

肺癌组织拉曼光谱的统计分析

付莉¹, 刘婉华², 李立祥², 张建民², 唐伟跃²

(¹郑州铁路职业技术学院,河南 郑州 4500052; ²郑州大学物理工程学院,河南 郑州 450001)

摘要 使用统计的方法,应用激光显微拉曼光谱法对肺癌变及癌旁正常组织冰冻切片进行了分析研究。结果表明,肺癌组织和癌旁正常组织的拉曼光谱有显著的差异性:正常肺组织切片的 1392 cm^{-1} 附近的 C-H 变形振动在癌变组织光谱中向高波数移动约 6 cm^{-1} ; 1523 cm^{-1} 脂类类胡萝卜素的 C=C 振动谱带在癌变组织光谱中向高波数移动约 3 cm^{-1} ; 体现在肺癌组织中细胞形态和组织结构发生的变化,说明拉曼光谱法可以用于对良、恶性肺部组织进行鉴别诊断。

关键词 肺癌; 拉曼光谱; 统计

Raman Spectroscopic Statistics Analysis on Tissues of Lung Cancer

Fu li¹, Liu wanhua², Li lixiang², Zhang jianmin², Tang weiyue²

(¹Zheng Zhou Railway Vocational & Technical College, Zhengzhou, Henan 450052, China;

²Physics and Engineer College of Zheng Zhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract Using statistics method, The co-focus Laser Raman spectroscopy was applied to the study of the spectrum of cancerous tissues and normal tissues near the cancer of the lung. The results showed that significant differences were seen in Raman spectra between the normal and malignant pulmonic tissues: the peak of C-H and C=C shifted to long wavenumber in cancerous tissues. These difference embodies the variety of cell's structure and shape, this might indicate Raman spectrum could be a new method of the clinical diagnoses of the lung cancer.

Key words Lung cancer; raman spectrum; statistics

1 引言

肿瘤是威胁人类健康和生命的最大的疾病之一。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。目前医学发展水平尚不能对其进行彻底治疗,因此早期诊断,及时治疗是提高肺癌病人生存机会的最有效途径^[1]。

构成组织和细胞的基本物质主要是由糖类、蛋白质、核酸、脂类等。细胞在癌变的过程中这些组份的含量、构像均会发生变化。而这些变化可以通过其拉曼光谱的变化表现出来。拉曼光谱法已经应用于对多种肿瘤的研究^[2-4],本文对肺癌和癌旁正常组织的拉曼光谱进行研究,探讨了其光谱差异及其导致其差异的可能原因,并对其进行统计分析,以期为肺癌的早期诊断提供新的思路。

2 实验部分

2.1 实验仪器

RM2000 型激光共焦显微拉曼光谱仪(英国 Renishaw 公司生产),波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光器。

2.2 样品及制备方法

样品:所用样品为已经病理学诊断的肺癌和正常组织的病理学切片(均取自河南省胸科医院)40例。其中正常组织和癌变组织各 20 例。

制备方法:对肺部癌变及其周围观察明显无病变为的正常肺组织手术取样,制做成冰冻切片。分别做病理学检查和激光共焦显微拉曼光谱采集。

2.3 实验方法

将病理切片置于显微镜下,使焦点聚焦到组织细胞核上采集光谱。He-Ne 激光器功率为 5 mW ,扫描时间为 20 s ,累加 3 次,扫描范围为 200 cm^{-1} — 2000 cm^{-1} ,分辨率: 1 cm^{-1} 。

3 实验结果

3.1 正常和癌变组织的典型拉曼光谱

采集到的肺部正常和癌变组织切片的拉曼光谱的特征峰主要集中在 1200cm^{-1} — 1700cm^{-1} 范围内。典型的拉曼谱图如图 1。

3.2 谱带归属

对 1200cm^{-1} — 1700cm^{-1} 范围内的特征峰进行谱带指认^[2-5], 分别归属如下: 1610cm^{-1} 附近属于蛋白质酰胺 I 谱带分子间反平行 β -折叠的 C-O 键伸缩振动; 1563cm^{-1} 附近为蛋白质色氨酸惰性环振动; 1524cm^{-1} 附近为脂类类胡萝卜素的 C=C 振动; 1394cm^{-1} 附近为 C-H 变形振动; 1342cm^{-1} 附近为 C-H 弯曲振动, 1237cm^{-1} 附近处属于核酸分子磷酸二脂基团 PO_2^- 的反对称伸缩振动。谱带归属如表 1 所示。

