

杨江,博士、教授、博士生导师,分别在浙江大学、英国利兹大学和美国威斯康 辛大学麦迪逊分校获得本科、硕士和博士学位。2013年至2018年先后在美国斯 坦福大学、哈佛大学和纪念斯隆-凯特琳癌症中心工作学习。入选中山大学"百 人计划"后于2019年1月全职回国,先后主持"十二五"计划、"十三五"计划、国 家自然科学基金、广东省自然科学基金等多个项目,参与国家重点研发计划,领 导完成一项IIb期美国FDA IND新药开发和临床试验。主要研究方向为分子影像 介导的诊疗一体化药物的研发和分子机制,在Nat Biomed Eng、Adv Mater、ACS Nano等国际知名杂志上发表论文超70篇,总引用次数超过1万次,H指数为37,单 篇引用>100共10余篇,多篇论文入选高被引论文、封面故事,获授权美国、国际 专利5项及中国专利4项。

基于表面增强拉曼散射的深层组织肿瘤活体成像 技术的研究进展

吴红* 肖莘芹* 胡羽君 杨江*

(华南恶性肿瘤防治全国重点实验室,广东省恶性肿瘤临床医学研究中心,中山大学肿瘤防治中心,广州 510060)

摘要 表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)作为一种高灵敏度、高 分辨率的光谱分析技术,在生物医学领域,特别是癌症的早期检测和非侵入性的活体成像中展现 出了巨大的临床应用潜力。生物组织中的光散射、自发荧光和光吸收效应的增强,显著影响了光 学成像技术在深层组织中的成像效果,进而导致了误诊和不完全的手术切除。随着分子影像的快 速发展,SERS探针因其高灵敏度、分子靶向性和多重检测的独特优势,受到广泛关注。近年来, SERS结合透射拉曼、近红外二区拉曼及空间偏移拉曼等具有组织穿透深度的技术获得了重要进 展,为非侵入性肿瘤活体成像提供了新思路和解决方案。该文回顾了基于SERS的深层组织活体成 像的最新研究进展,讨论了其在临床转化、多模态及诊疗一体化中的应用前景,并展望了未来的发 展方向,旨在促进其与临床医学的交叉融合,为癌症的早期诊断、手术导航和个体化治疗开辟新的 路径。

关键词 深层组织成像; 肿瘤活体成像; 表面增强拉曼散射; 近红外二区拉曼光谱; 空间偏移 拉曼光谱; 临床转化

#共同第一作者

收稿日期: 2024-11-28 接受日期: 2025-01-24

国家自然科学基金(批准号: 52271196、82472041)、中山大学高校基本科研业务费(批准号: 31610026)和中山大学肿瘤防治中心青年人才提升计划(批准号: YTP-SYSUCC-0024)资助的课题

^{*}通信作者。Tel: 020-87343292, E-mail: yangjiang@sysucc.org.cn

Received: November 28, 2024 Accepted: January 24, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.52271196, 82472041), the Fundamental Research Funds for the Central Universities at Sun Yat-sen University (Grant No.31610026), and the Young Talents Program of Sun Yat-sen University Cancer Center (Grant No.YTP-SYSUCC-0024)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-20-87343292, E-mail: yangjiang@sysucc.org.cn

Recent Advances in SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) for Deep-Tissue *In Vivo* Cancer Imaging

WU Hong[#], XIAO Xinqin[#], HU Yujun, YANG Jiang^{*}

(State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Cancer, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

Abstract SERS (surface-enhanced Raman scattering), as a highly sensitive and high-resolution spectroscopic analytical technique, has demonstrated tremendous clinical application potential in biomedicine, particularly in early cancer detection and non-invasive *in vivo* imaging. However, the effects of light scattering, autofluorescence, and absorption in biological tissues significantly impair the performance of optical imaging techniques in deep tissues, leading to misdiagnosis and incomplete surgical resection. With rapid advances in molecular imaging, SERS probes have attracted widespread attention due to their unique advantages of high sensitivity, molecular targeting, and multiplexing capabilities. In recent years, the combination of SERS with emerging specialized Raman techniques such as transmission Raman, near-infrared-II Raman, and SORS (spatially offset Raman scattering) has achieved significant progress in cancer imaging. Such advancements provide new insights and feasible solutions for non-invasively imaging tumors buried deep in tissues. This review comprehensively overviews the latest developments in SERS cancer imaging in living subjects and discusses their application prospects in clinical translation, multimodal imaging, and theranostics. Furthermore, future research directions are envisaged to focus on interdisciplinary and clinical investigations. The aim is to pave new paths for early cancer diagnosis, surgical navigation, and personalized therapy, ultimately improving patient outcomes.

Keywords deep-tissue imaging; *in vivo* cancer imaging; surface-enhanced Raman scattering; NIR-II (nearinfrared second window) Raman spectroscopy; spatially offset Raman spectroscopy; clinical translation

癌症作为全球最常见的严重高发疾病之一,已成 为重大公共卫生挑战。根据国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)的最新统 计数据,2022年全球新增癌症病例约为2000万例,癌 症相关死亡人数达970万例^[1]。预计到2050年,全球新 增癌症病例将超过3 500万例,较2022年的估计数增加 77%[1],这一增长趋势主要归因于吸烟、超重、肥胖 及感染等高危因素。目前,临床上常用的无创术前诊 断和评估手段包括X射线计算机断层扫描(computed tomography, CT)^[2]、正电子发射断层扫描(positron emission tomography, PET)^[3]和磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)^[4]。术中荧光成像利用荧光 染料和特定波长光源,在手术过程中实现实时可视化 组织解剖和病理特征,能够帮助外科医生准确识别和 定位肿瘤、血管和淋巴结等关键结构,提高手术精确 性,减少并发症并改善患者预后。然而,上述影像学 技术均存在成本高昂、设备庞大、造影剂有一定毒 性、特异性不高,以及在实时术中引导受限等问题, 难以满足对癌症早期、精准、动态监测和术中导航

的临床需求。其中,术中光学成像由于荧光信号穿透 深度有限,难以可视化深层组织,且易受到组织自发 荧光的干扰。而表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)由于其独特的分子特异性指 纹图谱、超高的多重检测能力^[5-6]、卓越的灵敏度^[7], 以及对水和光漂白不敏感等优势,近年来在生物医学 领域取得了显著进展^[8-9]。

SERS衍生的尖端增强拉曼散射(tip-enhanced Raman scattering, TERS)在相应波长的激发下,将等离子 体共振的探针尖端和扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscopy, STM)配置联合运用,实现高空间分 辨率和高灵敏度检测,能将传统共聚焦拉曼的分辨率 从250 nm提高到50 nm或更佳。ZHANG等^[10]展示了 SM-TERS的高空间分辨率的成像图像,其空间分辨 率可以达到0.5 nm。然而,TERS受技术原理限制,局 限于对固体表面的原位测量,目前仅应用于活细胞成 像^[11]。与此同时,TERS的金属尖端使用寿命有限,有 的材料使用寿命仅有几小时,且由于TERS尖端距离 不均一,可能产生伪影,给TERS的广泛应用带来了不 便。时间分辨共振拉曼光谱(time-resolved resonance Raman spectroscopy, TR³ S)则将时间分辨和共振拉曼 光谱技术相结合,使用飞秒或者皮秒级别的超短脉冲 作为激发光源,并利用时间分辨探测器,记录分子的 演变过程,同时利用共振效应提高特定检测分子的拉 曼信号强度,从而达到超短时间和高灵敏检测目标分 子的目的^[12]。随着纳秒和皮秒时域的发展, TR³ S已 成功应用于检测众多化学和生物系统中产生的短寿 命反应中间产物^[13]。TR³S的特性使其更适用于瞬时 的化学反应检测、动力学分析、分子的结构变化检 测、能量变化检测等。受激拉曼散射(stimulated Raman scattering, SRS)与传统的拉曼光谱不同,它是一种 非线性的光学成像技术,并且可以将拉曼信号增强几 个数量级,且不需要SERS衬底来增强拉曼信号。另 外,SRS显微镜还具有高速、高分辨率、高灵敏度等 优势。SRS需要两束激光(泵浦和斯托克斯)同时激发, 泵浦能量减少,导致斯托克斯能量增加。SRS显微镜 由于光毒性低和不受非共振背景影响等优势,在生物 医学成像中得到了广泛应用,然而在活体成像中也受 限于组织穿透深度的不足^[14]。WEI等^[15]运用了一种组 织透明化的方法,将SRS的成像深度增加了10倍,实现 了约1mm深度的小鼠脑肿瘤成像。相干反斯托克斯 拉曼散射(coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) 也是一种非线性的拉曼技术,指泵浦激光和斯托克斯 激光照射到物体上,产生频率差,与分子的振动频率 相匹配,通过三阶非线性过程在反斯托克斯频率下产 生显著增强的CARS信号。尽管CARS的信号强度优 于自发拉曼散射,但其在反斯托克斯频率下产生的非 共振背景显著限制了其进一步的实际应用。这种背 景信号并非由目标分子振动所产生,而是独立于激光 频率调谐,并取决于样品几何结构和局部浓度。因此, 在生物样本等复杂系统中,它可能会导致成像结果 出现伪影[16]。傅里叶变换相干反斯托克斯拉曼散射 (Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering, FT-CARS)则将傅里叶变换光谱的原理与CARS相结 合,可在每秒的时间范围内收集近万条拉曼光谱,同 时过滤掉非共振背景下产生的干扰信号[17],从而进行 细胞分选、细胞多路复用分析、生物成像、化学分 析等。ISOBE等^[18]利用FT-CARS对HeLa细胞几种亚 结构进行定位测定。相较于上述拉曼技术, SERS对仪 器硬件和算法的要求简单、成本较低、适用性更广, 最关键的是 SERS纳米颗粒可以作为药物注射到活体 中,实现疾病的诊断和治疗。此外,在高灵敏度SERS 基础上,可设计共振进一步增强拉曼信号,由此得到 的表面增强共振拉曼(surface-enhanced resonance Raman scattering, SERRS)影像探针, 在拉曼肿瘤成像中展 现出巨大的潜力,其检测限可达到飞摩尔(femtomolar) 甚至埃摩尔(attomolar)级别^[19]。然而,当前合成的拉曼 探针在近红外区域的波长范围有限,这将组织的穿透 深度限制在毫米级别,将可能导致深层肿瘤信号的漏 检,造成手术切除不彻底,进而增加肿瘤复发的风险。 因此,开发无损、非侵入性且具有更大组织穿透深度 的拉曼成像技术显得尤为迫切。空间偏移拉曼光谱 (spatially offset Raman spectroscopy, SORS)^[20]、透射拉 曼光谱(transmission Raman spectroscopy, TRS)^[21]以及近 红外二区(NIR-II, 1 000~1 700 nm)拉曼光谱^[22]等先进 的拉曼技术在深层肿瘤成像中展现出了显著优势(图 1)。

