

文章编号: 1001-3806(2005)06-0579-03

偏振荧光光谱在肝病诊断中的应用研究

吴 敏¹, 丁建华^{1*}, 王传晶²

(1. 大连理工大学 物理系, 大连 116024; 2 中国人民解放军第 210 医院, 大连 116021)

摘要: 利用 488.0nm 激发光诱导肝病变患者及健康人血清的自体荧光, 在 495nm~640nm 范围内进行荧光光谱、水平和垂直偏振荧光光谱采集。实验结果表明, 肝病变患者血清的荧光光谱带宽与正常人的相比差异不明显。但是, 肝病患者的血清的水平和垂直偏振荧光光谱的半峰全宽和 0.707 带宽 (强度为 1/2 时的带宽) 都比健康人血清的带宽宽。这一结果对于肝病的诊断研究有一定的参考价值。

关键词: 偏振荧光光谱; 自体荧光; 半峰全宽; 带宽; 血清

中图分类号: R318.51 **文献标识码:** A

Study on the polarization fluorescence spectra used for the liver disease diagnosis

WU Min¹, DING Jian-hua¹, WANG Chuan-jing²

(1. Department of Physics, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China; 2. the 201th Hospital of PLA, Dalian 116021, China)

Abstract: The human serum polarization fluorescence spectra (SPFS) are excited with 488.0nm Ar-ion laser and collected between 495nm and 640nm both in horizontal and vertical polarization direction respectively. The bandwidth of the SPFS are calculated both in the fullwidth at half maximum and 0.707 bandwidth in intensity. The SPFS from the abnormal are always wider than those from the healthy. However, the difference in the serum fluorescence spectra (SFS) is not obvious. This above result is a valuable reference in the future liver hypohepatia diagnosis.

Key words: polarization fluorescence spectra; autofluorescence; FWHM; bandwidth; serum

引 言

肝病是一种常见病、多发病, 已经成为严重威胁人类健康的高发疾病之一^[1]。这主要是由于一方面诱发肝病的原因十分复杂, 其中包括病毒、酒精、药物等诸多因素, 另一方面肝脏损伤程度的诊断比较困难, 而且它的发病机理也尚未完全明了^[2]。

激光光谱技术具有高灵敏度、高分辨率的特点, 是分析物质成分和分子结构的有力工具^[3]。由于在人体组织细胞和体液内, 存在大量能够产生荧光的生物大分子而且其结构及光学性质的改变能够反映组织细胞在功能、形态、以及微观上的变化。因而采用激光诱导荧光的方法, 研究组织和体液的荧光光谱可能会获得细胞的代谢信息, 为疾病诊断提供可靠的依据。但是血清的成分复杂, 可产生荧光的物质众多, 不同荧光物质的自体荧光相互叠加, 影响了肝病变光谱特征的

提取, 到目前为止, 对肝病的光谱诊断研究还没有取得具有规律性的结果。本文中尝试应用偏振荧光光谱技术对血清的荧光光谱进行部分分离, 以便更好地研究比较。对实验结果分析后发现, 肝病患者血清和健康人血清的偏振荧光光谱有一定的差异。

1 实验方法

1.1 样品的制作

实验中所检测的血清样品共 37 例, 其中有 25 例健康人的血清由大连理工大学校医院检验科提供, 其它 12 例肝硬化及肝癌患者的血清由中国人民解放军第 210 医院生化室提供。每例晨起空腹采血, 经过离心分离, 收集上层的血清置于 0℃~4℃冰箱中冷藏保存, 以备做光谱实验用。

1.2 实验仪器及检测方法

氩离子激光器 (实验选用 488.0nm 谱线作为激发波长), 双光栅单色仪, 侧窗式光电倍增管, 锁相放大器, 斩波器, 激光功率计, 光阑, 检偏器, 透镜、反射镜若干, 计算机 (带 A/D 板)。

实验装置如图 1 所示。氩离子激光器输出 488.0nm

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (60278037)

作者简介: 吴 敏 (1978-), 女, 硕士研究生, 主要从事激光光谱学在医学诊断领域的研究。

* 通讯联系人。E-mail: dingjh@dlut.edu.cn

收稿日期: 2004-09-02; 收到修改稿日期: 2004-11-04

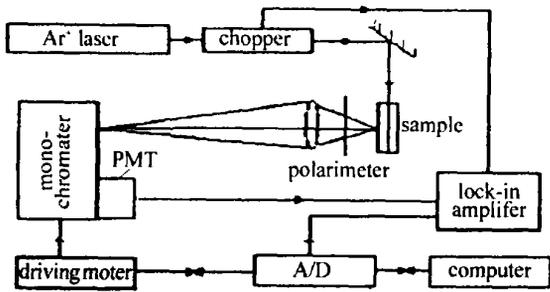


Fig 1 Schematic diagram of the experimental setup

的激光作为激发光源,经斩波器(700Hz)调制后,再经折光系统直接照射在血清样品上,血清的自体荧光信号经过检偏器和聚焦系统后,入射到双光栅单色仪入射狭缝处,并经光电倍增管放大后变成电信号,与斩波器输出的调制信号(作为锁相放大器的参考信号)一起输入到锁相放大器中,进行互相关运算,增大信噪比,放大的信号由计算机进行采集并处理。

