

文章编号:1004-4213(2010)04-0675-5

# 激光照射血细胞的衰变规律和损伤机制研究\*

张枫,刘莹<sup>†</sup>,杨成方,李雷

(徐州师范大学 物理与电子工程学院,江苏 徐州 221116)

**摘要:**采用 FLS900 型稳态荧光光谱仪对红色激光持续照射的正常离体血液和酒精中毒离体血液进行了荧光检测,得到了血液物质成分变化及荧光光谱特征随时间衰变的规律. 研究表明:随着血液离体时间的延长,当 407 nm 的紫光激励时,在 605 nm 处的荧光峰峰位保持不变只是强度缓慢减弱,但两者均在离体后的 14 h 和 10 h 出现了谱形突变,并在 474 nm 处产生了一个强荧光峰. 比较分析发现激光对正常离体血液的衰变有明显的延缓作用,对酒精作用破坏的红细胞也有部分修复功能,但当激光持续照射一定时间后却导致了细胞的形态改变进而加速了细胞的溶血进程,产生了大量的内源性荧光物质还原烟碱腺嘌呤二核苷酸. 本文的研究结果能为血细胞活性衰变规律以及功能结构研究提供有意义的参考.

**关键词:**荧光光谱;低强度激光;血细胞;酒精中毒血液;损伤机制

**中图分类号:**O433

**文献标识码:**A

**doi:**10.3788/gzxb20103904.0675

## 0 引言

过量饮酒可引发脂肪、蛋白质、糖的代谢紊乱,心血管疾病、胃、十二指肠、糖尿病及酒精肝等多种疾病,同时也对血液系统和中枢神经系统有着不同程度的损伤. 酒精摄入人体后,90%以上在肝脏代谢、分解. 一旦酒精含量超出肝脏的解毒能力,它可直接吸收进入血液,导致血液中红细胞的变形能力下降、平均体积增大、白细胞减少、血小板数及功能的异常等<sup>[1]</sup>,从而加速细胞的衰变,造成生物体组织的宏观病变.

在近年来低强度激光照射病变组织或血液的研究受到了众多学者的广泛关注,有关低强度激光照射引起血液及红细胞性质改变的实验研究也越来越多<sup>[2-4]</sup>. 早在 20 多年前医疗机构就采用低强度激光血管内照射来治疗心脑血管疾病,虽然照射后能有效改善微循环灌注以及组织、器官的供血,加速血液的流动性. 但有关此类的研究几乎都以临床现象和疗效为主,虽然也已开展了不少基础实验研究,但其作用机制至今尚无定论. 研究激光照射正常离体血液和酒精中毒离体血液的衰变规律对于阐明细胞生命进程、探讨低强度激光的生物效应、以及低强度激光的临床应用等都具有十分重要的意义. 通常研究细胞的衰变都是从生物学角度进行的,而近年来采

用荧光光谱技术对于血液荧光光谱的研究也有不少<sup>[5-9]</sup>,荧光光谱技术由于其诊断方法具有快速客观、灵敏准确且简单实用等特点,因而受到了广泛的关注和应用<sup>[10-12]</sup>.

本文采用荧光光谱技术对激光照射的正常离体血液和酒精中毒离体血液的衰变规律进行了比较研究,对低强度激光和酒精对红细胞活性衰变的影响进行了探讨,得到了激光对血细胞的作用机制,特别是对病变红细胞的修复效应,研究结果能对病变红细胞的特性和激光的生物学效应研究提供帮助.

## 1 材料和方法

实验所用仪器为英国 Edinburgh Instruments Inc 生产的 FLS900 型稳态荧光光谱仪. 激光光源是功率为 5 mW,波长为 407 nm 的半导体激光器. 对离体血液进行持续照射的是功率为 5 mW,波长为 632.8 nm 的低强度 He-Ne 激光器.

