

文章编号: 0253-2239(2009)10-2854-06

单细胞拉曼光谱分析地中海贫血红细胞的 氧合态和去氧态

陈秀丽^{1, 2} 王桂文¹ 尹晓林³ 刘军贤² 姚辉璐¹ 黄庶识¹ 黎永青⁴

(¹ 广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530003; ² 广西师范大学物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004;
³ 中国人民解放军第 303 医院, 广西 南宁 530022; ⁴ 美国东卡罗莱纳大学物理系, Greenville, NC 27858-4353, USA)

摘要 应用光镊拉曼光谱系统俘获单个红细胞并收集其拉曼光谱, 选择 I_{1638}/I_{1547} 比值为区分红细胞氧合及去氧态指标, 比较分析地中海贫血 HbH-CS 和健康个体单个红细胞的氧循环过程的氧合和去氧能力及去氧态群体红细胞。结果发现, 在氧循环的去氧态中, 地中海贫血 HbH-CS 的 I_{1638}/I_{1547} 显著高于正常对照; 氧合态的 I_{1638}/I_{1547} 也略高于正常对照。群体统计中, 若以小于正常对照 I_{1638}/I_{1547} 的平均值为去氧态基准, 则正常对照 46% 的红细胞达到去氧态, 而地中海贫血 HbH-CS 仅有 15%, 表明地中海贫血 HbH-CS 红细胞的氧合能力较强, 但去氧能力显著低于正常对照, 而且地中海贫血 HbH-CS 红细胞个体差异较大。该研究在单细胞水平上, 揭示了地中海贫血 HbH-CS 红细胞氧合、去氧能力以及细胞个体差异性, 以评价其携氧功能, 为诊断治疗提供一定的理论依据。

关键词 光谱学; 拉曼光谱; 携氧能力; 地中海贫血; 单个红细胞

中图分类号 000 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS20092910.2854

Single-Cell Raman Spectral Analysis of Oxygenated and Deoxygenated Thalassemia Erythrocytes

Chen Xiuli^{1, 2} Wang Guiwen¹ Yin Xiaolin³ Liu Junxian² Yao Huilu¹
Huang Shushi¹ Li Yongqing⁴

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

² College of Physics and technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China;

³ 303 Hospital of People's Liberation Army, Nanning, Guangxi 530022, China;

⁴ Department of Physics, East Carolina University, Greenville, NC 27858-4353, USA

Abstract A laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) system was used to investigate the capacity of carrying oxygen in thalassemia erythrocytes. Single erythrocyte from patients with thalassemia HbH-CS and normal donors were trapped, and the Raman scattering signal of trapped cell was collected. The intensity ratio of band 1638 cm^{-1} to band 1547 cm^{-1} (I_{1638}/I_{1547}) was selected to distinguish oxygenated erythrocytes from deoxygenated ones. By comparing the oxygenation cycle of optically trapped single red blood cells and the deoxygenated cells population from the two kinds of specimen, and analyzing the oxygenated and deoxygenated states, it is found that, in the oxygenation cycle, the ratio I_{1638}/I_{1547} of thalassemia HbH-CS was much higher than that of normal control in deoxygenated state and slightly higher than the normal control in oxygenated state. In the population statistic, 46% of the red blood cells from the normal control reach oxygenated state, but thalassemia HbH-CS only 15%, if the base is set by less than the average of I_{1638}/I_{1547} from normal control cells. The result shows that the red blood cells of thalassemia HbH-CS are easy to oxygenate, but difficult to deoxygenate. The individual difference between

收稿日期: 2008-12-08; 收到修改稿日期: 2009-03-09

基金项目: 国家自然科学基金(30660063)和广西科学院科技创新项目资助课题。

作者简介: 陈秀丽(1983—), 女, 硕士研究生, 主要从事分子振动光谱在生物医学中的应用研究。

E-mail: xiuli_ch@163.com.

