

表面增强拉曼光谱生物成像技术及其应用

周明辉¹, 廖春艳², 任兆玉¹, 樊海明^{1,3*}, 白晋涛¹

(1. 西北大学 光子学与光子技术研究所, 陕西 西安 710069; 2. 西北大学 物理学系, 陕西 西安 710069;
3. 西北大学 化工学院, 陕西 西安 710069)

摘要: 基于表面增强拉曼光谱的成像分析方法具有频带窄, 水溶液背景弱, 稳定性好, 高特异性等优势已成为生物成像领域的优良选择。拉曼成像技术拓展了拉曼光谱的应用范围, 使其不再只是检测单点化学成分的手段, 而进一步用于对评价区域内化学物质成分、分布及变化进行整体统计和描述。本文探讨了表面增强拉曼散射的原理及增强机制, 介绍了基于表面增强拉曼光谱的拉曼成像技术, 并对其在无标记成像及带标记成像中的细胞成像、活体成像, 特别是其在生物医学方面的应用进行了详细论述, 最后讨论了表面增强拉曼光谱生物成像技术存在的问题, 展望了该项技术的研究和应用前景。

关键词: 拉曼散射; 表面增强拉曼光谱; 生物成像; 生物医学

中图分类号: O657.37; Q-334 文献标识码: A doi:10.3788/CO.20130605.0633

Bioimaging technologies based on surface-enhanced Raman spectroscopy and their applications

ZHOU Ming-hui¹, LIAO Chun-yan², REN Zhao-yu¹, FAN Hai-ming^{1,3*}, BAI Jin-tao¹

(1. *Institute of Photonics & Photon-technology, Northwest University, Xi'an 710069, China;*

2. Physics Department, Northwest University, Xi'an 710069, China;

3. School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China)

** Corresponding author, E-mail: fanhm@nwu.edu.cn*

Abstract: The bioimaging technology based on the Surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS) has emerged as a potential alternative due to its narrow bandwidth, weak background interference, high stability of label agent and specificity. Raman imaging technique can not only analyze a single point of the sample, but also offer an integral description of ingredient, distribution and variation for a large scale selected region. This paper introduces the principle of surface enhanced Raman scattering and its enhancement mechanism. Then, it reviews the recent development of SERS based bioimaging where both non-labeled and labelled SERS imaging techniques are included, and describes its applications to the biomedicine. Finally, it discusses some problems existed in the current technology and points out the future developing trends of the SERS-based bioimaging.

Key words: Raman scattering; surface-enhanced Raman spectroscopy; bioimaging; biomedicine

收稿日期: 2013-09-12; 修订日期: 2013-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 21006079); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (No. 20126101110017)

1 引言

拉曼散射(Raman Scattering)效应是一种由分子振动和晶格振动导致的非弹性散射。C. V. Raman 于 1928 年在液体中观察到了这种现象^[1], 其后人们又在其它介质中发现了同样的现象。随后的几十年中,特别是激光器发明以后,拉曼光谱逐渐得到推广及应用。

由于拉曼光谱可以“指纹”标记特定的化学基团,因此它已经成为一种常用的化学成分分析手段。拉曼光谱分析不需要特殊的样品制备步骤,并具备无损测量的优势。此外,传统的红外光谱检测手段易受到水溶液的背景干扰,而水的拉曼光谱很弱,因此,对于生物样品来说,拉曼光谱是一种很理想的分析手段。然而,多数样品较弱的拉曼散射强度,特别是生物样品,在一定程度上阻碍了这一技术在多个领域的应用。表面增强拉曼散射可通过将分子吸附在粗糙金属或金属溶胶颗粒表面上以获取比普通拉曼散射增强的信号,其强度增加可达数个数量级之多。这一优势使表面增强拉曼散射在被发现以后的几十年中得到了快速且全面的发展,在物理、化学、材料、生物、医学、考古、环境等领域都得到了越来越广泛和深入的应用。近年来,拉曼成像(Raman Imaging 或 Raman Mapping)技术受到了较大的关注。通过集成大尺度、多采集点的拉曼光谱数据,拉曼成像得到的已经不再只是一幅简单的光谱图,而是对一个选定区域整体的、统计的描述。它所呈现出来的伪色图像,能够直接地反映样品内目标物的分布、浓度,并能实现对目标物的实时监测。基于表面增强拉曼光谱(Surface-enhanced Raman Spectroscopy, 简称 SERS)的拉曼成像技术随之出现,它继承了拉曼成像的诸多优点,并提高了信号强度,从而缩短了成像时间,使得在生物影像分析中定位病变细胞等成为可能。

本文以基于 SERS 的拉曼成像技术在生物成像领域的诸多进展为主线,对 SERS 的原理、应用及研究进展进行了探讨。

2 SERS 的原理

与荧光不同,拉曼效应并不吸收激发光,因此不能用实际的上能级来解释,而可以用虚能级的概念来解释,图 1 是说明拉曼效应的一个简化能级图。当一束光照射在介质上,少数光子会被该物质的原子或分子散射出去,被散射的光子中绝大部分会以原有的频率散射,光子散射前后没有发生频率变化,这部分散射属于瑞利散射;还有极小部分散射出去的光子频率发生了或大或小的改变,称为拉曼散射。如图 1 所示,基态分子被入射光子激发而跃迁到虚能级,虚能级上的分子不稳定,很快又跃迁回基态,从而释放出能量为 $h\nu_0$ 的光子,即瑞利散射过程;虚能级上的分子还可以跃迁到振动激发态上,释放出能量为 $h\nu_0 - \Delta\nu$ 的光子,即斯托克斯散射过程;如果分子处于振动激发态上,被光子激发跃迁到虚能级上继而又回到基态,则释放出能量为 $h\nu_0 + \Delta\nu$ 的光子,即为反斯托克斯散射过程^[2]。

