

## 基于双峰比值法分析自体荧光光谱识别结肠腺癌

刘秉扬<sup>1</sup>, 白志贤<sup>2</sup>, 刘秉云<sup>2</sup> (1.三明学院物理与机电工程学院, 福建 三明 365004; 2.厦门大学附属第一医院杏林分院, 福建 厦门 361022)

**摘要:**目的: 分别测量了人体正常和腺癌结肠组织在 300 nm、340 nm、400 nm 和 460 nm 波长激发下的自体荧光光谱, 通过对测量的自体荧光光谱分析比较, 探究临床上可以用于诊断早期结肠腺癌的最佳激发波长。方法: ①人体离体结肠组织样品由福建省立医院肿瘤外科提供, 离体样品均在 2 小时内完成光谱测量。②实验采用 FLS920 (Edinburgh Instruments, UK) 稳态荧光光谱系统对结肠组织进行自体荧光光谱测量。③实验数据利用 Origin 7.5 系统软件进行平滑归一化, 采用双峰比值法计算不同激发波长下自体荧光发射峰的荧光积分强度。结果: 采用双峰比值法计算得到人体结肠组织在 340 nm 波长激发下 (380±20) nm 和 (485±20) nm 发射峰的荧光积分强度比值存在显著差异 ( $P < 0.001$ ), 识别的灵敏度和特异性分别为 80% 和 73.3%。结论: 结果表明 340 nm 可作为诊断结肠腺癌的最佳激发波长。文章的初步结论可为光诱导人体结肠组织自体荧光诊断早期结肠癌提供了一定的参考价值。

**关键词:** 双峰比值法; 自体荧光光谱; 结肠组织

**DOI 编码:** doi:10.3969/j.issn.1005-202X.2013.02.024

中图分类号: R318.51

文献标识码: A

文章编号: 1005-202X(2013)02-4061-05

## Applying Two-peak Ratio Discriminant Analysis on Autofluorescence Spectra to Identify Adenocarcinoma Colonic Tissues

LIU Bing-yang<sup>1</sup>, BAI Zhi-xian<sup>2</sup>, LIU Bing-yun<sup>2</sup>

(1. Department of Physics and Electromechanical Engineering, Sanming University, Sanming Fujian 365004, China; 2. The First Affiliated Hospital of Xiamen University Xinglin Branch, Xiamen, 361022, China)

**Abstract: Objective:** To investigate the differences between normal and adenocarcinoma colonic tissues autofluorescence spectra excited by 300 nm, 340 nm, 400 nm and 460 nm, respectively. The optimal diagnosis excitation wavelength used in early adenocarcinoma colonic tissues was obtained through the measurement of autofluorescence spectra. **methods:** ① All samples of human colonic tissues in vitro were measured in two hours, which provided by the department of surgical oncology of Fujian provincial hospital. ② A FLS920 fluorescence detection system was used to collect the emission spectra excited by 300 nm, 340 nm, 400 nm and 460 nm, respectively. ③ After smoothed and normalized by Origin 7.5 system software, the algorithms of "two-peak ratio" were employed to distinguish normal and adenocarcinoma colonic tissues. **Results:** The ratio of two peaks at (380±20) and (485±20) nm under the 340 nm excitation excited sufficient difference ( $P < 0.001$ ), which the sensitivity was 80% and specificity was 73.3%. **Conclusions:** The results showed that 340 nm excitation was the optimum diagnostic wavelength. In conclusion, our results can provide a potential value in early diagnosis of human colonic tissues.

