析的结果证实随机森林的分类效能很高, 该方法可以解决所有二分类和多分类的问题。

(1) 以全部 71 例肺癌-对照唾液样本作为训练集和测试集:

Table 3 SVM classification results of the saliva samples of lung cancer patients and healthy people

实际观测	拉曼检测	
	肺癌	正常
肺癌	53	0
正常	0	18

灵敏度 = 检出阳性/(检出阳性 + 假阴性) = 100.0%;

特异度 = 检出阴性/(检出阴性 + 假阳性) = 100.0%

(2) 留一法检验: 即轮流将其中一个样本做测试集, 其余的样本做训练集:

Table 4 SVM classification results of the saliva samples of lung cancer patients and healthy people (Leave One Out, LOO)

		拉曼检测	
		肺癌	正常
实际观测	肺癌	53	0
	正常	0	18

灵敏度=检出阳性/(检出阳性+假阴性)=100%;

特异度=检出阴性/(检出阴性+假阳性)=100%

(3) 肺癌患者与正常人唾液样本的随机森林分类

Table 5 Random forests classification results of the saliva samples of lung cancer patients and healthy people

		拉曼检测	
		肺癌	正常
实际观测	肺癌	52	1
	正常	0	18

灵敏度=检出阳性/(检出阳性+假阴性)=98.11%;

特异度=检出阴性/(检出阴性+假阳性)=100.00%

3.3.2 K-均值聚类

K-均值聚类算法是一种基于划分的聚类算法,它通过不断的迭代来实现聚类,当算法收敛到结束条件时就终止迭代过程,得出聚类结果。由于其算法思想简单,又容易实现对大规模数据集的聚类,因此K-均值聚类算法已成为一种最常用的聚类算法之一。在SVM分类基础上,我们提取了13个特征峰作为指标,进行了K-均值聚类,结果为:

Table 6 K-means clustering results of the saliva samples of lung cancer patients and healthy people

		K-均值聚类	
		肺癌	正常
实际情况	肺癌	6	12
	正常	7	46

灵敏度=检出阳性/(检出阳性+假阴性)=89.2%;

特异度=检出阴性/(检出阴性+假阳性)=52%

3.3.2 显著性P值排序结果

由于拉曼检测所得到的样本数据在单个波数上呈正态分布,且方差不齐,对其使用t校正检验,再纵向比较各个波数上P值的大小,P值越小,代表该波数在两类样本分类中所贡献的权重较大。对于所检测的肺癌——对照唾液样本数据进行单个波数上的t检验,发现其分类所依

据的权重较大的光谱波数集中在 $1015\text{ cm}^{-1}\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ 和 $1250\text{ cm}^{-1}\sim 1280\text{ cm}^{-1}$ 波段。提示这些波数段在分类肺癌与正常唾液样本中贡献最大。参照国内外相关文献,糖类、蛋白质、DNA等物质均存在于这三个区域,拉曼图谱为其综合作用的结果。

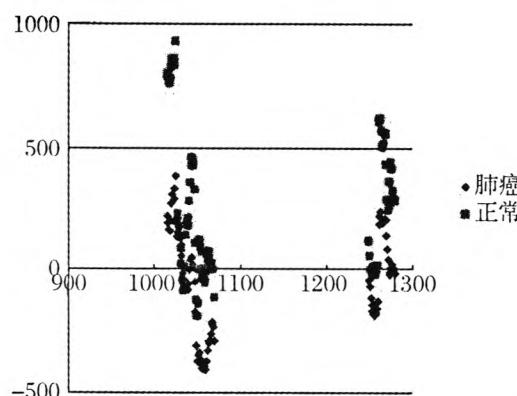


Fig. 3 Scatter plot chart in $1015\text{ cm}^{-1}\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ and $1250\text{ cm}^{-1}\sim 1280\text{ cm}^{-1}$

4 讨论

4.1 肺癌患者与正常人唾液拉曼光谱对比分析

(1) 肺癌患者唾液与正常人唾液的平均拉曼光谱存在显著差异:肺癌患者唾液的谱线较正常人唾液谱线强度整体变弱,在 528 cm^{-1} 、 636 cm^{-1} 、 676 cm^{-1} 、 854 cm^{-1} 、 924 cm^{-1} 、 1000 cm^{-1} 、 1046 cm^{-1} 、 1263 cm^{-1} 、 1604 cm^{-1} 峰的位置,正常人唾液的光谱强度都比肺癌患者高,而在 423 cm^{-1} 、 727 cm^{-1} 、 1450 cm^{-1} 峰的位置,肺癌患者唾液的光谱强度超过了正常人唾液。

(2) 糖类分子的变化:肺癌患者与正常人唾液的拉曼光谱所出现的 423 cm^{-1} 、 1450 cm^{-1} 两个峰位分别归属为D-葡萄糖和L-葡萄糖, 1046 cm^{-1} 峰位归属为N-乙酰基葡萄糖,L-乙酰基葡萄糖。由图中可以看出在 423 cm^{-1} 、 1450 cm^{-1} 两处峰位,肺癌患者唾液与正常人唾液的拉曼强度基本相同, 1046 cm^{-1} 峰位处,相差也小于20%,提示肺癌患者唾液与正常人唾液中所含糖类分子基本相同,变化不明显。