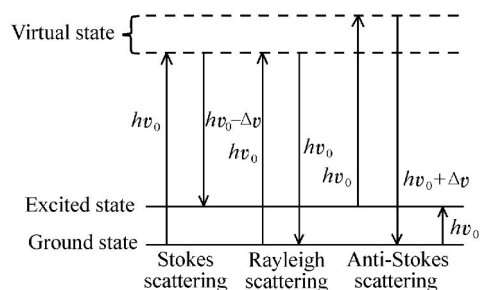


图 1 拉曼效应的简化能级图

Fig. 1 Simplified energy level diagram of Raman scattering

Fleischmann 于 1974 年首次发现粗糙银电极表面上吸附的吡啶分子的拉曼散射强度有异常的增强,增强倍数达到 $10^4 \sim 10^6$ ^[3], 即表面增强拉曼散射。最初 Fleischmann 等认为是电极的粗糙化引起了表面积的增加,相应吸附样品分子的数目同步增加所致。1977 年, D. L. Jeanmaire 等人^[4]和 M. G. Albrecht 等人^[5]分别研究发现,表面

粗糙化处理后银电极的表面积增加了约 10 倍,但吡啶分子的拉曼散射强度却增加了 $10^5 \sim 10^6$,这和 Fleischmann 等所认为的增强原因是不相符的。

经过长期的机理探索,目前,对 SERS 的增强机制已有了初步的认识,普遍认为 SERS 增强是物理增强和化学增强两种作用叠加的结果。SERS 的物理增强机制主要源于 3 种效应:(1) 表面镜像场效应(Image Field Effect),该理论认为拉曼信号增强来源于吸附分子与金属表面间的电磁相互作用所引起的散射截面的增加。(2) 避雷针效应(Lightning Rod Effect),该理论认为粒子某些部位的曲率半径非常小,这些部位电荷密度很高,会形成很强的局域表面电磁场分布,导致了粗糙金属表面的尖端或间隙处的拉曼信号得到增强,这些区域可以称之为“热点”。在“热点”区域,所有分子的拉曼信号都将得到增强^[6]。为获得表面增强拉曼信号,“热点”电磁增强技术已经被广泛应用,并成为获得高性能 SERS 活性基底的必要步骤。(3) 表面等离子体共振(Surface Plasma Resonance),该理论认为金属表面在入射光电场的作用下,其附近的类自由电子会产生疏密振动。金属表面等离子体在外电场的作用下可以自由流动并能被相应的激发,当入射光的频率与表面等离子体的自然振动频率相匹配时,就会产生大量电场。表面等离子体共振效应被公认为是 SERS 信号增强的主要来源。通过物理增强机制可以获得 $10^4 \sim 10^{10}$ 倍的信号增强^[6]。SERS 的化学增强机制主要是由于被分析物和金属表面间的电子耦合效应改变了分子的极化率,并形成了拉曼散射中的表面共振媒介所造成的。化学增强主要受金属表面电势的影响^[7],通过该机制可获得约 10^2 倍的信号增强^[8]。

研究 SERS 物理增强机制的大多数模型都是围绕对粗糙表面不同程度的近似而建立的各种简化的表面模型。例如,P. S. Kumar 等人为研究金纳米星的 SERS 增强机制建立了由一个纳米级中心球体和两个锥形尖端组成的理想模型,并对该模型进行了模拟计算。结果表明:SERS 增强是波长为 λ_{in} 的入射光所引起的局域增强与波长为 λ_{out} 的拉曼偶极发射所共同作用的结果。其增强因子,即 SERS 信号和拉曼信号的比值:

$$SERS = \frac{\int_{\text{surface}} d^2s \Gamma(\lambda_{in}) \Gamma(\lambda_{out})}{A \Gamma_0(\lambda_{in}) \Gamma_0(\lambda_{out})}, \quad (1)$$

式中:积分遍及纳米粒子表面, A 是粒子表面积, $\Gamma(\lambda)$ 是纳米粒子表面与波长和位置相关的偶极发射率, $\Gamma_0(\lambda)$ 是空气中的偶极发射率。图 2 是根据式(1)计算上述模型得出的结果,可以看到有两个主要结构的振动,一个是波长 > 700 nm 的尖端共振,另一个是波长在 500 nm 左右的球体共振,前者产生了约 10^8 的增强,这对设计高性能的拉曼增强基底起决定作用,并预示着有更多尖端的金纳米星将会产生更大的增强^[9]。

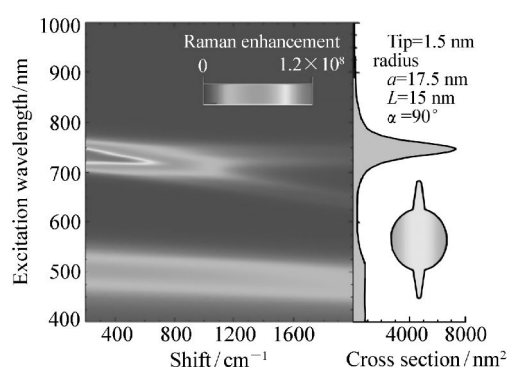


图 2 左图:金纳米星的拉曼增强理论计算结果;右图:该金纳米星的散射截面及几何参数

Fig. 2 Left:calculated Raman enhancement in a two-tip gold particle in air. Right:scattering cross section of the same particle. The particle shape and geometrical parameters are shown in the insets

