

激光散射技术在细胞计数及分类中的应用

杨 晔 张镇西 蒋大宗

(西安交通大学生物医学工程研究所, 西安, 710049)

摘要: 系统地概述了近年来激光散射技术在血细胞计数及分类中应用的进展。介绍了多角度散射法、散射强度曲线法、两角度强度比值法、多向散射法、90° 散射法, 并对这些方法进行了评价。同时还论述了血细胞的理论散射模型。指出了需要解决的问题和研究发展方向。

关键词: 激光散射技术 血细胞 计数 分类 激光流式细胞光度计

Application of laser light scattering techniques in cell counting and classification

Yang Ye, Zhang Zhenxi, Jiang Dazong

(Institute of BME, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710049)

Abstract: In this paper, the development of laser light scattering technique applied in blood cells' classification and counting in recent years is reviewed. Methods of multiangle light scattering, light scattering curve, ratio of light scattering intensities, multidirection light scattering and right angle scattering are introduced and evaluated, respectively. The theoretical light scattering models of blood cells are discussed. Finally, the problems to be solved and the research directions are pointed out.

Key words: laser light scattering blood cell counting classification laser flow cytometry

一、引 言

血细胞计数及分类是医学常规检查项目之一。目前测量血细胞的方法有计数板计数法、光电比浊法、库尔特(Coulter)计数器法、激光流式细胞光度计法^[1~3]等。以上方法各有利弊。计数板计数法是利用带有刻度的载玻片进行人工计数,也有电子显象人工计数,价格便宜,但工作量较大;光电比浊法是根据红细胞在一定量的稀释液中,其浊度与光密度成正比的关系,在标准曲线表上查得结果。这种方法只可用于正常红细胞的计数,不适于红细胞自相凝集和冷凝集患者以及贫血患者;库尔特计数器利用库尔特原理^[3],可以测量血液中红细胞、白细胞和血小板的数目,也可用于其它微粒的计数。这种方法的缺点是只可根据细胞的大小进行分类计数^[4];且悬浮液中的杂质易堵塞仪器测定管下端的微孔,从而给测量带来不便。激光流式细胞光度计可对单个细胞逐个地进行高速和定量分析,从一个细胞可同时测得多种参数,如细胞的体积、细胞内 DNA, RNA, 蛋白质的含量等。它将表面标记有荧光染料的细胞置于含有特殊生物分子的悬浮液中,通过让单个细胞在一定时间内流过一聚焦激光束的照射区来激发荧光染料分子,最后测量激发出来的荧光对细胞分类计数。可根据细胞的外在和内在特性进行多参数数据处理,计数精度很高。为了进一步提高仪器的性能,人们使用了许多新技术,如傅里叶变换技术(Fourier Transform)、相位敏感检测技术(Phase Sensitive Detection)、大规模数据采集与分析技术(High Data Acquisition and Analysis)、高速分选技术(High Speed Sorting)以

及激光散射技术(Laser Light Scattering)^[5]。本文将对激光散射技术在激光流式细胞光度计中用于血细胞分类和计数的发展加以介绍和讨论, 同时还将论述血细胞的理论散射模型。并指出需要解决的问题和研究发展方向。

二、激光散射技术在血细胞分类计数中的应用

光线在均匀介质中是按直线传播的, 但当其通过不均匀介质(如含有细胞的悬浮液)时, 除了透过及吸收外, 入射光的一部分偏离其原来方向而投射到其它方向, 这种现象即为光的散射。任何一个单散射物体(指它的再次散射可以忽略不计)被光照后产生的散射光形式代表了这个物体独特的物理描述。因此流式系统中细胞的散射光可用来分辨非均匀细胞群中的不同细胞。被细胞散射的全部散射光以及散射光的角度分布不仅跟细胞的大小, 而且跟细胞的折射率有关^[6]。同时细胞的非对称性和生存性也影响散射光^[7,8]。研究表明^[9], 在散射角(散射方向与入射方向的夹角)小于 90° 范围内的散射光强分布(相对于散射角)的极大值和极小值主要和细胞的大小有关; 而在更大散射角范围内, 其对应值主要与细胞内部的介电(Dielectric)结构有关。因此, 不但可以用激光散射技术来确定细胞的大小, 还可以按细胞形态、内部成分而不只是按大小来对细胞进行分类计数; 并可识别细胞的非对称性以及它在流式系统中的取向情况, 还可将活细胞从死细胞中区分出来。

