

文章编号: 1001-3806(2016)03-0372-05

## 缺血大鼠脑组织的太赫兹波吸收特性研究

张 章<sup>1,2</sup>, 孟 坤<sup>2</sup>, 朱礼国<sup>2</sup>, 陈图南<sup>3</sup>, 李泽仁<sup>2</sup>, 冯 华<sup>3</sup>, 凌福日<sup>1\*</sup>, 姚建铨<sup>4</sup>

(1. 华中科技大学 光学与电子信息学院, 武汉 430074; 2. 中国工程物理研究院 流体物理研究所, 绵阳 621900; 3. 西南医院, 重庆 400038; 4. 天津大学 精密仪器与光电子工程学院 光电子信息系, 天津 300072)

**摘要:** 为了探讨不同缺血时间的大鼠脑组织在 0.4THz ~ 0.95THz 频段内的吸收特征, 采用线栓法制备大鼠脑缺血模型, 利用透射式太赫兹时域光谱仪对缺血大鼠脑组织进行检测, 并进行了理论分析和实验验证, 取得了缺血大鼠脑组织在 0.4THz ~ 0.95THz 频段内吸收系数。结果表明, 缺血时间不同的脑组织对太赫兹波呈现出各异的吸收特性, 这是由缺血所致脑损伤级联反应中的兴奋性氨基酸、无氧呼吸所产生的乳酸等中间产物以及钙离子超载导致一氧化氮大量合成所造成的。这一结果对于研究缺血脑损伤的病理机制具有一定的指导作用和应用价值。

**关键词:** 生物光学; 吸收系数; 太赫兹时域光谱; 脑缺血损伤

中图分类号: Q631

文献标志码: A

doi: 10.7510/jgjs.issn.1001-3806.2016.03.015

### Study on terahertz absorption characteristics of ischemic rat brain tissue

ZHANG Zhang<sup>1,2</sup>, MENG Kun<sup>2</sup>, ZHU Ligu<sup>2</sup>, CHEN Tunan<sup>3</sup>, LI Zeren<sup>2</sup>, FENG Hua<sup>3</sup>, LING Furi<sup>1</sup>, YAO Jianquan<sup>4</sup>

(1. School of Optical and Electronic Information, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; 2. Institute of Fluid Physics, China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621900, China; 3. Southwest Hospital, Chongqing 400038, China; 4. Department of Opto-electronics Information Engineering, School of Precision Instrument and Opto-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** In order to explore the absorption features of rat brain tissue at different ischemia time, the model of middle cerebral artery occlusion was established and terahertz time-domain spectroscopy of ischemic rat brain tissue was measured. After theoretical analysis and experimental evaluation, terahertz absorption coefficient of ischemic brain tissue at different time in the frequency band from 0.4THz to 0.95THz was acquired. The results show that different absorption characteristics to terahertz wave at different time of ischemic brain tissue is due to intermediates, such as excitatory amino acids produced by ischemia brain injury cascade, lactic acid produced by anaerobic respiration, and large quantities of nitric oxide synthesis produced by calcium overload. The results will have an important role in studying the pathology mechanisms of ischemic brain injury and have a certain value in the biomedical field.

**Key words:** biotechnology; absorption coefficient; terahertz time-domain spectroscopy; ischemic brain injury

### 引 言

脑缺血以其突发性强, 致残、致死率高以及越来越高的发病率等已成为神经科常见的疾病之一, 其发病机理主要有由于脑动脉狭窄、闭塞或者破裂造成该动脉所支配的区域脑组织缺血和体循环障碍如低血压、心脏骤停、失血性休克等原因所引起的大脑缺血两种<sup>[1-2]</sup>。它主要涉及兴奋性氨基酸释放、细胞内钙离子超载、梗死周围去极化以及炎症 4 个方面, 它们之间

