

文章编号: 0258-7025(2009)10-2651-06

重型 α 地中海贫血红细胞的拉曼光谱

王桂文¹ 彭立新¹ 陈萍² 姚辉璐¹ 黄庶识¹ 陶站华¹ 黎永青³

(¹ 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530003; ² 广西医科大学第一附属医院, 广西南宁 530021)
³ 美国东卡罗莱纳大学物理系, 北卡罗莱纳 格林维尔 27858-4353)

摘要 采用光镊拉曼光谱(LTRS)方法收集一例重型 α 地中海贫血患者单个红细胞的拉曼光谱, 分析同一群体内不同细胞间的光谱差异, 从中了解地中海贫血红细胞的病理过程。结果发现, 重型 α 地中海贫血患者红细胞的拉曼光谱信号显著低于正常对照, 并检测到一定比例的有核红细胞; 正常对照的红细胞拉曼光谱均一, 而重型 α 地中海贫血患者的细胞形态和拉曼光谱均显示出多样性; 中等大小、形态接近正常的一类红细胞, 其细胞间光谱差异最大; 单细胞拉曼光谱可观察到部分外表形态正常的红细胞, 其血红蛋白可能发生了血红素凝集和蛋白质变性。

关键词 光谱学; 拉曼光谱; 红细胞; 单细胞分析; 重型 α 地中海贫血

中图分类号 O657.37 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2651

Single-Cell Raman Spectroscopy of Erythrocytes from Hemoglobin Bart's Hydrops

Wang Guiwen¹ Peng Lixin¹ Chen Ping² Yao Huilu¹
Huang Shushi¹ Tao Zhanhua¹ Li Yongqing³

¹ Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530003, China

² First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China

³ Department of Physics, East Carolina University, Greenville, North Carolina 27858-4353, USA

Abstract Hemoglobin (Hb) bart's hydrops is caused by mutations or deletions affecting all four α -globin genes, leading to absent α -globin chain production from the affected genes. Laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) is a useful tool for single-cell analysis based on the optical trapping and Raman scattering. A LTRS setup with 785 nm laser beam was used to record the Raman scattering of trapped single erythrocytes from Hb bart's hydrops. The results reveal that the Hb bart's erythrocytes are possessed of not only diversiform cells and heterogeneous Raman scattering signals, but remarkable low intensity of Raman scattering and definite proportion nucleated erythrocytes, while the normal controls homogeneous. The analyse of Raman spectra and principal component analysis uncovers the Raman scattering heterogeneity of cells with normal shape and middle size. LTRS peeks insight into the abnormal biochemical essence beyond the normal cell appearance due to the heme aggregation and protein denaturalization.

Key words spectroscopy; Raman spectroscopy; single-cell analysis; erythrocytes; α -thalassemia hemoglobin bart's

1 引言

地中海贫血(地贫)是一组由于珠蛋白基因的缺失或缺陷导致珠蛋白链合成障碍所引起的遗传性溶血性疾病, 我国的华南地区是高发区。其中, α 地贫是由于 α 珠蛋白基因的缺失或缺陷导致 α 珠蛋白链合成缺乏或减少所致。 α 珠蛋白链的缺乏使 β 和 γ

珠蛋白链相对增多, 过剩的 β 和 γ 珠蛋白链聚合成血红蛋白(Hb) Bart's(γ_4)及 Hb H(β_4), Hb Bart's 和 Hb H 对氧的亲合力极高。同时, Hb H 分子不稳定, 易沉积在红细胞内成为包涵体, 影响膜的功能, 导致红细胞被破坏, 引起慢性溶血性贫血。临床上把 α 地贫分为静止型携带者, α 地中海贫血特性、

收稿日期: 2009-04-22; 收到修改稿日期: 2009-06-29

基金项目: 国家自然科学基金(30660063)和广西科学基金(0832022Z)资助课题。

作者简介: 王桂文(1969—), 男, 副研究员, 主要从事生物物理与微生物应用等方面的研究。E-mail: wguiwen@126.com

Hb H 病和 Hb Bart's 胎儿水肿综合症(即重型 α 地贫)。Bart's 患者贫血较重,平均血红蛋白的质量浓度仅 60~70 g/L,红细胞的平均血红蛋白质量浓度通常很低,细胞大小不均,异形和靶形很明显^[1]。

