

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202626011

· 论 著 ·

鼻咽癌细胞分泌蛋白的表面增强拉曼光谱技术研究

吴烽芳¹, 吴志伟², 吴志圣¹, 王晓燕³, 叶青³

(1. 福建医科大学附属泉州第一医院 耳鼻咽喉科, 福建 泉州 362000; 2. 泉州师范学院 物理与信息工程学院, 福建 泉州 362000; 3. 福州大学附属省立医院 福建省立医院 耳鼻咽喉科, 福建 福州 350001)

摘要: **目的** 探索基于细胞分泌蛋白的表面增强拉曼光谱(SERS)技术,构建一种能够有效区分高分化与低分化鼻咽癌细胞的检测方法。**方法** 以人高分化鼻咽癌细胞 CNE1、低分化鼻咽癌细胞 CNE2 及正常鼻咽上皮细胞株 NP69 为研究对象,顺铂干预后培养 24 h,收集细胞分泌蛋白并进行 SERS 技术检测。通过对比 3 组细胞的 SERS 光谱特征,分析其分泌蛋白组分和结构的差异。进一步结合主成分分析(PCA)与线性判别分析(LDA)对光谱数据进行降维和分类,评估该方法在区分不同分化程度癌细胞及正常鼻咽上皮细胞中的性能。**结果** 成功获取了 CNE1、CNE2 及 NP69 细胞的分泌蛋白 SERS 光谱,3 组细胞在拉曼峰位、峰强及峰形上均呈显著差异,提示其分泌蛋白组成存在特异性改变。PCA-LDA 模型显示出优异的分类能力,能够清晰地区分癌细胞与正常鼻咽上皮细胞,且在高分化与低分化鼻咽癌细胞之间也实现了有效分离。模型对高分化鼻咽癌细胞 CNE1 的识别灵敏度和特异性均超过 96%,分类准确率达到 98%以上;对低分化鼻咽癌细胞 CNE2 的识别灵敏度和特异性均超过 95%,分类准确率达到 95%以上,显示出良好的诊断性能。**结论** 细胞分泌蛋白联合 SERS 技术不仅能够有效区分鼻咽癌细胞与正常鼻咽上皮细胞,还能进一步鉴别癌细胞的分化程度,具有较高的灵敏度与特异性,有望为鼻咽癌的病理分型提供一种非标记、快速便捷的新型辅助检测手段。

关键词: 鼻咽癌;表面增强拉曼光谱技术;细胞分泌蛋白

中图分类号:R739.63

Study on SERS technology of cellular secreted proteins of nasopharyngeal carcinoma

WU Fengfang¹, WU Zhiwei², WU Zhisheng¹, WANG Xiaoyan³, YE Qing³

(1. Department of Otolaryngology, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China; 2. Institute of Physics and Information Engineering, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China; 3. Department of Otolaryngology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou University Affiliated Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China)

Abstract: **Objective** To explore a new method based on cellular secreted protein combined with surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) to effectively distinguish well-differentiated and poorly-differentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. **Methods** Human well-differentiated NPC cell CNE1, poorly-differentiated NPC cell CNE2 and normal nasopharyngeal epithelial cell NP69 were taken as the research objects. After 24 hours of natural culture, the secreted proteins were collected and measured by SERS. By comparing the spectral characteristics of the three groups of cells, the differences in composition and structure of protein secreted by cells were analyzed. Furthermore, principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA) were combined to reduce the dimensionality and classify the spectral data, and the performance of this method in distinguishing cancer cells of different differentiation degrees and normal cells was evaluated. **Results** SERS spectra of secreted proteins of CNE1, CNE2 and NP69 cells were successfully obtained. There were obvious differences in Raman peak position, peak intensity and peak shape among the three groups of cells, suggesting that there were specific changes in the composition of their secreted proteins. The PCA-

基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2023J011768)。
第一(通信)作者简介:吴烽芳,女,博士,副主任医师。

