

# 活体糖尿病小鼠中单个白细胞的拉曼光谱分析

牛丽媛<sup>1,2</sup> 林漫漫<sup>1,2</sup> 李雪<sup>1,2</sup> 董云亮<sup>2</sup> 魏坤莲<sup>4</sup> 匡志鹏<sup>3</sup> 刘军贤<sup>2</sup> 姚辉璐<sup>1</sup>

<sup>1</sup>广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 531003  
<sup>2</sup>广西师范大学物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004  
<sup>3</sup>广西医科大学附属肿瘤医院, 广西 南宁 531003  
<sup>4</sup>玉林市第一中等职业技术学校, 广西 玉林 537000

**摘要** 利用拉曼光谱并结合多元统计分析方法无损地对活体糖尿病(DM)小鼠中的白细胞(WBC)进行了研究,分别检测了糖尿病和正常小鼠活体中的白细胞拉曼光谱,利用主成分分析(PCA)建立拉曼光谱诊断多元统计算法模型。结果表明,患糖尿病小鼠和正常小鼠白细胞拉曼光谱差别明显,且实验存在较好的重现性。利用PCA统计分析方法得到诊断特异性和灵敏度达到了98%。在活体糖尿病小鼠白细胞中出现较高的蛋白质的特征峰 $1302\text{ cm}^{-1}$ ,表明活体糖尿病白细胞中的蛋白质浓度比正常状态高。糖尿病小鼠内的白细胞与正常相比,DNA磷酸骨架基团强度和蛋白质酰胺强度升高,表明DNA双螺旋结构、蛋白质主链和氢键体系发生变化,二级构象改变。

**关键词** 光谱学;拉曼光谱;糖尿病;白细胞;主成分分析;活体

中图分类号 O657.37 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP49.063001

## Raman Spectroscopic Analysis of Single White Blood Cell of DM Mouse *in vivo*

Niu Liyuan<sup>1,2</sup> Lin Manman<sup>1,2</sup> Li Xue<sup>1,2</sup> Dong Yunliang<sup>2</sup>  
 Wei Kunlian<sup>4</sup> Kuang Zhipeng<sup>3</sup> Liu Junxian<sup>2</sup> Yao Huilu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 531003, China

<sup>2</sup>College of Physics and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China

<sup>3</sup>Cancer Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 531003, China

<sup>4</sup>The First Professional Specialized Middle School of Yulin, Yulin, Guangxi 537000, China

**Abstract** Raman spectra of normal white blood cell (WBC) and diabetes mellitus (DM) WBC *in vivo* are studied by laser tweezers combined with multivariate statistic analysis method. Raman spectrum and multivariate statistic model is founded by the principal components analysis (PCA). The result of Raman spectrum suggests that DM WBC and normal WBC could be differentiated with PCA. Diagnostic specificity and sensitivity are nearly 98%. The protein vibration bands at  $1302\text{ cm}^{-1}$  in DM WBC mouse *in vivo* show that the concentration of protein in DM WBC is higher than normal WBC. The Raman intensities at O—P—O of DNA and amide bands of DM cell are significantly higher than normal cell, which shows that the changes in the conformation of O—P—O and the backbone and hydrogen bonds of protein, as well as the second conformation of protein.

**Key words** spectroscopy; Raman spectrum; diabetes mellitus; white blood cell; principal component analysis; *in vivo*

**OCIS codes** 300.6450; 170.1530; 170.1610

收稿日期: 2011-12-30; 收到修改稿日期: 2012-02-08; 网络出版日期: 2012-04-24

基金项目: 国家自然科学基金(60868002,31060128)、广西自然科学基金(桂科回 0731013,2011GXNSFA018143)和广西研究生创新项目基金(201106020702M40)资助课题。

