

单个鼻咽癌细胞的拉曼光谱分析的研究

姚辉璐¹, 朱森², 王桂文¹, 彭立新¹, 何碧娟³, 何敏², 黎永青⁴

1. 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530003
2. 广西医科大学实验中心, 广西南宁 530021
3. 广西科学院科研处, 广西南宁 530003
4. 东卡罗莱纳大学物理系, 美国 北卡罗莱纳 27858

摘要 利用激光镊子拉曼光谱系统研究了鼻咽癌细胞株和正常人鼻咽部气道上皮细胞株的单个细胞的拉曼光谱, 对于每个细胞在不同部位测3个点。结果显示: 正常细胞和癌细胞的平均拉曼光谱有显著差异; 正常的细胞光谱强度比癌细胞的明显要高; 正常细胞的1304和1336 cm⁻¹处峰的强度比值为1.05, 癌细胞的为1.22。用PCA主成分分析和DFA判别分析分别对单个细胞的平均光谱和不同位置所取得的单独光谱进行分析, 结果发现: PCA和DFA均可以把癌细胞和正常细胞正确区分, 对于单独光谱, DFA的效果更好一些。同时还发现同一个细胞中不同的光谱位置对PCA和DFA的区分度影响不是很大; PCA和DFA的图中还表明癌细胞的均匀度要比正常细胞的差。以上的研究均表明: 激光镊子拉曼光谱可以成为区别正常鼻咽细胞和鼻咽癌细胞的有效手段。

关键词 拉曼光谱; 鼻咽癌; 光镊; 主成分分析; 判别分析

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)09-1761-04

引言

拉曼光谱是一种分析分子结构的有用工具, 拉曼光谱特征峰位置、强度和线宽可提供分子振动、转动方面的信息, 据此可以反映出分子中不同的化学键或官能团, 因此拉曼光谱成为研究物质分子结构的有效手段。拉曼光谱作为一种分析方法有其显著的优势, 它能提供快速、无损的检测, 并且给出高专一性的光谱信息, 从而可以进行多成分分析。此外, 拉曼光谱不需对样品进行特别的处理, 使得在线分析和实地检测成为可能。显微拉曼光谱技术对于探测大细胞内物质是一种有用手段, 但对不少受布朗运动影响或会游动的细胞或生物大分子就无能为力了。为此我们引入了激光镊子拉曼光谱技术。激光光镊拉曼光谱技术是将光学囚禁技术与显微拉曼光谱技术相结合用于单细胞探测的新技术^[1-3]。它用同一束光来囚禁细胞和激发细胞的拉曼光谱。

鼻咽癌是东南亚国家和我国南方地区常见的恶性肿瘤, 尽管目前肿瘤诊断技术(内窥镜技术、影像技术和肿瘤标志物检验技术等)发展迅速, 但主要还是依赖于形态学的诊断, 组织活检(Biopsy)的方法来确定肿瘤的性质、分化程度等。

对肿瘤诊断仍存在一定的主观性, 并且报告结果的时间长, 活检次数多, 而寻找一种准确、高效、客观的肿瘤诊断方法, 是生命科学研究中具有重要意义的课题。

组织发生癌变, 主要是由于组成细胞的基本成分蛋白质、核酸、脂类和糖类等物质结构发生改变所造成的。拉曼光谱正是分析这些物质结构、成分变化的有效手段。目前拉曼光谱已经用于分析乳腺癌、结肠癌、食管癌、前列腺癌和胃癌等研究^[4-6], 但对于鼻咽癌细胞系的拉曼光谱研究目前还没有见报道。本文利用激光光镊拉曼光谱仪系统测量单个鼻咽癌细胞的拉曼光谱, 并利用多元统计分析方法对光谱进行分析, 从而建立一个识别正常细胞与癌细胞的数学模型。