LDA model demonstrated excellent classification performance, achieving clear discrimination between cancerous and non-cancerous cells, as well as effective separation between well-differentiated and poorly-differentiated NPC cells. For the well-differentiated NPC cell line CNE1, the model achieved a sensitivity and specificity exceeding 96%, with a classification accuracy above 98%. For the poorly-differentiated NPC cell line CNE2, it yielded sensitivity and specificity rates over 95% and a classification accuracy exceeding 95%, indicating robust diagnostic capability. **Conclusions** The cell secretory protein combined with SERS technology can not only effectively distinguish NPC cells from normal cells, but also further identify the differentiation degree of cancer cells, with high sensitivity and specificity. This method is expected to provide a non-labeled and rapid detection method for pathological classification of NPC.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma; Surface enhanced Raman spectroscopy; Cellular secreted proteins

鼻咽癌是一种起源于鼻咽黏膜上皮层的恶性肿瘤,2022 年我国鼻咽癌新发病例约 64 165 例,死亡 36 315 例^[1]。鼻咽癌发病机制十分复杂,在其发生发展过程中,肿瘤细胞可分泌多种蛋白分子,参与癌细胞间、癌细胞与周围细胞间的复杂信息调控,改变微环境,使之有利于癌细胞的侵袭和转移。这些蛋白分子是指由细胞合成并分泌到细胞外基质的可溶性蛋白,主要通过体液循环作用于靶细胞和靶器官,被称为细胞分泌蛋白。这类蛋白由细胞因子、激素、免疫调节因子和其他生物活性分子等重要的生物大分子组成,参与人体内许多重要的生命活动过程,如细胞的增殖和分化、免疫应答、细胞信号传导、脂质代谢等,并与恶性肿瘤的血管生成、分化、侵袭及转移密切相关。研究提示,至少有 5 种细胞分泌蛋白与鼻咽癌的转移机制有关,包括钙黏蛋白、凝乳蛋白、崩解蛋白、肽基-脯氨酸-反式异构酶 A 以及硫氧还蛋白^[2]。

表面增强拉曼光谱 (surface enhanced raman spectroscopy, SERS) 技术能够灵敏地反映出物质内部分子组分、结构的细微改变,通过拉曼光谱谱峰的变化,从分子水平反映研究对象内部结构变化,被视为物质分子的光学“指纹密码”,具有无创、直接、准确、快速等优点。本文利用细胞分泌蛋白的 SERS 谱峰变化来区分不同类型的鼻咽癌细胞,有望为临床快速鉴别鼻咽癌病理分型提供新思路。

1 实验方法

1.1 实验标本

人高分化鼻咽癌细胞株 CNE1、人低分化鼻咽癌细胞株 CNE2、人永生鼻咽黏膜上皮细胞株 NP69 均购自湖南长沙湘雅医院中心实验室。

1.2 细胞培养

1.2.1 细胞复苏 将 CNE1、CNE2、NP69 细胞系从冻存中取出后,即刻置于 37 °C 恒温水浴锅中快速震

荡解冻,加入 2 mL 含 10% 胎牛血清、1×青霉素/链霉素双抗的 RPMI-1640 完全培养基稀释,1 000 rpm/min 离心 5 min,移除上清液,添加 1 mL 同配方完全培养基,均匀吹打后将细胞悬液转入 10 cm 培养皿,补加 6 mL 上述完全培养基,轻轻摇动培养皿,使之充分混匀后培养。

1.2.2 细胞培养 将培养皿放入 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养。

1.2.3 细胞传代 隔日观察细胞状态,若细胞培养基出现黄变,应立即更换培养基。使用 Leica 显微镜观察细胞密度达到 80% 时,进行细胞传代。

弃去旧的细胞培养基,并用 1×PBS 溶液轻柔地洗涤细胞 3 次,加入 1 mL 胰蛋白酶,将其放入培养箱中孵化 3~5 min。当在显微镜下观察到细胞变为圆形、细胞质回缩以及颜色变得透明时,应添加 1 mL 的完全培养基以终止消化过程。用移液枪轻轻吹打细胞悬液,再将其转入 1.5 mL 的 EP 管中。在 1 000 r/min 离心 5 min。最终,在管底会形成白色的沉淀物。弃去上层液体,再补加 1 mL 完全培养基,吹打均匀,制成单细胞悬液。取 100 μL 细胞悬液装入 1 个新的 1.5 mL EP 管,加入 900 μL 完全培养液稀释 10 倍,从中取 10 μL 进行细胞计数。根据实验要求,将剩余的细胞悬液稀释至合适的浓度,然后按照 1:3 或 1:4 比例转移到新的培养皿中进行传代培养,随后继续在细胞培养箱中进行培养。