作者简介: 牛丽媛(1982—),女,硕士研究生,主要从事生物物理方面的研究。E-mail: niuliyuana@126.com

导师简介: 姚辉璐(1972—),男,研究员,主要从事光谱学与光电检测方面的研究。E-mail: yaohl@163.net

## 1 引言

随着生活水平的提高、生活方式的改变,糖尿病(DM)发病率在世界范围内呈上升趋势,成为在心血管疾病、肿瘤之后的又一严重危害人体健康的疾病。有学者报道,糖尿病患者死因中,感染占第三位。糖尿病患者的感染发病率高达 36.8%,并仍有上升的趋势<sup>[1]</sup>。因此,有效地防治感染对于降低糖尿病患者的死亡率非常重要。

目前认为糖尿病患者易并发各种感染,主要与高血糖状态、机体防御功能、糖尿病的并发症、营养不良等因素有关,其中比较受关注的是机体防御机能改变。机体对入侵微生物的各反应阶段都被抑制,从而极易感染,且程度严重。白细胞(WBC)在抗感染方面发挥着重要作用,它参与机体特异性和非特异性过程,有吞噬、杀死病原体的作用,是机体抗感染的第一道防线。近年来,对糖尿病患者白细胞吞噬细胞杀菌功能降低的研究越来越受到重视<sup>[2]</sup>,但是以往白细胞的研究过程繁琐,且往往是在体外进行的,这就必然会改变其生存环境,不能客观地反映其实际情况,原位无损的研究就显得尤为必要。本文利用无损的方法来研究糖尿病小鼠的原位白细胞成分及其在不同状态的成分变化。

拉曼光谱技术具有非侵入性、低破坏性、不用试剂和高度自动化等优点,在医学诊断中具有很大的应用潜力。光镊拉曼光谱技术是将光学囚禁技术与显微拉曼技术结合并应用于悬浮细胞研究的生物光子技术,用一束光来囚禁单个悬浮细胞并激发细胞分子的拉曼光谱<sup>[3~6]</sup>。目前关于白细胞的拉曼光谱的研究已有不少<sup>[7,8]</sup>,但以前的研究都是只限于体外,由于体外检验过程繁琐且易受到周围环境影响,因此很难真实地复制体内环境。体内环境中白细胞的真实状态和随体内环境变化而产生的物质变化信息,利用传统手段是很难获得的。本文利用激光光镊拉曼光谱系统对活体糖尿病白细胞和正常小鼠内的白细胞进行了研究,光谱分析表明其相似性和差异性:从光谱分析中看到蛋白质、核酸和脂类等生物分子的空间结构发生了变化。而蛋白质和 DNA 的结构变化与某些生物学行为(免疫功能低下、神经功能异常及发育障碍等)密切相关,因此有可能利用拉曼光谱的特征峰的变化来解释白细胞的防御功能和作为糖尿病诊断和预测感染的可能指标<sup>[8,9]</sup>。

## 2 实验

### 2.1 实验装置

实验所使用的活体激光光镊拉曼系统如图 1 所示,装置详情参见文献<sup>[10]</sup>。

### 2.2 实验材料

雄性 KM SPF 级小白鼠,购于广西医科大学实验动物中心,体重 15~18 g,选择个体差异小的 6 只分笼饲养,其中一组用药物诱导成糖尿病,另一组保持正常作为对照组。小鼠食料为广西医科大学动物中心自制,实验前适应性预养一周。采用豚佐菌素(日本 Sigma 公司)和爱科来 GT-1810 型血糖仪。实验模型的建立参见文献<sup>[11]</sup>。注射药物 72 h 后,用血糖仪检测小白鼠禁食 12 h 的血糖浓度,在小白鼠尾端取血,当血糖浓度大于等于 11.1 mol/L 时建模成功。用质量分数为 4% 的水合氯醛(0.15 mL/10 mg)腹腔注射麻醉糖尿病小鼠。选取活体正常白细胞作为对照,糖尿病和正常小鼠各取 3 只用于实验。

### 2.3 数据采集与处理

激光的波长为 780 nm,光斑大小约为 2  $\mu\text{m}$ ,进入显微镜前功率为 22 mW。实验中激光聚焦在离小鼠耳朵的上表面 60~70  $\mu\text{m}$  处时效果最佳。由于白细胞在血管中的流速很快,为了得到白细胞的拉曼光谱,用

