

文章编号: 0258-7025(2009)10-2666-04

# 动脉粥样硬化斑块和血管壁的光谱学实验研究

高慧 薛志孝 李迎新 钟丽萍

(天津医科大学生物医学工程系激光医学实验室, 天津 300070)

**摘要** 为区分动脉粥样硬化斑块和血管壁,给激光血管成形术的实时监控提供依据,研究了动脉粥样硬化斑块和血管壁的激光诱导荧光光谱(LIFS)和拉曼光谱。日本雄性大耳白兔15只,以高脂饲料喂养3个月,取主动脉弓作纵行切开,分别采用380 nm紫外激光和532 nm绿激光作为激发光源诱导动脉粥样硬化斑块和血管壁的荧光光谱;采用532 nm绿激光作为激发光源诱导动脉粥样硬化斑块和血管壁的拉曼光谱。结果表明,380 nm紫外激光诱导的动脉粥样硬化斑块和血管壁的荧光光谱在416 nm处均有明显特征峰,但前者的强度显著高于后者;532 nm绿激光诱导的动脉粥样硬化斑块和血管壁的荧光光谱在800 nm处均有明显特征峰,但强度无明显差别;动脉粥样硬化斑块的拉曼光谱在3000 nm和3300 nm处存在明显的波峰和波谷,而血管壁的拉曼光谱曲线较光滑,无明显特征峰。说明380 nm紫外激光诱导的荧光光谱和拉曼光谱均有可能有效区分动脉粥样硬化斑块和血管壁,而532 nm绿激光诱导的荧光光谱不能有效区分动脉粥样硬化斑块和血管壁。

**关键词** 光谱学;荧光光谱;拉曼光谱;激光血管成形术;动脉粥样硬化

**中图分类号** TN249;R318.51 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL20093610.2666

## Experimental Study on Spectroscopy of Atherosclerotic Plaque and Vessel Wall

Gao Hui Xue Zhixiao Li Yingxin Zhong Liping

(Laser Medicine Laboratory, Department of Biomedical Engineering, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** The atherosclerotic plaque and vessel wall are experimental studied by laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) and Raman spectroscopy in order to provide a real-time monitoring for laser angioplasty. Fifteen male Japanese white rabbits fed three months with high-fat feed get aortic arch and do portrait incision by using 380 nm ultraviolet (UV) laser and 532 nm green laser as light source to induce fluorescence spectroscopy of atherosclerotic plaque and vessel wall respectively, while 532 nm green laser is used as light source to induce Raman spectroscopy. Results shows that, 380 nm UV laser-induced fluorescence spectra of atherosclerotic plaque and vessel wall both have characteristic peaks at wavelength of 416 nm, but the intensity of the former is significantly higher than the latter; 532 nm green laser-induced fluorescence spectra both have characteristic peaks at wavelength of 800 nm, but have no significant difference in intensity; The Raman spectroscopy of atherosclerotic plaque has one peak at wavelength of 3000 nm and one trough at 3300 nm, but the Raman spectroscopy of vessel wall is smooth without any peaks. Therefore, both 380 nm UV laser-induced fluorescence spectroscopy and Raman spectroscopy can effectively differentiate atherosclerotic plaque and vessel wall, while 532 nm green laser-induced fluorescence spectra cannot differentiate them effectively.

**Key words** spectroscopy; laser-induced fluorescence; Raman spectroscopy; laser angioplasty; atherosclerosis

### 1 引言

激光血管成形术是治疗心血管疾病的一种新型介入性治疗方法,具有巨大的应用前景<sup>[1]</sup>。但在治

疗过程中出现的血管穿孔现象严重影响它在临床中的广泛应用。为了防止出现血管穿孔,要求能够及时准确地识别出斑块和血管壁。采用光谱学的方法

收稿日期:2009-07-09;收到修改稿日期:2009-08-19

作者简介:高慧(1985—),女,硕士研究生,主要从事激光医学方面的研究。E-mail:gaohui19850619@yahoo.com.cn

导师简介:李迎新(1959—),男,教授,博士生导师,主要从事激光医学方面的研究。

E-mail:yingxinli@tjmu.edu.cn(通信联系人)