1.2.4 细胞冻存 取 1.5 mL 细胞冻存液,中和细胞后,逐渐缓慢降温,依次经 4 °C 冰箱 30 min、-20 °C 冰箱 30 min 后转入 -80 °C 冰箱内冻存。

1.3 细胞分泌蛋白提取

当观察到细胞单层铺满培养皿时,弃去原细胞培养液,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,充分去除培养液中残余的血清蛋白,分别加入含顺铂、不含胎牛血清和青霉素/链霉素双抗的单纯 RPMI-1640 培养液,培养 24 h 后提取细胞培养液,先用 1 000 r/min 离

心 5 min 过滤除去培养液里的细胞碎屑;取上清液 1 000 g 再次离心 10 min;取出上清液加入 2 倍体积的 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 无水乙醇混合于离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 000 rpm/min 离心 10 min, 丢弃上清液, 可见附着于管底的白色沉淀物。移除上清液, 将该沉淀物用 95% 乙醇洗涤 1 次, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 10 min, 丢弃上清液, 得到沉淀于管底的白色块状物, 室温下干燥 1~2 h 让乙醇充分挥发; 然后加入 40 μL 超纯水溶解干燥后的分泌蛋白团块, 充分混匀, 即得到实验所需的细胞分泌蛋白液。

1.4 银胶制备

本研究采用盐酸羟胺还原硝酸银的方法制作银胶^[3]。

1.5 SERS 信号检测

剪取一块大小适中的铝箔, 利用 75% 乙醇充分去除铝箔表面的杂质, 然后自然风干。在洁净、光滑、平整的铝箔上将银胶依次点好, 每个样本 2 μL , 将 2 μL 细胞分泌蛋白液加入银胶, 用移液枪轻轻吹打混匀, 静置 1~2 h 待样本自然干燥。

使用英国 Renishaw inVia 型全自动共焦拉曼显微光谱仪, 激发波长 785 nm, 在 $400\sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$ 范围内对样品进行测试。采用 WIRE 3.4 软件收集 SERS 信号, 使用 20 $\times$ 物镜, 激光功率 17.2 mW, 光谱分辨率 2 cm^{-1} , 扫描时间 10 s, 积分 1 次。

1.6 图像处理方法

先用 Vancouver Raman Algorithm 软件对 $400\sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$ 范围内原始检测到的 SERS 光谱扣除荧光背景干扰, 然后用 LabVIEW 2014 软件进行面积归一化处理, 消除焦面偏移和激光功率波动的影响。使用 Origin 2019 软件处理图像。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行多元统计分析。采用主成分分析-线性判别分析法 (principal component analysis and linear discriminant analysis, PCA-LDA)

进行计算。采用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic, ROC) 方法评价灵敏度与特异性。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种细胞的光学显微镜特点

CNE1 是一种高分化的人鼻咽癌细胞, 其胞浆丰富, 形态规整, 细胞间隙分明, 边界清晰^[4], 见图 1A。CNE2 细胞是一种低分化的人鼻咽癌细胞, 相比于 CNE1, 其细胞体积较细长, 细胞胞浆丰富, 边界清晰, 见图 1B。NP69 细胞是本研究对照组的人正常鼻咽黏膜上皮细胞, 细胞胞浆丰富, 间隙清晰, 细胞核大, 见图 1C。

2.2 3 种细胞分泌蛋白的 SERS 光谱

用 RPMI-1640 培养 24 h 的 3 种细胞分泌蛋白的平均 SERS 光谱图见图 2, 谱峰主要集中在 733 、 $1\,004$ 、 $1\,331$ 、 $1\,450$ 和 $1\,676\text{ cm}^{-1}$ 等处。3 种细胞的 733 、 $1\,004$ 、 $1\,331$ 、 $1\,450$ 和 $1\,676\text{ cm}^{-1}$ 的拉曼强度柱状图见图 3。

2.3 PCA-LDA 与 ROC 分析

使用 LDA 算法计算 CNE1 组与 CNE2 组比较的后验概率结果 ($n=50$) 显示, 灵敏度和特异性分别为 100.0%、100.0%, 准确率为 100.0%, 见图 4A。使用 LDA 算法计算 CNE1 组与 NP69 组比较的后验概率结果 ($n=50$) 显示, 灵敏度和特异性分别为 100.0%、96.0%, 准确率为 98.0%, 见图 4B。使用 LDA 算法计算 CNE2 组与 NP69 组比较的后验概率结果 ($n=50$) 显示, 灵敏度和特异性分别为 95.9%、96.0%, 准确率为 95.95%, 见图 4C。