实验所用动物为两只体态相似的雄性小白鼠,其中一只被灌入浓度为 53% 的白酒并致其昏迷. 0.5 h 后同时将两只小白鼠经眼眶采血,加入 5% 的肝素抗凝,获得全血溶液. 为保证实验结果的有效性和可比性,进一步用生理盐水将二者配制成 1.5 mL 浓度均为 1% 的全血溶液. 放置在温度为 20~22 °C 的室内,分别用两个型号功率完全相同,波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光器进行持续照射,每 2~3 h 进行一次光谱扫描检测.

\* 江苏省高校自然科学基金(07KJD14028)资助

<sup>†</sup> Tel: 025-84315075

Email: liuying70@126.com

收稿日期: 2009-09-29

修回日期: 2009-11-10

## 2 实验结果与分析

### 2.1 激光照射正常离体血液的荧光光谱研究

图1为正常离体血液经激光持续照射4 h、8 h、12 h、14 h、15 h以及16 h内的荧光光谱图,并与新鲜的离体血液进行对比(0 h).从图中可以看出0~12 h 每条谱线均有四个谱峰,其峰值分别位于456 nm、515 nm、556 nm和605 nm处.随着激光在0~12 h内的持续照射,其谱峰位置几乎不变,只是强度随着时间的变化逐渐缓慢减弱.从14~16 h光谱中可以看出血液离体14 h后的荧光光谱图出现突变,605 nm处谱峰强度缓慢减弱,在456 nm和515 nm处的谱峰逐渐消失.激光照射16 h后,456 nm和515 nm处的谱峰完全消失,取而代之的是一个高强度的宽展谱峰,峰值位于474 nm处.图1中从450~540 nm有个宽展的谱,不能从图中准确得出发射峰的位置和数量,不便于对其进行分析讨论.而导数荧光分析中二阶导数谱的极小值位置对应原谱线的极大值位置,即峰位,可以精确得到荧光的发射中心波长.因此为了精确寻找宽展谱的荧光峰位,特对稳态荧光光谱做了二阶导数,但由于0~12 h的二阶导数谱形几乎完全吻合,所以下面只对谱形变化大的时间段即离体后14 h以上光谱进行二阶导数光谱分析,并与新鲜离体血液做对比.

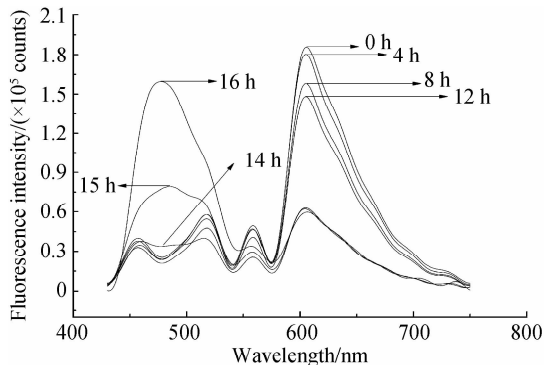


图1 激光照射0~16 h,1%正常离体血液的荧光光谱  
Fig. 1 The fluorescence spectrum of 1% normal blood 0~16 hours

图2为激光照射0~16 h,1%正常离体血液二阶导数光谱图.从图中可以看出四条谱线均有4个明显的极小值,且其中有三个极小值的位置几乎是不变的,即519 nm、558 nm和600 nm处.这与图1中515 nm、556 nm和605 nm处的稳态荧光光谱峰位置符合很好.通过查阅文献认为在558 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>[13]</sup>.而519 nm和600 nm处谱峰分别主要由血液中的黄素腺嘌呤二核苷酸和内生性卟啉所发射<sup>[14]</sup>.此外,第一处极小值的光谱位置在激光照射

后发生了红移,分别有6 nm、7 nm和8 nm的红移,最后红移至462 nm处.分析认为474 nm处的高强度谱峰应主要由462 nm、519 nm谱峰共同形成,而462 nm的谱峰强度迅速增大掩盖了519 nm的谱峰,形成了一个强的新谱峰.经查阅文献认为462 nm附近的谱峰主要由血液中的还原烟碱嘌呤二核苷酸(磷酸盐)发射所致<sup>[14]</sup>.