单个金属纳米粒子的 SERS“热点”区域主要集中在粒子的尖端、边缘处。当将金属纳米粒子组合成粒子阵列时,粒子间隙处的 SERS 增强将远远超过单个纳米粒子的 SERS 增强。图 3 所示是几种典型纳米粒子和粒子阵列的电磁增强模拟^[10],从图 3 中可以看出,单个纳米粒子的边缘和尖端部分电磁增强最大,而粒子阵列的间隙部分电磁增强最大。

由上所述,可知 SERS 相对于常规拉曼光谱有以下一些特点:首先,在应用 SERS 进行探测时其信号强度受限于 SERS 基底,且拥有 SERS 活性的金属种类较少,目前主要是贵金属(金、银、铜)和碱金属(锂、钠、钾)基底上观测到的增强较

强烈;其次,分子不同的振动模式获得的增强程度不同,吸附分子的大多数拉曼振动峰的强度并不发生显著变化,但被增强的谱峰相对未增强的散射峰的相对强度存在较大的差别;最后,要获取较好的 SERS 增强,需要依据 SERS 基底的材料种类,SERS 基底表面微纳米结构以及被测分子的特性等众多因素来选择最佳的激发光波长^[2]。

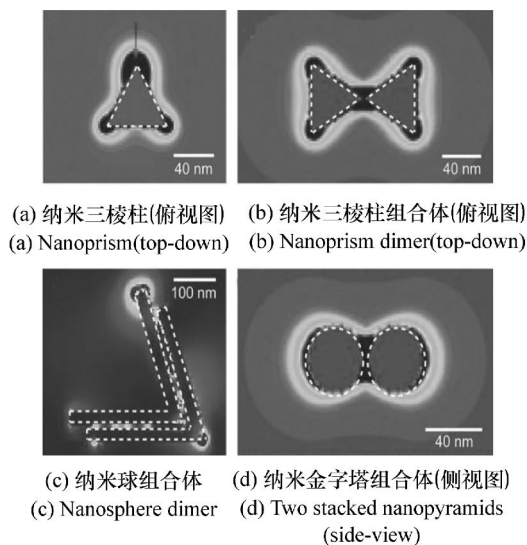


图3 不同形状的纳米粒子及粒子组合在表面等离子体共振波长下的理论电磁场增强

Fig. 3 Calculated electromagnetic field intensities for different metal nanoparticle shapes and dimers at localized surface plasmon resonance wavelengths

3 SERS 在生物成像中的应用

3.1 基于 SERS 的拉曼成像技术

拉曼成像技术是通过采集一定样品区域中的拉曼信号来获得样品的详细化学图像的先进探测方法。以共聚焦拉曼成像为例,该方法是获得所探测区域内的每一点的拉曼光谱后,再根据特定拉曼峰的强度、波束或者半峰宽等参数绘制成一幅伪色图像。该伪色图像的灰度与拉曼峰参数的变化相对应,可提供物质浓度及分布、分子结构和分子态、应力分布以及结晶度和晶相等多种信息。基于 SERS 的拉曼成像技术继承了传统拉曼成像的优势,且具有优异的多元性。它利用 SERS 的

增强原理,将活性分子的拉曼信号放大,更灵敏地探测目标物;同时也利用了 SERS 增强基底的诸多其它性质,如其对生物样品的亲和性,可减少与生物体之间的排斥作用等。

SERS 技术作为一种生物成像分析检测手段,相对于其它检测方法的优势主要体现在以下几个方面。第一,检测灵敏度高,SERS 的增强因子最高可以达到 10^{14} ^[11],能实现单分子检测;第二,选择性高,利用表面选择定则和共振增强的选择性使得 SERS 技术可以在成分复杂的体系中选择增强目标分子;第三,多路复用能力强,能够多路探测目标物,效率得到提升;第四,检测条件宽松,SERS 技术可以方便地应用于水溶液体系,而且样品可以是固态、液态或气态,目前,研究者各种界面都已观察到了 SERS 效应,说明 SERS 技术具有较好的普适性。

基于 SERS 的拉曼生物成像技术可以分为无标记成像和标记成像。无标记成像中生物分子不会受到外源标记物的干扰;标记成像按其应用目标又可细分为细胞成像和活体成像,二者均需将 SERS 标签引入待探测体系。由于 SERS 标记成像技术可以避免光漂白效应的影响,使其有潜力成为和荧光标记成像技术并立的新型探测手段。它可以观测到飞摩尔 (10^{-15} mol) 级别的生物流体化学变化,并缩短了观测时间。同时,SERS 成像在提高信号信噪比方面也有很大进步^[12],不易受到生物体内其它信号的干扰。此外,传统的荧光成像工作在紫外至可见光区域,产生荧光的同