相互重叠、相互作用, 其机理极其复杂。脑组织缺血时, 细胞处于缺氧、养料的极端环境, 细胞的呼吸作用逐渐由有氧呼吸过渡到无氧呼吸, 这不仅导致胞内酸碱度失衡, 还导致胞膜能量供应不足, 从而影响胞膜的钠、钾离子泵功能失调, 进而导致胞膜去极化, 电压依赖性的钙离子通道被打开, 钙离子内流, 兴奋性氨基酸如谷氨酸大量释放, 由于能量缺乏, 导致谷氨酸的重摄取受阻, 进而胞外大量谷氨酸堆积, 使得谷氨酸受体被大量激活, 再使依赖于谷氨酸受体的钙离子通道激活, 进一步导致钙离子内流、胞内钙离子超载, 超载的钙离子作为主要的第二信使, 使得胞内一氧化氮合成酶、脂酶、蛋白酶、核酸内切酶等一系列酶被激活, 介导了胞内一系列依赖钙离子的生化反应, 引起脱氧核糖核酸、蛋白质、脂类降解、氧自由基形成、线粒体功能障碍、能量耗竭等, 导致神经元逐步变性、坏死<sup>[3-5]</sup>。由于脑细

基金项目: 国家九七三重点基础研究发展计划资助项目 (2015CB755405)

作者简介: 张 章 (1988-), 男, 硕士研究生, 现主要从事激光 (太赫兹) 生物光学方面的研究。

\* 通讯联系人。E-mail: lingfuri@163.com

收稿日期: 2015-01-27; 收到修改稿日期: 2015-04-30

胞的不可再生性,因此,脑缺血对脑组织所产生的损伤是不可估量的。

太赫兹波介于微波和红外之间,其频率介于0.1THz~10THz之间,对应的波长为30 $\mu\text{m}$ ~3000 $\mu\text{m}$ ,目前太赫兹相关技术已广泛应用于国防、安检、生化卫生等科研领域<sup>[6-7]</sup>。经过理论计算,脱氧核糖核酸、核糖核酸、蛋白质以及糖类生物大分子的振动和转动频率处于太赫兹波段内,可以通过太赫兹波去探测生物大分子的构型、构象,从分子的结构上去认识其功能<sup>[8]</sup>。事实上,一些学者在生物与太赫兹相互作用、太赫兹生物探测以及成像等方面已经做出了巨大的贡献:NORIE等人<sup>[9]</sup>首次利用太赫兹时域光谱(terahertz time-domain spectroscopy, THz-TDS)系统探测了L-半胱氨酸和L-组氨酸的氨基酸单晶体;SIEQRIST等人<sup>[10-11]</sup>利用太赫兹傅里叶变换干涉(terahertz Fourier transform interferometer, THz-FTI)技术检测了不同晶型的多肽,获得了明显不同的THz波谱,发现短链晶型的多肽在THz波段具有明显的指纹谱;首尔Yonsei大学等机构联合进行了太赫兹对新鲜脑组织的成像研究<sup>[12]</sup>,发现THz波谱可区分脑灰质与白质之间存在反射波谱差异等等,此外,太赫兹波在乳腺癌、皮肤癌、结肠癌等病变组织能够进行快速、精准的检测,对皮肤烧伤等症状具有良好的治疗作用。本文中主要用太赫兹时域光谱技术对缺血大鼠脑组织进行探测,研究并分析不同缺血时间大鼠脑组织对太赫兹波的吸收特性与脑损伤级联反应的相互关系。

## 1 样品制备与方法

### 1.1 实验动物及分组

选取60只健康成年雄性斯泼雷格·多雷大鼠,体

质量240g~280g(来源于中国工程物理研究院流体物理研究所物理与生物医学交叉实验室),随机分为缺血0h,1h,3h,6h,12h,24h共6个小组,每组10只,其中缺血时间为0h的为对照组。