导师简介: 王桂文(1969—), 男, 副研究员, 主要从事生物物理和微生物研究。E-mail: wguiwen@126.com. (通信联系人)

thalassemia HbH-CS erythrocytes is obvious. This study provides the spectral vision on the oxygenation of thalassemia HbH-CS erythrocytes and the laboratorial referrences for the diagnosis and treatment.

Key words spectroscopy; Raman spectroscopy; carrying oxygen; thalassemia; single erythrocyte

1 引言

红细胞是血液中数量最多的一种细胞,在机体气体运输方面起着非常重要的作用。其机能主要由胞内的血红蛋白完成,有氧时,血红蛋白血红素 Fe 的第 6 个配位键与氧结合形成氧合血红蛋白,为氧合态;无氧时,该配位键空缺,形成去氧血红蛋白,为去氧态。红细胞的储氧能力是疾病和机理不良的重要指示^[1]。目前,基于大量红细胞群体的氧浓度测定只能得到一些平均结果。单个细胞的氧浓度与该细胞的健康或生长发育相关,而且来自单细胞的信息使人们更深入地了解细胞群体中的个体差异性。因此,基于单细胞的研究很有必要。而外部环境的变化,如渗透压、药物处理、氧气或氮气分压、温度等可能引起红细胞内血红蛋白分子构象发生变化。姚成灿等^[2]利用快速显微多道分光光度技术,测定了不同环境温度下单个活态红细胞内血红蛋白吸收光谱的变化,得出人红细胞的携氧能力与温度密切相关。可见,能在单细胞水平上快速检测这些变化,对于深入了解红细胞的携氧功能甚至血液疾病有着重要意义。

拉曼光谱是一种反映物质结构的分子振动光谱。血红蛋白拉曼光谱研究^[3~6]表明,该技术可用于血红蛋白分子构象变化研究。近年来,共振显微拉曼已用于功能红细胞的研究^[1,7~9],并成功记录氧合和去氧态红细胞的特征谱线,发现二者的差别主要表现在自旋带和次甲基振动带^[7]。但利用吸附物固定红细胞会改变细胞膜的拓扑结构^[10]。激光镊子和显微拉曼光谱相结合的激光镊子拉曼光谱(Laser tweezers Raman spectroscopy, LTRS)技术的出现,很好地解决了这一问题。单个细胞被囚禁在激光束的焦点处,无需机械固定或引入化学标记。同时,光镊可提升被囚禁的细胞,减少了来自玻片的信号干扰,从而获得信噪比更高的光谱。该技术可在线分析单个功能细胞,并实时记录由于环境变化引起的细胞构象变化。Ramser 等^[11]利用 LTRS 系统与微流控技术相结合,监测单个红细胞的氧循环过程和光化学反应。LTRS 技术不仅可以模拟功能红细胞的输氧过程,而且有望应用于血液疾病的诊断和病理研究。De Luca 等^[12]利用双光镊拉曼技术研究 β -地中海贫血红细胞,发现其抗氧化及形变能

力均比正常对照差。

地中海贫血(Thalassemia,简称地贫)是一种由于珠蛋白基因缺失或缺陷使珠蛋白链的合成受到部分或完全抑制而引起的遗传性溶血性贫血。该疾病在我国南方地区发病率较高,主要分为 α -地贫和 β -地贫两种类型。重型地贫患者症状严重,甚至夭折。中间型 α -地贫的非缺失型 HbH-CS 多见于广西、台湾及东南亚地区,其临床症状较普通的 HbH 病严重,经常需要输血^[13,14]。借助 LTRS 技术监测该疾病功能红细胞在不同氧合状态下的构象变化尚无报道。

利用 LTRS 技术收集氧合、去氧态红细胞的单细胞拉曼光谱,并记录地贫 HbH-CS 和健康个体的单个红细胞氧循环过程的光谱;通过平均光谱、主成分分析(PCA)提取光谱主要信息进行谱线的指认,并建立区分氧合及去氧态的指标;分析讨论在相同的 $O_2(N_2)$ 气压环境下,地贫 HbH-CS 红细胞及正常对照红细胞氧合及去氧能力的差异性,以评价其携氧功能,为诊断治疗提供一定的理论依据。

