

人血液荧光的光谱特性及其物质来源

李步洪^{1,2}, 张镇西¹, 谢树森², 陈 荣²

1. 西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室, 生命科学与技术学院, 生物医学工程研究所, 陕西 西安 710049
2. 福建师范大学, 医学光电信息科学与技术教育部重点实验室, 激光与光电子技术研究所, 福建 福州 350007

摘 要 取健康人的静脉血, 首次实验测量了人血液的三维荧光光谱, 并通过分析荧光激发-发射矩阵研究了血液自体荧光的物质来源。结果表明: 人血液的荧光激发-发射对主要有 260-630, 280-340, 340-460, 450-520 nm, 它们所对应的内源性荧光物质分别来源于血液中的内源性卟啉, 色氨酸, 还原烟碱腺嘌呤二核苷酸(磷酸盐)和黄素腺嘌呤二核苷酸。这些物质的荧光激发效率随着激发光波长的变化而表现出显著差异。

主题词 人血液; 激光诱导荧光; 吸收光谱; 三维荧光光谱; 激发-发射矩阵; 内源性荧光物质

中图分类号: O433 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)07-1310-04

引 言

自体荧光光谱诊断技术以其极高的灵敏度以及无损、安全、快速等优点而成为了当前“生物医学光子学”中的一个重要研究课题。国内外许多研究小组纷纷开展了自体荧光光谱的实验和临床研究, 并在早期肺癌、肠癌、子宫癌和胃癌等临床诊断上取得了令人可喜的初步结果。但是, 自体荧光光谱诊断方法要真正能够替代现有的组织病理诊断尚有一定距离^[1]。究其原因, 主要是因为自体荧光光谱的测量要受诸多因素的影响, 临床应用中难以获得统一的客观判据。其中, 人体组织中的血液含量和分布是影响自体荧光光谱的一个极为重要因素^[2,3]。已有的研究表明: 癌变组织中的血液含量比正常组织中高, 所以血液的吸收是分析自体荧光光谱时必须考虑的影响因素^[4,5]。国内外虽然有关人体血液荧光光谱的研究报道不少, 但血液荧光光谱的实验结果都仅局限于选用现有输出特定波长的激光器作为激发光源, 其中以 Ar⁺ 和 He-Ne 激光最为典型^[6-8]。与此同时, 许多研究还利用了血液的自体荧光光谱实现对某些特殊疾病的临床诊断^[9-11]。

传统的荧光发射(激发)光谱只是在某一个激发(发射)波长下扫描, 而实际上, 荧光是激发波长和发射波长两者的函数。为了完整地描述某种物质的荧光光谱特性, 可以通过实验获得它的三维荧光光谱(Three-dimensional fluorescence spectrum)。三维荧光光谱表征的是荧光强度随激发和发射

波长同时变化的信息, 它的三个维度分别是指荧光激发波长、发射波长和荧光强度。三维荧光光谱还被称为激发-发射矩阵(Emission-excitation matrix)、总发光光谱(Total luminescence spectrum)、等高线谱(Contour spectrum)等。本文首次实验测量获得了在连续波长光源激发下人血液的三维荧光光谱, 它能够比二维荧光光谱更加全面地反映出血液的荧光光谱信息, 并且通过分析荧光激发-发射矩阵中的荧光激发-发射可得到血液自体荧光的内源性物质来源。这些结果不仅可用于分析血液对组织自体荧光光谱的影响, 而且还可为利用血液荧光光谱进行疾病诊断的可行性和进一步探讨低强度激光血管内、外照射疗法的机理提供理论依据。

1 实验材料和方法

1.1 血液样品及处理方法

新鲜血液样品取采自健康成年人静脉血, 由福州市血液中心提供, 用枸橼酸钠抗凝。测量吸收光谱时血液用生理盐水稀释至初始浓度的 1%, 另一组未经稀释的血液用于三维荧光光谱测量。

1.2 光谱测量仪器

测量血液吸收光谱采用的是 Perkin-Elmer 公司的 Lambda 950 UV/Vis/VIR Spectrometer。血液的三维荧光光谱用 Edinburgh analytical instruments 公司的 FL/FS920 Combined TCSPC spectrofluorimeter and lifetime spectrometer system 测量。