**Key words:** two-peak ratio; autofluorescence spectra; colonic tissues

### 前言

结肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤, 其发病率在我国仅次于胃癌和食道癌, 高居消化道恶性肿瘤的

第三位, 日益引起大家的关注<sup>[1,2]</sup>。由于早期结肠癌症状不明显, 病灶位置没有明显凸起、较为平坦, 结肠内窥镜检查难以发现, 因此容易被误诊或者漏诊<sup>[3]</sup>。为了提高结肠癌的早期诊出率, 亟需寻找一种先进技术以实现对患者早期诊断。激光诱导自体荧光技术以其无创、实时、高灵敏度等优点成为了当前“生物医学光学”中的重要研究领域, 有望成为一种新的诊断结肠癌的技术<sup>[4-6]</sup>。

1984 年, Alfano 等<sup>[7]</sup>发现低功率激光可诱导结肠粘膜组织产生自体荧光, 此后有多个研究小组开展了

收稿日期: 2012-09-21

基金项目: 三明学院自然科学基金项目 (编号 B201009/Q)

作者简介: 刘秉扬 (1984-), 男 (汉族), 福建莆田人, 三明学院讲师, 从事生物医学光学研究, E-mail: lby1125@126.com, Tel: 0598-8398519。

用激光诱导自体荧光检测肠道肿瘤的实验研究,均认为自体荧光光谱形状和光强的改变可反映癌变组织和细胞的新陈代谢或结构改变<sup>[8-10]</sup>。但是目前为止癌变组织自体荧光光谱改变的机制还未明晰,激光诱导自体荧光光谱诊断结肠癌的方法也尚未真正实现临床应用,激光诱导自体荧光光谱在结肠癌早期诊断中的应用还有待于进一步的研究。

实验分别测量了人体结肠组织在 300 nm、340 nm、400 nm 和 460 nm 波长激发下的自体荧光光谱特性,采用双峰比值法计算各个激发波长下的荧光发射光谱差异,以期寻找用于识别早起结肠腺癌的最佳激发波长,从而为临床上采用光诱导人体组织自体荧光诊断早起结肠癌提供识别依据。

## 1 材料与方

### 1.1 组织样品制备

由福建省立医院肿瘤外科提供人体离体结肠组织样品。离体样品用生理盐水进行清洗,2小时内完成对样品的光谱测量。经光谱测量的样品用4%的福尔马林固定,HE染色后由病理科医生做病理分析,病例分析结果为:结肠腺癌15例,正常结肠组织15例。

### 1.2 实验仪器

采用 FLS920 (Edinburgh Instruments, UK) 稳态荧光光谱系统对结肠组织自体荧光光谱进行测量。激发和发射单色仪的狭缝宽度分别为 3.0 nm 和 2.0 nm。选用氙灯作为激发光源,激发波长设定分别为 300 nm、340 nm、400 nm 和 460 nm,采集的发射光谱波长范围为 350 nm~800 nm。扫描步长为 5 nm。

### 1.3 数据算法

实验数据利用 Origin 7.5 系统软件进行平滑归一化,对发射谱选取双峰值位置的荧光积分强度进行比值计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 离体人体正常和结肠腺癌组织自体荧光光谱特征

离体人体正常和结肠腺癌组织激发在激发波长分别为 300 nm、340 nm、400 nm 和 460 nm 激发下的自体荧光发射光谱,以 340 nm 激发波长为例,如图 1 所示。由图可知,在 340 nm 波长激发下人体正常与腺癌结肠组织在 380 nm、485 nm 和 625 nm 附近均出现峰值,且正常与腺癌的相对荧光强度存在显著差异。实验结果显示,人体正常和腺癌结肠组织在 300 nm、400 nm 和 460 nm 波长激发下均出现双峰,双峰分别位于 380 nm 和 485 nm,500 nm 和 625 nm 以及 525 nm 和 635 nm。

为了对人体正常和腺癌结肠组织在 300 nm、340 nm、400 nm 和 460 nm 激发波长下的荧光发射光谱特性的差异性进行统计分析,对获取的各组自体荧光发射光谱进行平均归一化处理,如图 2 所示。