本文首先介绍了SERS的基本原理及其在生物成 像中的独特优势,包括高信噪比、分子特异性和多重 检测能力,探讨了如何利用近红外二区、空间偏移和 透射拉曼等方法来提高在深层生物组织中的穿透深 度,从而实现了有效成像。接着,我们重点讨论了用 于深层组织成像的SERS纳米探针的设计与合成策略, 涵盖了表面功能化修饰以及生物相容性改良。随后, 文章综述了基于 SERS 的技术在临床转化、高通量检 测、多模态成像及诊疗一体化等方面的应用前景,并 介绍了其在肿瘤的发现、实时监测和疗效评估等方 面的最新进展,特别强调了多模态成像的整合,如将 SERS与其他影像技术相结合,进一步提高了深层组 织成像的总体灵敏度和分辨率。最后,我们总结了 当前 SERS技术在深层组织体内癌症成像中面临的挑 战,包括信号衰减、组织散射、生物安全性、稳定性 和临床转化等问题。针对这些挑战,我们提出了可能 的解决方案,如开发新型高效安全的SERS活性基底、 优化探针的光学和生物学性能,以及加强基于SERS 的成像与临床医学、人工智能等领域的交叉融合,并 对未来发展方向进行了展望。

1 拉曼成像背景介绍

拉曼现象最早由印度物理学家Chandrasekhara Venkata RAMAN^[23]于1928年通过实验发现(图2)。他在光 散射领域的开创性研究为其赢得了1930年的诺贝尔 物理学奖。大多数光与物质的相互作用以弹性散射



Fig.1 Schematic diagram of deep-tissue Raman imaging (prepared by BioRender.com)

(瑞利散射)为主,即入射光子与散射光子之间不发生 能量交换,因此拉曼散射信号在目标物体中的检测灵 敏度较低。此外,许多样品,尤其是生物样品的拉曼 散射截面较小,限制了该技术在多个领域的进一步应 用。

基于上述发现, 1977年, VAN DUYNE等^[24]提出 了异常增强的拉曼信号归因于拉曼散射效率的显著 提升,这一现象被称为表面增强拉曼散射,即SERS。 SERS的增强机制分为电磁增强(electromagnetic enhancement, EM)和化学增强(chemical enhancement, CM)^[25-26]。在电磁增强机制中,贵金属纳米颗粒中 的自由电子与入射光子的振动频率产生共振,即局 域表面等离子体共振(localized surface plasmon resonance, LSPR),从而吸收光子能量并显著增强局部电 磁场^[27]。金属纳米颗粒之间的"热点"区域场强增强 因子(enhancement factor, EF)可达到10¹¹。化学增强 则源于吸附分子与金属粗糙表面之间的电荷转移, EF可以达到10¹~10^{3[28-29]}。随着医学影像技术的进步 和未满足的临床需求加大, SERS作为新兴的活体成 像技术受到了广泛关注,其中,金纳米结构由于合成 方法简单、生物安全性高、比表面积大、光学特性 可调控以及易于进行表面功能化等优点,得到了广 泛的深入研究^[30]。

目前,SERS已广泛应用于化学传感、生物检测、 手术导航和肿瘤诊断等领域。2008年, SERS纳米颗 粒(nanoparticles, NPs)首次应用于活体小鼠深层组织 的无创成像^[31]。近年, SERS NPs被用于超敏微小肿 瘤病灶的检测,有助于早期发现肿瘤并在手术中准 确界定肿瘤边缘^[32]。然而, SERS极大地受限于组织 穿透深度不足,为了解决此问题,MATOUSEK等^[20] 首次提出了空间偏移拉曼光谱(spatially offset Raman spectroscopy, SORS)的概念。SORS是一种无创的光 '谱检测技术,能够探测不透明样品深层的拉曼信号。 同时,金属纳米颗粒产生的SERS效应能增强SORS 在肿瘤成像中的检测信号,由此构建表面增强空间 偏移拉曼光谱(surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy, SESORS), 将 SERS的高灵敏度与 SORS 的组织穿透深度优势结合,能有效改进肿瘤的可视 化、微病灶侦测和肿瘤切缘的高精度勾勒。TRS作 为SORS的一种特殊模式,其激光激发区域位于浑浊



Fig.2 Timeline of key historical milestones and discoveries in Raman spectroscopy

样品的表面,信号收集区域在样品的背面,这种设计方便了对大体积样品的测试。此外,采用长波长的激发光有助于降低组织自发荧光的干扰,减弱组织的光散射效应,有助于深层组织的肿瘤成像。将光谱波长从近红外一区(NIR-I, 700~900 nm)窗口范围延伸至近红外二区(NIR-II, 1 000~1 700 nm),有助于进一步提高成像深度和信噪比^[38]。

2 用于活体成像的SERS探针

用于活体成像的SERS探针通常由以下部分 组成:(1)具有LSPR效应、可显著增强SERS信号 的核心或壳结构,一般多为如金、银、铜、铝等 贵金属; (2) 拉曼报告分子, 用于提供区别于生物 体内的特异性拉曼信号; (3) 拉曼报告分子保护层, 如二氧化硅、红细胞膜、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)等具有良好生物相容性的材料^[39-41], 用以增加生物相容性、降低毒性、保护拉曼报告 分子并维持稳定信号; (4) 靶向性分子标记, 为了 实现对特定肿瘤表型的主动靶向, SERS探针通常 通过表面功能化修饰抗体、适配体、DNA、肽或 叶酸等分子,从而实现针对标志物的特异性成像。 与传统的抗体靶向相比,低免疫原性和低生产成 本的适配体靶向是一种可行的替代方案^[42]。例 如, PAL等^[43]设计了针对黏蛋白1(mucin 1, MUC1) 的适配体拉曼影像探针,可主动靶向MUC1过表 达的乳腺癌细胞。同时,由于SERS探针本身的多 重检测能力, DNA适配体作为靶向分子有望用于 针对不同分子分型癌症的多重活体成像^[32]。MU-RALI等^[44]在金纳米颗粒表面修饰了抗体,以评估 临床相关的乳腺癌生物标志物——雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2), 在单 个组织样本上实现了单重、双重和三重生物标志 物的快速检测,从而最大限度地减少了假阴性和 假阳性结果。结果显示,单重生物标志物的灵敏 度和特异性分别达到95%和92%,双重生物标志物 达到88%和85%, 三重生物标志物为75%和67%。 此外,也有研究表明可以利用抗MUC18的单链抗 体(scFv)来修饰笼状金纳米结构(gold nanocages, AuNCs),构建多功能的诊疗一体化纳米探针,从 而实现特异性靶向恶性黑色素瘤细胞的诊疗[44]。 另一个类似的例子则将环状多肽连接到红细胞 膜包裹的金纳米颗粒表面, 靶向肿瘤细胞表面的 αvβ3整合素受体从而进行SERS检测^[40]。综上所述, SERS探针的设计与合成在肿瘤成像中发挥着关键 作用。通过优化探针的物理化学性质、表面功能 化和生物相容性,可以实现对目标肿瘤的高灵敏 度和高特异性检测,为早期诊断和个体化治疗提 供了有力工具。

3 SERS的癌症诊断应用

3.1 非侵入性光谱检测

由于SERS的激发和探测器通常位于皮肤或其

他组织表面,因此SERS是一种非侵入性技术。目前, 已有多项研究利用各种 SERS 探针和方法成功实现 了术中成像,在影像引导下精确地描绘出脑胶质瘤 的边界并拟定切缘,实现对肿瘤组织的高灵敏度识 别^[45-47],为神经外科医生在手术中切除肿瘤提供了 重要的影像支持,显著提高了手术的准确性和安全 性。另外,研究人员最近开发了一种微型光谱内窥 镜,结合多重受体靶向的SERS探针,在原位食管癌 动物模型中实现了快速、高效的成像,显著提高了 早期诊断的灵敏度和特异性[48]。该方法的优势在 于能够在内窥镜检查过程中实现实时检测,从而降 低了患者的痛苦和活检风险。结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的早期准确筛查对于改善患者预后至 关重要,然而现有的诊断技术通常具有侵入性,并 伴随一定的并发症风险。为解决这一问题, JO等^[49] 设计了一种涂覆金纳米多面体的针式SERS传感器, 并将其与内窥镜系统集成,实现了非侵入式的直接 黏液采样和无标记检测。同时,通过基于逻辑回归 的机器学习算法,他们成功区分了CRC患者与正常 对照组,达到了100%的灵敏度、93.33%的特异性和 96.67%的准确度。SERS传感器辅助的内窥镜技术 有望在未来推动CRC的早期筛查与诊断,降低疾病 的发病率和死亡率。此外, LEE等^[50]利用直径仅为 1.2 mm的小型内窥镜,成功监测了大鼠膀胱癌的分 期和息肉样肿瘤的发展,将SERS技术与机器学习算 法结合后, 在早期诊断和息肉期膀胱肿瘤的检测中 达到了≥99.6%的准确率。基于上述发现,将内窥 镜的无创检测与先进的机器学习算法相结合,这种 多学科交叉的策略可以显著提升癌症检测的准确 性和效率,减少侵入性操作对患者的影响,促进精 准医学的发展,为临床提供可靠依据和全新思路。