### 1.2 动物模型制备

采用线栓法制备脑缺血再灌注模型<sup>[13]</sup>。实验动物用质量分数为0.05的水合氯醛(35mg/kg)腹腔注射麻醉后仰卧固定于手术台上,颈部备皮。用碘伏消毒颈部皮肤,暴露右侧颈总动脉,找到颈外动脉和颈内动脉的分叉。将栓线(由北京沙东生物技术有限公司提供)由颈总动脉插入,经颈内动脉向颅内方向推进至栓线标记到达分叉处。大鼠出现呼吸加速、心跳增快提示模型成功。固定栓线,缝合皮肤<sup>[14]</sup>。

### 1.3 组织标本准备

动物模型制备好后,在相应的缺血时间点用脊椎脱臼法处死大鼠,完整取出脑组织,沿冠状面切开,用

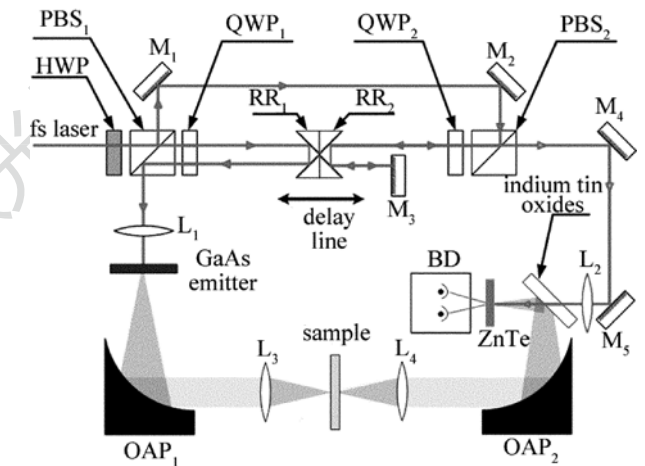


Fig. 1 Schematic representation of a terahertz time-domain spectroscopy system

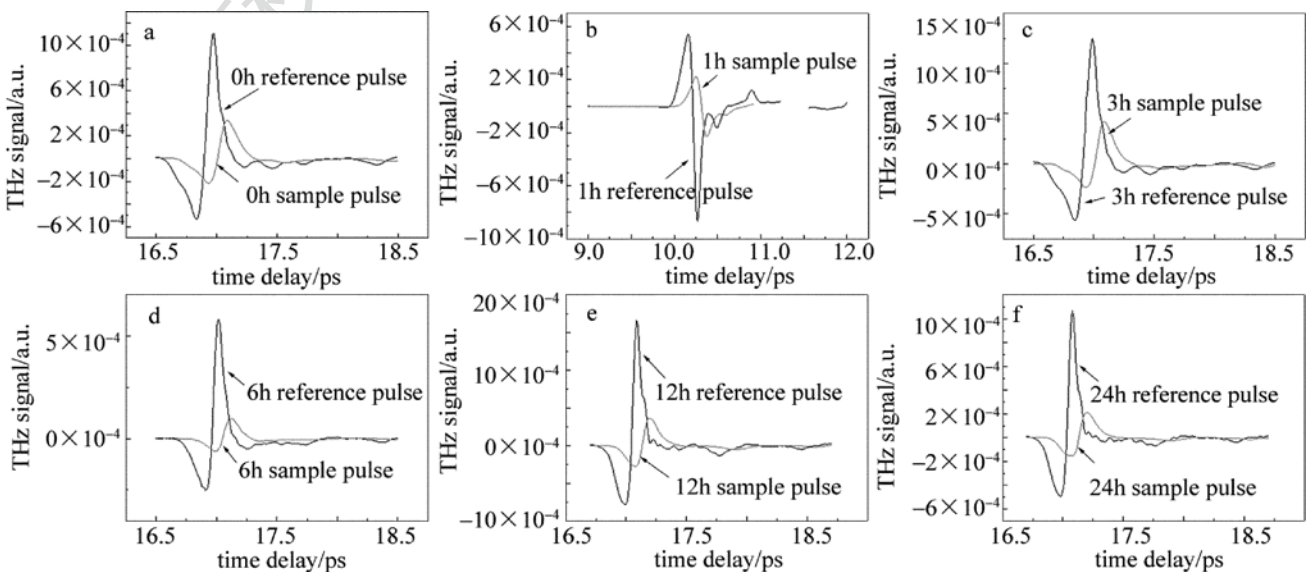


Fig. 2 Time-domain spectrum of ischemic rat brain tissue with different time

检测模具制成 100μm 厚度的脑组织切片。