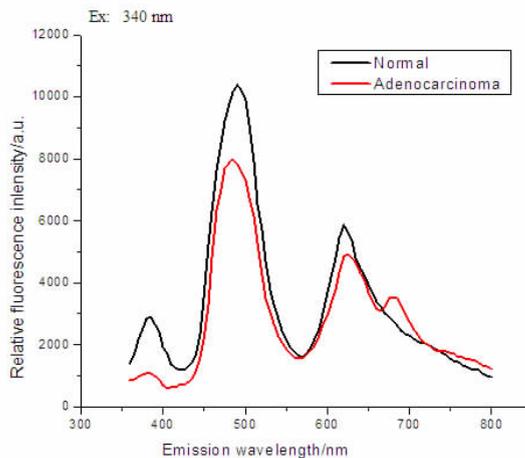


图 1 人体正常和腺癌结肠组织在 340 nm 波长下的荧光发射光谱  
Fig.1 Emission spectra of human normal and adenocarcinoma colonic tissues excited by 340 nm

由图 2 可知,人体正常组织和腺癌结肠组织位于 380 nm 与 485 nm 的荧光峰的相对强度存在较为显著的差异,腺癌组织 480 nm 波长处的荧光强度减小更为显著;分析其他激发波长的自体荧光发射光谱,可知激发波长为 400 nm 时,人体正常组织和腺癌结肠组织位于 500 nm 和 635 nm 的荧光峰的相对强度存在较为显著的差异,腺癌组织 500 nm 波长处的相对荧光强度更小;激发波长为 460 nm 时人体正常组织和结肠腺癌组织位于 520 nm 和 635 nm 波长处的相对荧光强度差异性不明显。

### 2.2 双峰比值法识别结肠腺癌

采用双峰比值法分别计算人体正常和腺癌结肠组织在 300 nm、340 nm、400 nm 和 460 nm 波长激发下存在的典型发射峰的荧光积分强度比值,积分宽度为 20 nm,结果如图 3(a-d)所示:

以 340 nm 发射波长为例,实验选取 (380±20) 和 (485±20) nm 处的荧光发射峰,计算双峰比值  $I_{380\pm 20}/I_{485\pm 20}$ ,结果如图 3-b 所示,判别结果显示,人体正常和腺癌结肠组织在 300 nm、340 nm、400 nm 激发下

表 1 基于双峰比值法在不同波长激发下识别结肠腺癌的评价结果

Tab.1 The evaluation results of adenocarcinoma colonic identify excited by different wavelengths based

激发波长(nm)	判断标准	判断结果
300	灵敏度 80% (12/15)	
	特异性 60% (9/15)	
340	灵敏度 80.0% (12/15)	
	特异性 73.3% (11/15)	
400	灵敏度 86.7% (13/15)	
	特异性 60% (9/15)	
460	灵敏度 53.3% (8/15)	
	特异性 40% (6/15)	

注:灵敏度为实验阳性结果与病理检查阳性结果之比;特异性为实验阴性结果与病理检查阴性结果之比。

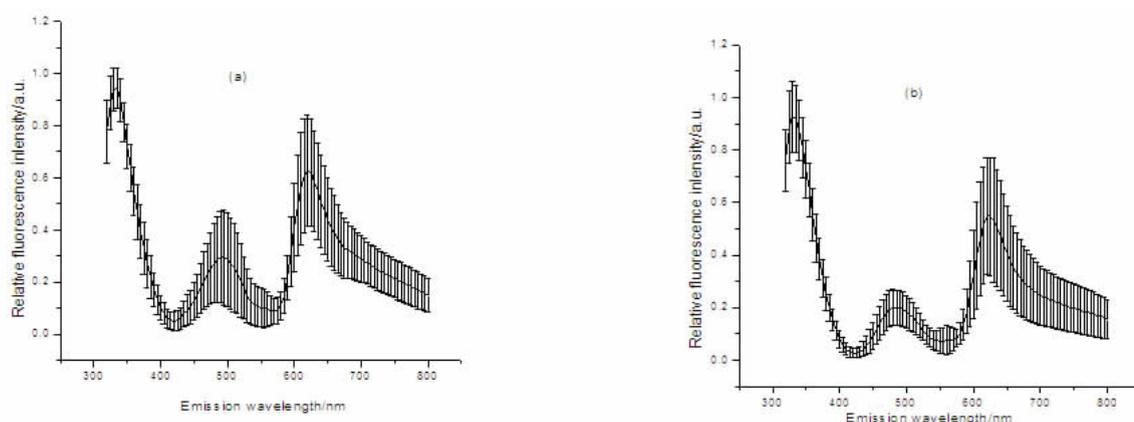


图 2-1 人体结肠组织平均归一化光谱 300 nm (a) 正常组织; (b) 腺癌组织

Fig.2-1 Normalized mean spectra of human colonic tissues excited by 300 nm (a) normal; (b) adenocarcinoma

