

拉曼光谱分析人类单个血小板的类胡萝卜素

王桂文¹ 彭立新¹ 申卫东² 陶站华¹ 黎永青³

¹广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530007
²广西南宁中心血站, 广西 南宁 530003
³东卡罗莱纳大学物理系, 北卡罗莱纳, 格林维尔, 27858-4353

摘要 应用拉曼光镊对人的单个血小板细胞(Plt)进行拉曼光谱收集与分析。拉曼信号显示,人类血液成分中,血小板的类胡萝卜素浓度最高。虽然类胡萝卜素在人类血小板中普遍存在,但是单个血小板之间差异极显著,且与血小板的脂类物质、蛋白质含量没有相关性。血小板激活过程引起蛋白质拉曼光谱的变化,而类胡萝卜素基本没有变化;常温(25 ℃)保存的血小板会导致类胡萝卜素光谱信号降低,脂类物质的相对拉曼信号强度基本没有变化,但经低温(4 ℃)12 d保存的血小板则相反。

关键词 光谱学;类胡萝卜素;拉曼光谱;血小板;单细胞分析

中图分类号 O657.37 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201131.0630002

Raman Spectroscopic Analysis of Carotenoids of Single Human Blood Platelets

Wang Guiwen¹ Peng Lixin¹ Shen Weidong² Tao Zhanhua¹ Li Yongqing³

¹Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China
²Nanning Central Blood Bank, Nanning, Guangxi 530003, China
³Department of Physics, East Carolina University, Greenville, North Carolina 27858-4353, USA

Abstract The Raman spectra of single blood platelets from human body are acquired by using Raman tweezers and the biochemical information of Raman spectra is extracted. The carotenoids concentration of platelets is found to be highest among the blood. But the carotenoids concentration of platelets is heterogeneous and is irrelevant to the content of lipids and protein of platelets. After platelets is activated, the Raman intensities of carotenoid are constant but those of proteins arise. The Raman intensity of carotenoids decreases but the relative intensities of lipids remain stable when platelets are stored at 25 ℃. The Raman intensities of lipids stored at 4 ℃ 12 d decline while those of carotenoids unchange.

Key words spectroscopy; carotenoids; Raman spectroscopy; platelet; single-cell analysis

OCIS codes 300.6450; 170.5660; 170.1530; 170.1420

1 引言

血小板(Plt)是血液细胞之一,由骨髓中成熟的巨核细胞裂解、胞质脱落而成。在结构上,血小板缺失细胞核,不具备脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)和蛋白质的合成功能,但有丰富的细胞膜系统、细胞骨架蛋白和完整的细胞器,如线粒体、类溶酶体和分泌小泡等。此外细胞内还具有特殊的储存颗粒,如 α 颗粒和致密颗粒^[1]。在功能上,血小板主

要在止血和凝血过程中发挥重要作用^[1,2],此外还具有调节体内新陈代谢,促进组织的修复与愈合的功能^[2]。

拉曼光谱作为一种分子振动光谱,由于其对水不敏感,光谱信号特异,提供的分子结构和组成信息丰富,具有实时、快速和无损分析的独特优势,在生物医学领域的应用日益广泛和深入^[3]。而将光学俘获与显微拉曼相结合的拉曼光镊技术,融合了光阱