ROC 见图 5, 其中 CNE1 vs CNE2 组曲线下面积 (area under the curve, AUC) 值为 1.000; CNE1 与 NP69 组 AUC 值为 0.987; CNE2 组与 NP69 组 AUC 值为 0.988。

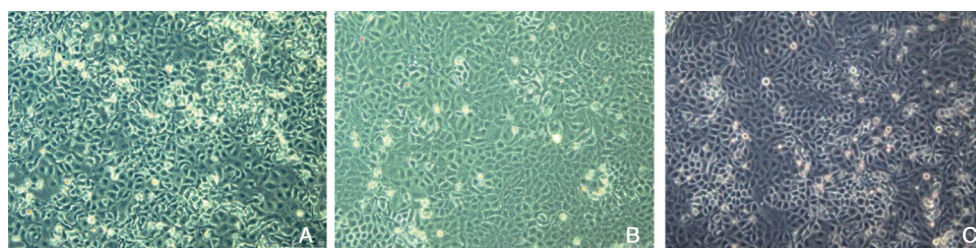


图1 Leica 显微镜下的 3 种细胞形态 ($\times 100$) A: CNE1; B: CNE2; C: NP69

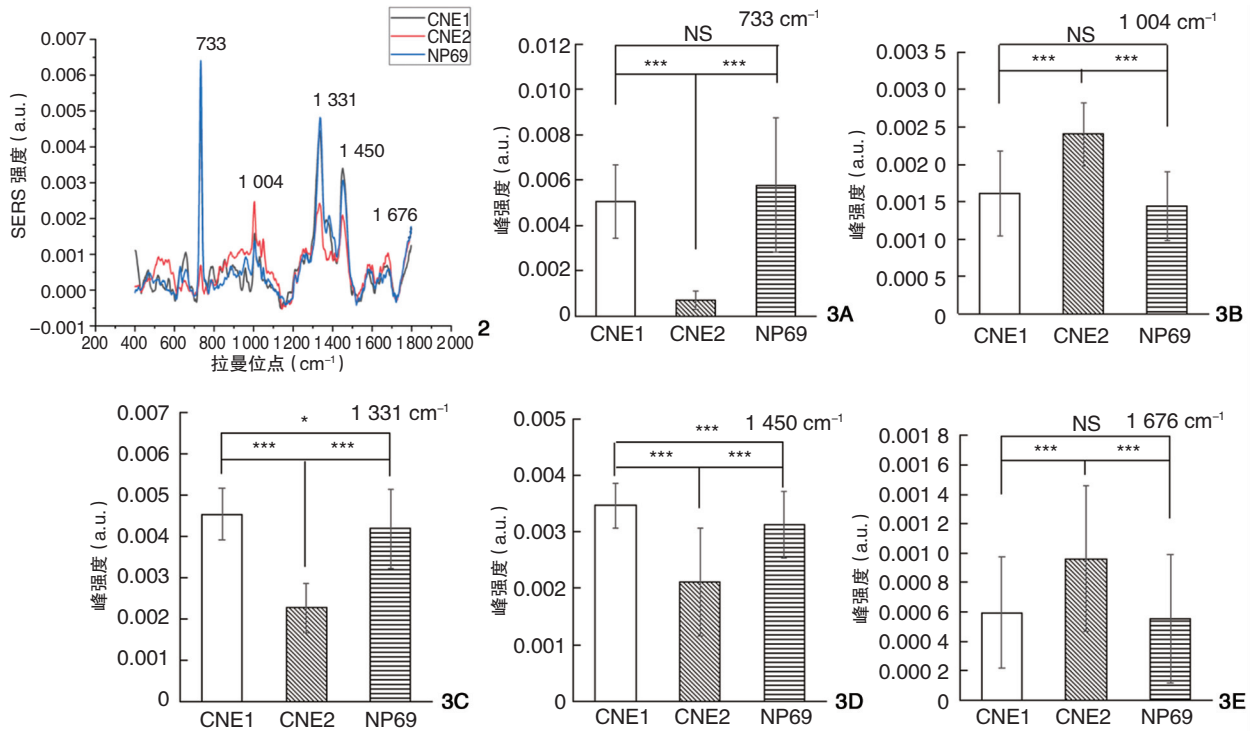


图 2 3 种细胞分泌蛋白的平均 SERS 光谱图 图 3 3 种细胞的峰强度柱状图 3A:733 cm^{-1} 组;3B:1 004 cm^{-1} 组;3C:1 331 cm^{-1} 组;3D:1 