

• 论著 •

血清表面增强拉曼光谱应用于口腔鳞状细胞癌患者临床分期的研究

闫冰^{1,2,3} 骆献阳^{1,2,3} 谭迎赞⁴ 关丽梅¹ 薛丽丽⁵

1.厦门大学附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科 厦门 361003; 2.厦门大学医学院 厦门 361003;
3.厦门市耳鼻咽喉头颈外科重点实验室 厦门 361003; 4.重庆医科大学口腔医院种植科 重庆 401120;
5.厦门大学附属第一医院口腔科 厦门 361003

[摘要] 目的 应用表面增强拉曼光谱技术研究口腔鳞状细胞癌患者血清,并建立临床分期鉴别诊断模型。方法 收集144例口腔鳞状细胞癌患者血清,按照早期组、中期组及晚期组进行分组检测血清表面增强拉曼光谱,比较光谱差异,应用主成分分析及线性判别函数法建立鉴别诊断模型,对不同分组光谱数据进行鉴别诊断。结果 共获得血清拉曼光谱144例,其中早期组59例,中期组40例及晚期组45例。血清光谱差异主要表现在721~727、931~932、1 129~1 133、1 264~1 266、1 367~1 371 cm^{-1} 处谱峰强度差异,主要与血清中脂类、蛋白质及核酸成分和结构有关。鉴别诊断模型总体准确率达80%以上,经过交互验证后准确率为70%以上。结论 表面增强拉曼光谱检测口腔鳞状细胞癌患者血清为口腔鳞状细胞癌临床分期及预后判断提供了一种简便、准确的新方法。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 表面增强拉曼光谱; 临床分期; 诊断

[中图分类号] R 782 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq2019036



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Research on the surface-enhanced Raman spectrum of blood serum for clinical staging of oral squamous cell carcinoma Yan Bing^{1,2,3}, Luo Xianyang^{1,2,3}, Tan Yingyun⁴, Guan Limei¹, Xue Lili⁵. (1. Dept. of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China; 2. School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361003, China; 3. Xiamen Key Laboratory of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Xiamen 361003, China; 4. Dept. of Implant, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China; 5. Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China)

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (81502584), the Project of Medical Innovation of Fujian Province (2015-CXB-35), Natural Science Foundation of Fujian Province (2017J01357) and Project of Science and Technology of Xiamen (3502Z20174062).

[Abstract] Objective To evaluate the surface-enhanced Raman spectrum of the blood serum of oral squamous cell carcinoma patients and establish a diagnostic model for clinical staging. **Methods** Serum samples were obtained from a total of 144 patients with oral squamous cell carcinoma and classified into three groups, namely, the early cancer group, the mid-term cancer group, and the advanced cancer group. Principal component and linear discriminant analyses were utilized to establish a diagnostic model with which to classify the different groups based on spectral differences. **Results** A total of 144 spectra were generated from the samples. The main differences found involved peaks at 721-727, 931-932, 1 129-1 133,

1 264-1 266, and 1 367-1 371 cm^{-1} , which can be assigned to proteins, lipids, and nucleic acids. The total accuracy of the established model exceeded 80%, and its cross-validation accuracy exceeded 70%. **Conclusion** Surface-enhanced Raman spectroscopy could be applied to detect the clinical stages of oral squamous cell carcinoma based on blood serum.

[收稿日期] 2018-09-21; **[修回日期]** 2019-01-10

[基金项目] 国家自然科学基金(81502584);福建省医学创新课题(2015-CXB-35);福建省自然科学基金(2017J01357);厦门市科技计划项目(3502Z20174062)

[作者简介] 闫冰,副教授,博士,Email: yanbing_west@163.com

[通信作者] 薛丽丽,主治医师,博士,Email: xuelili0596@163.com

[Key words] oral squamous cell carcinoma; surface-enhanced Raman spectroscopy; clinical stage; diagnosis