对于窄带分布的悬浮液, 可用一个探测器探测一定角度范围内的细胞散射光^[10-12]来决定细胞的大小和折射率, 探测器探测的是这个角度范围内的累积散射光。对于宽带或双峰大小分布的细胞群来说, 由于产生同样累积散射信号的细胞有可能具有很不一样的大小、折射率或其它细胞参数, 这样做就有可能产生计数误差并失去许多对细胞分类和计数十分有用的信息。细胞的散射形式(Scattering Pattern, 指散射光强与散射角的关系曲线)在 0° 与 180° 间有许多极大值和极小值^[6], 故许多学者采用了多种不同方法以从散射光信号中得出更丰富信息。

1. 多角度散射法

为了从散射光中得出更多有关细胞的信息, 许多学者采用了多角度散射法。文献[13, 14]在两个角度探测散射光。文献[15]采用一个多环同心圆环光电探测器探测与激光光轴成 $0^\circ \sim 30^\circ$ 范围内32个散射角处的光强来得到每个细胞的散射形式, 将每个细胞的散射形式都放在同一坐标系中, 得到一散射图。使用一个数学集聚算法(Mathematical Clustering Algorithm)来确定细胞可分为几类, 同时采用一个线性分离算法(Linear Separation Algorithm)来决定散射图上每类细胞之间的分界线, 从而把细胞分为几类。这种方法的缺点是算法比较复杂。

2. 散射强度曲线法

这种方法以一定波长的激光光束照射悬浮液中的颗粒或细胞, 在全部散射角(或一定散射角)范围内测量散射光强的角度分布, 将 Mie 理论^[16]的散射图形与之进行比较来确定颗粒或细胞的大小和折射率。在比较中, 一些极大和极小的角度位置尤其有助于颗粒或细胞大小和折射率的确定。Kaye 等人^[17]让单个细胞流过激光照射区, 记录 0° 到 180° 内多个散射角度上(角度分辨率为 1.5°)的散射光强分布, 通过寻找极小光强角度位置并与计算机中存储的理论值相比较而得到该细胞的大小和折射率, 进而根据多个细胞的大小和折射率对此细胞群分类和计数。这种方法预先假定细胞是球对称的, 并且为了减少计算机中理论值的存储量, 需对被测细胞的形态如大小极限, 典型壁厚与半径的比率等有所了解, 否则需要存储的理论值太多; 同时仪器也比较庞大。这些不足限制了这种方法的应用。

3. 两角度强度比值法

用激光照射散射体,同时测出两个不同散射角 θ_1 和 θ_2 处的光强 $I_1(\theta_1, \alpha, m)$ 和 $I_2(\theta_2, \alpha, m)$ 。定义一比率函数 $R(\theta_1, \theta_2, \alpha, m) = k \cdot I_1(\theta_1, \alpha, m) / I_2(\theta_2, \alpha, m)$, 其中 α 是尺寸参数(粒子周长/光在介质中的波长), m 是粒子的相对折射率, k 是一个规一化常数。通过与理论计算的 $R(\theta_1, \theta_2, \alpha, m) \sim d$ (d 是粒子的直径)关系曲线相比而得出粒子的直径和折射率,或直接对 $R(\theta_1, \theta_2, \alpha, m)$ 进行频谱分析得出颗粒群的分布来。文献[18]测量了三种不同尺寸的聚苯乙烯微珠(0.48 μm ~2 μm 直径)在不同散射角上的比率函数,结果表明,比率函数曲线比光强分布曲线更窄并且更对称。当不同微粒的光强分布曲线间有严重的重叠情况时,比率函数却可以很好地分辨出不同尺寸的微珠来。这种方法也可用于血细胞。