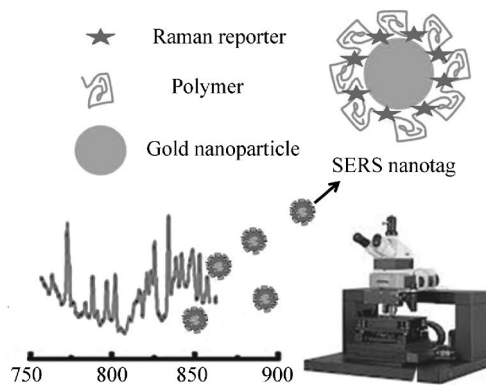
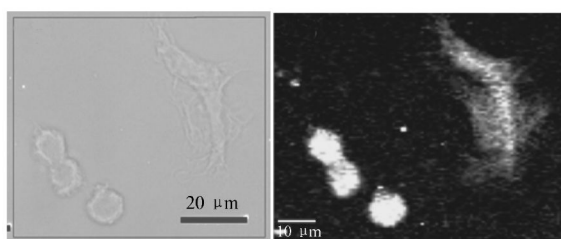


图4 SERS 标记成像示意图

Fig. 4 Schematic diagram of labeled SERS imaging

时还会引起冗余的光化学反应,而 SERS 成像可以工作在可见光至近红外光谱区域,从而避免了这些干扰^[13]。典型 SERS 标记成像的示意如图 4 所示,利用由 SERS 活性金属纳米粒子、拉曼活性分子及聚合物包覆材料等组成的 SERS 纳米标签来实现对样品的标记成像。图 5 所示的是 SERS 纳米标签通过细胞内吞作用进入 MCF-7 乳腺癌细胞内后得到的典型 SERS 标记成像图。(a)为在显微镜下的光学图像,(b)是相应细胞用近红外 785 nm 激光扫描得到的 SERS 成像图。(b)中所展现出来的明亮斑点表明了 SERS 纳米标签在细胞中的定位和分布。



(a) 显微镜下观察到的 MCF-7 乳腺癌细胞
(a) Microscope image of MCF-7 breast cancer cell

(b) SERS 纳米标签标记的 MCF-7 乳腺癌细胞的 SERS 成像图
(b) SERS imaging of MCF-7 breast cancer cell labelled with SERS nanotag

图 5 MCF-7 乳腺癌细胞的显微图像和 SERS 成像图
Fig.5 Microscope and SERS images of MCF-7 breast cancer cell

共聚焦 SERS 成像的扫描时间跨度由几分钟到几小时不等。扫描时间依赖于很多因素,如所选定区域的大小,所需像元数目的多少,特别是每个像元所需积分时间的长短,该时间是由所测样品特性、所需拉曼谱的质量以及共振激发等条件决定的。如果每幅光谱图所需积分时间为 1 s,一幅 60×60 pixel 的成像图就要耗时 $60 \times 60 = 3600 \text{ s} = 1 \text{ h}$,再加上利用步进电机平台寻找样品的时间,CCD 相机的读出时间等等,总的耗时可能会更长,更关键的是要在这么长的时间跨度里保持系统的稳定性非常困难。扫描时间过长限制了 SERS 成像技术的推广应用,但这种方法能够提供高分辨率的化学分布图像,有其可取之处。特别是近年来,高灵敏的光谱仪成像模块发展极

为迅速,可以有效地缩短像元的扫描时间至 5 ms 以下,这使得将来大面积拉曼成像所需时间降至分钟甚至秒级别成为可能。

从生物医学应用角度来看,由于病变生物组织的拉曼光谱是随着疾病过程的变化而变化的,故研究者很早就已开始利用生物体液或组织的拉曼光谱来监测疾病的病程变化,比如监测肿瘤疾病等^[14-19]。然而传统拉曼成像的信号强度较弱,不能广泛应用于临床诊断。此外,虽然目前已经有了一些诊断肿瘤疾病的先进方法,但是确诊时期大多为中晚期,错过了最佳的治疗时机,难以实现完全康复。SERS 成像方法具备的高强度、高灵敏度等特性可以克服传统拉曼成像的缺点,从而在肿瘤疾病诊断方面倍受青睐,该方法的引入为拉曼光谱在生物医学领域的应用开辟了新途径。

3.2 无标记成像

SERS 是一种非常理想的无标记探测手段,广泛应用于化学和生物分子成像领域。无标记成像是将样品分子吸附于 SERS 基底的“热点”区域,借助 SERS 基底的增强作用,提高样品的拉曼散射强度。

SERS 活性金属纳米粒子分散体系稳定性较差,容易团聚,而金属纳米阵列没有盐诱导团聚的

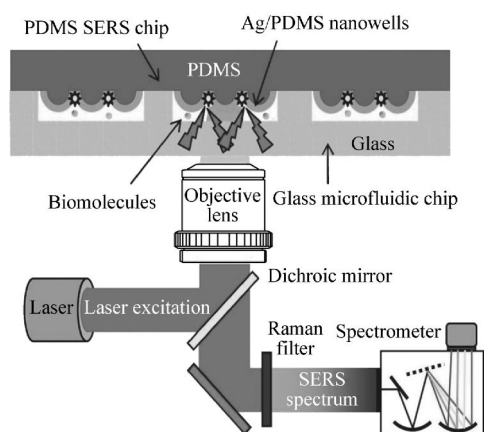


图 6 用于 SERS 无标记成像的微流装置及该生物分子成像系统示意图

Fig.6 Schematic diagram of the integrated microfluidic chip of label free SERS imaging and the biomolecular SERS imaging system

