

心律失常患者红细胞的光镊拉曼光谱

吴智辉 莫 华 黄代政 陈朝旺

(广西医科大学物理学教研室, 广西 南宁 530021)

摘要 利用激光光镊拉曼光谱系统,测定健康者红细胞(RBC)和心律失常患者红细胞的拉曼光谱,对健康者红细胞与心律失常患者红细胞的拉曼光谱进行了比较,发现心律失常患者红细胞的部分谱线整体强度有所减弱,部分谱线发生了频移;另外,低强度 He-Ne 激光对心律失常患者红细胞也存在一定的影响。根据拉曼光谱差异性,进一步探讨其红细胞内容的改变情况及其变化机理,了解心律失常患者红细胞中分子结构、构象、组成的变化,从分子水平探讨心律失常患者的发病机制。

关键词 医用光学; 心律失常; 光镊; 拉曼光谱; 红细胞

中图分类号 O657.37

OCIS 170.5660 170.1530

文献标识码 A

Red Blood Cells in Patients with Arrhythmias Using Optical Tweezers Raman Spectroscopy

Wu Zhihui Mo Hua Huang Daizheng Chen Chaowang

(Department of Physics, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract Using optical tweezers Raman spectroscopy system to test and compare the Raman spectra of red blood cells (RBCs) between normal human and arrhythmia patients, we find that the overall intensity of some spectral lines of arrhythmia patients becomes weaker, several lines have a displacement, and the low intensity He-Ne laser irradiation has a certain impact on arrhythmia patients red blood cells. According to the diversity of Raman spectra, we further research the changes of the contents in red blood cells and its variation mechanism, and understand the changes of red blood cells' molecular structure, conformation and composition in different types of arrhythmia disease, and also investigate the pathogenesis of arrhythmia disease by the molecular level.

Key words medical optics; cardiac arrhythmia; optical tweezers; Raman spectra; red blood cells

1 引 言

细胞是生命有机体的一个结构和功能的基本单位,也是一切疾病发生、发展和转归的基础,血液中红细胞(RBC)的血红蛋白能和氧结合,在人体新陈代谢和气体运输方面起着非常重要的作用。研究红细胞内血红蛋白的结构及不同氧合状态下其结构的变化等,对于深入了解红细胞携氧功能甚至心血管疾病有重要的意义^[1]。单细胞激光光镊拉曼光谱技术是将光学囚禁与拉曼光谱分析结合并应用于悬浮单个细胞研究的一项新的生物光子技术^[2],近年来在细胞的结构、功能及细胞凋亡等方面取得了迅速发展^[3~5]。目前,拉曼光谱已经在医学、生命科学等领域尤其在单细胞方面得到了广泛的应用,取得了明显的成效^[6~10]。本文利用光镊拉曼光谱技术,通过对心律失常患者红细胞的捕获和分离并测定其拉曼散射光谱,研究分析红细胞的内容物及生物大分子的变化,从而更有效地研究常见心血管疾病患者红细胞的真实生理过程,为进一步研究常见心血管疾病的拉曼光谱模型,在分子水平上探讨心血管疾病的类型及发病机制提供相应的理论依据。同时,本文实验还从单细胞的层次研究低强度激光对心律失常患者红细胞的影响,从而进一步探讨了适当功率和适当照射时间的低强度激光对心律失常患者红细胞内的分子基团作用机理。

收稿日期: 2010-08-16; **收到修改稿日期:** 2010-10-12

基金项目: 广西自然科学基金(桂科自 0991109)资助课题。

作者简介: 吴智辉(1974—),男,硕士,讲师,主要从事医学教育和激光生物物理学等方面的研究。

E-mail: wufei12003@yahoo.com.cn

2 材料与方法

2.1 样品来源

心律失常患者 10 例,男 6 例,女 4 例,年龄 43~74 岁,平均 53 ± 9.67 岁。入选标准:发病时间在 24 h 内症状持续时间至少 30 min,患者诊断后即可采其新鲜血液,最迟不超过发病后 12 h,以上样品均来自广西壮族自治区人民医院心血管内科。健康者血液 10 例,男、女各 5 例,年龄 20~23 岁,以上样品均来自广西医科大学在校自愿献血的大学生。

2.2 样品的处理

1) 肘部静脉采血(肝素 100 u/mL)2 mL,并轻轻混匀。

2) 将采取的血液分装入 2 个 5 mL 离心管,加 4 mL PBS 稀释,然后用 750 r/min 的速度离心 6.5 min,用吸管去上层液,留底层红细胞。

