

# 激光诱导荧光光谱法研究血细胞衰变规律\*

李荣青<sup>1</sup> 刘莹<sup>1</sup> 葛立新<sup>1</sup> 高淑梅<sup>1,2</sup>

(1 徐州师范大学物理系, 江苏 徐州 221116)

(2 江南大学理学院, 江苏无锡 214036)

**摘要** 用激光诱导荧光光谱法研究了全血溶液在不同衰变时间的荧光光谱变化规律. 经小白鼠眼眶取血后配成不同浓度的全血溶液, 每隔三小时检测一次其荧光光谱, 得到了全血溶液在整个衰变过程中不同时间段的荧光光谱. 研究表明: 存放在室温空气中的血液会随存放时间的延长, 其 628nm 处的荧光峰产生红移, 同时荧光峰强度也随之减弱. 提出血液荧光光谱峰值红移是由于血细胞在老化过程中红细胞膜不同程度受损引起的. 红细胞受损导致溶血, 其中的血红蛋白大分子之间将发生共振能量转移, 引起自吸收, 从而使荧光光谱强度降低. 其研究结果将会对研究血液细胞的衰变机理, 理解机体细胞的衰变具有一定的参考意义.

**关键词** 荧光光谱; 血细胞; 衰变时间; 激光

**中图分类号** Q631 **文献标识码** A

## 0 引言

细胞老化是机体衰老的基础, 研究哺乳动物细胞老化对研究机体衰老有一定意义<sup>[1]</sup>. 血液的细胞衰变规律类似于细胞老化过程<sup>[2]</sup>, 研究血液细胞的老化, 对于阐明细胞生命进程的机制以及相关疾病的诊断与治疗, 提高输血效率, 延长血液保存期等都具有十分重要的意义. 通常研究血液的衰变规律都是从化学或生物学角度进行的<sup>[3]</sup>. 荧光光谱技术在了解生物分子结构和诊断生物组织病变方面以其特有的灵敏和准确, 越来越受到重视<sup>[4,5]</sup>. 如根据正常与病变组织的荧光光谱, 可以找出它们结构特性差异从而进行诊断等等<sup>[6-8]</sup>. 本文拟从物理的角度, 利用激光诱导血细胞荧光光谱法研究血细胞的衰变规律.

## 1 材料和方法

实验所用光谱仪是英国 Edinburgh Instruments Inc 生产的 FLS920 型 Combined Fluorescence Lifetime & Steady State Spectrometer. 装置如图 1. 用功率为 5 mW、波长为 407 nm 的半导体激光器作为激发光源, 整个光路为 L 型, 减少了激发光对荧光的直接干扰.

为保证血液的质量和新鲜程度及实验结果的可比性, 实验所用的血液样品均来自同一只实验用健康小白鼠. 经眼眶采血, 加 5% 的肝素抗凝, 获得全血溶液. 进一步用生理盐水分别将其配制成 1.2 mL 的浓度为 15%、12%、10%、8%、5%、3% 的全血溶

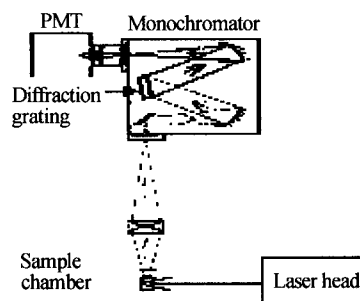


图 1 FLS920 型稳态荧光光谱仪结构  
Fig. 1 Schematic of the FLS920 steady-state spectrometer configuration

液. 放置在温度为 22~24℃ 的室内. 对上述浓度的全血溶液, 每 3 h 进行一次检测. 每次测量均重新开机(包括光谱仪和激光器), 经 30 min 仪器稳定后再进行, 连续重复 3 次测量, 完成后关闭仪器, 且每次实验仪器各参量设置均不变, 以保证所测数据具有可比性.