(3) 蛋白质分子的变化:由图2可见在 528 cm^{-1} 、 636 cm^{-1} 、 727 cm^{-1} 、 854 cm^{-1} 、 1000 cm^{-1} 、 1030 cm^{-1} 、 1263 cm^{-1} 、 1604 cm^{-1} 峰的位置,肺癌患者唾液的光谱强度均明显异于正常人唾液的光谱强度。在主链结构方面 1030 cm^{-1} 、

1263 cm^{-1} 的谱线分别归属为蛋白质分子环的伸缩振动, C—H 平面内变形以及酰胺Ⅲ的无规卷曲, 表明导致蛋白质分子的空间构象发生改变。侧链构象方面其中 854 cm^{-1} 、 1000 cm^{-1} 、 1604 cm^{-1} 的谱线归属于蛋白质分子的残基酪氨酸、苯丙氨酸残基以及苯丙氨酸单基取代苯基环的谱线。说明肺癌患者与正常人唾液中所含蛋白质分子残基的改变。 528 cm^{-1} 、 636 cm^{-1} 、 727 cm^{-1} 峰的位置分别表示 S—S 二硫键扭曲-扭曲-反式构象、C—S 扭曲和 C—S 反式的谱线, 这些均为构象灵敏的基团, 这几种改变叠加的结果, 必然导致蛋白质结构的无序性。

(4) 核酸分子的变化: 肺癌患者唾液在 676 cm^{-1} 、 727 cm^{-1} 、 924 cm^{-1} 处峰光谱强度与正常人唾液在该峰位的光谱强度不同, 且 676 cm^{-1} 的谱线归属胸腺嘧啶的谱线, 而 727 cm^{-1} 处的谱线归属为腺嘌呤的谱线, 可见肺癌患者唾液中, 核酸分子的种类及含量发生改变。

4.2 统计结果分析

4.2.1 SVM 及随机森林分类结果分析

(1) 由表 3 可以看到使用 R 软件, 以全部 71 例样本组成训练集和测试集, 其中肺癌患者唾液样本 53 例, 正常人唾液样本 18 例作为对照, 肺癌患者和正常人唾液样本的拉曼光谱数据 SVM 分类结果灵敏度为 100%, 特异度为 100%。

(2) 留一法检验: 即轮流将其中一个样本做测试集, 其余的样本做训练集(表 3), 使用 SVM 算法的分类结果灵敏度仍为 100%, 特异度为 100%。

(3) 随机森林法检测(5000 棵决策树), 分类结果灵敏度为 98.11%, 特异度为 100%。

可以看到无论是自测还是他测, 灵敏度和特异度均为 100%, 提示使用 SVM 及随机森林算法对肺癌患者和正常人唾液样本的拉曼光谱数据都有很好的分类效果, 肺癌患者唾液与正常人唾液在组成成分上确有不同, 与光谱分析结果一致。若继续扩大样本量则说服力会更大但可能会引入误差。

4.2.2 t 检验结果分析

对于所检测的肺癌一对照唾液样本数据进行 t 检验, 在均满足置信因子($P < 0.05$)的波数中按照权重大小排序, 发现权重较大的光谱波数

集中在 $1015\text{ cm}^{-1} \sim 1070\text{ cm}^{-1}$ 和 $1250\text{ cm}^{-1} \sim 1280\text{ cm}^{-1}$ 之间。通过肺癌患者与正常人唾液拉曼光谱数据在 $1015\text{ cm}^{-1} \sim 1070\text{ cm}^{-1}$ 和 $1250\text{ cm}^{-1} \sim 1280\text{ cm}^{-1}$ 波段的散点图可以看出肺癌患者与正常人唾液在这两个波段分类较为明确。在该波段, 肺癌患者和正常人唾液的拉曼光谱中有明显的拉曼峰出现, 分别为 1030 cm^{-1} 、 1046 cm^{-1} 和 1263 cm^{-1} 分别对应环的伸缩振动, C—H 平面内变形和 N—乙酰基葡萄糖, 氮代 N—乙酰基葡萄糖。综上结果, 提示对肺癌患者与正常人的唾液样本中可能存在这蛋白质构象的改变以及糖类的变化, 这些因素在对光谱数据的统计分析中得到了体现。

4.2.3 对特征峰的 K-均值分类

如图 2 所示, 研究肺癌-健康对比图谱, 提取出 13 个特征峰如表 6 所示,

我们应用 K-均值法对 13 个特征峰进行空间聚类, 迭代四次后收敛结果灵敏度为 89.2%, 特异度为 52%, 其中将 7 例肺癌患者唾液样本误判为阴性, 12 例正常人唾液样本判为阳性。结果提示提取的 13 个特征峰有一定的代表性, 能够代表近 2000 个波数的拉曼光谱图, 灵敏度较特异度高, 说明该方法适合预防性筛查工作。