趋势,稳定性好^[20-21],是无标记成像较理想的基底。G. L. Liu 等人^[22]利用软刻蚀技术构造了可用于无标记 SERS 成像的纳米阵列。实验中先在硅基底上刻蚀出纳米井母版,对其表面改性后,将聚二甲基硅氧烷(PDMS)附着于硅基底上,即在 PDMS 上刻蚀出纳米凸起,再将银纳米粒子沉积在凸起部位的间隙处,最后与玻璃微流道组合,如图 6 上部所示,得到了可用于无标记探测生物分子的 SERS 基底阵列。该装置使用过程如图 6 所示,将生物分子引入微流道内,由于间隙处银纳米粒子的存在,生物分子的拉曼信号得到增强,进而获得生物分子的 SERS 成像图。

3.3 细胞成像

SERS 的应用研究已从单纯的生物流体分析拓展到细胞成像领域。由于细胞的内源性物质浓度比较低,且为保证细胞的成活及完整性,不能采用高功率激光去增强拉曼散射。因此,细胞拉曼光谱的信号强度都非常微弱,而且还会受到荧光背景干扰,信噪比很低。而 SERS 标记成像技术

能够高效快速地探测到细胞内部微观世界的信息,同时又能够对荧光产生很好的抑制、淬灭作用,提高了信噪比,是细胞成像领域的良好选择。

Manfait 等人早在 1990 年即已将银溶胶引入活细胞,利用 SERS 效应监视药物在细胞内的分布以及研究抗肿瘤药物与细胞的相互作用情况^[23-24]。Efrima 等将银溶胶颗粒通过与细胞共同孵育的方法导入埃希氏细菌,银纳米粒子有选择地分布在埃希氏细菌内部,可以观测到细菌壁和膜上不同生化成分的拉曼光谱,如多聚糖、缩氨酸等^[25]。C. D. Syme 等人^[26]将拉曼活性分子 4-巯基苯甲酸(4-MBA)与银胶粒子结合组成的 SERS 纳米标签与中国仓鼠卵巢细胞共同培养,使之被动吸收进入细胞。图 7 中展示的是以该纳米标签标记的同一个细胞随时间变化的 SERS 成像图。可以看到,该图反映了 SERS 纳米标签在细胞内的分布及运动变化。这可以用于跟踪细胞的分裂、转动等细节问题,实现对活细胞的实时监测。

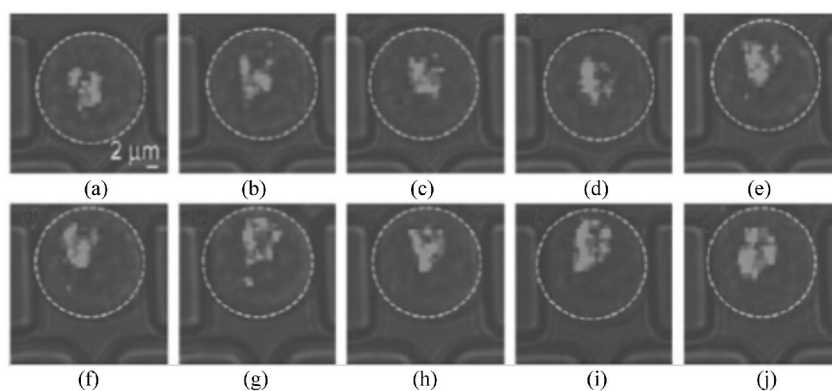


图 7 微流装置内随时间变化的以 4-MBA 标记的活细胞 SERS 成像图

Fig. 7 Time-course SERS mapping of a trapped live cell containing 4-MBA-coated nanoparticles trapped on a microfluidic device

由于需将 SERS 纳米标签引入活细胞,在选择纳米标签时还需注意其在水溶液中的溶解性、分散性、生物相容性、贮存稳定性以及选择特异性等方面的性能。K. V. Kong 等人^[27]将金属羰基化合物与金纳米粒子结合组成 SERS 纳米标签,对上述因素一一进行了探究,得到了上述性能均良好的新型 SERS 纳米标签。

随着高精度显微注射装置的发展,现已发展出利用这种注射装置将 SERS 纳米标签有选择性

的注射到细胞内部。这种商业化的微注射针头的内外直径可达 10^{-7} m 量级。利用这种针头对细胞进行注射操作,造成的机械损伤非常小,能够保持细胞的完整性^[28]。

3.4 活体成像

生物深层组织的成像一直以来都是生物医学领域的难题,研究者们过去常常将目光锁定在荧光标记成像方法以及高亮度量子点的应用^[29]。然而生物组织表层的自发荧光非常弱,限制了探

测深度,也不利于分辨率的提高。量子点虽可实现高效的荧光标记,却具有较高的生物毒性^[30]。拉曼光谱与 SERS 纳米标签的组合在一定程度上克服了上述缺陷。近红外 SERS 纳米标签制备技术的迅速发展,在生物深层组织成像方面表现出了巨大的应用潜力^[31-35]。在 SERS 标签的拉曼活性分子选择方面,碘化 3,3'-二乙基硫杂三羰花青 (DTTCi) 已经成为近红外波段研究肿瘤细胞 SERS 标记成像的一个标准拉曼活性分子, Ximei Qian 等^[34] 已利用它在活体实验中实现了 1 ~ 2 cm 的穿透深度。虽然 DTTCi 表现出了稳定的拉曼信号,但强度依然偏弱,限制了 SERS 标签灵敏度的提高^[36-37]。A. Samanta 等人^[38] 将拥有不同氨基结构的 80 种染料派生物与金纳米粒子结合,进行了 SERS 信号强度测试对比实验,证实了许多染料的 SERS 信号强度高于 DTTCi,拓展了拉曼活性分子的选择范围。同时,SERS 标签在溶液中的稳定性也非常重要,要防止拉曼活性分子从金核上脱落或 SERS 标签在体液内团聚,特别是 SERS 标签的团聚,给 SERS 标记成像造成很大影响^[39-40]。已经有很多材料被用于固定 SERS 标签,如聚乙二醇,二氧化硅等。虽然它们有较好的生物相容性,但其或多或少都会对 SERS 标签的性能产生影响,且其本身也会产生光谱吸收。最后再于外层结合上生物抗体等特异性物质,得到具有特异性结合能力的 SERS 标签。