诊断动脉粥样斑块, 指导激光消斑以减少血管穿孔的并发症是前途光明的研究新领域<sup>[2,3]</sup>。目前医学诊断的光谱学方法主要有荧光光谱技术和拉曼光谱技术, 但现阶段的研究还都停留在实验阶段, 各实验室的激光装置、诊断参数和实验结果均不一致, 需要大量地积累实验数据, 方能达成共识, 制订统一的标准。

本实验通过对动脉粥样硬化斑块和血管壁进行激光诱导荧光光谱(LIFS)和拉曼光谱检测, 表明这两种方法是区分动脉粥样硬化斑块和血管壁的可行方法, 为激光血管成形术的实时监控提供依据。

## 2 材料与方 法

标本制备: 日本雄性大耳白兔 15 只, 体重 2.0~2.5 kg, 由中国协和医科大学放射医学研究所(天津)提供, 高脂饲料(质量分数分别为 7% 胆固醇, 5% 猪油, 10% 蛋黄粉及 78% 标准颗粒饲料)喂养 3 个月。实验开始时测量动物体重及血脂水平, 喂养 1 个月, 2 个月, 3 个月时分别再次测量。每次测量时禁食 12 h, 测定体重后, 经耳缘静脉取血, 检测血清总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)。3 个月后安乐死, 取主动脉弓, 作纵行切开, 观察动脉粥样硬化斑块发生情况, 肉眼可见动脉粥样硬化斑块形成并突出于管腔, 将动脉组织置入磷酸盐缓冲溶液(PBS)(pH7.4)中, 于液氮中快速冷冻, 之后放入 -80 °C 冰箱保存, 以备光谱检测。

实验仪器: 荧光光谱实验分别采用波长 380 nm, 功率 500 mW 的紫外激光和波长 532 nm, 功率 1 W 的绿激光作为光源, 均由天津医科大学激光医学实验室提供, 荧光光谱仪购于北京爱万提斯科技有限公司, 数据分析软件为光谱仪自带的 Avantes AvaSoft; 拉曼光谱实验采用波长 532 nm, 功率 500 mW 的绿激光作为光源, 拉曼光谱仪由南开大学物理研究所提供。

测定方法: 标本检测前室温解冻, 把标本剪成每块 1.0 cm×1.0 cm, 取 30 块斑块标本, 实验时动脉标本浸没于生理盐水中, 光纤头与动脉内膜保持 2 mm 距离。先测定动脉粥样硬化斑块的荧光光谱和拉曼光谱, 然后取出标本, 轻轻刮除斑块, 暴露血管壁, 再测定血管壁的荧光光谱和拉曼光谱。对于同一对照组, 我们采用同一小块标本, 避免了个体差异性, 另外整个实验在避光过程中进行, 以免外在光源影响测量结果。

## 3 结 果

### 3.1 动脉粥样硬化斑块和血管壁的荧光光谱检测

380 nm 紫外激光诱导的动脉粥样硬化斑块和血管壁的荧光强度与波长的关系如图 1 所示。由于荧光光谱仪自带的分析软件在实际测量时只能采集到 400 nm 以后的信号, 因此在 380 nm 处的激发光源的峰值被忽略, 从图中可以看出, 动脉粥样硬化斑块和血管壁诱导的荧光峰值均位于 416 nm 处, 前者的强度明显大于后者。

532 nm 绿激光诱导的动脉粥样硬化斑块和血管壁的荧光强度与波长的关系如图 2 所示。532 nm 绿激光诱导的粥样硬化斑块和血管壁荧光光谱均在 800 nm 处出现特征峰, 图中 532 nm 处的峰由激光光源产生, 800 nm 处特征峰为诱导荧光特征峰, 粥样硬化斑块和血管壁的荧光峰值均出现在同一波长上且强度无明显差别。