分子振动光谱以其极高的光谱和时间分辨率、灵敏度、精确度以及无损、安全、快速等优点而成为医学光子学的重要研究领域^[2~6]。任何物质都有确定的分子结构,都有确定的分子振动光谱。Hb 分子由 4 个亚基组成, α 地贫中 α 珠蛋白链的缺乏或减少,必然导致红细胞内 Hb 分子的一级、二级乃至三级结构的改变。而 Hb 结构的改变也必然反映在其振动光谱上,这使得采用振动光谱技术来检测地贫成为可能。已有不少将振动光谱技术应用于血红蛋白和功能红细胞研究的报道^[7~11]。相对于其他方法,拉曼光谱技术用于医学诊断具有非侵入性、非破坏性、不用试剂和快速灵敏的优点,在生物医学和临床诊断上的应用是目前的热门课题。激光镊子拉曼光谱(LTRS)是光学俘获与共焦拉曼技术的结合,提供了获知详细的单细胞生化信息的新途径,可以表征和检测发生在细胞和组织内的生化变化,且干扰细胞的自然生理状态,是单细胞分析的良好工具^[12~14]。本文应用 LTRS 方法收集、分析一例 Bart's 患者的单个红细胞的拉曼光谱,收集、对比不同形态的红细胞的平均光谱,分析同一群体内不同细胞间的光谱差异,以期通过 4 个 α 基因均缺失的 Bart's 患者的红细胞分析,从中了解地贫红细胞的病理过程。

2 材料与方法

2.1 血液样品收集

血液样品来自广西医科大学第一附属医院,Bart's 患者为 1 月龄,正常对照分别为 1 月龄和 4 月龄。采集的外周静脉血用 ACD 抗凝,置 4 °C 保存备用。

2.2 实验装置与光谱收集

采用和文献^[15]相同的实验系统。在倒置显微镜(TE2000U, Nikon)导入 785 nm 激光,经物镜(100 \times , d_{NA} 1.30)聚焦进入溶液样品槽。激光俘获并激发单个细胞,产生的拉曼散射由物镜收集,沿着原光路导入光谱仪(SpectraPro2300i, Acton)。光谱仪参数为分辨率 6 cm^{-1} ,光栅刻线密度 600 lines/mm,闪耀波长 650 nm。光谱信号由电荷耦合器件 CCD(Spec-10, Princeton Instruments)检测,用液氮冷却 CCD 到 -120 °C。用悬浮在无菌水中的聚苯乙烯小球(直径为 2.0 μm)做光谱系统校

正。激光汇聚点的功率为 30 mW。

取 100 μL 外周血用质量分数为 0.9% 生理盐水做 3000 倍稀释,滴加 200 μL 到样品槽中,用 100 倍油浸物镜观察,光镊俘获单个红细胞于石英玻片上方 8 μm ,收集带背景的拉曼光谱,收集时间为 10 s;移开细胞,用同样的时间收集不俘获细胞的背景拉曼光谱。在地贫患者的血液样品中收集以下 4 种形态的红细胞的拉曼光谱,每种收集 15~30 个细胞的光谱。a 类,细胞较大(>10 μm),类似大饼;b 类,细胞中等大,接近正常红细胞形态;c 类,外形接近正常但比较小(<6 μm);d 类,不规则形状的红细胞,如泪滴状,长条形等,细胞大小不一。两个正常对照样品做同样处理,各随机收集 30 个细胞的拉曼光谱。

2.3 数据处理

将光谱数据转换为 ASCII 数据,输入软件 Micro Origin 7.0 处理。红细胞的实际光谱计算公式为

$$S_0(\nu) = [S_{\text{acq}}(\nu) - S_{\text{bg}}(\nu)] R(\nu), \quad (1)$$

其中 $S_{\text{acq}}(\nu)$ 为每个红细胞测得的光谱, $S_{\text{bg}}(\nu)$ 为源自溶液、盖玻片和光学部件的背景光谱, $R(\nu)$ 为系统响应函数。

每种样品或每类细胞的平均光谱为所有的细胞实际光谱的平均。光谱曲线经 3 点相邻平均平滑,取一阶导数,而后取 600~1750 cm^{-1} 指纹峰集中区域,做矢量归一化处理,公式为

$$R_{ij} = A_{ij} / \sqrt{\sum_{i=1}^m A_{ij}^2}, \quad (i = 1, 2, 3, \dots, m; j = 1, 2, 3, \dots, n) \quad (2)$$

