

文章编号: 0258-7025(2003)01-0093-04

不同波长光照射血液诱发的荧光光谱研究

骆晓森¹, 倪晓武², 陆建², 贺安之², 刘晓然², 严玉兰¹, 段平¹, 沈建¹

(¹ 第二军医大学南京军医学院基础部, 江苏南京 210099; ² 南京理工大学应用物理系, 江苏南京 210094)

摘要 为研究波长因素在激光与血液相互作用中的影响, 从健康人静脉采集血液, 分别用 502 nm, 530 nm 和 632.8 nm 波长光照射血液样品, 同时用光栅光谱仪检测其荧光光谱。结果表明, 530 nm 波长光在血液中引发的荧光辐射最强; 502 nm 波长光在血液中引发的荧光辐射比较弱; 632.8 nm 波长光照射血液, 所产生的发射光谱在原激发光的长波和短波两个方向都有分布。这一结果提示, 上述三种波长光与血液相互作用的过程有所不同, 因而其对血液的生物效应也会有所差异。

关键词 血液生理学; 荧光光谱; 激光照射

中图分类号 TN 249; R 331.1 文献标识码 A

Study of Fluorescent Spectrum of Blood Induced by Lights of Different Wavelengths

LUO Xiao-sen¹, NI Xiao-wu², LU Jian², HE An-zhi²,
LIU Xiao-ran², YAN Yu-lan¹, DUAN Ping¹, SHEN Jian¹

¹Nanjing Military Medical College, Second Military Medical University, Nanjing, Jiangsu 210099, China

²Department of Applied Physics, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, Jiangsu 210094, China

Abstract The blood taken from a healthy human vein is irradiated by different wavelength lights at 502 nm, 530 nm and 632.8 nm. The fluorescent spectra are tested by the grating spectrograph. The result indicates that the fluorescent intensity of the blood induced by the light at 530 nm is the strongest. The fluorescence of the blood induced by the light at 502 nm is very weak. The emitting spectrum of the blood induced by the light of 632.8 nm appears in both side of 632.8 nm. This result shows that the processes of interaction between laser and blood may be different when wavelengths of the exciting lights are different. So the biological effects of the lights on the blood may be different.

Key words blood physiology; fluorescent spectrum; laser irradiation

激光血管内照射疗法在我国开展临床应用已有多多年。其适应范围主要有心脑血管系统、免疫系统和神经系统三个方面。其中对缺血性心脑血管疾病、感染性疾病、糖尿病和老年性痴呆等疾病的疗效尤为显著^[1]。

然而, 目前对激光血管内照射疗法的治疗机理仍缺乏统一的认识, 有关该疗法的基础研究还有待进一步深入。多年来, 对激光血管内照射疗法治疗机理的研究工作一直没有间断, 一些研究者从不同方面、不同角度展开的研究工作都具有积极意

义^[2-5]。

波长对激光血管内照射疗法的影响及作用机理, 是该疗法研究中已经涉及的一个重要方面。目前临床治疗所采用的激光主要为 He-Ne 激光(632.8 nm) 和半导体激光(650 nm) 等红色激光。为探索将绿激光(532 nm) 用于激光血管内照射治疗的可行性, 有研究者进行了一些动物实验和临床治疗观察^[6-8], 其基本依据是考虑到绿色与红色是互补色, 血液对绿色光的吸收率显著大于对红色光的吸收率, 用绿光作用于血液会比红光产生更强的生物效

收稿日期: 2001-09-04; 收到修改稿日期: 2002-01-14

基金项目: 国家“九五”科技攻关项目(编号 96-B11-04-03-02) 和国家教委“跨世纪人才培养计划”专项基金资助课题。

作者简介: 骆晓森(1959-), 男, 副教授, 博士, 主要从事光生物医学研究。E-mail: xsluo@jlonline.com

应,因而有可能取得更好的疗效。

光谱学方法是研究光与血液相互作用过程的有效方法之一,血液的吸收光谱表示血液对于光的吸收随波长的变化情况,吸收曲线上各峰值的位置和相对强度能够反映血液中生物分子的部分能级结构^[9];血液的荧光光谱则可以部分地反映血液分子吸收光子能量以后所发生的能量转移情况。分析研究这些谱线的结构,有助于进一步理解激光与血液的相互作用机理。