收稿日期: 2010-12-20; 收到修改稿日期: 2011-01-21

基金项目: 广西自然科学基金(0832022Z 和 0991079)资助课题。

作者简介: 王桂文(1969—),男,副研究员,主要从事生物物理与应用微生物等方面的研究。E-mail: wguiwen@gxas.cn

操控和拉曼光谱的无损、快速和灵敏的优点,无需物理或者化学方法固定或标记目标细胞,是实时监测与分析单个活细胞的优良工具^[4~10]。本研究小组曾用激光光镊拉曼光谱(LTRS)技术对来自人和其他3种哺乳动物的单个血小板进行了研究,发现单细胞拉曼光谱结合多元统计分析可以判别来自不同物种的血小板,并在人血小板中检测到特异的类胡萝卜素拉曼信号^[11]。该结果暗示着类胡萝卜素在人类血液中可能有着特殊的生理意义。类胡萝卜素是异戊二烯类化合物,具有多个共轭双键结构,普遍认为类胡萝卜素可以明显强化机体的抗氧化防御系统,在抗氧化损伤和保护细胞方面具有非常重要的作用^[12,13]。文献^[14,15]报道了对固定的人血小板或血小板膜进行的光谱学研究,发现类胡萝卜素在人类血小板中广泛存在且分布在血小板的细胞膜上,但尚未有在单个血小板水平上的研究报道。因此,本文应用拉曼光镊技术,研究人类单个血小板及其类胡萝卜素,对比不同个体,不同保存方法,静止态与激活态血小板的拉曼信号变化特点,认识类胡萝卜素在血小板中的分布规律,在单细胞水平上提供基本的认识。

2 材料与方法

2.1 血样采集与血小板的分离、处理

收集人的外周血血液样本,与枸橼酸钠(ACD)抗凝剂按体积比8.6:1.4混合抗凝,共收集10个不同性别和年龄的个体样本,其中10号个体在45 d内随机取样5次。

血小板的分离采用常规方法。新采集的血液经1000 r/min,22 ℃,离心10 min 去掉红细胞(RBC),上清液经3000 r/min,22 ℃,离心10 min 沉淀血小板,质量分数为0.9%生理盐水洗一次,用生理盐水重悬。血小板激活处理:小心收集血小板,避免激活血小板,然后将血小板悬浮在生理盐水中,加入二磷酸腺苷(ADP)使其终浓度达到30 mmol/L,28 ℃处理10 min。光谱收集时选择细胞形态发生皱缩、已经伸出伪足的血小板为激活态血小板,而将未经ADP处理、细胞形态完整的静止态血小板作为对照。常温保存处理:血小板在室温(25 ℃~28 ℃)下保存10 d。低温保存处理:血小板在4 ℃保存12 d。

2.2 光谱数据的收集与处理

实验所用的拉曼光镊技术系统如文献^[5]所述。有所不同的是采用的光谱仪型号为SpectraPro2300i (Acton, USA;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, Spec-10, Princeton Instruments, USA)上,CCD用液氮冷却到-120 ℃。测量过程通过摄像机实时监控。收集300~2200 cm⁻¹范围的拉曼光谱。

将待测的红细胞、白细胞(WBC)或者血小板悬浮在生理盐水中,取200 μL于检测槽中,调整激光束在会聚点的功率约18 mW,俘获血液细胞,聚焦高度为8 μm,10 s收集拉曼信号,得到带背景的单细胞血液细胞的拉曼光谱 $S_{acq}(\nu)$;移开细胞约10 μm,保持激光束聚焦高度不变,用同样的时间收集背景拉曼光谱 $S_{bg}(\nu)$ 。将血液经3340 r/m离心5 min,吸取上层血浆(Plm)于样品槽,在同样的聚焦高度,收集血浆的拉曼光谱,以生理盐水作为血浆的背景光谱。由于血小板较小,除非特别说明,在本研究中其拉曼信号收集时间均为30 s。每个样品至少俘获并收集35个血小板拉曼光谱。将光谱数据转换为ASCII数据,输入软件Micro Origin 7.5处理,每个血小板的实际光谱由公式 $S_{act}(\nu) = [S_{acq}(\nu) - S_{bg}(\nu)] R(\nu)$ 计算得到,其中 $S_{acq}(\nu)$ 为带背景的血小板光谱, $S_{bg}(\nu)$ 为来自溶液、盖玻片和光学部件的背景光谱, $R(\nu)$ 为系统响应函数。