其中 A_{ij} 对应光谱矩阵中第 i 行,第 j 列的数值, R_{ij} 对应计算结果矩阵中第 i 行,第 j 列的数值。 m 为 600~1750 cm^{-1} 指纹峰集中区的光谱数列($m = 850$), n 为细胞光谱数。用 Matlab7.0 软件工具包 PLS-Toolbox 做主成分分析(PCA)。每类随机取 3 个细胞光谱做检验,其余做训练。

3 结果与分析

3.1 红细胞光谱收集与平均拉曼光谱分析

悬浮在生理盐水中的红细胞很容易被光镊俘获并囚禁在溶液中,与基底石英玻片没有任何接触,得到信噪比很高的拉曼光谱。图 1 是重型 α 地贫患者红细胞和正常对照的平均拉曼光谱及红细胞的图像。图 1(a)中曲线组 A 为平均光谱,曲线组 B 为以 1448 cm^{-1} 峰强度归一化后的光谱;图 1(b)和图 1(c)分别为重型 α 地贫患者和正常人的红细胞

微分干涉差(DIC)图像,标尺为 $10\ \mu\text{m}$ 。图 1(b)显示了患者红细胞形态的多样性,源于胞内 Hb 成分和结构的变化。 $1500\sim 1660\ \text{cm}^{-1}$ 区域是一群比较显著的峰,与 Hb 组成和结构有关,其中 $1545\ \text{cm}^{-1}$ 是 amide II 蛋白骨架的 N-H 键振动, $1582\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1603\ \text{cm}^{-1}$ 来自苯丙氨酸、酪氨酸的乙烯基团

(C=C), $1619\ \text{cm}^{-1}$ 来自酪氨酸和色氨酸的乙烯基团(C=C)。在表征 α -螺旋结构的 $1654\ \text{cm}^{-1}$ 处,其光谱的强度略低于正常对照。在正常血红蛋白中,二级结构以 α -螺旋为主,没有 β 折叠结构。在 Bart's 患者中,由于 α 链的合成完全丧失,Hb 中所含的 α -螺旋明显减少, $1654\ \text{cm}^{-1}$ 信号减弱。

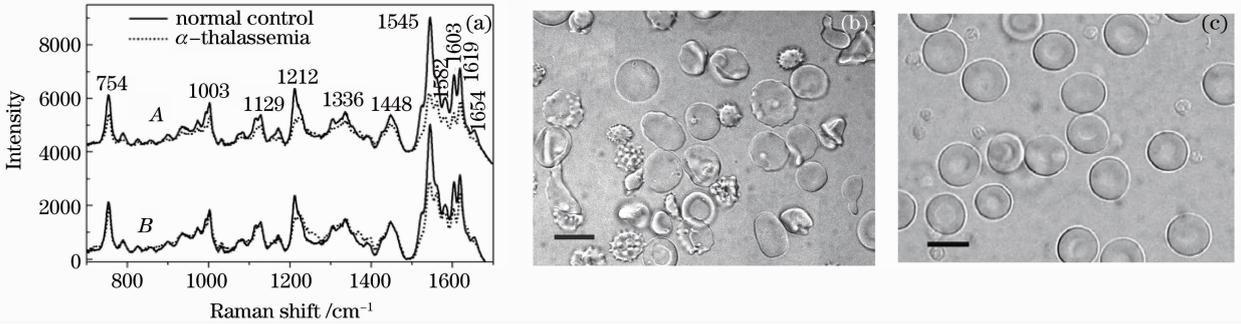


图 1 (a) 重型 α 地贫患者样品和正常对照的平均拉曼光谱;(b)患者和(c)正常人的红细胞 DIC 图像

Fig. 1 Averaged Raman spectra of single erythrocytes (a); DIC images of erythrocytes (b) and normal (c) from Hb bart's hydrops

$1448\ \text{cm}^{-1}$ 是表征蛋白质和脂类 CH_2 的变形振动,其强度主要受蛋白含量影响,与蛋白结构变化关联不大。因此,以 $1448\ \text{cm}^{-1}$ 峰的信号强度归一化处理后,在其他峰位上显现出因蛋白质结构变化而引起的差异。从图 1(a)的 B 组曲线看出,Bart's 患者与正常对照在低波数的主要拉曼信号峰基本重合,其他各主要拉曼信号峰强度显著低于正常对照。特别是 $1545\ \text{cm}^{-1}$ 信号强度的显著降低,这说明 Bart's 患儿由于 α 链的合成完全丧失,所合成的 γ 链和 β 链形成四聚体,蛋白结构发生了改变。