4. 多向散射法

可以通过同时测量前向散射(Forward Scatter, FS)、后向散射(Back Scatter, BS)或侧向散射(Side Scatter, SS)的方法对细胞进行分类计数。Salzman 等人^[13]在 1975 年通过同时测量 FS 和 SS 成功地分辨出人体周围血液中的淋巴细胞、单核细胞和粒细胞。许多测量系统也测量了 FS 和 SS^[9,19]。Sloot 等人^[20](1986 年)的研究表明,FS 主要和细胞的整体大小有关,而和细胞核与细胞质厚度之比无关;同时细胞核的折射率变化也影响 FS。BS 由细胞核与细胞质的大小比率以及细胞核或细胞质的光密度决定,而 SS 对上述所有变化都很敏感。这也证明了 Salzman 等人的方法是可行的。

5. 90° 散射法

Salzman 等人^[13](1975 年)的实验结果显示人体周围血液中的淋巴细胞、单核细胞和粒细胞具有不同的 90° 散射特性。Hoffman 等人^[21](1980 年)用这种方法对人体周围血液中的白细胞进行分类,但当用标记单克隆抗体(Monoclonal Antibodies)OKM-1 的方法来检验时,发现用 90° 散射法分出的淋巴细胞中含有的 30% 的单核细胞。1983 年, Ritchie 等人^[22]将 90° 散射法与荧光标记单克隆抗体的方法相结合,从人体周围血液中的单核细胞和粒细胞中分辨出淋巴细胞,准确度有了很大的提高。

以上各种方法都不是绝对独立的,有时可同时采用几种方法来提高测量结果的可靠性,文献[21]还采用了同时探测 90° 和前向散射光强的方法将 T 淋巴细胞从其它白细胞中分辨出来,并通过细胞免疫荧光分辨 T 淋巴细胞的亚群,其中细胞免疫荧光信号由单克隆抗体作用于 T 细胞表面不同抗体时产生。常规方法计数 T 淋巴细胞亚群需 2d 时间, 20 μl 全血,还需要 E 染色质浓缩(E Rosette Enrichment),而文献[21]中报导的方法仅需 2h 和 50 μl 全血。

除上述方法外,新的方法在不断探索之中。文献[23]研究了同时被两个不同波长的激光器照射产生的散射光。文献[24]研究了散射光的偏振态。此外,将光散射法与诸如吸收、荧光、容积、荧光非均匀性等方法结合起来,也能进一步提高测量的敏感性、专门性和分辨率。

三、利用光散射进行血细胞分类与计数的理论模型

1. 各向同性球型颗粒的散射理论

当光强为 I_0 , 在颗粒周围介质中波长为 λ' ($\lambda' = \lambda_0 / n_2$, λ_0 为光在真空中的波长, n_2 为介质的折射率)的自然光(完全非偏振光)平行照射到一半径为 r 的均匀球形颗粒上时, 散射角 θ , 距离散射体 R 处的散射光强为

$$I_s = [\lambda'^2 / (8\pi^2 R^2)] I_0 (i_1 + i_2) \quad (1)$$

散射光一般是部分偏振光, 散射光方向和入射光方向构成的平面称为散射面, 散射光垂直偏振光矢量(其矢量垂直于散射面)的强度 I_{\perp} 和平行偏振光矢量(其矢量平行于散射面)的强度 I_{\parallel} 分别为:

$$I_{\perp} = [\lambda^2 / (8\pi^2 R^2)] I_{0i1} \quad (2)$$

$$I_{\parallel} = [\lambda^2 / (8\pi^2 R^2)] I_{0i2} \quad (3)$$

散射光的偏振度 $\rho = (I_{\perp} - I_{\parallel}) / (I_{\perp} + I_{\parallel})$ (4)