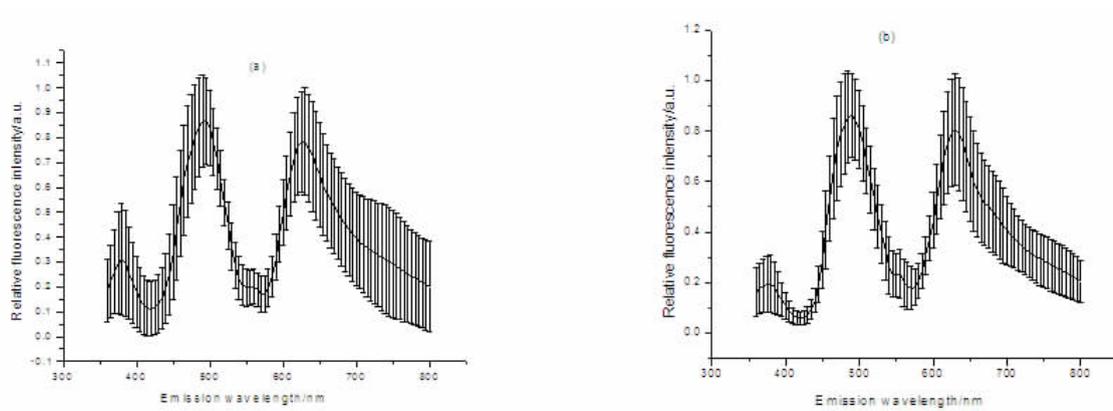


图 2-2 人体结肠组织平均归一化光谱 340 nm (a) 正常组织; (b) 腺癌组织

Fig.2-2 Normalized mean spectra of human colonic tissues excited by 340 nm (a) normal; (b) adenocarcinoma

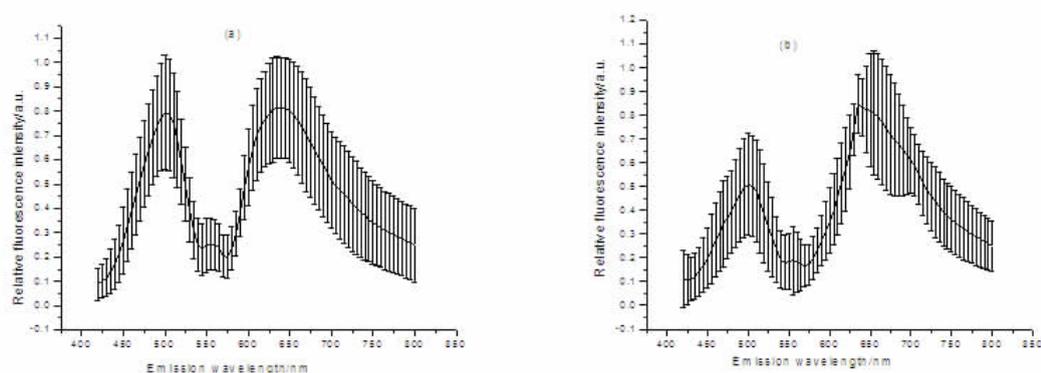


图 2-3 人体结肠组织平均归一化光谱 400 nm (a) 正常组织; (b) 腺癌组织

Fig.2-3 Normalized mean spectra of human colonic tissues excited by 400 nm (a) normal; (b) adenocarcinoma