3 结果与分析

3.1 人血液成分的显微拉曼光谱

图1为使用功率18 mW,波长785 nm的激光照射,收集时间10 s的红细胞、白细胞、血小板和血浆等血液成分的拉曼光谱。为方便显示,红细胞的光谱为实际测量值的50%,表1是各主要拉曼光谱峰可能对应的基团和生物大分子。图1的拉曼光谱曲线充分反映了几种血液成分的组成特点,红细胞的主体是血红蛋白,主要拉曼峰1212,1545,1602和1618 cm⁻¹等均源自血红蛋白,信号强烈且清晰;而白细胞、血小板和血浆的组成除了各种不同的蛋白质外还有脂类物质等,白细胞还有核酸类物质,但由于相对含量低,拉曼峰多且弱,其拉曼曲线明显不同于由血红蛋白组成的红细胞。值得注意的是1157 cm⁻¹和1524 cm⁻¹峰,是一对同时出现的、来自类胡萝卜素的独特拉曼峰,分别对应的是类胡萝卜素分子的=C-C=和-C=C-基团的伸展振动。图1中血小板的1157 cm⁻¹和1524 cm⁻¹峰最强,红细胞次之,而其他血液成分并没有明显的类胡萝卜素峰,说明所收集的血液样品中,血小板的类胡萝卜素含量为最高,其次是红细胞(类胡萝卜素位于细胞膜上)。一般认为血浆的类胡萝卜素含量最多,

但由于分散在血浆的脂蛋白中,其实际浓度并不高,在显微拉曼光谱中并没有明显的信号峰。

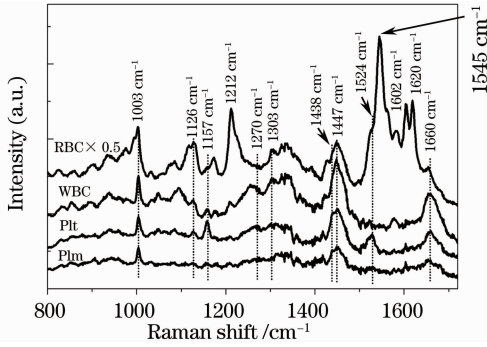


图1 单个正常人的红细胞、白细胞、血小板和血浆的平均拉曼光谱

Fig.1 Averaged Raman spectra of single RBC, WBC, Plt and Plm from healthy human donor

表1 主要拉曼信号峰可能对应的分子基团指认

Table 1 Tentative molecular cluster assignments for the peaks of Raman spectrum

Peak position / cm^{-1}	Mode	Assignment
1003	Ring breathing of phenylalanine	Phenylalanine
1212	C-(C_mH) deformation of tryptophan and phenylalanine	Protein
1126	C-N stretching	Protein
1157	chain C-C stretching	Lipids
1270	=C-C= stretching	Carotenoids
1303	C-C & C-N stretching	Protein
1438	Amide III	Protein
1450	CH_2 deformation	Lipids
1447	- CH_2 deformation	Protein/Lipids
1524	-C=C- stretching	Carotenoids
1545	N-H bending (amide II band)	Protein
1602	C=C in-plane bending mode of phenylalanine and tyrosine	Protein
1618	C=C stretching mode of tyrosine and tryptophan	Protein
1660	Amide I (C=O stretching of proteins, α -helix conformation)	Protein

3.2 类胡萝卜素在血小板中的分布

血小板是一类大小不一的血液细胞,来自巨核细胞,其细胞组成基本相同^[1]。而 1450 cm^{-1} 峰源自蛋白质、脂类物质中的 CH_2 , CH_3 振动模,其信号

强度与分子数量有关,与分子结构关系不大,考虑到细胞大小带来的拉曼信号强度差异,采用 1450 cm^{-1} 峰强度进行归一化处理,可校正细胞间的大小差异。由图 2 可看出,经 1450 cm^{-1} 峰信号强度校正后的 $1003, 1303$ 和 1660 cm^{-1} 分布集中、均匀,标准差 (SD) 基本相同 (如表 2 所列),正态分布检验 (normality test) 显示,这三个峰的信号强度在 $p=0.05$ 水平属于正态分布;而 1157 cm^{-1} 和 1524 cm^{-1} 峰的分布则差异极显著,其 SD 值是 $1003, 1303$ 和 1660 cm^{-1} 峰的 2~3 倍;正态分布检验显示,这两个峰的信号强度在置信水平 $p=0.05$ 时不属于正态分布。上述数据说明各血小板间类胡萝卜素的含量明显不同,差异很大,无论是同一个体 [如图 2(a) 所示] 或者来自不同个体 [如图 2(b) 所示] 的血小板均呈相同的现象。