450 cm^{-1} 组;3E:1 676 cm^{-1} 组 注:SERS(表面增强拉曼光谱);* 为 $P < 0.01$;*** 为 $P < 0.001$;NS 为 $P > 0.05$ 。

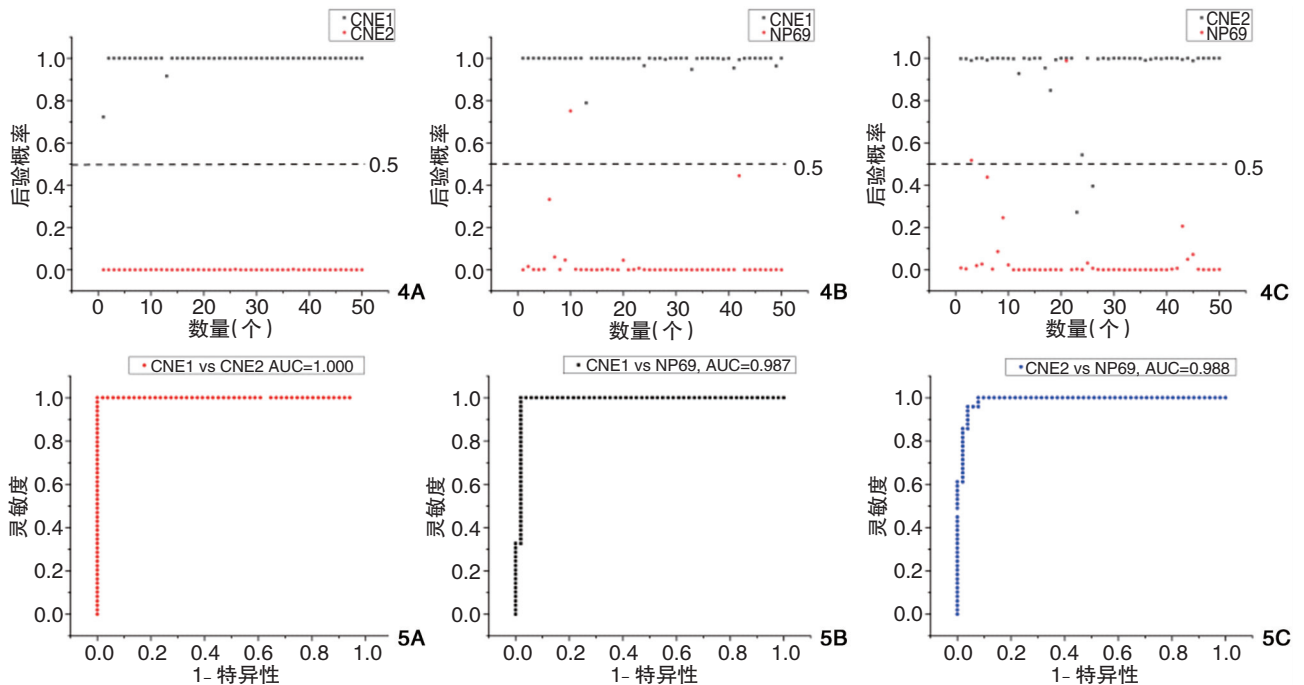


图 4 后验概率散点图 4A:CNE1 组与 CNE2 组;4B:CNE1 与 NP69 组;4C:CNE2 组与 NP69 组 注:4A、4B、4C 的区分阈值分别为 0.5、0.5、0.5。 图 5 PCA-LDA 分析生成的不同组细胞分泌蛋白样本鉴别结果的 ROC 5A:CNE1 与 CNE2 组;5B:CNE1 与 NP69 组;5C:CNE2 组与 NP69 组 注:PCA-LDA(主成分分析-线性判别分析法);ROC(受试者工作特征曲线);AUC(曲线下面积)。

