

文章编号: 1001-3806(2004)03-0312-03

不同波长的 Ar⁺ 激光诱导红细胞荧光光谱特性分析

高淑梅¹, 兰秀凤², 刘莹², 沈中华², 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)

摘要: 根据对可见波段、不同波长的 Ar⁺ 激光激发同一浓度红细胞溶液产生荧光光谱的研究, 发现从 600nm 到 860nm 较大的范围内红细胞均存在较为丰富的荧光光谱谱峰, 且在波长为 620nm 附近的谱峰随激发光波长的变化而变化。通过理论分析得到, 激光诱导的红细胞荧光光谱主要是红细胞膜上的细胞色素基团、双磷脂分子等以及红细胞中的血红蛋白大分子中的血红素基团等构成的多种荧光团作用的结果, 且在 620nm 附近的谱峰不仅含有荧光光谱成分, 还有喇曼散射的光谱成分。研究结果可对低功率激光诱导生物组织荧光光谱技术在医疗中的应用有参考意义。

关键词: Ar⁺ 激光; 荧光光谱; 红细胞; 荧光团

中图分类号: R318.51 **文献标识码:** A

Analysis of Ar⁺ laser-induced erythrocyte fluorescence spectra with various wavelengths

GAO Shu-mei¹, LAN Xiufeng², LIU Ying², SHEN Zhong-hua², LU Jian², NI Xiaowu²

(1. Department of Physics, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221009, China; 2. Department of Applied Physics, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract: Based on the investigation of Ar⁺ laser induced erythrocyte fluorescence spectra with various visible wavelengths under certain concentration of erythrocyte, it is found that there are plentiful peaks in the fluorescence spectra from 600nm to 860nm, and the peaks near 620nm change with the variation of exciting light wavelength. The results indicate that laser induced erythrocyte fluorescence spectra are mainly due to numerous fluorophores from part thereof cytochrome, and pair phosphatide on the erythrocyte membrane and the part thereof haem from the hemoglobin. In addition, there are not only laser excited erythrocyte fluorescence peaks but also the Raman scattered light by the erythrocyte in the near 620nm. The investigation may be useful for low lever laser induced tissue fluorescence spectra applied in medical treatment.

Key words: Ar⁺ laser; fluorescence spectra; erythrocyte; fluorophore

引 言

早在 70 年代初期, 激光诱导荧光光谱诊断技术就已经引起了人们的广泛关注, 特别是近年来兴起的根据激光诱导正常的和病变的生物组织荧光光谱来诊断肿瘤技术的研究和应用^[1]已成为该领域的研究热点之一, 即正常组织或病变组织的特征荧光光谱是临床诊断的重要依据。尽管有关这方面的研究报道比较多, 但是所得到的结果或是结论还存在较

大的差异, 尚未有明确的规律可循, 更未形成理论体系。究其原因, 一是生物组织本身是很复杂的, 影响因素也比较多, 另一方面血液的荧光光谱在其中的作用也不可忽视, 许多疾病都可能导致血细胞性质的变化, 从而引起其荧光光谱特性的变化。因此, 有必要对低功率光激发的健康血液荧光光谱特性进行较为全面和深入的研究。

在进行相关研究工作时发现, 低功率光照射血液时可产生较强的荧光^[2], 进而又对用低功率光诱导的全血^[3]、红细胞和血红蛋白的荧光光谱^[4]进行了研究。已发现中心波长相近的不同光源所激发的血液荧光光谱也存在较大的不同^[5]。作者进一步对不同波长的低功率氩离子激光激发的红细胞荧光光谱特性进行了实验研究, 并提出 Ar⁺ 激光激发的红细胞荧光光谱在 650nm 后的谱峰主要是红细胞膜上

基金项目: 江苏省教育厅科研资助项目(02KJB140006);

教育部高校优秀青年教师奖励计划资助项目(2002)