的荧光发射峰的典型双峰比值均存在显著差异。采用双峰比值法计算得到的 4 组激发波长下识别人体正常和腺癌组织的灵敏度和特异性,如表 1 所示。比较 4 组不同激发波长得到的评价结果可知,采用 340 nm 作为激发波长得到的识别灵敏度和特异性分别为 80% 和 73.3%, 与其他激发波长相比更优, 所以 340 nm 可以作为诊断结肠腺癌的最佳激发波长。

有文献报道人体组织在 380 nm 和 485 nm 的荧

光发射峰主要是由人体内主要的内源性荧光标记物胶原蛋白 (Collagen) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 产生<sup>[11-12]</sup>。实验采用 340 nm 激发得到人体正常和腺癌结肠组织在 380 nm 和 485 nm 的相对荧光积分强度存在显著差异, 说明人体正常和腺癌结肠组织内胶原蛋白 (Collagen) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 这两种内源性荧光分子的相对含量存在差异, 结果提示这个指标有望用来识别正常与癌变结肠

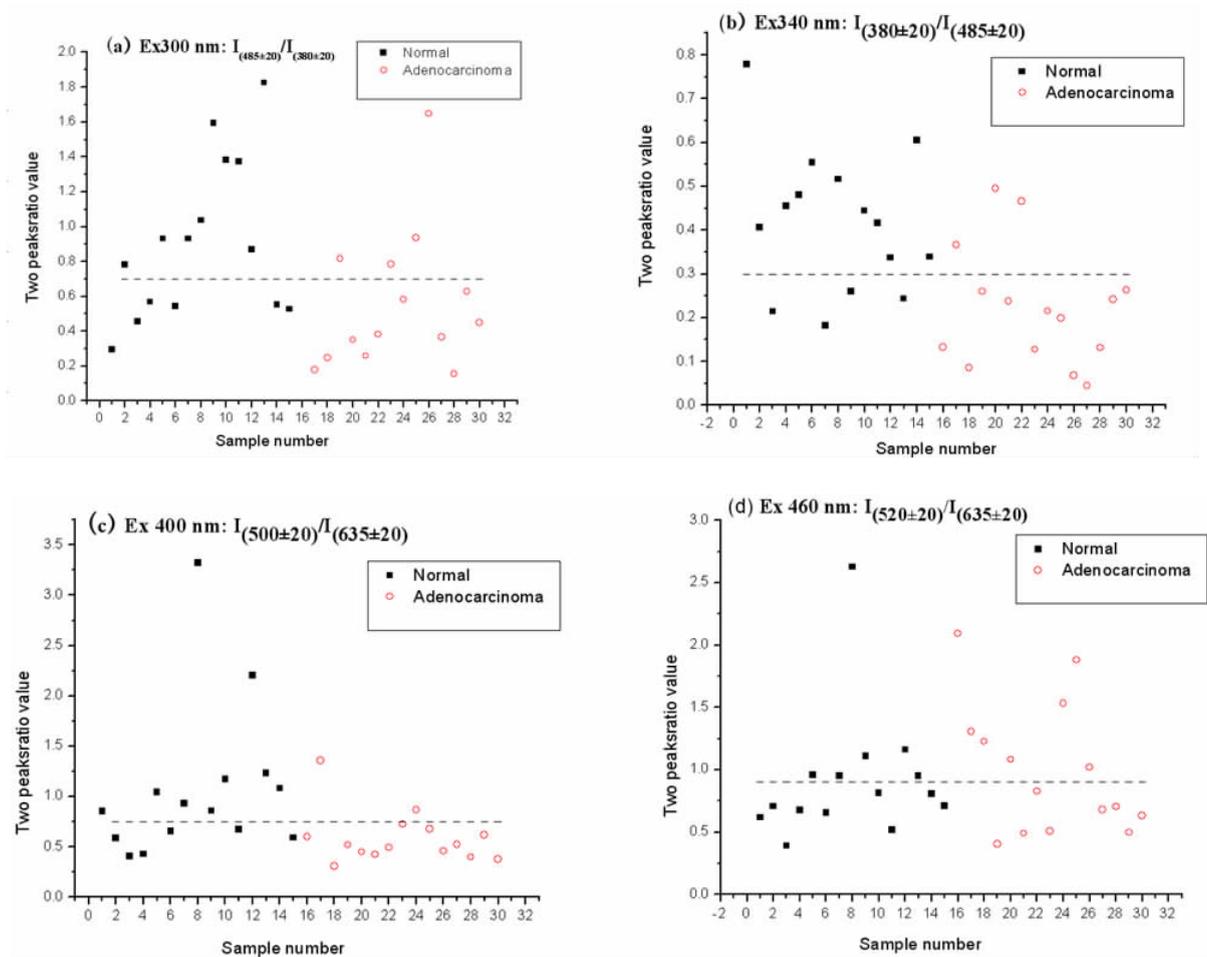


图3 不同激发波长下荧光发射峰强度比值:(a) $I_{(485\pm 20)}/I_{(380\pm 20)}$ ; (b) $I_{(380\pm 20)}/I_{(485\pm 20)}$ nm; (c) $I_{(500\pm 20)}/I_{(635\pm 20)}$ nm; (d) $I_{(520\pm 20)}/I_{(635\pm 20)}$ nm

Fig.3 The two-peak ratio values four different excitation wavelengths: (a) $I_{(485\pm 20)}/I_{(380\pm 20)}$ nm; (b) $I_{(380\pm 20)}/I_{(485\pm 20)}$ nm; (c) $I_{(500\pm 20)}/I_{(635\pm 20)}$ nm; (d) $I_{(520\pm 20)}/I_{(635\pm 20)}$ nm

组织。

#### 4 结论

荧光光谱技术以其无损、快捷、可实现实时在体检测等优势,已经广泛应用于医学诊断领域,成为当今生物医学光学领域的一门热门课题。国内外很多研究小组已经对光诱导自体荧光技术在早期结肠癌诊断方面进行了深入研究和临床探索,但如何确定最佳的诊断参数仍然是棘手的难题。文章采用双峰比值法比较分析人体结肠组织在 300 nm、340 nm、400 nm和 460 nm 波长激发下的自体荧光光谱特性,得到 340 nm 可作为诊断结肠腺癌的最佳激发波长。文章的初步结论可为光诱导人体结肠组织自体荧光诊断早期结肠癌提供了有意义的参考依据。

