

文章编号: 0258-7025(2004)07-0893-04

可见波段 Ar⁺ 激光诱导血红蛋白荧光 光谱特性研究

高淑梅^{1,2}, 刘莹^{1,2}, 兰秀凤², 沈中华², 陆建², 倪晓武^{2*}

(¹ 徐州师范大学物理系, 江苏 徐州 221009; ² 南京理工大学应用物理系, 江苏 南京 210094)

摘要 用可见波段、不同波长的 Ar⁺ 激光激发同一浓度血红蛋白溶液产生荧光光谱的研究结果表明, 血红蛋白在 628 nm 附近存在一个较强的荧光峰, 且随激励激光波长的红移其相对光强依次增大, 从而解释了临床上用 He-Ne 激光治疗疗效显著的物理机理。理论研究结果认为该血红蛋白的荧光光谱主要是血红蛋白中存在的卟啉类荧光团的贡献。还利用 475.6 nm 的激光分别激发浓度为 1%~7% 的血红蛋白溶液, 根据所获得的荧光光谱发现, 其谱峰位置几乎不随样品浓度的改变而改变, 该结果显示了激光与普通光对生物大分子存在明显不同的作用特性。

关键词 血液生理学; 荧光光谱; 血红蛋白; 荧光团; 卟啉

中图分类号 R 318.51 **文献标识码** A

Investigation of Visible Laser-Induced Hemoglobin Fluorescence Spectral Characteristics

GAO Shu-mei^{1,2}, LIU Ying^{1,2}, LAN Xiu-feng²,
SHEN Zhong-hua², LU Jian², NI Xiao-wu²

¹ Department of Physics, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221009, China

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

Abstract Based on argon laser of different wavelengths in visible light excited hemoglobin fluorescence spectra, it shows that there is one prominent fluorescence peak near 628 nm and the intensity increases with excitation light red shifting. The theoretical analysis indicates the hemoglobin fluorescence is mainly due to porphyrin fluorophores in it. In addition, it is found that the peak locations of 476.5 nm laser induced the fluorescence spectra hardly change with the sample concentration from 1% to 7%. The research indicated that the effects of laser are markedly different from that of normal light in the characteristics of low lever light-biotissue interaction.

Key words blood physiollogy; fluorescence spectra; hemoglobin; fluorophore; porphyrin

1 引 言

低功率激光照射疗法的治疗效果已得到了该领域专家的认可^[1], 在许多国家的临床上得到广泛的应用。诸多临床应用结果报道表明该疗法不仅对各种病因引起的久治不愈的伤口具有显著的疗效, 而且采用低功率激光血管内照射疗法可以对许多疾病

有很好的治疗效果或辅助治疗作用^[2], 其中尤其以 He-Ne 激光作光源的疗效最显著, 也得到最为普遍的使用, 所以至今仍为该领域的研究热点之一。有关 He-Ne 激光能治疗疾病的物理机理也一直是国内外学者关注的热点问题, 已有学者从不同的方面进行了相关的研究^[3~5], 但是至今仍未得到较为完

收稿日期: 2003-04-18; 收到修改稿日期: 2003-06-16

基金项目: 江苏省教育厅科研项目(02KJB140006)和教育部高校优秀青年教师奖励计划资助课题。

作者简介: 高淑梅(1961—), 女, 博士, 徐州师范大学物理系教授。主要从事光子生物医学和激光全息方面的研究和教学工作。E-mail: gaosm61@163.com

* 通信联系人。E-mail: nxw@mail.njust.edu.cn

善的理论体系,所以有必要对激光与血液及其组份相互作用作进一步的研究。

近年来我国学者已有一些关于激光激发血液产生的荧光光谱初步分析和研究的报道^[6~9],但是所报道的结果差异较大,这其中有生物大分子本身的复杂性因素的影响,也存在实验样品和作用条件的不同引起的差异。

血液中主要成分是红细胞,而红细胞几乎全部是由血红蛋白溶液组成,为此本文在照射激光功率密度不变的情况下,对可见波段的不同波长 Ar⁺ 激光诱导血红蛋白的荧光光谱,以及同一波长的激光激发的不同浓度的血红蛋白荧光光谱进行了相关研究,初步得到了激光与血红蛋白溶液的作用规律。