随着发病率不断增加,口腔鳞状细胞癌成为头颈部最常见的恶性肿瘤之一,据统计世界范围内每年新增病例约300 000,死亡病例128 000,我国也属于口腔鳞状细胞癌高发率国家^[1-3]。近年来,口腔鳞状细胞癌预后并无明显改善,晚期患者多因局部复发死亡^[2]。虽然肿瘤分子生物学或病理学特征对判断预后具有重要作用,但患者原发肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移情况及有无远处转移等因素仍是影响患者预后的重要因素,因此患者术前临床分期诊断对判断口腔鳞癌患者预后具有重要意义^[2,4]。目前临床上对口腔鳞状细胞癌患者术前分期主要依赖影像学检查及临床查体,无法像病理分期更准确地反映患者肿瘤浸润深度、淋巴结转移情况等^[2]。Xue等^[5]应用表面增强拉曼光谱技术对不同肿瘤大小、淋巴结转移及病理分级的口腔鳞癌患者的血清进行研究,通过鉴别诊断模型可以分辨出不同肿瘤大小、有无淋巴结转移及组织病理学分级,具有良好的灵敏度、特异性及准确率。因此,本研究的目的是通过研究口腔鳞状细胞癌患者血清表面增强拉曼光谱特征,鉴别诊断不同临床分期的患者,为口腔鳞状细胞癌患者术前临床分期诊断提供一种快速、便捷、准确的新方法。

1 材料和方法

1.1 患者血清收集

选取2015年7月—2018年7月厦门大学附属第一医院收治的144例口腔鳞状细胞癌患者。患者无其他系统疾病、长期服药史及治疗史,男女病例1:1,平均年龄(60±7)岁。术前均经活检明确口腔鳞状细胞癌诊断。患者根据最新美国国家综合癌症网络^[6]口腔鳞状细胞癌预后分期分为3组,早期组为0、I、II期患者59例,中期组为III期患者40例,晚期组为IV期患者45例。患者参加试验前均知情并签署知情同意书,且研究经过厦门大学附属第一医院伦理委员会批准(批准号KY2013-01)。患者前夜禁食10 h后清晨抽取外周血5 mL,4℃下静置4 h后3 400 r·min⁻¹转速离心,抽取1 mL上清液于-20℃下储存用于拉曼光谱检测。

1.2 纳米金溶胶制备

将浓度为0.1 g·L⁻¹的HAuCl₄溶液100 mL加热

至沸腾后加入浓度10 g·L⁻¹柠檬酸钠溶液0.7 mL,继续加热使混合液沸腾并持续搅拌30 min后静置冷却至室温。

1.3 血清表面增强拉曼光谱检测

抽取4 mL纳米金溶胶溶液6 000 r·min⁻¹转速离心10 min后,去除上清液后加入0.4 mL血清,并超声震荡使血清与纳米金溶胶充分混合。4℃下静置2 h后,将加入纳米金溶胶的血清滴于盖玻片上。应用共聚焦显微拉曼光谱仪(Renishaw公司,英国)对血清样本进行表面增强拉曼光谱检测,激发光波长为633 nm,功率为400 mW,扫描时间10 s,选取2处检测点取平均值。拉曼光谱记录范围为600~1 800 cm⁻¹,分辨率为2 cm⁻¹。

1.4 数据分析

原始光谱数据通过WiRE 2.0(Renishaw公司,英国)和LABSPEC2.0(HORIBA Scientific公司,法国)去除荧光背景、消除噪音信号及平滑谱线处理。不同血清表面增强光谱数据通过软件Oringin 8.0(OringinLab公司,美国)进行基线校正及归一化处理。应用主成分分析法及线性判别函数对处理过后的光谱数据进行鉴别诊断,建立鉴别诊断模型。并应用交互验证方法对诊断模型准确性进行检验。

