

单个血小板的拉曼光谱分析

王桂文¹, 姚辉璐¹, 何碧娟², 彭立新¹, 黎永青³

1. 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530003

2. 广西科学院, 广西南宁 530022

3. 美国东卡罗莱纳大学物理系, Greenville, NC 27858-4353, USA

摘要 利用波长为 785 nm 的激光束构建光镊拉曼光谱系统, 俘获悬浮在生理盐水中的三种动物(家猪、大鼠、家兔)的单个血小板, 激发并收集其拉曼光谱。单个血小板的平均拉曼光谱信号清楚地反映了血小板的生化组成特点, 人血小板的拉曼光谱与三种动物的明显不同, $1\,524\text{ cm}^{-1}$ 是人类血小板所特有的拉曼信号峰, 而 $1\,157\text{ cm}^{-1}$ 在人类中显著高于三种动物的, 人类血小板的平均 $I_{1\,157}/I_{1\,008}$ 为 0.795, 而家猪、大鼠、家兔的分别为 0.532, 0.502, 0.485。多元统计分析结果显示, 不同物种血小板的拉曼信号落入不同的空间, 可以判别区分。上述结果表明, 单个血小板的拉曼光谱基本反映了血小板的主要组成成分, 结合多元统计分析可以用于辨别不同的物种的血小板, 光镊拉曼光谱系统是实时研究细胞生理、生化变化的快速简便而有效的工具。

关键词 光镊; 拉曼光谱; 血小板

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)07-1347-04

引言

血小板(Platelet)又称血栓细胞, 是由骨髓中成熟的巨核细胞裂解、胞质脱落而成, 一般为小圆盘状, 大小不一, 直径 $2\sim 4\text{ }\mu\text{m}$, 激活时, 伸出伪足, 成为不规则形或棘球状。血小板具有粘附、聚集、分泌、收缩血块等活动, 在止血和凝血过程中起重要作用^[1]。近年来的许多研究证实, 血小板还具有帮助调节体内新陈代谢, 促进组织的修复与愈合功能^[2]。

拉曼光谱是生命科学研究领域很有应用潜力的工具^[3]。从拉曼光谱的特征峰的位置、强度和线宽可以获得样品的分子组成及结构信息, 因此拉曼光谱已成为研究物质分子结构的有效手段。共焦显微拉曼光谱技术可以研究单个细胞甚至细胞器^[4], 但由于人为的用物理或化学手段固定研究对象, 细胞周围的环境发生改变, 甚至细胞死亡, 对细胞的生理带来了未知的影响, 最近, 光镊拉曼光谱技术(laser tweezers Raman spectroscopy, LTRS)的出现, 使我们可以在接近其自然的生理状态下研究单个悬浮细胞或细胞器^[5-8]。LTRS是将光学囚禁技术与显微拉曼光谱技术相结合, 用同一束光来实现囚禁单个悬浮细胞并激发细胞分子的拉曼光谱, 其特

点是: 会聚激光产生的梯度力将溶液中的单个活细胞长时间囚禁在焦点附近, 避免细胞因布朗运动或细胞本身的游动而离开光束的激发区域; 细胞被囚禁在光束焦点位置因此优化了散射光的收集光路从而可以获得高的信噪比; 细胞被囚禁在载玻片上方 $8\text{ }\mu\text{m}$ 位置, 减弱来自载玻片的杂散光; 被囚禁的细胞依然悬浮在不受干扰的环境中, 得到的是接近自然生理状态的单个活细胞的拉曼光谱。

本文采用 LTRS 首次对人和三种动物(家猪、大鼠、家兔)的单个活体血小板细胞进行拉曼光谱分析。对不同物种血小板的拉曼光谱分析有助于了解不同物种血小板细胞的分子结构的差异, 有助于了解分子结构的差异在不同动物止血和凝血功能中发挥的作用。已有学者对固定的血小板或血小板膜进行过光谱学研究^[9-11], 但还没有对单个活的血小板进行拉曼光谱研究的报道。本文利用 LTRS 系统, 俘获单个活的血小板细胞, 收集拉曼信号, 利用多元统计分析方法对光谱进行分析, 判别四个物种血小板的拉曼光谱的异同, 探讨进一步利用该系统研究血小板的生化反应的可能。