2 材料和方法

2.1 实验样品与实验仪器

血液标本来自解放军第 303 医院,常规分析结果见表 1。采用 EDTA-K2 抗凝,置于 4 °C 的冰箱中保存。实验时,从样本中取 2 μ L 用磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)(pH=7.4,27 °C)稀释至 3000 倍,取 100 μ L 置于样品槽。表中 SD 表示标准偏差。

表 1 血液样品常规分析结果

Table 1 Laboratorial analysis of red blood cells

	HbH-CS (n=3, mean±SD)	Normal conctrol (n=3, mean±SD)
MCV /fL	75.5±3.5	85.8±1.13
MCH /pg	19.5±1.3	30.2±1.3
MCHC /(g·L ⁻¹)	258.5±3.5	351.5±9.2
HbF (HPLC) /%	2.5(n=1)	—

激光镊子拉曼光谱系统如图 1 所示,由二极管激光器(DL),干涉滤波片(IF),反射镜(M),透镜(L),陷波滤波器(HNF),双色镜(DM),针孔(PH),光源(Lamp),摄像机(VC),偏振片(P1, P2)组成,波长为 780 nm 的激光经过一系列的反射镜、透镜

及干涉陷波滤波片等到达尼康倒置显微镜(TE2000U, Nikon),并聚焦进入溶液样品槽。激光俘获并激发单个细胞,产生的拉曼散射沿着原光路进入光谱仪(SpectraPro2300i, Acton, 分辨率为 6 cm^{-1} ,光栅 600 Line/mm, 650 nm Blaze)。光谱仪耦合到电荷耦合器件(CCD)上,为了获得极低的暗电流,CCD被冷却到 $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。激光功率通过偏振片P1,P2调节。测量过程中,通过摄像机(VC)实时监控囚禁的红细胞。

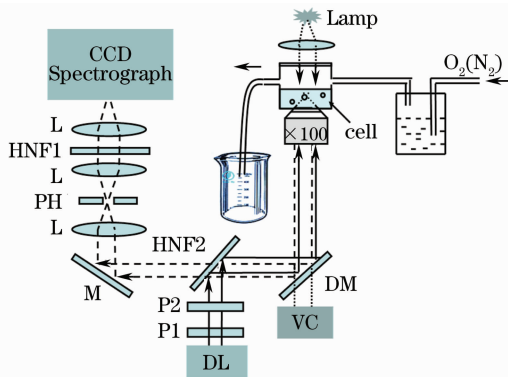


图1 结合了气体循环装置的光镊拉曼光谱仪

Fig.1 Experimental setup of laser tweezers Raman spectroscopy coupling with N_2/O_2 cycle supply

O_2 和 N_2 均采用压缩气体,通过多道减压阀和气体流量计($10\sim 100\text{ mL/min}$ 的普通玻璃转子流量计)严格控制进入样品槽的气流。样品槽采用涂抹硅油的盖玻片密封。气体导进端先经过水槽,目的是保持气流湿润,避免干燥的气流带走 PBS 缓冲液的水分,影响红细胞的渗透压。导出端用水槽承接,以便观察气密性。此外,导气管插入水面的深度约 1 cm ,以保证每次实验样品槽内气压一致。

2.2 拉曼光谱收集与数据处理方法

光镊将红细胞囚禁于石英玻片上方约 $8\text{ }\mu\text{m}$ 位置,收集细胞的拉曼光谱 $S_0(\nu)$; 移开红细胞,保持参数和光镊高度不变,收集生理盐水溶液背景光谱为 $S_1(\nu)$ 。将细胞光谱减去溶液背景光谱,并经响应函数 $R(\nu)$ 校正,得到实际光谱 $S(\nu) = [S_0(\nu) - S_1(\nu)]R(\nu)$ 。