2 结果及讨论

在 488.0nm 激发光诱导下,采集到的肝病患者血清和健康人血清的荧光光谱如图 2 所示,图中选取的

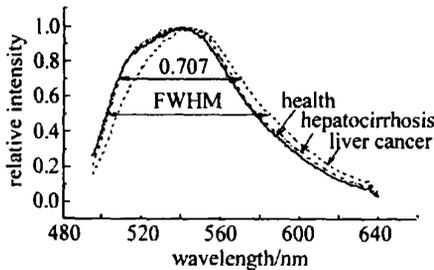


Fig 2 The bandwidth of the serum fluorescence spectra

是较为典型的谱图。各谱图的荧光光谱的半峰全宽^[4]分别是 75.3nm(肝癌)、75.5nm(肝硬化)、75.6nm(正常),而 0.707 带宽分别是 59.2nm(肝癌)、55.1nm(肝硬化)、57.1nm(正常)。经过对所有数据的分析发现,荧光光谱带宽的变化无规律可循。因此,无法很好地区分肝病患者和健康人的血清。

经过 488.0nm 激发光作用后,加上检偏器继续在 495nm~640nm 范围内采集肝病患者和健康人血清的

Table 1 The statistic results of the bandwidth of horizontal polarization fluorescence spectra

FWHM/nm	normal number	liverish number	0.707bandwidth/nm	normal number	liverish number
<61.0	12	0	<38.5	8	0
61.0~64.0	7	3	38.5~39.7	14	2
>64.0	6	9	>39.7	3	10
average/nm	62.05	66.35	average/nm	38.78	42.18

Table 2 The statistic result of the bandwidth of vertical polarization fluorescence spectra

FWHM/nm	normal number	liverish number	0.707bandwidth/nm	normal number	liverish number
<64.5	18	3	<46.3	19	4
64.5~68.0	6	6	46.3~50.0	5	6
>68.0	1	3	>50.0	1	2
average/nm	63.98	66.83	average/nm	45.19	46.79

偏振荧光光谱(注:氩离子激光为线偏振光,将检偏器的光轴方向与激发电矢量振动方向平行和垂直时所采集的荧光光谱分别称为水平、垂直偏振荧光光谱)。经过归一化处理,比较它们的半峰全宽和 0.707 处带宽,发现无论是水平偏振荧光光谱还是垂直偏振荧光光谱,肝病患者血清的带宽均比健康人的宽,如图 3 和图 4 所示。虽然偏振荧光光谱的带宽能很好地区分

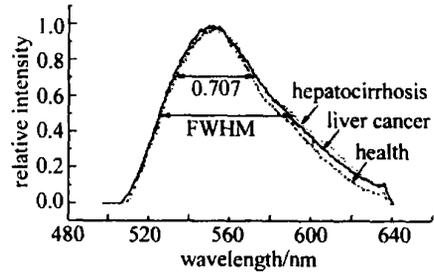


Fig 3 The bandwidth of the horizontal polarization fluorescence spectra of the serum

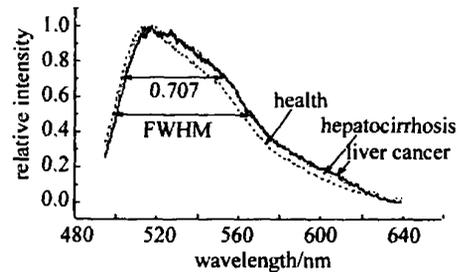


Fig 4 The bandwidth of the vertical polarization fluorescence spectra of the serum

健康人和肝病变患者的血清,但是肝癌与肝硬化患者血清的带宽差别不是很明显,无法很好地进行肝病变程度的判别,因此仍需要做更多的实验加以研究分析。

在数据分析中对每个参量都确定其阈值,将大于阈值的血清样品定为阳性(+),小于阈值的为阴性(-)。并定义真阳率为呈阳性的病变样品数占呈阳性样品总数的百分比;假阴率为呈阴性的病变样品数占呈阴性样品总数的百分比;符合率为呈阳性的病变样品数与呈阴性的健康样品数占被测样品总数的百分比。对所有血清样品的统计结果分别见表 1 和表 2。

从表 1 中可以看出,对于水平偏振荧光光谱的半峰

全宽定出的参考阈值是 64.0nm, 0.707 带宽的参考阈值是 39.7nm。半峰全宽中, 呈阳性的肝病样品占有肝病样品的 75%, 而呈阴性的健康血清样品占有健康样品的 76%; 真阳率为 60%, 假阴率为 13.6%, 符合率为 76%。0.707 带宽中, 呈阳性的肝病样品占有肝病样品的 83%, 呈阴性的健康血清样品占有健康样品的 88%; 真阳率是 76.9%, 假阴率是 8.3%, 符合率为 86%。