表2 不同来源血小板主要拉曼峰的相对强度

Table 2 Relative intensities of Raman peaks from different sources of blood platelet

Peaks / cm^{-1}	One donor, 55 Plts	5 donors, 175 Plts
1003	0.342 ± 0.036	0.297 ± 0.050
1157	0.387 ± 0.083	0.252 ± 0.111
1303	0.412 ± 0.044	0.442 ± 0.044
1524	0.468 ± 0.127	0.263 ± 0.158
1660	0.591 ± 0.035	0.609 ± 0.050

图 3 中对比了同一个健康捐献者的不同血小板的蛋白质 (1660 cm^{-1})、脂类 (1303 cm^{-1}) 和类胡萝卜素 (1157 cm^{-1} 和 1524 cm^{-1}) 的拉曼信号强度。其中同一血小板的 1303 cm^{-1} 和 1660 cm^{-1} 峰呈现基本相同的信号强度变化趋势,统计显示两者的相关系数达到 0.826,说明血小板间的蛋白质和脂类组成基本相同。但是血小板的 1157 cm^{-1} 和 1524 cm^{-1} 峰强并没有随蛋白质或者脂类物质的变化而变化,两者与蛋白质峰的相关系数分别为 0.066 和 0.281,与脂类物质峰的相关系数分别为 0.033 和 -0.116,说明血小板的类胡萝卜素含量与血小板的脂类物质、蛋白含量没有相关性。从 10 个不同的捐献者各随机抽取 38 个血小板进行统计分析均得到相似的结果。由于常规分析的分析对象是群体细胞,得到的是群体细胞的平均信息,掩盖了上述个体细胞的信息。图 2,3 显示的结果表明,类胡萝卜素在血小板间的分布是极不均一的,而且其含量与血小板自身的脂类物质及蛋白质含量并不相关。

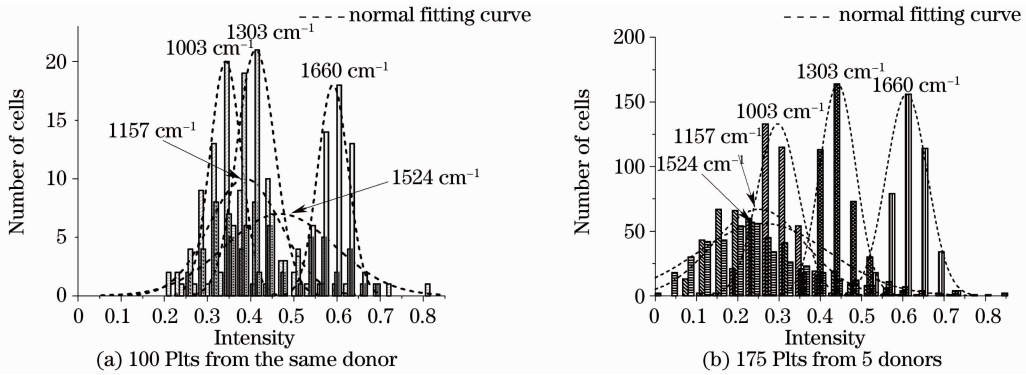


图 2 血小板 1003, 1157, 1303, 1524 和 1660 cm^{-1} 峰的相对强度的直方分布图, 虚线曲线为正态分布拟合
Fig. 2 Histogram of relative intensities of Raman bands at 1003, 1157, 1303, 1524 and 1660 cm^{-1}

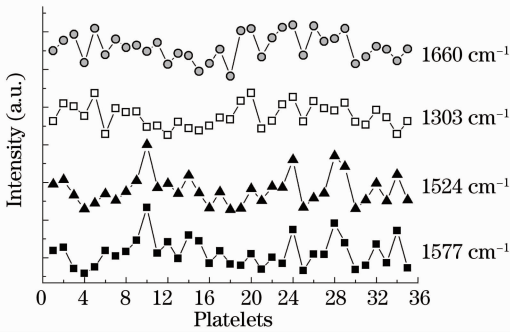


图 3 同一个体不同血小板成份的拉曼信号 1660, 1303, 1157 和 1524 cm^{-1} 强度对比

Fig. 3 Comparison of the intensities of bands 1660, 1303, 1157 and 1524 cm^{-1} from different platelets of an individual donor