由于荧光光谱的带宽较宽,各个特征峰之间容易产生重叠,限制了荧光标记成像的多路探测能力^[41]。而拉曼光谱的带宽只有 1 nm 左右,有效地减少了各个特征峰之间的重叠^[42],使 SERS 标记成像技术具备了良好的多路探测能力。多路探测能力的应用使 SERS 标记成像技术的信息量得到增加,效率得到提升,如果与信息学中的模式识别算法相结合,自动识别混合物拉曼光谱中的光谱成分将成为现实。C. L. Zavaleta 等人对 SERS 标签的多路探测能力进行了研究。将 10 种带有不同拉曼活性分子的 SERS 标签注入裸鼠体内,得到了以各种活性分子的特征峰呈现出来的 SERS 成像图,如图 8 所示,成功区分出了各个标签^[31]。

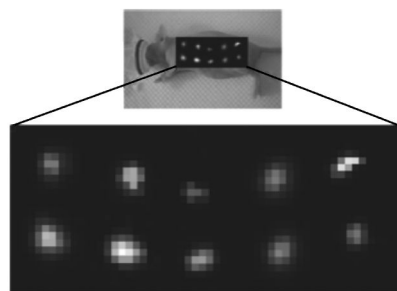


图 8 10 种带有不同标记物的 SERS 标签注入裸鼠后得到的 SERS 成像图

Fig. 8 A SERS mapping of 10 different SERS nanotags injected subcutaneously in a nude mouse

由上述关于 SERS 标记成像的阐述可知,如果使该标签功能化,使其对肿瘤细胞产生特异性结合,就可以得到肿瘤细胞的位置及分布,这对肿瘤疾病的早发现、早诊断、早治疗有很大意义。K. K. Maiti 等人用染料 CyNAMLA-381, Cy7LA 和

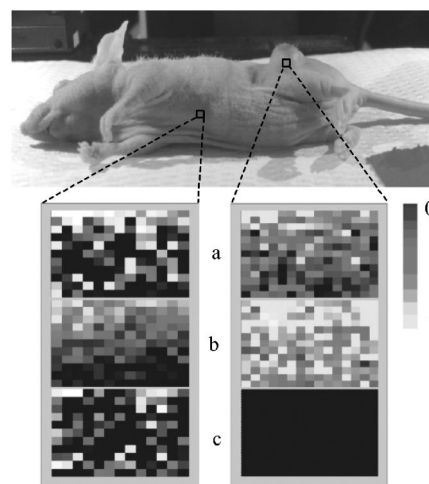


图 9 多路探测 SERS 成像图:左列来自肝脏部位,右列来自肿瘤部位(a 图中呈现 CyNAMLA-381 分子的特征峰为 523 cm^{-1} , b 图中呈现 Cy7LA 分子的特征峰为 503 cm^{-1} , c 图中呈现 Cy7.5LA 分子的特征峰为 586 cm^{-1})

Fig. 9 Multiplex SERS mapping images: Left column from liver site and right column from tumor site (a: mapping corresponding to peak 523 cm^{-1} for CyNAMLA-381; b: mapping corresponding to peak 503 cm^{-1} for Cy7LA, and c: mapping corresponding to peak 586 cm^{-1} for Cy7.5LA)

Cy7.5LA 作为拉曼活性分子进行了 SERS 活体成像多路探测的研究。该实验中将带有 CyNAMLA-381 和 Cy7LA 分子的 SERS 标签结合上表皮生长因子受体(EGFR),带有 Cy7.5LA 分子的 SERS 标签没有结合 EGFR。将 3 种标签混合注入带口腔鳞状细胞癌(OSCC)移植瘤的裸鼠体内,得到的 SERS 标记成像图如图 9 所示。清晰地显示出了带 CyNAMLA-381 和 Cy7LA 分子的 SERS 标签聚集在 OSCC 移植瘤部位,同时由于网状内皮系统可扑弗氏细胞的吸收,3 种 SERS 标签又都在肝脏部位聚集。随后该研究组又进行了 SERS 标签分布的动力学研究,经过 8 天的观测,聚集在肿瘤部位的标签浓度不会下降,而聚集在肝脏部位的标签浓度几近为零。这说明肝脏部位的标签已经被排泄系统快速排出体外,这对 SERS 标记成像技术的临床应用非常重要^[43]。这些研究均证实了 SERS 生物成像技术在实时监测细胞动态,诊断肿瘤疾病,以及其它需要涉及深层组织成像的

研究中的应用潜力。

4 结束语

综上所述,本文讨论了 SERS 的基本原理和增强机制,并重点介绍了基于 SERS 的拉曼生物成像技术。探讨了 SERS 生物成像在无标记成像及标记成像中的细胞成像、活体成像以及多路探测能力等领域的研究进展。SERS 成像作为一种快捷、高效、无损、高灵敏度的检测手段,在生物学、药物、食品检测等领域展现了巨大的应用潜力,特别是在生物医学领域的细胞成像、肿瘤识别等方面的研究更具有重要价值。同时,SERS 成像也面临一些问题,如每个像元的积分时间过长、SERS 探针的制备困难等等。目前开展的工作仍处于临床前研究阶段,要实现 SERS 成像技术在肿瘤疾病临床诊断上的实际应用还有待于各个不同学科领域的研究者深入的沟通与合作。