本研究用几种不同波长光照射离体的血液样品并检测其荧光光谱,目的在于进一步探讨波长对激光与血液相互作用过程的影响。

1 材料与方法

光栅光谱仪, WGD-8 型, R928 型光电倍增管, 单色仪采用每毫米 1200 刻线闪耀光栅; 502 nm 高亮度发光二极管; 溴钨灯; DTB530 带通滤光片, 中心波长 530 nm, 半值宽度 30 nm; He-Ne 激光器, 波长 632.8 nm, 功率 3 mW。

健康人静脉取血, 肝素抗凝, 用生理盐水配制成 1% 稀释血液待用。取上述稀释血液 3 ml, 置于比色皿内, 分别用 502 nm, 530 nm 和 632.8 nm 波长光照射血液样品, 同时用光栅光谱仪检测血液的散射光谱, 检测方向与激发光的入射方向垂直。光谱仪扫描波长精度取 0.5 nm, 完成一次光谱扫描检测所需时间约 80 s。对每一份血液样品只安排一种波长光进行照射, 并且只进行一次扫描检测。所测得的数据可通过计算机描绘成曲线, 如图 1~ 3 所示。考虑到上述检测样品中除血液外还添加了生理盐水和抗凝剂肝素, 故再配制仅含有肝素的生理盐水于比色皿中, 同样分别进行上述三种波长光的照射及光谱检测过程。对于上述每种照射波长条件, 都分别安排三份血液样品进行照射, 并对每份血液样品进行一次光谱扫描检测。因此, 对于每份血液样品而言, 光照射时间就是光谱扫描检测时间(80 s)。

2 结 果

1) 激发光波长为 502 nm 时, 检测到在 559 nm 和 601 nm 处出现两个荧光峰, 如图 1 所示, 图中曲线上对应于波长最短处的一个峰值强度最大, 这是散射光中对应于原激发光波长相同的成分, 中心波长为 502 nm。在其长波方向一侧有两个很小的峰, 这两