2 结果

2.1 血清表面增强拉曼光谱

本研究共获得144例口腔鳞状细胞癌患者血清的特征表面增强拉曼光谱,其中早期组59例,中期组40例,晚期组49例。本研究制备纳米级金溶胶颗粒均一、稳定,增强效果好,血清表面增强拉曼光谱信号强度好,为后期数据分析及诊断模型建立提供基础(图1、2)。

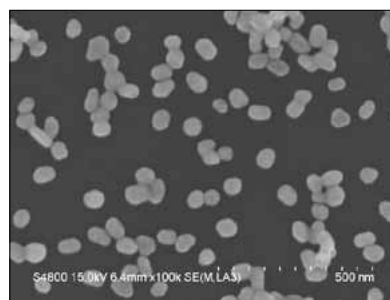


图1 纳米级金溶胶扫描电镜图

Fig 1 Scanning electron microscopy image of the gold nanoparticles

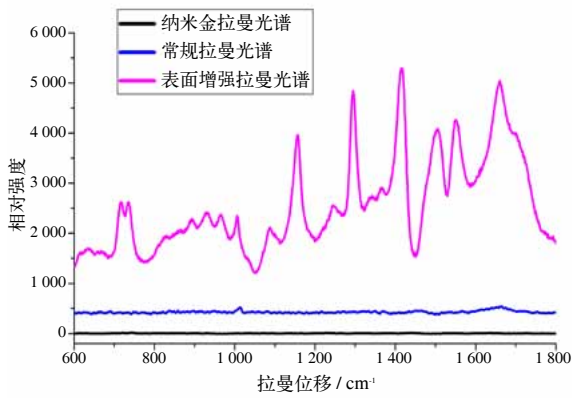


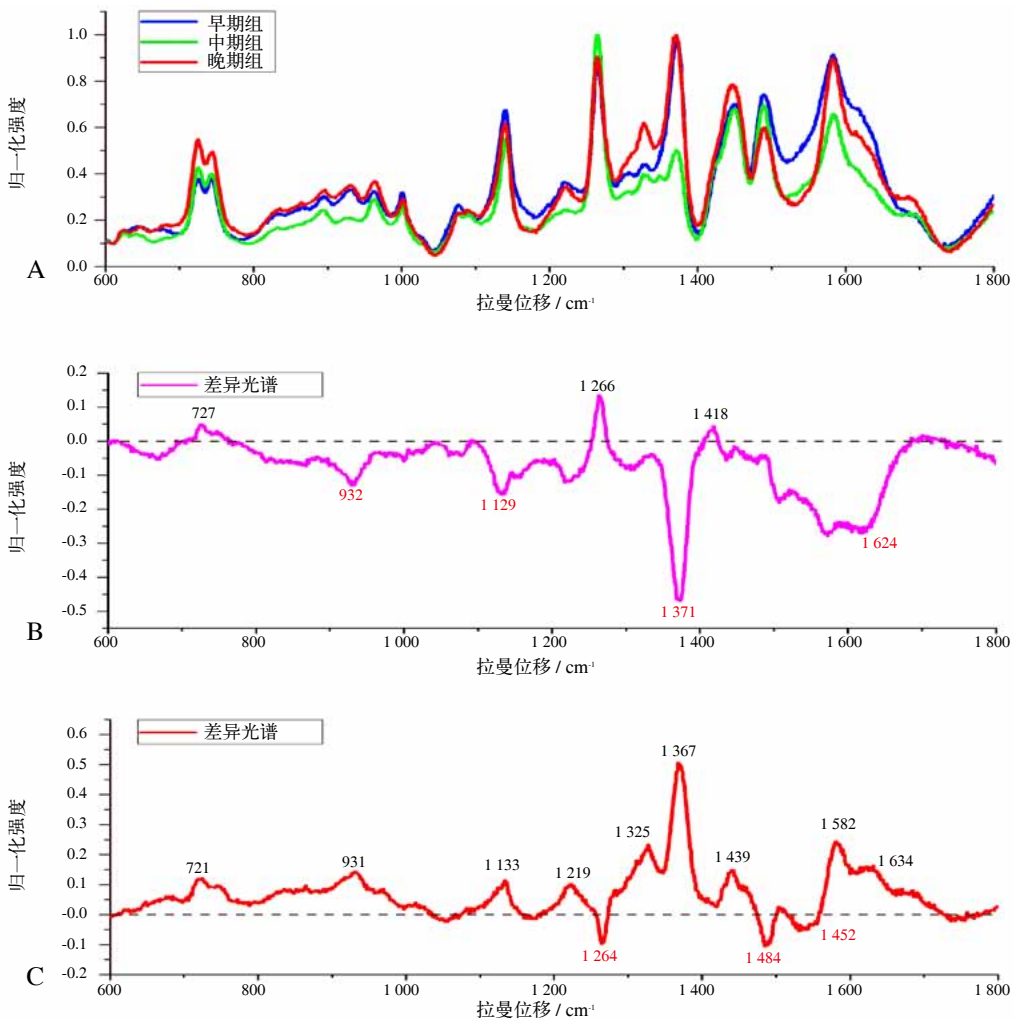
图 2 血清样本表面光谱

Fig 2 Surface spectrums of serum

通过分析比较3组血清平均光谱数据，可见不同临床分期口腔鳞状细胞癌患者血清光谱存在差异（图3）。中期组与早期组光谱比较，可见中期

组光谱在727、1 266、1 418 cm^{-1} 处谱峰强度增加，而在932、1 129、1 371、1 624 cm^{-1} 处谱峰强度下降。晚期组与中期组血清光谱比较，晚期组在721、931、1 133、1 219、1 325、1 367、1 439、1 634 cm^{-1} 处谱峰强度增加，而在1 264、1 484、1 452 cm^{-1} 处谱峰强度下降。在这些差异谱峰组中，共同存在的谱峰分别为：721~727 cm^{-1} 谱峰，提示可能与血清中次黄嘌呤相关；931~932 cm^{-1} 谱峰，提示可能与蛋白质中碳碳键延展振动模式有关；1 129~1 133 cm^{-1} 谱峰，提示可能与甘露糖中的碳氮键振动相关；1 264~1 266 cm^{-1} 谱峰，提示这可能与脂类中碳碳键的振动模式有关；1 367~1 371 cm^{-1} 谱峰，提示可能与鸟嘌呤相关^[5,7-8]。