3.2 重型 α 地贫患者不同形态红细胞的平均拉曼光谱

在显微镜下可以观察到重型 α 地贫 4 类不同形态的细胞,如图 1(b)所示。a 类,细胞大($\geq 10\ \mu\text{m}$)类似大饼;b 类,细胞中等大($8\ \mu\text{m}$ 左右),和正常红细胞相似;c 类,外形接近正常但比较小($< 6\ \mu\text{m}$);

d 类,大小不一、不规则形态如泪滴状、碎片状的细胞。图 2 是这 4 种形态红细胞的图像及其相应的平均拉曼光谱,显示的是 $1420\sim 1680\ \text{cm}^{-1}$ 区域。图 2(a)为去背景后的实际光谱,图 2(b)是经 $1448\ \text{cm}^{-1}$ 峰值归一化后的光谱。从平均拉曼曲线可以看到,b 类,d 类细胞与 a 类,c 类有明显不同,b 类细胞的 $1448, 1562, 1582$ 和 $1619\ \text{cm}^{-1}$ 峰的强度比其他的高,经 $1448\ \text{cm}^{-1}$ 峰强归一化处理后,表征蛋白结构的 $1545\ \text{cm}^{-1}$ (N-H 骨架)和 $1654\ \text{cm}^{-1}$ (α -螺旋)峰比其他形态细胞的弱,预示着 b 类细胞的 Hb 结构、特别是 α -螺旋结构和其他形态细胞可能有所不同。而 d 类细胞归一化处理前后 $1500\sim 1640\ \text{cm}^{-1}$ 的拉曼信号都明显地弱。

3.3 重型 α 地贫红细胞拉曼光谱的单细胞分析

图 2 显示的是几种形态细胞的平均光谱信息,掩盖了细胞间的差异,从图 1(b)中可看出红细胞形

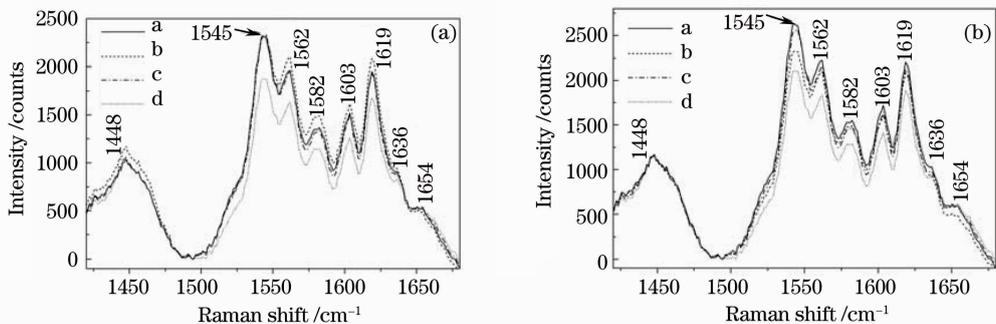
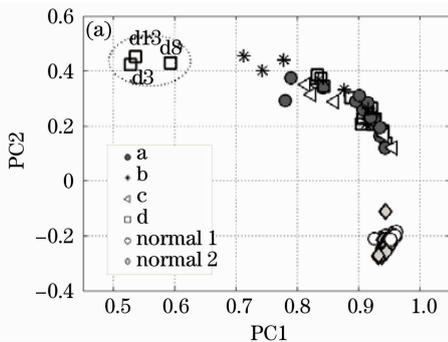


图 2 4 种形态细胞的平均拉曼光谱

Fig. 2 Averaged spectra of four kinds of difference shape erythrocytes

态多样化,胞内成分与结构可能发生了改变,各细胞间的拉曼光谱应有所不同。图 3(a)是 4 种形态重型 α 地贫红细胞和 2 个正常对照样品的 PCA 结果。结果显示,正常对照和重型 α 地贫的拉曼光谱差异明显,在主成分(PC)2 分值可明显区分,说明 PC2 分值可区分正常与重型 α 地贫红细胞;正常细胞间光谱很均一,2 个正常样品的细胞均落入同一集中区域;PC1 分值源于群体内细胞间的差异,重型 α 地贫的细胞间差异显著。其中 d 类细胞有 d3, d8 和 d13 细胞落入与其他 d 类细胞不同的空间,显示着这 3 个细胞与众不同。图 3(b)对比了这 3 个细胞与其他 d 类细胞的平均光谱,曲线 d_1 是 d3, d8,