1 材料与方法

1.1 血样的采集与血小板的分离

收稿日期: 2005-11-10, 修订日期: 2006-04-20

基金项目: 广西科学基金项目(桂科基 0448018)资助

作者简介: 王桂文, 1969 年生, 广西科学院生物物理实验室副研究员, e-mail: liy@mail.ecu.edu.cn

本实验共采集人(*Homo sapiens*)、家猪(*Sus scrofa domestica*)、家兔(*Oryctolagus cuniculus*)和大鼠(*Rattus norvegicus*)四个物种的血液。其中人样本三个(编号 H1, 男性, 25 岁; H2, 女性, 24 岁; H3, 男性, 35 岁; 静脉取血); 家猪样本三个(编号 P1, P2, P3, 成年公猪, 宰杀取血); 家兔样本一个(编号 Rb1, 雄性; 静脉取血); 大鼠样本两个(编号 R1, R2, 一个月龄, 宰杀取血)。所采血样与抗凝剂 ACD 按 8.6:1.4 比例混合抗凝。

血小板的分离采用常规方法。血液经 $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 10 min 去掉血红细胞, 上清液经 $3\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 10 min 沉淀血小板, 0.9% 生理盐水洗一次, 重悬。

1.2 实验组成

本实验所用的拉曼光镊系统如文献^[5]所述: 半导体激光器(Tiger laser system, saccher lasertechnik, Germany)产生波长为 785 nm 的激光束, 滤波, 导入倒置生物显微镜(TE2000U, Nikon)。激光束经油浸物镜(N.A. 1.30, $100\times$)聚焦后在焦点附近形成了一个单光束光势阱来囚禁细胞, 同时这束激光也用来激发被囚禁细胞的拉曼散射。样品槽由一个厚 3 mm, 中心有一个直径为 8 mm 的孔的玻璃板构成, 下部用一个厚 $100\text{ }\mu\text{m}$ 石英片密封, 上部盖上盖玻片。用生理盐水悬浮的血小板细胞就放置在两个玻片之间的孔里。在收集光路里, 物镜也作为收集透镜收集来自细胞的背向散射光, 设置一个 $150\text{ }\mu\text{m}$ 的针孔去除离轴的散射光, 两个干涉陷波滤波器滤除波长与激发波长相同的弹性散射光, 拉曼散射光聚焦进光谱仪的输入狭缝。光谱仪(SpectraPro2300i, Acton)的衍射光栅参数是闪耀波长为 650 nm, 每毫米 600 线。光谱仪耦合到电荷耦合器件 CCD(Spee 10, Princeton Instruments)上, CCD 用液氮冷却到 $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。摄像机(V.C)连

续监视被囚禁血小板。收集 $300\sim 2\,200\text{ cm}^{-1}$ 范围的拉曼光谱, 光谱分辨率为 6 cm^{-1} 。

1.3 光谱数据的收集与处理

血小板囚禁在载玻片上方约 $8\text{ }\mu\text{m}$ 位置, 调整激光束在会聚点的功率约 30 mW, 拉曼信号收集时间为 30 s, 得到带背景的单个血小板细胞的拉曼光谱 $S_{\text{acq}}(\nu)$; 移开血小板约 $10\text{ }\mu\text{m}$, 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 $S_{\text{bg}}(\nu)$ 。每个物种俘获并收集 30 个血小板的拉曼光谱, 光谱数据转换为 ASCII 数据, 输入软件 Micro Origin 6.0 进行处理。每个血小板测得的光谱先减去来自溶液、盖玻片和光学部件的背景光谱 $S_{\text{bg}}(\nu)$, 再经系统响应函数 $R(\nu)$ 校正得到单个血小板的实际光谱: $S_{\text{act}}(\nu) = [S_{\text{acq}}(\nu) - S_{\text{bg}}(\nu)] / R(\nu)$ 。

每个物种(个体)随机选择 20 个血小板的光谱和 4 个背景光谱, 应用 Matlab 7.0 软件包(The Mathworks Inc, Natick, MA)做主成分分析(principal components analysis, PCA), 应用 PyChem 1.0.2 软件做判别函数分析(discriminant function analysis, DFA): 先将每个血小板的实际光谱 $S_{\text{act}}(\nu)$ 取一阶导数, 而后做总面积归一化, 选取信号峰集中的 $600\sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$ 的指纹区域做多元统计分析, 输出 PCA 和 DFA 结果。