这些差异为鉴别诊断不同临床分期的口腔鳞状细胞癌患者提供了理论基础。



A：不同分组的血清样本平均表面增强拉曼光谱；B：中期组与早期组的差异；C：晚期组与中期组的差异。

图 3 口腔鳞状细胞癌患者血清样本的表面增强拉曼光谱图

Fig 3 The surface-enhanced Raman spectrums of serum of oral squamous cell carcinoma

2.2 鉴别诊断模型的建立

应用主成分分析法对早期组、中期组及晚期组3组临床分期口腔鳞状细胞癌患者血清进行主成分分析，从每例光谱数据1 643个点中提出64个主成分，累及变异率为96%，可以很好地反映原有数据变量信息。以每张光谱61个特征主成分数据为基础，进行线性判别函数分析，建立鉴别诊断模型。在应用判别函数鉴别诊断过程中，早期组诊断准确率为74.6%，中期组诊断准确率为87.5%，晚期组诊断准确率为82.2%，鉴别诊断模型总体诊断准确率为80.6%。经过交互验证方法，早期组诊断准确率为62.7%，中期组诊断准确率为80.0%，晚期组诊断准确率为71.1%，鉴别诊断模型总体诊断准确率为70.1%，表明该鉴别诊断模型的稳定性较好，可以用于鉴别诊断不同分期患者的血清样本(表1)。

表 1 主成分分析及线性判别函数分类结果

Tab 1 Classification result of the principle component analysis and linear discriminant analysis