个小峰是血液发射的荧光, 荧光强度比较弱。

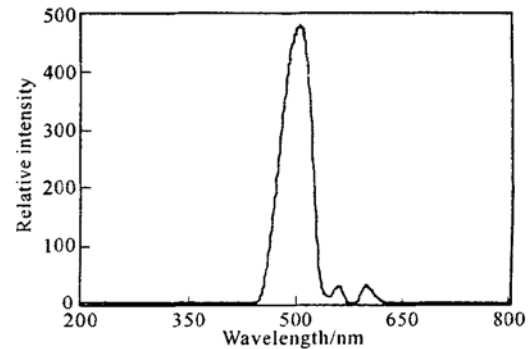


图 1 502 nm 波长光在血液中激发的光谱

Fig. 1 Spectrum of blood induced by the light of 502 nm

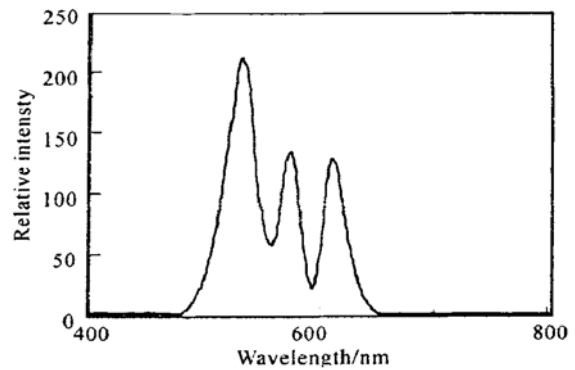


图 2 530 nm 波长光在血液中激发的光谱

Fig. 2 Spectrum of blood induced by the light of 530 nm

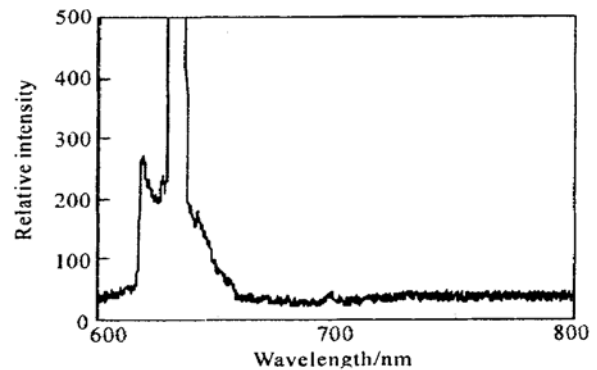


图 3 632.8 nm 波长光在血液中激发的光谱

Fig. 3 Spectrum of blood induced by the light of 632.8 nm

2) 激发光波长为 530 nm 时, 可观察到在 563 nm 和 601 nm 处有两个比较强的荧光峰, 如图 2 所示, 图中曲线上最大的一个峰值在 530 nm 处, 这是散射光中对应于原激发光的波长成分。在其长波方向一侧, 有两个高度稍低一些的峰, 这是血液发射的荧光, 荧光强度比较强。

3) 用 He-Ne 激光(波长 632.8 nm, 功率 3 mW)

照射血液。散射光谱中,在原激发光波长两侧近旁,新出现了一些波长不同于原激发光波长的光谱分布,如图 3 所示。图中曲线上的最大峰值所对应的波长与原激发光波长 632.8 nm 一致,新产生的光谱波长分布在与原激发光波长两侧,波长变化范围约 20 nm,其强度很微弱。

4) 用上述三种波长光照射仅含肝素的生理盐水,未观察到有不同于原激发光波长的发射光谱出现。

5) 对于相同的照射波长条件,重复进行的光谱扫描检测,都得到相同的曲线分布。

3 讨 论

本研究以离体血液为实验对象,分别用几种不同波长的单色光照射血液,同时用光栅光谱仪检测血液在各单色光激发下所产生的荧光光谱,目的是要从另一个侧面研究激光与血液的相互作用机制。

生物分子发出荧光是由于其吸收了激发光的辐射能,从基态跃迁到某一激发态,处于受激态能级的分子通过运动或与其他分子碰撞,而将过多能量转移给其他分子后很快回到第一激发态的最低能级,然后发生自发辐射,跃迁回基态,发射一定波长的辐射,此辐射即为荧光^[10]。

荧光现象是光辐射引起生物体内部发生一系列能量转移过程的表现之一。总体而言,生物分子吸收光子后就转变成为电子激发的分子。激发的分子会通过几种可能的途径弛豫(放出多余的电子能量)。在这些途径中,有一些将导致发射荧光、内转换或系统间交叉等过程。而另一些途径将导致产生化学上不同于起始分子的基态分子,光以这种方式影响的化学反应叫光化学反应^[11,12]。伴随电子激发态分子的弛豫,最初出现的化学变化叫做原初光化学过程,大多数原初光化学过程的产物是自由基等具有高度活性的中间产物,它们会在继发的过程中进一步发生反应^[13,14]。

自由基是含有未成对电子的基团(例如超氧阴离子自由基、羟自由基等),通常都表现出极活泼的化学性质,这与未成对电子的存在直接相关。自由基可以发生多种形式的反应,其中包括取代反应、过氧化反应、碎裂反应、偶联反应和歧化反应等。自由基反应的最大特征之一是倾向于进行链反应,因为自由基有一个未成对电子,当它们与具有成对电子的分子进行反应时就会再产生另一个自由基。这