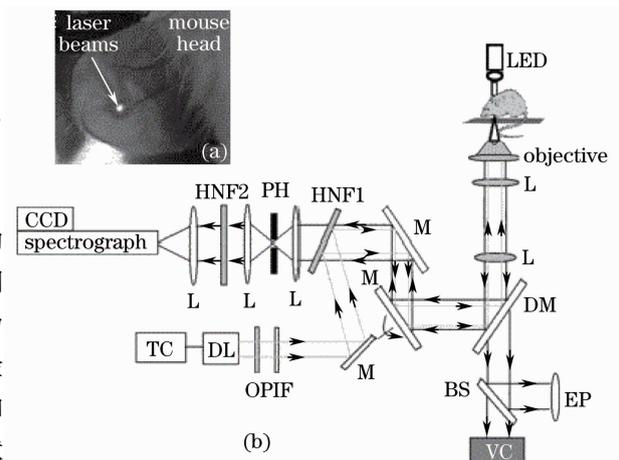


图 1 (a) 光谱采集在小白鼠耳朵中的位置; (b) 激光光镊拉曼光谱实验装置图

Fig. 1 (a) Circular pump laser beam is positioned in the vessel on the mouse ear; (b) schematic of experimental arrangement

止血钳夹住小白鼠的耳朵使得细胞流速减慢,以囚禁住血管中的白细胞。在整个过程中,活体内选取的是静脉血管中比较清晰的白细胞,使用光镊俘获后,立即关掉 LED 灯收集白细胞的光谱,拉曼信号采集积分时间为 5 s。糖尿病白细胞和正常白细胞光谱分别是糖尿病和正常小鼠血管中的单个白细胞的光谱。再以同样的激发功率、积分时间采集糖尿病和正常小鼠血管的背景光谱,背景光谱是没有细胞流过空血管的光谱。各种不同的光谱分别是 3 只小鼠 20 个白细胞的平均光谱。利用 Origin8.0 软件对白细胞进行扣减背景、5 点平滑、基线校正和平均、归一化处理,最后得到状态不同的白细胞的平均光谱;利用 The Unscrambler. V9.7 软件和 PyChem 软件对平滑后的光谱进行处理,做主成分分析(PCA),输出三维 PCA 结果。

## 3 结果与讨论

### 3.1 活体单个白细胞拉曼光谱分析

图 2(a)是糖尿病小鼠中光镊囚禁住的血管中的单个白细胞图像,图 2(b)是正常小鼠中光镊囚禁的血管中的单个正常白细胞图像。图 3(a)是活体小鼠的空血管背景光谱,图 3(b)分别是来自图 2(a)和(b)图像中白细胞的平均光谱。由图 3(b)谱线可见,糖尿病与正常小鼠的白细胞光谱之间差别明显且存在较好的相似性。虽然糖尿病小鼠和正常小鼠的白细胞光谱上存在明显差异,但两种光谱都能观察到白细胞的特征峰  $725, 785, 935, 1097, 1257, 1302, 1451, 1661 \text{ cm}^{-1}$ , 最强的 2 个谱峰是  $1451 \text{ cm}^{-1}$  和  $1661 \text{ cm}^{-1}$ , 而在  $1097, 1257, 1451, 1661 \text{ cm}^{-1}$  这 4 个谱峰位置糖尿病小鼠的强度比较大。这些归一化平均谱线的差异从图 3(b)下方的谱线差异曲线中表现得更加明显。这些差异将在后面进行更加详细的分析和讨论。

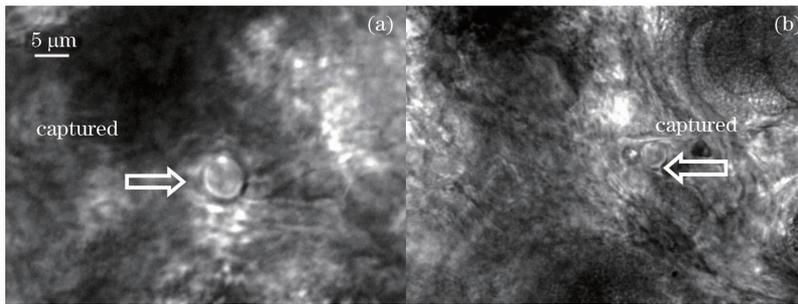


图 2 糖尿病(a)和正常(b)小鼠中被光镊囚禁的白细胞图像

Fig. 2 Images of single WBCs trapped by the optical tweezers in (a) DM vasculature and (b) normal vasculature *in vivo*

