

高功率毫米波辐照对小鼠皮肤组织拉曼光谱的影响

张杰, 韩黎军, 谢涛嵘, 齐红星, 陈树德, 乔登江*

华东师范大学物理系精密光谱科学与技术国家重点实验室, 上海 200062

摘要 运用显微激光拉曼仪测定了正常小鼠离体皮肤 0~300 μm 不同深度的拉曼光谱。实验还测定了 8 mm 辐照一定时间后小鼠受辐照皮肤组织的拉曼光谱。实验结果表明毫米波辐照后皮肤拉曼光谱峰位 857, 936, 1 658 cm^{-1} 的相对强度随着辐照时间的增加而减少。这表明由于毫米波热效应皮肤组织中的胶原蛋白构象发生了改变甚至分解, 从而进一步表明皮肤组织受到了不可恢复的损伤。

关键词 高功率毫米波; 皮肤组织; 拉曼光谱

中图分类号: Q68 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)12.2872-04

引言

由于拉曼光谱对样品要求更低, 不必粉碎、研磨, 不必透明, 并且水和玻璃的散射光谱极弱, 它成为含水生物样品测试的理想手段。拉曼光谱可以测定外界刺激对处于生理状态下蛋白质的构象变化, 如 Li 等^[1,2] 利用拉曼光谱测定了低频电场刺激下胰岛素和白蛋白的构象变化。拉曼光谱现在也越来越多地应用于组织成分和组织变化的检测。闫循顿^[3] 等给出了单个乳腺癌细胞的拉曼光谱。刘刚^[4] 等检测了人体甲状腺、卵巢、输卵管、肺、子宫平滑肌、宫颈等组织的拉曼光谱。他们还测定了低温保存对组织拉曼光谱的影响^[5]。Synytsya 等^[6] 测定了高能质子束辐照离体裸鼠皮肤和人的甲状腺等组织后组织拉曼光谱的变化规律, 为利用高能粒子束治疗癌症提供了参考。Huang 等^[7] 应用近红外拉曼光谱鉴定胃癌的类别。Horiba Jobin Yvon 公司在拉曼光谱的应用^[8] 中还特别提到了活体检测人体皮肤的拉曼光谱, 给出了人体皮肤的特征峰和不同深度的不同谱线。Caspers 等^[9] 还测定了不同深度活体皮肤组织的含水量。给出了活体皮肤组织中分子浓度组分图^[10]。

前期实验表明, 高功率毫米波辐照小鼠时, 可造成皮肤组织损伤。本文将用拉曼光谱从分子水平测定正常小鼠皮肤组织和经高功率毫米波辐照一定时间后的皮肤组织切片的拉曼光谱, 分析毫米波辐照对小鼠皮肤不同深度组织的拉曼光谱的影响。这将为判定组织损伤程度, 进一步活体快速检测毫米波辐照引起的表皮损伤和恢复程度提供参考方法和数据, 并为损伤组织治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 35 GHz 毫米波辐照系统

脉冲调制的 8 mm 微波源, 平均输出功率 20 W, 输出脉宽 1.0 μs , 重复频率 0.5 kHz, 脉冲功率为 40 kW。辐照系统采用点聚焦天线。

1.2 辐照方法和样品采集

取 ICR 小鼠, 无特殊病菌级 (spf 级), 购自上海斯莱克实验动物中心, 雄性, 20 g, 共 4 只。剃去背部毛发, 固定在塑料泡沫板上。将其依次放入暗室中, 分别辐照 0, 5, 10, 20 s。辐照部位为背部。辐照时间为 0 s 的一只对照组, 即辐照时间为 0 s, 放入暗室中 2 min 取出。辐照后, 立即脱颈椎处死。取辐照部位皮肤组织, 在冰浴中进行操作。将组织样本放入 -70 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中保存。

1.3 拉曼光谱的测定

将储存组织样品从低温冰箱中取出, 用 Leica CM1850 型恒温冷冻切片机制于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 将组织纵向切成 10 μm 的切片, 然后将切片置于石英载波片上。采用 Jobin Yvon 公司 T64000 型共焦显微拉曼光谱仪, 波长 514.6 nm 的氩离子激光器作为激发光源, 激光功率为 40 mW, 100 倍物镜聚焦激光和收集拉曼信号。每一光谱积分时间 120 s。