作者简介: 高淑梅(1961), 女, 博士, 教授, 主要从事激光全息和光子生物学方面的科研和教学工作。

E-mail: nxw@mail.njtu.edu.cn

收稿日期: 2003 06 24; 收到修改稿日期: 2003 10 20

的诸多荧光团的贡献,进而对激光激励红细胞产生荧光的机理进行了理论研究。

1 实验材料与方法

1.1 实验装置

实验装置如图 1 所示。图中光电转换器件是日本 Hamamatsu 公司生产的 R955 型光电倍增管 (PM)。该光谱仪波长扫描范围为 160nm~ 900nm。为突出重点,仅给出了对显示荧光光谱有效部分波段的光谱图。激光光源是 Spectra-Physics Lasers Inc. 生产的 2060-5S 型 Ar⁺ 激光器,其可输出从 457.9nm 到 528.7nm 多种波长的单色光,本文中给出的是 457.9nm, 476.5nm, 488.0nm, 501.7nm 和 514.5nm 5 种波长的激光激发红细胞产生荧光光谱。为了增加试样的受照射面积,激光光束又被扩束和准直,如图 1 所示。文中选用的激光输出功率为 420mW,而实际照射到样品表面的激光功率为 18mW,作用在红细胞溶液样品上的激光照射光斑面积约为 0.7cm²,因而照射在样品处的激光功率密度为 25.7 mW/cm²。

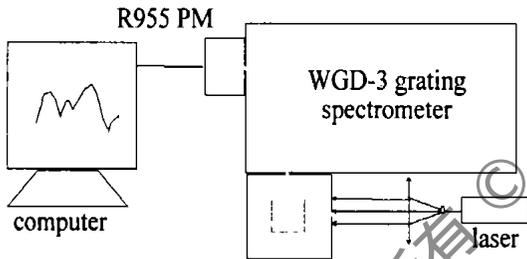


Fig. 1 Experimental setup

1.2 试样制备

血液样品取自一只健康的、雌性小白鼠。经眼眶采血,体积分数为 5% 的肝素抗凝。进而用 TGL-16C 型高速离心机常规分离血细胞,获得红细胞。再加入适量生理盐水,配制成体积分数为 3% 的红细胞溶液备用。每次检测时取新样品 2.5mL。所有检测均在 24℃ 的室温下进行,扫描间隔为 0.2nm。每次检测前摇匀,并重复测量 3 次以上。

2 结果

当实际照射于样品表面的功率密度为 25.7 mW/cm², 波长为 457.9nm, 476.5nm, 488.0nm, 501.7nm 和 514.5nm 的激光分别激发体积分数为 3% 的红细胞溶液所获得的荧光光谱,如图 2a~ 图 2e 所示。图中为了更清楚地看到每个谱峰变化情况,其中的谱线已经过平滑处理。

由图 2 可见,荧光光谱在波长为 666 nm 以后的

谱峰位置基本不随激发光波长的改变而改变,而不同波长的激光激发的荧光光谱的各谱峰强度有所不同。根据荧光发射理论^[6],荧光光谱的谱峰分布是不随激发光波长变化的,所以这些谱峰均应是荧光。