式中, $i_1 = S_1(m, \theta, \alpha) \times S_1^*(m, \theta, \alpha)$ (5a)

$$i_2 = S_2(m, \theta, \alpha) \times S_2^*(m, \theta, \alpha) \quad (5b)$$

i_1, i_2 称为散射光的强度函数; S_1, S_2 称为散射光的振幅函数; S_1^*, S_2^* 分别为 S_1, S_2 的共轭复数; $m = n_1 / n_2$ (n_1 为球形颗粒的折射率); α 为尺寸参数 ($\alpha = 2\pi r / \lambda$)。

光散射现象是由吸收、衍射、透射与折射、镜面反射以及粒子-介质界面的平面波传播之间的相互作用引起的。严格的光散射的电磁场理论是将光波看作电磁波, 在一定的颗粒的形状和尺寸所决定的边界条件下, 对颗粒内部和外部区域的 Maxwell 方程求解, 得到振幅函数和强度函数的表达式。Mie 理论即是在这种情况下对均匀介质中的均匀球体在平面单色光照射下求得的严格数学解, 适于任何粒子尺寸, 但它的解的形式比较复杂。因此, 在球形颗粒的某些范围内, 人们用一些近似的公式来描述。

文献[26]指出, 当 $\alpha \ll 1$ (即球粒直径远小于光波波长), 并且颗粒是非导体时, Mie 理论的近似解是 Rayleigh 公式, 这种情况下的散射称 Rayleigh 散射, 当 $\alpha \gg 1$ (即球粒直径比光波波长大多) 时, 由衍射理论得到的结果与 Mie 的解一致, 此时的散射称衍射散射。介于 Rayleigh 散射和衍射散射之间的球粒散射一般只能由 Mie 理论给出, 但只要 $\alpha(\mu - 1) \ll 1$, 可用 Rayleigh-Debye-Gans (RDG) 近似式。

2. 用于血细胞的理论散射模型

虽然第二部分中所述的许多散射方法可用于血细胞分类及计数, 但它们中的大部分是根据实验现象来进行分类, 描述血细胞光散射的理论却很有限。瑞利散射 (Rayleigh Scattering) 不能用于哺乳动物细胞中, 因为这种理论只适合于大小与入射光波波长不相上下的粒子, 而有核血细胞却大得多 ($3\mu\text{m} \sim 30\mu\text{m}$ 直径)。Mie 理论可适用于任何直径和折射率大小的球形颗粒, 但这种方法却有一个严重的缺点, 即太复杂。此外, Mie 理论描述的是各向同性球体的弹性光散射 (Elastic Light Scattering), 正常红细胞近似符合这一要求, 然而有核血细胞是各向异性的 (细胞质、细胞核), 并且它们有可能具有不规则的形状。

1972 年, Kerker 等人^[27, 28] 提出一种镀膜球模型 (Coated Sphere Model), 这种模型可以说明细胞内的不均匀状况, 比较接近实际情况。然而这种模型的算法比 Mie 理论更复杂。由于人体血细胞的相对折射率接近于 1, 则 $\alpha(\mu - 1) \ll 1$, 可考虑使用 RDG 近似式。1986 年, Sloop 等人^[20] 通过改进 RDG 近似式的形状因子 (Form Factor) $P(\theta)$, 即使用改进的 RDG 近似式 (Modified Rayleigh-Debye-Gans, MRDG), 给出了一个球壳模型来描述尺寸范围在血细胞大小范围内的弹性光散射。这个模型由两个同心球组成, 里面的球代表细胞核 (半径为 a , 相对折射率为 m_a), 外面的球代表细胞质 (半径为 b , 相对折射率为 m_b)。由于对有核血细胞特别感兴趣, 因此, 细胞核和细胞质的大小和折射率都有限制^[28], 外球的半径为 $1\mu\text{m} \leq b \leq 7\mu\text{m}$, 相对折射率 $m_a \geq 1 + 10^{-6}$, $m_b \leq 1 + 10^{-1}$ 且 $m_a > m_b$, 内球半径/外球半径之比定为 $3.0 / 3.5\mu\text{m}$, 因为这代表了人体周围血液中淋巴细胞的典型值。实验结果^[29] 显示这种简单模型在前向散射