1.4 拉曼光谱的处理方法

应用 LabSpec 3.0 软件将每组拉曼光谱扣除荧光本底。根据 Synytsya^[6] 归一化方法, 以 1 450 cm^{-1} 峰进行归一化, 即得到组织的拉曼光谱。

收稿日期: 2007-08-08, 修订日期: 2007-11-18

基金项目: 国家“863-803”项目资助

作者简介: 张杰, 1981 年生, 华东师范大学物理系博士研究生, e-mail: 99jiezi@163.com * 通讯联系人

2 毫米波辐照前后皮肤组织的拉曼光谱

2.1 正常皮肤组织的拉曼光谱

正常小鼠皮肤组织不同深度的拉曼光谱如图 1 所示。图中给出了皮肤组织 0, 100, 200, 300 μm 的拉曼光谱。拉曼光谱中主要的峰有 566, 857, 936, 1 450, 1 658 cm^{-1} 。这些与 Synytsya 等^[6]测定的正常小鼠皮肤组织的拉曼光谱特征基本一致。

2.2 受辐照小鼠皮肤的拉曼光谱

高功率 8 mm 波辐照后皮肤不同深度的拉曼光谱如图 2 所示。图 2 给出了对照组和辐照组(辐照时间依次为 5, 10, 20 s)皮肤组织表皮如图 2(a)、皮下 100 μm 如图 2(b)、皮下 200 μm 如图 2(c)、皮下 300 μm 如图 2(d)的拉曼光谱。结果表明, 随着辐照时间的增长, 各层组织的拉曼光谱相似, 但是谱系强度与峰形变化比较明显。表皮、皮下 100 μm 、皮下 200 μm 组织中 510~530, 857, 936, 1 158, 1 658 cm^{-1} 谱系

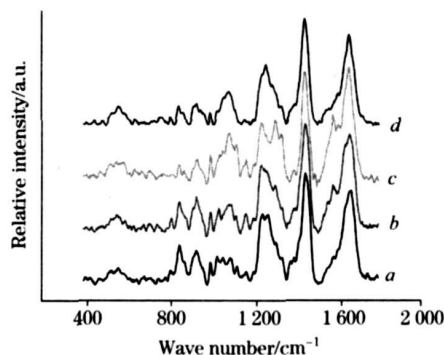


Fig 1 Raman spectra of normal murine skin tissues. Raman spectra of a~d are originated from skin tissues under the skin 0, 100, 200 and 300 μm

的相对强度随着辐照时间的增加而逐渐减少, 甚至消失。1 000~1 100, 1 200~1 300, 1 500~1 660 cm^{-1} 峰形向波数增大的方向平移。