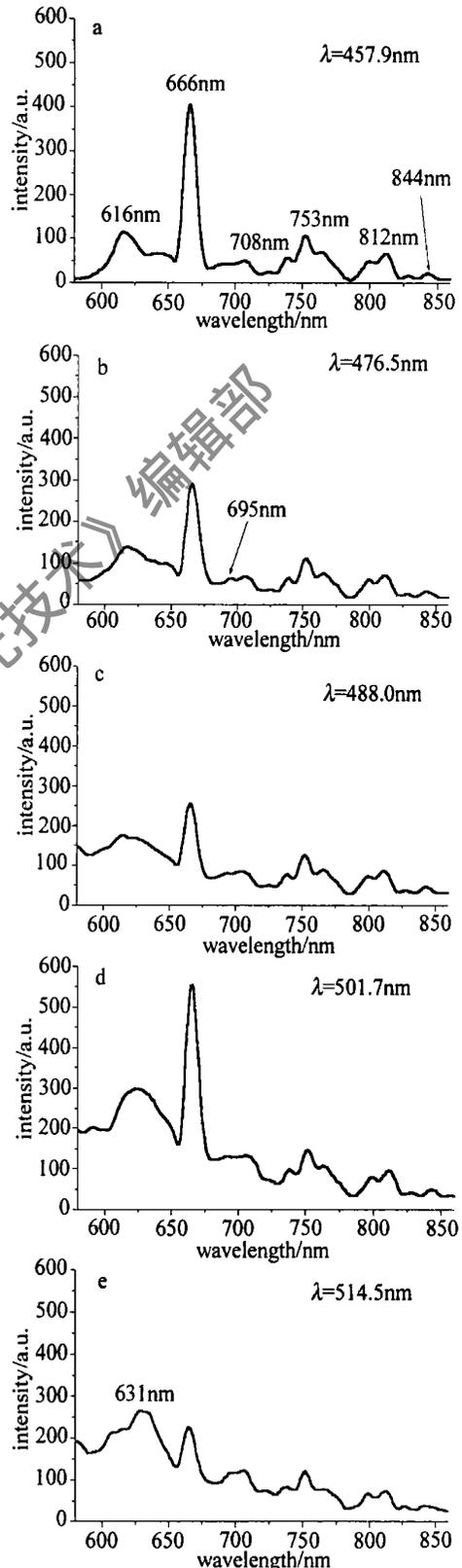


Fig. 2 Laser induced erythrocyte fluorescence spectra with various wavelengths

而图2中位于600nm~650nm波段内的谱峰变化相对比较复杂,当激发光波长为457.9nm时,在该处所获得荧光为比较明显的单峰结构,随着激发光波长的红移,该处的谱峰也在逐渐加宽,到514.5nm时,该谱峰已经成了双峰结构了。经过仔细观察和分析,作者认为该谱峰可能是由两个谱峰组成的,荧光光谱谱峰分布不随激发光波长变化,但有些谱峰的强度与激发光波长一定有关系,其中616nm附近的谱峰对激发光波长不太敏感,而631nm附近的谱峰强度随激发光波长的红移而增大。另一方面,激发光的散射谱带加宽也对该谱峰的位置产生一定的影响。

3 理论分析

3.1 红细胞上的多种荧光团的贡献形成了荧光光谱丰富的谱峰

根据分子荧光发射理论,不同波长的光波激发荧光发射团(简称荧光团)时,可将荧光团激发到它的几个不同的电子激发态,但是由生物大分子构成的荧光团含有众多原子或分子等,具有很高的内转换和振动弛豫,不管起初激发到了哪个电子态,或其中的哪个振动态及转动态,它们总要通过内转换释放多余能量,迅速地弛豫到第一激发态的基振动态,荧光发射都是从第一电子激发态的基振动态向基电子态各振动能级上的跃迁,如图3所示,图中虚线表示较高的振动态。生物大分子具有很复杂的能级结构,能级的数目随分子中原子数目的增加变得非常多,使得其基态包含大量的振动能级。然而,根据能级跃迁理论,处于激发态的电子向各振动能级跃迁的概率也是不同的,所以形成的不是一条均匀的宽谱带。但是,无论哪一种荧光团,其基态的宽度都是有限的。所以图2中的荧光光谱峰并非是一个荧光团所为,而是多个荧光团共同作用的结果。

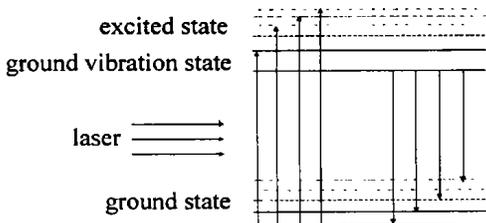


Fig. 3 The mechanism of a fluorophore emitting fluorescence

红细胞分子的组成和结构都非常复杂,仅其中细胞膜上的色素基团、双极性的磷脂^[7]等生物大分子就可形成众多荧光团,所以690nm~850nm之间的众多荧光峰主要是由红细胞膜上的各种较弱的荧

光团贡献的,这些较弱的荧光团只有在激光的作用下才能被激发产生荧光,在普通的准单色光激发的血液荧光光谱中未见到这部分荧光峰^[2-4]。这一点也许可以进一步说明医学上为什么激光可以治病而普通光不能或疗效不明显的原因。

红细胞内的血红蛋白中含有大量的卟啉环,它们可形成卟啉类荧光团,这些荧光团都可以直接在激光的作用下产生荧光。已经知道,卟啉类荧光团的荧光发射范围是610nm~690nm,主要发射峰是在630nm附近,其次是690nm,但随环境的变化谱峰其发射范围也有所变化^[8]。所以在616nm和695nm附近的谱峰主要是卟啉类的荧光团的贡献,至于666nm这个较强的谱峰,它不仅由卟啉类荧光团发射的荧光的贡献,可能其它荧光团在此处也刚好存在发射峰。