上很适合任何形状和大小的有核血细胞, 并且跟那些复杂理论也符合得很好。然而这一模型没有考虑生物分子的(消)偏振[(De) (polarization)]作用, 许多文献^[30,31]的实验结果对这一点提出了质疑。Sloot 等人^[24]在 1989 年对这种模型作了进一步的改进, 考虑了血细胞的(消)偏振作用, 并计算了血细胞的散射矩阵元素(Scattering Matrix Element), 并尝试根据这些(消)偏振信息对人体血细胞进行分类, 目前这一研究还在进行之中。

四、结 束 语

在过去的 20 余年中, 激光散射技术在血细胞自动计数及分类的应用中取得了很大的进展。然而由于血细胞的形态各异和不均匀性, 要建立血细胞的散射理论模型比较困难, 而现有的模型仍待进一步完善。由于血细胞的聚集和细胞碎片的存在, 要求单位体积中的血细胞数也比较困难。现有的方法多是采用让细胞逐一流过激光照射区(激光流式细胞光度计)或小孔(库尔特计数器)来得到血液样品中细胞的分布情况。这样既增大了仪器的体积又增加了其造价和复杂性。为了简捷、方便地对血细胞进行分析, 迫切需要建立完善的血细胞激光散射理论模型。多分散细胞群的研究也有待进一步深入。此外, 从散射光的偏振性、相移、强度、能量及其分布中得出更多对血细胞计数及分类有用的信息, 减少计算量, 与其它手段并用, 以便快速、有效地对血细胞进行计数及分类也是今后研究的方向。

参 考 文 献

- 1 Keren D F. Flow cytometry in clinical diagnosis. New York: Academic Press, 1989
- 2 Nisiyia I, Cram L S, Gray J W. Flow cytometry and image analysis for clinical applications. Amsterdam, The Netherlands: Excerpta Medica, 1991
- 3 武汉医学院第二附属医院检验科. 实用临床医学检验. 武汉: 湖北人民出版社, 1980
- 4 李树民, 赵晓虹. 动物学杂志, 1988; 23(3): 36~ 38
- 5 Cram L S, Martin J C, Steinkamp J A *et al.* Proc IEEE, 1992; 80(6): 912~ 917
- 6 Meyer R A, Brunsting A. Biophys J, 1975; 15: 191~ 195
- 7 Loken M R, Sweet R G, Herzenberg L A. Ann NY Acad Sci, 1975; 254: 263~ 267
- 8 Michael R L, Parks D R, Herzenberg L A. J Histochem Cytochem, 1977; 25(7): 790~ 795
- 9 Loken M R, Stall A M. J Immunol Methods, 1982; 50: R85
- 10 Bonner W A. Rev Scient Instrum, 1972; 43: 404~ 501
- 11 Mansberg H P. J Histochem Cytochem, 1974; 22: 711~ 719
- 12 Steinkamp J A, Hansen K M, Crisman H A. Rev Scient Instrum, 1973; 44: 1301~ 1308
- 13 Salzman G C, Crowell J M, Martin J C *et al.* Acta Cytol, 1975; 9(5): 374~ 377
- 14 Michael R L. J Histochem Cytochem, 1986; 34(1): 284~ 291
- 15 Salzman G C, Crowell J M, Goad C A *et al.* Clin Chem, 1975; 21(9): 1297~ 1304
- 16 Kerker M. The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation. New York: Academic Press, 1969
- 17 Kaye P H, Ludlow I K, Milburn M R. J Coll Interface Sci, 1980; 70(3): 167~ 171
- 18 Jovin T M, Morris S J, Striker G *et al.* J Histochem Cytochem, 1986; 34(1): 269~ 283
- 19 Steinkamp J A. Rev Scient Instrum, 1984; 55: 1375~ 1386
- 20 Sloot P M A, Figdor C G. Appl Opt, 1986; 25(19): 3559~ 3565
- 21 Hoffman R A, Kung P C, Hansen W P *et al.* Proc Nat Acad Sci(U. S. A.), 1980; 77(8): 4914~ 4917
- 22 Ritchie A W S, Gray R A, Micklem H S. J Immunol Methods, 1983; 64: 109~ 117
- 23 Otten G R. Cytometry, 1982; 3: 182~ 189
- 24 Sloot P M A, Hoekstra A G, Hans van der Liet *et al.* Appl Opt, 1989; 28(10): 1752~ 1761
- 25 Van de Hulst H C. Light Scattering by Small Particles. New York: Wiley Press, 1957
- 26 Kattawar G W. Appl Opt, 1967; 6: 1377~ 1382
- 27 Kerker M, Cooke D D, Chew H *et al.* J O S A, 1978; 68: 592~ 604