5 结论

利用表面增强拉曼光谱技术对肺癌患者的唾液样本进行检测, 并进行光谱分析, 得出肺癌患者唾液与正常人唾液的拉曼光谱存在显著性差异: 肺癌患者唾液的谱线较正常人唾液谱线强度整体变弱, 并找出了 13 个特征峰。与正常人唾液相比, 肺癌患者的唾液中蛋白质分子, 核酸分子都发生了一定程度的变化, 而糖类分子变化较小。初步分析使用 SVM 和随机森林算法对肺癌患者和正常人唾液样本的拉曼光谱数据分类效果显著, 肺癌患者唾液与正常人唾液在组成成分上确有不同, 与光谱分析结果一致。若继续扩大样本量则说服力会更大但可能会引入误差。我们通过和宣武医院合作, 共召集退休职工 110 人进行肺癌的健康普查, 取受试者唾液样本进行表面增强拉曼光谱检测。SVM 分类均为正常, 结果与医院体检结果吻合。

为使表面增强拉曼光谱技术通过检测唾液能真正的应用于临床医学诊断, 还要有大量的工

作要做。如建立系统的样品预处理程序、规范光谱采集条件、完善谱线分析方法;增加样本数量,以使结论更具有统计学意义;扩大研究肺癌特异性标志物的种类,进一步探索引起肺癌患者唾液的拉曼特征峰的物质基础。相信在不久的将来,经过不断的努力探索,表面增强拉曼光谱技术会成为临床肿瘤早期诊断、辅助诊断和健康普查的简便、可靠的方法。

参考文献:

- [1] Noh M S, Jun B H, Kim S, et al. Magnetic surface-enhanced Raman spectroscopic (M-SERS) dots for the identification of bronchioalveolar stem cells in normal and lung cancer mice[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(23-24): 3915—3925.
- [2] Liu Y, Wang M. [Advances in early diagnosis of lung cancer][J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2011, 14(5): 429—434.
- [3] Lee S M, Park C M, Paeng J C, et al. Accuracy and predictive features of FDG-PET/CT and CT for diagnosis of lymph node metastasis of T1 non-small-cell lung cancer manifesting as a subsolid nodule[J]. *Eur Radiol*, 2012.
- [4] Nie B, Masyuko R N, Bohn P W. Correlation of surface-enhanced Raman spectroscopy and laser desorption-ionization mass spectrometry acquired from silver nanoparticle substrates[J]. *Analyst*, 2012, 137(6): 1421—1427.
- [5] Owen C A, Notinger I, Hill R, et al. Progress in Raman spectroscopy in the fields of tissue engineering, diagnostics and toxicological testing[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2006, 17(11): 1019—1023.
- [6] Virkler K, Lednev I K. Forensic body fluid identification: the Raman spectroscopic signature of saliva[J]. *Analyst*, 2010, 135(3): 512—517.
- [7] Castagnola M, Picciotti P M, Messana I, et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid[J]. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2011, 31(6): 347—357.
- [8] Thomadaki K, Helmerhorst E J, Tian N, et al. Whole-saliva proteolysis and its impact on salivary diagnostics[J]. *J Dent Res*, 2011, 90(11): 1325—1330.
- [9] Lenora R, Bigler C F S W. Salivary biomarkers for the detection of malignant tumors that are remote from the oral cavity[J]. *Clin Lab Med*, 2009 (29): 71—85.
- [10] 许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用[Z]. 化学工业出版社, 2004.
- [11] Peng-Wei Li J Z L Z. Surface-enhanced Raman scattering and adsorption studies of morphine on silver island film[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2009, 49(4): 2—6.
- [12] Feng S, Chen R, Lin J, et al. Gastric cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy excited by polarized laser light[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26 (7): 3167—3174.
- [13] Han H Y X D R. Analysis of serum from type II diabetes mellitus and diabetic[J]. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 2008, 4(94): 667—672.
- [14] Barhoumi A, Zhang D, Tam F, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(16): 5523—5529.
- [15] Feng S, Chen R, Lin J, et al. Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(11): 2414—2419.
- [16] Neugebauer U, Clement J H, Bocklitz T, et al. Identification and differentiation of single cells from peripheral blood by Raman spectroscopic imaging[J]. *J Biophotonics*, 2010, 3(8-9): 579—587.
- [17] Krafft C, Codrich D, Pelizzo G, et al. Raman mapping and FTIR imaging of lung tissue: congenital cystic adenomatoid malformation[J]. *Analyst*, 2008, 133(3): 361—371.
- [18] Huang Z, McWilliams A, Lui H, et al. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2003, 107(6): 1047—1052.
- [19] Pichardo-Molina J L, Frausto-Reyes C, Barbosa-Garcia O, et al. Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients[J]. *Lasers Med Sci*, 2007, 22(4): 229—236.
- [20] Brigit M M, Sasirekha V, Ramakrishnan V. Spectral investigations of amino acid picrates[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2006, 65(2): 414—420.