实验一,单个红细胞氧循环过程。激光功率 1.25 mW ,光谱采集时间 10 s 。氧合过程:先通 N_2 ,流速 20 mL/min , 20 min 后收集第一个光谱。关闭 N_2 ,打开 O_2 ,流速 13 mL/min ,每 2 min 收集一个光谱,共收集 25 个光谱。去氧过程:关闭 O_2 ,打开 N_2 ,流速仍为 13 mL/min ,每 2 min 收集一个光谱,共收集 35 个光谱。收集 5 个溶液背景光谱。为减

少细胞的光损伤,光谱收集间隙,激光功率降至零。

实验二,激光功率 2.6 mW ,光谱采集时间 10 s 。氧合红细胞光谱: O_2 流速 20 mL/min , 20 min 后开始测量;去氧红细胞光谱:给氧合红细胞通 N_2 ,流速 20 mL/min , 30 min 后开始测量。各收集 200 个红细胞的光谱及 10 个溶液背景光谱。

将光谱数据转换为 ASCII 数据后,进行 5 点平滑去噪。光谱基线校正通过选择主要信号峰的峰谷 $727,1025,1192,1491$ 和 1725 cm^{-1} 等点,利用最小二乘多项式曲线拟合方法,在 Matlab7.0 中自编程序实现。光谱通过聚苯乙烯小球进行强度校正。拉曼光谱主成份分析(PCA)算法对单细胞氧循环过程所有光谱数据矩阵进行压缩,提取氧合及去氧态的特征谱线信息。

3 结果与分析

3.1 红细胞的不同氧合态拉曼光谱对比

图 2 是实验二得到的健康个体的红细胞氧合态和去氧态的平均拉曼光谱。二者的差异主要表现在次甲基变形振动带($1200\sim 1250\text{ cm}^{-1}$)、吡咯半环呼吸振动带($1300\sim 1500\text{ cm}^{-1}$)以及自旋标志谱带($1500\sim 1650\text{ cm}^{-1}$)。与 wood 等^[5~7]采用 632.8 nm 共振显微拉曼的结果基本吻合。谱峰的归属参见文献^[15,16]。图 3 是单个正常红细胞的氧循环过程 60 个拉曼光谱主成分分析的第一主成分荷载。图中负荷载表明去氧态光谱的显著特征峰为 $1210\sim 1215,1544\sim 1547\text{ cm}^{-1}$;正荷载表征了氧合态显著光谱特征峰为 $1224\sim 1226,1393\sim 1400,1562\sim 1565,1636\sim 1639\text{ cm}^{-1}$ 等。红细胞两种状态中,谱线 1547 cm^{-1} 和 1638 cm^{-1} 差异最显著。

基于上述现象,分别统计氧合态和去氧态红细

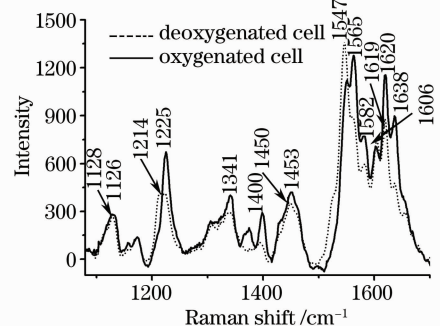


图2 来自健康个体的去氧态红细胞和氧合态红细胞的平均拉曼光谱

Fig.2 The average Raman spectra of the deoxygenated cell and oxygenated cell from normal controls