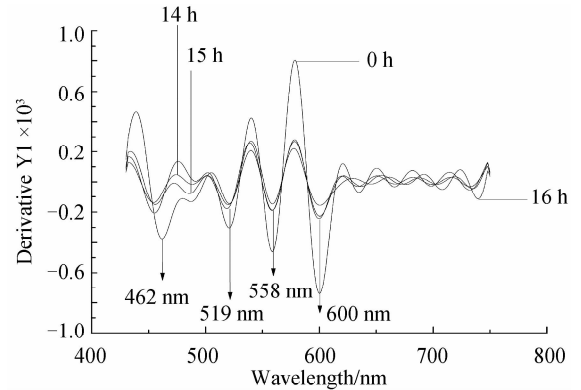


图2 激光照射0~16 h,1%正常离体血液二阶导数光谱  
Fig. 2 The second-order derivative spectrum of 1% normal blood irradiating 0~16 hours

正常离体血液在激光的持续照射下,从0~12 h在605 nm处的荧光峰峰位不变,强度随着时间的变化呈现出减弱缓慢的趋势,在14 h后产生了谱形突变.由于605 nm处的荧光峰由卟啉发射出,而卟啉存在于血液中的血红素中.据此可以认为激光照射对血红素的能级跃迁几乎没有影响,只是随着时间的延长,血细胞缓慢分解,血红素含量逐渐变少.而不经激光照射的正常离体血液从0~7 h在605 nm处的荧光峰强度缓慢减弱,从7~19 h荧光峰强度开始急剧降低<sup>[15]</sup>.所以激光照射后的正常离体血液突变时间比未经激光照射的正常离体血液的突变时间要晚大约7 h,即激光的照射延缓了红细胞的衰变.这是因为血红蛋白与膜的连接是一种弱耦合相互作用<sup>[16]</sup>,由于632.8 nm的激光照射使红细胞膜上的血红蛋白的振动能增加,进而使其脱离与膜的链接成为细胞中的自由血红蛋白,从而改善了红细胞的变形能力,使红细胞活性增强,延缓了血液的衰变.但在14 h后出现谱形突变并最终在474 nm处产生一强荧光峰,这是正常离体血液衰变所不存在的现象.分析认为在激光照射14 h后导致了细胞的形态改变进而加速了细胞的溶血,产生了内生性荧光物质还原烟碱腺嘌呤二核苷酸.

### 2.2 激光照射酒精中毒离体血液的荧光光谱研究

图3(a)为酒精中毒离体血液经激光持续照射2 h、6 h、以及8 h内的荧光光谱图,并与新鲜的酒精中毒离体血液进行对比(0 h).从图中可以看出每条谱线也是均有四个谱峰,其峰值分别位于456 nm、