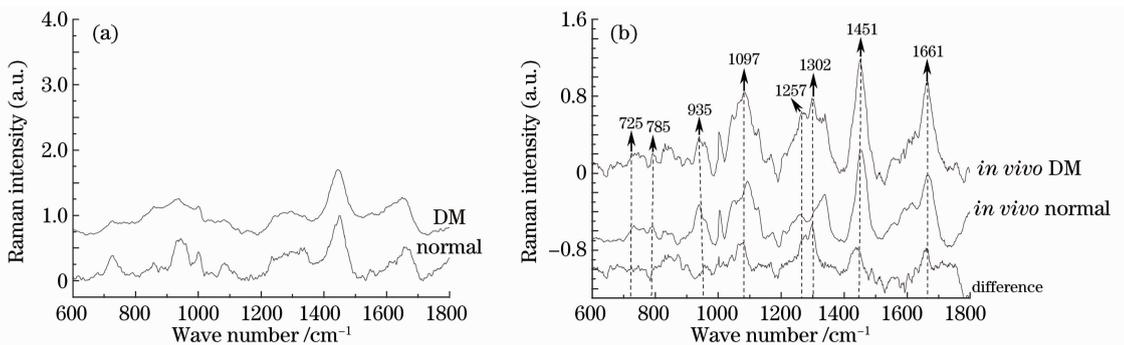


图 3 (a)活体空血管背景光谱;(b)糖尿病与正常小鼠中白细胞平均光谱及其差谱

Fig. 3 Background (a) Raman spectrum coming from black blood vascular; (b) Raman spectra of single blood cells in DM and normal mice *in vivo* together with the difference spectrum between them

### 3.2 活体白细胞拉曼光谱统计分析

为了判断利用拉曼光谱是否能够区别正常小鼠和糖尿病小鼠的白细胞,对实验测试获得的正常和糖尿病小鼠白细胞的拉曼光谱利用 PCA 方法<sup>[12]</sup>进行统计分析。在进行 PCA 之前要对每个光谱进行处理,否则将影响实验结果,使实验结果变差<sup>[13]</sup>。所以进行 PCA 之前对每个光谱进行五点拟合基线校正、扣减背景,然后对  $600 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$  波数范围的数据进行面积归一化处理。最后使用 The Unscrambler. V 9.7 软件对

正常小鼠与糖尿病小鼠两组数据进行 PCA 统计分析。多数情况下,利用 PCA 获得的两组数据的主成分会有 20~30 个,选出差异比较大的 PC1、PC2、PC3 这 3 个 PCA 得分,画出三维散点分布图,如图 4 所示。

从图 4 可以看出,正常小鼠和糖尿病小鼠明显被区分出来,它们分布在不同的空间区域,并无重叠。由此表明可以利用 PCA 直接对糖尿病与正常小鼠的白细胞光谱数据进行区分。

### 3.3 讨论

由实验结果分析发现,正常小鼠与患有糖尿病的小鼠在拉曼光谱上存在较大的差异。与正常小鼠相比,糖尿病小鼠白细胞拉曼光谱在光谱形状以及谱峰强度上都有可能发生变化,由此可进一步反映出糖尿病小鼠血液中某些分子或细胞会随着糖尿病病情的发展而发生变化。