分类		预测分类			合计
		早期组	中期组	晚期组	
判别函数	早期组	44	7	8	59
	中期组	5	35	0	40
	晚期组	5	3	37	45
交互验证	早期组	37	11	11	59
	中期组	7	32	1	40
	晚期组	9	4	32	45

图4显示通过主成分分析及线性判别函数相结合的方法建立3个组的散点图，显示可以较好地地区分不同分期组别。

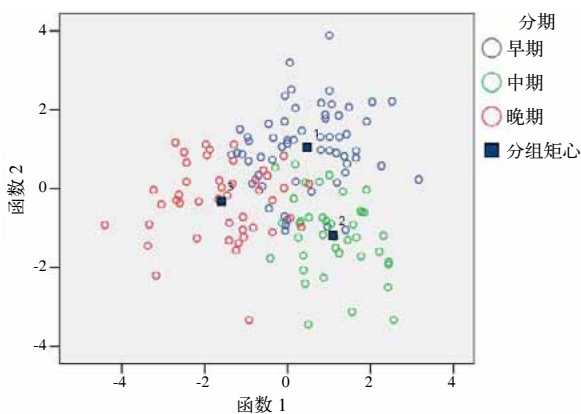


图 4 散点图

Fig 4 The scatter plot diagram

3 讨论

当分子吸附到纳米级金属表面上检测拉曼光谱时，拉曼散射信号比常规拉曼散射要增强 $10^5 \sim 10^{14}$ 倍，这一现象最早是由Fleischman和他的同事在研究吡啶分子吸附于粗糙银电极表面的拉曼光谱时发现的^[9-10]。表面增强拉曼光谱技术可以克服常规拉曼光谱技术信号弱、易受噪音干扰、荧光背景高等缺点，现已被广泛应用于生物样本检测研究，甚至可以用于单个分子检测研究^[5,7-9,11]。Yan等^[8]应用表面增强拉曼光谱对腮腺肿瘤患者血清进行研究发现，根据患者血清特征光谱数据，可以将多形性腺瘤、沃辛瘤、黏液表皮样癌患者以及正常对照组相鉴别，取得了80%以上的准确率。Tan等^[9]在对口腔鳞状细胞癌患者、腮腺肿瘤患者的血清进行研究时发现，两者血清的特征表面增强拉曼光谱存在差异，通过主成分分析及线性判别函数建立鉴别诊断模型，可以很好地区分口腔鳞状细胞癌患者与腮腺肿瘤患者，灵敏度达80.7%，特异性达84.1%。对癌症的分期鉴别诊断，表面增强拉曼光谱显示了同样的优势。Lin等^[11]对不同T分期的鼻咽癌患者血浆进行研究，发现早期患者血浆、晚期患者血浆与正常对照组血浆光谱存在差异，主要体现在蛋白质、脂类及核酸相对应的谱峰强度差异，可以用于鉴别诊断不同T分期的鼻咽癌患者。

本研究主要根据美国国家综合癌症网络2018年版^[6]头颈肿瘤预后分期及患者治疗方式将0期、I期及II期患者归为早期组，III期患者归为中期组，而IV期患者归为晚期组。在比较不同分期患者血清表面增强拉曼光谱特征时发现，随着预后分期级别越高，光谱中 $721 \sim 727 \text{ cm}^{-1}$ 谱峰差异也较大，提示患者血清中次黄嘌呤的含量也越高，与Xue等^[5]在对不同肿瘤大小及淋巴结转移情况的口腔鳞状细胞癌患者血清的表面增强拉曼光谱研究中的发现一致。有研究^[12]发现，口腔鳞状细胞癌患者血清中表皮生长因子含量越高的患者，其术后复发、淋巴结转移概率越高，术后生存时间越短。Gupta等^[13]在对90例样本的研究中发现，治疗后无复发的口腔鳞状细胞癌患者及正常对照组血清中的成纤维细胞生长因子含量明显低于未治疗的口腔鳞状细胞癌患者。Rekha等^[14]对口腔癌前病变、口腔鳞状细胞癌患者血浆进行拉曼光谱研

