

文章编号: 1001-3806(2002)06-0435-04

407nm 辐照激发血细胞荧光光谱分析*

高淑梅^{1,2} 骆晓森² 沈建³ 陆建² 倪晓武²

(1 徐州师范大学物理系, 徐州, 221009)

(2 南京理工大学应用物理系, 南京, 210094)

(3 第二军医大学南京医学院, 南京, 210099)

摘要: 用光栅光谱仪获得了波长为 407nm (±18nm) 的 LED 激发的健康小白鼠的全血、红细胞和血红蛋白的荧光光谱, 并对其产生机理和谱线特性进行了研究。实验结果和理论分析表明, 407nm 的 LED 诱导血液发出的荧光量子转换效率可达 90% 以上, 且主要是由血液中红细胞上的荧光团产生的; 溶血的红细胞产生荧光的量子产额明显较低, 光谱特征也发生明显变化, 且红细胞和血红蛋白的荧光光谱有较大的差异; 血红蛋白的荧光量子产额将随浓度发生明显变化。

关键词: 荧光光谱; LED; 荧光团; 血细胞

中图分类号: O657.31; R331.1⁺4 **文献标识码:** A

Analization of blood cells fluorescence spectra induced by LED at the wavelength of 407nm

Gao Shumei^{1,2}, Luo Xiaosen², Shen Jian³, Lu Jian², Ni Xiaowu²

(¹ Department of Physics, Xuzhou Normal University, Xuzhou, 221009)

(² Department of Applied Physics, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, 210094)

(³ Nanjing Medical College, Second Military Medical University, Nanjing, 210099)

Abstract: The fluorescence spectra for whole blood, erythrocyte and hemoglobin from healthy and fresh experimental mice under the wavelength of 407nm (±18nm) excitation are measured by a grating spectrometer, and their emitting mechanism and spectral characteristic are investigated. The experimental results and theoretic analization about it are presented in this paper. It shows that the blood or erythrocyte emitting fluorescence quantum yield efficiency under 407nm-LED excitation may reach above 90%, the blood fluorescence mainly result from fluorophores of the erythrocyte, but fluorescence spectra of hemoglobin by 407nm-LED excitation are obviously different from that of erythrocyte, and the fluorescence quantum yield of cracked erythrocyte remarkably declines and its spectral profiles are being distorted with the consistency of the cracked erythrocyte increasing.

Key words: fluorescence spectrum; LED; fluorophores; erythrocyte

引言

利用光诱导产生的荧光光谱了解生物大分子的结构或诊断生物组织病变已经盛行很多年了, 在临床上荧光显微镜和血细胞计数器等仪器已经成了检查人的身体健康状况的基本工具。其中比较具有实用价值的是利用激光诱导自体或离体的癌组织使其

产生荧光的方法诊断癌症^[1~4], 进而利用血卟啉衍生物 (HpD) 的光敏效应进行治疗癌症的方法^[5]。另一方面, 低功率激光照射的治疗效果也得到了该领域许多专家的认可^[6], 因而在许多国家的临床上得到广泛的应用研究。许多临床报道表明, 该疗法不仅对各种病因引起的久治不愈的伤口有很好辅助治疗效果^[7], 而且通过激光在血管内照射可以对许多疾病有很好的治疗效果或辅助治疗作用^[8], 所以, 至今仍为研究热点之一。但是, 这些利用激光或其它光进行治疗方法所对应的物理机理也一直是国内外学者关注的热点问题, 已从不同的方面进行了相关的研究^[9], 至今为止, 尚未得到公认的、较为完善的理论体系。

* 校重点科研资助项目。

作者简介: 高淑梅, 女, 1961 年 12 月出生。副教授。主要从事光子生物医学和光学全息技术的科研与教学工作。

收稿日期: 2002-01-15; 收到修改稿日期: 2002-04-28

血液在生物体内可以说是无所不在,在与光有关的各种诊断或治疗方法中,都不可避免地要涉及到光与血细胞的相互作用问题,因而研究光诱导血液中主要细胞产生荧光光谱及其特征谱线是十分必要的。近年来,就有我国学者关于 He-Ne 激光激发血液产生的荧光光谱初步分析和研究的报道^[10]。