2 结果与分析

由于细胞对近红外波长的低吸收, 对细胞的损伤很小^[12], 有研究表明, 小鼠肺表皮细胞在 785 nm, 115 mW 照射 40 min, 其细胞形态和活性没有受损^[13]。本研究选用 785 nm 波长激光俘获和激发血小板, 在会聚点的功率约为 30 mW, 收集时间为 30 s, 对血小板的活性影响很小。

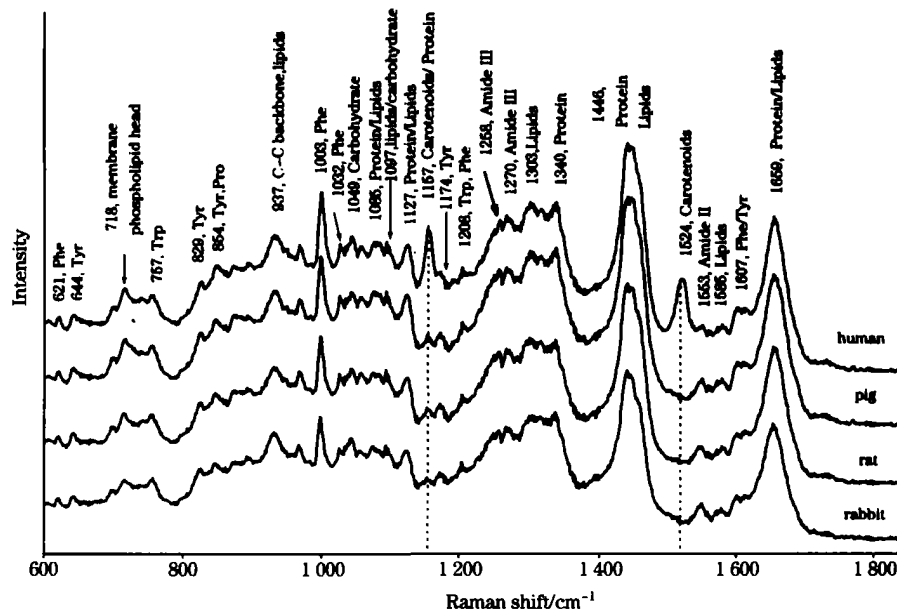


Fig 1 Mean Raman spectra of single platelet and tentative peak assignment

Abbreviations: Phe, phenylalanine; Tyr, tyrosine; Trp, tryptophan; Pro, proline

图1是四个物种的单个血小板细胞的平均拉曼光谱及各拉曼信号峰可能对应的生物大分子的指认。血小板是由骨髓中成熟的巨核细胞裂解、胞质脱落而成,是一个无核的细胞,一般认为没有合成DNA、RNA和蛋白质的功能,其具有丰富的细胞膜系统和细胞骨架蛋白,除线粒体、类溶酶体、分泌小泡等细胞器外,还有特殊的储存颗粒如 α 颗粒、致密颗粒^[1]。图1基本反映了血小板的组成:其主要峰值代表的都是蛋白质(氨基酸)和脂肪的基团,如芳香族氨基酸(苯丙氨酸 621, 1 003, 1 032, 1 208 cm^{-1} 、酪氨酸 644, 829, 854, 1 174 cm^{-1})、杂环族氨基酸(色氨酸 757, 1 208 cm^{-1})的特征拉曼峰。而核酸类物质的特征峰(785, 811, 1 083, 1 336, 1 369, 1 099, 1 578 cm^{-1})并没有出现;1 003 cm^{-1} 是苯丙氨酸的对称呼吸振动模,在各种生物样品中其拉曼信号明显而且稳定,常作为生物样品的内标。血小板丰富的膜系统也有所反映,718 cm^{-1} 的是磷脂分子极性头部C—N键的振动模,938 cm^{-1} 是脂肪链的C—C骨架伸展振动峰。