3.2 微小肿瘤病灶影像学示踪

近年,SERS在肿瘤活体成像方面取得了显著 进展。自2006年首次应用于体内检测以来,SERS成 像逐渐成为医学影像和生物传感的重要工具^[51-52]。 拉曼探针通过被动靶向,即增强渗透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR),或 针对特异性肿瘤标志物的主动靶向机制,在肿瘤部 位实现高效富集。与其他成像技术相比,SERS具 有在单细胞灵敏度水平上检测微小肿瘤病灶的独 特优势,使其在辅助手术切除残余肿瘤和淋巴结转 移灶方面展现出巨大优势。传统光学成像受限于 分辨率和灵敏度,可能无法完全识别并切除肿瘤组 织,从而增加了肿瘤复发和转移的风险。利用整合 素靶向的SERRS纳米颗粒^[56],研究者在胶质母细胞 瘤(glioblastoma multiforme, GBM)小鼠模型中,准 确描绘了肿瘤的范围,且成像结果与病理学染色结 果高度吻合。由于其极高的检测灵敏度, SERRS能 够检测到远离主肿瘤区域的细微迁移路径,直径仅 为2~3个细胞,甚至能有效识别少于5个细胞的远处 肿瘤细胞簇。此外,高灵敏度SERRS星状金纳米探 针在胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌和肉瘤等其他癌 种的动物模型中,也实现了宏观和微观恶性病变的 高精度成像[53-55],展示出对肿瘤边缘、微小转移灶 和多灶性肿瘤扩散的良好成像效果,支持了完整的 手术切除策略。WEN等[56]利用手持式拉曼光谱仪 描绘了肿瘤边界,成功识别了多个残余肿瘤灶和卫 星微小肿瘤转移灶。OSELEDCHYK等^[32]采用靶 向叶酸受体的 SERRS NPs进行多重比率成像,极大 地提高了诊断的特异性,能检测到小至370 μm的肿 瘤灶。叶酸受体靶向性 SERRS NPs的影像学结果 与生物发光成像和组织病理学染色结果吻合。此 拉曼成像技术有望在手术过程中有效检测微观残 余肿瘤,降低卵巢癌和其他腹膜播散性疾病的复发 率。此外, QIU等^[57]制备了一种间隙增强的拉曼探 针(gap-enhanced Raman tags, GERTs), 其具有高灵 敏度、光稳定性和光热效应,准确检测并消除了手 术切除过程中残留的微小病灶,确保了动物模型中 100%的存活率。该研究利用小鼠皮下肿瘤模型,虽 然能通过GERTs材料的SERS增强功能检测到肉眼 可见的肿瘤和微小肿瘤灶点,但针对的主要是浅表 肿瘤。尽管如此,该研究在提高诊断准确性和降低 肿瘤复发率方面显示出潜力,为相关技术的发展提 供了实验依据,并有望推动诊疗一体化。然而,对 于深层组织肿瘤, 拉曼活体成像仍需结合具有更深 穿透深度的技术,如SORS、TRS和NIR-II等。

4 深层组织拉曼活体成像面临的挑战

当前,基于光学的肿瘤成像面临诸多挑战,生物 组织的自发荧光、光散射、光吸收是亟需解决的关 键问题。在活体中定位并检测深层隐匿的肿瘤病灶、 准确描绘肿瘤边界及微小转移灶,对提升手术成功率 具有重要意义。尤其在早期肿瘤阶段,肿瘤位置往往 深且体积较小,难以通过表面检查或浅表成像技术进 行有效筛查。因此,深层肿瘤成像技术的开发尤为紧 迫。传统的临床成像手段存在电离辐射、分辨率不足、 穿透深度有限、难以实现术中实时快速成像等问题。 而TRS、SORS、NIR-II等拉曼成像技术在规避生物 组织自发荧光、减少光散射和光吸收的干扰等方面 具有潜在优势,为深部肿瘤成像提供了可行方案。通 过将SERS高敏探针与TRS、SORS、NIR-II等拉曼技 术相结合,可进一步提升对深层肿瘤的成像能力,为 精准诊断和治疗带来更优的解决途径。

5 TRS

TRS技术的可行性已获得验证,近年来,其在 生物医学领域获得了快速发展,并被广泛应用[58-59]。 TRS被认为是SORS的一种特殊配置。与传统的背向 散射拉曼模式相比, TRS更适合于浑浊介质中的物质 探测。TRS降低了来自表面层的背景噪声并提高了 来自深层的信噪比(signal-to-noise ratio, SNR), 大大增 加了检测深度,可以达到几厘米,相比背向散射模式 (毫米)有显著的改进^[60]。这种非侵入性的、无损成 像方式,其激发光和拉曼收集区分别位于样品的两 侧,利用被检测样品中的漫散射,可以测到深度达几 厘米的拉曼信号,是深层组织成像的关键技术之一。 GHITA等^[61]探讨了在大体积深层组织中使用 TRS进 行检测的最优激发波长,以最大化乳腺组织深层拉曼 光谱的灵敏度,实现了4~5 cm的扫描深度,并在活体 乳腺组织中获取了具有临床预后相关的钙化信息,为 临床转化应用提供了解决方案。STONE等^[62]则展示 了一种优化的TRS技术,能够在哺乳动物组织中检测 和识别深度达2.7 cm的临床相关钙化物,通过对厚度 为0.9 mm的不同类型乳腺切片的研究,他们成功获取 了I型和Ⅱ型钙化物的分型信息,为乳腺癌的早期诊断 提供了有力的数据支持。此外,早前的TRS拉曼仪器 也能够在4 cm深的软组织中检测到与患者样本中钙 化深度相似的病变,并展示了区分良性与恶性乳腺组 织的潜力[62]。这一成果得益于增大光斑尺寸以提高 入射激光功率, 增宽狭缝以提升光谱仪的效率, 以及 采用高色散光栅来提高光谱分辨率,有助于推动该技 术向临床转化,目前已进入人体试验阶段[63]。

5.1 SERS联合TRS拉曼成像

由于拉曼散射本身就是一种很弱的信号,加之 样品厚度等因素的影响,当激光照射到物体上,再经 过深层信号转导后,组织的吸收和散射会导致信号 变弱甚至丢失,因此引入外部增强策略显得尤为重要。GARDNER等^[63]的研究指出,在利用TRS技术进行组织成像时,在探测深度达到几厘米时,通常会产生自衰减伪影。因此,SERS探针的高灵敏度和特异性,再结合TRS的组织穿透深度,使表面增强透射拉曼光谱(surface-enhanced transmission Raman spectroscopy)成为一种有效的检测手段。

近期,通过不断优化TRS技术,并结合SERS探 针的高灵敏度和增强特性,在深层组织检测方面取 得了显著进展。成年人的背腹部厚度约为22 cm^[64]。 ZHANG等^[65]研究者成功地在厚达14 cm的离体生物 组织中实现了对 SERS探针的 TRS检测,这一厚度已 接近成人背腹部的实际厚度。此外,也有学者通过 利用拉曼峰强度比的自然对数与病变深度之间的线 性关系,建立了一种具有临床安全辐照度的自制TRS 系统^[66]。该系统利用SERS颗粒标记深层生物组织中 的病变,成功在离体条件下准确检测到隐藏在6 cm 厚度均质组织及5 cm厚度非均质组织中的病变。这 项快速、稳健的检测技术,为异质性肿瘤的临床诊 断和治疗提供了深层组织定位的新手段,具有一定 的临床转化潜力。BPT染料标记的 SERS纳米探针结 合TRS成像,可以在7.1 cm的生物组织中检测到小鼠 肿瘤,这一结果刷新了在活体深层组织中的检测记 录。与此同时,该检测深度与某些浅表型人源肿瘤(如 乳腺癌、头颈癌和前列腺癌等)的典型深度一致,体 现了其潜在的临床转化价值^[60]。ZHANG等^[65]则运 用TRS技术,在安全的MPE下,成功在1.5 cm厚的未 剃毛小鼠体内实现了深层肿瘤的无创活体成像。

5.2 局限性和未来发展趋势

TRS与SORS的主要区别在于:SORS可区分 不同深度层次的拉曼信号,而TRS则提供整个样品 的平均拉曼信号。这使SORS在检测乳腺癌和前 列腺癌方面更具优势。由于TRS成像原理的限制, 该技术适用于样品两侧均可接触的情形,且样品 厚度必须在拉曼信号检测的极限范围内。优化激 光功率、波长和探测器灵敏度,能提升TRS对深层 组织的检测能力,但目前的TRS技术尚未完全突破 临床的厚度限制。此外,光子在TRS中的传播机制, 以及信号受测量因素影响的具体机制尚未被完全 解析,未来需建立更精确的光子传输模型,理解光 子在组织中的散射和吸收行为,以改进信号解卷 积算法。

6 NIR-II拉曼成像

SERS在生物医学中的应用,主要集中在可见光 (200~700 nm)和近红外一区(NIR-I, 700~900 nm),由 于这两个区域具有强烈的组织吸收和自发荧光,使 组织的穿透深度限制在毫米级别。因此,将近红外 一区延伸到近红外二区,来降低组织本身的荧光信 号,提高组织穿透深度,是生物医学活体成像中的可 行策略。近年来,关于NIR-II(1 000~1 700 nm)拉曼成 像在癌症诊断、肿瘤边缘可视化等方面的研究取得 了一定的进展^[67]。尽管NIR-II具有很强的组织穿透 能力,但其检测灵敏度仍然有限,同时其使用功率也 大大受限于高发热。结合SERS探针的高灵敏度及肿 瘤靶向性,与NIR-II的低光散射、低组织吸收、低荧 光背景等优势,有望实现活体深层组织的肿瘤成像。