3) 将 PBS 换成 RPMI-1640 培养液(体积分数为 20% 小牛血清)重复操作两次。

4) 将 RPMI-1640 培养液换成质量分数为 0.9% 的生理盐水洗涤、离心,留取底层红细胞。

5) 加质量分数为 0.9% 的生理盐水制备 5 份成所需(体积分数为 10%)浓度的 1 mL 红细胞悬液,分装入 5 个 5 mL 试管中,盖好胶帽并用胶布密封装入 4 °C 冰盒内待用,红细胞的制备及各种试剂的配置均在广西医科大学基础医学院生物学与遗传学实验室完成。

2.3 实验装置

实验系统如图 1 所示^[2,9],由一台波长稳定的半导体激光器(TCLDM9-TEC,美国 Thorlabs 公司)激发出一束波长为 780 nm 的激光,经过滤波,被导入到一台倒置生物显微镜(TE2000U,日本 Nikon 公司),激光束途经油浸物镜($d_{NA} = 1.30, 100\times$)聚焦后在焦点附近形成一个单光束光势阱来囚禁细胞,同时这束激光也用于激发被囚禁细胞的拉曼散射。样品被放置在厚 4 mm,中心有一个直径为 6 mm 孔、底部用 0.1 mm 厚的石英玻璃密封的玻璃板构成的样品槽中,其被激发出的拉曼散射再通过物镜,途经一个 200 μm 的针孔和 2 个陷波滤波器,前者用以滤除偏离焦点的瑞利散射光,后者用以滤除 780 nm 的弹性散射光,最后被聚焦进入光谱仪的输入狭缝中。一个滤除绿光的照明灯和一套显微摄像系统用以检测样品被激光俘获的过程。光谱仪(Spectra-pro-230ri,美国 Princeton 公司)被耦合到一台由液氮冷却(-120 °C)CCD (Spec-10,美国 Princeton 公司)上。此系统的分辨率为 8 cm^{-1} ,用 780 nm 激光捕获悬浮于无菌水中的聚苯乙烯小球(直径 2 μm)记录拉曼光谱并校正系统。整个实验系统由广西科学院提供。

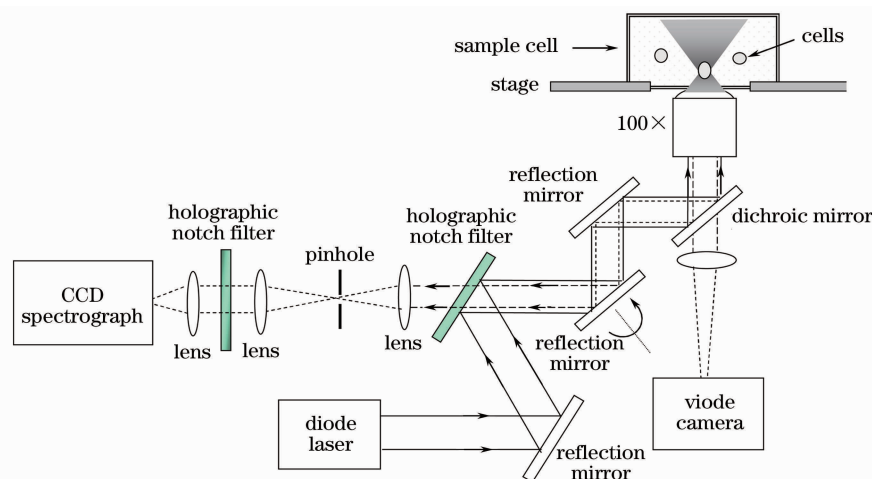


图 1 激光光镊拉曼光谱仪装置

Fig. 1 Experimental setup of laser tweezers Raman spectroscopy

2.4 红细胞光谱获取

1) 实验之前先把放少量红细胞悬液(非实验样本)置于拉曼光谱样品池中浸泡 10~20 min。因为样品池被有机溶液洗过,使红细胞在样品池中极易贴壁,造成光镊抓捕红细胞困难,提前放入悬液一段时间,红细胞可与上边的残留有机溶液结合,避免了正式实验样品被有机溶液影响。

2) 进行实验时,倒掉提前放入的红细胞悬液,用生理盐水反复冲洗干净样品池,然后用吸水纸反复擦干净,将处理好的血样品稀释到一定倍数,用移液器吸取少量放到样品池中进行测量。