根据荧光发射的特点,即当生物大分子吸收了激发光光子后,转变为受激发的单态,进而当出现辐射性的单态衰变为单态基态时,就将产生荧光^[11]。荧光光谱的特征波长一般比吸收波长要长些^[12],因而适当减小激发光的波长将可能得到更为丰富的荧光光谱。考虑到激光波长在选择时具有一定的局限性,而发光二极管(light emitting diode, LED)性能在功率和波长等主要方面都可以达到相当稳定的程度,对应的频谱宽度也可以较窄,基本上能满足本文中涉及的实验要求。为此,通过对紫光辐照诱导荧光光谱的分析和研究,着重对光与血细胞的相互作用过程及其对应物理机理进行研究。考虑到血液中的主要成分是红细胞,红细胞主要由血红蛋白组成,所以,首先对全血的荧光光谱进行观察,进而对红细胞和血红蛋白溶液的荧光光谱进行分析和比较,从中判断血液荧光的产生机制。

另一方面,所使用的 LED 器件成本低、价格廉,输出功率也可以达到 5mW 以上,波长选择范围广,便于今后推广使用。

1 实验材料与方法

1.1 实验装置

获得血细胞荧光光谱的实验装置如图 1 所示。采用天津港东公司生产的 WGD-8 型多功能光栅光谱仪,其

中的光电转换器件是日本的 Hamamatsu 公司生产的 R928 型光电倍增管(PM),其输出端与计算机相联,所有信息经计算机处理后以图像的形式显示在计算机的显示器上。仪器的波长扫描范围为 200nm ~ 850nm,考虑到多次实验均未见波长小于 350nm 波段出现谱峰,因而所给出的光谱图中波长范围是 350nm ~ 850nm。激发光源为峰值波长在 407nm ($\lambda_{1/2}$ 18nm)、功率为 6mW 的 LED。因为光谱仪

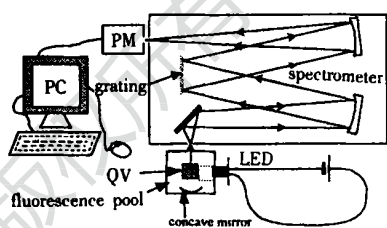


Fig. 1 Schematic diagram of the experimental setup

的有关参数值不同,谱线高度差异较大;其中加在光电倍增管上的高压值称为负高压,分 8 个档次;后置放大器的放大率称为增益,分 7 个档次。这两者中的任何一个数值的增大,都会使谱线的幅度增高,尤其以负高压的影响最大。因此,仪器的负高压和增益对应的数值越大,所获得谱线图幅值越大,因而以下光谱图中纵轴所给出只是相对光强。

1.2 血液样品的制备

实验所用的血液样品均来自实验用的健康的小白鼠。经眼眶采血,加 5% 的肝素抗凝获得全血溶液;根据所得到的全血溶液浓度,取出一部分再加入适量的生理盐水,配制成 2% 的全血溶液备用;将余下的部分加适量的生理盐水,经 1500r/min、旋转半径为 12cm 的高速离心机 10min 分离,去除上清液,重复两次上述过程,获得红细胞,用生理盐水稀释至浓度为 1%;再取出部分红细胞加适量的蒸馏水使其裂解,制成 0.5% 和 0.125% 血红蛋白溶液备用。

1.3 获取荧光光谱的方法

用不发荧光的石英比色皿盛装被测样品 2mL,并将其置于荧光池内中心位置(见图 1),LED 的前端套有一个箔金纸筒,以阻止由 LED 直接射入接收的狭缝。所有样品的荧光光谱检测过程均在夏末的室温下进行的(28 ~ 30),扫描间隔为 0.1nm,每 1 点的扫描次数为 456 次,每 1 次扫描全过程需要 1.5min,每一样品均进行 3 次扫描测试,并且每 1 次测试前均进行摇动以保证血细胞溶液的均匀性,3 次测得的实验结果都基本稳定一致。