与表 1 相似, 在表 2 所示的样品的垂直偏振荧光光谱带宽的统计结果中, 定出样品的半峰全宽和 0.707 带宽的参考阈值分别是 64.5nm 和 46.3nm。半峰全宽中, 呈阳性的肝病样品占有肝病样品的 75%, 而呈阴性的健康血清样品占有健康样品的 72%; 真阳率为 56.3%, 假阴率为 14.3%, 符合率为 73%。0.707 带宽中, 呈阳性的肝病样品占有肝病样品的 67%, 呈阴性的健康血清样品占有健康样品的 76%; 真阳率是 57.1%, 假阴率是 17.4%, 符合率为 73%。

由于肝脏的代谢异常, 会引起血清中的 ECM、胶原酶类及细胞因子等物质含量发生变化, 这些物质的变化都可能对血清的荧光光谱造成影响。况且, 血清本身的组成就非常的复杂, 实验中所采集的 495nm~640nm 范围内的光谱就是由多种荧光物质^[5] (胆红素、抗坏血酸、卟啉, 卟啉衍生物等) 叠加产生的。但是, 物质具有选择吸收光波中两个垂直分量之一的性质^[6], 而且使用互相垂直的偏振片能有效地消除某些荧光物质的干扰^[7]。如 PRADHAN 等在研究人乳腺荧光特性时发现, 荧光的各向异性与光谱形状相结合能够从彼此间区分正常、良性和恶变组织。乳腺组织的偏振性研究表明: 肿瘤组织与其相对正常的组织相比表现为更高的各向异性^[8]。因此, 实验时在光路中加上一个检偏器, 对血清荧光进行了部分分离, 从而更好地分析了病变血清中荧光物质的变化。如图 4 所示, 血清产生的荧光经过光轴方向与激发电矢量振

动方向垂直的检偏器后, 在 515.0nm 附近荧光峰最强, 这可能是胆红素的荧光峰位。而在水平偏振荧光光谱图中, 发现在 550.0nm 附近荧光峰最强, 同样, 这也应该是某种荧光物质或者是几种荧光物质叠加而产生的荧光峰。因肝病时会引起许多物质代谢紊乱, 比如说肝病血清中胆红素、卟啉衍生物^[9] 等的含量明显要比正常人的高, 或许这就是造成肝病者血清的偏振荧光光谱半峰全宽及 0.707 带宽变化的原因。

3 结 论

检测了 37 例人的血清, 用 488.0nm 作为激发光源激发这些样品的自体荧光, 从 495nm~640nm 范围内采集到的光谱图中发现: 在荧光光谱图中, 肝病者血清的荧光光谱带宽与正常的相比没有明显差别。但是, 经过 488.0nm 激发光作用后, 加上检偏器, 采集到的肝病和正常人的血清偏振荧光光谱图的带宽, 能很好地区分病变血清和健康血清。这一结果对于肝病的光谱诊断研究有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 程明亮, 陆 彤, 梁跃东 *et al* 肝纤维化发生机制的研究进展 [J]. 科技导报, 1999 (5): 22~24.
- [2] 焦锡莹, 高泽红, 丁建华 *et al* 应用激光诱发荧光诊断不同物质导致的白鼠肝纤维化 [J]. 激光杂志, 2001, 22 (4): 47~48.
- [3] 冯兆池, 丁建华, 余 虹 *et al* 恶性肿瘤患者血清特异可见荧光光谱的初步研究 [J]. 大连理工大学学报, 1997, 37 (4): 403~405.
- [4] 赵箭光, 吴晓玲, 杨佩青 *et al* 肝癌与正常肝组织激光荧光光谱的比较研究 [J]. 中国医学物理学杂志, 1996, 13 (4): 220~222.
- [5] 赵晓杰, 李少白, 江 山 *et al* 激光诱导血清荧光诊断肝癌初探 [J]. 光电子·激光, 1994, 5 (1): 31~33.
- [6] 新谷隆一. 偏振光 [M]. 北京: 原子能出版社, 1994. 6~7.
- [7] 杜 鸣, 唐 波, 沈含熙. 偏振荧光光度法同时测定氨基酸注射液及动、植物浸出液中酪氨酸、色氨酸的研究 [J]. 药学报, 1997, 32 (9): 695~698.
- [8] PRADHAN A, PANDA R N, NA R M S *et al* Fluorescence study of normal, benign and malignant human breast tissues [J]. Proc SPIE, 2000, 3917: 240~243.
- [9] 刘 杼, 陈丽娜, 李 冰 *et al* 慢性肝病者血卟啉变化初探 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 1992, 26 (2): 99~101.

请向邮局订阅 2006 年度《激光技术》

国内统一刊号: CN51-1125/TN, 邮发代号: 62-74