3) 用激光镊子(波长 780 nm,功率 10 mW)囚禁单个红细胞(液晶显示屏上可以观察到红细胞被光镊囚禁后竖立起来并被拉到激光聚焦中心),捕获红细胞于盖玻片上约 15 μm 后,继而激发拉曼光谱(曝光时间为 10 s),然后将细胞从光势阱中释放出来,再以同样的激发功率和曝光时间采集附近的背景光谱,这样对每个小样品分别采集 30 个红细胞的拉曼光谱;再把红细胞的拉曼光谱减去对应的背景光谱,并取 30 个红细胞的光谱平均值,就得到该小样品红细胞的最终拉曼光谱。

将上述用过的液体倒掉,用生理盐水冲洗干净样品池后换上新的小样品即可进行下一组实验,整个光谱的收集均在室温(26 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 下完成。

2.5 用软件 Origin 8.0 绘制图谱

将光谱数据转换为 AscII 数据,输入软件 Micro-Origin 8.0 处理。

3 实验结果分析与讨论

3.1 健康者正常红细胞与心律失常患者红细胞的光镊拉曼光谱

心律失常是指心脏内激动起源或者激动传导的不正常,会引起整个或部分心脏的活动变得过快、过慢或不规则,或者各部分的激动顺序发生紊乱,引起心脏跳动的速率或节律发生改变。心律失常按起搏或传导的异常,在临床分为 3 类:1) 激动起源异常:包括窦性心律失常、异位心律、主动性异位心律,其中以各种窦性心律失常、期前收缩和房颤最为常见。2) 传导异常:包括窦房、房内、房室传导阻滞及室内传导阻滞,预激综合征。3) 异位激动伴生理性传导障碍,大多为生理现象,本身无特殊治疗方法。研究表明,在室性心律失常的发生机理中红细胞内离子的代谢失衡起重要作用,其红细胞中血红蛋白的浓度发生改变。本实验测定了心律失常患者红细胞的光镊拉曼光谱并进行分析。

正常人红细胞 10 例与心律失常患者红细胞 10 例各 30 个细胞的平均光镊拉曼光谱如图 2 所示,部分特征峰强度如图 3 所示。由图 2 和图 3 可知,与健康者正常红细胞光镊拉曼光谱相比,心律失常患者红细胞的部分谱线强度变弱。根据表 1^[11,12],指认为正常红细胞蛋白质的 CH_2 , CH_3 变形振动的谱线 1453 cm^{-1} 已移到 1449 cm^{-1} ,说明其蛋白质构象的变形振动出现了变化;对比健康者正常红细胞拉曼光谱,可清楚地看到指认为酪氨酸的谱线由 854 cm^{-1} 频移到 860 cm^{-1} ,以及谱线 620 cm^{-1} 和指认为蛋氨酸 725 cm^{-1} 的谱线都有所增强,这些谱线强度的增加,也表明心律失常患者中红细胞氨基酸残基含量增加,蛋白质的改变成为了影响光谱峰位及强度的主要因素。

对于正常红细胞的蛋白质,有氢键的 C—O 伸缩振动峰出现在 1162 cm^{-1} 附近,而没有氢键相结合的 C—O 伸缩振动峰出现在 1172 cm^{-1} 附近^[13]。由图 2 的 B 图谱可见,心律失常患者 RBC 中蛋白质的谱线 1162 cm^{-1} 几乎不出现,而 1174 cm^{-1} 谱线强度明显增强。这说明与正常 RBC 相比,心律失常患者 RBC 的蛋白质分子中 C—O 受约束的程度降低,由此形成的氢键受到破坏,导致蛋白质的空间构象改变,蛋白质变得松散。有文献报道^[14], Mg^{2+} 能激活 Na^+ , K^+ , ATP 酶,提供电解质通过细胞膜所需要的能量,维持细胞内

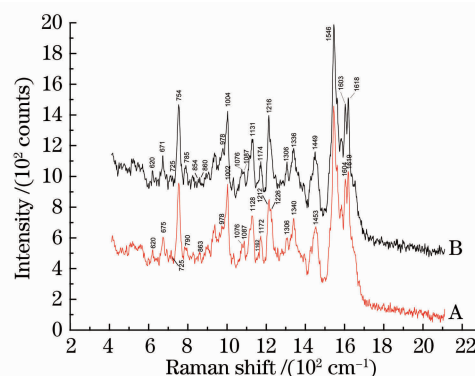


图 2 正常红细胞(A)与心律失常患者红细胞(B)的光镊拉曼光谱

Fig. 2 Laser tweezers Raman spectra of normal RBC (A) and RBC in patients with arrhythmias (B)