#### 参考文献:

[1] Wang CY, Lin JK, Chen PF, et al. Autofluorescence spectroscopic differentiation between normal and cancerous colorectal tissues using two-peak ratio algorithm[J]. J Formos Med Assoc, 1999, 98(12):837-

843. Wang CY, Lin JK, Chen PF,等. 采用双峰比值法分析自体荧光光谱区分人体正常和癌变结肠组织[J],台湾医学协会杂志,1999, 98(12):837-843.

[2] 骆清铭,龚辉,刘贤德,等. 肿瘤组织自体荧光光谱测量与分析[J]. 光谱学与光谱分析,1997, 17(3):105-111. Qingming Luo, Hui Gong, Xiande Liu, et al. Measurement and analysis of tumor tissue autofluorescence spectra [J]. Spectroscopy and Spectral analysis, 1997, 17(3): 105-111.

[3] 罗湘建,张阳德,李建国,等. 激光诱导大肠癌自体荧光光谱实验研究[J]. 生物医学工程学杂志,2005, 22(6):1231-1233. Xiangjian Luo, Yangde Zhang, Jianguo Li, et al. Experimental study of colorectal cancerous autofluorescent spectra induced by laser[J]. J Biomed Eng, 2005, 22(6):1231-1233.

[4] 孙飞,曲凤玉,王旭. 关于肝癌的激光荧光光谱数据的模式识别分析[J]. 中国医学物理学杂志.1999,16(2):82-83. Fei Sun, Fengyu Qu, Xu Wang. The analysis of patten recognition of indexes of laser fluorescence spectrum to liver cancer [J]. Chinese Journal of Medical Physics, 1999,16(2):82-83.