3.2 荧光光谱的强度与激发光波长有关

荧光强度 F 取决于激发态的初始分布 I_a 与荧光量子产率 Φ_f 的乘积。这里的 F 指的是向各个方向上发射的荧光强度的总和,实际上,光谱仪收集的只是其中的一小部分,因此,仪器测到的荧光强度为 $F = I_a \Phi_f Z^{[9]}$, Z 是仪器因子。

根据 Beer-Lambert 定律^[9]:

$$I_a = I_0 - I_t = I_0 \{1 - \exp[-2.3 \epsilon(\lambda_a) Cl]\} \quad (1)$$

式中, I_0 为入射光强度; I_t 为透过样品后的光强度; $\epsilon(\lambda_a)$ 为样品在激发波长 λ_a 处的消光系数; C 为样品分子的浓度; l 为光程。

因而荧光强度 F 为:

$$F_\lambda = I_a \Phi_f Z = I_0 \{1 - \exp[-2.3 \epsilon(\lambda_a) Cl]\} \Phi_f Z \quad (2)$$

式中, $\epsilon(\lambda_a)$ 与荧光团的能级跃迁几率 w_{mk} 成正比。

作者所用的 Ar^+ 激光可看作是一束沿 z 轴传播的平面偏振光(沿 x 方向振动),其电场可表示为:

$$E_x = E_0 \cos(2\pi z / \lambda - \omega t) \quad (3)$$

则当激光照射到红细胞溶液时,红细胞中荧光团上的电子在此电场中的势能可写为:

$$H' = exE_x \quad (4)$$

根据量子力学的微扰理论,在理想化的情况下,荧光团在单位时间由 Φ_k 态到 Φ_m 态跃迁概率可写为^[10]:

$$w_{km} = K |x_{mk}|^2 I(\omega_{mk}) \quad (5)$$

式中, $I(\omega_{mk})$ 为频率为 ω_{mk} 的激光的能量密度; $|x_{mk}|$ 是一个与荧光团所处的量子状态有关的量; K 为一常数。

因此可得荧光强度:

(下转第318页)

的不透明缺陷,如图 6b 所示(PMMA 溶于亲水性溶剂 DMF),主要是由于溶剂的吸水性造成的^[5]。可在旋涂容器上方通干燥氮气或采用亲水性弱的溶剂制备镀膜溶液来避免这种缺陷的产生。(3) 慧尾状缺陷:如果在旋涂的过程中,不慎在基片上沾染了灰尘颗粒,就会造成如图 6c 所示的慧尾状缺陷。慧尾部分背向旋膜仪的转轴中心,灰尘的存在挡住了其后的空间,而导致图中慧尾部分的薄膜厚度明显低于其它部分。因此,旋涂过程应尽量在超净间完成,防止灰尘污染基片。

通过避免以上所说的各种可能造成缺陷原因,可以制备出高质量的 PS 薄膜。图 6d 为笔者采用高沸点低吸水性溶剂环己酮制作的无缺陷优质 PS 薄膜显微图。

3 结 论

基于以上的讨论,可以初步总结出制备用于光波导的优质聚合物薄膜的几点关键要素:(1) 可以通过调节旋膜溶液浓度和旋膜转速来得到所需要的薄膜的厚度;具体参数的选择可参考从实验中总结出来的经验公式;(2) 尽量使用高沸点溶剂,可以使薄膜表面平整度好,也不会产生桔皮状缺陷;如果一定要使用挥发性溶剂,应采取一定措施避免溶剂挥

发过快;(3) 尽量使用亲水性弱的溶剂,避免溶剂在旋涂的过程中吸水导致云雾状缺陷的产生。

使用高沸点低吸水性溶剂环己酮,在硅片上制得了用于光波导的高性能 PS 薄膜。该薄膜厚度 4 μm ~ 5 μm ,无上述的各种缺陷,表面粗糙度控制在 6nm~ 7nm 左右,波长 1553nm 下折射率为 1.545,损耗可望在 1dB/cm 以下,可应用于平面光波导器件的制作。