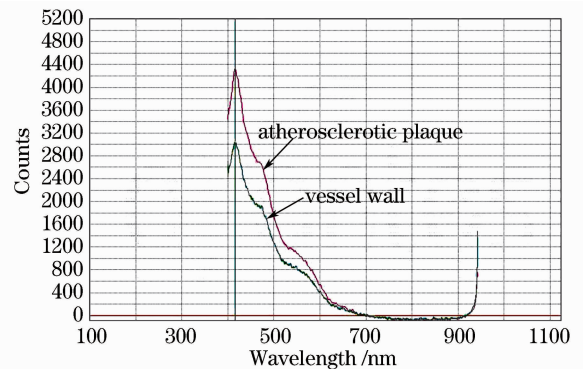


图 1 380 nm 紫外激光诱导的粥样硬化斑块和血管壁的激光诱导荧光光谱

Fig. 1 380 nm UV laser-induced fluorescence spectra of atherosclerotic plaque and vessel wall

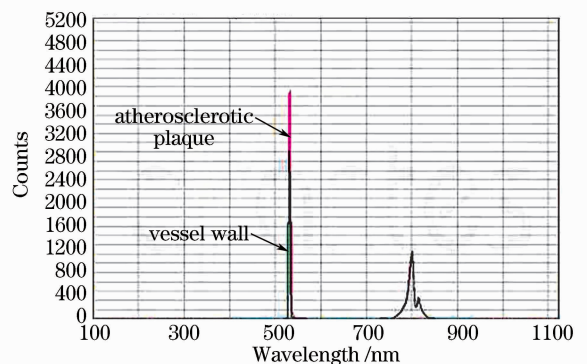


图 2 532 nm 绿激光诱导的粥样硬化斑块和血管壁的激光诱导荧光光谱

Fig. 2 532 nm green laser-induced fluorescence spectra of atherosclerotic plaque and vessel wall

### 3.2 动脉粥样硬化斑块和血管壁的拉曼光谱检测

532 nm 绿激光诱导的动脉粥样硬化斑块和血管壁的拉曼光谱图如图 3 所示。动脉粥样硬化斑块的拉曼光谱在 3000 nm 和 3300 nm 处出现明显的波峰和波谷,而血管壁的拉曼光谱曲线较光滑,无明显特征峰。

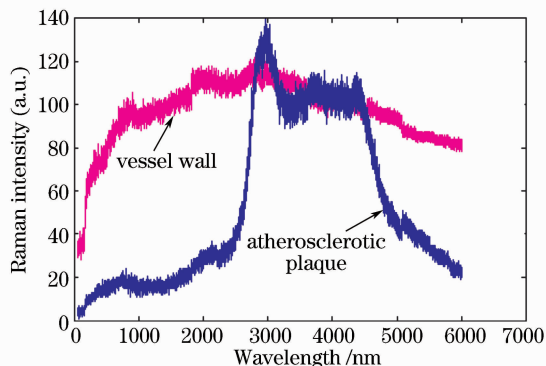


图 3 粥样硬化斑块和血管壁的拉曼光谱

Fig. 3 Raman spectroscopy of atherosclerotic plaque and vessel wall

## 4 讨 论

激光诱导荧光光谱法,就是根据血管壁和斑块组织在激光照射下所发荧光光谱或时间分辨特性的不同而予以识别和定位<sup>[4~6]</sup>。本实验采用的光谱仪能直接输出光谱信号,无需经过一系列的传导、耦合、放大,有效地回避了杂散光和相差,极大地提高了测量精确度。如实验所示,380 nm 紫外激光诱导的动脉粥样硬化斑块的荧光峰值强度明显大于血管壁的荧光峰值,这可能有如下两种解释:一是因为在动脉粥样硬化组织中脂类物质含量明显增高<sup>[7,8]</sup>,研究表明,正常动脉组织中脂质的质量分数为 6.9%,而斑块中的脂质质量分数达 30%~65%<sup>[9]</sup>,并且有研究认为脂质的荧光强度较强<sup>[10]</sup>;二是因为正常动脉组织荧光光谱是以弹性蛋白为主构成的,而粥样硬化动脉组织荧光则以胶原蛋白为主构成<sup>[11,12]</sup>,而胶原蛋白的峰值强度大于弹性蛋白,所以斑块的荧光峰值强度大于血管壁<sup>[13]</sup>。另外,激发光谱与荧光光谱没有光谱交叠而是相距较远,这是因为荧光辐射的波长比激发光波长长,因此测量到的荧光频率与入射光的频率不同。这样,荧光不来自激发光本底的干扰,这也是荧光光谱灵敏度高的原因之一。理论上说激发光谱和荧光光谱的特征峰会相隔一定的距离,这也跟本实验测得的实验结果相吻合。由于 532 nm 绿激光诱导的粥样硬化