[5] Romer TJ, Cothorn M, Richards KR, et al. Laser-induced fluorescence microscopy of normal colonic and dysplasia in colonic adenomas: implications for spectroscopic diagnosis[J]. Am J Gastroenterol, 1995, 90 (1):81-87. Romer TJ, Cothorn M, Richards KR,等.激光诱导人体正常

- 和病变结肠组织荧光内镜:采用光谱学诊断模式[J].美国胃肠病学杂志,1995,90(1):81-87.
- [6] Li BH, Xie SS. Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(25): 3931-3934. 李步洪, 谢树森. 自体荧光光谱激发发射矩阵诊断结肠癌[J]. 世界华人消化道杂志, 2005, 11(25):3931-3934.
- [7] Alfano RR, Tata DB, Cordero J, et al. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue [J]. IEEE J Quantum Electron, 1984, 20 (12):1507-1511. Alfano RR, Tata DB, Cordero J, 等. 激光诱导人体正常和癌变结肠组织自体荧光光谱[J]. 电气与电子工程师协会-量子电子学杂志, 1984, 20(12):1507-1511.
- [8] Richards KR, Rava RP, Petras RE, et al. Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia [J]. Photochem Photobiol, 1991, 53 (6):777-786. Richards KR, Rava RP, Petras RE, 等. 结肠病变组织的光谱诊断技术[J]. 光化学与光生物学杂志, 1991, 53(6):777-786.
- [9] Dacosta RS, Aderson H, Wilson BC. Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy [J]. Photochem Photobiol, 2003, 78(4):384-392. Dacosta RS, Aderson H, Wilson BC. 组织体内源性荧光分子激发发射矩阵 [J]. 光化学与光生物学杂志, 2003, 78(4):384-392.
- [10] Banerjee B, Middema B, Chandrasekhar HR. Emission spectra of colonic tissue and endogenous fluorophores[J]. Am J Med Sci, 1998, 316 (3):220-226. Banerjee B, Middema B, Chandrasekhar HR. 结肠组织内源性荧光分子的发射光谱[J]. 美国医学科学杂志, 1998, 316 (3):220-226.
- [11] Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, et al. Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential [J]. Lasers Surg Med, 1992, 12 (1):63-78. Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, 等. 紫外激光诱导结肠组织荧光光谱技术: 基础生物学和诊断前景[J]. 激光外科学杂志, 1992, 12(1):63-78.
- [12] Eker C, Montan S, Jaramillo E, et al. Clinical spectral characterisation of colonic mucosal lesions using autofluorescence and aminolevulinic acid sensitization[J]. Gut, 1999, 44(4): 511-518. Eker C, Montan S, Jaramillo E, 等. 采用自体荧光光谱技术和氨基乙酰丙酸敏化作用分析结肠病变黏膜的临床光谱特征[J]. 消化道, 1999, 44(4): 511-518.

(上接第 4055 页)

实验中,我们以目标 BIS 值 50 为控制目标,观察其控制过程是否能实现指令和数据的传输、输注速率的正确计算和输注泵的控制,其麻醉深度控制系统界面信息如图 10 所示:

实验过程中可以显示病人的相关信息和医生的操作指令,系统较平稳,能进行麻醉深度的自动控制。由于靶控输注系统的稳定性和可靠性直接影响到临床手术的质量,因此在真正应用于实际过程之前,还需完善模型参数和控制策略,把各种可能出现的结果和对策作全面细致的研究和探索。