3 讨论

既往已有多项基于 SERS 技术的鼻咽癌相关研究,但聚焦于细胞分泌蛋白的 SERS 光谱研究相对匮乏。2006 年梁可等^[5]建立鼻咽癌 CNE2 细胞分泌蛋白的双向凝胶电泳图谱,鉴定出 52 种细胞分泌蛋白质,并按功能和亚细胞分布对这些蛋白质进行了初步分类,为研究细胞分泌蛋白在鼻咽癌发生、发展中的作用打下基础。2007 年葛圣雷等^[6]采用新鲜鼻咽癌组织块贴壁进行细胞原代培养,经超滤法脱盐浓缩培养液上清,利用双向凝胶电泳技术得到细胞分泌性蛋白图谱,开展鼻咽癌分泌蛋白组学的研究。2021 年肖萍等^[7]利用流式细胞术及 Western blot 技术检测 Periostin 蛋白,发现 Periostin 蛋白的表达上调可以促进鼻咽癌细胞的凋亡;其促凋亡机制与鼻咽癌组织中 p53 蛋白表达上调无关。细胞分泌蛋白的结构、组分等与细胞的活性等密切相关^[8-9]。本研究进一步采用细胞分泌蛋白 SERS 技术研究不同类型鼻咽癌细胞的不同特性。

目前临床诊断的金标准依然是病理诊断,但是可能存在人为判定的误差。在本次研究中,SERS 光谱的直观显示以及 PCA-LDA 的数据分析,清楚客观地反映了 3 种细胞分泌蛋白的差异显著,提示可以通过分离细胞分泌蛋白来鉴别细胞病理类型,给临床诊断提供新思路。本团队在 2023 年发表的另外一篇文章中指出^[10]:将细胞分泌蛋白 SERS 检测方法结合 PCA-LDA 可检测出顺铂浓度差异达 1 $\mu\text{g/mL}$ 时的响应差异,可以用于评估不同顺铂浓度对鼻咽癌细胞的药物反应。细胞分泌蛋白的 SERS 光谱峰强度与顺铂浓度呈强相关性,证实了细胞分泌蛋白的 SERS 技术在化疗药物反应的高精度检测中具有巨大应用潜力。

由图 2 可知,CNE1、CNE2、NP69 的细胞分泌蛋白的 SERS 光谱主峰位置存在差异,说明 3 种细胞的代谢产物不同,结合 PCA-LDA 结果,利用 SERS 光谱的差异可以很好地区分出癌与非癌细胞,并区分出鼻咽癌细胞的不同分化程度。另一方面,针对光谱峰强度的统计分析指出,3 种细胞的分泌蛋白在特定峰位处存在显著差异,见图 3。根据拉曼谱峰归属^[11-12],SERS 峰 1 331 cm^{-1} 属于胶原蛋白的典型特征峰,即胶原蛋白三螺旋结构,SERS 峰 1 450 cm^{-1} 归属于蛋白质侧链的 CH_2/CH_3 弯曲振

动。一方面,胶原中富含甘氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸的主链和侧链可以贡献大量的 CH_2 ;另一方面,样本 SERS 光谱中 1 331 cm^{-1} 和 1 450 cm^{-1} 峰强度在 3 种细胞中的变化趋势基本一致。因此,细胞分泌蛋白中含有胶原的可能性极大。胶原是细胞外基质的主要成分,对肿瘤的侵袭、浸润和转移起到重要的调节作用。MD Anderson 癌症中心的一项研究指出^[13],肿瘤微环境中胶原蛋白的减少导致胰腺癌生长加快,以及小鼠整体存活率的显著降低。SERS 光谱显示,低分化鼻咽癌细胞 CNE2 分泌蛋白中胶原丰度显著低于高分化鼻咽癌细胞 CNE1 和鼻咽部上皮细胞 NP69。因此,CNE2 细胞的恶性表型可能与低丰度胶原直接相关。733 cm^{-1} SERS 峰归属于蛋白质侧链 C-S 伸缩振动。SERS 光谱提示鼻咽癌细胞的恶性表型与 C-S 伸缩振动的强度呈负相关。1 004 cm^{-1} SERS 峰归属于苯丙氨酸的对称环呼吸振动。SERS 光谱提示恶性程度高的鼻咽癌细胞中苯丙氨酸残基的“对称环呼吸振动”模式强度也更高。