d13, 3 个细胞的平均拉曼光谱, d_2 是其余 12 个细胞的平均光谱。这 3 个细胞的 Hb 拉曼光谱信号峰很弱,主要的峰如 789, 1094, 1340, 1376 和 1579 cm^{-1} 等峰均和 DNA 有关,说明这几个细胞是有核红细胞,而且细胞质较小,细胞核占整个细胞的比例比较大。在正常对照中,尽管网织红细胞会残留有少量遗传物质,属于晚幼红细胞脱核后到完全成熟红细胞的过渡型细胞,但是数量极少。因此,在正常对照的检测中,红细胞表形均一,没能检测到有核红细胞。而在重型 α 地贫的中能检测到该类 DNA 组分高的细胞应归因于其有核红细胞的增多^[1]。

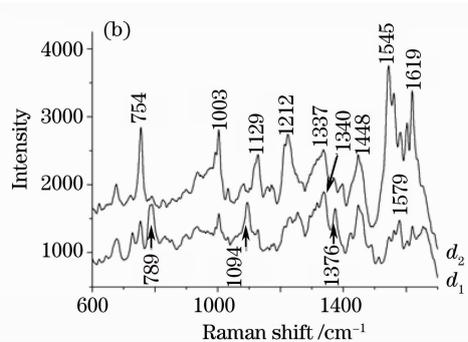


图 3 (a)重型 α 地贫与正常对照的 PCA 结果及(b)d 类细胞中两群不同细胞的平均拉曼光谱对比

Fig. 3 PCA plot for the erythrocytes from normal control and Hb Bart's hydrops (a), and averaged spectra of cells from d group (b)

相对于正常对照细胞间的均一性,重型 α 地贫的细胞间差异明显。把重型 α 地贫样品所有的红细胞(d3, d8, d13 三个有核红细胞除外)进行 PCA 分析,如图 4(a)所示,多数细胞分布于 PC1 0.95, PC2 -0.1 的分值附近,部分细胞分布在外围。在外围不同区域选择代表性的细胞,对比其拉曼光谱差异,如图 4(b)~图 4(e)所示,发现各细胞间的光谱峰形状和强度均有明显的差异,主要出现在 1200~1400 cm^{-1} 和 1500~1670 cm^{-1} 区域。并与图 4(a)中离集中区域(PC1 0.95, PC2 -0.1)的距离成正相关,其分布距离越远,差异越大。

各类细胞呈不均匀分布,其中 b 类细胞在 PC1 分值上差异最明显,其次是 a 类细胞,d 类的几个代表性的细胞间差异最小。a 类细胞中 a6 和 a8 在 1200~1400 cm^{-1} 区域,1231, 1244, 1336, 1369 cm^{-1} 等峰比正常细胞显著提高。b 类细胞中的 b15, b14 与其他细胞差异较大,在拉曼光谱上的异常和 a8 细胞类似。d 类细胞除了 d13, d8 和 d3 几个有核细胞外,其他细胞相对均一,光谱差异不大。c 类的 c8

细胞的光谱信号和图 3 中 d13, d8, d3 相似,是一个有核细胞,但表征 Hb 的 754, 1547, 1619 和 1657 cm^{-1} 等也比较强,说明 c8 细胞和 d13, d8, d3 有所不同,胞内已经合成了血红蛋白,且 Hb 没有发生变性,表征 α -螺旋结构的信号峰明显。

把 4 类细胞中差异最大的一个(b 类取 2 个)细胞集中在一起和正常的对比,如图 4(f)所示,发现各细胞间拉曼光谱差异明显。详细对比 b15, b14 2 个细胞,其光谱在 1200~1400 cm^{-1} 和 1520~1670 cm^{-1} 区域不同于其他细胞。1388, 1369, 1244, 970 cm^{-1} 等峰是血红素凝集的标志峰^[16],在 b14, b15 和 a8 等细胞中均显著升高,预示着这些细胞的胞内可能有血红素凝集。注意到在光谱异常显著的几个细胞均出现了源自蛋白质酰胺基团的 1689 cm^{-1} 峰,且 1448 cm^{-1} 和 1500~1670 cm^{-1} 在原始光谱中均较高,说明其胞内的蛋白质浓度比其他细胞高。但经 1448 cm^{-1} 峰信号强度归一化后,源自蛋白质结构的 1500~1670 cm^{-1} 信号显著低于正常对照,说明其 Hb 发生了变性,拉曼信号降低。