## 2 实验结果

407 nm 的激光激发的各浓度的全血溶液荧光光谱是在采血后一小时进行扫描的, 以后每隔三个小时测量一次, 期间荧光光谱变化较剧烈的地方每隔两个小时扫描一次. 图 2 是浓度为 15% 的全血溶液在不同的衰变时间所测到的荧光光谱图. 由图 2 可以看出, 随着离体血液放置时间的增加, 628 nm 附近的荧光峰( $\lambda$ )位置发生了变化, 从开始的  $\lambda$  等于 628 nm 到 25 h 后红移至  $\lambda$  等于 638 nm, 荧光强度随衰变时间的延长而降低. 为了更清楚地展示激光诱导的血液荧光光谱随血细胞衰变时间的变化规律, 图 3 给出了其三维变化图. 很明显, 浓度为 15% 的血细胞离体后的衰变过程大致可分为三个阶

\* 河南大学自然科学基金(2004LYY003)和徐州师范大学自然科学基金(XY200357)资助项目

Email: rongqing@xznu.edu.cn

收稿日期: 2005-09-03

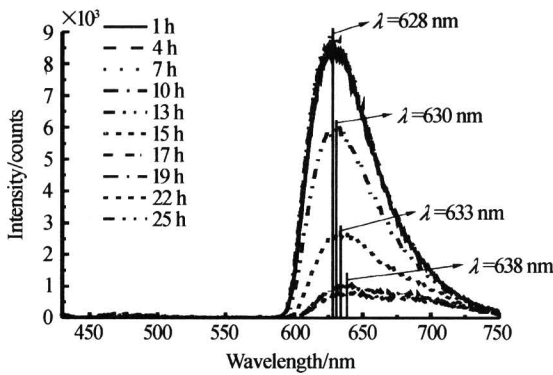


图 2 不同衰变时间 407 nm 激光激发的 15% 的全血溶液荧光光谱

Fig. 2 407 nm laser excited 15% whole blood fluorescence spectra at different disintegration time

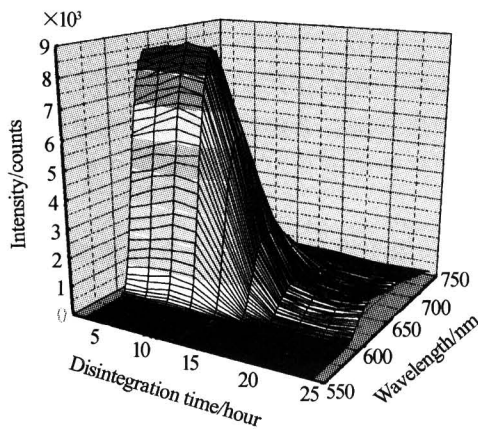


图 3 407 nm 激光激发的 15% 的全血溶液荧光光谱随时间变化的三维图

Fig. 3 407 nm laser excited 15% whole blood fluorescence spectra change with the disintegration time

段: 第一阶段, 从 1 h 到第 10 h, 在此时间段内荧光峰的位置均在 628 nm 处, 荧光峰的强度也几乎相同. 第二阶段, 从第 10 h 到第 17 h, 在此阶段荧光峰急剧变化, 荧光强度急剧减弱, 其强度  $I$  从  $8.6 \times 10^3$  变化到  $1.05 \times 10^3$ . 荧光峰位置( $\lambda$ )从 628 nm 红移到了 638 nm. 第三阶段, 第 16 h 到 25 h, 荧光峰变化缓慢, 强度几乎不再变化.

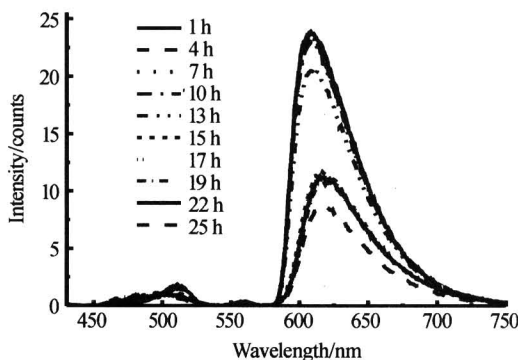


图 4 在不同衰时间 407 nm 激光激发的浓度为 3% 的全血溶液荧光光谱

Fig. 4 407 nm laser excited 3% blood fluorescence spectra at different disintegration time

另外, 407 nm 的激光激发血液溶液时, 对高浓度的全血溶液, 如 15%、12%、10%, 其荧光光谱中产生的主要是 628 nm 左右处的荧光峰. 对低浓度的溶液, 如 3%、5%、8%, 除了在 628 nm 处比较明显的荧光峰外, 在 510 nm 和 560 nm 处还有两个强度较弱的谱峰, 且随着衰变时间的增加, 其并未发生明显红移, 只是荧光强度略微降低, 图 4 给出的是在不同衰变时间, 用 407 nm 的激光激发的浓度为 3% 的全血溶液的荧光光谱.