6.1 降低生物体组织光散射、吸收和自发荧光背景

目前 SERS在近红外窗口的成像和诊断方面已 取得一定进展。然而,组织的自发荧光以及高光子 散射和吸收率显著降低了光在组织中的穿透深度, 影响了对深部肿瘤和其他疾病的诊断。随着生物 样本厚度的增加, 信噪比不可避免地降低, 这一现 象在紫外和可见光区域(200~700 nm)尤为明显^[68]。 紫外或近红外一区(NIR-I)波长的激光与组织内部 的荧光基团发生相互作用,也会部分掩盖深层组织 的信号。因此,延长激光波长可以有效减弱来自生 物体组织的光散射和吸收,降低组织自发荧光信号 的干扰,从而增加拉曼检测的深度。相比之下,利 用NIR-II区(1 000~1 700 nm)的激发光, 不仅能够减 弱组织的自发荧光,还能减少光在组织中的吸收和 散射,提高光子在组织中的穿透深度。这对于深部 组织成像和诊断具有重要意义。随着新型NIR-II拉 曼报告分子和高效拉曼增强材料的开发, SERS在深 层组织成像中的应用前景更加广阔。这些研究进 展有望推动SERS在临床中的应用,如肿瘤识别、肿 瘤组织边缘及早期微小肿瘤灶的勾勒、精准手术 导航和个性化治疗,并提供可行的解决方案[67]。

6.2 激光安全性

活体 SERS成像面临的另一个重要挑战是激 光安全性问题,激光的使用需要在安全剂量范围内 进行,以避免对正常组织造成不必要的损伤。根据 美国国家标准协会(American National Standard for Safe Use of Lasers, ANSI)制定的《美国国家激光安 全使用标准》,最大允许暴露量(maximum permissible exposure, MPE)被定义为可能入射到人眼或 皮肤上而不引起任何不良生物效应的最大辐照度 或辐射曝光量^[69]。在手术过程中应用激发光时,激 光功率必须不高于MPE(≤MPE), 以避免潜在的组 织损伤。然而,当前几乎所有用于活体 SERS 成像 仪器的激光功率均超过了这一安全标准[70-72]。尽 管通过直接降低激光功率密度或缩短曝光时间可 以达到MPE标准,但并未取得理想效果,因为SERS 的信噪比会随之显著降低,影响成像质量^[73]。与常 规的NIR-I相比, NIR-II拉曼成像的MPE限制更为 宽松。例如,在曝光时间均为10秒的情况下,临床 批准1 064 nm激光的皮肤MPE标准为10.0 J/cm², 而 785 nm激光仅为3.0 J/cm²。这表明 MPE在很大程 度上取决于激光的波长、功率密度和曝光时间[69]。 为了解决SERS激光安全性的问题,将成像窗口移 至NIR-II区是一种可行的策略。NIR-II窗口区具有 卓越的光安全性、更高的MPE限值、更深的组织 穿透能力、较低的组织自发荧光背景以及更高的 空间分辨率等内在优势,使NIR-II在满足安全标准 的前提下,仍能提供高质量的深层组织成像[74]。因 此,开发超高亮度的NIR-II拉曼探针成为当前研究 热点。最近, DENG等^[84]设计了一种超高灵敏度的 NIR-II SERS纳米探针,并成功将其应用于临床前 大动物模型中,精准识别了乳腺癌相关的前哨淋巴 结(sentinel lymph node, SLN)。由此, 激光辐照度 降低至MPE的12.5%, 大大提高了拉曼经皮检测的 激光安全性,同时仍然维持了高信噪比的成像信 号。这一成果表明, NIR-II区SERS纳米探针在满足 激光安全要求的前提下,具备深层组织高灵敏度成 像的潜力。

6.3 局限性和未来发展趋势

与NIR-I光学成像的穿透深度(<1 cm)相比,NIR-II光学成像展现出更高的时空精度、高灵敏度及深层 组织穿透能力,最高可达3 cm。然而,NIR-II成像技术 在生物组织中的穿透深度仍不足以检测更深层的病 变。为了解决这一问题,有必要进一步红移NIR-II的 激发波长以及等离子体材料的吸收峰至II^b或II^c区,以 提高光在组织中的穿透深度。此外,结合不同的光学 成像模式可以发挥各自的优势。例如,可结合光声成 像(photoacoustic imaging, PAI)的穿透深度进行肿瘤的 三维可视化,继而使用 SERS的高灵敏度在手术过程 中实时可视化微小肿瘤灶^[56,75]。同时,多模态成像策 略有助于克服单一成像技术的局限性,提供更全面和 准确的诊断信息。为了提高生物相容性并实现NIR-II等离子体纳米材料的主动靶向能力,可以采用表面 改性和功能化的方法。例如,仿生修饰已成为促进靶 向递送的有效策略^[76]。将肿瘤靶向分子(如抗体、多 肽和核酸)与NIR-II等离子体材料结合,可实现高效的 肿瘤靶向递送。此外,细胞膜包被技术也可能在未来 研究中成为促进靶向递送的一种有前景的方法。目 前,NIR-II SERS探针的肿瘤递送策略主要依赖于EPR 效应,然而,这种递送方式的效率有限,且探针通过肝 胆系统代谢清除的速度较慢。因此,未来的研究应侧 重于两方面:一是提高SERS探针的肿瘤递送效率,二 是将 SERS探针设计为可在体内有效降解或通过肾脏 代谢有效排出的形式,从而最大限度地减少其体内滞 留,从而降低潜在的生物毒性。

7 SORS拉曼检测

2005年, MATOUSEK等^[20]首次提出了SORS的 概念,该技术成功应用于经皮肤表层人体骨骼的分 析[77]、乳腺组织中的肿瘤钙化检测[78]以及其他疾病 的诊断研究。SORS仪器的设计特点是将光源和探 测器空间分离,利用生物组织的光散射特性,使来 自深层的光子能够传播到远离激发区域,从而有效 地抑制表层产生的背景信号,提升深层信号的SNR。 在安全的激光照射强度下, MATOUSEK团队^[79]首次 实现了对皮肤深层骨组织的拉曼光谱检测。这一突 破性成果揭示了 SORS 在临床深层组织成像中的巨 大应用潜力。乳腺钙化的分型对于区分良性和恶性 乳腺病变具有重要意义,而SORS技术能够非侵入 性地区分I型和II型钙化, 检测深度可达厘米级别^[80]。 相比之下, 传统的乳腺X射线摄影因灵敏度不足, 通 常需要结合组织活检才能确诊乳腺病变, 而SORS技 术不仅实现了无创检测,还减少了电离辐射和活检 对患者造成的不必要伤害。

7.1 SERS探针结合SORS

单纯依靠 SORS成像仍难以实现高灵敏度地检测深层组织中的微肿瘤灶,因此应用具备指数级别 拉曼信号放大的 SERS探针是进一步实现 SORS活体 肿瘤成像的一种可能方案。NICOLSON等^[81]构建 了一种三维多细胞球 (three-dimensional multicellular tumour spheroids, 3D MTS)模型来模拟乳腺肿瘤,借 助手持式 SORS光谱仪,成功检测到了深度达1.5 cm

的SERS探针信号。此外,同一课题组还开发了具备 多重检测能力的探针,首次在乳腺癌模型中实现了 1 cm深度的SORS多重成像^[82]。随后,结合了SERRS 和SORS的SESORRS技术首次成功应用于小鼠脑肿 瘤的拉曼活体成像^[73]。SESORRS结合了SERRS的 高灵敏度和SORS的深层组织穿透能力,显著提升了 穿透深度,可以透过颅骨成像。SESORRS涉及表面 结合的染料分子,其电子跃迁与激发激光频率相匹 配,产生共振效应,从而大幅提高灵敏度并增强穿透 深度^[83]。SESORRS的一个重要优势在于其体内非 侵入性检测和监测肿瘤的能力,为术中手术指导和 临床前诊断提供了坚实的基础。

7.2 局限性和未来发展趋势

在进行拉曼成像时,必须选择适当的激光波长, 以尽量减少组织的荧光干扰和避免拉曼光谱特征峰 的重叠,不匹配的激光波长可能导致深层组织的信 号被完全掩盖。然而,过长的波长可能降低拉曼散 射的效率,影响信号强度。因此,在灵敏度和穿透深 度之间找到平衡点是未来研究的重点。目前常用的 拉曼活体成像激光波长包括785 nm和830 nm。然而, 在实际应用中,研究人员在模拟深部成像时,目标物 的深度通常是已知的,但在实际临床中,肿瘤或病变 组织的深度和位置常常不可预知,目标物深度的未 知性增加了成像的复杂性,这对精确成像和诊断提 出了更高要求。为了解决这一问题, MOSCA等^[21]通 过改进数据处理和算法,将目标位置预测的精确度 提高了10%。开发先进的算法和数据处理方法,是 未来重要的研究方向,有望提高深部组织中目标物 的定位精度,促进SORS技术在临床诊断中的应用。 此外,信号弱化和噪声干扰也是需要解决的问题。 随着成像深度的增加, 拉曼信号会显著减弱, 而背景 噪声可能对信号产生干扰。为此,提升拉曼信号的 EF, 开发更高效的SERS纳米探针, 以及改进信号处 理技术,都是可行的解决方案。