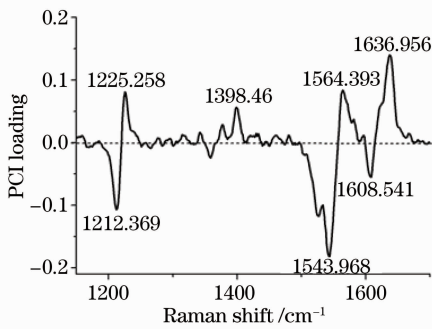


图3 氧循环过程60个光谱数据矩阵PCA的第一主成分荷载

Fig. 3 The PCA loading plot for the 60 spectral data set in oxygenation cycle

胞光谱 1400, 1547, 1565, 1582, 1606, 1620, 1638 cm^{-1} 等谱线的绝对强度, 各 200 个细胞, 以寻求一种区分红细胞氧合及去氧态的指标。由直方分布图(未给出)发现, 由于红细胞个体差异、系统噪声、系统强度的不稳定和测量误差等因素的存在, 采用任一谱线强度作为指标, 均不能很好的把氧合态及去氧态红细胞完全区分开。为此, 计算各主要信号峰强度比值, $R_1 = I_{1400}/I_{1547}$, $R_2 = I_{1582}/I_{1547}$, $R_3 = I_{1565}/I_{1547}$, $R_4 = I_{1606}/I_{1547}$, $R_5 = I_{1620}/I_{1547}$ 和 $R_6 = I_{1638}/I_{1547}$, 其中, 去氧态的 $\overline{R_6}$ 平均值为 0.3128, 而氧合态的 $\overline{R_6}$ 为 0.68963, 标准差(SD)较大, 而且, 去氧态 R_6 最大值与氧合态 R_6 的最小值相差 0.12815。因此, 选择 R_6 (I_{1638}/I_{1547}) 比值作为区分红细胞氧合态和去氧态的指标, 区分效果最佳。这与图3中显示的负荷载最大值为 1547 cm^{-1} , 正

荷载最大值为 1638 cm^{-1} 的结果相符。

3.2 单个红细胞氧合、去氧过程的拉曼光谱

采用实验一的方法, 收集地贫 HbH-CS 和正常对照红细胞的光谱。图 4(a) 给出 3 个地贫 HbH-CS 和 3 个正常对照红细胞的 R_6 随时间的变化曲线及相应的拟合曲线见图 4(a) 右上方, 相应的平均曲线见图 4(b)。由图 4 得出: 1) 0~48 min 通 O_2 过程, 所有红细胞光谱的 R_6 均快速上升, 12 min 后达到一个较高水平, 并保持上下波动的平稳状态, 这时红细胞基本达到完全氧合态。50~118 min 通 N_2 , R_6 逐渐下降, 但下降速度低于上升速度。110 min 后 R_6 降低到一个新的平稳状态, 红细胞转化为去氧态。2) 在初态, 地贫 HbH-CS 和正常对照的 R_6 较明显的分离。地贫 HbH-CS 起点 $\overline{R_6}$ 0.3936, 显著高于正常对照的 $\overline{R_6}$ 0.23118。在完全氧合态中, R_6 上下波动, 从氧循环曲线看, 二者差异不明显。但拟合曲线显示, 地贫 HbH-CS 的 R_6 比对照高, 且三个细胞间的差异明显。而正常对照的三条拟合曲线几乎一致。新的去氧平稳态时, 二者差异显著。地贫 HbH-CS 的 $\overline{R_6}$ 为 0.50852, 明显高于正常对照的 $\overline{R_6}$ 0.33437 图 4(b) 中虚线 A, B。3) 去氧终态的 $\overline{R_6}$ 均比初态的高, 其中地贫 HbH-CS 的 $\overline{R_6}$ 由 0.3936 上升为 0.50852, 正常对照的 $\overline{R_6}$ 由 0.23118 提高到 0.33437。这些结果表明, 在相同的气压下, 地贫 HbH-CS 红细胞的氧合能力较强, 但去氧能力明显比正常对照的差。而终态的 $\overline{R_6}$ 比初态偏高, 可能是红细胞经多次俘获后, 产生一定的光损伤所致。

