

文章编号: 0253-2239(2010)07-2065-04

# 乙醇中毒血液荧光偏振特性研究

刘莹 何文亮 刘诚

(徐州师范大学物理与电子工程学院, 江苏 徐州 221116)

**摘要** 研究了 407 nm 激光激发乙醇中毒血液的稳态和偏振荧光光谱特征, 计算了乙醇中毒、正常血液荧光的偏振度以及分子的旋转弛豫时间, 结果表明乙醇中毒血细胞的退偏效果明显差于正常血细胞, 而分子旋转弛豫时间却明显高于正常值, 此结果与血液流变学测量结果一致。分析认为乙醇中毒引起了血液粘度升高和红细胞体积增大, 两者的共同作用最终导致中毒血液荧光强度、荧光偏振度和分子弛豫时间的规律变化。

**关键词** 光谱学; 偏振荧光; 乙醇中毒; 偏振度

中图分类号 Q631 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS20103007.2065

## Research on the Fluorescence Polarization Characteritic of Alcoholism Blood

Liu Ying He Wenliang Liu Cheng

(College of Physics & Electronic Engineering, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

**Abstract** Both of the fluorescence and polarization spectral characteritic of steady-state and polarized fluorescence induced by 407 nm laser of normal and the alcoholic whole blood are studied. By calculating the polarization degree and the rotation-relaxation time of the two blood cells, the depolarization effect of alcoholism blood is less than the normal one, but the rotation-relaxation time is opposite. The result is in accordance with the hemorheologic measurements. Because of alcoholism, viscosity of blood and the volume of erythrocyte become greater. The combined action of the two changes induces the regularity variation of fluorescence intensity, polarization degree and the rotation-relaxation time of the normal and alcoholism blood cells.

**Key words** spectroscopy; polarized fluorescence; alcoholism; polarization degree

### 1 引 言

近年来有关乙醇代谢动力学以及乙醇对人体细胞的作用机理受到广泛关注。过量饮酒对中枢神经系统、心脑血管、消化系统、周围神经末梢都有损伤, 并导致各类中毒现象的出现。长期大量酗酒可导致红细胞变形能力下降, 红细胞平均体积增大, 白细胞数减少, 血小板数及功能等方面的异常等, 进而增加出血及血栓性病变的危险<sup>[1]</sup>。乙醇与生物组织的作用靶位是细胞膜。当乙醇分子进入机体后, 立即进入膜的疏水区, 同时改变膜结构和影响膜的物理性质。近十年来, 通过荧光偏振、电子自旋共振、核磁共振以及差示扫描量热技术研究了乙醇对生物膜和

人工膜的作用, 取得了一定的成果<sup>[2~4]</sup>。乙醇对红细胞膜的影响较大, 嗜酒者红细胞膜表面存在微结构异常。Gastaldi 等<sup>[5]</sup>对长期酗酒患者的红细胞膜脂质组成和代谢的研究表明乙醇可引起红细胞合成时胞膜成分的改变, 导致脂质重建和功能异常。

过量饮酒会导致血细胞功能异常, 从而影响生物体的宏观病变。检测血液病变或血细胞功能异常的方法很多。传统的血液检验一般是基于血细胞形态学, 细胞的结构与功能, 细胞的代谢与免疫以及细胞的衰老和消亡等理论基础上的。而近年来得到迅速发展的荧光光谱技术诊断方法具有快速客观、灵敏准确、无痛无损且简单实用等特点, 并可检

收稿日期: 2009-08-11; 收到修改稿日期: 2009-09-25

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2007204)、江苏省教育厅科研项目(07KJD140208)和省部级培育项目(2006PYL001)资助课题。

作者简介: 刘莹(1970—), 女, 博士, 教授, 主要从事光与生物分子、有机分子相互作用的实验和理论等方面的研究。

E-mail: Liuying70@126.com

测出常规方法难以发现的表征生物病变的微弱荧光,因而受到了广泛的关注和应用<sup>[6~10]</sup>。而光镊可以对小微粒或者活细胞进行无损伤地操纵,对每一个细胞进行有目的或者随机性的检测,直观地研究细胞的形状和细胞体的结构随着时间的变化。