收稿日期: 2005-04-02, 修订日期: 2005-08-17

基金项目: 中国博士后科学基金(2004036138)和福建省自然科学基金(A0310018, 2002F008)资助项目

作者简介: 李步洪, 1973 年生, 福建师范大学激光与光电子技术研究所副教授, 博士, 现为西安交通大学博士后

2 结果和讨论

2.1 人全血的吸收光谱

为了能够深入地分析血液的荧光光谱特性以及血液吸收特性对荧光光谱的影响,实验测量了人血液的吸收光谱。结果表明:A、B、O和AB等不同类型的血液的吸收光谱之间没有明显差异,典型的人血液的吸收光谱如图1所示,在250~800 nm之间,人血液有五个明显的吸收峰值,它们依次出现在274, 345, 415, 541和576 nm。血液对紫光及紫外光有很强吸收,最强的吸收峰位于415 nm。在荧光光谱诊断中,对530~590 nm范围的荧光信号也有相对较强的吸收。在长波段吸收较弱,尤其是在波长大于600 nm时吸收很小。

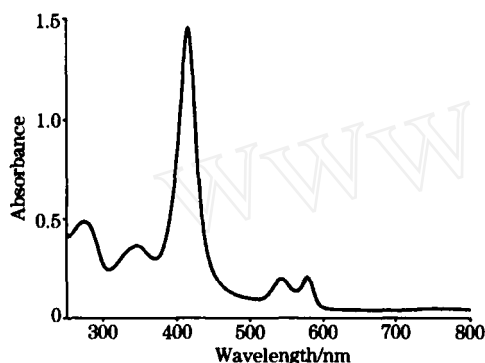


Fig 1 Absorption spectrum of human blood

2.2 血液的二维荧光光谱

如图2所示,在测量血液的荧光光谱时,对血液样品的激发有(a)中心型和(b)表面型两种不同的激发方式。当采用中心型激发方式时,由于人血液的浓度过高,所以血液通常用需用生理盐水或磷酸缓冲溶液稀释至初始浓度的1%~3%后才能进行荧光测量,否则血液样品经激发后产生的荧光很容易被血液完全吸收。相反,血液的表面型荧光激发方式如图2(b)所示,与图2(a)的中心型激发方式相比,系统中光电探测器所检测到的血液荧光是激光激发后直接从血液样品表面逃逸的荧光光子。同时,为了避免入射激发光经过镜式发射后对荧光信号的影响,石英样品池可以采用与水平方向呈30°或60°夹角放置。

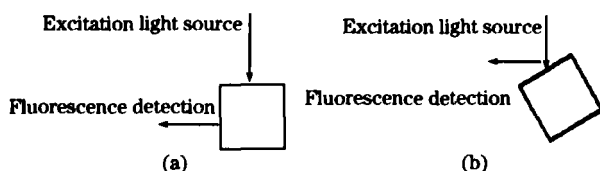


Fig 2 Excitation methods of fluorescence spectroscopy for human blood

(a): Centre type; (b): Surface type

为了比较不同激发方式下的实验结果,实验采用了经过生理盐水稀释后的具有相同浓度的血液样品进行测量。当激发光波长为260 nm时,血液的荧光光谱如图3所示。尽管在两种不同激发方式下,血液荧光光谱的形状和峰值位置都基

本相同,但它们的相对荧光强度上存在显著差异。当血液样品采用表面型激发方式时,340 nm处的荧光相对强度最强。由于血液对345和541 nm附近荧光存在比较强的吸收,所以在中心型的激发方式中,610 nm处的相对荧光强度最强,与表面型激发方式相比,荧光发射过程中发生了显著的共振能量转移(FRET)。即在260 nm波长光源激发下所产生340 nm的荧光在传输过程中,再次被血液所吸收,并作为激发光进一步激发血液产生其它波长的荧光。由图3(a)可知,由于血液在541和576 nm处存在较强吸收,导致了荧光光谱中出现了一个位于560 nm的荧光峰,实际上这并不是血液的荧光发射峰。因此,为了克服血液对组织自体荧光光谱测量结果的影响,可以采用来自于组织体表面的反射光谱对荧光光谱进行校正。其次,结果还表明:采用表面型的荧光激发方式研究血液的荧光光谱更加符合自体荧光光谱在临床诊断应用中的实际情况。