### 1.4 太赫兹时域光谱检测

本研究使用透射式太赫兹时域光谱系统(如图1所示)。图中,HWP为半波片(half-wave-plate,HWP),PBS<sub>1</sub>和PBS<sub>2</sub>为分束器(polarizing beam splitter,PBS),M<sub>1</sub>~M<sub>5</sub>为高反镜,QWP<sub>1</sub>和QWP<sub>2</sub>为λ/4波片(quarter-wave-plate,QWP),RR<sub>1</sub>和RR<sub>2</sub>为屋脊反射镜(rigging reflector,RR),L<sub>1</sub>~L<sub>4</sub>为聚焦透镜,OAP<sub>1</sub>和OAP<sub>2</sub>

为离轴抛物面镜(off-axis parabolic mirror,OAP),BD为平衡探测器(balanced detector,BD)。中国工程物理研究院液体物理研究所109室搭建参量:频谱分辨率优于100GHz,时间分辨率优于50fs,信噪比大于300。检测时将脑组织标本置于光谱系统中样品处,控制温度22℃~23℃,湿度5%以下,扫描步长0.067ps,扫描范围13.4ps。图2和图3为实验测得样品、参考光的时域光谱及其对应的频谱。

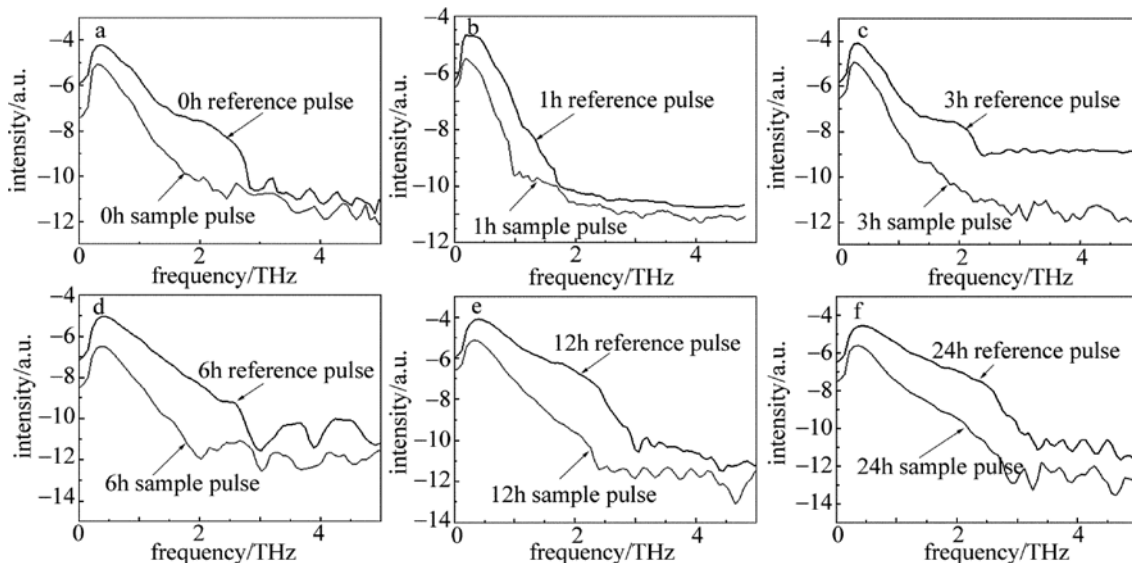


Fig. 3 The corresponding frequency spectroscopy of ischemic rat brain tissue at different time