2 实验材料与方法

2.1 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),其波长扫描在 160~900 nm 范围内都有较好的响应曲线。为突出重点,仅给出了有效波段的荧光光谱图。

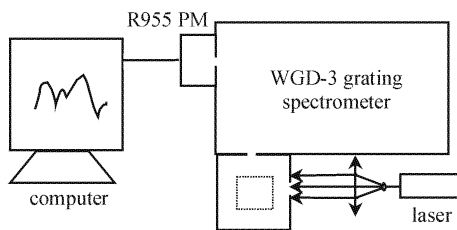


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Experimental setup

激光光源是 Spectra-Physics Lasers Inc. 生产的 2060-5S 型 Ar⁺ 激光器,可输出波长为 457.9~528.7 nm 多种波长单色光。为了增加试样的受照面积,激光光束又被扩束和准直,如图 1 所示。实际作用在血红蛋白溶液样品上的激光照射光斑面积约为 0.7 cm²,实际作用在样品处的激光功率密度均为 25.7 mW/cm²。

2.2 试样制备

血液样品取自一只健康的雄性成年小白鼠。经眼眶采血,5% 肝素抗凝,获得全血。用 TGL-16C 高速台式离心机,常规分离获得红细胞。用适量的蒸馏水裂解,配制成所需的血红蛋白溶液。每次检测取被测样品 2 mL。所有检测均在 25℃ 的室温下

进行,扫描间隔为 0.2 nm,每一样品均进行三次扫描测试。

3 实验结果

3.1 可见波段、不同波长的激光诱导同一浓度的血红蛋白荧光光谱

采用 Ar⁺ 激光器输出的 5 种波长:457.9 nm, 476.5 nm,488.0 nm,496.5 nm 和 501.7 nm 的激光激发浓度为 3% 的血红蛋白溶液所获得的荧光光谱如图 2 所示。

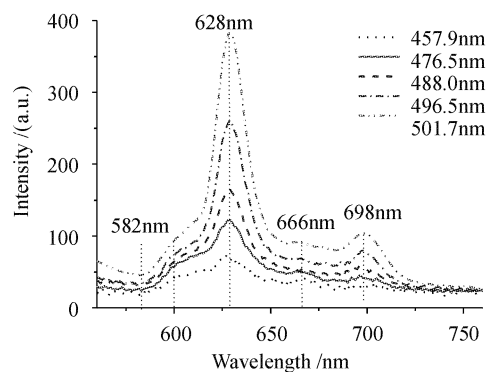


图 2 一定强度、不同波长的氩离子激光诱导的浓度为 3% 的血红蛋白荧光光谱

Fig. 2 Ar⁺ laser-induced hemoglobin fluorescence spectra in the case of the concentration of 3% with definite power various wavelengths

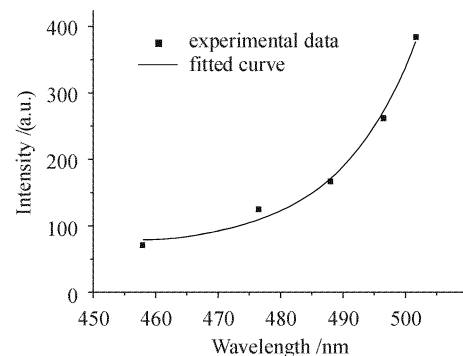


图 3 血红蛋白荧光光谱中的 628 nm 谱峰强度随激发光波长红移的变化关系

Fig. 3 Peak intensity of hemoglobin fluorescence spectra near 628 nm grows nonlinearly with excited laser red shift

由图 2 可见,不同波长的激光激发的同一浓度的血红蛋白的荧光光谱谱线分布几乎完全相同,即在波长为 628 nm 附近形成的比较强的荧光峰,在波长为 600 nm,666 nm 和 698 nm 处也存在小幅度的变化,且它们均不随激发光波长的变化而变化。

因此,根据分子荧光发射理论^[10],这些谱峰均为荧光峰。

另外,波长为 628 nm 和 698 nm 谱峰几乎都随激发光波长红移,荧光峰的相对强度在增加,尤其以位于 628nm 处谱峰最为显著,其强度与激发光波长几乎呈指数增加,如图 3 所示。