通过正常血液和乙醇中毒血液的荧光光谱和偏振荧光光谱的检测,比较血液荧光光谱特征参数随时间的衰变规律,测量了两种红细胞活性衰变即旋转弛豫时间的变化,同时结合乙醇中毒引起运动神经损伤随时间的恢复程度,给出乙醇与血液作用的过程和机理。最终分析乙醇对血细胞的作用机理,旨在研究乙醇摄入体内以后的代谢规律,分析乙醇对血细胞作用的机理,为合理的饮酒模型的建立和急性乙醇中毒的诊断提供参考。

## 2 实验仪器和方法

实验中采用的是英国 Edinburgh Instruments 公司生产的 FLS900 型稳态和时间分辨荧光光谱仪,其中光源为半导体激光器,功率是 5 mW、波长为 407 nm。发射谱扫描区间为 400~750 nm。测量采用相关单光子计数系统。实验所用动物是徐州医学院动物研究中心提供的雄性日本大耳兔,实验中给其灌入体积分数为 53% 的白酒并致其昏迷,并分别于吸食乙醇中毒后不同时间,采集血液样品。

在进行偏振荧光光谱的检测时,在激光器和样品之间放置一个偏振片作为起偏器。检测器和样品之间的检偏器由光谱仪自带。将起偏器和检偏器设置成平行和垂直,分别扫描正常和乙醇中毒各浓度的全血溶液,分别得到平行和垂直时的荧光光谱。

## 3 实验结果与分析

### 3.1 乙醇中毒血液与正常血液的稳态荧光光谱

用 407 nm 的激光激发灌酒后不同时段(单位为 h)全血溶液并记录其荧光光谱图如图 1 所示。其中 normal 表示正常血液的荧光谱线。

从图中可以看出,每条谱线均有三个谱峰,其峰值分别位于 510, 556 和 605 nm 处。通过分析血液的吸收光谱和查阅文献,发现 556 nm 处的谱峰并不是荧光团所发射的特征峰,而是因为吸收造成的假象<sup>[11]</sup>。而且该谱峰离激励光太近,受到激励光的影响也较大。因此在实验中只讨论 605 nm 处的荧光峰的变化规律。而 605 nm 处的谱峰主要是血液中的卟啉类物质收激发后产生的<sup>[2~15]</sup>。通过比较体积分数为 1% 的全血溶液的荧光光谱图,发现在

灌酒后的不同时间恢复过程中,605 nm 荧光峰的强度先增强后减小,直至最后恢复正常。其中在乙醇中毒 6 h 左右 605 nm 荧光峰的强度达到最大,到 11 h 时基本恢复正常,其荧光强度随酒精中毒时间的定量关系曲线如图 2 所示。在不同时间段,605 nm 处的荧光强度变化过程中,峰位置基本保持在 605~606 nm 之间,无明显偏移。通过多次实验发现,所得实验结果几乎一致。

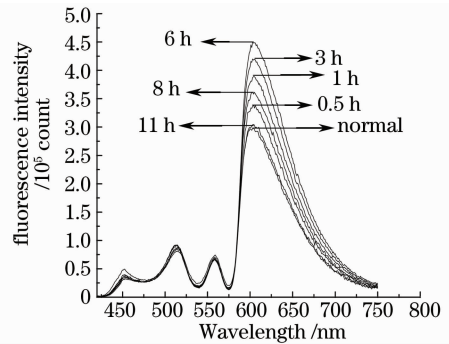


图 1 正常和乙醇中毒全血溶液荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectra of normal and alcoholic whole blood

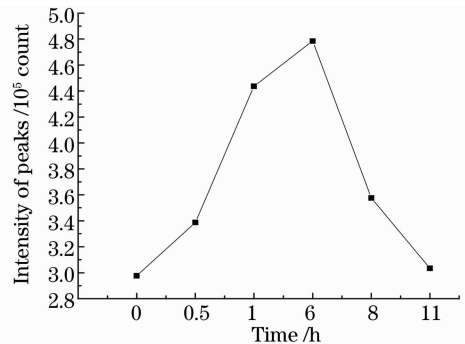


图 2 乙醇中毒全血溶液荧光强度随时间的定量变化曲线

Fig. 2 Quantitative curve of the whole blood fluorescence intensity after alcoholism versus time