样,自由基-分子反应就会形成链反应,直到发生偶联或歧化反应,链反应才会终止^[15]。

自由基与生命活动密切相关,生物体内只要进行能量代谢,就会有自由基产生和自由基反应。自由基对机体的作用具有两面性,一方面,自由基反应是机体正常生理过程的重要组成部分,若没有自由基和自由基反应,生命活动就会终止。另一方面,自由基和自由基反应又会对机体造成损害。例如在线粒体呼吸链上的电子传递过程中产生的 FMN 自由基和 FAD 自由基就在线粒体能量代谢中起重要作用;同时,在呼吸链上也产生超氧阴离子自由基,在特定条件下会对线粒体造成损伤。生物机体在长期进化的过程中已形成了对自由基的防御体系,例如人体中能产生超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化酶,清除超氧阴离子等活性氧自由基。在生命活动中,自由基的产生、淬灭、利用和损伤作用是几乎同时在进行的对立统一过程^[16,17]。对于正常的生理情况,体内自由基不断产生,也不断被清除,使之维持在一个正常的生理水平上。

本研究观察到,502 nm,530 nm 和 632.8 nm 波长光都能在血液中引发荧光辐射,表明这三种波长光都能够在血液内引发某些能量转移过程。若将这样波长的光引入人体静脉,照射循环中的血液,则伴随上述能量转移过程而附加产生的自由基和自由基反应会对血液乃至整个人体系统的生理过程产生扰动,这样的扰动首先会使得血液中自由基和自由基反应呈增加趋势,继而反馈激活人体的自由基防护体系,提高体内多种抗自由基酶(例如 SOD)的活性。如果照射光的剂量不超过一定的限度,所产生的扰动是小扰动,则人体系统在相应的适应性调整过程中,多方面的机能得到加强(例如免疫功能增强),可获得治病效果;反之,若照射光的剂量过大,所产生的扰动超过了人体系统的调节范围,则人体的多方面机能会被削弱(例如免疫功能降低)。因此,进一步研究上述能量转移过程及其所引发的系列反应,对于进一步阐明激光血液照射疗法的治疗机理和改善其治疗效果,具有一定的理论和实际意义。

本研究显示,530 nm 波长光照射血液所引发的发射光谱结构(见图 2),相比于 He-Ne 激光(632.8 nm)照射血液所诱发的光谱结构(见图 3)有很大不同。如果把照射血液的光波叫激发光,把血液中新生成的波长成分叫发射光,则上述的不同首先表现在发射光的强度不同,图 2 中的发射光相对强度比图 3 中大很多;其次是波长间隔不同,图 2 中发射光

波长与激发光波长之差的绝对值最大约有 70 nm, 而图 3 中发射光波长与激发光波长之差的绝对值最大约 20 nm; 还有波长分布也不同, 图 2 中的发射光仅在激发光的长波方向一侧有分布, 而图 3 中发射光在激发光的两侧都有分布。图 2 与图 3 的诸多差异表明, 绿色的 530 nm 波长光与红色的 632.8 nm 波长光各自在血液中所引发的能量转移过程会有所不同, 因而这两种波长的光波对血液所产生的生物效应也会有所差异。

本研究观察到, 530 nm 波长光照射血液能诱发比较强的荧光辐射, 表明用该波段的光波照射血液时, 会在血液中引发比较大的能量转移变化, 由此会在血液中进一步引发一系列的生物化学反应(包括自由基反应), 并进而产生比较强的生物学效应。因此, 若采用这一波段的激光(如 532 nm 激光)进行血管内照射治疗, 应适当减小照射功率, 以避免其有可能对血细胞所产生的过度破坏作用。

4 结 论

1) 530 nm 波长光照射血液会产生比较强的荧光发射, 这提示 530 nm 光对血液有比较强的生物学作用; 2) 502 nm 波长光照射血液也会产生荧光发射, 但其荧光强度比 530 nm 波长光照射血液所产生的荧光弱很多, 这一结果与血液对 502 nm 波长光的吸收率小于对 530 nm 波长光的吸收率的情况相一致; 3) He-Ne 激光(632.8 nm)照射血液, 在散射光中可观察到有波长不同于原激发光波长的光谱分布, 并且在原激发光波长两侧都有分布, 只是其强度很微弱。这表明, He-Ne 激光能在血液中引发一定程度的物理和化学的变化, 进一步研究这些变化, 有可能为理解激光血液疗法的治疗机理提供一定依据; 4) 用上述三种波长光照射仅含肝素的生理盐水, 未观察到有不同于原激发光波长的发射光谱出现。这表明, 前面三种情况中所检测到的不同于原激发光波长的发射光谱是由血液发射的; 5) 光诱发的自由基和自由基反应在光照射血液所产生的生物效应中起重要作用, 进一步研究光量子引发血液中的自由基反应过程及特点对于阐明激光血管内照射疗法的治疗机理具有一定意义。