还注意到在波长为 582 nm 附近是一个较为明显的波谷,考虑到血红蛋白的吸收谱^[11]中,该处正是一个小的吸收峰,因而可以认为该波谷是吸收效应所致。

3.2 血红蛋白的浓度对激光诱导的荧光光谱的影响

用波长为 476.5 nm 的 Ar⁺ 激光分别激发 1%~7% 浓度的血红蛋白溶液所获得的荧光光谱如图 4 所示。由图可见,光谱中存在一个很明显的荧光区,即是由峰值波长为 600 nm 和 628 nm 的双谱峰形成的宽谱峰,该谱峰随血红蛋白溶液浓度的降低而升高,且增长更为显著,结构也越来越明显了。同样,在波长为 559 nm 处的小谱峰与 600 nm 谱峰存在类似的规律。而 698 nm 附近的荧光峰随浓度的改变其相对幅值几乎不变。

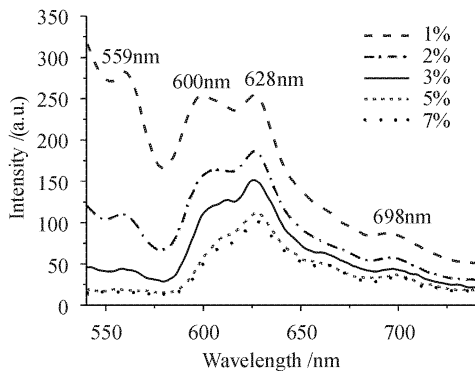


图 4 476.5 nm 激光激发不同浓度的血红蛋白产生的荧光光谱

Fig. 4 476.5 nm laser-induced hemoglobin fluorescence spectra in the case of various concentrations

对比血红蛋白的吸收光谱^[11],由于波长为 559 nm 处恰恰是一个吸收谷,所以我们认为该谱峰是由吸收谱所致,由于浓度越低激光的散射谱带加宽带来的本底越高,使得这个吸收谷也就越明显;另一方面,血红蛋白对波长短于 600 nm 附近的光仍存在较强的吸收,浓度越高,吸收光谱越强,因此造成 600 nm 处的谱峰随浓度增高其相对强度降低的现象。

4 分析与讨论

1) Ar⁺ 激光激发的血红蛋白荧光光谱主要是血红蛋白中的卟啉类荧光团的贡献。血红蛋白是动物体内的一种主要的蛋白质,它肩负着重要的生理功能,是一种色素蛋白,由珠蛋白和血红素结合而成,而血红素是由原卟啉 IX 与 Fe²⁺ 组成^[12]。卟啉是一种比较强的荧光物质,卟啉类荧光团的荧光发射范围一般在 600~690 nm^[11],但是它们随环境的变化(如处于不同的卟啉荧光团或溶剂中)有一定的漂移。比较所得的实验结果,我们认为可见波段的 Ar⁺ 激光激发的血红蛋白荧光光谱主要是血红蛋白大分子中的带有卟啉环的链或分子所形成的卟啉类荧光团的贡献。

2) 激光与普通光对生物组织的作用效果或结果是不同的。图 4 表明,血红蛋白的荧光光谱谱线分布几乎不随浓度的变化而改变,这一点与我们用普通的准单色光(谱带相对较宽)激发血细胞荧光光谱会随血细胞的浓度变化而发生红移现象^[13]相悖。这一结果说明了激光与普通光对生物组织的作用效果或结果是不同的,但是究竟是激光的哪种特性产生了这种效果尚待进一步研究。

3) 血红蛋白的浓度变化对其荧光光谱也有一定的影响。进一步分析和比较图 4 还可以看出,随着血红蛋白浓度的降低,激发光的散射谱带越来越宽,从而使所得到的荧光光谱本底噪声加强,形成了光谱强度加强的“假象”。若去除本底噪声的影响,实际上在浓度≤3%时,随血红蛋白浓度的增高,荧光的相对强度也在增大,这是由于溶液中荧光团数量的增加引起的;而浓度>3%时,随血红蛋白浓度的增高,荧光的相对强度却在减小,则应是溶液浓度越高,荧光团之间以及荧光团与其他大分子之间的相对距离减小,碰撞和重吸收的概率增大,导致发射的荧光被二次吸收或碰撞,从而荧光猝灭。