在实验过程中同时观察并记录兔子因灌食白酒昏迷后恢复过程中体征的变化情况。开始主要表现为行动迟缓,步履蹒跚,呼吸急促,灌酒 1 h 以后兔子开始昏睡,6 h 后开始逐渐苏醒,11 h 左右基本恢复正常。兔子灌酒以后这一系列的体征变化和全血溶液的荧光光谱变化规律相同,荧光峰随时间的衰变过程和兔运动神经损伤的恢复过程完全一致,说明乙醇中毒引起兔子体征变化与荧光光谱的变化有着一定的内在联系。

### 3.2 乙醇中毒血液与正常血液的偏振荧光光谱

图 3(a) 为正常全血溶液的荧光偏振光谱。图 3(b) 为乙醇中毒后全血溶液的荧光偏振光谱图。图中表示平行和垂直分别表示检偏器和起偏器的方

向相互平行和垂直。由于全血溶液中可发出荧光内源荧光团的退偏作用,使得在和激励光偏振方向垂直(vertical)和平行(horizontal)方向上同样都可以检测到荧光。从两幅偏振荧光光谱图可以看出,平行方向上的荧光强度比垂直方向强,即发射出的荧

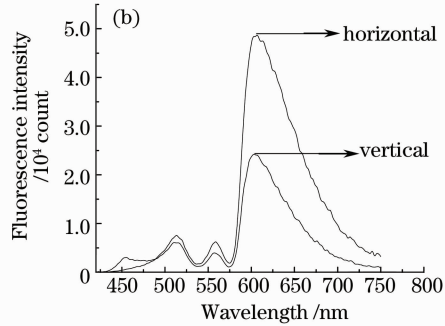
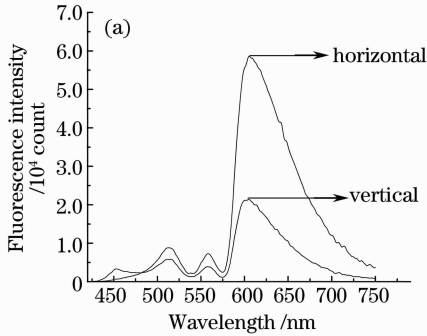


图 3 1%乙醇中毒全血溶液(a)和正常全血溶液(b)的偏振荧光光谱

Fig. 3 Polarized fluorescence spectra of alcoholic whole blood with the volume fraction of 1% (a) and normal whole blood

根据偏振度的定义式

$$P = \frac{I_h - I_v}{I_h + I_v}, \quad (1)$$

可求得

$$P_1 = \frac{48666 - 24213}{48666 + 24213} = 0.335, \quad (2)$$

$$P_2 = \frac{58616 - 21198}{58616 + 21198} = 0.468, \quad (3)$$

式中  $P_1$  为正常的全血溶液偏振度、 $P_2$  为乙醇中毒以后的偏振度。

影响偏振度的因素主要有分子的旋转扩散效应,吸收偶极矩和发射偶极矩的取向以及能量转移等。由于体积分数 1% 的全血溶液是比较稀的溶液,可以忽略能量转移对它的影响,同时实验使用的激励光为最佳激励光可以认为吸收偶极矩和发射偶极矩是近似平行的。所以主要考虑分子旋转扩散对偏振的影响。

由荧光偏振理论可知,当偏振光激励时,分子在激发时发生的旋转运动越弱,发射光的偏振程度就越高,反之,分子旋转能力较强,去偏振效果越明显,发射荧光的偏振度较小。从实验结果可以看出,乙醇中毒血液的荧光偏振度明显比正常血液大,说明中毒后分子旋转受到阻碍,分析认为可能主要有两个原因所致:一是分子体积变大导致旋转困难,二是环境粘度变大。

一般用旋转弛豫时间  $\tau$  来表征分子旋转快慢。分子旋转的快慢主要受到温度  $T$ 、粘度  $\eta$ 、体积  $V$  的影响:

光虽然记忆了激励光的偏振信息,即发射的荧光也具有偏振性但偏振方向改变了。由于前半区的两个次峰是受到了血液自吸收作用而形成的假峰,所以仍然主要讨论有血卟啉发出的峰位在 605 nm 的主荧光峰。

$$\tau = \frac{3\eta V}{RT}, \quad (4)$$

式中  $R$  为普适气体恒量。当考虑旋转扩散效应时

$$P = \frac{3\cos^2 \alpha - 1}{\cos^2 \alpha + \tau_F/\tau + 1}, \quad (5)$$

式中  $\alpha$  为分子的吸收偶极矩和发射偶极矩的取向夹角,  $\tau_F$  为分子在激发态的寿命。根据(4),(5)式和前面计算的结果可估算出乙醇中毒前后分子旋转弛豫时间相对于正常血液的增加了 70%。

由此可见乙醇中毒后分子的旋转弛豫时间明显升高,这说明乙醇中毒使得血液的粘度升高。为了验证这一结论,把正常和乙醇中毒的血液样品送到医院进行了血液流变学分析,其结果如表 1 所示。从表中可以看出,乙醇中毒后血液的粘度明显增大。计算结果和测量结果相一致,而且由于粘度增加导致的分子旋转时间增加起主要作用,分子体积变大也会引起旋转时间的变化。

表 1 正常和乙醇中毒血液流变学分析

Table 1 Hemorheologic measurements of normal and alcoholic whole blood

Whole blood viscosity	High-shear rate	Middle-shear rate	Low-shear rate
Normal blood / (mPa/s)	1.94	2.23	4.71
Alcoholism whole blood / (mPa/s)	2.74	3.22	6.83
Percentage variation / %	41	44	45

重度饮酒可严重影响机体各器官的功能与代谢。红细胞在血液中占 40%，因而红细胞数量、比容等参数的变化对血液的生理机能有一定的影响。由于急性乙醇中毒后，中毒者血液中的红细胞数(RBC)、血红蛋白浓度(HGB)、红细胞比容(HCT)增高。急性乙醇中毒者的 3 个红细胞平均指数(MCV, MCH, MCHC) 均增高<sup>[3]</sup>。说明红细胞体积的增大，且出现异形，细胞内血红蛋白容量的增加。红细胞太多会导致血液粘滞性增高，流动缓慢，以及血管内血栓形成；红细胞体积的增大将使其变形能力减弱，通过毛细血管的能力也相应减弱，容易引起红细胞的滞留聚集形成凝血而引起血栓，因而急性乙醇中毒者有引发血液粘稠、引起凝血、形成血栓或血管栓塞等的危险。

另外，乙醇中毒引起红细胞体积的增大，使得红细胞之间由于碰撞造成的能量转移几率增加，使得荧光量子产率降低，即发生了荧光碰撞猝灭；又由于急性乙醇中毒后，红细胞数、红细胞比容的增加，导致了血液粘滞性增加，减少了分子间碰撞的几率，从而减少了能量的损失，荧光量子产率增强。即乙醇中毒后导致红细胞体积增大而产生的荧光猝灭和血液粘滞性增加引起的荧光加强；两个原因共同作用导致了全血溶液荧光光谱的规律变化。

## 4 结 论

采用 407 nm 的激光照射乙醇中毒全血溶液，实验中检测到了稳态荧光光谱和偏振荧光光谱，初步得到了乙醇作用后全血溶液荧光光谱的变化规律，得到如下结论：1) 在灌酒后的不同时间恢复过程中，血液荧光峰的强度随时间而发生规律性变化：605 nm 荧光峰的强度先增强随后减小，直至最后恢复正常。2) 乙醇中毒引起红细胞体积的增大，使得红细胞之间由于碰撞造成的能量转移几率增加，使得荧光量子产率降低，即发生了荧光碰撞猝灭，使荧光峰强度变小。3) 乙醇中毒血液偏振荧光光谱得到的荧光偏振度为 0.468 比正常情况下 0.335 要高。估算了荧光团分子的旋转弛豫时间，通过血液流变学测量，实验结果和计算结果均表明乙醇中毒后血液的粘度明显升高。4) 血液的粘滞性变大减小了荧光分子流动性，使得分子碰撞的几率变小，两者共同作用导致了乙醇中毒血液荧光强度的规律变化。

## 参 考 文 献

1 Zhao Li. Study on White rats cerebrovascular pathological changes and cerebral lesion after alcoholism [D]. Changchun;

Jilin University, 2004

赵 丽. 酒精中毒大鼠脑血管病变及相应脑组织损伤的病理观察研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2004