究,结果提示不同患者血浆光谱差异与脂类、蛋白质及核酸等物质有关。Sahu等^[15]对复发及无复发的口腔鳞状细胞癌患者血清进行了拉曼光谱比较研究,结果发现2组患者的血清光谱在1 265、1 320、1 450以及1 660 cm^{-1} 等谱峰上存在明显差异,这与本研究结果相似,提示患者血清中某些成分及分子结构的变化与患者预后相关。

上述研究结果均表明,不同口腔鳞状细胞癌患者血清成分存在差异,表面增强拉曼光谱可以用于检测不同患者血清中不同差异,结合主成分分析及线性判别函数建立鉴别诊断模型,为口腔鳞状细胞癌患者临床预后分期提供了一种便捷、准确的检测方法。

4 参考文献

- [1] Blatt S, Krüger M, Ziebart T, et al. Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: a review of the literature[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2017, 45(5): 722-730.
- [2] Kreppel M, Nazarli P, Grandoch A, et al. Clinical and histopathological staging in oral squamous cell carcinoma-comparison of the prognostic significance[J]. *Oral Oncol*, 2016, 60: 68-73.
- [3] 薛丽丽, 李一, 蔡巧玲, 等. 口腔黏膜鳞状细胞癌、上皮异常增生及正常黏膜组织拉曼光谱研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2015, 50(1): 18-22.
Xue LL, Li Y, Cai QL, et al. Raman spectral characteristics of oral squamous cell carcinoma epithelial dysplasia and normal mucosa[J]. *Chin J Stomatol*, 2015, 50(1): 18-22.
- [4] Ghantous Y, Bahouth Z, Abu El-Naaj I. Clinical and genetic signatures of local recurrence in oral squamous cell carcinoma[J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 95: 141-148.
- [5] Xue L, Yan B, Li Y, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum based on gold nanoparticles for tumor stages detection and histologic grades classification of oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 4977-4986.
- [6] National Comprehensive Cancer Network. The NCCN clinical practice guidelines in oncology[EB/OL]. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx. [2018-08-05]
- [7] Wang J, Lin D, Lin J, et al. Label-free detection of serum proteins using surface-enhanced Raman spectroscopy for colorectal cancer screening[J]. *J Biomed Opt*, 2014, 19(8): 087003.
- [8] Yan B, Li B, Wen Z, et al. Label-free blood serum detection by using surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machine for the preoperative diagnosis of parotid gland tumors[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 650.
- [9] Tan Y, Yan B, Xue L, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum based on gold nanoparticles for the diagnosis of the oral squamous cell carcinoma[J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 73.
- [10] Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode[J]. *Chem Phys Lett*, 1974, 26(2): 163-166.
- [11] Lin D, Pan J, Huang H, et al. Label-free blood plasma test based on surface-enhanced Raman scattering for tumor stages detection in nasopharyngeal cancer[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4751.
- [12] Lin JS, Sun FJ, Lin PY, et al. Clinicopathological and prognostic significance of preoperative serum epidermal growth factor levels in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2018, 47(10): 1236-1242.
- [13] Gupta A, Tripathi A, Patil R, et al. Estimation of salivary and serum basic fibroblast growth factor in treated and untreated patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2019, 9(1): 19-23.
- [14] Rekha P, Aruna P, Bharanidharan G, et al. Near infrared Raman spectroscopic characterization of blood plasma of normal, oral premalignant and malignant conditions—a pilot study[J]. *J Raman Spectrosc*, 2015, 46(9): 735-743.
- [15] Sahu A, Nandakumar N, Sawant S, et al. Recurrence prediction in oral cancers: a serum Raman spectroscopy study[J]. *Analyst*, 2015, 140(7): 2294-2301.

(本文编辑 张玉楠)