1 实验与方法

1.1 实验设备

激光镊子拉曼光谱的实验装置如图1所示。一束波长为785 nm的半导体激光经过滤波后被导入一台尼康倒置生物显微镜。显微镜物镜是数值孔径为1.30, 放大倍数为100倍的油浸物镜。激光束经物镜聚焦后在焦点附近形成了一个单光束光势阱。激光束到达物镜前的光斑直径大约6 mm, 发

收稿日期: 2006-04-06, 修订日期: 2006-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30460121)和广西科学基金项目(桂科基0448018)资助

作者简介: 姚辉璐, 1972年生, 广西科学院生物物理实验室副研究员 e-mail: yaohl@163.net

散角是 2 mrad。半导体激光器通过恒温电路控制以避免波长漂移。样品池由下底密封了 100 μm 的石英盖玻片和上边密封了 1 号盖玻片的玻璃板构成，玻璃板中心有一个直径为 6 mm 的孔。含有样品的缓冲液就放置在两个玻片之间的孔里。缓冲液里的单个细胞可以被聚焦的激光束产生的辐射压力囚禁在焦点附近，同时这束激光也用来激发被囚禁细胞的拉曼散射。在收集光路里，物镜也作为收集透镜收集来自细胞的背向散射光，一个 200 μm 的针孔用来去除离轴的散射光。细胞的散射光包括三部分：拉曼信号、荧光和弹性散射光。由于是单细胞测量，细胞的荧光明显减小。两个干涉陷波滤波器被用来滤除波长与激发波长相同的弹性散射光。拉曼散射光然后被聚焦进光谱仪的输入狭缝。光谱仪的衍射光栅参数是闪耀波长为 1 000 nm，每 600 线/mm。光谱仪耦合到电荷耦合器件 CCD 上，为了获得极低的暗电流，CCD 被冷却到 -120 °C。为方便实验操作，细胞通过一个摄像机连续监视。

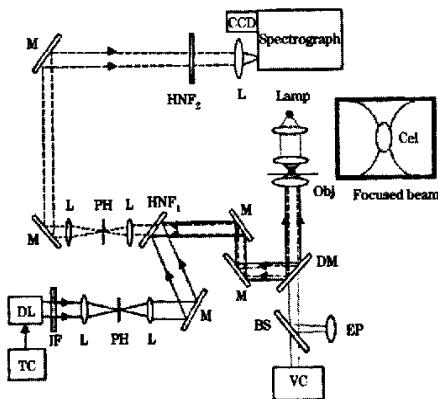


Fig. 1 Experimental setup

DL: Diode laser; IF: Interference filter; M: Reflection mirror; L: Lens; BS: Beam splitter; Obj: Objective lens; EP: Eyepiece; VC: Video camera; Lamp-Green-filtered illumination light; Cel: Cell; HNF: Holographic notch filter; PH: Pinhole; DM: Dichroic mirror

1.2 样品来源与处理方法

材料：人鼻咽癌 CNE₂ 细胞株由广西医科大学肿瘤医院提供；人气道上皮（鼻咽部）HBE 细胞株购于湖南远泰生物有限公司；RPMI-1640 培养液、MEM 培养液、1: 250 胨蛋白酶为 Hyclone 产品；新生牛血清：杭州四季青生物材料研究所。

细胞培养：人鼻咽癌 CNE₂ 细胞株，采用含 10% 新生牛血清、100 U·mL⁻¹ 的青霉素及链霉素的 RPMI-1640 培养液；人气道上皮 HBE 细胞株，采用含 10% 新生牛血清、100 U·mL⁻¹ 的青霉素及链霉素的 MEM 培养液，置于 37 °C，5% CO₂ 的培养箱中培养，选用对数生长期细胞进行实验。

测试方法：以 20 mW 激发功率和 30 s 曝光时间分别采集 40 个正常细胞和 40 个鼻咽癌细胞的拉曼光谱，对于每个细胞按照平均位置分布测 3 个点，然后对光谱进行背景扣除及强度修正。由于每个细胞只被功率为 20 mW 的激光照射了 30 s，因此对细胞生物活性的影响很小。