三种动物血小板的拉曼光谱基本相似,但人血小板与其他三种动物血小板的差异比较大,表现在:一是1 524 cm^{-1} 峰(类胡萝卜素的—C=C—基团)是人血小板特有的拉曼信号峰,在其他三种动物中没有出现;二是1 157 cm^{-1} 峰(类胡萝卜素、蛋白质的C—C和C—N拉伸振动模)的信号强度明显高于其他三个物种,其强度与1 003 cm^{-1} 之比(I_{1157}/I_{1003})平均值为0.795,而家猪、大鼠、家兔的分别为0.532, 0.502, 0.485。

上述结果也体现在PCA结果中,人与家猪、大鼠、家兔之间血小板的拉曼光谱可以明显的区分[见图2(a)];三种动物之间、同一物种不同个体之间[见图2(b)]的血小板的拉曼光谱差异不明显,PCA落入几乎相同的区域。但如采用DFA对家猪、大鼠、家兔进行判别分析,三者落入不同的空间,相当集中,容易判别[见图2(c)],同样条件下的同一物种不同个体之间则相对分散,互有重合[见图2(d)]。

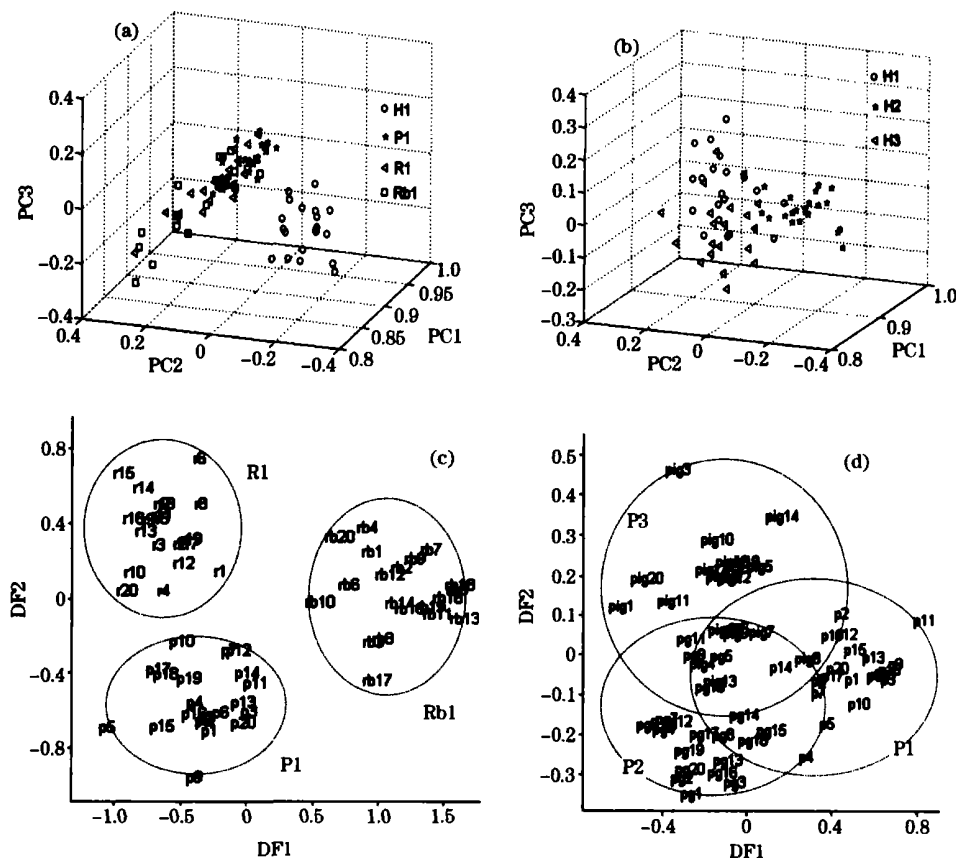


Fig 2 The multivariate analysis of 20 training sets

(a): Human H1, pig P1, rat R1 and rabbit Rb1 with PCA; (b): Three individual human with PCA;
 (c): Pig P1, rat R1 and rabbit Rb1 with discriminate function analysis (DFA); (d): Three individual pigs with DFA