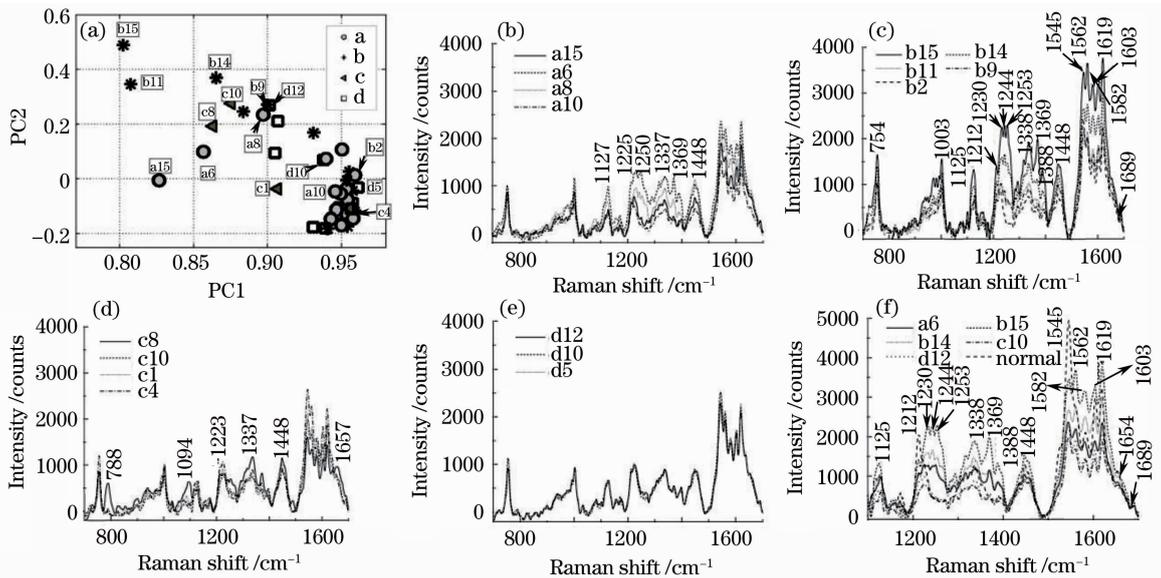


图 4 (a)重型 α 地贫细胞的 PCA 结果及(b)~(f)各类细胞在不同区域代表性的细胞拉曼光谱对比
Fig. 4 PCA plot for the erythrocytes from Hb Bart's hydrops (a) and representative spectra of cells from different groups (b)~(f)

4 讨 论

地中海贫血是遗传性溶血性贫血,目前尚无法根治,避免地贫患者出生的唯一有效手段是在地贫高发区筛查携带者,进行产前诊断。但常规检测方法存在操作繁琐、工作量大、费用相对昂贵、不适合大面积人群的筛查等诸多不足^[1]。Liu Kanzhi 等^[9]通过比较正常人与重型 β 地贫病人 Hb 的红外吸收光谱,发现 β 地贫病人的 α -螺旋含量减少,酪氨酸环吸收增加,及半胱氨酸 Cys-SH 基团红外吸收增加。这些变化可被红外光谱技术检测,并可用于 β 地贫携带者的筛查。但在血液临床研究中需要进行将细胞溶血,收集 Hb,涂膜,干燥等系列准备过程,这使得检验成本增加,工作量加大,获取结果的时间延长。与此相比,拉曼光谱技术无需复杂的样品准备过程,可进行样品的实时检测,而且水和玻璃材质等干扰很小。常规的分析方法是群体分析,无法得到单个红细胞的信息,此外分析样品必须经过预处理,其 Hb 结构也可能发生了改变。而应用 LTRS 技术,样品用生理盐水稀释后,红细胞仍然具有生理活性,得到的是功能红细胞内 Hb 的实时拉曼信号。采用近红外 785 nm 激光,减少对细胞影响,在激光功率 30 mW,收集时间 10 s 条件下,在正常对照细胞中没有观察到 Hb 变性的光谱信号^[16]。