2 Cheng Shi. Biofilms and Disease [M]. Beijing: China Xie-He Medical University Press, 1994

程 时 主编. 生物膜与疾病 [M]. 北京: 中国协和医科大学联合出版社, 1994

3 S. M. de la Monte, J. R. Wands. Chronic gestational exposure to ethanol impairs insulin-stimulated survival and mitochondrial function in cerebellar neurons [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002, **59**(5): 882~893

4 F. Castaneda, R. K. H. Kinne. Short exposure to millimolar concentrations of ethanol induces apoptotic cell death in multicellular HepG2 spheroids [J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2000, **126**(6): 305~310

5 J. Nakamura, S. Harada, N. Tanaka. Relationship between alcohol consumption and the activity of GTP-binding regulatory proteins in human erythrocyte membranes [J]. *Clinica Chimica Acta*, 1993, **215**(1): 1~7

6 Wang Wei, Sun Yue, Zhou Naikang. Laser-induced autofluorescence spectroscopy of normal lung and lung cancer [J]. *Chinese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2000, **16**(4): 202~204

王 伟, 孙玉鸢, 周乃康. 正常肺组织和肺癌组织激光诱发自体荧光光谱 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2000, **16**(4): 202~204

7 Xiao Shudong, Ge Zhizheng, Zhong Liang *et al.*. Gastric cancer diagnosed by autofluorescence spectroscopy [J]. *Chin. J. Gastroenterology*. 2002, **7**(1): 21~23

萧树东, 戈之铮, 钟 晓 等. 胃癌的自体荧光光谱诊断 [J]. 胃肠学, 2002, **7**(1): 21~23

8 Gao Shumei, Lan Xiufeng, Liu Ying *et al.*. Characteristics of blood fluorescence spectra using low-level, 457.9 nm excitation form Ar<sup>+</sup> laser [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2004, **2**(3): 160~161

9 Gao Shumei, Kong Yan, Shen Zhonghua *et al.*. Analyzing physical mechanism about 532 nm laser-induced erythrocyte fluorescence [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(4): 369~372

高淑梅, 孔 艳, 沈中华 等. 532 nm 激光激励血液中红细胞产生荧光的物理机理研究 [J]. 中国激光, 2003, **30**(4): 369~372

10 Chen Xiaodong, Yu Daoyin, Xie Hongbo *et al.*. Reconstruction of tissue autofluorescence spectra by Monte-Carlo modeling [J]. *Acta Optica Sinica*, 2003, **23**(5): 612~615

陈晓冬, 郁道银, 谢洪波 等. 蒙特卡罗模拟重建组织的自体荧光光谱 [J]. 光学学报, 2003, **23**(5): 612~615

11 Peng Changde, Liu Ying, Lan Xiufeng *et al.*. Research on static fluorescence polarization spectrum of whole blood [J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(10): 1544~1546

彭长德, 刘 莹, 兰秀凤 等. 血液静态荧光偏振光谱研究 [J]. 光学学报, 2006, **26**(10): 1544~1546

12 Li Buhong, Zhang Zhenxi, Xie Shuseng *et al.*. Fluorescence spectral characteristics of human blood and its endogenous fluorophores [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**(7): 1311~1313

李步洪, 张镇西, 谢树森 等. 人血液荧光的光谱特性及其物质来源 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, **26**(7): 1311~1313

13 Xu Feng, Hu Lin, Wang Xianwei *et al.*. Effects of low power laser irradiation on human's red blood cell [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(6): 957~960

许 锋, 胡 林, 王现伟 等. 低强度激光照射对离体人红细胞的影响 [J]. 中国激光, 2008, **35**(6): 957~960

14 Luo Xiaosen, Ni Xiaowu, Lu Jian *et al.*. Study of fluorescent spectrum of blood induced by lights of different wavelengths [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(1): 93~96

骆晓森, 倪晓武, 陆 建 等. 不同波长光照射血液诱发的荧光光谱研究 [J]. 中国激光, 2003, **30**(1): 93~96

15 Li Buhong, Xie Shusen, Zhang Zhenxi. Steady-state and time-resolved autofluorescence studies of human colonic cancer [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2006, **4**(6): 348~351