参 考 文 献

- [1] 王浩敏,李佐宜,林更琪 *et al.* 光波导用玻璃薄膜的制备及其性能研究 [J]. 光电子技术与信息, 2002, 15(1): 28~ 31.
- [2] EMSLIE A G, BONNER FT, PECK L G. Flow of a viscous liquid on a rotating disk [J]. J A P, 1958, 29: 858~ 862.
- [3] DAMON G F. The effects of whirler acceleration on the properties of the photoresist film [A]. Proceedings of the Second Kodak Seminar on microminiaturization [C]. New York: Eastman Kodak Co, 1967. 36~ 42.
- [4] DAUGHTON W J, GIVENS F L. An investigation of the thickness variation of spurr on thin films commonly associated with the semiconductor industry [J]. J Electrochem Soc, 1982, 129: 173~ 179.
- [5] LAI J H. An investigation of spin coating of electron resists [J]. Polym Engg Sci, 1979, 19: 1117~ 1121.
- [6] SPANGLER L L, TORKELESON J M, ROYAL J S. Influence of solvent and molecular weight on thickness and surface topography of spin coated polymer films [J]. Polym Engg Sci, 1990, 30: 644~ 653.

(上接第 314 页)

$$F_{\lambda} = I_0 \{ 1 - \exp[- 2.3 \varepsilon(\lambda_0) Cl] \}^{\varphi_F Z} \\ K' I_0 \{ 1 - \exp[- 2.3 \varepsilon(\lambda_0) Cl] \}^{\varphi_F Z} |x_{mk}|^2 I(\omega_{mk}) \quad (6)$$

由(6)式可以看出,不同波长的 Ar⁺ 激光激发红细胞产生荧光光谱的谱峰强度不仅与激发光的能量密度 $I(\omega_{mk})$ 有关,而且与激发光波长有关。这种荧光强度与激发光波长的关系可能对医学上用于诊断和治疗的激光光源的选择上有一定的参考作用。荧光峰的强弱或位置的变化可在一定程度上反应出生物组织内部结构的变化,但是对应的生物效应是如何变化尚有待进一步研究。

4 结 论

由理论分析得到,红细胞上的多种荧光团的贡献形成了荧光光谱丰富的谱峰,且荧光光谱的强度与激发光波长有关。该结果对低功率激光诱导生物组织荧光光谱技术在医疗中的应用有参考意义。

参 考 文 献

- [1] CHEN W, HE B, WEI G H. Ultraviolet laser induced fluorescence spectroscopy diagnosis of human stomach malignant tissues [J]. Lasers Med Sci, 1998, 13: 209~ 213.
- [2] GAO Sh M, LUO X S, LAN X F *et al.* Analyzing of LED induced blood fluorescent spectra [J]. Chinese Journal of Lasers, 2002, B11(4): 315~ 318.
- [3] 高淑梅, 骆晓森, 兰秀凤, *et al.* 可见光诱导血液荧光光谱特性的研究 [J]. 激光杂志, 2002, 23(5): 71~ 72.
- [4] 高淑梅, 骆晓森, 沈 健 *et al.* 407nm 辐照激发血细胞荧光光谱分析 [J]. 激光技术, 2002, 26(6): 435~ 438.
- [5] 骆晓森, 倪晓武, 陆 建 *et al.* 不同波长光照射血液诱发的荧光光谱研究 [J]. 中国激光, 2003, A30(1): 93~ 96.
- [6] 陆同兴, 路轶群. 激光光谱技术原理与应用 [M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999. 230~ 233.
- [7] 施密德舍思拜 H, 格鲁瑙 G, 布罗伊尔 H. 图解血液流变学 [M]. 北京: 科学出版社, 1989. 46.
- [8] NIEMZ M H. Laser tissue interactions fundamentals and applications [M]. Berlin: Springer Verlag Heidelberg, 1996. 51~ 53.
- [9] 赵南明, 周海梦. 生物物理学 [M]. 北京: 高等教育出版社 & Springer Verlag Heidelberg, 1992. 287~ 300.
- [10] 周世勋. 量子力学 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1982. 160~ 167.