斑块和血管壁的荧光峰值均出现在同一波长上且强度无明显差别,因此认为采用 532 nm 绿激光诱导荧光光谱不能有效区分动脉粥样硬化斑块和血管壁。另外,还可进一步采用荧光光敏剂选择性结合在粥样斑块上,进一步提高诊断的可靠性<sup>[14]</sup>。

拉曼散射是分子对光子的一种非弹性散射效应,且取决于分子的几何构型、化学键性质及组成原子的类型等因素,因而拉曼光谱对分子特异性反应灵敏,成为检测组织化学变化、鉴别及诊断疾病的理想手段<sup>[15]</sup>。由图 3 可以看出,动脉粥样硬化斑块的拉曼光谱在 3000 nm 和 3300 nm 处存在明显的波峰和波谷,而血管壁的拉曼光谱曲线较光滑,无特征峰,这应该是在明显动脉粥样硬化组织中脂类物质含量明显增高所致,因此该特征峰很可能与斑块中胆固醇结晶、脂核及泡沫细胞相关<sup>[16]</sup>。但是根据 P. Hendrik 等<sup>[17]</sup>的研究,认为在 1500  $\text{cm}^{-1}$  左右出现脂质特征峰,因此还需要对血管壁及动脉粥样硬化斑块的化学成分和形态学有彻底的理解,目前动脉粥样硬化组织的生物化学及形态学特征仍不完全清楚<sup>[18]</sup>。最近的研究显示,动脉粥样硬化不稳定斑块的破裂是引发急性冠脉综合征的主要原因,而拉曼光谱可对动脉粥样硬化斑块的组成成分进行定位及定量检测,识别性较高,且对组织无破坏性,在发现不稳定斑块方面有独特的优越性<sup>[19,20]</sup>。

## 5 结 论

用 380 nm 紫外激光诱导荧光光谱方法区分动脉粥样硬化斑块和血管壁有可能是可行的,但由于两者的特征谱峰出现在同一波长上,只能将峰值强度作为区分两者的指标,临床上不太好把握;而 532 nm 绿激光诱导的荧光光谱不能有效区分动脉粥样硬化斑块和血管壁。动脉粥样硬化斑块的拉曼光谱在 3000 nm 和 3300 nm 处存在明显的波峰和波谷,而血管壁的拉曼光谱曲线较光滑,无显著特征峰。说明拉曼光谱方法区分动脉粥样硬化斑块和血管壁更为直观,但拉曼散射信号较弱,在一定程度上也限制了该方法的推广应用。研究结果有待在人体内激光血管成形术的研究及临床应用中加以完善。

## 参 考 文 献

- Gu Haimin, Xin Da. Laser-induced fluorescence spectroscopy analysis identifies atherosclerotic plaque [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(6):649~652  
谷怀民,邢 达. 激光诱导荧光光谱识别动脉粥样硬化斑块的研究[J]. *光子学报*, 2003, **32**(6):649~652