2 结果与讨论

(1) 正常细胞 HBE 与鼻咽癌细胞系 40 个细胞的平均光谱及 HBE 与 CNE₂ 的差值光谱见图 2，CNE₂ 和 HBE 的典型图像见右上角（放大了 1 000 倍），其对应峰的归属见表 1。

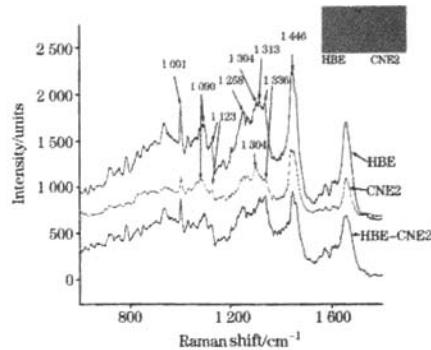


Fig. 2 Mean Raman spectra from single normal cell and carcinoma of nasopharynx cell

从图 2 可以得到以下结论：癌细胞的拉曼光谱强度比较弱，在一系列峰的位置，正常细胞的光谱都比癌细胞高。我们从光谱中还可以看到正常细胞的 1 336, 1 313 相对于 1 304 而言高了很多。对于正常细胞的 I_{1304}/I_{1336} 等于 1.05，而癌细胞的 I_{1304}/I_{1336} 等于 1.22。

Table 1 The peak positions and assignment of Raman spectra^[4]

峰位置/cm ⁻¹	归属
1 001	苯丙氨酸的对称呼吸振动模
1 087~1 090	C—C stretch, O—P—O stretch
1 123	脂类 C—C 拉伸模/蛋白 C—N 拉伸模
1 258	Amide III/adene/cytosine
1 304	CH ₂ 变形(脂类)腺嘌呤, 胞嘧啶
1 313	CH ₃ CH ₂ twisting mode of collagen/lipids
1 336	核苷酸链(DNA)
1 446	蛋白质 CH ₂ 变形振动模
1 660	Amide I 氨基化合物

(2) 为提高识别的灵敏度和特异度，我们采用将主成分分析 PCA 与判别分析 DFA 相结合的方法对光谱数据重新进行分析。主成分分析是研究如何将多指标问题化为较少的综合指标问题。综合指标是原来多个指标的线性组合，虽然这些线性综合指标是不能直接观测到的，但这些综合指标间互不相关，又能反映原来多指标的信息。判别分析 (discriminant factorial analysis, DFA)，该分析在充分保护现有信息的前提下，使同类组群数据的差异性尽量缩小，不同类数据间的差异尽量扩大，以此建立识别模型。

我们对数据进行两类分析，以验证实验的有效性和可靠性，一般而言，激光的激发光斑在 2 μm 左右，面积约为

$3.14 \mu\text{m}^2$, 癌细胞和正常细胞的尺寸一般在 $15\sim20 \mu\text{m}$ 之间, 面积大于 $200 \mu\text{m}^2$, 即激光激发光谱的面积不到细胞面积的 $1/60$; 这样的话数据是否真能反应整个细胞的光谱信息就存在一定问题。在文献中可以看到, 对于这种情况一般采用两种方法解决, 一是利用扫描方式, 设定一个区域和时间让激光连续在设定好的区域进行运动以累积方式记录光谱信号, 从而得到光谱。二是采用在一个细胞中选择几个点来进行光谱收集, 然后把它们累加, 平均后做为该细胞的光谱。这两种方式其实也都存在不能 100% 反应信息量的问题。特别是后一种, 抽取的点的可信度从原理来说更低。为此我们在后期的数据处理中, 采用了不同的方法, 以验证数据的可靠性。一是针对每个细胞 3 个平均位置的光谱平均后, 作为细胞代表光谱, 共 80 个数据做 PCA 和 DFA(见图 3 和图 4), 另一个方式是用单独的光谱共 240 组数据做 PCA 和 DFA(见图 5 和图 6, PCA 的区分率见图 4)。在以下图中 HBE 代表了正常的 HBE 细胞系细胞, CNE 代表了癌细胞系, 其后的数字是所对应的标号, 数字后的“t”表示该标号的细胞用做测试, 以检验该模型的准确性。