8 现状与瓶颈

8.1 SERS探针的生物安全性

生物安全性是临床转化最需要关注的关键因素。确保SERS探针的生物相容性,减少潜在的毒性, 以及满足临床应用的监管要求,都是推动该技术从 实验室走向临床的必要条件。尽管取得了显著的进 展,但活体SERS成像的临床转化仍面临着重大的安 全性挑战,主要体现在生物安全性方面。在近期的研 究中, SERS探针的体内成像通常需要通过静脉注射 将其引入体循环,随后在目标部位富集。然而,纳米 颗粒在非靶向组织(尤其是肝脏和肾脏)中的积累可 能引发潜在的生物安全问题,例如毒性反应和长期滞 留,从而限制其在临床应用中的进一步发展。因此, 对于造影剂而言,实现病灶或靶器官的高效富集,同 时最小化在非靶器官中的滞留,并在诊断和成像后能 够方便地被手术切除或通过代谢途径清除,是显著减 少纳米探针相关生物安全问题的关键策略之一。此 外,改变给药途径,将SERS探针直接注射至目标部位, 可以显著降低全身循环带来的毒性,进而提高生物安 全性。例如,在一项研究中,研究者将探针皮下注射 到恒河猴的右侧乳房乳晕区域,与传统的静脉注射不 同,局部注射避免了纳米颗粒在肝脏等非靶器官的积 累,从而展示出了更好的生物安全性^[84]。这种局部注 射的方法不仅减少了系统性副作用,还提高了纳米探 针在目标区域的浓度,增强了成像效果。

8.2 SERS探针信号的稳定性

SERS探针衬底的稳定性直接影响肿瘤成像和 诊断的准确性与可靠性。金或银纳米颗粒因其易于 合成且具备强烈的LSPR效应,常被用于临床前的体 内肿瘤成像研究。然而,制备的金属纳米颗粒在不 同批次之间可能存在显著差异,导致成像和诊断结 果的可重复性受到影响。这种批次间的不一致性主 要源于纳米颗粒在尺寸、形貌和表面化学性质上的 变化。为了解决这一问题,研究人员开发了具有纳 米级间隙的等离子体结构,这些结构能够产生均匀 的信号,并可根据分析物的尺寸调整"热点"位置,从 而提高检测的灵敏度和可靠性。在没有封端剂干扰 的情况下,这类衬底在批次和样品间表现出高度的 可重复性。尽管上述表面等离子体结构的制备原理 相对明确,但实际规模化制备过程仍然面临一系列 挑战,通常需要复杂的实验设备和高昂的合成成本, 这无疑限制了其大规模应用。

相比之下,半导体等非金属材料作为SERS衬底 具有较高的稳定性和化学惰性,但其主要增强机制 为化学增强,等离子体增强效应较弱,这与其材料的 本征特性有关。二维过渡金属硫属化合物(2D transition metal dichalcogenides, 2D TMDs)因其原子级平 坦的表面,有利于实现均匀的拉曼增强。然而,由于 其主要增强贡献来自化学增强,拉曼增强因子仅为

101~103,限制了其在高灵敏度检测中的应用[85-86]。金 属-有机框架(metal-organic frameworks, MOFs)作为 一种新兴的有机--无机杂化材料,通过精确控制孔隙 结构、金属节点的周期性和功能化修饰,展现出作 为SERS衬底的巨大潜力^[87]。这些新型衬底克服了传 统SERS衬底的不足,具有高可重复性、更长的保质 期、经济高效的制造工艺,以及增强的分析物吸附 能力,在实现最大电荷转移和等离子体增强方面表 现出色。因此,功能化的复合材料有望提供双重优势, 既具备高灵敏度和可调控的"热点",又具有良好的 重复性和均匀性。然而,目前对此类材料的研究尚 不充分,在增强机制和多功能特性方面仍需进一步 探索。未来的研究应着重于深入理解这些新型衬底 的物理化学特性,优化其结构设计,以提升SERS信号 的强度和稳定性,推动其在深层组织肿瘤成像中的 应用。

8.3 SERS探针的增强效果

目前深层组织成像的关键瓶颈是SERS探针的 增强效果达不到预期的目标。由于生物体自身的复 杂性、组织自发荧光等多种因素的干扰,开发更高 增强效果的SERS探针也是解决组织穿透深度不足 的关键之一^[65]。SERS探针一般由增强核心、拉曼 报告分子、外壳涂层以及靶向性修饰分子组成。其 中, 靶向性修饰的目的是为了更高的病灶富集, 从 而获得更高的成像信号强度和特异性。选择相互适 配的激发波长和 SERS 探针是实现更高 SERS 增强效 果的有效途径。因此,利用大拉曼横截面的报告分 子,配合相应波长的激发产生共振效应[65],能获得更 好的增强效果。此外,通过精准控制多个金属核心 的之间的间隙大小[88],产生自由电子的集体振动,从 而造成局部"热点"的产生,将极大地增强SERS信号, 从而提高灵敏度,这是解决穿透深度局限性的有效 策略。纳米颗粒的多孔结构也可产生丰富的局域热 点而展现优异的 SERS 增强^[89]。二氧化硅、PEG等 保护层结构可以提高SERS探针在生物体内的稳定 性,使得SERS可在生理条件下持续稳定增强。

8.4 成像速度和分辨率

在临床应用中,快速成像和高分辨率是临床医 生的理想目标。然而,现有的成像技术难以在这两 方面同时兼顾:成像速度过慢会延长临床诊断时间, 可能错过最佳治疗时机,进而增加患者的痛苦;分辨 率不足则可能导致误诊或漏诊,给患者带来不必要 的伤害。尽管现有的拉曼成像技术在一定程度上能 提供分子层面的信息,但它同样面临上述挑战,尚未 完全满足临床需求。例如, 拉曼成像单点的停留时 间较长,为了提高成像分辨率,点与点之间的步进距 离需尽可能缩小,这将显著延长成像时间。相比之 下, 拉曼线扫描成像方式能够显著提高成像速度, 但 其分辨率与成像深度之间常常相互制约。在SORS 成像中,空间偏移距离越大,成像深度越深,但相应 的分辨率则会降低,为了获取更深层组织的信号,通 常需要牺牲一定的分辨率[90]。此外,影响拉曼成像 分辨率的另一个主要因素是激光光斑的大小,激光 光斑越小,分辨率越高。由于NIR-II拉曼成像采用 较长的激发波长,而激发波长与分辨率呈反比关系, 因此, NIR-II拉曼成像的分辨率通常低于可见光拉 曼成像。宽场拉曼成像是一种理想的解决方案,它 通过结合拉曼光谱和数字成像的特点,能够为整个 感兴趣区域提供快速的拉曼图像,而无需逐点扫描, 从而提高了成像效率^[91]。最后, SRS可以兼顾快速 成像和高分辨率两种优势,但其成像深度仍然受到 限制,难以实现更深层次的组织成像[92]。

8.5 多模态及诊疗一体化

SERS成像的局限之一是其在组织中的穿透深 度有限。为充分发挥SERS信号的高特异性和PAI成 像的深层组织穿透优势,近年来已有多项研究致力 于开发双模态造影剂,主要应用于肿瘤成像领域[93]。 将PAI、SERS和MRI联合应用于同一成像目标,有 助于优化多模态SERS探针的开发,推进疾病的流程 化管理^[47]。例如, NEUSCHMELTING等^[94]设计并合 成了一种新型的金纳米星双模态造影剂,同时实现 了 SERRS和多光谱光声断层扫描 (multi-spectral optoacoustic tomography, MSOT)成像。金纳米棒(gold nanorods, GNRs)是另一类能够提供强SERS信号和 可调谐光吸收截面的纳米材料,其吸收峰可通过调 节纵横比和粒径进行优化,以增强光声信号[95]。此 外,基于核-卫星纳米结构的一种比率型双模态造影 剂,不仅能够定量、精确地实时监测兔子体内炎症、 肿瘤和骨关节炎中产生的过氧化氢(H2O2),还可用 于实时追踪抗炎治疗的进展^[96]。

MRI作为一种功能性成像工具,具有卓越的软组织对比度,特别在评估肿瘤、炎症和解剖结构方面表现出色。KIRCHER等^[47]展示了一种名为MPR的三模态成像纳米探针,其一体化地结合了MRI、

PAI和SERS造影技术,能够在活体小鼠中实现术前 定位和术中精确地勾画脑肿瘤的边界,实现更精准 的脑肿瘤成像与切除。此外,SUN等^[22]合成了一种 树枝状金纳米颗粒AuND-TPP-ICG@MCM,该探针 能够将多模态成像(包括荧光、PAI、SERS)、近红 外二区光热疗法和近红外一区光动力疗法相结合, 应用于癌症的综合治疗。该探针系统展现出良好的 生物相容性、多种成像能力,以及在近红外激光照 射下的良好治疗效果,为癌症的临床成像和治疗提 供了广阔的应用前景。

8.6 临床转化

SERS因其高特异性、高灵敏度和非侵入性的 检测特点,为临床转化提供了巨大的可能性。然而, 拉曼光谱技术在临床应用中仍面临诸多挑战,主要 包括生物安全性、成本、可持续性、分析时间,以 及激光源和功率的安全性等。由于拉曼散射本身是 一种弱信号现象,每1000万至1亿个弹性散射光子 中仅产生一个非弹性散射光子,这限制了其在临床 中的广泛应用。随着SERS、SORS等新型拉曼成像 技术的出现和不断优化, 拉曼光谱在临床应用方面 迈出了一大步。一项具有代表性的临床研究是由 ZAVALETA等¹⁹⁷¹设计的专用于临床的非接触式拉曼 内窥镜。该内窥镜利用功能化的多重SERS纳米粒 子作为分子成像造影剂,使内窥镜医师能够快速区 分正常组织和癌前病变组织。拉曼内窥镜的应用也 为结直肠癌、膀胱癌、胃癌等疾病的临床影像学诊 断提供了新的方向,其非侵入性和便携性的特点为 临床应用提供了可行性。此外, PENCE等^[98]在53名 患者中验证了拉曼内窥镜区分炎症性肠病的潜力。 2017年,一项基于金纳米粒子血清SERS用于口腔鳞 状细胞癌诊断的临床试验报道,进一步表明SERS在 临床样本诊断中具有巨大前景^[99]。WANG等^[100]对8 名接受靶向治疗的黑色素瘤患者进行了细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs)表型变化的纵向监测,发 现了与药物耐药性发展相关的特定EVs光谱,反映 了EVs表型分析在监测治疗反应方面的潜力。此外, YU等^[101]探讨了使用SERS结合机器学习方法检测阿 尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)生物标志物的 可行性,此项研究对AD的早期诊断和疾病防治至关 重要。需要特别强调的是,用于胃肠道癌症检测的 SERS探针可以通过口服或内窥镜局部给药,从而实 现快速清除,避免进入血液循环系统,这可能有助于