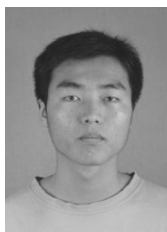
参考文献:

- [1] RAMAN C V, KRISHMAN K S. A new type of secondary radiation[J]. *Nature*, 1928, 121:501-502.
- [2] 段建民. 金属纳米粒子局域电磁增强的数值模拟研究[D]. 大连:大连理工大学, 2009.
DUAN J M. Studies on localized electromagnetic enhancement of metallic nanoparticle by numerical simulation[D]. Dalian; Dalian University of Technology, 2009. (in Chinese)
- [3] FLEISHMANN I M, HENDRA J P, MCQUILLIAN A J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode[J]. *Chem. Phys. Lett.*, 1974, 26(2):163-166.
- [4] JEANMAIRE D L, VAN DUYNE R P. Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode[J]. *J. Electroanal. Chem. Inter. Electro.*, 1977, 84(1):1-20.
- [5] ALBRECHT M G, CREIGHTON J A. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99(15):5215-5217.
- [6] MOSKOVITS M. Surface-enhanced spectroscopy[J]. *Rev. Mod. Phys.*, 1985, 57:783-826.
- [7] LIANG E J, KIEFER W. Chemical effect of SERS with near-infrared excitation[J]. *J. Raman Spectroscopy*, 1996, 27:879-885.
- [8] ADRIAN F J. Charge transfer effects in surface-enhanced Raman scattering[J]. *J. Chem. Phys.*, 1982, 77(11):5302-5315.
- [9] KUMAR P S, PASTORIZA-SANTOS I, RODRIGUEZ-GONZALEZ B, et al.. High-yield synthesis and optical response of gold nanostars[J]. *Nanotechnology*, 2008, 19:015606.
- [10] STOERZINGER K A, LIN J Y, ODOM T W. Nanoparticle SERS substrates with 3D Raman-active volumes[J]. *Chem. Sci.*, 2011, 2:1435-1439.
- [11] KNEIPP K, WANG Y, KNEIPP H, et al.. Single molecule detection using Surface-Enhanced Raman Scattering(SERS)[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 1997, 78:1667-1670.
- [12] KUDELSKI A. Analytical applications of Raman spectroscopy[J]. *Talanta*, 2008, 76(1):1-8.
- [13] LI K, CLIME L, TAY L, et al.. Multiple surface plasmon resonances and near-infrared field enhancement of gold nanow-

- ells[J]. *Anal. Chem.*,2008,80:4945-4950.
- [14] 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.
- [15] BERGHOLT M S, ZHENG W, LIN K, *et al.*. Combining near-infrared-excited autofluorescence and Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of gastric cancer[J]. *Biosens Bioelectron*,2011,26(10):4104-4110.
- [16] KELLER M D, VARGIS E, DE MATOS GRANJA N, *et al.*. Development of a spatially offset Raman spectroscopy probe for breast tumor surgical margin evaluation[J]. *J Biomed Opt.*,2011,16(7):077006.
- [17] VARGIS E, KANTER E M, MAJUMDER S K, *et al.*. Effect of normal variations on disease classification of Raman spectra from cervical tissue[J]. *Analyst.*,2011,136(14):2981-2987.
- [18] DOCHOW S, KRAFFT C, NEUGEBAUER U, *et al.*. Tumour cell identification by means of Raman spectroscopy in combination with optical traps and microfluidic environments[J]. *Lab. Chip*,2011,11(8):1484-1490.
- [19] STENZL A, COWAN N C, SANTIS M D, *et al.*. Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines[J]. *European Urology*,2011,59:1009-1018.
- [20] LAI X, HUANG W, XU R. Geometry optimization of atomic clusters using a heuristic method with dynamic lattice searching[J]. *J. Phys. Chem. A*,2011,115(20):5021-5026.
- [21] KHO K W, QING K Z, SHEN Z X, *et al.*. Polymer-based microfluidics with surface-enhanced Raman-spectroscopy-active periodic metal nanostructures for biofluid analysis[J]. *J. Biomed Opt.*,2008,13(5):054026.
- [22] LIU G L, LEE L P. Nanowell surface enhanced Raman scattering arrays fabricated by soft-lithography for label-free biomolecular detections in integrated microfluidics[J]. *Appl. Phys. Lett.*,2005,87:074101-074103.
- [23] NABIEV I, CHOURPA I, MANFAIT M. Applications of Raman and surface-enhanced Raman scattering spectroscopy in medicine[J]. *J. Raman Spectroscopy*,1994,25(1):13-23.
- [24] MANFAIT M, NABIEV I, MOJANI H. Molecular events on single living cancer cells as studied by microspectrofluorometry and micro SERS raman spectroscopy[J]. *J. Cell. Pharma*,1992,3:120-125.
- [25] EFRIMA S, BRONK B. Silver colloids impregnating or coating bacteria[J]. *J. Phys. Chem. B*,1998,102(31):5947-5950.
- [26] SYME C D, SIRIMUTHU N M, FALEY S L, *et al.*. SERS mapping of nanoparticle labels in single cells using a microfluidic chip[J]. *Chem. Commun.*,2010,46(42):7921-7923.
- [27] KONG K V, LAM Z, GOH W D, *et al.*. Metal carbonyl-gold nanoparticle conjugates for live-cell SERS imaging[J]. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*,2012,51(39):9796-9799.
- [28] CHOURPA I, LEI F H, DUBOIS P, *et al.*. Intracellular applications of analytical SERS spectroscopy and multispectral imaging[J]. *Chem. Soc. Rev.*,2008,37(5):993-1000.
- [29] ZHANG C, LIU T, SU Y, *et al.*. A near-infrared fluorescent heptamethine indocyanine dye with preferential tumor accumulation for in vivo imaging[J]. *Biomaterials*,2010,31(25):6612-6617.
- [30] HOSHINO A, FUJIOKA K, OKU T, *et al.*. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification[J]. *Nano Letters*,2004,4(11):2163-2169.
- [31] ZAVALITA C L, SMITH B R, WALTON I, *et al.*. Multiplexed imaging of surface enhanced Raman scattering nanotags in living mice using noninvasive Raman spectroscopy[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,2009,106(32):13511-13516.
- [32] YIGIT M V, ZHU L, IFEDIBA M A, *et al.*. Noninvasive MRI-SERS imaging in living mice using an innately bimodal nanomaterial[J]. *ACS Nano*,2011,5(2):1056-1066.
- [33] STONE N, FAULDS K, GRAHAM D, *et al.*. Prospects of deep Raman spectroscopy for noninvasive detection of conjugated surface enhanced resonance Raman scattering nanoparticles buried within 25 mm of mammalian tissue[J]. *Anal. Chem.*,2010,82(10):3969-3973.
- [34] QIAN X M, PENG X H, ANSARI D O, *et al.*. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags[J]. *Nature Biotechnology*,2008,26:83-90.
- [35] SUN L, SUNG K B, DENTINGER C, *et al.*. Composite organic-inorganic nanoparticles as Raman labels for tissue analysis