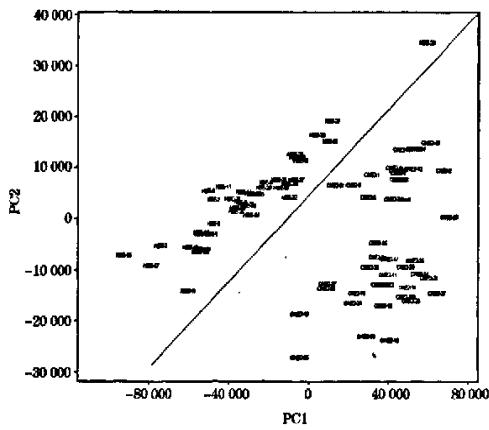


Fig. 3 Analysis of single cell's averaged spectra with PCA

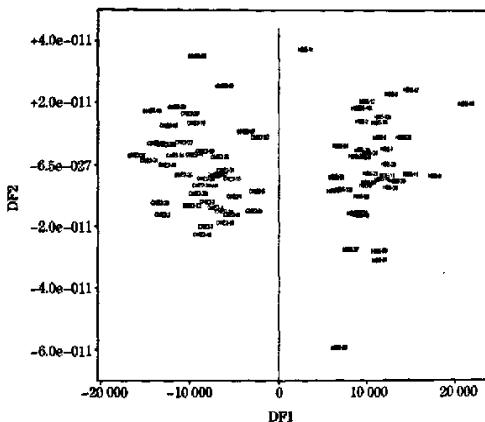


Fig. 4 Analysis of single cell's averaged spectra with DFA

(3)从图 3 和图 4 中我们可以清楚的看到对于平均光谱, 无论 PCA 还是 DFA 都可以清楚的把癌细胞和正常细胞区别开来, 测试数据也落在了相应的区域, 区分率均可以达到 100% , 在 PCA 中我们也同时注意到癌细胞的分布区域比正常的细胞的区域大, 这说明了癌细胞在个体差异上比正常细胞的要大。