名称	简介	优势	局限性	应用	参考文献
Name	Short definition	Advantages	Limitations	Application	Reference
CARS	Two laser beams; higher energy "pump" photons and lower energy "Stokes" pho- tons; resonates with the chemical bonds of a molecule	Fast imaging; high sensitivity	Non-resonant back- ground; autofluores- cence	DNA; protein; small molecules	[104]
TERS	Raman enhancement only occurs on the sharp pin to the nearest atoms	High sensitivity; high spatial resolution	Difficulty of precisely control the tip radius;	Materials science; environmental moni- toring; biomedical; chemical analysis	[105]
SRS	The energy difference matches the vibrational frequencies of the molecule	Does not exhibit non- resonant background	Complex system; achieving a wide spectral range and high resolution simul- taneously	Lipid measure- ment; drug delivery monitoring; tumor cell detection; flow cytometry	[106]
TR ³ S	Simultaneously providing molecular structure and kinetic information	High sensitivity; time resolution capability; ultrafast	High sample re- quirements; signal transience	Molecular structure analysis; molecular dynamics analysis	[12]
FT-CARS	Combines the principles of Fourier-transform spectros- copy of CARS; the resolution is inversely proportional the length of the Fourier transform	High-speed scan- ning; high sensitivity; superior resolution	High costs; complex system; complex data processing	Chemical analysis; biological imaging; flow cytometry; cell sorting; multiplexed cell analysis	[107]

表1 其他主要的拉曼技术 Table 1 Other major Raman techniques

CARS: 相干反斯托克斯拉曼散射; TERS: 尖端增强拉曼散射; SRS: 受激拉曼散射; TR³S: 时间分辨共振拉曼光谱; FT-CARS: 傅里叶变换相干反斯托克斯拉曼散射。

CARS: coherent anti-Stokes Raman scattering; TERS: tip-enhanced Raman scattering; SRS: stimulated Raman scattering; TR³ S: time-resolved resonance Raman spectroscopy; FT-CARS: Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering.

加速其临床应用。此外,为了推动SERS成像引导的 外科手术切除,开发能够实时、快速扫描大面积组 织的宽场拉曼成像系统是至关重要的。

手术导航是临床拉曼光谱学最重要的研究方向。研究人员开发了与活检针兼容的光纤探针,用于检测微钙化以诊断乳腺癌,且结合 SORS技术确定手术切除过程中乳腺癌的切缘状态,并在粗针活检中成功用于识别标本中是否存在微钙化,准确率达82%^[102]。此外,手术切除时难以可视化脑肿瘤的真实影像是导致脑肿瘤患者预后不良的主要原因之一,为此KARABEBER等^[103]利用手持式拉曼扫描仪,在SERS纳米颗粒的引导下,成功识别了微小的肿瘤灶。总之,SERS成像引导的切除术比仅使用白光可视化的切除更为准确,具有巨大的临床应用价值。最后,其他拉曼技术在临床检测和诊断中也表现出了显著的速度和灵敏度等优势^[103],具体见表1。

9 总结与展望

近年来,由传统拉曼衍生出的表面增强拉曼散 射、空间偏移拉曼光谱、透射拉曼光谱和近红外二 区拉曼等非侵入性光谱成像技术,为肿瘤的体内外 检测、成像和治疗提供了多样化且有效的手段。结 合这些技术的各自优点为肿瘤的深层成像提供了便 利和可行的解决方案。SERS纳米颗粒凭借其超高的 灵敏度和特异性,以及卓越的信号增强效果,为肿瘤 的诊断和治疗提供了强有力的工具。这些技术在准 确描绘肿瘤边缘、发现微小肿瘤转移灶、引导手术 切除以及检测临床样本中发挥了重要作用。与此同 时,SERS与SORS的联合应用推动了SESORS系统的 发展,显著提高了组织成像的穿透能力和检测灵敏 度。然而, SERS在临床转化过程中仍面临着生物安 全性方面的重大挑战。纳米颗粒在体内的潜在毒性 和生物相容性问题,限制了其在临床应用中的进一 步发展。为此,研究者们不断优化纳米颗粒的合成 方案,以降低影像探针的生物毒性。例如,采用红细 胞膜包覆纳米颗粒,提高其生物相容性并降低免疫 原性。此外,减小纳米颗粒的尺寸,使其能够通过肾 脏排泄,也是一个可行的策略,有助于减少其体内滞 留,降低潜在毒性。

尽管SERS的非侵入性成像方式为临床前转化 提供了新的解决方案,但距离广泛的临床应用仍存 在一定的挑战。未来需要重点解决以下问题:(1) 提高纳米颗粒的可重复性和可扩展性,确保用于设 计SERS构建体的纳米颗粒在不同批次间具有高度 一致性,并提高SERS系统的生物安全性,是推动其 临床应用的基础;(2)开发特定的SERS设备,提高 SERS技术与不同疾病的匹配度,开发更多种类的 仪器,实现针对不同疾病的定制化检测和诊断;(3) 优化基于SERS的医疗设备,改进用于开发SERS医 疗设备所需的仪器和技术,如拉曼内窥镜等,提升 设备的便携性、易用性和成像质量;(4)融合人工 智能技术,将SERS成像与人工智能算法相结合,有 望实现大数据分析和智能诊断,开辟新的技术领 域,提升诊断的准确性和效率;(5)提升成像速度 和分辨率,由于传统拉曼仪器成像速度较慢,开发 快速且高分辨率的成像方法是未来发展的重要方 向。例如,相干反斯托克斯拉曼光谱(coherent anti-Stokes Raman spectroscopy, CARS)和受激拉曼散 射(stimulated Raman scattering, SRS)等非线性拉 曼成像技术,在提高成像速度和分辨率方面具有巨 大潜力。TRS在大体积成像方面展现出潜在优势, 其检测深度可接近成年人的身体厚度。同时,近红 外二区较长的激发波长显著降低了组织的自发荧 光强度,提高了信噪比,为深层肿瘤成像指明了新 的方向。

总之,尽管面临诸多挑战,但SERS技术在深层 组织癌症成像领域展现出巨大的应用潜力。通过不 断优化纳米探针的设计、提高拉曼探针的生物安全 性、开发新型成像设备以及融合先进的人工智能技 术,SERS有望在未来实现从实验室研究到临床应用 的突破,为癌症的早期诊断、手术导航和个体化治 疗提供强有力的支持(图3)。



Fig.3 Strategies to accelerate clinical translation of Raman cancer imaging

参考文献 (References)

- BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-63.
- [2] LUSIC H, GRINSTAFF M W. X-ray-computed tomography contrast agents [J]. Chem Rev, 2013, 113(3): 1641-66.
- [3] CHERRY S R, DIEKMANN J, BENGEL F M. Total-body positron emission tomography: adding new perspectives to cardiovascular research [J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2023, 16(10): 1335-47.
- [4] KUBBEN P L, TER MEULEN K J, SCHIJNS O E, et al. Intraoperative MRI-guided resection of glioblastoma multiforme: a systematic review [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(11): 1062-70.
- [5] KAO Y C, HAN X, LEE Y H, et al. Multiplex surface-enhanced Raman scattering identification and quantification of urine metabolites in patient samples within 30 min [J]. ACS Nano, 2020, 14(2): 2542-52.
- [6] JIN Q, FAN X, CHEN C, et al. Multicolor Raman beads for multiplexed tumor cell and tissue imaging and *in vivo* tumor spectral detection [J]. Anal Chem, 2019, 91(6): 3784-9.
- [7] EREMINA O E, SCHAEFER S, CZAJA A T, et al. Multiplexing potential of NIR resonant and non-resonant Raman reporters for bio-imaging applications [J]. Analyst, 2023, 148(23): 5915-25.
- [8] LIN D, HSIEH C L, HSU K C, et al. Geometrically encoded SERS nanobarcodes for the logical detection of nasopharyngeal carcinoma-related progression biomarkers [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3430.
- [9] LU X, HU C, JIA D, et al. Amplification-free and mix-and-read analysis of multiplexed microRNAs on a single plasmonic microbead [J]. Nano Lett, 2021, 21(15): 6718-24.
- [10] ZHANG R, ZHANG Y, DONG Z C, et al. Chemical mapping of a single molecule by plasmon-enhanced Raman scattering [J]. Nature, 2013, 498(7452): 82-6.
- [11] WATKINS-MARIANI M, DECKERT-GAUDIG T, DECKERT V. Label-free *in vitro* visualization and characterization of caveolar bulbs during stimulated re-epithelialization [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(27): 6993-7002.
- [12] BUHRKE D, HILDEBRANDT P. Probing structure and reaction dynamics of proteins using time-resolved resonance Raman spectroscopy [J]. Chem Rev, 2020, 120(7): 3577-630.
- [13] KRUGLIK S G, YOO B K, FRANZEN S, et al. Picosecond primary structural transition of the heme is retarded after nitric oxide binding to heme proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(31): 13678-83.
- [14] FREUDIGER C W, MIN W, SAAR B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy [J]. Science, 2008, 322(5909): 1857-61.
- [15] WEI M, SHI L, SHEN Y, et al. Volumetric chemical imaging by clearing-enhanced stimulated Raman scattering microscopy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(14): 6608-17.
- [16] MIN W, FREUDIGER C W, LU S, et al. Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy [J]. Annu Rev Phys Chem, 2011, 62: 507-30.
- [17] POLLI D, KUMAR V, VALENSISE C M, et al. Broadband coherent Raman scattering microscopy [J]. Laser Photon Rev,

2018, 12(9): 1800020.