## 2 实验数据分析

在正入射的情况如图4所示。

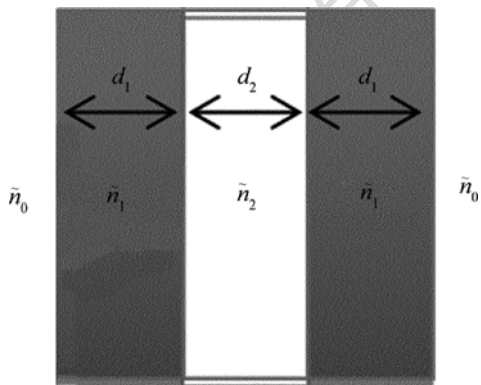


Fig. 4 Schematic diagram of the sample cell

当样品池中为空气和样品时,其太赫兹波的电场强度可分别表示为:

$$\vec{E}_{empty} = \vec{E}_0 t_{01} P_1(d_1) t_{10} P_0(d_2) t_{01} P_1(d_1) t_{10} \quad (1)$$

$$\vec{E}_{sample} = \vec{E}_0 t_{01} P_1(d_1) t_{12} P_2(d_2) t_{21} P_1(d_1) t_{10} \quad (2)$$

式中,下标0表示空气,1表示夹具,2表示样品; $d$ 为夹具或样品的厚度; $t_{mn} = \frac{2\tilde{n}_m}{\tilde{n}_m + \tilde{n}_n}$ 为正入射情况下的透射系数( $m, n = 0, 1, 2$ ), $\tilde{n}$ 是介质的复折射率, $\tilde{n} = n -$

$ik, n$ 为折射率, $k$ 为消光系数,它是用来衡量光在材料传播过程中衰减程度的物理量; $P(d) = \exp(-i\omega\tilde{n}d/c)$ 为介质 $\tilde{n}$ 中的传播子, $\omega$ 为频率, $c$ 为光速。以通过空样品池的电场强度作为参考光,样品池中存在样品时为信号光,则:

$$\frac{\vec{E}_{sample}}{\vec{E}_{empty}} = \frac{\frac{2\tilde{n}_1}{n_1 + n_2} \exp\left(-\frac{i\omega\tilde{n}_2 d_2}{c}\right) \frac{2\tilde{n}_2}{n_1 + n_2}}{\frac{2\tilde{n}_1}{n_1 + n_0} \exp\left(-\frac{i\omega\tilde{n}_0 d_2}{c}\right) \frac{2\tilde{n}_0}{n_1 + n_0}} = \frac{\tilde{n}_2 (\tilde{n}_1 + \tilde{n}_0)^2 \exp\left[-\frac{i\omega(\tilde{n}_2 - \tilde{n}_0) d_2}{c}\right]}{\tilde{n}_0 (\tilde{n}_1 + \tilde{n}_2)^2} \quad (3)$$

将太赫兹电场强度用模和幅角 $\varphi$ 形式表达:

$$\frac{\vec{E}_{sample}}{\vec{E}_{empty}} = \frac{|\vec{E}_{sample}|}{|\vec{E}_{empty}|} \exp[-i(\varphi_{sample} - \varphi_{empty})] \quad (4)$$

由(3)式和(4)式得:

$$\begin{cases} \frac{|\vec{E}_{sample}|}{|\vec{E}_{empty}|} = \frac{4(n_0 + n_1)^2 \sqrt{n_2^2 + k^2}}{n_0 [(n_1 + n_2)^2 + k^2]} \exp\left(-\frac{\omega k d_2}{c}\right) \\ \varphi_{sample} - \varphi_{empty} = \frac{n_2 - n_0}{c} \omega d_2 - \arctan\left(-\frac{k}{n_2}\right) + 2\arctan\left[-\frac{k}{(n_1 + n_2)}\right] \end{cases} \quad (5)$$