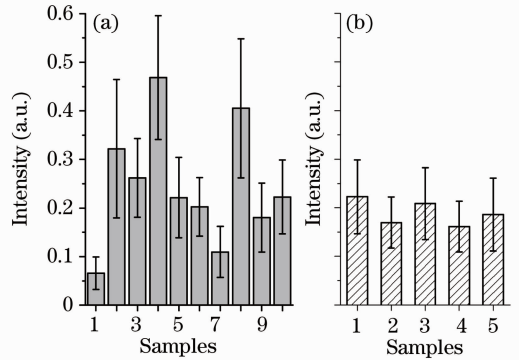


图 4 来自 (a) 10 个不同样品及 (b) 同一个体不同取样时期 1524 cm^{-1} 峰的相对强度

Fig. 4 Relative intensities of band 1524 cm^{-1} from (a) 10 individual donors and (b) one individual at different time

图 4 是不同个体血小板及同一个体不同时期 1524 cm^{-1} 峰的平均强度, 说明不同个体间血小板的平均类胡萝卜素并不相同, 而且同一个体不同采血时期的血小板, 其血小板的平均类胡萝卜素浓度也不相同。t-测验显示, 在 $p=0.05$ 的水平, 5#、6# 和 10# 之间及 6#、9# 个体之间差异不显著, 而其他个体之间则差异极显著。而同一个体不同时期, 1#, 3# 样品和 2# 之间, 4#, 5# 样品之间在 $p=0.05$ 的水平差异显著, 但达不到极显著的水平, 而 1# 和 3# 之间, 2#, 4# 和 5# 样品之间差异不显著。上述差异可能受饮食因素的影响, 也与个体吸收类胡萝卜素能力有关^[8]。图 4 的误差线(标准差)也显示, 同一个体, 类胡萝卜素在各血小板间的分布差异很大。

3.3 静止态与激活态血小板的拉曼光谱

血小板被 30 mmol/L 的 ADP 激活后, 其拉曼光谱信号明显增强, 可能是源于血小板被激活后细胞发生皱缩, 导致光谱信号上升, 蛋白质、脂类物质和类胡萝卜素等物质的信号峰的绝对强度均增加

[如图 5 所示]。但是当以 1450 cm^{-1} 进行归一化处理后发现, 激活后的血小板除蛋白质峰(1003 cm^{-1} 和 1660 cm^{-1})有少许增强外, 脂类物质和类胡萝卜素的峰几乎没有变化。说明血小板激活过程引起的变化主要是蛋白质发生改变, 而脂类物质和类胡萝卜素并没有变化。

3.4 常温保存与低温保存处理血小板的拉曼光谱

比较了常温静止保存 60 h 的血小板, 其类胡萝卜素含量没有改变, 脂类物质的拉曼信号基本没变。但常温静止保存 10 d 的血小板, 其拉曼光谱信号强度明显减弱(如图 6 所示), 其中 1303 cm^{-1} 峰的相对强度没有改变, 但是类胡萝卜素的 1524 cm^{-1} 峰显著降低。经过 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存 12 d 的血小板, 来自脂类物质的 1301, 1440 和 1651 cm^{-1} 峰的拉曼信号均显著降低, 而来自类胡萝卜素的 1157 cm^{-1} 和 1524 cm^{-1} 谱带的信号略有升高, 说明 12 d 时间的低温保存对类胡萝卜素基本没有改变, 但是脂类物质发生了严重的改变, 这些变化, 会严重影响到血小板的功能。