### 3 分析与讨论

为了便于讨论, 将 15% 的全血溶液荧光光谱在 628 nm 附近的荧光峰波长( $\lambda$ )和相对光强或光子数( $I$ )与衰变时间( $t$ )的关系, 用 Origin 软件分别给出其函数变化关系式(1)和(2), 及函数变化曲线, 见图 5 和 6.

$$\lambda = \frac{627 - 639}{1 + e^{(t-14.2) * 1.34}} + 639 = \frac{-11}{1 + e^{(t-14.2) * 1.34}} + 639 \quad (1)$$

$$I = \frac{8708 - 839}{1 + e^{(t-12) * 0.98}} + 839 = \frac{7869}{1 + e^{(t-12) * 0.98}} + 839 \quad (2)$$

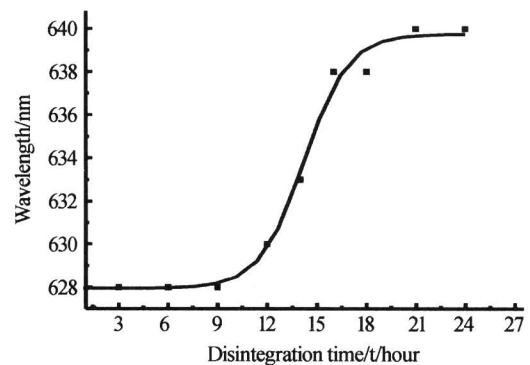


图 5 15% 的全血溶液荧光峰波长随衰变时间的变化关系

Fig. 5 Whole blood of 628 nm wavelength changes under the concentration of 15% at different time

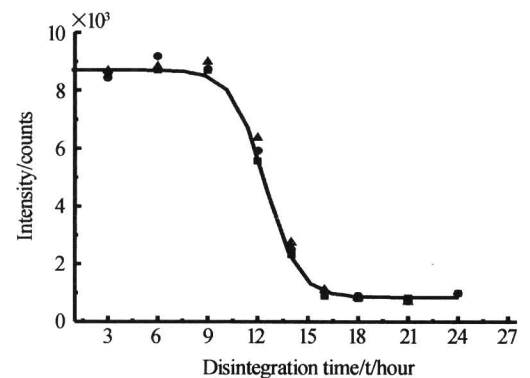


图 6 15% 的全血溶液荧光峰强度随衰变时间的变化关系

Fig. 6 15% whole blood fluorescence peak intensity changes with different disintegration time

实验和理论分析表明, 其他浓度的全血溶液

628 nm 附近的荧光峰随衰变时间的变化也有相似规律,经分析总结,给出下面的通用表达式

$$\lambda = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(t-t_0)d_i}} + A_2 \quad (3)$$

$$I = \frac{B_1 - B_2}{1 + e^{(t-t_0)d_i}} + B_2 \quad (4)$$

不同浓度的荧光光谱在随时间的衰变过程中的参量变化值见表 1 和 2.

表 1 全血溶液荧光峰波长  $\lambda$  与  $t$  的变化函数中参量值

浓度	$A_1$	$A_2$	$A_1 - A_2$	$t_0$	$d_i$
15%	627	639	-12	14.2	1.34
12%	624	635	-11	12.4	0.72
10%	622	633	-11	13.1	0.67
8%	619	630	-11	12.1	0.73
5%	613	624	-11	11.3	1.02
3%	609	619	-10	13.2	0.56

表 2 全血溶液荧光峰强度  $I$  与  $t$  的变化函数中各参量值

浓度	$B_1$	$B_2$	$B_1 - B_2$	$t_0$	$d_i$
15%	8708	839	7869	12.4	0.99
12%	11231	1743	9488	11.3	0.73
10%	14250	2389	11861	12.4	0.70
8%	17026	3671	13355	11.6	0.78
5%	23464	6799	16665	10.6	0.73
3%	23283	10617	12666	12.6	0.57

若将表 1 和 2 的参量值代入式(3)和式(4)中,可以看出: $A_1$ 、 $A_2$  的值和  $A_1 - A_2$  的绝对值均随着浓度的降低而减少,而  $B_1$ 、 $B_2$  和  $B_1 - B_2$  的值均随着浓度的降低而增加,浓度为 3% 时  $B_1 - B_2$  值有个突变.