表 1 肺部组织的拉曼光谱吸收峰振动模式的初步指认

Tab. 1 The peak position and assignment of Raman spectra of lung tissues

| 正常肺组织吸收峰位置 cm^{-1} | 癌变肺组织吸收峰位置 cm^{-1} | 振动模式初步指认 | 数据分析对应 C_n |
|-----------------------------|-----------------------------|---|--------------|
| 1610.26 ± 1.76 | 1610.43 ± 1.42 | 蛋白质酰胺 I 谱带分子间反平行 β -折叠的 C-O 键伸缩振动 | C_1 |
| 1563.58 ± 2.89 | 1562.46 ± 1.68 | 色氨酸惰性环振动 | C_2 |
| 1524.51 ± 1.98 | 1527.04 ± 1.83 | 脂类类胡萝卜素的 C=C 振动 | C_3 |
| 1394.33 ± 1.81 | 1398.13 ± 2.41 | C-H 变形振动 | C_4 |
| 1342.75 ± 1.47 | 1343.06 ± 1.41 | C-H 弯曲振动 | C_5 |
| 1237.07 ± 2.40 | 1237.65 ± 1.93 | 核酸分子磷酸二脂基团 PO_2^- 的反对称伸缩振动 | C_6 |

3.3 实验数据的统计分析

采集肺癌和正常肺组织病理切片的拉曼光谱, 得到它们的拉曼图谱以及与之相对应的数据。分别对癌变和正常组织的图谱进行分析, 提取出有可能鉴别两者差别的特征峰峰位, 特征峰的峰位分别见表 2、3。特征峰位的表示采用下式:

表 2 正常肺组织切片的拉曼光谱特征峰位置(波数 cm^{-1})

Tab. 2 The normal lung tissues section's peak position of Raman spectra

| | C_1 | C_2 | C_3 | C_4 | C_5 | C_6 |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 1609.96 | 1565.34 | 1526.14 | 1392.66 | 1342.99 | 1235.13 |
| 2 | 1609.04 | 1561.25 | 1526.01 | 1392.06 | 1344.62 | 1241.36 |
| 3 | 1612.44 | 1564.41 | 1524.03 | 1391.73 | 1342.23 | 1237.03 |
| 4 | 1607.86 | 1559.66 | 1520.13 | 1392.61 | 1342.87 | 1232.99 |
| 5 | 1611.29 | 1560.22 | 1523.44 | 1398.35 | 1344.47 | 1232.60 |
| 6 | 1609.04 | 1566.82 | 1523.69 | 1395.99 | 1342.42 | 1237.30 |
| 7 | 1610.27 | 1558.35 | 1525.08 | 1392.39 | 1343.66 | 1233.55 |
| 8 | 1609.42 | 1561.44 | 1525.29 | 1393.82 | 1343.02 | 1237.40 |

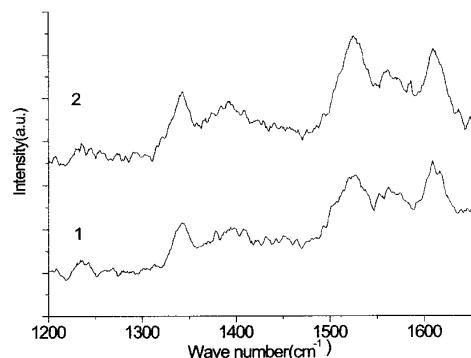


图 1 肺部正常和癌变组织切片在 1200cm^{-1} — 1700cm^{-1} 范围内的拉曼光谱
Fig. 1 Raman spectra of the section of normal and malignant lung tissues from 1200cm^{-1} — 1700cm^{-1}

$$\text{特征峰位} = \text{Mean} \pm s$$

上式中 Mean 值表示各处拉曼光谱特征峰峰位数据对应的平均值, s 值表示拉曼光谱特征峰峰位数据的均方根。 C_n ($n=1, 2 \dots 6$) 代表特征峰, 它与拉曼峰位的对应关系见表 1。

| | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 9 | 1615.05 | 1562.66 | 1526.19 | 1394.57 | 1343.51 | 1235.42 |
| 10 | 1612.86 | 1560.10 | 1524.36 | 1395.36 | 1341.23 | 1239.12 |
| 11 | 1609.45 | 1566.37 | 1523.46 | 1393.56 | 1343.92 | 1239.53 |
| 12 | 1609.83 | 1564.65 | 1521.08 | 1397.42 | 1340.28 | 1237.44 |
| 13 | 1608.56 | 1568.43 | 1524.72 | 1392.81 | 1344.20 | 1234.92 |
| 14 | 1612.46 | 1563.09 | 1528.24 | 1393.66 | 1341.13 | 1238.46 |
| 15 | 1610.52 | 1565.46 | 1526.44 | 1394.78 | 1342.08 | 1237.55 |
| 16 | 1608.34 | 1567.71 | 1523.65 | 1396.43 | 1342.25 | 1238.07 |
| 17 | 1609.78 | 1562.88 | 1522.87 | 1395.16 | 1341.72 | 1240.22 |
| 18 | 1609.53 | 1566.39 | 1524.09 | 1393.44 | 1339.83 | 1239.63 |
| 19 | 1609.33 | 1561.53 | 1523.75 | 1394.17 | 1342.95 | 1237.48 |
| 20 | 1610.15 | 1564.87 | 1527.62 | 1395.62 | 1345.58 | 1236.18 |
| Mean | 1610.26 | 1563.58 | 1524.51 | 1394.33 | 1342.75 | 1237.07 |
| s | 1.76 | 2.89 | 1.98 | 1.81 | 1.47 | 2.40 |

表 3 肺癌组织切片的拉曼光谱特征峰位置(波数 cm⁻¹)

Tab. 3 The malignant lung tissues section's peak position of Raman spectra

| | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 1611.43 | 1563.19 | 1526.22 | 1397.38 | 1341.96 | 1234.47 |
| 2 | 1610.74 | 1564.17 | 1529.68 | 1398.82 | 1343.16 | 1235.28 |
| 3 | 1609.18 | 1561.68 | 1526.77 | 1401.48 | 1342.38 | 1240.37 |
| 4 | 1609.58 | 1563.80 | 1525.81 | 1396.64 | 1341.41 | 1235.96 |
| 5 | 1613.79 | 1559.77 | 1524.40 | 1398.63 | 1343.04 | 1239.31 |
| 6 | 1609.65 | 1563.35 | 1529.27 | 1392.21 | 1345.51 | 1238.34 |
| 7 | 1610.78 | 1560.96 | 1528.64 | 1396.39 | 1341.47 | 1239.39 |
| 8 | 1609.65 | 1558.57 | 1523.42 | 1399.16 | 1341.56 | 1240.03 |
| 9 | 1609.42 | 1564.44 | 1529.72 | 1396.23 | 1341.43 | 1237.27 |
| 10 | 1610.54 | 1562.21 | 1525.62 | 1397.05 | 1342.59 | 1238.61 |
| 11 | 1611.53 | 1563.56 | 1526.35 | 1400.61 | 1344.60 | 1234.63 |
| 12 | 1608.61 | 1559.92 | 1528.34 | 1399.58 | 1342.92 | 1235.60 |
| 13 | 1609.55 | 1562.75 | 1526.79 | 1394.62 | 1341.88 | 1239.54 |
| 14 | 1609.79 | 1563.03 | 1523.72 | 1398.47 | 1343.64 | 1237.48 |
| 15 | 1611.30 | 1561.12 | 1526.42 | 1398.73 | 1346.15 | 1236.77 |
| 16 | 1609.53 | 1562.84 | 1528.06 | 1402.77 | 1343.73 | 1238.72 |
| 17 | 1613.68 | 1564.07 | 1527.93 | 1397.26 | 1345.25 | 1239.09 |
| 18 | 1610.04 | 1562.92 | 1528.33 | 1398.54 | 1342.22 | 1237.51 |
| 19 | 1608.68 | 1564.81 | 1527.80 | 1397.18 | 1343.52 | 1239.62 |
| 20 | 1611.07 | 1562.13 | 1527.46 | 1400.78 | 1342.74 | 1234.98 |
| Mean | 1610.43 | 1562.46 | 1527.04 | 1398.13 | 1343.06 | 1237.65 |
| s | 1.42 | 1.68 | 1.83 | 2.41 | 1.41 | 1.93 |

3.3.1 峰位实验数据的 F-分布检验

对表 2 表 3 中正常和癌变肺组织切片拉曼光谱对应特征峰位置做 F-分布检验检验其试验数据方

差的一致性。F-检验的显著性水平 $\alpha=0.05$, 两组数据 $n=20$ 。因此其拒绝域为 $F \geq F_{0.025}$ 或 $F \leq F_{0.075}$, 即 $F \geq 2.51$ 或 $F \leq 0.39$ 。F-分布检验的结

果如表 4 所示：

表 4 峰位 F—分布检验结果

Tab. 4 The result of F-distribution of peak position

| | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| F | 0.65 | 0.34 | 0.86 | 1.68 | 0.92 | 0.65 |