另外需要说明的是,本文所给出的实验结果已经过多次重复试验,采用不同的小白鼠、不同的实验条件下进行,所得结果基本一致。

参 考 文 献

- 1 Tiina I. Karu. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy [J]. *IEEE J. Quantum Electron*, 1987, **QE-23**(10): 1703~1717
- 2 Zhu Ping, Intravascular Low Intensity Laser Irradiation Therapy [M]. Nanning: Guangxi Science And Technology Press, 1999. 67~176
朱萍. 低强度激光血管内照射疗法[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1999. 67~176

- 3 Lan Xiufeng, Liu Xiaoran, Eang Yawei *et al.*. The physical analysis of intravascular low-reaction-level laser irradiation therapy decreasing the aggregate degree of erythrocyte [J]. *Chinese J. Lasers*, 2000, **A27**(5):477~480
兰秀凤, 刘晓然, 王亚伟 等. 弱激光血管内照射改善红细胞聚集能力的物理机理研究[J]. 中国激光, 2000, **A27**(5):477~480
- 4 Liu Xiaoran, Lu Jian, Wang Yawei *et al.*. Fractal analysis on the physical mechanism of intravascular low reaction level laser irradiation therapy improving the deformity of erythrocyte [J]. *Chinese J. Lasers*, 2002, **A29**(2):189~191
刘晓然, 陆建, 王亚伟 等. 弱激光照射改善红细胞变形性的物理机理的分形研究[J]. 中国激光, 2002, **A29**(2):189~191
- 5 Luo Xiaosen, Ni Xiaowu, Lu Jian *et al.*. Influence of He-Ne laser on oxygen dissociation of erythrocyte [J]. *J. Optoelectronics · Laser*, 2002, **13**(4):413~415
骆晓森, 倪晓武, 陆建 等. He-Ne 激光对红细胞氧解离的影响[J]. 光电子·激光, 2002, **13**(4):413~415
- 6 Chen Rong, Chen Yanjiao, Yang Wenqin *et al.*. Primary study on the blood fluorescence spectrum affected by He-Ne laser [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 1999, **8**(1):62~65
陈荣, 陈艳娇, 杨文琴 等. 激光照射血液荧光光谱的初步研究[J]. 激光生物学报, 1999, **8**(1):62~65
- 7 Jiang Yuqiang, Li Cangyong, Xiao Liantuan *et al.*. A study of fluorescence spectra sent out from HBsAg positive blood which irradiated with He-Ne laser [J]. *Chinese J. Medical Physics*, 2000, **17**(4):203~204
降雨强, 李昌勇, 肖连团 等. He-Ne 激光照射 HBsAg 阳性血液的荧光光谱研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2000, **17**(4):203~204
- 8 Gao Shumei, Kong Yan, Shen Zhonghua *et al.*. Analyzing physical mechanism about 532 nm laser-induced erythrocyte fluorescence [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(4):369~372
高淑梅, 孔艳, 沈中华 等. 532 nm 激光激励血液中红细胞产生荧光的物理机理研究[J]. 中国激光, 2003, **30**(4):369~372
- 9 Luo Xiaosen, Ni Xiaowu, Lu Jian *et al.*. Study of fluorescent spectrum of blood induced by lights of different wavelengths [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(1):93~96
骆晓森, 倪晓武, 陆建 等. 不同波长光照射血液诱发的荧光光谱研究[J]. 中国激光, 2003, **30**(1):93~96
- 10 Qiu Guanying, Peng Yinxiang. *Biological Physics* [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2000. 137~138
丘冠英, 彭银祥. 生物物理学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000. 137~138
- 11 Marloff H. Niemz. *Laser-Tissue Interactions Fundamentals and Applications* [M]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996. 16~18, 52~54
- 12 Chen Huili. *Biological Macromolecular Structure and Function* [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1999. 43~44
陈惠黎. 生物大分子的结构和功能[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999. 43~44
- 13 Gao Shumei, Lin Ying, Lu Jian *et al.*. Analysis of 407 nm light-induced erythrocyte fluorescence spectra red shifted mechanism with the concentration increase [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(3):261~263
高淑梅, 刘莹, 陆建 等. 407 nm 光诱导的红细胞荧光光谱随浓度增加红移的机理分析[J]. 光子学报, 2003, **32**(3):261~263