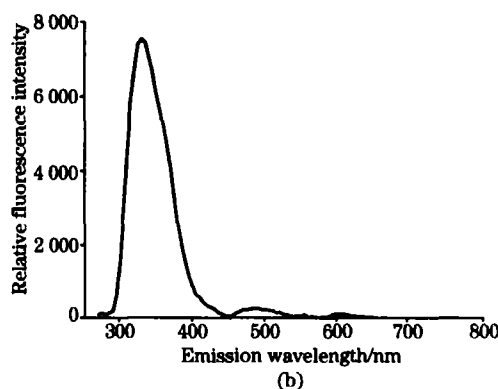
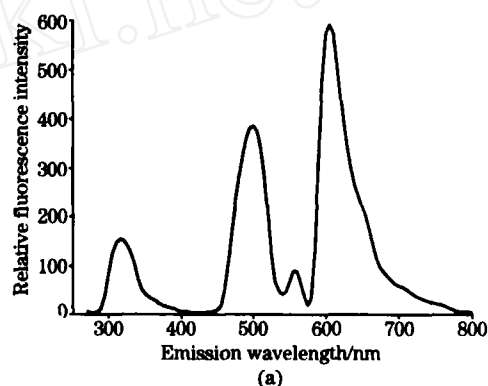


Fig 3 Fluorescence spectra of human blood

Excitation wavelength 260 nm; (a): Centre type; (b): Surface type

2.3 血液的三维荧光光谱

血液三维荧光光谱的测量采用的是表面激发方式,激发光波长的扫描范围260~540 nm,每次的增加10 nm,相应的荧光发射波长扫描范围为280~800 nm,步长5 nm。由于荧光发射波长总是大于激发光波长,因此在三维荧光光谱测量过程中,荧光信号的起始采集波长始终设置成比激发波长大20 nm^[12]。所记录的系列荧光光谱数据可以转化成为用于血液内源性荧光物质分析的三维荧光光谱或荧光激发-发射矩阵。血液的三维荧光光谱和荧光激发-发射矩阵分别如图4和图5所示。在图5中,横坐标表示荧光发射波长,纵坐标

表示激发光波长, 平面上的点表示由两个波长所决定的血液样品的荧光强度。将荧光强度相等的各个点连结起来, 便在激发-发射波长构成的平面上显示了由一系列等强度线所组成的等高线光谱。

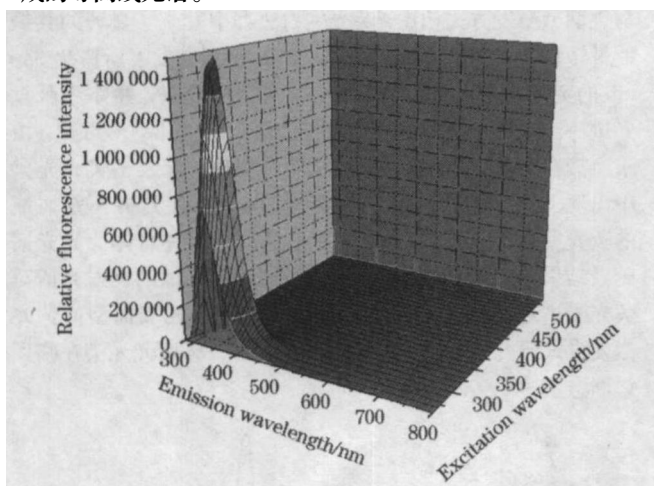


Fig 4 Three-dimensional fluorescence spectra of human blood

图 5 中血液的荧光激发-发射对有 260-630, 280-340, 340-460, 450-520 nm, 它们所对应的内源性荧光物质分别来源于血液中的内源性卟啉, 色氨酸, 还原烟碱腺嘌呤二核苷酸(磷酸盐)和黄素腺嘌呤二核苷酸^[13, 14]。同时, 这些内源性物质的荧光激发效率随着激发光波长的变化而表现出显著差异。特别是对于卟啉, 由于激发过程中仍然存在荧光共振能量转移现象, 使得 260 nm 激发时的相对荧光强度最强。