3 小结

处于溶液中的血小板,由于布朗运动而处于不停的运动中,LTRS可以俘获单个血小板细胞,而后提升到石英片上

方一定的高度,加大其对细胞的激发和拉曼散射的收集,减少来自玻片和环境的背景干扰。血小板丰富的内膜系统、骨架蛋白组成特征能在其拉曼光谱曲线上清楚地显示,而且人血小板的1 157和1 524 cm^{-1} 拉曼峰是明显区别于其他物种的信号峰。对不同物种、不同个体的单个血小板细胞的拉曼

光谱进行 PCA 和 DFA 分析结果显示, 不同物种之间可以结合多元统计分析进行区分和判别。据我们所知, 这是国际上首次对单个活的血小板进行拉曼光谱分析, 上述结果表明, LTRS 可以研究单个血小板细胞的拉曼光谱, 并可以区分不

同物种的血小板, 是研究溶液中接近自然生理状态下小生物体、细胞的有力工具, 为进一步研究血小板的生理生化反应提供了良好的实验基础。

参 考 文 献

- [1] RUAN Chang-geng(阮长耿主编). Platelet: Basic and Clinic(血小板——基础与临床). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press (上海: 上海科技出版社), 1987.
- [2] SU Zheng-rao(苏正尧). Sciences and Development(科学发展), 2004, (379): 48.
- [3] Petry R, Schmit M, Popp J. Chemphyschem, 2003, 4(1): 14.
- [4] Puppels G J, de Mul FF, Otto C, et al. Nature, 1990, 347: 301.
- [5] Xie C A, Dinno M A, Li Y Q. Optics Letters, 2002, 27: 249.
- [6] Xie C A, Li Y Q, Tang W, et al. Journal of Applied Physics, 2003, 94: 6138.
- [7] Xie C A, Charles G, Dinno M A, et al. Optics Express, 2004, 12: 6208.
- [8] Xie C A, Mace J, Dinno M A, et al. Analytical Chemistry, 2005, 77: 4390.
- [9] Kennedy J H, Ishida H, Staikoff L S, et al. Biomater. Med. Devices Artif. Organs., 1978, 6(3): 215.
- [10] Aslanian D, Vainer H, Guesdon J P, et al. FEBS Lett., 1979, 101(1): 39.
- [11] Aslanian D, Vainer H, Guesdon J P. Eur. J. Biochem., 1983, 131(3): 555.
- [12] Neuman K, Chadd, E H, Liou G F, et al. Biophys. J., 1999, 77: 2656.
- [13] Notingher I, Verrier S, Romanska H, et al. Spectrosc. Int., J., 2002, 16: 43.
- [14] Notingher I, Verrier S, Haque S, et al. Biopolymers, 2003, 72(4): 230.
- [15] Stone N, Kendall C, Smith J, et al. Faraday Discuss, 2004, 126: 141.

Raman Micro-Spectroscopy of Single Blood Platelets

WANG Gu-wen¹, YAO Hu-lu¹, HE Bi-juan², PENG Li-xin¹, LI Yong-qing³

1. Lab of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China

2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530022, China

3. Department of Physics, East Carolina University, Greenville, North Carolina 27858-4353, USA

Abstract The authors collected the Raman spectra of single blood platelets of human, pig, rat and rabbit suspended in saline solution by using a laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) setup. A single platelet cell was trapped in the focus of a near-infrared laser beam at 785 nm and the excited Raman spectrum was acquired. For each species, the Raman spectra of up to 20 platelet cells were acquired and were used to perform a principal components analysis (PCA) or a discriminate function analysis (DFA). The average Raman spectra indicate that the vibration bands at 1 524 and 1 157 cm^{-1} of human platelets are obviously different from those of the platelets from pig, rat and rabbit. The Raman intensities at 1 157 and 1 524 cm^{-1} bands are significantly high for human platelets. The ratio I_{1157}/I_{1008} of human platelets was 0.795, but those of pig, rat and rabbit were 0.532, 0.502 and 0.485, respectively. In addition, the platelets from four different species can be discriminated with multivariate analysis. These findings demonstrate that the LTRS, combined with multivariate analysis, could be used to rapidly discriminate platelets from various species and may find valuable application in rapid sensing of biochemical changes in a single cell.

Keywords Laser tweezers; Raman spectroscopy; Blood platelets

(Received Nov. 10, 2005; accepted Apr. 20, 2006)