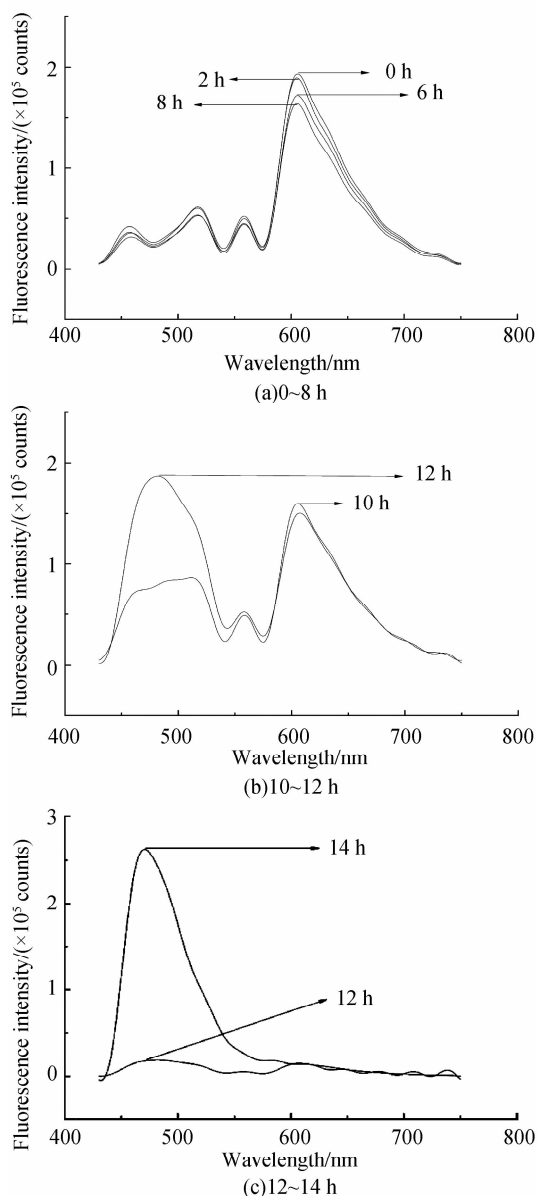


图3 激光照射0~8 h,10~12 h和12~14 h  
1%酒精中毒血液的荧光光谱  
Fig. 3 The fluorescence spectrum of 1% alcoholism  
blood irradiating 0~8 h,10~12 h and 12~14 h

515 nm,556 nm 和 605 nm 处.随着激光在0~8 h 内的持续照射,其谱峰位置几乎不变,只是强度随着时间的变化逐渐缓慢减弱.

图3(b)为激光持续照射酒精中毒血液10 h与12 h的荧光光谱图.从图中可以看出血液离体10 h后的荧光光谱图出现突变,605 nm处的谱峰强度缓慢减弱,456 nm和515 nm处的谱峰却逐渐消失.

图3(c)为激光持续照射酒精中毒血液12 h与14 h的荧光光谱图.由于14小时的谱峰强度太大掩盖了其他时间段的谱峰,所以没将其与其他时间段谱峰合并在一起.从图中可以看出在14 h,456 nm和515 nm处的谱峰已完全消失,取而代之的是一个极强的谱峰,峰值位于474 nm处,由于峰值太大已经掩盖了605 nm处的主荧光峰.为了研

究激光照射前后的荧光发射机制,对其也进行了二阶导数光谱分析.

图4为激光持续照射酒精中毒离体血液0~14 h二阶导数光谱图.从图中可以看出14 h谱线462 nm处的极小值强度太大,掩盖了其他处的极小值.经查阅文献认为462 nm附近的谱峰主要由血液中的还原烟碱嘌呤二核苷酸(磷酸盐)发射所致<sup>[14]</sup>.

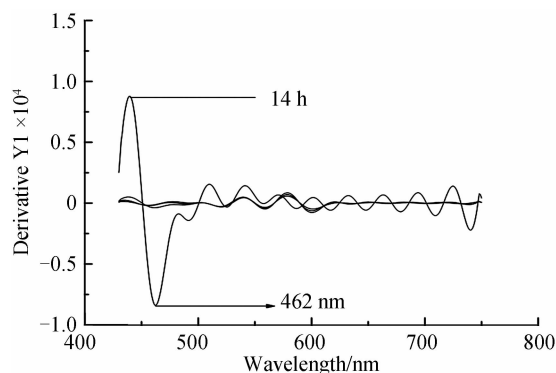


图4 激光照射0~14 h 1%酒精中毒血液二阶导数光谱  
Fig. 4 The second-order derivative spectrum of  
1% alcoholism blood 0~14 hours

酒精中毒离体血液在激光的持续照射下,从0~8 h在605 nm处的荧光峰峰位不变,强度随着时间的变化逐渐缓慢减弱,在10 h后产生了谱形突变.而未经过激光照射的酒精中毒离体血液从0~5 h在605 nm处荧光强度缓慢减弱,从5~13 h荧光峰强度开始急剧降低<sup>[15]</sup>.所以激光照射的酒精中毒血液的突变时间比未经激光照射的酒精中毒离体血液的突变时间要晚大约5 h,即激光的照射延缓了酒精中毒血液的衰变,说明激光能够部分修正酒精对红细胞的破坏.而离体10 h之后出现谱形突变并最终在474 nm处产生了一极强荧光峰,这也是酒精中毒离体血液正常衰变所不存在的现象.分析认为在激光持续照射10 h后激光的光热效应逐渐显现,加上乙醇的共同作用诱发了强烈的损伤反应,如过氧化反应、启动细胞凋亡程序等,极大的加速了细胞的溶血进程,产生了大量的内源性荧光物质还原烟碱腺嘌呤二核苷酸.