参 考 文 献

- 1 Dong Weiren, Xiao Yingqing, Cheng Jieluan. Combined treatment of cerebrovascular diseases by endovascular laser irradiation of blood [J]. *Laser Journal* (激光杂志), 1997, **18**(1): 56~ 58 (in Chinese)
- 2 Ni Xiaowu, Liu Xiaoran, Lu Jian *et al.*. The physical analysis of improving on permeability of erythrocyte in intravascular low-reaction level laser irradiation therapy [J]. *Journal of Optoelectronics • Laser* (光电子 • 激光), 1999, **10**(Supp.): 61~ 63 (in Chinese)
- 3 Lan Xiufeng, Liu Xiaoran, Wang Yawei *et al.*. Physical analysis of intravascular low-reaction level laser irradiation therapy decreasing the aggregate degree of erythrocyte [J]. *Chinese J. Lasers* (中国激光), 2000, **A27**(5): 477~ 480 (in Chinese)
- 4 X. Liu, J. Lu, Y. Wang *et al.*. The physical analysis of intravascular low-reaction level laser irradiation therapy on improving the hemorheologic characteristics [C]. *SPIE*, 1999, **3863**: 465~ 467
- 5 L. Zhou, R. Wang, C. Sun *et al.*. Analysis of the micromechanism of ILLI treating diseases [C]. *SPIE*, 1998, **3344**: 149~ 158
- 6 Yan Chenzhong, Fan Daping, Zhao Xiaoning *et al.*. Biological effects of intravascular low level laser irradiation by five different wavelength [J]. *Applied Laser* (应用激光), 1998, **18**(2): 86~ 89 (in Chinese)
- 7 Huo Xiaoli, Zhang Yingdong, Di Qing *et al.*. Effect of intravascular low level laser irradiation with different wavelenths for the treatment of patients with Cerebral infarction [J]. *Journal of Optoelectronics • Laser* (光电子 • 激光), 2000, **11**(1): 92~ 95 (in Chinese)
- 8 Zhang Ping, Rao Fengfei, Hou Xiaoqiang *et al.*. The clinical application and experiment on the best dosage under semiconductor green laser intravenous irradiation [J]. *Laser Journal* (激光杂志), 2001, **22**(5): 77~ 79 (in Chinese)
- 9 S. Xu, S. Lin, R. Chen. Absorption spectrum of blood components in human and rabbit [C]. *SPIE*, 1998, **3344**: 212 ~ 220
- 10 D. M. Amundson, M. Zhou. Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol [J]. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1999, **38**(1): 43~ 52
- 11 D. O. Cowan, R. L. E. Drisko. *Elements of Organic Photochemistry* [M]. New York: Plenum Press, 1976. 23~ 30
- 12 A. Cantrell, D. J. Garvey, J. Roberts *et al.*. Photochemical studies of A2-E [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2001, **64**(2): 162~ 165
- 13 K. C. Smith. *The Science of Photobiology* [M]. New York: Plenum Press, 1977. 98~ 110
- 14 F. Gabor, K. Szocs, P. Maillard *et al.*. Photobiological activity of exogenous and endogenous porphyrin derivatives in escherichia coli and enterococcus hirae cells [J]. *Radiat. Environ Biophys.*, 2001, **40**(2): 145~ 151
- 15 B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine* [M]. Oxford: Clarendon Press, 1989. 22~ 85
- 16 J. A. Knight. Free radicals: their history and current status in aging and disease [J]. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1998, **28**(6): 331~ 346
- 17 Y. A. Vladimirov. Free radicals in primary photobiological processes [J]. *Membr. Cell Biol.*, 1998, **12**(5): 645~ 663