- [18] ISOBE K, SUDA A, TANAKA M, et al. Single-pulse coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy employing an octave spanning pulse [J]. Opt Express, 2009, 17(14): 11259-66.
- [19] HARMSEN S, WALL M A, HUANG R, et al. Cancer imaging using surface-enhanced resonance Raman scattering nanoparticles [J]. Nat Protoc, 2017, 12(7): 1400-14.
- [20] MATOUSEK P, CLARK I P, DRAPER E R, et al. Subsurface probing in diffusely scattering media using spatially offset Raman spectroscopy [J]. Appl Spectrosc, 2005, 59(4): 393-400.
- [21] MOSCA S, DEY P, TABISH T A, et al. Spatially offset and transmission Raman spectroscopy for determination of depth of inclusion in turbid matrix [J]. Anal Chem, 2019, 91(14): 8994-9000.
- [22] SUN J, WANG J, HU W, et al. Camouflaged gold nanodendrites enable synergistic photodynamic therapy and NIR biowindow II photothermal therapy and multimodal imaging [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(9): 10778-95.
- [23] RAMAN C V, KRISHNAN K S. A new type of secondary radiation [J]. Nature, 1928, 121(3048): 501-2.
- [24] 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 Interfacial Electrochem, 1977, 84(1): 1-20.
- [25] SEREBRENNIKOVA K V, BERLINA A N, SOTNIKOV D V, et al. Raman scattering-based biosensing: new prospects and opportunities [J]. Biosensors, 2021, 11(12): 512.
- [26] MICHAELS A M, NIRMAL M, BRUS L E. Surface enhanced Raman spectroscopy of individual rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals [J]. J Am Chem Soc, 1999, 121(43): 9932-9.
- [27] WILLETS K A, VAN DUYNE R P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing [J]. Annu Rev Phys Chem, 2007, 58: 267-97.
- [28] LI M, QIU Y, FAN C, et al. Design of SERS nanoprobes for Raman imaging: materials, critical factors and architectures [J]. Acta Pharm Sin B, 2018, 8(3): 381-9.
- [29] DOERING W E, NIE S J A C. Spectroscopic tags using dyeembedded nanoparticles and surface-enhanced Raman scattering [J]. Anal Chem, 2003, 75(22): 6171-6.
- [30] LEE J H, CHO H Y, CHOI H K, et al. Application of gold nanoparticle to plasmonic biosensors [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): 2021.
- [31] KEREN S, ZAVALETA C, CHENG Z, et al. Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(15): 5844-9.
- [32] OSELEDCHYK A, ANDREOU C, WALL M A, et al. Folatetargeted surface-enhanced resonance Raman scattering nanoprobe ratiometry for detection of microscopic ovarian cancer [J]. ACS Nano, 2017, 11(2): 1488-97.
- [33] SCHRADER B, BERGMANN G. Die intensität des Ramanspektrums polykristalliner substanzen: I. mitteilung strahlungsbilanz von substanz und probenanordnung [J]. Anal Bioanal Chem, 1967, 225: 230-47.
- [34] SHIM M G, WONG KEE SONG L M, MARCON N E, et al. In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy [J]. Photochem

447

Photobiol, 2000, 72(1): 146-50.

- [35] FLEISCHMANN M, HENDRA P J, MCQUILLAN A J J C P L. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode [J]. Chem Phys Lett, 1974, 26(2): 163-6.
- [36] QIAN X, PENG X H, ANSARI D O, et al. *In vivo* tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(1): 83-90.
- [37] 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): 3969-73.
- [38] CAI M, ZHANG Z, SHI X, et al. NIR-II/NIR-I fluorescence molecular tomography of heterogeneous mice based on Gaussian weighted neighborhood fused Lasso method [J]. IEEE Trans Med Imaging, 2020, 39(6): 2213-22.
- [39] ELECHALAWAR C K, GULLA S K, ROY R V, et al. Biodistribution and therapeutic efficacy of a gold nanoparticle-based targeted drug delivery system against pancreatic cancer [J]. Cancer Lett, 2024, 589: 216810.
- [40] SRIVASTAVA I, XUE R, JONES J, et al. Biomimetic surfaceenhanced Raman scattering nanoparticles with improved dispersibility, signal brightness, and tumor targeting functions [J]. ACS Nano, 2022, 16(5): 8051-63.
- [41] PELLAS V, HU D, MAZOUZI Y, et al. Gold nanorods for LSPR biosensing: synthesis, coating by silica, and bioanalytical applications [J]. Biosensors, 2020, 10(10): 146.
- [42] HERRERA G M, PADILLA A C, HERNANDEZ-RIVERA S P. Surface enhanced Raman scattering (SERS) studies of gold and silver nanoparticles prepared by laser ablation [J]. Nanomaterials, 2013, 3(1): 158-72.
- [43] PAL S, HARMSEN S, OSELEDCHYK A, et al. MUC1 aptamer targeted SERS nanoprobes [J]. Adv Funct Mater, 2017, 27(32): 1606632.
- [44] MURALI V P, KARUNAKARAN V, MURALI M, et al. A clinically feasible diagnostic spectro-histology built on SERSnanotags for multiplex detection and grading of breast cancer biomarkers [J]. Biosens Bioelectron, 2023, 227: 115177.
- [45] JIN Z, YUE Q, DUAN W, et al. Intelligent SERS navigation system guiding brain tumor surgery by intraoperatively delineating the metabolic acidosis [J]. Adv Sci, 2022, 9(7): e2104935.
- [46] YANG G, ZHANG K, QU X, et al. Ratiometric pH-responsive SERS strategy for glioma boundary determination [J]. Talanta, 2022, 250: 123750.
- [47] KIRCHER M F, DE LA ZERDA A, JOKERST J V, et al. A brain tumor molecular imaging strategy using a new triplemodality MRI-photoacoustic-Raman nanoparticle [J]. Nat Med, 2012, 18(5): 829-34.
- [48] WANG Y W, KANG S, KHAN A, et al. *In vivo* multiplexed molecular imaging of esophageal cancer via spectral endoscopy of topically applied SERS nanoparticles [J]. Biomed Opt Express, 2015, 6(10): 3714-23.
- [49] JO K, LINH V T N, YANG J Y, et al. Machine learning-assisted label-free colorectal cancer diagnosis using plasmonic needleendoscopy system [J]. Biosens Bioelectron, 2024, 264: 116633.
- [50] LEE S, JUE M, LEE K, et al. Early-stage diagnosis of bladder

cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy combined with machine learning algorithms in a rat model [J]. Biosens Bioelectron, 2024, 246: 115915.

- [51] STUART D A, YUEN J M, SHAH N, et al. *In vivo* glucose measurement by surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Anal Chem, 2006, 78(20): 7211-5.
- [52] HAKA A S, VOLYNSKAYA Z, GARDECKI J A, et al. *In vivo* margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy [J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3317-22.
- [53] HUANG R, HARMSEN S, SAMII J M, et al. High precision imaging of microscopic spread of glioblastoma with a targeted ultrasensitive SERRS molecular imaging probe [J]. Theranostics, 2016, 6(8): 1075-84.
- [54] HARMSEN S, HUANG R, WALL M A, et al. Surface-enhanced resonance Raman scattering nanostars for high-precision cancer imaging [J]. Sci Transl Med, 2015, 7(271): 271ra7.
- [55] ZENG L, PAN Y, WANG S, et al. Raman reporter-coupled Ag_{core}@ Au_{shell} nanostars for *in vivo* improved surface enhanced Raman scattering imaging and near-infrared-triggered photothermal therapy in breast cancers [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(30): 16781-91.
- [56] WEN Y, TRUONG V X, LI M. Real-time intraoperative surface-enhanced Raman spectroscopy-guided thermosurgical eradication of residual microtumors in orthotopic breast cancer [J]. Nano Lett, 2021, 21(7): 3066-74.
- [57] QIU Y, ZHANG Y, LI M, et al. Intraoperative detection and eradication of residual microtumors with gap-enhanced Raman tags [J]. ACS Nano, 2018, 12(8): 7974-85.
- [58] INOUE M, HISADA H, KOIDE T, et al. Transmission lowfrequency Raman spectroscopy for quantification of crystalline polymorphs in pharmaceutical tablets [J]. Anal Chem, 2019, 91(3): 1997-2003.
- [59] MYRICK M L, ANGEL S M, DESIDERIO R. Comparison of some fiber optic configurations for measurement of luminescence and Raman scattering [J]. Appl Opt, 1990, 29(9): 1333-44.
- [60] DEY P, VAIDEANU A, MOSCA S, et al. Surface enhanced deep Raman detection of cancer tumour through 71 mm of heterogeneous tissue [J]. Nanotheranostics, 2022, 6(3): 337-49.
- [61] GHITA A, MATOUSEK P, STONE N. Exploring the effect of laser excitation wavelength on signal recovery with deep tissue transmission Raman spectroscopy [J]. Analyst, 2016, 141(20): 5738-46.
- [62] STONE N, MATOUSEK P. Advanced transmission Raman spectroscopy: a promising tool for breast disease diagnosis [J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4424-30.
- [63] GARDNER B, STONE N, MATOUSEK P. Noninvasive determination of depth in transmission Raman spectroscopy in turbid media based on sample differential transmittance [J]. Anal Chem, 2017, 89(18): 9730-3.
- [64] FRYAR C D, GU Q, OGDEN C L, et al. Anthropometric reference data for children and adults: United States, 2011-2014 [J].
 Vital Health Stat 3 Anal Stud, 2016, (39): 1-46.
- [65] ZHANG Y, CHEN R, LIU F, et al. *In vivo* surface-enhanced transmission Raman spectroscopy under maximum permissible exposure: toward photosafe detection of deep-seated tumors [J]. Small Methods, 2023, 7(2): e2201334.
- [66] ZHANG Y, LIN L, YE J J V. A rapid and universal method for

depth estimation of lesions in heterogeneous tissues via photosafe ratiometric transmission Raman spectroscopy [J]. View, 2023, 4(4): 20230022.