通过比较激光照射正常离体血液和酒精中毒离体血液稳态荧光光谱发现,照射正常离体血液14 h、15 h和16 h图谱分别与照射酒精中毒离体血液10 h、12 h和14 h的图谱很相似,只是后者比前者要提前2~3 h.主要是因为乙醇作用于红细胞提高了细胞的渗透脆性,降低了红细胞的抗张能力,加速了红细胞的溶血,从而使时间提前.由于激光照射在一定程度上延缓了酒精中毒血液的衰变,所以激光对酒精作用破坏的红细胞有部分修复功能.

### 3 结论

本文采用荧光光谱技术研究了激光照射正常离体血液和酒精中毒离体血液的衰变规律,得到:

1)持续激光照射的正常离体血液和酒精中毒离体血液在 605 nm 处的峰位不变,强度缓慢减弱,表明激光照射对血红素的能级跃迁几乎没有影响,只是血红素含量逐渐变少,红细胞缓慢分解;

2)激光对正常离体血液的衰变有明显的延缓作用,也能够部分修正酒精对红细胞的破坏;

3)持续激光照射使得离体血液在 474 nm 处产生一高强度的宽展谱峰,表明长时间的激光照射会导致细胞的形态改变,加速细胞的溶血;

4)谱峰突变的原因是持续激光照射损伤了红细胞膜,加速了细胞的溶血,产生了大量内源性荧光物质还原烟碱腺嘌呤二核苷酸。

#### 参考文献

- [1] COOK R T, KEINER J A, YEN A. Ethanol causes accelerated GI arrest in differentiating HL260 cells [J]. *Alc Clin Exp Res*, 1990, **14**: 695-697.
- [2] MI Xian-qiang, CEN Yan, ZHOU Zheng-yi, et al. The in vitro effects of low power laser irradiation on animal erythrocyte rheology [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2004, **31**(7): 888-892. 宓现强, 岑奕, 周正谊, 等. 低强度激光照射对离体动物红细胞流变学性质的影响 [J]. *中国激光*, 2004, **31**(7): 888-892.
- [3] XU Feng, HU Lin, WANG Xian-wei, et al. The effects of low power laser irradiation on human's red blood cell [J]. *Laser Journal*, 2008, **29**(2): 79-80. 许峰, 胡林, 王现伟, 等. 低强度激光照射对离体正常人红细胞的影响 [J]. *激光杂志*, 2008, **29**(2): 79-80.
- [4] LI Yan, JIAO Jian-ling, LIU Cheng-yi, et al. Recent advance of effects of low intensity laser irradiation on cells [J]. *Laser Biology Sinica*, 2003, **12**(1): 67-70. 李燕, 角建瓴, 刘承宜, 等. 低强度激光对离体细胞效应的若干新进展 [J]. *激光生物学报*, 2003, **12**(1): 67-70.
- [5] ZHU Wei-hua, ZHAO Zhi-min, ZHENG Min, et al. Effect of glucose concentration in human serum on fluorescence intensity [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(12): 2531-2533. 朱卫华, 赵志敏, 郑敏, 等. 人体血清血糖浓度对血清荧光强度的影响 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(12): 2531-2533.
- [6] GAO Shu-mei, GE Li-xin, XU Zhen-feng. Characteristics and mechanism for three-dimensional UV-fluorescence spectroscopy of plasma [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2008, **37**(9): 1865-1868. 高淑梅, 葛立新, 徐振峰. 三维紫外血浆荧光光谱学特性及机理分析 [J]. *光子学报*, 2008, **37**(9): 1865-1868.
- [7] LAN Xiu-feng, LIU Ying, ZHU Tuo, et al. Spectroscopy analysis of total cholesterol in human serum [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2008, **37**(3): 547-551.
- [8] LI Rong-qing, LIU Ying, GE Li-xin, et al. Study on blood cells disintegration by laser included fluorescence spectrometry [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2006, **35**(3): 398-401. 李荣青, 刘莹, 葛立新, 等. 激光诱导荧光光谱法研究血细胞衰变规律 [J]. *光子学报*, 2006, **35**(3): 398-401.
- [9] LAN Xiu-feng, LIU Jian-gang, LIU Ying, et al. Spectroscopy research on cholesterol in hypercholesterolemia serum [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**(3): 467-470. 兰秀凤, 刘建刚, 刘莹, 等. 高胆固醇血症血清内胆固醇的光谱学研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, **26**(3): 467-470.
- [10] LIU Ying, PENG Chang-de, NI Xiao-wu, et al. Study on ethanol-water cluster types with steady state and time resolved fluorescence spectrometer [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(9): 1677-1682.