由于生物体对太赫兹波的吸收强度相对较大,因而(5)式中后两项不能被忽略,可以根据这个超越方程提取出所测生物样品的吸收系数等相关参量。

经过计算得到不同缺血时间脑组织对 0.4THz ~ 0.95THz 频段太赫兹波的吸收系数,如图 5 所示。

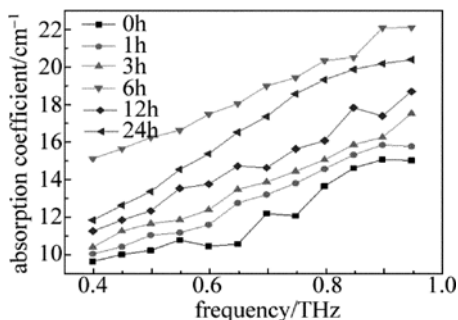


Fig. 5 Absorption coefficient of ischemic rat brain tissue at different time in the band of 0.4THz ~ 0.95THz

### 3 结果与讨论

从图 5 可以看出,不同缺血时间的大鼠脑组织对太赫兹波的吸收系数表现出不同的吸收特性,为了更加直观地分析,截取 0.7THz 处不同缺血时间的大鼠脑组织对太赫兹波的吸收特性,如图 6 所示,与对照组相比,随着缺血时间的延长,脑组织对太赫兹波的吸收呈现出先增加,在缺血 6h 时,其对太赫兹波的吸收系数达到最大值,然后降低而后再增加的趋势。

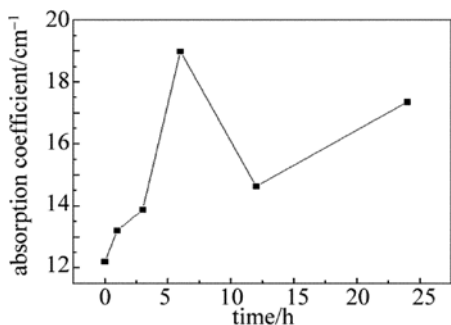


Fig. 6 Absorption coefficient of ischemic rat brain tissue at different time at 0.7THz

在缺血 0h ~ 12h 时间段,缺血脑组织对太赫兹波的吸收呈现出先增加,在缺血 6h 时达到最大值,然后逐渐减小,这种趋势与缺血致脑损伤级联反应中的兴奋性氨基酸、无氧呼吸所产生的乳酸等中间产物有关系。XU 曾提到,在脑缺血后 15min 脑组织中的谷氨酸、天门冬氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、牛磺酸等含量迅速上升,在缺血 30min 至 60min 时,4 种氨基酸含量均达到最高值<sup>[15]</sup>。LIU 等人报道<sup>[16]</sup>,脑缺血后,大鼠脑组织中的乳酸含量在短时间内急剧上升,在 6h 达到高峰。从以上分析中可以看出,由于谷氨酸等兴奋性氨基酸的大量释放并在缺血 1h 时达到峰值,以及无氧呼吸所产

生的乳酸等中间产物的大量堆积并在缺血 6h 时达到峰值,使得缺血时间为 6h 以下的脑组织随着缺血时间的延长,而对太赫兹波的吸收不断增加,并在缺血 6h 时达到最大值。6h 之后,随着乳酸等中间产物的逐步分解,从而导致缺血脑组织对太赫兹波的吸收减小。

在缺血 12h ~ 24h 内,缺血脑组织所呈现出的增大趋势,是由于钙离子超载进而激活一氧化氮合酶导致大量一氧化氮被合成。NAGEYAMA 等人报道<sup>[17]</sup>,在缺血时间达到 12h 时,可以检测到一氧化氮合酶和催化活性,在 48h 时达到高峰,7d 左右恢复至基础水平。这说明在缺血 12h 之后,一氧化氮合酶逐渐激活,导致一氧化氮合成在细胞内积累,随着缺血时间的延长而增加,导致缺血脑组织对太赫兹波的吸收呈现出逐渐上升趋势,7d 左右恢复至基础水平还有待进一步研究。