2 结果

实验结果如图 2 ~ 图 7 所示。图 2 给出的是在没有任何血细胞时,石英比色皿中只是生理盐水,

用 407nm 的 LED 照射时所得到的光谱,可看出除了紫色 LED 自身谱线,并无其它谱峰(实际扫描范围为 200nm ~ 850nm),这里选择的增益为 6,负高压为 5。图 3 ~ 图 7 都是在光谱仪检测灵敏度为最大时,即增益是 7、负高压为 8 的条件下进行检测的。图 3 和图 4 分别是浓度为 2% 的全血和浓度为 1% 的红细胞溶液在 LED 的 407nm 光辐照激发下产生

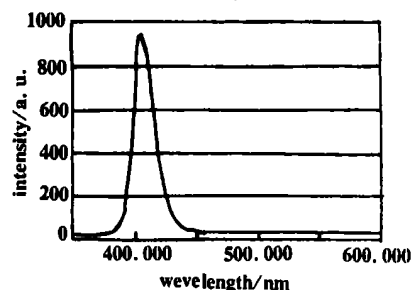


Fig. 2 The scatter spectrum of LED light while there is no blood samples in the QV

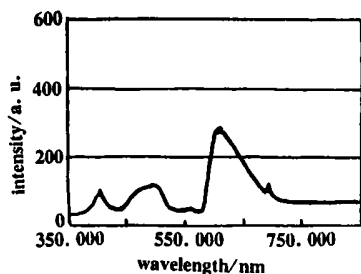


Fig. 3 Whole blood fluorescence spectra excited at about 407nm under the concentration of 2%

不同。它们的光谱图中都存在 5 个峰值:第 1 个是在 407nm 处,显然是激励光源所为,其大小在一定程度上可以表明血细胞对激发光源的吸收情况,显然红细胞溶液比

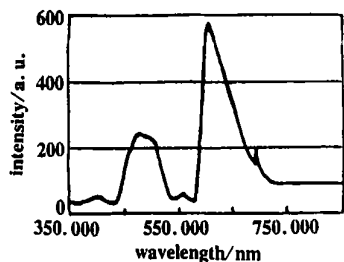


Fig. 4 The erythrocyte fluorescence spectra excited at the wavelength of 407nm under the concentration of 2%

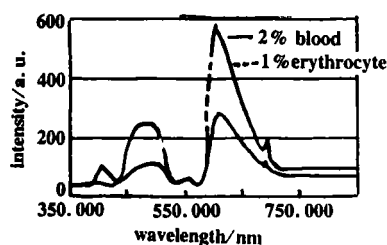


Fig. 5 Compared the whole blood fluorescence spectrum with the erythrocyte's

弱的荧光峰,峰值位于 560nm 处;第 4 个峰是最强的谱峰,峰值位于 607nm 处,是血细胞的主要荧光谱线;最后的是一个较弱的但比较锐的谱峰,峰值在 694nm 处。

浓度为 0.5% 和 0.125% 的血红蛋白溶液激发的荧光光谱分别在图 6 和图 7 中给出。由图可见,浓度为 0.5% 的血红蛋白溶液所发出的荧光远低于浓度为 0.125% 血红

蛋白溶液产生的荧光;但血红蛋白溶液辐射的荧光光谱特征与红细胞发出的荧光光谱有较大的差异。

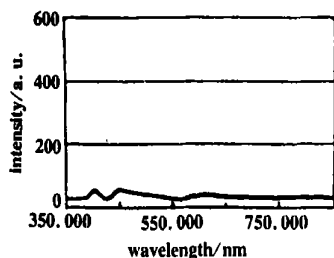


Fig. 6 The hemoglobin fluorescence spectra excited by 407nm LED under the concentration of 0.5%