参量  $t_0$  代表图形开始剧烈变化的地方,即转折点,认为即是血液开始变质的时间,与血液样品所处的环境温度成反比,由表 1 和表 2 可知, $t_0$  值和浓度几乎没有关系,也即血液的浓度对血液的保存期影响较小. $d_i$  表示谱峰变化程度,由表 2 可见  $d_i$  随浓度减小变化趋势也趋于缓和.

另外,全血溶液在空气中随着时间的推移其荧光峰产生红移,浓度为 15%、12%、10%、8%、5%、3% 的全血溶液其荧光峰波长分别红移 12、11、11、11、11、10 nm,浓度越低光谱变化越小.

## 4 讨论

血液中 40% 是红细胞,血液的荧光光谱又主要是血液中红细胞的贡献<sup>[9]</sup>,而对红细胞产生的荧光光谱作主要贡献的是其细胞膜<sup>[10]</sup>. 因此,血细胞在老化过程中荧光光谱的变化主要是血液中红细胞老化引起的. 因为红细胞在老化过程中红细胞膜磷脂丢失,使膜表面积减少,表面积和体积之比发生改变,最终导致细胞老化死亡. 在此过程中,由于红

细胞膜不同程度的受损而影响了细胞膜在 628 nm 附近的荧光发射,从而引起了血液在此位置的荧光峰随衰变时间的红移,如图 5. 血液在放置过程中,血液内各种抗损伤物质不断消耗而又没有后援补充,使得该系统功能不断削弱,而细胞的裂解产物及各种代谢产物的堆积又可以诱发更为强烈的损伤反应(即衰变过程的第二阶段),如过氧化反应、加速细胞老化进程、启动凋亡程序等,引起一系列结构和功能的改变. 在这些变化中,首先受损的是生物膜<sup>[11]</sup>;红细胞受损即发生溶血,其中的血红蛋白大分子之间将发生共振能量转移,引起自吸收,从而使荧光光谱强度降低,如图 6. 血细胞完全衰变后,荧光光谱趋于稳定,荧光峰强度  $I$  和荧光峰位置  $\lambda$  变化也就基本不变. 比较图 5 和 6 还可以看出,荧光峰强度衰减和荧光峰位置红移几乎是在同时进行的,这也进一步说明血细胞在老化过程中荧光光谱的变化主要是血液中红细胞老化引起的,老化开始也就溶血发生.

另外,图 4 中低浓度的全血溶液在 510 nm 和 558 nm 处的谱峰并不随时间而变化. 分析认为这里主要是由于血液吸收光谱的作用<sup>[12]</sup>,在 540 nm 和 576 nm 处有两个主要的吸收峰,558 nm 处的谱峰主要是由于其两边的光谱被吸收而形成的.

实际上,血液的成份很复杂,影响其荧光光谱变化的因素还有很多,如血液中其他细胞或分子在血细胞衰变过程中所起到的直接或间接的催化或抑制作用、空气或溶剂中杂质的影响等,所以要进行更为细致、深入的研究,还需要进一步提高实验环境、对血液成份的细致分离等.

## 4 结论

本文从荧光光谱方面展示了血液的衰变过程,对研究血液细胞的衰变机理,理解机体的衰变具有一定的参考意义. 其研究结果可为新鲜健康血液和发生衰变或病理突变的血液的对比鉴别提供一定的参考.