因此,白细胞的拉曼光谱在糖尿病的诊断与普查上可能存在巨大的应用价值。白细胞拉曼光谱中包含着许多生物分子的振动光谱信息,例如某些蛋白质、脂肪以及核酸分子等都有可能由于小鼠患有糖尿病而在数量和结构上发生某种变化。为了更好地理解实验所观察到的由白细胞拉曼光谱的变化所反映出的生物分子变化的机理,根据相关文献,在表 1 中列出了白细胞拉曼光谱中每个谱峰可能对应的谱峰归属情况<sup>[8,14~17]</sup>。由图 3(b)谱线可见,糖尿病白细胞拉曼光谱比正常情况下多出  $1302\text{ cm}^{-1}$  拉曼峰。 $1302\text{ cm}^{-1}$  峰归属于蛋白质伸缩振动,由此可知,糖尿病小鼠白细胞中蛋白质含量增加,导致此峰的出现。这个结果和相关文献报道<sup>[18]</sup>在 2-型糖尿病机体中 C-反应蛋白(CRP)合成增加的结果是一致的。

表 1 拉曼光谱归属

Table 1 Assignment of Raman spectra

Peak position / $\text{cm}^{-1}$	Assignment
725	C-S (protein)/ $\text{CH}_2$ rocking/adenine
785	DNA: O-P-O, cytosine, uracil, thymine
935	C-C stretch of proline ring and valine
1003	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine
1097	C-C stretch, O-P-O <sup>-</sup> stretch
1257	Amide III
1302	Amide III
1451	$\text{CH}_2$ bending mode of proteins, $\text{CH}_3\text{CH}_2$ twisting mode of lipid
1664	Amide I

拉曼光谱  $785$ 、 $1097\text{ cm}^{-1}$  与  $1451\text{ cm}^{-1}$  的峰高比在糖尿病小鼠内明显升高。 $785\text{ cm}^{-1}$  峰归属于胸腺嘧啶、胞嘧啶, $1097\text{ cm}^{-1}$  峰归属于 DNA 磷酸离子 O-P-O, $1451\text{ cm}^{-1}$  峰归属脂类弯曲振动峰。计算表明糖尿病小鼠内白细胞中的  $I_{785}/I_{1451}$  (0.16)、 $I_{1097}/I_{1451}$  (0.72) 明显高于体内正常的  $I_{785}/I_{1451}$  (0.07)、 $I_{1097}/I_{1451}$  (0.52)。这些谱线的增强可能的解释为糖尿病小鼠血管中氧自由基对于白细胞中 DNA 有损伤,谱线强度升高,说明可能 DNA 发生了单链、双链的断裂<sup>[19,20]</sup>。

在糖尿病的白细胞拉曼光谱中  $1451\text{ cm}^{-1}$  峰明显比正常情况下的,这个峰归属于脂类  $\text{CH}_3\text{CH}_2$  弯曲振动峰。强度的升高表明糖尿病小鼠中白细胞膜脂受损,脂酰基链骨架发生了断裂<sup>[21]</sup>。可能是由于糖尿病小鼠的白细胞表面黏附分子表达增加,增强了与血管内皮细胞的相互作用,极易黏附于血管内皮细胞表面,进一步白细胞可被激活,产生和释放多种毒性物质如氧自由基,对白细胞膜进行氧化,膜上的脂类物质受损<sup>[22]</sup>。

拉曼光谱峰  $1257$ 、 $1451$ 、 $1661\text{ cm}^{-1}$  在糖尿病白细胞中明显升高,这三个峰分别归属于蛋白质酰胺 III、蛋白质  $\text{CH}_2$  振动模型、蛋白质酰胺 I,表明糖尿病小鼠血管中氧自由基使白细胞中蛋白质主链和氢键断裂使