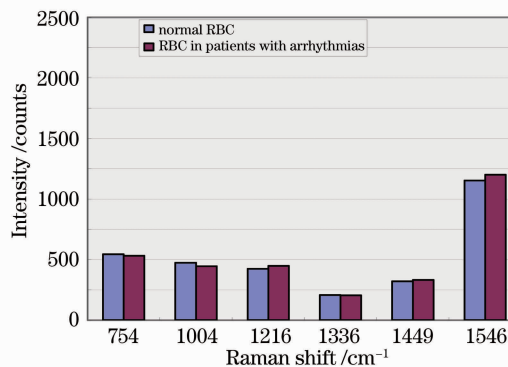


图 3 部分特征峰强度的柱状图

Fig. 3 Intensity histogram of some characteristic peaks

外 Na^+ , K^+ 离子梯度。缺 Mg^{2+} 时,细胞膜上的 Na^+ , K^+ , ATP 酶活性降低,细胞内离子梯度难以维持,导致细胞内缺 K^+ 。静息膜电位负值减小,使心肌应激性、自律性增高。动作电位时间及不应期延长,易于诱发室性心律失常。本实验结果提示:心律失常患者 RBC 的蛋白质分子中 C—O 伸缩振动峰谱线强度变化可能与 Mg^{2+} 浓度下降相关,因为 Mg^{2+} 参与蛋白质合成作用,能激活 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 之活性,维持细胞内外钠、钾的平衡。 Mg^{2+} 控制心肌细胞内钾外移,维持细胞内钾恒定,避免产生心率不整。在 Mg^{2+} 缺乏时, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 发生功能障碍,从而影响心肌而导致心律失常。文献[15]报道了心功能不全越严重,钙泵、钠泵活性越低,红细胞内 Ca^{2+} 浓度越高, K^+ , Mg^{2+} 含量下降越显著。

表 1 实验中观察到的正常红细胞与心律失常患者红细胞谱线及其指认

Table 1 Observed bands of human being RBC and RBC in patients with arrhythmias in the experiments

Spectrum of the normal number of RBC / cm^{-1}	Spectrum of RBC in patients with arrhythmia / cm^{-1}	Initial vibrational mode identified
1619(1620)	1618	Tyr, Trp $\nu(\text{C}=\text{C})$
1603	1604	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1546	1547	Amide II
1449(1453)	1449	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$
1340(1336)	1336	
1302	1306	CH_2 -(twist, wagging)
1212(1214)	1214	Phe, Tyr
1172	1174	Tyr
1162		$\nu(\text{C}-\text{O})$
1126(1128)	1131	$\nu(\text{pyr half-ring})$
1054		Amide 2 III
1032		Tyr, (C—N)
1002(1001)	1004	Phe $\nu(\text{C}-\text{H})$
978		Phe $\nu(\text{C}=\text{C})$ symmetric
863	860	CH_2
753(755)	754	$\nu(\text{C}=\text{C})$ skeletal α -helix
675	673	Met $\nu(\text{C}-\text{S})$

注: Phe: 苯丙氨酸; Tyr: 酪氨酸; Trp: 色氨酸; ν : 伸缩振动; δ : 平面内变形振动; pyr: 吡咯; symmetric: 对称

人类红细胞是血液中的重要组成成分,其内的血红蛋白(Hb)携带着人体生命与健康状况的重要信息——氧;细胞水平上,氧可以影响线粒体中 ATP 的合成,淋巴细胞的繁殖等,与人体的新陈代谢和免疫机能密切相关。人体中氧含量的增加对人体组织的各种机能都有重要的影响。血液氧饱和度指与氧气结合的血红蛋白量占血红蛋白总量的百分比。本实验通过观测红细胞的拉曼光谱强度来分析 RBC 含氧 Hb 的改变。正常 RBC 出现的特征峰谱线 1226 cm^{-1} 说明其血红蛋白转变为氧合血红蛋白,提示含氧血红蛋白增多,氧饱和度增加。而由图 2 的 B 图谱可知,心律失常患者特征峰值 1226 cm^{-1} 几乎没有,说明心律失常患者 RBC 的含氧血红蛋白比正常红细胞减少。