### 参考文献

- 崔旭,李文彬,张炳烈,等. 自由基损伤与 D-半乳糖所致细胞老化关系. 基础医学与临床,2000,20(1): 24~26  
Cui X, Li W B, Zhang B L, et al. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 2000, 20(1): 24~26
- 杜静平,邢天荣,马奎力,等. 不同温度及时间对保存血液有效期和质量的影响. 中国应用生理学杂志, 2002, 18(4): 362~364  
Du J P, Xing T R, Ma K L, et al. *Chin J Physiol*, 2002, 18(14): 362~364
- 刘胜洪,杨木兰,张春明,等. 人红细胞老化过程中花

- 生凝集素和 Con A 受体电镜细胞化学研究. 解剖学报, 2000, **31**(3): 268~271
- Liu S H, Yang M L, Zhang, C M, *et al.* *Acta Anatomica Sinica*, 2000, **31**(3): 268~271
- 4 Gao S M, Liu Y, Lu J, *et al.* Analysis of 407 nm light-induced erythrocyte fluorescence spectra red shifted mechanism with the concentration increase. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(3): 261~263
- 5 王成龙, 钱隆, 范多旺, 等. 叶绿体不同浓度下光诱导延迟荧光光谱研究. 光子学报, 2005, **34**(7): 1028~1031
- Wang C L, Qian L, Fan D W, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 2005, **34**(7): 1028~1031
- 6 Giraev K M, Ashurbekov N A, Medzhidov R T. Stationary spectroscopy of biotissues in vivo; fluorescent studies of some pathological states. *Opt Spectrosc*, 2003, **95**(5): 819~824
- 7 Christov A, Ottman T, Grammas P. Pathological changes in Alzheimer's brain evaluated with fluorescence emission analysis (FEA). *Progr Biomed Opt Imaging*, 2004, **5**(15): 17~24
- 8 谷怀民, 邢达. 激光诱导荧光光谱识别动脉粥样硬化斑快的研究. 光子学报, 2003, **32**(6): 649~652
- Gu H M, Xing D. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(6): 649~652
- 9 Gao S M, Luo X S, Lan X F, *et al.* Analyzing of LED-induced blood fluorescent spectra. *Chinese Journal of Lasers*, 2002, **B11**(4): 315~318
- 10 高淑梅, 骆晓森, 沈建, 等. 407nm 辐照激发血细胞荧光光谱分析. 激光技术, 2002, **26**(6): 435~438
- Gao S M, Luo X S, Shen J, *et al.* *Laser Technology*, 2002, **26**(6): 435~438
- 11 刘晓华, 刘成玉, 谭齐贤. 红细胞老化与脂质过氧化的关系. 青岛大学医学院学报, 2004, **40**(1): 90~92
- Liu X H, Liu C Y, Tan Q X. *Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis*, 2004, **40**(1): 90~92
- 12 彭长德, 高淑梅, 刘莹, 等. LED 诱导人血液荧光光谱研究. 应用激光, 2003, **23**(4): 232~234
- Peng C D, Gao S M, Liu Y, *et al.* *Applied Laser*, 2003, **23**(4): 232~234

## Study on Blood Cells Disintegration by Laser Included Fluorescence Spectrometry

Li Rongqing<sup>1</sup>, Liu Ying<sup>1</sup>, Ge Lixin<sup>1</sup>, Gao Shumei<sup>1,2</sup>

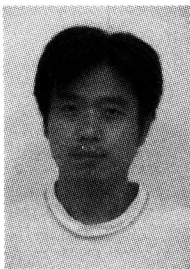
<sup>1</sup> Department of Physics, Xuzhou Normal University, Jiangsu Xuzhou 221116

<sup>2</sup> School of Science, Southern Yangtze University, Jiangsu Wuxi 214036

Received date: 2005-09-03

**Abstract** The fluorescence spectra of whole blood in different disintegration time are measured under the laser excitation. Blood from health small white mice is diluted to different concentration. They are scanned every three hours. The fluorescence spectra of different times are presented. The variety of fluorescence spectra reflect the changes of blood in structure. It is found that the primary emission peaks near 628nm is significantly red shifted with the time increase and the intensity is weakened in the fluorescence spectra. Based on the experimental results and theoretical analysis, it is concluded the peak red-shifted is mainly due to the theca disintegration of erythrocyte. During the erythrocyte disintegrating, the theca is destroyed in different degree and results in hemolysis. The study may make sense for understand the whole blood disintegrative mechanism.

**Keywords** Fluorescence spectra; Blood cell; Disintegration time; Laser



**Li Rongqing** was born in 1980. He is now a graduate student in Department of Physics, Xuzhou Normal University. His research is concerned with application of lasers in medicine, particularly for the investigation of the mechanisms of light-tissue interaction.