红细胞需经过原始红细胞、早幼红细胞、中幼红细胞、晚幼红细胞、网织红细胞再到成熟红细胞的过

程。网织红细胞是晚幼红细胞脱核后到完全成熟红细胞的过渡型细胞,仅在胞浆残留有少量遗传物质^[1]。Hb 由珠蛋白和血红素组成,其合成始于早幼红细胞,中止于网织红细胞,成熟红细胞已经没有细胞器,不能合成血红蛋白。对比各阶段红细胞的 Hb 含量^[17],本研究中检测到的有核红细胞 d3, d8 和 d13 可能是中幼红细胞或更早期的红细胞;c8 是外形正常的小细胞,胞内 Hb 含量较高,也有遗传物质的信号,可能属于晚幼红细胞或网织红细胞;由于其胞内成分的迥异,PCA 把两者落入明显不同的区域。重型 α 地贫患者由于 α 链无法合成致使所合成的 γ 和 β 链形成四聚体在胞内和细胞膜上沉积,导致细胞膜物理性能发生改变,影响了红细胞的可塑性和渗透脆性,在红细胞经过毛细血管时导致细胞形态发生改变。但是有核红细胞 d3, d8 和 d13 胞内仅检测到很弱的 Hb 信号,胞内 Hb 含量很少,却是不规则形态的细胞,推测是其他因素影响了细胞形态。

从单个红细胞的拉曼光谱对比可知,在 d 类细胞中有 d3, d8 和 d13 细胞, b 类有 b14 和 b15 细胞的光谱和其他细胞的光谱明显不同,把这些细胞排除,得到的各类细胞的平均拉曼光谱基本重合,说明绝大部分红细胞在成熟过程中,细胞病变过程是相同的,胞内 Hb 成分和结构的变化基本相同,只是由于细胞膜物理性能的改变导致其细胞形态多样化^[18]。

地中海贫血是遗传性疾病,重型 α 地贫患者所有的 4 个 α 基因均缺失,无法合成血红蛋白 α 链,是最

严重的地中海贫血,几乎都是“胎死腹中”,即使是能勉强出生,也是存活不长;随着地贫筛查和产前检查的普及,Bart's 患儿出生的几率很小。鉴于不同性别、不同年龄患者的病因和病理基础完全相同,虽然仅对一例病例做了分析,但其可重复性应是可预知的。此外,还分析了大量 α 地贫中间型(3 个 α 基因缺失,临床症状比 Bart's 轻)样本,发现不同性别、不同年龄患者的红细胞,其平均拉曼光谱基本相同,PCA 中落入基本相同的区域,显示了很好的可重复性。

为研究方便,人为地根据细胞形态将重型 α 地贫红细胞分为 a, b, c, d 4 类,但从图 4(a)中可看出,经 PCA 分析的各类细胞都落入相近的空间,没有哪类细胞相对独立成群。a, c 和 d 类都是细胞形态发生了改变的细胞,是完全成熟的红细胞,其 Hb 含量和结构已经确定;而 b 类细胞可能是新生细胞,胞内异常珠蛋白链还没有沉积在细胞膜上,细胞形态表现正常,但从单细胞拉曼光谱可观察到在正常的形态外表下,其胞内血红蛋白成分和结构可能发生了异常改变。这是常规的检验手段无法观察到的,是 LTRS 的技术优势。同时从另一个角度显示了地贫细胞由于部分或全部珠蛋白链合成受抑而导致的红细胞 Hb 病变到形态改变的过程。

5 结 论

采用 LTRS 技术俘获和分析了来自重型 α 地贫患者和正常人单个红细胞的拉曼光谱。通过差异光谱和主成分分析可以发现,重型 α 地贫患者红细胞的拉曼信号明显弱于正常对照,且重型 α 地贫患者不同红细胞间的拉曼光谱差异较大,而正常对照的很均一;重型 α 地贫患者红细胞由于 α 链无法合成,细胞形态发生很大的改变,同时其 Hb 成分和结构在拉曼光谱上也有明显的差异;从单细胞拉曼光谱可观察到,细胞形态表现正常的一类细胞,其胞内血红蛋白成分和结构可能发生了异常改变,其中部分红细胞的 Hb 可能发生了蛋白变性和血红素凝集,1388, 1369, 1244, 970 cm^{-1} 等血红素凝集的标志峰显著升高,而蛋白质结构的拉曼信号显著降低。上述结果显示,LTRS 是细胞分析中极具应用潜力的光学工具,无需化学染色,直接检测,得到真实的自然生理状态的细胞光谱学信息,可分析群体细胞中个体的差异,分辨异常的红细胞,实时检测细胞的生化变化和监测细胞的药物反应等。