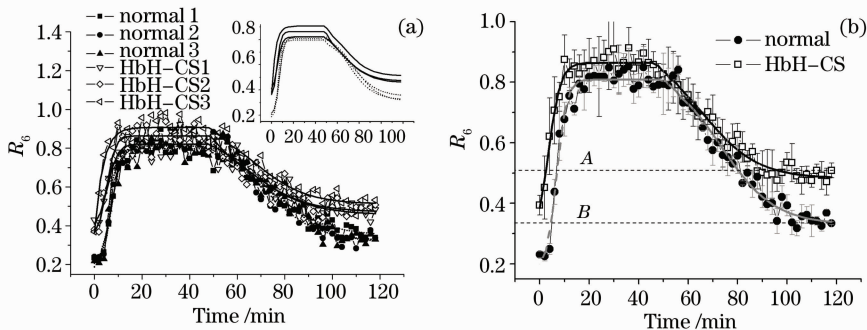


图4 3个HbH-CS和正常对照红细胞氧循环过程 R_6 随时间变化曲线、相应拟合曲线(a)及其平均曲线(b)

Fig. 4 The R_6 of three individual red blood cells from patient with HbH-CS and normal control as a function of time and the corresponding curve fitting (a) and the averaged curve (b)

考虑到细胞个体差异的因素, 在氧循环结束后, 保持 N_2 流速不变, 收集地贫 HbH-CS 和正常对照各 100 个红细胞光谱, 图 5 是相应的直方分布图。地贫 HbH-CS 的 $\overline{R_6} = 0.39693$, $n_{SD} = 0.06035$; 正常对照的 $\overline{R_6} = 0.33013$, $n_{SD} = 0.03456$ 。若以小于正

常对照 $\overline{R_6}$ 为去氧态基准, 则正常对照中 46% 的红细胞达到去氧态, 而地贫 HbH-CS 仅有 15%。这些结果表明, 地贫 HbH-CS 红细胞整体去氧能力低于正常对照; 而其 n_{SD} 值比正常对照高 74.6%, 表明地贫 HbH-CS 红细胞个体差异大。

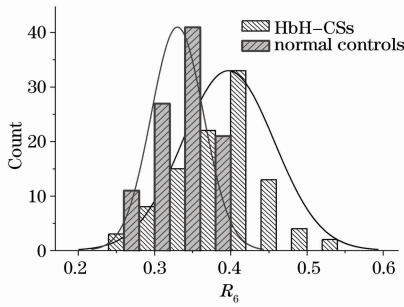


图5 HbH-CS和正常对照各100个红细胞去氧态 R_6 的直方分布图

Fig. 5 The histogram of the R_6 of 100 red blood cells from normal control and patients with HbH-CS

以 1638 cm^{-1} 与 1547 cm^{-1} 的强度比值 R_6 为指标虽然能较好地分析红细胞的氧合及去氧态。但由于 R_6 消除了绝对强度的影响因素,因此可能掩盖掉一些有用的信息,例如无法反映胞内物质的浓度。研究表明, 1638 cm^{-1} 是细胞氧合态的拉曼标志谱线^[1]。因此,与图4(b)相对应,图6给出氧合、去氧过程中 1638 cm^{-1} 的信号强度变化曲线。图6显示,正常对照的曲线表现出较显著的变化规律,而地贫HbH-CS的曲线较平缓;正常对照的初态值比地贫HbH-CS的低,但在氧合态,却明显高于地贫HbH-CS,这一结果与图4(b)中正常对照氧合态 R_6 略低于地贫HbH-CS的显著不同。在氧合及新的去氧态中, 1638 cm^{-1} 的强度值仍然是上下波动。

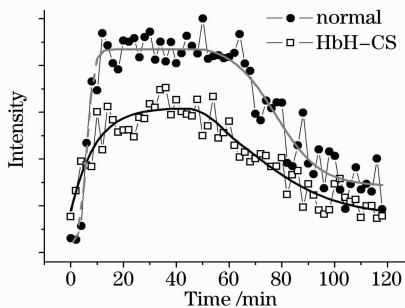


图6 单个地贫和正常对照红细胞氧循环过程 1638 cm^{-1} 强度随时间变化的平均曲线

Fig. 6 The averaged absolute intensity curve 1638 cm^{-1} with of three individual red blood cells from patient with HbH-CS and normal control as a function of time