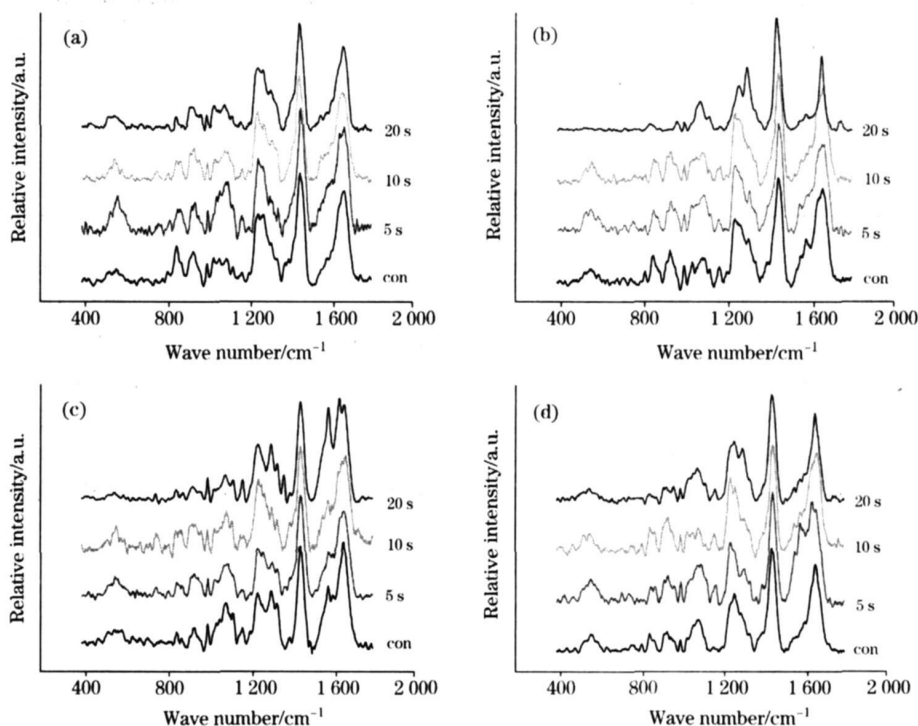


Fig 2 Raman spectra of murine skin tissues irradiated by HPMM. Pic. (a) is originated from epidermis, and Pic. (b) is originated from the tissue under 100 μm of the skin depth., Pic. (c) is 200 μm under, and pic. (d) is under 300 μm . In each picture, the spectra is originated from the same depth of the skin tissues which are irradiated by HPMM. The durations of irradiation are 0, 5, 10 and 20 s, respectively

3 讨论

本文应用显微拉曼光谱方法实验研究了高功率 8 mm 波辐照对 ICR 小鼠皮肤组织的损伤作用。测定了正常小鼠皮肤组织不同深度拉曼光谱。实验组(辐照时间依次为 5, 10, 20 s)皮肤组织表皮, 皮下 100, 200, 300 μm 的拉曼光谱。

实验结果表明, 毫米波辐照后皮肤不同深度的拉曼光谱在峰位为 857, 936, 1 658 cm^{-1} 等发生了明显的变化。由表 1 可知峰位 857 cm^{-1} 主要来自于 $\delta(\text{CCH})$, 936 cm^{-1} 来自 $\chi(\text{CC})$, 1 658 cm^{-1} 为酰胺 I 带(Amide I)。根据 Caspers 等报道^[9]皮肤组织的拉曼光谱主要组成为胶原蛋白的拉曼信号。胶原蛋白的主要特征峰为 857 和 936 cm^{-1} , 而这 2 个峰来自于脯氨酸和羟脯氨酸支链振动和胶原蛋白骨架 $\chi(\text{CC})$ 振

动。由实验结果,毫米波辐照 10 s 后,表皮和皮下 100 μm 组织 2 峰位的拉曼光谱相对强度减小,在辐照 20 s 后,拉曼光谱相对强度减小至接近 0,如表 2 所示。这一过程说明辐照 10 s 时皮下 100 μm 处组织已受到严重损伤,辐照持续 20 s 时皮下 300 μm 的皮肤已受到损伤。

Table 1 Peaks and assignment of Raman spectra of skin tissues^[6, 8-11]

Peak position (cm^{-1})	Protein assignments	Lipids assignments	Others
855	$\delta(\text{CCH})$ aromatic, olefinic		Polysaccharide
936	$\nu(\text{CC})$ praline, valine		
1 004	$\nu(\text{CC})$ Phenyl ring		
1 080		$\nu(\text{CC})$ skeletal	$\nu(\text{CC})$, $\nu_s(\text{PO}_2)$
1 125	$\nu(\text{C}-\text{N})$		
1 166	$\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{COH})$		
1 223			$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$, nucleic acids
1 302	$\delta(\text{CH}_2)$ twisting wagging, collagen	$\delta(\text{CH}_2)$ twisting wagging, phospholipids	
1 448	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$	$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring	
1 585	$\delta(\text{C}=\text{C})$ phenylalanine		
1 653	$\nu(\text{C}=\text{O})$ Amide, collagen, elastin, α helix		

Table 2 Variation of relative Raman intensity of skin tissues irradiated by HPMM

t/s	857 cm^{-1}				936 cm^{-1}				$1\,658\text{ cm}^{-1}$			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
Control	0.34	0.23	0.10	0.15	0.29	0.31	0.15	0.17	0.88	0.92	1.05	0.85
5	0.14	0.19	0.14	0.13	0.19	0.26	0.21	0.21	0.98	0.85	0.87	0.87
10	0.16	0.19	0.16	0.22	0.28	0.28	0.21	0.26	0.82	0.83	0.88	0.90
20	0.09	0.03	0.08	0.04	0.19	0.002	0.12	0.10	0.76	0.72	0.97	0.82