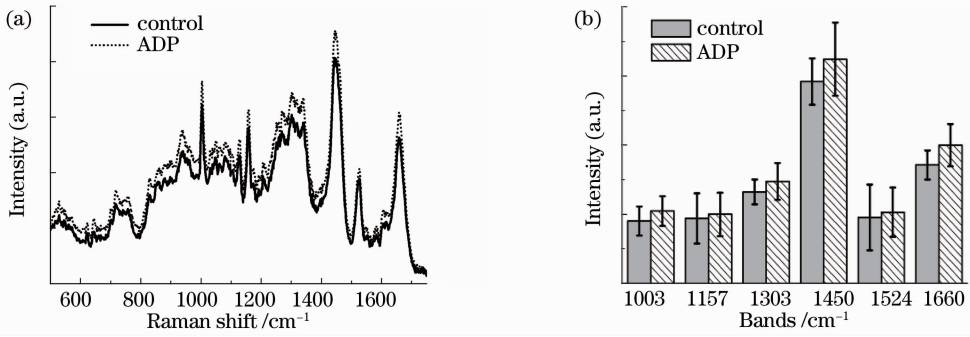


图 5 激活态与静止态血小板的(a)平均拉曼光谱及(b)主要信号峰的相对强度
 Fig. 5 (a) Averaged Raman spectra and (b) intensities of main bands at 1003, 1157, 1303, 1524 and 1660 cm^{-1} of control and active platelets treated by ADP

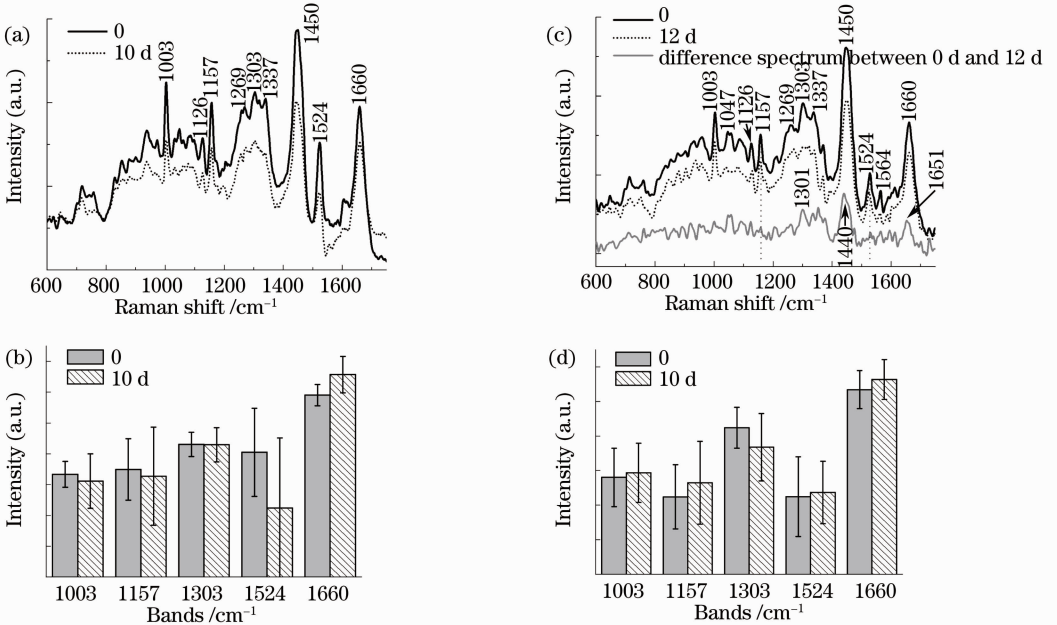


图 6 常温静止保存 10 d (a), (b) 和低温保存 12 d (c), (d) 的血小板平均拉曼光谱及其主要信号峰的相对强度
 Fig. 6 Averaged Raman spectra and relative intensities of major bands of platelets stored at room temperature for 10 d (a), (b) and or at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 12 d (c), (d)