- [67] LI L, JIANG R, SHAN B, et al. Near-infrared II plasmonic porous cubic nanoshells for *in vivo* noninvasive SERS visualization of sub-millimeter microtumors [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 5249.
- [68] GHITA A, MATOUSEK P, STONE N. High sensitivity noninvasive detection of calcifications deep inside biological tissue using Transmission Raman Spectroscopy [J]. J Biophotonics, 2018, doi: 10.1002/jbio.201600260.
- [69] THOMAS R J, ROCKWELL B A, MARSHALL W J, et al. Procedure for the computation of hazards from diffusely scattering surfaces under the Z136.1-2000 American National Standard for Safe Use of Lasers [J]. J Laser Appl, 2007, 19(1): 46-54.
- [70] QIAN X, PENG X H, ANSARI D O, et al. *In vivo* tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(1): 83-90.
- [71] XIE J, ZHANG Q, LEE J Y, et al. The synthesis of SERS-active gold nanoflower tags for *in vivo* applications [J]. ACS Nano, 2008, 2(12): 2473-80.
- [72] VON MALTZAHN G, CENTRONE A, PARK J H, et al. SERScoded gold nanorods as a multifunctional platform for densely multiplexed near-infrared imaging and photothermal heating [J]. Adv Mater, 2009, 21(31): 3175-80.
- [73] NICOLSON F, ANDREIUK B, ANDREOU C, et al. Non-invasive *in vivo* imaging of cancer using surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy (SESORS) [J]. Theranostics, 2019, 9(20): 5899-913.
- [74] ZHU S, TIAN R, ANTARIS A L, et al. Near-infrared-II molecular dyes for cancer imaging and surgery [J]. Adv Mater, 2019, 31(24): 1900321.
- [75] WEN Y, TRUONG V X, LI M J N L. Real-time intraoperative surface-enhanced Raman spectroscopy-guided thermosurgical eradication of residual microtumors in orthotopic breast cancer [J]. Nano Lett, 2021, 21(7): 3066-74.
- [76] DAEMS N, MICHIELS C, LUCAS S, et al. Gold nanoparticles meet medical radionuclides [J]. Nucl Med Biol, 2021, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2021.06.001.
- [77] MATOUSEK P, DRAPER E R, GOODSHIP A E, et al. Noninvasive Raman spectroscopy of human tissue *in vivo* [J]. Appl Spectrosc, 2006, 60(7): 758-63.
- [78] XIE H N, STEVENSON R, STONE N, et al. Tracking bisphosphonates through a 20 mm thick porcine tissue by using surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2012, 51(34): 8509-11.
- [79] MATOUSEK P, DRAPER E R, GOODSHIP A E, et al. Noninvasive Raman spectroscopy of human tissue *in vivo* [J]. Appl Spectrosc, 2006, 60(7): 758-63.
- [80] STONE N, BAKER R, ROGERS K, et al. Subsurface probing of calcifications with spatially offset Raman spectroscopy (SORS): future possibilities for the diagnosis of breast cancer [J]. Analyst, 2007, 132(9): 899-905.
- [81] NICOLSON F, JAMIESON L E, MABBOTT S, et al. Through tissue imaging of a live breast cancer tumour model using handheld surface enhanced spatially offset resonance Raman spectroscopy (SESORRS) [J]. Chem Sci, 2018, 9(15): 3788-92.

- [82] NICOLSON F, JAMIESON L E, MABBOTT S, et al. Multiplex imaging of live breast cancer tumour models through tissue using handheld surface enhanced spatially offset resonance Raman spectroscopy (SESORRS) [J]. Chem Commun, 2018, 54(61): 8530-3.
- [83] NICOLSON F, JAMIESON L E, MABBOTT S, et al. Surface enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS) for probing through plastic and tissue barriers using a handheld spectrometer [J]. Analyst, 2018, 143(24): 5965-73.
- [84] DENG B, WANG Y, BU X, et al. Sentinel lymph node identification using NIR-II ultrabright Raman nanotags on preclinical models [J]. Biomaterials, 2024, 308: 122538.
- [85] LING X, FANG W, LEE Y H, et al. Raman enhancement effect on two-dimensional layered materials: graphene, h-BN and MoS₂ [J]. Nano Lett, 2014, 14(6): 3033-40.
- [86] ZUO P, JIANG L, LI X, et al. Enhancing charge transfer with foreign molecules through femtosecond laser induced MoS₂ defect sites for photoluminescence control and SERS enhancement [J]. Nanoscale, 2019, 11(2): 485-94.
- [87] GUSELNIKOVA O, LIM H, KIM H J, et al. New trends in nanoarchitectured SERS substrates: nanospaces, 2D materials, and organic heterostructures [J]. Small, 2022, 18(25): e2107182.
- [88] NAM J M, OH J W, LEE H, et al. Plasmonic nanogap-enhanced Raman scattering with nanoparticles [J]. Acc Chem Res, 2016, 49(12): 2746-55.
- [89] WANG L, PATSKOVSKY S, GAUTHIER-SOUMIS B, et al. Porous Au-Ag nanoparticles from galvanic replacement applied as single-particle SERS probe for quantitative monitoring [J]. Small, 2022, 18(1): e2105209.
- [90] NICOLSON F, ANDREIUK B, LEE E, et al. In vivo imaging using surface enhanced spatially offset Raman spectroscopy (SESORS): balancing sampling frequency to improve overall image acquisition [J]. NPJ Imaging, 2024, 2(1): 7.
- [91] LI H, LU G, YIN Z, et al. Optical identification of single- and few-layer MoS₂ sheets [J]. Small, 2012, 8(5): 682-6.
- [92] WEI L, HU F, CHEN Z, et al. Live-cell bioorthogonal chemical imaging: stimulated Raman scattering microscopy of vibrational probes [J]. Acc Chem Res, 2016, 49(8): 1494-502.
- [93] KARLAS A, PLEITEZ M A, AGUIRRE J, et al. Optoacoustic imaging in endocrinology and metabolism [J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(6): 323-35.
- [94] NEUSCHMELTING V, HARMSEN S, BEZIERE N, et al. Dual-modality surface-enhanced resonance Raman scattering and multispectral optoacoustic tomography nanoparticle approach for brain tumor delineation [J]. Small, 2018, 14(23): e1800740.
- [95] JOKERST J V, COLE A J, VAN DE SOMPEL D, et al. Gold nanorods for ovarian cancer detection with photoacoustic imaging and resection guidance via Raman imaging in living mice [J]. ACS Nano, 2012, 6(11): 10366-77.
- [96] LI Q, GE X, YE J, et al. Dual ratiometric SERS and photoacoustic core-satellite nanoprobe for quantitatively visualizing hydrogen peroxide in inflammation and cancer [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2021, 60(13): 7323-32.
- [97] ZAVALETA C L, GARAI E, LIU J T, et al. A Raman-based endoscopic strategy for multiplexed molecular imaging [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(25): E2288-97.

- [98] PENCE I, NGUYEN Q, BI X, et al. Endoscopy-coupled Raman spectroscopy for *in vivo* discrimination of inflammatory bowel disease [C]. Biomedical Vibrational Spectroscopy VI: Advances in Research and Industry, 2014, 8939: 129-38.
- [99] 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.
- [100] WANG J, WUETHRICH A, SINA A A, et al. Tracking extracellular vesicle phenotypic changes enables treatment monitoring in melanoma [J]. Sci Adv, 2020, 6(9): eaax3223.
- [101] YU X, SRIVASTAVA S, HUANG S, et al. The feasibility of early Alzheimer's disease diagnosis using a neural network hybrid platform [J]. Biosensors, 2022, 12(9): 753.
- [102] SAHA A, BARMAN I, DINGARI N C, et al. Raman spectroscopy: a real-time tool for identifying microcalcifications during stereotactic breast core needle biopsies [J]. Biomed Opt Express, 2011, 2(10): 2792-803.

- [103] KARABEBER H, HUANG R, IACONO P, et al. Guiding brain tumor resection using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles and a hand-held Raman scanner [J]. ACS Nano, 2014, 8(10): 9755-66.
- [104] FOLICK A, MIN W, WANG M C. Label-free imaging of lipid dynamics using coherent anti-stokes Raman scattering (CARS) and stimulated Raman scattering (SRS) microscopy [J]. Curr Opin Genet Dev, 2011, 21(5): 585-90.
- [105] WANG X, HUANG S C, HUANG T X, et al. Tip-enhanced Raman spectroscopy for surfaces and interfaces [J]. Chem Soc Rev, 2017, 46(13): 4020-41.
- [106] LI Y, SHEN B, LI S, et al. Review of stimulated Raman scattering microscopy techniques and applications in the biosciences [J]. Adv Biol, 2021, 5(1): e2000184.
- [107] NISHIYAMA R, FURUYA K, TAMURA T, et al. Fouriertransform coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy: a comprehensive review [J]. Anal Chem, 2024, 96(46): 18322-36.