由表 4 峰位 F—分布检验可以看出 C₂ 对应的 1560 cm⁻¹ 附近特征峰处的 F 值落在 F 检验的拒绝域内，两组数据的方差不一致。其余各特征峰处的 F 值均被接受，可以进一步作 T—分布检验。

3.3.2 峰位实验数据的 T—分布检验

对通过 F—分布检验的 C₁、C₃、C₄、C₅、C₆ 处对应特征峰的峰位数据进一步做配对 T 检验来检验其差异性。T—检验的显著性水平取 $\alpha=0.05$ ，自由度 $v=n_1+n_2-2=38$ ，其拒绝域是 $(-\infty, -1.686)$ 和 $(1.686, +\infty)$ 。峰位实验数据的 T—分布检验的结果如表 5 所示：

表 5 峰位 T—分布检验结果

Tab. 5 The result of T-distribution of peak position

| | C ₁ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| T | 0.33 | 4.18 | 5.30 | 0.68 | 0.84 |

从表 5 峰位 F—分布检验结果可以看出 C₃、C₄ 所对应的正常和癌变肺组织特征峰的拉曼光谱峰位 T—分布检验结果落在拒绝域内，表明在显著性水平 $\alpha=0.05$ 的情况下正常和癌变肺组织这两处特征峰的拉曼光谱峰位有差异。

3.4 结果分析与讨论

对正常和癌变肺组织切片拉曼特征峰的峰位差异统计分析表明，C-H 变形振动谱带和脂类类胡萝卜素的 C=C 振动谱带的差异较大：

正常肺组织切片的 1394 cm⁻¹ 附近的 C-H 变形振动在癌变肺组织的切片中移动到了 1398 cm⁻¹ 波数附近，移动了约 4 cm⁻¹。这可能与 C-H 键的结合程度在癌变的变化过程中被破坏有关。有报道在对其它肿瘤组织的拉曼光谱研究中也发现该谱带有向高波数移动的现象^[6-8]。

脂类类胡萝卜素的 C=C 振动谱带在正常肺组织切片的拉曼峰位于 1524 cm⁻¹ 附近，而在肺癌组织切片的拉曼峰却移动到 1526 cm⁻¹ 附近。该处谱

带的变化可能是组织在癌变过程中 C=C 键的张力发生改变有关。

4 实验结论

通过对肺部正常和癌变组织切片的拉曼光谱研究统计学分析表明，正常和癌变肺组织的拉曼光谱表现出一定的差异。其差别主要表现在：(1) 正常肺组织切片的 1394 cm⁻¹ 附近的 C-H 变形振动；(2) 1524 cm⁻¹ 脂类类胡萝卜素的 C=C 振动谱带在癌变肺组织的切片中均向高波数移动。

正常和癌变肺组织的拉曼光谱谱图的这些变化表明组织细胞在癌变过程中在构型、构像和数量上发生了变化：C-H 键的结合程度和脂类 C=C 键的张力在癌变的变化过程中发生变化；蛋白质酰胺 I 在癌变组织中与脂类类胡萝卜素相对含量减少；核酸分子在癌变组织中的相对含量增大。

综上所述，肺部正常和癌变组织红外和拉曼光谱各有自身的特点。通过它们谱图上的变化可以从不同的侧面反映组织细胞癌变前后在构型、相对含量等方面发生的变化。核酸的相对含量有望在应用光谱技术诊断肺癌时作为判别组织癌变的重要标志。

参考文献

- [1] 唐伟跃, 刘婉华, 孙雷明等. 肺癌切片的拉曼光谱分析. 激光杂志[J]. 2007, 28(3): 91.
- [2] 许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用[M]. 化学工业出版社, 2005.
- [3] 凌晓锋, 徐怡庄. 恶性肿瘤的傅立叶变换拉曼光谱研究国内外进展. 中国微创外科杂志[J]. 2002, 2(6): 433-435.
- [4] 朱自莹, 古仁敷, 陆天虹. 拉曼光谱在化学中的应用 [M]. 东北大学出版社, 1998.
- [5] 洪山海. 光谱解析法在有机化学中的应用[M]. 科学出版社, 1980.
- [6] 维红, 徐怡庄, 翁诗甫等. 肿瘤和正常组织的 FT-Raman 与 FT-IR 研究. 光散射学报[J]. 1998, 10(3): 114-119.
- [7] 沈世杰, 刘炳玉, 李清等. 人乳腺癌组织的特征红外光谱研究. 光谱学与光谱分析[J]. 2000, 20(1): 28-30.
- [8] 赵元黎, 吕晶等. 乳腺肿瘤组织的拉曼光谱研究. 激光与红外[J]. 2004, 34(6): 502-504.