4 讨 论

在LTRS系统上,通过严格控制气压和激光功率,构建了模拟红细胞携氧过程的实验装置。应用PCA算法提取不同态红细胞拉曼光谱特征,其第一

主成分荷载与文献[9]中 785 nm 激发波长的结果基本吻合。但文献[7]采用 632.8 nm 共振拉曼研究得出的氧合态特征峰 $1248, 1369\text{ cm}^{-1}$ 在荷载中没有出现。该小组后期研究表明,在低温低功率条件下, 632.8 nm 下的氧合红细胞拉曼光谱中 1248 cm^{-1} 和 1369 cm^{-1} 没有显著增强^[1],可推测 $1248, 1369\text{ cm}^{-1}$ 的增强是激光损伤的结果,同时说明 1.25 mW 的激光对红细胞损伤非常弱。

血红素的振动表现在卟啉中心变形和铁原子与卟啉平面的位移。 632.8 nm 是血红素振动的共振激发波长,在氧合态中, 1638 cm^{-1} 相对强度较大。而采用 780 nm 得到的氧合态平均光谱中, 1638 cm^{-1} 只是一个肩峰。但通过对比 $R_1 \sim R_6$ 的分布图(未给出)发现, 1638 cm^{-1} 与 1547 cm^{-1} 强度的比值 R_6 仍然是区别氧合及去氧态的最好指标。表明,不同的激光波长、共振机制不同,拉曼谱线的相对强度有差异,但氧合及去氧态特征峰的变化趋势基本相同。此外, 780 nm 的光损伤较小,因此适合于长时间监测单细胞氧循环过程。以 R_6 为指标,分析地贫HbH-CS和正常对照单个红细胞氧循环过程(图4),得出地贫较易结合氧,但不易去氧的特点。与文献[11]指出的红细胞对氧的亲合力极高,没有Bohr效应,不利于氧的运输,从而导致组织缺氧基本相吻合。

影响 1638 cm^{-1} 强度的因素主要有两个,一是红细胞内血红蛋白的浓度,二是血红蛋白结合 O_2 的程度。对于地贫HbH-CS,由于其mRNA极不稳定,导致 α -珠蛋白链合成减少^[13],血红蛋白浓度低于正常对照(见表1)。在图6中,初态时,正常对照的 1638 cm^{-1} 强度比地贫HbH-CS低,而在氧合态中却明显高于地贫HbH-CS。可能原因是,正常对照红细胞在初态时由于基本没有结合 O_2 , 1638 cm^{-1} 强度较低;而地贫HbH-CS在初态时仍然结合了一定的 O_2 , 1638 cm^{-1} 强度较高;但在逐渐氧合的过程中,正常对照由于血红蛋白浓度较大,能结合更多的 O_2 ,所以 1638 cm^{-1} 的强度显著高于地贫HbH-CS。而图4中,地贫HbH-CS的氧合态 R_6 略高于正常对照,说明地贫HbH-CS红细胞的氧合程度比正常对照的高。由此可知, R_6 能反映红细胞的氧合及去氧程度,但无法反映结合 O_2 的分子数。

图4和图6均显示,红细胞在氧合($12 \sim 48\text{ min}$)及再去氧($110 \sim 118\text{ min}$)阶段, R_6 (或 1638 cm^{-1} 信号强度)均上下波动。引起这一结果的可能因素有:系统量子起伏噪声的影响;氧合及去氧

态过程是一个动态的变化过程,在氧合态,血红蛋白不断结合氧的同时也会脱去一定的氧,反之,血红蛋白在氮气环境中不断脱氧,但可能会再次结合溶液中存在的少量氧分子。

人体内红细胞的呼吸功能遵从 Bohr 效应-高浓度的氧促使血红蛋白释放 CO_2 和 H^+ ,反之,高浓度 CO_2 , H^+ 促使血红蛋白释放氧。而本模拟实验通过高浓度 N_2 降低 O_2 的浓度,使红细胞释放氧,与红细胞氧输送过程仍有一定的区别,这可能是造成红细胞的去氧态速率较低的原因(如图 4 所示)。