- 2 K. R. Richards, R. Rava, R. Cothren *et al.*. A model for extraction of diagnostic information from laser induced fluorescence spectra of human artery wall [J]. *Molecular Spectroscopy*, 1989, **45**(1):87~93
- 3 Zhang Hongyu, Ma Wenjiang, Zou Zhaohui *et al.*. Generation of antitumor vaccines for H22 tumor on mouse using photodynamic therapy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(4):631~634  
张红雨, 马文江, 邹朝晖 等. 光动力法制备抗小鼠 H22 肝癌的肿瘤疫苗[J]. *中国激光*, 2008, **35**(4):631~634
- 4 J. M. Maarek, L. Marcu, M. C. Fishbein *et al.*. Time-resolved fluorescence of human aortic wall: use for improved identification of atherosclerotic lesions [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2000, **27**(3):241~254
- 5 G. Filippidis, G. Zacharakis, A. Katsamouris *et al.*. Single and double wavelength excitation of laser-induced fluorescence of normal and atherosclerotic peripheral vascular tissue [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology, Biology (B)*, 2000, **56**(2):163~171
- 6 N. Anastassopoulou, B. Arapoglou, P. Demakakos *et al.*. Spectroscopic characterisation of carotid atherosclerotic plaque by laser induced fluorescence [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2001, **28**(1):67~73
- 7 Zhaohui Zou, Ping Gao, Huijuan Yin *et al.*. Investigation of photodynamic therapy on streptococcus mutans of oral biofilm [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2008, **6**(12):947~949
- 8 J. M. Maarek, L. Marcu, W. J. Snyder *et al.*. Time-resolved fluorescence spectra of arterial fluorescent compounds: reconstruction with the Laguerre expansion technique [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2000, **71**(2):178~187
- 9 Arakawa Koh, Isoda Kikuo, Ito Toshimitu *et al.*. Fluorescence analysis of biochemical constituents identifies atherosclerotic plaque with a thin fibrous cap [J]. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 2002, **22**(6):1002~1007
- 10 L. I. Deckelbaum, S. P. Desai, C. Kim *et al.*. Evaluation of a fluorescence feedback system for guidance of laser angioplasty [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1995, **16**(3):226~234
- 11 L. Laifor, K. M. O'Brien, M. L. Stetz *et al.*. Biochemical basis for the difference between normal and atherosclerotic arterial fluorescence [J]. *Circulation*, 1989, **80**(6):1983
- 12 B. Rokosova, J. H. Rapp, J. M. Porter *et al.*. Composition and metabolism of symptomatic distal aortic plaque [J]. *Vasc. Surg.*, 1986, **13**:617
- 13 L. I. Deck Ibaum, M. L. Stetz, K. M. O'Brien *et al.*. Fluorescence spectroscopy guidance of laser ablation of atherosclerotic plaque [J]. *Laser Surg. Med.*, 1989, **9**:205
- 14 Huijuan Yin, Yingxin Li, Zhaohui Zou *et al.*. Inactivation of bovine immunodeficiency virus by photodynamic therapy with HMME [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2008, **6**(12):944~946
- 15 Rick Rocha, J. R. Landulfo Silveira, Antonio Balbin Dillaverde *et al.*. Use of near-infrared Raman spectroscopy for identification of atherosclerotic plaques in the carotid artery [J]. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2007, **25**(6):482~486
- 16 Tjeerd J. Römer, James F. Brennan, Maryann Fitzmaurice *et al.*. Histopathology of human coronary atherosclerosis by quantifying its chemical composition with Raman spectroscopy [J]. *Circulation*, 1998, **97**:878~885
- 17 P. Hendrik, H. Buschman, J. Motz *et al.*. Diagnosis of human coronary atherosclerosis by morphology-based Raman spectroscopy [J]. *Cardiovascular Pathology*, 2001, **10**(2):59~68
- 18 Yang Changhu, Zeng Xiaoying, Yuan Jianhui *et al.*. Application of Raman spectrum in water quality analysis [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(8):1169~1172  
杨昌虎, 曾晓英, 袁剑辉 等. 激光拉曼光谱在水质分析中的应用[J]. *中国激光*, 2008, **35**(8):1169~1172
- 19 A. G. Zaman, G. Helfl, S. G. Worthly. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery diseases [J]. *Atherosclerosis*, 2000, **149**(20):251~266
- 20 Xue Xiao, Yujun Zhang, Zhigang Wang *et al.*. Characterization of coal oil using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2009, **7**(1):85~87