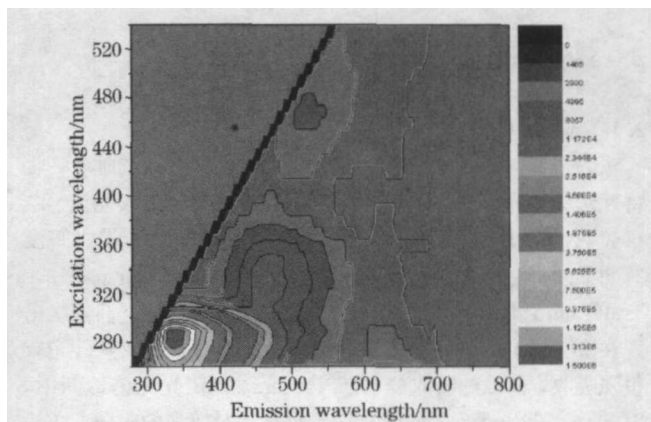


Fig 5 Fluorescence excitation-emission matrix of human blood

3 结 论

人血液在 250-800 nm 的吸收峰分别位于 274, 344, 415, 541 和 576 nm, 其中在 415 nm 处的吸收最强。在离体样品的荧光光谱测量中, 为了使所获得的自体荧光光谱更加接近临床实际情况, 对实验样品的激发宜采用表面型激发方式。实验首次测量获得了在连续波长光源激发下人血液的三维荧光光谱, 结果表明: 人血液的荧光激发-发射对主要有 260-630, 280-340, 340-460, 450-520 nm, 它们所对应的内源性荧光物质分别来源于血液中的内源性卟啉, 色氨酸, 还原烟碱腺嘌呤二核苷酸(磷酸盐)和黄素腺嘌呤二核苷酸。

参 考 文 献

- [1] LI Bu-hong, XIE Shu-sen(李步洪, 谢树森). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(7): 1083.
- [2] Welch A J, Gardner C, Richards Körtum R. Lasers Surg. Med., 1997, 21(2): 166.
- [3] MacAulay C, Richards Körtum R, Utzinger U, et al. Optics Express, 2002, 10(12): 493.
- [4] Hawrysz D, Sevick-Muraca E. Neoplasia, 2000, 2: 388.
- [5] Lin Wei-chiang, Steven A. Toms, Jansen E Duco, et al. IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics, 2001, 7(6): 996.
- [6] Gao Shumei, Lan Xiufeng, Liu Ying, et al. Chinese Optics Letters, 2004, 2(3): 160.
- [7] Luo Xiaosen, Tao Chunkan, Gao Shumei, et al. Proc. SPIE, 2003, 5254: 399.
- [8] CHEN Rong, LI Bu-hong, CHEN Jin-kai, et al(陈 荣, 李步洪, 陈金铠, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(4): 748.
- [9] ZHAO Zhi-min, CHEN Yu-ming, YU Xiao-lei(赵志敏, 陈玉明, 俞晓磊). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(5): 922.
- [10] Madhuri S, Vengadesan N, Aruna P, et al. Photochem Photobiol., 2003, 78(2): 197.
- [11] Masilamani V, Al-Zhrani K, Al-Salhi M, et al. Journal of Luminescence, 2004, 109: 143.
- [12] Li Bu-hong, Xie Shu-sen. World J. Gastroenterol., 2005, 11(25): 3931.
- [13] Richards Körtum R, Sevick-Muraca E. Annu. Rev. Phys. Chem., 1996, 47: 555.
- [14] Uppal A, Ghosh N, Datta A, et al. Biotechnol. Appl. Biochem., 2005, 41(1): 43.

Fluorescence Spectral Characteristics of Human Blood and Its Endogenous Fluorophores

LI Bu-hong^{1,2}, ZHANG Zhen-xi¹, XIE Shu-sen², CHEN Rong²

1. Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, and Institute of Biomedical Engineering, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China
2. Key Laboratory of Opto-electronic Science and Technology for Medicine of Ministry of Education, Institute of Laser and Optoelectronics Technology, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

Abstract The three-dimensional fluorescence spectra and excitation-emission matrix of human blood were measured, and an attempt was made to exploit the endogenous fluorophores of major peaks in the UV and visible. The result indicates that the absorption peaks of human blood appear at 274, 345, 415, 541 and 576 nm. Based on the analysis of fluorescence excitation-emission matrix, the major emission peaks of human blood occur at excitation-emission wavelength pairs of 260-630, 280-340, 340-460 and 450-520 nm, which are attributed to endogenous porphyrins, tryptophan, reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) or reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and flavin adenine dinucleotide (FAD), respectively. These results can be used to analyze and explain the effect of blood on the distortion of fluorescence signal of human tissues for optical diagnosis.

Keywords Human blood; Laser-induced fluorescence; Absorption spectroscopy; Three-dimensional fluorescence spectroscopy; Excitation-emission matrix; Endogenous fluorophores

(Received Apr. 2, 2005; accepted Aug. 17, 2005)