的荧光光谱。图 5 是为了便于比较将图 3 和图 4 中光谱曲线合在一起而获得的。值得注意的是,全血荧光光谱与红细胞的荧光光谱特征几乎完全相同,只是强度

3 讨论

根据以上实验所获得的光谱图,可得到以下结论。

(1) 比较图 2 和图 4 可见,在图 4 中激励光通过红细胞溶液后绝

大部分能量转换为荧光光能,其荧光量子转换效率可达 90% 以上。可以认为红细胞在波长为 407nm 的激励光作用下,可使红细胞的主要荧光团较好地吸收激励光能量,进而转换为荧光光子能量。(2) 比较图 3 和图 4 可知,当产生荧光物质为全血溶液时,由于该溶液中存在较多的其它大分子,因而引起的散射光较强,致使激励光对应的峰值较大。考虑到在图 3 和图 4 两者的红细胞浓度不完全相同,其差值约为 0.2%。根据以往的实验结果,当红细胞浓度不同时,产生散射光的强度不同,因而引起了激励光峰值强度这一差异。(3) 图 5 中给出的两条光谱线对应的红细胞浓度差约为 0.2%,虽然对应谱线的峰值强度有所差异,但谱线的相对结构具有可比性,两者所对应的峰值位置几乎完全相同。也就是说,红细胞溶液与全血溶液所获得的光谱图特征基本一致,但其幅值有所差异,且全血溶液对应的幅值要小。比较二者,认为这可能是全血溶液所含物质较红细胞溶液复杂,其中有某种物质或少量破碎的红细胞可能起到荧光猝灭剂的作用,因而影响了荧光强度。(4) 比较图 3~图 7 易见,血红蛋白溶液在 LED 辐照激发下所发射的荧光光谱特征与红细胞发出的荧光光谱明显不同,可以认为所涉及的 LED 辐照诱导的血液荧光光谱主要是红细胞产生的。注意到红细胞的主要成份是血红蛋白,但当红细胞加蒸馏水裂解(或称溶血)后,即出现这种荧光谱线强度和位置的明显差异。众所周知,各种卟啉发射的荧光光谱峰值随环境在 594nm ~ 630nm 的范围内^[13]变化,红细胞上存在大量的血红素,其上的由原卟啉组成的荧光团吸收了波长为 407nm 的光子而受激跃迁至激发态,所以,图 5 中最强的 607nm 处的荧光峰是由原卟啉组成的荧光团所产生的,且对应的相关能级为 $^1S_{1,0}$ - $^1S_{0,0}$ ^[11]。根据共振能量转移形成的条件^[14],当红细胞发生溶血时,其中的血红蛋白大分子之间将发生共振能量转移,引起自

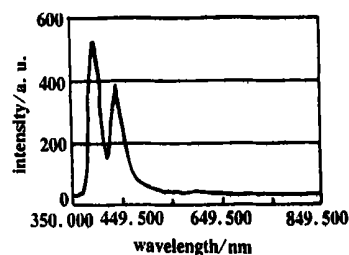


Fig. 7 The hemoglobin fluorescence spectra excited by 407nm LED under the concentration of 0.125%

吸收,从而使荧光光谱强度降低,荧光光谱的特征也会随着溶血程度的加剧而发生变化。从而可以解释红细胞与血红蛋白产生荧光谱线的强度和峰值位置都明显不同的特点。这一实验结果可能会对某些有溶血的病理检查提供一定的指导作用。(5)进而根据 Niemi 等人所给的 HpD 的能级图分析^[11], 564nm 和 694nm 处的荧光峰可能是由其中的 $^1S_{1,1}$, $^1S_{0,0}$ 和 $^1S_{1,0}$ $^1S_{0,2}$ 产生的。但这两种跃迁的几率很小,或者对应的激发态能级寿命较短。同时,因环境等因素的影响,其能级也将存在一定的扰动和分裂,实验结果也证实了这一结论。(6)比较图 6 和图 7 还可以看出,血红蛋白的荧光量子产额随浓度发生明显变化,而且浓度越高,量子产额越低。这也是因为当红细胞发生溶血时,将产生共振能量转移,引起自吸收,从而使荧光光谱强度降低。(7)至于 470nm ~ 506nm 宽谱峰,经过分析,可能是红细胞膜上的多种荧光团共同的作用,这些荧光团在此范围内有相近的激发单态和跃迁到被进一步分裂的振动态几率,从而形成较宽的谱峰。具体由哪些荧光团参与发光,还有待于进一步研究。