- [11] LIU Ying, HE Wen-liang, LIU Kun-xiang, et al. Theory of the fluorescence emitting mechanism of an ethanol-water cluster [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2009, **38**(1): 133-137.
- [12] VLASOVA M, SALETSKII A M. Analysis of protective action of ischemic preconditioning from fluorescence spectra of blood serum and probes added to it [J]. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2007, **74**(3): 421-424.
- [13] PENG Chang-de, GAO Shu-mei, LIU Ying, et al. Investigation of LED - induced fluorescent spectra from human blood solution [J]. *Applied Laser*, 2003, **23**(4): 232-242. 彭长德, 高淑梅, 刘莹, 等. LED 诱导人血液荧光光谱研究 [J]. *应用激光*, 2003, **23**(4): 232-242.
- [14] LI Bu-hong, ZHANG Zhen-xi, XIE Shu-sen, et al. Fluorescence spectral characteristics of human blood and its endogenous fluorophores [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**(7): 1310-1313. 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): 1310-1313.
- [15] 何文亮. 乙醇与血细胞相互作用过程与机理研究 [D]. 徐州: 徐州师范大学, 2008.
- [16] BIOCHIM C W M. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1982, **694**: 331-352.

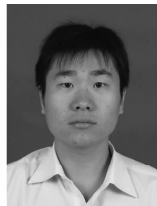
## Decay and Damage Mechanism of Blood Irradiated by Laser

ZHANG Feng, LIU Ying, YANG Cheng-fang, LI Lei

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

**Abstract:** The FLS900 Steady-state fluorescence spectrometer is used to test the normal and alcohol blood in vitro when radiated by continuous laser, and the variation components in blood and the fluorescence characteristics decayed with the time are obtained. The results show that the location of the fluorescence peak can not change when excited by 407 nm laser, only the intensity of the emission peak in the 605 nm decreases slowly. But the fluorescence spectrums have a wave mutation in 14 hours and 10 hours respectively, and have a strong fluorescence peak in the 474 nm eventually. Through the analysis, it can be concluded that the laser can put off the decay time of blood in vitro obviously and also can partly repaired the erythrocyte destroyed by the alcohol, but continuous irradiation by laser led to the change of cells morphology and then accelerated the hemolytic process, thus produced a lot of fluorescence material-reduction of nicotinamide adenine dinucleotide. The result will supply a valuable reference to the research on activity of the blood cell and the functional structure of the blood.

**Key words:** Fluorescence spectrum; Low-intensity laser; Blood cell; Alcoholism blood; Damage mechanism



**ZHANG Feng** was born in 1984. He is pursuing the M. S. degree, and his research interests focus on optical biomedical photonics, particularly for the investigation of the mechanisms of light-tissue interaction.



**LIU Ying** was born in 1970. She received the Ph. D. degree in optical engineering from Nanjing University of Science & Technology in 2006. Now, she is an associate professor, and her research interests focus on applications of lasers in biomedical, particularly for the investigation of the mechanisms of light-tissue interaction.