激光在男性节育方面的应用

孙朝晖

(滨州医学院, 滨州, 256603)

摘要: 通过对不同专家学者用不同激光分别作用于输精管或睾丸的动物实验和临床应用的阐述, 说明激光能产生一系列生物效应, 达到男性节育的目的。各学者分别从物理、病理、功能等不同方面证实了激光用于男性节育的可靠性。最后笔者认为, 若把氩离子激光通过光纤引导到输精管中进行照射, 输精管便产生纤维瘢痕而堵塞, 且不影响输精管周围的其它组织, 粘连、水肿等近期副作用将大为减少。

关键词: 激光 输精管 睾丸 节育

Application of laser in male birth control

Sun Zhaohui

(Binzhou Medical College, Binzhou, 256603)

Abstract: This paper describes the animal experiment and clinical application of different kinds of lasers affecting respectively deferent duct or testis. It showed that laser could produce a series of biological effects and achieve male birth control. And the result was reliable and the operation was simple. Thus the author considers that vas deferens, if irradiated with argon-laser which is conducted by the optical fibre, will be coagulated by the fibre spots, which can't influence the peripheral tissues of vas deferens and such side-effects as adhesion and oedema will greatly decrease.

Key words: laser deferent duct testis birth control

一、引 言

迄今为止, 已有多种计划生育方法成功地应用于男性节育中^[1~4]。随着激光技术的发展, 利用激光技术作男性节育的实验研究和临床应用, 国内外许多专家学者已做过大量的工作

- 28 Brunsting A, Mullaney P F. Appl Opt, 1972; 11: 675~ 682
- 29 Slood P M A. Elastic Light Scattering from Leucocytes in the Development of Computer Assisted Cell Separation. Ph. D. Thesis, Netherland Cancer Institute, 1066 CX Amsterdam, The Netherland, 1988
- 30 De Grooth B G, Terstappen L W M M, Puppels G J *et al.* Cytometry, 1987; 8: 539~ 552
- 31 Bickel W S, Watkins A J, Videen G. Biological particles as irregularly shaped scatterers. In: Schueman D W ed. Light scattering by irregularly shaped particles, New York: Plenum, 1980: 299~ 305

* * *

作者简介: 杨 晔(附照片), 女, 1968 年 12 月出生。现为西安交通大学生物医学工程研究所博士研究生。现主要从事医疗仪器新技术及光电检测等方面的研究。

张镇西, 男, 1951 年出生。副教授, 博士。主要从事光生物学的研究。

蒋大宗, 男, 1922 年出生。教授, 博士生导师。现为 IEEE Fellow。主要从事医学图象、神经电生理及医学仪器新技术等方面的研究。