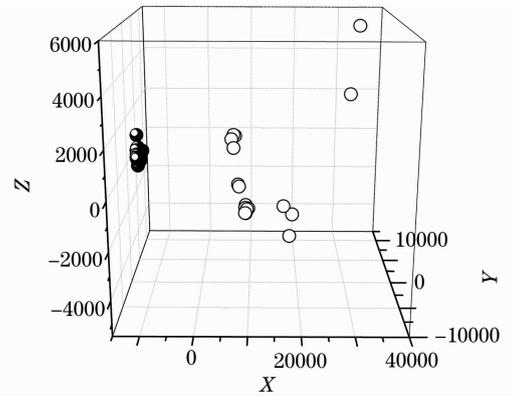


图 4 活体正常小鼠(黑色点)与糖尿病小鼠(圆圈)白细胞光谱 PCA 得分三维散点图

Fig. 4 WBC spectrum PCA scores of normal (dots) and DM (circles) mice *in vivo*

氢键体系发生变化<sup>[23]</sup>,导致峰强升高。

从图4可见,糖尿病小鼠和正常小鼠白细胞光谱数据的主成分得分分布在两个不同的空间区域,正常小鼠分布的区域比较小,比较集中,而糖尿病小鼠分布的区域比较大,较分散。究其原因,可能是在病理情况下,随着糖尿病病情的发展,小鼠白细胞中各种成分将发生较大变化,同时不同白细胞个体之间也会有很大的差异,由于这些差异,造成糖尿病小鼠PCA得分三维散点分布图在空间分布的区域较大,而且比较松散;而正常白细胞由于其成分相对比较稳定,因此分布比较集中。

## 4 结 论

利用激光光镊拉曼光谱并结合多变量统计分析方法来研究糖尿病小鼠体内和正常小鼠的白细胞。以拉曼光谱结合PCA统计分析可用于糖尿病的检测和诊断研究,诊断特异性和灵敏度达到98%。拉曼光谱谱峰归属分析表明,糖尿病小鼠白细胞与正常白细胞在生化成分上存在一定差异。与正常白细胞相比,糖尿病小鼠白细胞中的核酸、脂类以及蛋白质成分偏高。这些变化可能是由于2型糖尿病是一种细胞因子介导的炎性反应,一种先天的免疫性疾病,是由血管受损产生的过多氧自由基对白细胞的作用引起的。PCA能够很好地区分正常和糖尿病小鼠体内的白细胞。结果表明,活体白细胞的拉曼光谱分析很有希望发展成为一种无损检测与筛查糖尿病的临床诊断工具。

## 参 考 文 献

- 1 A. Y. Peleg, T. Weerarathna, J. S. McCarthy *et al.*. Common infections in diabetes: Pathogenesis, management and relationship to glycaemic control[J]. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2007, **23**(1): 3~13
- 2 N. F. Fedosova, S. V. Alisievich, K. V. Lyadov *et al.*. Mechanisms underlying diquertin-mediated regulation of neutrophil function in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2004, **137**(2): 143~146
- 3 C. A. Xie, Y. Q. Li. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques[J]. *J. Appl. Phys.*, 2003, **93**(5): 2982~2986
- 4 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
- 5 C. A. Xie, Y. Q. Li, W. Tang *et al.*. Study of dynamical process of heat denaturation in optically trapped single microorganisms by near-infrared Raman spectroscopy[J]. *J. Appl. Phys.*, 2003, **94**(9): 6138~6142
- 6 Zhang Yong, Ye Anpei, Wen Cheng. A micro-Raman spectroscopy combining with optical tweezers[J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(2): 491~497  
张勇,叶安培,闻丞.一种与光镊结合的显微拉曼光谱技术[J].*光学学报*, 2010, **30**(2): 491~497
- 7 G. J. Puppels, H. S. P. Garritsen, G. M. J. Segers-Nolten *et al.*. Raman microspectroscopic approach to the study of human granulocytes[J]. *Biophys. J.*, 1991, **60**(5): 1046~1056
- 8 Mao Lihua, Liu Junxian, Ai Min *et al.*. Raman spectrums approach to rats inflamed white blood cells[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2009, **38**(11): 2844~2848  
毛丽华,刘军贤,艾敏等.大鼠的发炎白细胞的拉曼光谱研究[J].*光子学报*, 2009, **38**(11): 2844~2848
- 9 Tao Houquan, Wang Ruinian. DNA repair disorders, genomic instability and cancer[J]. *Chinese J. Cancer*, 2001, **12**(2): 101~106  
陶厚权,王瑞年. DNA修复障碍、基因组不稳定性与癌症[J].*中国肿瘤*, 2001, **12**(2): 101~106
- 10 Gao Zehong, Yu Jinggong, Liu Fuxiang *et al.*. Micro-Raman spectra for lipids C-H in colorectal tissue[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(2): 605~608  
高泽红,于晶功,刘福祥等.结肠癌组织中脂类伸缩振动的拉曼光谱[J].*中国激光*, 2010, **37**(2): 605~608
- 11 Yang Run, Li Qingwang, Zhao Rui. Comparison between the effects of alloxan and streptozotoci on inducing diabetes in mice[J]. *J. Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2006, **34**(2): 17~20  
杨润,李青旺,赵蕊.四氧嘧啶与链脲佐菌素诱导小鼠糖尿病模型的效果比较[J].*西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2006, **34**(2): 17~20
- 12 Yu Chuanhua. SPSS and Statistical Analysis[M]. Beijing: Electronic Industry Press, 2007. 491  
宇传华. SPSS与统计分析[M].北京:电子工业出版社, 2007. 491