## 参考文献

- [1] 陈杭. 麻醉靶控输注的控制策略及算法研究[D]. 浙江大学博士学位论文. 2007.5-7,10-12. CHEN Hang. Study of control strategy and algorithm on the target-controlled infusion in anaesthesia[D]. Doctor of Philosophy Degree of Zhejiang University. 2007.5-7,10-12.
- [2] 王若松. 静脉麻醉与药物输注学[M]. 北京. 人民军医出版社. 2001.61-62. WANG Ruo-song. Intravenous anesthesia and drug infusion[M]. Beijing. People's Military Medical Press. 2001.61-62.
- [3] 洪文学, 张仲鹏, 宋佳霖等. 麻醉深度监测方法及仪器研究的现状与展望[J]. 中国生物医学工程学报. 2011.30(5):781-786. HONG Wen-xue, ZHANG Zhong-peng, SONG Jia-lin. Current situation and prospect of the methods and instruments for monitoring the depth of anesthesia [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering. 2011.30(5): 781-786.
- [4] 庄心良等. 现代麻醉学 [M]. 北京. 人民卫生出版社. 2004.345-578. ZHUANG Xin-liang. Modern anesthesiology[M]. Beijing. People's Medical Publishing House. 2004.345-578.
- [5] 陈杭, 王选, 陈新忠. 基于 PID 闭环控制算法的麻醉靶控输注给药研究[J]. 中国生物医学工程学报. 2007.26(2):204-207. CHEN Hang, WANG Xuan, CHEN Xin-zhong. The Study of TCI Dose Regimen Based on PID Closed-loop Control Arithmetic [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering. 2007.26(2):204-207.
- [6] 周庆利, 何剑虎, 陈新忠. 基于 BIS 指数的麻醉给药系统研究设计[J]. 中国医疗设备. 2010.25 (05):27-30. ZHOU Qing-li, HE Jian-hu, CHEN Xin-zhong. Research and Design of Anaesthetic Feeding System based on BIS[J]. China Medical Devices. 2010.25 (05):27-30.
- [7] AstrLm KJ, Hgglund T. Revising the Ziegler-Nichols step response method for PID control. Journal of process Control. 2004.14 (6):635-650. AstrLm KJ, Hgglund T. 基于 Ziegler-Nichols 阶跃响应参数整定法的 PID 控制. 过程控制, 2004, 14(6):635-650.
- [8] 潘笑, 高玉玲, 康亚娜. 基于模糊 PID 的 AT89C2051 单片机智能温度控制系统 [J]. 兵工自动化. 2006.5:65-67. Intellectualized Temperature Control System of AT89C2051 Singlechip Based on Fuzzy-PID[J]. Ordnance Industry Automation. 2006.5:65-67.
- [9] 李全利. 单片机原理及接口技术[M]. 北京. 高等教育出版社. 2009.5-29. LI Quan-li. Principle and Interfacetechnology of Sigle Chip[M]. Beijing. Higher Education Press. 2009.5-29.
- [10] 陈宇珂, 龚建洪. Windows 系统注射泵控制程序的实现[J]. 医疗设备信息. 2001.12:14-15. CHEN Yu-ke, Jianhong Dou. The control program of an infusion pump on the Windows plate-form [J]. Information of Medical Equipment. 2001.12:14-15.
- [11] 石曙光. 基于数字 PID 和数字电位器的恒温控制系统[J]. 武汉工业学院学报. 2005.3:29-32. SHI Shu-guang. Auto-control system of high-precision const-temperature based on digital PID and digital potentiometer [J]. Journal of Wuhan Polytechnic University. 2005.3: 29-32.
- [12] Upton RN, Ludbrook G. A physiologically based, recirculatory model of the kinetics and dynamics of propofol in man [J]. Anesthesiology. 2005.103:344-352. Upton RN, Ludbrook G. 异丙酚人体药代动力学生理对象模型[J]. 麻醉学. 2005.103:344-352.
- [13] Liu N, Chazot T, Genty A, et al. Titration of propofol for anesthetic induction maintenance guided by the bispectral index: closed-loop versus manual control: a protective, randomized, multicenter study [J]. Anesthesiology. 2006.104 (4):686-695. Liu N, Chazot T, Genty A, et al. 基于 BIS 的异丙酚输注麻醉诱导维持期的闭环控制与手动控制的研究[J]. 麻醉学. 2006.104(4):686-695.
- [14] Locher S, Stadler KS, Boehlen T, 等. A new closed-loop control system for isoflurane using bispectral index outperforms manual control [J]. Anesthesiology. 2004.101 (3):591-602. Locher S, Stadler KS, Boehlen T, 等. 基于 BIS 指数的异氟醚闭环控制系统优于手动控制[J]. 麻醉学. 2004.101(3):591-602.