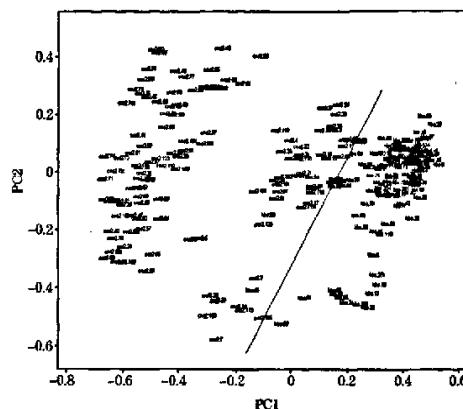


Fig. 5 Analysis of single cell's spectra with PCA

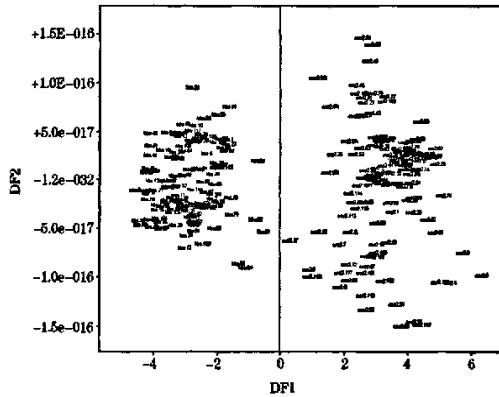


Fig. 6 Percentage explained variance of PCA from single cells

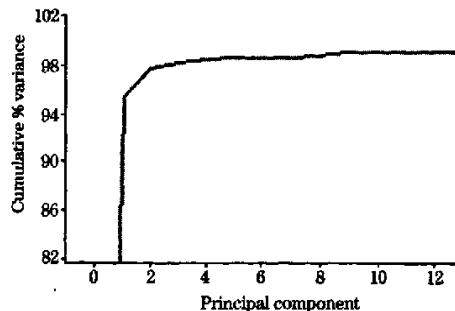


Fig. 7 Analysis of single cell's averaged spectra with DFA

(4)从图 5 和图 6 中我们看到对于单个光谱而言, PCA 的区分率显然不如平均光谱的 PCA, 虽然在图 7 中我们知道在 PCA 中我们只要采用了前面两个主要成分区分率就可以达到将近 98%, 但无论再怎样增加后面的主要成分, 区分率也不高于 98%, 具体到本数据上, 意味着有 3 组光谱数据是交叉的, 不能区分的。同时我们也可以更加清楚的看到癌细胞对于正常细胞而言, 它们的分布区域更加宽, 而且有一部分很靠近正常细胞, 这进一步说明了癌细胞内部物质均匀性很差。但我们从图 6 的 DFA 图中可以看到, 就算是单个光

谱, 用 DFA 也能 100% 的区别开来。

综上所述, 我们利用激光光镊拉曼光谱仪测量了 40 个鼻咽癌细胞和正常细胞的拉曼光谱, 利用主成分分析与判别分析结合的方法对鼻咽癌细胞拉曼光谱进行分析。它可以正确的判别癌细胞和正常细胞这一模型的灵敏性和特异性均为 100%, 通过分析我们还发现了该判别方法对光谱的激发位置要求不高。通过对鼻咽癌细胞拉曼光谱的研究表明, 拉曼光谱可以成为鼻咽癌诊断的有用技术。

参 考 文 献

- [1] Xie C A, Dinno M A, Li Y Q. Opt. Lett., 2002, 27: 249.
- [2] Xie C A, Li Y Q. J. Appl. Phys., 2003, 93: 2982.
- [3] Xie C A, Li Y Q, Tang W, et al. J. Appl. Phys., 2003, 94: 6138.
- [4] Nicholas Stone, Catherine Kendall, Jenny Smith, et al. Faraday Discuss., 2004, (126): 141.
- [5] 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.
- [6] TANG Wei-yue, WANG Jie-fang, XU Ping(唐伟跃, 王杰芳, 徐平). Laser Journal(激光杂志), 2004, 25(1): 82.
- [7] Ashkin A, Dziedzic J M, Bjorkholm J E, et al. Opt. Lett., 1986, 11: 288.
- [8] Ashkin A, Dziedzic J M. Science, 1987, 235: 1517.
- [9] Ashkin A, Dziedzic J M, Yamane T. Nature, 1987, 330: 769.

Study of Raman Spectra of Single Carcinoma of Nasopharynx Cell

YAO Hui-lu¹, ZHU Miao², WANG Gui-wen¹, PENG Li-xin¹, HE Bi-juan¹, HE Min², LI Yong-qing⁴

1. Laboratory for Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China

2. Laboratory Center of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China

4. Department of Physics, East Carolina University, Greenville, North Carolina 27858-4353, USA

Abstract The Raman spectra from carcinoma of nasopharynx cell lines (CNE₂) and normal airway epithelial cell lines (HBE) were investigated using a laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS). The Raman scattering measurements were obtained from three different places in every single cell. Visual inspection of the spectra shows that the differences observed in spectra of the cancer cells and normal cells are obvious. The peak ratio I_{1304}/I_{1336} is 1.05 for the normal cell and 1.22 for the cancer cell. Using a combination of principal component analysis (PCA) and discriminant function analysis (DFA), the authors are able to predict cancer cells, and normal cells and the DFA is better for single Raman spectrum. The sampling locations did not seriously affect the result of PCA and DFA. PCA and DFA also show that the uniformity of normal cells is better than that of cancer cells. The results indicate that the Raman spectra may offer the experimental basis for colorectal cancer diagnosis.

Keywords Raman spectroscopy; Carcinoma of nasopharynx; Laser tweezer; Principal component analysis; Discriminant function analysis

(Received Apr. 6, 2006; accepted Jul. 16, 2006)