- 13 Feng Shangyuan, Pan Jianji, Wu Yanan *et al.*. Study on gastric cancer blood plasma based on surface-enhanced Raman spectroscopy combined with multivariate analysis[J]. *Sci. China Life Sci.*, 2011, **41**(7): 550~557  
冯尚源, 潘建基, 伍严安 等. 基于 SERS 技术结合多变量统计分析胃癌患者血浆拉曼光谱[J]. 中国科学: 生命科学, 2011, **41**(7): 550~557
- 14 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, 朱淼 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
- 15 Cheng Qin, Dong Rong, Huang Dalin *et al.*. Raman spectrum of germinated spores of *bacillus subtilis* in response to formaldehyde stress[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(10): 1015002  
程琴, 董蓉, 黄大林 等. 枯草芽孢杆菌萌发后孢子响应甲醛胁迫过程的拉曼光谱研究[J]. 中国激光, 2011, **38**(10): 1015002
- 16 Wang Guiwen, Peng Lixin, Shen Weidong *et al.*. Raman spectroscopic analysis of carotenoids of single human blood platelets[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(6): 0630002  
王桂文, 彭立新, 申卫东 等. 拉曼光谱分析人类单个血小板的类胡萝卜素[J]. 光学学报, 2011, **31**(6): 0630002
- 17 Li Zida, Lai Junzhuo, Liao Wei *et al.*. Raman spectroscopic profile of ethanol fermentation in high gravity cassava starch brewing[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, **32**(3): 0317001  
李自达, 赖钧灼, 廖威 等. 浓醪乙醇发酵的单细胞拉曼光谱表征[J]. 光学学报, 2012, **32**(3): 0317001
- 18 Bai Lili, Jin Yong. The value of CRP in macrovascular lesions of 2 diabetes[J]. *Jinlin Medical*, 2009, **30**(5): 467~468  
白莉莉, 金勇. C-反应蛋白在 2 型糖尿病大血管病变中的价值[J]. 吉林医学, 2009, **30**(5): 467~468
- 19 Xu Yiming, Zhang Zhiyi, Xu Guorui. Photodynamic damages of DNA with YHPD by Raman spectroscopy[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1989, **34**(19): 1500~1504  
许以明, 张志义, 徐国瑞. 抗癌药物 YHPD 对 DNA 光敏损伤的激光喇曼光谱研究[J]. 科学通报, 1989, **34**(19): 1500~1504
- 20 Zhou Dianfeng, Ke Weizhong. Raman spectroscopic study on the influence of ultraviolet radiation on calf thymus DNA in aqueous solution[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, **24**(11): 1370~1372  
周殿凤, 柯惟中. 紫外辐射对小牛胸腺 DNA 水溶液影响的拉曼光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, **24**(11): 1370~1372
- 21 P. R. Carey. Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies[M]. New York: Academic Press, 1982. 71~98
- 22 Jia Zhaotong, Du Lili, Li Hongying *et al.*. Changes in leukocyte deformability and leukocyte adhesion function in NIDDM [J]. *Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis*, 1997, (3): 245~246  
贾兆通, 杜利力, 李洪英 等. NIDDM 病人白细胞粘附功能和变形能力的变化[J]. 青岛大学医学院学报, 1997, (3): 245~246
- 23 G. C. Pimentel. The Hydrogen Bond[M]. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1960. 67~141, 296~325