参 考 文 献

- Zhang Junwu, Long Guifang. Hemoglobin & Hemoglobinopathies [M]. Nanning: Guangxi Science & Technology Publishing House, 2003. 151~235
张俊武,龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病[M]. 南宁:广西科学技术出版社, 2003. 151~235
- J. Chalmers, P. R. Griffiths. Handbook of Vibrational Spectroscopy [M]. Wiley. Vol. 1~5, 2001
- Jianyue Guo, Bing Du, Min Qian *et al.*. Raman spectroscopic identification of normal and malignant hepatocytes[J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2009, 7(1): 60~63
- Zhang Guangshui, Chen Changqing, Qi Jian *et al.*. Raman spectroscopic study on EC9706 cells irradiated by X-ray with different dose[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, 36(2): 509~512
张广水,陈长青,齐健等. EC9706 细胞经不同剂量 X 射线辐照后的拉曼光谱[J]. 中国激光, 2009, 36(2): 509~512
- Ai Min, Liu Junxian, Yao Huilu. Raman spectra of single reticulocytes and small lymphocytes in blood[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, 29(4): 1043~1048
艾敏,刘军贤,姚辉璐. 外周血中单个网织红细胞与小淋巴细胞的拉曼光谱[J]. 光学学报, 2009, 29(4): 1043~1048
- Han Hongwen, Yan Xunling, Ban Ge *et al.*. Surface-enhanced Raman spectra analysis of serum from diabetes mellitus and complication[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, 29(4): 1122~1125
韩洪文,闫循领,班戈等. 糖尿病及并发症血清的表面增强拉曼光谱[J]. 光学学报, 2009, 29(4): 1122~1125
- B. R. Wood, B. Tait, D. McNaughton. Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1539: 58~70
- B. R. Wood, P. Caspers, G. J. Puppels *et al.*. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation[J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387: 1691~1703
- Liu Kan zhi, Tsang Kamsze, Li Chikeng *et al.*. Infrared spectroscopic identification of β -thalassaemia [J]. *Clinical Chemistry*, 2003, 49: 1125~1132
- Dong Aichun, W. S. Caughey. Infrared methods for study of hemoglobin reactions and structure[J]. *Methods Enzymol.*, 1994, 232: 139~175
- Shen Gaoshan, Gu Huaimin, Yan Tianxiu *et al.*. Micro-Raman spectroscopy of the interaction between sodium nitrite and oxyhemoglobin[J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, 35(9): 1432~1436
沈高山,谷怀民,闫天秀等. 亚硝酸钠和氧合血红蛋白反应的拉曼光谱[J]. 中国激光, 2008, 35(9): 1432~1436
- Xie Changan, M. A. Dinno, Li Yongqing. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells [J]. *Opt. Lett.*, 2002, 27: 249~251
- Xie Changan, Li Yongqing. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques[J]. *J. Appl. Phys.*, 2003, 93: 2982~2986
- Chen De, Huang Shushi, Li Yongqing. Real-time detection of kinetic germination and heterogeneity of single bacillus spores by laser tweezers Raman spectroscopy [J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78(19): 6936~6941
- Wang Guiwen, Yao Huilu, Peng Lixin *et al.*. Analysis of single paraspinal crystal from bacillus thuringiensis by Raman tweezers[J]. *Chinese J. Anal. Chem.*, 2007, 35(9): 1351~1354
王桂文,姚辉璐,彭立新等. 拉曼镊子分析单个苏云金芽孢杆菌伴孢晶体蛋白[J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1351~1354
- B. R. Wood, L. Hammer, L. I. Davis *et al.*. Raman microspectroscopy and imaging reveals insights into hemoglobin denaturation and aggregation within human erythrocytes [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2005, 10(1): 14005
- Wang Fengji. Blood Cytology[M]. Tianjin: Science & Technology Publishing House. 1990. 54
王凤计. 血液细胞学[M]. 天津:天津科学技术出版社, 1990. 54
- S. L. Schrier. Pathophysiology of the thalassemias. the Albion Walter Hewlett Award presentation [J]. *West J. Med.*, 1997, 167: 82~89