5 结 论

低功率的 780 nm 波长的 LTRS 避免了细胞的光损伤,保证在功能状态下检测红细胞不同氧合状态。通过分析不同状态红细胞的特征峰和 PCA 荷载,以及对比不同状态的特征谱线相对强度,确定在 780 nm 波长下,1638 cm^{-1} 峰与 1547 cm^{-1} 峰强度比值(R_6)能较好地地区分红细胞的氧合、去氧态。利用 R_6 比较分析了地贫 HbH-CS 和正常对照红细胞的携氧能力。结果表明,地贫红细胞的氧合能力较强,但去氧能力明显比正常对照的差。该结果为更深入了解地贫 HbH-CS 红细胞功能缺陷,临床的疾病诊断及病理研究提供了一定的依据。该方法有可能应用于其他血液疾病的病理和增氧治疗的研究。

参 考 文 献

- 1 B. R. Wood, L. Hammer, L. Davis *et al.*. Raman microspectroscopy and imaging provides insights into heme aggregation and denaturation within human erythrocytes [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2005, **10**(1): 014005
- 2 Yao Chengcan, Li Xiaokun, Huang Yaoxiong. Instant effect of temperature on the oxygen carrying capacity of single living intact red blood cell [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2005, **25**(4): 613~616
姚成灿,李校坤,黄耀熊. 温度对单个活态人红细胞携氧能力的即时影响[J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, **25**(4): 613~616
- 3 T. G. Spiro, T. C. Streakas. Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state [J]. *J. Am. Chem.*

- Soc.*, 1974, **96**(2): 338~345
- 4 H. Brunner, A. Mayer, H. Sussner. Resonance Raman scattering on the haem group of oxy- and deoxyhaemoglobin [J]. *J. Mol. Biol.*, 1972, **70**: 153~156
- 5 X. Zhao, T. G. Spiro. Ultraviolet resonance Raman spectroscopy of hemoglobin with 200 and 212 nm excitation: H-bonds of tyrosines and pralines [J]. *J. Raman Spectrosc.*, 1998, **29**: 49~55
- 6 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
- 7 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
- 8 B. R. Wood, D. McNaughton. Micro-Raman Characterization of High- and Low-Spin Heme Moieties within Single Living Erythrocytes [J]. *Biopolymers*, 2002, **67**: 259~262
- 9 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
- 10 K. Ramser, E. J. Bjerneld, C. Fant *et al.*. Raman imaging and spectroscopy of single functional erythrocytes: a feasibility study [C]. *SPIE*, 2002, **4614**: 20~27
- 11 K. Ramser, K. Logg, J. Enger *et al.*. Resonance Raman study of the oxygenation cycle of optically trapped single red blood cells in a microfluidic system [C]. *SPIE*, 2004, **5514**: 560~568
- 12 A. C. De Luca, G. Rusciano, R. Ciancia *et al.*. Spectroscopical and mechanical characterization of normal and thalassemic red blood cells by Ramantweezers [J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(11): 7943~7957
- 13 Zhang Junwu, Long Guifang. *Hemoglobin & Hemoglobinopathies* [M]. Nanning: Guangxi Science & Technology Publishing, House, 2003
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
- 14 S. L. Schrier, A. Bunyaratvej, A. Khuhapinants *et al.*. The unusual pathobiology of hemoglobin Constant Spring red blood cells [J]. *Blood*, 1997, **89**(5): 1762~1769
- 15 M. Abe, T. Kitagawa, Y. Kyogoku. Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinato-Ni(II) and mesodeuterated and ^{15}N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis [J]. *J. Chem. Phys.* 1978, **69**: 4526~4531
- 16 B. R. Wood, D. McNaughton. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cell in vivo [J]. *J. Raman Spectrosc.*, 2002, **33**: 517~523