3.2 低强度 He-Ne 激光对心律失常患者红细胞影响的光谱

低强度 He-Ne 激光对红细胞的生物效应主要与激光能量有关,目前临床上开展低强度 He-Ne 激光血管内照射治疗的激光功率一般选择在 $2 \sim 5 \text{ mW}$ 之间^[16],经过反复多次预实验,最终选择激光功率 2 mW 对心律失常患者红细胞照射,并且通过不同的照射时间来增加照射量,以研究不同能量对心律失常患者红细胞的作用。

激光波长 632.8 nm ,功率 2 mW ;照射按四个不同时间段[时间照射为: 0 min (未照射), 10 min , 30 min , 1 h]照射结束后马上采集相应拉曼光谱,即照射 0 min 样品谱线为 a ,照射 10 min 为 b ,照射 30 min 为 c ,照射 1 h 为 d 。相应的光谱如图 4 所示。由图 4 可知,随着照射时间的增加,其谱线强度均有明显减弱。这可能是随着照射时间的延长,被照射过的细胞已经处于抑制状态,照射后抑制效应没有及时解出,从而对细胞造成一定的伤害。

对于指认为色氨酸的呼吸振动模的 754 cm^{-1} , 在照射时间为 1h 后强度降到最低, 754 cm^{-1} 指认为卟啉环呼吸振动谱, 是血红蛋白的重要参量。该谱数强度的改变反应了血红蛋白结构的变化, 说明了激光的能量在一定范围内对于红细胞内结构的光调节作用已发生效应; 进一步实验表明, 低能量 He-Ne 强度 2 mW 照射时间不同, 光镊拉曼光谱都比照射前强度降低, 且降低程度不同; 提示了低能量 He-Ne 激光对心律失常患者红细胞内的原子基团有一定的影响作用, 对于键的转动、基团形态的改变可能也存在一定影响。

健康者正常红细胞和心律失常患者红细胞的平均拉曼光谱也存有较明显的差异, 心律失常患者红细胞的谱线强度整体变弱, 1453 cm^{-1} 处峰的光谱在心律失常患者红细胞的谱线已移到 1449 cm^{-1} , 说明归属于蛋白质的 CH_2, CH_3 变形振动出现了变化。对细胞内蛋白质来说, 有氢键的 C—O 伸缩振动峰出现在 1162 cm^{-1} 附近没有氢键相结合的 C—O 伸缩振动峰出现在 1172 cm^{-1} 附近。而心律失常患者红细胞中蛋白质的 $1174\text{ cm}^{-1} \nu(\text{C—O})$ 与正常红细胞中 1162 cm^{-1} 相比, 向高波数频移了 12 cm^{-1} , 且谱线强度明显增强。这说明心律失常患者红细胞的蛋白质分子中 C—O 受约束的程度降低, 形成的氢键受到破坏, 导致蛋白质的空间构象受到破坏, 蛋白质变得松散, 由此可能引起 Mg^{+} 浓度下降, 从而引发心律失常。由于本实验采用离体的红细胞, Mg^{+} 浓度下降是否与红细胞的离体相关还需要进一步研究。当然, 本实验采集样本例数较少, 还需要增加例数继续来完善此实验。

另外, 低能量 He-Ne 激光对心律失常患者红细胞内的原子基团有一定的影响作用, 对于键的转动、基团形态的改变可能也有一定影响作用。当然, 照射单一红细胞与照射全血会有哪些差异, 在体内照射和离体照射会有什么差异, 仍然是有待研究的新课题。

4 结 论

通过对健康者红细胞的拉曼光谱与心律失常患者红细胞拉曼光谱的比较, 根据拉曼光谱差异性, 了解红细胞功能在心律失常作用下细胞中分子结构、构象、组成的变化; 并根据拉曼光谱能测量分子官能团振动模式的指纹特性, 为疾病的诊断提供一种新的、快速简便的光谱分析手段, 从分子水平探讨心血管疾病的类型及发病机制, 为临床诊断提供有力的实验依据。