综上所述,本研究中采用细胞分泌蛋白 SERS 技术,研究人高分化鼻咽癌细胞 CNE1、低分化鼻咽癌细胞 CNE2 和正常鼻咽细胞 NP69 自然状态培养 24 h 后的细胞分泌蛋白 SERS 光谱,进一步结合 PCA-LDA 对光谱数据进行降维和分类,结果表明,3 组细胞在拉曼峰位、峰强及峰形上均表现出明显差异,提示其分泌蛋白组成存在显著变化。PCA-LDA 模型显示出优异的分类能力,能够清晰地区分癌与非癌细胞,且在高分化与低分化鼻咽癌细胞之间也实现了有效分离。模型对高分化鼻咽癌细胞 CNE1 的识别灵敏度和特异性均超过 96%,分类准确率达到 98% 以上;对低分化鼻咽癌细胞 CNE2 的识别灵敏度和特异性均超过 95%,分类准确率达到 95% 以上,显示出良好的诊断性能,有望为鼻咽癌的病理分型提供一种非标记、快速便捷的新型辅助检测手段。

参考文献:

- [1] 谢民强.鼻咽癌治疗研究进展[J].中国耳鼻喉颅底外科杂志,2023,29(6):1-10.
- [2] Honda K, Hishiki T, Yamamoto S, et al. On-tissue polysulfide visualization by surface-enhanced Raman spectroscopy benefits patients with ovarian cancer to predict post-operative chemosensitivity[J]. Redox Biol, 2021, 41: 101926.

- [3] Teh SK, Zheng W, Ho KY, et al. Near-infrared Raman spectroscopy for early diagnosis and typing of adenocarcinoma in the stomach[J]. *Brit J of Surg*, 2010, 97(4): 550–557.
- [4] 钟华林, 李玲波, 覃焕桦, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路探讨虎杖苷诱导鼻咽癌细胞凋亡的初步研究[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2019, 26(10): 536–540.
- [5] 梁可, 肖志强. 人鼻咽癌细胞系 CNE2 分泌蛋白质谱的初步建立[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, 26(4): 277–282.
- [6] 葛圣雷, 朱纲华, 陈主初, 等. 鼻咽癌原代培养细胞分泌性蛋白图谱的初步研究[J]. *现代生物医学进展*, 2007, 7(8): 1200–1201, 1204.
- [7] 肖萍, 李通, 杨晓玉, 等. 间质蛋白 Periostin 高表达对鼻咽癌 6-10B 细胞凋亡的影响及可能机制[J]. *中南医学科学杂志*, 2021, 49(6): 621–625.
- [8] Zhi SM, Fang GX, Xie XM, et al. Melatonin reduces OGD/R-induced neuron injury by regulating redox/inflammation/apoptosis signaling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(3): 1524–1536.
- [9] Ma Z, Guo J, Zhang Y, et al. Neuromedin B regulates steroidogenesis, cell viability and apoptosis in rabbit Leydig cells[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2020, 288: 113371.
- [10] Wu F, Wu Z, Wang X, et al. High-precision detection of cellular drug response based on SERS spectrum and multivariate statistical analysis[J]. *Biosensors (Basel)*, 2023, 13(2): 241.
- [11] 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.
- [12] Fujita K, Ishitobi S, Hamada K, et al. Time-resolved observation of surface-enhanced Raman scattering from gold nanoparticles during transport through a living cell[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(2): 024038.
- [13] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I. Raman spectroscopy of biological tissues[J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2007, 42(5): 493–541.
- [14] Wu H, Volponi JV, Oliver AE, et al. In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(9): 3809–3814.
- [15] Chen Y, Kim J, Yang S, et al. Type I collagen deletion in α SMA+ myofibroblasts augments immune suppression and accelerates progression of pancreatic cancer[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(4): 548–565. e6.

(收稿日期: 2026-01-12; 网络首发: 2026-05-09)

本文引用格式: 吴烽芳, 吴志伟, 吴志圣, 等. 鼻咽癌细胞分泌蛋白的表面增强拉曼光谱技术研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2026, 32(3): 67–72. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202626011

Cite this article as: WU Fengfang, WU Zhiwei, WU Zhisheng, et al. Study on SERS technology of cellular secreted proteins of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2026, 32(3): 67–72. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202626011