- [J]. *Nano Lett.*, 2007, 7(2): 351-356.
- [36] SOUZA G R, LEVIN C S, HAJITOU A, *et al.*. In vivo detection of gold-imidazole self-assembly complexes: NIR-SERS signal reporters[J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78(17): 6232-6237.
- [37] HUANG P J, CHAU L K, YANG T S, *et al.*. Nanoaggregate-embedded beads as novel Raman labels for biodetection[J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2009, 19: 242-248.
- [38] SAMANTA A, MAITI K K, SOH K S, *et al.*. Ultrasensitive near-infrared Raman reporters for SERS-based in vivo cancer detection[J]. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011, 50(27): 6089-6092.
- [39] LIZ-MARZ N L M, GIERSIG M, MULVANEY P. Homogeneous silica coating of vitreophobic colloids[J]. *Chem. Commun.*, 1996, 6: 731-732.
- [40] LIU G, JI H, YANG X, *et al.*. Synthesis of a Au/silica/polymer trilayer composite and the corresponding hollow polymer microsphere with a movable Au core[J]. *Langmuir*, 2008, 24(3): 1019-1025.
- [41] GRAHAM D, GOODACRE R. Chemical and bioanalytical applications of surface enhanced Raman scattering spectroscopy [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37(5): 883-884.
- [42] NI J, LIPERT R J, DAWSON G B, *et al.*. Immunoassay readout method using extrinsic Raman labels adsorbed on immunogold colloids[J]. *Anal. Chem.*, 1999, 71(21): 4903-4908.
- [43] MAITI K K, DINISH U S, SAMANTA A, *et al.*. Multiplex targeted in vivo cancer detection using sensitive near-infrared SERS nanotags[J]. *Nano Today*, 2012, 7: 85-93.

作者简介:



周明辉(1989—),男,内蒙古赤峰人,硕士研究生,2008年于中国地质大学(武汉)获得学士学位,主要从事表面增强拉曼散射生物成像方面的研究。E-mail:zhouminghui89@sina.com



樊海明(1976—),男,陕西汉中,人,教授,博士生导师,1998年于西北大学获得学士学位,2001年于华东师范大学获得硕士学位,2004年于中国科学院物理研究所获得博士学位,主要从事功能纳米材料、纳米生物光子学与生物成像、生物医学等方面的研究。E-mail:fanhm@nwu.edu.cn



廖春艳(1979—),女,四川眉山人,博士,讲师,2000年、2003年于西安工业大学分别获得学士、硕士学位,2006年于中国科学院上海光学精密机械研究所获得博士学位,主要从事薄膜纳米材料的制备、表征及应用开发等方面的研究。E-mail:cyliao@nwu.edu.cn



白晋涛(1959—),男,陕西绥德人,教授,博士生导师,1982年、1991年于西北大学分别获得学士、硕士学位,2001年于中国科学院西安光学精密机械研究所获得博士学位,现任西北大学物理学系主任,西北大学光子学与光子技术研究所副所长,陕西省物理学会副理事长兼秘书长,陕西省光学学会常务理事。主要从事瞬态光学,全固态激光器等方面的研究。E-mail:baijt@nwu.edu.cn



任兆玉(1958—),女,陕西临潼人,教授,博士生导师,1982年于北京师范大学获得学士学位,1995年、2002年于西北大学分别获得硕士、博士学位,主要从事非线性光学、光电功能材料、激光技术与器件等方面的研究。E-mail:rzy@nwu.edu.cn