4 讨 论

类胡萝卜素是一大类具有相似的由单双键相间的长多烯链构成的聚戊二烯骨架结构的化合物,其拉曼光谱特征峰就是来自长链 C=C 双键 (1524 cm^{-1}) 和 C-C 单键 (1157 cm^{-1}) 的伸缩振动。已有大量的应用拉曼光谱检测类胡萝卜素的文献报道^[14,16~18]。对人与几种实验动物的血小板进行拉曼光谱分析发现,人类血小板存在显著的类胡萝卜素 1157 cm^{-1} 和 1524 cm^{-1} 信号峰^[11],但几种实验动物的血小板没有,原因可能是有些物种不能完整地吸收类胡萝卜素^[13]。

很早就有学者发现,类胡萝卜素在人类血小板中广泛存在^[19],但对血液和组织中类胡萝卜素的分

析,通常需要经过萃取、分离、鉴定和量化等主要步骤,而类胡萝卜素是光敏化合物,整个分析过程需要在避光、少氧和低温条件下进行,以尽量减少其降解^[13],分析过程复杂、烦琐、耗时、耗试剂。拉曼光谱是生命科学研究领域很有应用潜力的工具,无需对样品做特殊处理,样品需要量少,快速灵敏。已有学者应用拉曼光谱技术分析和研究人类的血小板^[14,15],采用的方法是将人的血小板固定,或者是提取血小板膜来收集拉曼光谱,也发现在血小板中广泛存在类胡萝卜素,但是这种研究方法需要收集很多血小板细胞,得到的是大量血小板的信息,也就是仅能获知在血小板中有类胡萝卜素存在,但无法知道是否每个血小板都有类胡萝卜素,含量是否都

一样;而且上述方法得到的是经过处理、没有生理活性的血小板的类胡萝卜素信息,这种处理可能会对类胡萝卜素的分析产生不可预知的影响。实验应用拉曼光镊分析单个血小板的拉曼光谱,得到的是具有生理活性的单个血小板的类胡萝卜素信息,结果表明,类胡萝卜素在血小板间的含量是极不均匀的,差异显著。类胡萝卜素属脂溶性物质,在血液中输送主要依靠血液中的脂蛋白,在血小板中分布在血小板膜上,与脂类物质或者脂蛋白结合;然而实验结果显示,血小板的类胡萝卜素含量高低与血小板脂类物质、蛋白质含量没有直接关系。此外,本文所采用的技术方法,仅需简单的血小板分离过程,甚至不需要分离,直接稀释少量血液上清液即可,避免了复杂样品准备过程可能带来的未知影响;检测过程无损、快速,在生物样品的微量、无损、快速检测与分析领域有很大的应用潜力。

临床上,血小板保存是个难题。常规的 22 ℃ 保存方法保存期仅为 5 d,低温 4 ℃ 贮存,恢复率和存活率均低于 22 ℃ 贮存。血小板保存损伤表现在微管消失、三磷酸腺苷(ATP)丧失以及血小板收缩蛋白损耗等,或者与脂质的丧失和功能下降有关^[20]。如图 6 所示,常温保存,会带来的是类胡萝卜素的部分分解,脂类物质没有改变,而低温保存的后果是血小板由正常的圆盘状变为球状形态,部分细胞激活,血小板脂类物质的丧失,在拉曼光谱上的反映就是 1303,1440 和 1651 cm^{-1} 峰信号的显著降低。

5 结 论

血小板是无细胞核的血液细胞,应用 785 nm 波长激光对单个活的血小板进行俘获和显微拉曼光谱分析,得到了常规群体分析方法无法获知的单个血小板的光谱信息:1)在人的血液成分中,血小板的类胡萝卜素拉曼信号最强,而不同的人类个体,或者同一个体的不同时期,其血小板类胡萝卜素含量不同;2)类胡萝卜素在血小板细胞中的分布极不均一,细胞间差异显著,其含量高低与细胞脂类物质、蛋白含量没有相关性;3)经过 ADP 诱导激活的血小板,蛋白质峰有少许增强外,脂类物质和类胡萝卜素的峰几乎没有变化;4)常温静止保存 10 d 的血小板,其 1303 cm^{-1} 峰的相对强度没有改变,类胡萝卜素显著降低,而经过 4 ℃ 保存 12 d 的血小板,类胡萝卜素拉曼信号基本没有改变,而脂类物质的拉曼信号明显减弱。