通过研究紫色 LED 光诱导血细胞荧光光谱的研究,将对进一步解释低强度激光照射疗法的治疗

机理有一定的参考意义。考虑到生命组织的复杂性,影响因素也是多方面的,对应的理论体系尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 李 静,李世荣,高 革 *et al.* 中华肿瘤杂志,2000,22(5):893 ~ 993.
- [2] 金曼文,宋支才. 激光杂志,1991,12(3):148 ~ 150,131.
- [3] 刘文清, Ram R. 科学通报,1989,34(9):700 ~ 703.
- [4] 赵箭光,杨佩青. 中国医学物理学杂志,1996,13(4):220 ~ 222.
- [5] Kessel D. IEEE J Q E,1987, QE23(10):1718 ~ 1720.
- [6] Tiina I. IEEE J Q E,1987, QE23(10):1703 ~ 1717.
- [7] Kertesz I, Fenyő M, Mester E *et al.* Opt Laser Technol, 1982, 14:31 ~ 32.
- [8] 朱平主编. 低强度激光血管内照射疗法. 南宁:广西科学技术出版社,1999.
- [9] 兰秀凤,刘晓然,王亚伟 *et al.* 中国激光,2000,27(5):477 ~ 480.
- [10] 陈 荣,陈艳娇,杨文琴 *et al.* 激光生物学报,1999,8(1):62 ~ 65.
- [11] Niemi M H. Laser-tissue interactions fundamentals and applications. Heidelberg:Springer-Verlag Berlin,1996.
- [12] 林克椿主编. 生物物理学. 武汉:华中师范大学出版社,1999.
- [13] Udenfriend S. Fluorescence assay in biology and medicine, New York: Academic,1962.
- [14] Fisher F, Arnold J R P. Instant notes in chemistry for biologists. BIOS Scientific Publishers Limited,1999.

(上接第 434 页)

3 讨论和结论

在一定的激光强度范围内,激光对红外系统输出信号的有效干扰主要表现为对红外系统输出信号饱和、瞬时致盲和恢复过程的时间。在一定的激光强度/辐照时间下,激光的辐照强度/辐照时间与致盲和恢复过程的时间成正比;但当激光强度/辐照时间增加到一定时,输出信号致盲和恢复过程的时间变化不明显,并逐渐趋于稳定,其原因主要是由信号处理电路 RC 时间常数引起的;当激光强度/辐照时间再继续增加时,激光加热滤光片使探测器环境温度增高,导致系统输出信号致盲和恢复过程的时间明显缩短、灵敏度下降。

研究表明:激光对红外系统输出信号的失效时间不但与滤光片/探测器吸收入射光能量产生的热效应有关,而且还主要取决于信号处理电路 RC 时间常数的影响。根据红外系统输出信号电路的原理分析,利用脉冲响应公式解释了激光辐照红外系统

输出信号饱和、消失,然后缓慢恢复信号的现象。RC 时间常数越大,饱和恢复时间越长。实验验证了这种结论,说明这种解释有一定的合理性。也就是说,激光对红外系统输出信号致盲和恢复过程的时间是信号处理系统电路本身特性固有的。对于激光短时间/低强度辐照来说,信号处理电路 RC 时间常数对输出信号的影响比激光引起的热效应要严重得多。显然,它有助于激光(或脉冲激光)对红外系统输出信号的有效干扰,并最终导致红外系统功能失效。研究结果对深入开展激光辐照红外系统的失效机理研究具有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 何启予,金国祥,周茂树. 飞航导弹红外导引头. 北京:宇航出版社,1995.
- [2] 邓仁亮. 光学制导技术. 北京:国防工业出版社,1992.
- [3] 杨臣华,梅遂生,林钧挺 *et al.* 激光与红外手册. 北京:国防工业出版社,1990.
- [4] Richard D. Hudson J R. Infrared system engineering. Wley,1969.
- [5] 张敬贤,李玉丹,金伟其. 微光与红外成像技术. 北京:北京理工大学出版社,1995.