### 4 结论

将目前发展比较热门的太赫兹科学技术和脑神经科学结合到一起,采用透射式太赫兹时域光谱技术对不同缺血时间的大鼠脑组织进行了研究。从结果来看,不同缺血时间的大鼠脑组织对太赫兹波具有不同的吸收特性,而且这种吸收特性的变化趋势是与脑组织缺血所导致的级联损伤反应过程中的兴奋性氨基酸、无氧呼吸产生的乳酸等中间产物以及一氧化氮有关联,这说明可以运用太赫兹时域光谱技术对缺血脑组织进行研究,通过缺血脑组织对太赫兹波的吸收特性来分析其缺血过程中的病理机制,具有一定的指导作用和应用价值。

#### 参 考 文 献

- [1] KENSUKE M, TAKEO K, MAKOTO K, *et al.* Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency [J]. *Journal of Neuroscience*, 1998, 18(1): 205-213.
- [2] GAO G D, MANABU M, PEI W, *et al.* Intracellular bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2001, 21(4): 321-333.
- [3] HIROSHI W, YASUHIRO O, TAKESHI U, *et al.* The effects of glucose, mannose, fructose and lactate on the preservation neural activity in the hippocampal slices from the guinea pig [J]. *Brain Research*, 1998, 788(1/2): 144-150.
- [4] WEI J N, MICHAEL J Q. Effect of nitric oxide synthesis inhibitor on a hyperglycemia rat model of reversible focal ischemia: detection of excitatory amino acids release and hydroxyl radical formation [J]. *Brain Research*, 1998, 791(1/2): 146-156.
- [5] YANG G Y, SCHIELKE G P, GONG C, *et al.* Expression of tumor necrosis factor-alpha and intercellular adhesion molecule-1 after focal

- cerebral ischemia in interleukin-1beta converting enzyme deficient mice [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1999, 19(10): 1109-1117.
- [6] WANG Q, CHI X, LI Q. Imaging theory and development of THz free electron lasers [J]. *Laser Technology*, 2006, 30(6): 643-646 (in Chinese)
- [7] GAO X, LIU H Q, JIE Y X, *et al.* Experimental study of THz CW high-power DCN laser [J]. *Laser Technology*, 2006, 30(1): 64-66 (in Chinese).
- [8] WANG X H, GUO A T, HU Y. The brief review of terahertz time-domain spectroscopy on gas[J]. *Journal of Light Scattering*, 2005, 17(1): 67-70 (in Chinese).
- [9] NORIE K, TAKENORI T, MINRO W, *et al.* A membrane method for terahertz spectroscopy of amino acids [J]. *Analytical Sciences*, 2009, 25(3): 457-459.
- [10] SIEQRIST K, BUCHER C R, MANDELBAUM L, *et al.* High-resolution terahertz spectroscopy of crystalline trialanine: extreme sensitivity to beta-sheet structure and cocrystallized water [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(17): 5764-5775.
- [11] ZEESHAN A, SHIN G C, KAREN S, *et al.* State-resolved THz spectroscopy and dynamics of crystalline peptide-water systems [J]. *Faraday Discuss*, 2011, 150: 175-192.
- [12] SEUNG J O, HUH Y M, KIM S H, *et al.* Terahertz pulse imaging of fresh brain tumor [C]// *The 36th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves (IRMMW-THz)*. New York, USA: IEEE, 2011: 1-2.
- [13] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] MENG K, CHEN T N, CHEN T, *et al.* Terahertz pulsed spectroscopy of paraffin-embedded brain glioma [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(7): 0770011.
- [15] XU X H. Research and application of the dynamic process of cerebral ischemic injury [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005: 23-30 (in Chinese).
- [16] LIU M, SUN J L, DONG Sh F, *et al.* Changes in brain energy metabolism for different duration of cerebral ischemia in rats [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2011, 17(5): 216-218 (in Chinese).
- [17] NAGEYAMA M, ZHANG F, ZODECOLA C. Delayed treatment with amino-guanidine decreases focal cerebral ischemia damage and enhances neurologic recovery in rats [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1998, 18(10): 1107-1113.