参 考 文 献

- Chen Xiuli, Wang Guiwen, Liu Junxian *et al.*. Technique and advance of Raman spectroscopy on functional erythrocyte study[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2008, **17**(6): 845~852
陈秀丽, 王桂文, 刘军贤 等. 功能红细胞研究的拉曼光谱技术与进展[J]. *激光生物学报*, 2008, **17**(6): 845~852
- C. A. Xie, M. A. Dinno, Y. Q. Li. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. *Opt. Lett.*, 2002, **27**(4): 249~251
- G. Chottard, I. Kazanskaya, M. Bruschi. Resonance Raman study of multihemic c-type cytochromes from *desulfuromonas acetoxidans*[J]. *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**(4): 1050~1058
- H. Y. Tang, H. L. Yao, G. W. Wang *et al.*. NIR Raman spectroscopic investigation of single mitochondria trapped by optical tweezers[J]. *Opt. Express*, 2007, **15**(20): 12708~12716
- 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**(5): 1691~1703
- Ai Min, Liu Junxian, Yao Huilu *et al.*. Raman spectra of single reticulocytes and small lymphocytes in blood[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(4): 1~6
艾敏, 刘军贤, 姚辉璐 等. 外周血中单个网织红细胞与小淋巴细胞拉曼光谱[J]. *光学学报*, 2009, **29**(4): 1~6
- Yue Liangyue, Wang Guiwen, Fang Ling *et al.*. Study of Raman spectroscopy of optically trapped human red blood cell

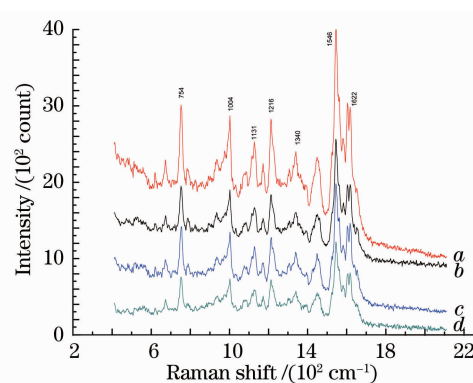


图 4 激光照射后心律失常患者红细胞的光镊拉曼光谱
Fig. 4 Laser tweezers Raman spectra of the RBC in patients with arrhythmias after laser irradiation

- affected by direct current [J]. *J. Biomedical Engineering*, 2007, **24**(2): 404~408
岳粮跃,王桂文,方玲等. 人红细胞在直流电作用后光镊操控的拉曼光谱研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, **24**(2): 404~408
- 8 Yang Wenpei, Yao Huilu, Zhu Miao *et al.*. Raman spectrums of mono-hepatocellular carcinoma [J]. *Laser & Infrared*, 2007, **37**(9): 824~827
杨文沛,姚辉璐,朱森等. 单个肝癌细胞的拉曼光谱分析研究[J]. 激光与红外, 2007, **37**(9): 824~827
- 9 Yao Huilu, Zhu Miao, Wang Guiwen *et al.*. Study of Raman spectra of single carcinoma of nasopharnx cell [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(9): 1761~1764
姚辉璐,朱森,王桂文等. 单个鼻咽癌细胞的拉曼光谱分析的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, **27**(9): 1761~1764
- 10 C. A. Xie, M. A. Dinno, Y. Q. Li. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. *Opt. Lett.*, 2002, **27**(4): 249~251
- 11 A. Ashkin, K. Schutze, J. M. Dziedzic. Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser [J]. *Nature*, 1990, **348**(6299): 346~348
- 12 C. A. Xie, Y. Q. Li. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cell using optical trapping and shifted excitation deference techniques[J]. *Appl. Phys.*, 2003, **93**(5): 2982~2986
- 13 Li Guang, Yang Hongying, Xu Yiming *et al.*. Raman microspectroscopic study of bimolecular structure inside living adhesive cells[J]. *Science in Chinese C*, 2002, **32**(2): 177~183
李光,杨红英,许以明等. 黏附细胞中生物大分子结构变化的显微Raman光谱[J]. 中国科学C, 2002, **32**(2): 177~183
- 14 Sun Yuming, Ye Fulai, Du Xu. Study for relationship between cations in erythrocytes and ventricular arrhythmias in patients with essential hypertension[J]. *J. Clinical Cardiology*, 1993, **9**(6): 333~334
孙玉明,叶复来,杜旭. 高血压病患者室性心律失常与红细胞内离子含量的关系[J]. 临床心血管病杂志, 1993, **9**(6): 333~334
- 15 Ding Kang, Wang Fengzhi, Liang Anguo. Relationship of erythrocytic calcim-, sodium-pump activities, ion transportation and cardiac function in patients of heart diseases[J]. *Chinese J. Cardiology*, 1998, **26**(6): 462~464
丁康,王凤芝,梁安国. 心脏病患者红细胞钙泵、钠泵活性及离子转运与心功能的关系[J]. 中华心血管病杂志, 1998, **26**(6): 462~464
- 16 D. Yova. Antagonistic effects of epinephrine and helium-neon (He-Ne) laser irradiation on red blood cells deformability[J]. *Clin Hemorheol*, 1994, **14**(3): 369~378