Synytsya 等^[6]报道了经质子束辐照后组织的拉曼光谱变化。他们实验结果表明 Amide I 带相对峰强的减少表明了蛋白质已被破坏。我们实验结果也观察到与对照组相比,毫米波辐照小鼠 20 s 后小鼠皮肤组织(皮下 0~ 300 μm) Amide I 的峰强减小。这也表明皮肤组织中的蛋白质已被破坏。

这些结果从一定程度上反映出了毫米波辐照活体组织后蛋白质等生物大分子的损伤程度,从而进一步反映了组织损伤的程度。这些为快速检测活体烧伤、烫伤等受损伤程度和受伤深度提供了一种参考依据。这还可以为损伤的治疗提供

参考。但是对于辐照后组织拉曼光谱的相对强度增大(如皮下 300 μm 处峰位 857 cm^{-1} 的相对强度)的原因和毫米波辐照生物体的作用位点等还需结合其他方法(如荧光标记)进一步实验研究,还可以结合透射电镜观察组织超显微结构变化规律,从而与拉曼光谱变化建立对应关系。

致谢:华东师范大学光谱学与波谱学教育部重点实验室蔡炜颖老师在拉曼光谱测试与分析中给予了大量帮助,在此表示衷心的感谢!

参 考 文 献

[1] LI Lejun, DAI Yirwen, XIA Ruohong, et al. Bioelectromanetics, 2005, 26(8): 639.

[2] LI Lejun, CHEN Shirde, QIAO Dengjiang (李乐军, 陈树德, 乔登江). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(1): 81.

[3] YAN Xurling, DONG Ruixin, WANG Qirguo et al(闫循领, 董瑞新, 王秋国, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(1): 58.

[4] LIU Gang, LIU Jianhong, ZHANG Lin, et al(刘刚, 刘剑虹, 张林, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(5): 723.

[5] LIU Gang, ZHANG Lin, YU Fan, et al(刘刚, 张林, 俞帆, 等). Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(光谱实验室), 2004, 21(5): 838.

[6] Synytsya A, Alexa P, Besserer J, et al. International Journal of Radiation Biology, 2004, 80(8): 581.

[7] Huang Zhiwei, McWilliams Annette, Lui Harvey, et al. International Journal of Cancer, 2003, 107(6): 1047.

[8] <http://www.jyinc.com/usadivisions/Raman/downloads/art01.htm>.

[9] Caspers P J, Lucassen G W, Bruining H A, et al. Journal of Raman Spectroscopy, 2000, 31: 813.

[10] Caspers P J, Lucassen G W, Carter Elizabeth A, et al. The Journal of Investigative Dermatology, 2001, 116(3): 434.

[11] Caspers P J, Lucassen G W, Biospectroscopy H A, 1998, 4(5)(Suppl.): 31.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

Raman Spectra of Murine Skin Irradiated by High Power Millimeter Wave

ZHANG Jie, HAN Li jun, XIE Tao rong, QI Hong xing, CHEN Shu de, QIAO Deng jiang*

State Key Laboratory of Precision Spectroscopy, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract An experimental study on Raman spectroscopy of normal murine skin and the skin irradiated by high power millimeter wave (HPMM) is presented. It is showed that the Raman spectra of normal skin mainly originate from collagen, and the characteristic peaks are 857, 936 and 1 658 cm^{-1} . The result showed that after irradiation by HPMM, the relative intensity of the characteristic peaks at 857 and 936 cm^{-1} of Raman spectra was decreased. This meant that the collagen was destroyed and even damaged. It was probably indicated that the skin tissue was damaged and could not be restored. The result also showed that the intensity of the characteristic peak at 1 658 cm^{-1} of the skin tissue irradiated by millimeter wave with the duration of 20 s decreased. It was considered that the protein in the skin was destroyed. Those results were consistent with macroscopic observation results.

Keywords High power millimeter wave; Skin tissues; Raman spectroscopy

(Received Aug. 8, 2007; accepted Nov. 18, 2007)

* Corresponding author