致谢 感谢广西师范大学陈秀丽同学参与部分实验数据的收集。

参 考 文 献

- Ruan Changeng. Platelet: Basic and Clinic [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1987
阮长耿. 血小板—基础与临床 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1987
- P. A. Everts, J. T. Knappe, G. Weibrich *et al.*. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review [J]. *The Journal of Extra-Corporeal Technology*, 2006, **38**(2): 174~187
- R. Petry, M. Schmitt, J. Popp. Raman spectroscopy—a prospective tool in the life sciences [J]. *Chemphyschem*, 2003, **4**(1): 14~30
- C. 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
- C. Xie, C. Goodman, M. Dinno *et al.*. Real-time Raman spectroscopy of optically trapped living cells and organelles [J]. *Opt. Express*, 2004, **12**(25): 6208~6214
- L. X. Peng, G. W. Wang, W. Liao *et al.*. Intracellular ethanol accumulation of yeast cells during aerobic fermentation: a Raman spectroscopic exploration [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, **51**(6): 632~638
- Chen Xiuli, Wang Guiwen, Yin Xiaolin *et al.*. Single-cell Raman spectral analysis of oxygenated and deoxygenated thalassemia erythrocytes [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(10): 2854~2859
陈秀丽, 王桂文, 尹晓林等. 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 [J]. *光学学报*, 2009, **29**(10): 2854~2859
- Wang Guiwen, Peng Lixin, Chen Ping *et al.*. Single-cell Raman spectroscopy of erythrocytes from hemoglobin Bart's hydrops [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2651~2656
王桂文, 彭立新, 陈萍等. 重型 α 地中海贫血红细胞的拉曼光谱 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2651~2656
- Z. H. Tao, G. W. Wang, X. D. Xu *et al.*. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in rhodotorula glutinis cells using laser tweezers Raman spectroscopy [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, **314**(1): 42~48
- Zhang Yong, Ye Anpei, Wen Cheng. A micro-Raman spectroscopy combing 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
- Wang Guiwen, Yao Huilu, He Bijuan *et al.*. Raman micro-spectroscopy of single blood platelets [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(7): 1347~1350
王桂文, 姚辉璐, 何碧娟等. 单个血小板的拉曼光谱分析 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(7): 1347~1350
- Li Changling, Bi Shenxu, Jiashi Zhu *et al.*. New functions and clinic assessment of carotenoids [J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2006, **18**(6): 285~288
李长龄, 毕森序, Jiashi Zhu 等. 类胡萝卜素的新功能与临床评估 [J]. *上海预防医学*, 2006, **18**(6): 285~288
- Jiang Jianguo, Wang fei, Chen Qian. The Functions and Biotechnology on Carotenoids [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008
姜建国, 王飞, 陈倩. 类胡萝卜素功效与生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008
- D. Aslanian, H. Vainer, J. Guesdon *et al.*. Resonance Raman spectrometric study of human blood platelets [J]. *FEBS Lett.*, 1979, **101**(1): 39~42
- D. Aslanian, H. Vainer, J. P. Guesdon. Thermotropic state

- transition in isolated platelet membranes studied by Raman spectroscopy[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1983, **131**(3): 555~558
- 16 C. P. Marshall, S. Leuko, C. M. Coyle *et al.*. Carotenoid analysis of Halophilic archaea by resonance Raman spectroscopy [J]. *Astrobiology*, 2007, **7**(4): 631~643
- 17 M. E. Darvin, I. Gersonde, M. Meinke *et al.*. Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method [J]. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2005, **38** (15): 2696~2700
- 18 E. H. Papaioannou, M. L.-Kyriakides, D. Christofilos *et al.*. Raman spectroscopy for intracellular monitoring of carotenoid in *Blakeslea trispora*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, **159**(2): 478~487
- 19 M. Stefanini, N. Krinsky, S. I. Magalini. Studies on platelets XIX: Carotenoid pigments in human platelet[J]. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1957, **50**(2): 225~228
- 20 M. Shrivastava. The platelet storage lesion [J]. *Transfus. Apher. Sci.*, 2009, **41**(2): 105~113