

血液激发荧光强度分析及应用

赵志敏¹, 郭林峰¹, 俞晓磊¹, 马军艳², 王乐新¹, 辛玉军¹

1. 南京航空航天大学理学院, 江苏 南京 210016

2. 青岛大学理工学院, 山东 青岛 266071

摘要 文章采用荧光分析技术,对血液激发荧光强度进行研究。给出了有关理论分析,并给出了正常血样与异常血样(高血糖、高胆固醇)对比实验结果。研究发现:血液中血糖的浓度影响血液的激发荧光,其大致趋势是:在相同波长的激发光激发下,随着血糖浓度的提高,血液的激发荧光强度也逐渐增强,显然,血液中的血糖也是一种荧光物质,其浓度对血液的荧光强度的影响与理论分析相一致,这表明所得的实验结果是合理的,同时还表明了可以通过比较血液的激发荧光强度来区分血液中血糖浓度的高低;研究还发现:胆固醇含量越高,所得的荧光强度也越强。因此,根据血清的荧光强度可以知道血清中胆固醇含量的高低,尤其是当使用波长位于435 nm附近的激发光时,结果非常明显。文章提出的血液激发荧光强度分析技术,为血样快速检测及疾病诊断提供了新的途径。

主题词 血液;激发荧光;荧光强度

中图分类号: O433.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)12-2056-05

引言

生命科学是当今世界科技发展的最大的热点之一。目前,几乎所有的科学技术都围绕人与人类的发展问题,寻求自己有意义的生长点与发展面,而生命科学的重点研究对象更是直指高等生命活体与人体本身的一些重大问题。

随着人们生活条件的改善,饮食习惯发生了变化,这使得高血糖、高血脂及高胆固醇等疾病的发病率呈逐年上升趋势,这又通常会导致糖尿病、动脉硬化等疾病的发生,最终导致高血粘综合症(Hyper viscosity syndrome),这是致残率极高的严重疾病,减少其发病率和致残率,提高人类健康水平,是当今生命科学领域急需解决的前沿研究课题。

生物体尤其是人体,是复杂的生命系统,所携带的信息量大而丰富,其中就隐藏着重要的荧光信息。研究表明,生物组织出现异常时,荧光特征将发生变化,据最新报道:瑞士科学家近日发现,神经细胞组织的变性是导致早发性痴呆症的主要原因,通过分析细胞组织变性过程的荧光信息,可对该病进行早期诊断^[1]。因此,充分利用生物组织携带的荧光信息,进行疾病的有效分析和诊断,尤其是血液荧光分析技术研究是新的具有挑战性的研究课题。

传统的血液检测技术由于操作复杂、周期长,有给病人造成的痛苦大以及仪器设备昂贵等缺陷,已经越来越跟不上

科技的发展。因此,发展一种能克服上述缺陷的检测方法,已成为一项十分迫切的任务,引起了有关研究领域的重视^[2-6],并成为研究热点。

本文结合实际情况,把荧光分析技术应用于人体血液的分析上,通过比较人体正常血液与血糖、胆固醇异常的血液激发荧光强度,分析其特性,为血液检测开辟一条新的途径。

1 血液荧光强度分析基本原理

血液成分十分复杂,其中存在大量能发射荧光的基团。当这些基团处于激发态时,就可通过辐射驰豫发射荧光。由此可知,血液的激发荧光内容非常丰富,但同时其复杂性也给血液分析造成困难。荧光产生的全过程比较复杂,即使是一条荧光谱线,也涉及分子在多条能级之间的跃迁,但与某条荧光谱线直接相关的则只有两能级。因此,在讨论血液激发荧光的强度时,为讨论方便而又不失一般性,将血液分子简化为两能级系统。

假设只有两条能级被光辐射耦合而在光照期间能级粒子数发生变化,上能级(2)相对应于激发态,下能级(1)相对应于基态,如图1所示。

激发态粒子数为 N_2 ,基态粒子数为 N_1 ,粒子数 N_1 和 N_2 随时间的变化,可用速率方程描述

收稿日期:2004-12-10,修订日期:2005-04-20

基金项目:南京航空航天大学创新基金项目资助

作者简介:赵志敏,女,1955年生,南京航空航天大学理学院教授,博士生导师

$$\frac{dN_2(t)}{dt} = N_1(t)(K_{12} + S_{12}) - N_2(t)(K_{21} + S_{21} + A_{21}) \quad (1)$$

式中 K_{12} , K_{21} 分别是分子受激吸收速率和受激发射速率, S_{12} , S_{21} 分别是分子碰撞引起的激发速率和消激发速率, A_{21} 为自发发射速率。

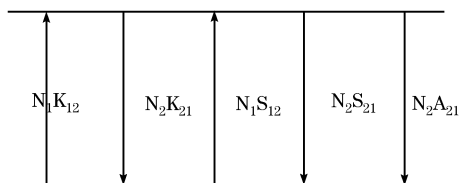


Fig. 1 Schematic diagram of excitation fluorescence

设两能级统计权重相等, 于是有

$$K_{12} = K_{21} = K \quad (2)$$

而一般情况下, 分子碰撞所引起的吸收率远小于分子的受激吸收速率, 即

$$S_{12} \ll S_{21} \quad (3)$$

因此, 可将(1)式进一步简化, 并令粒子数 $N_0 = N_1 + N_2$, 则

$$\frac{dN_2(t)}{dt} = N_0 K - N_2(t)(2K + S_{12} + A_{21}) \quad (4)$$

由方程(4)可得

$$N_2(t) = \frac{N_0 - e^{-(2K+S_{12}+A_{21})t}}{2K + S_{21} + A_{21}} \quad (5)$$

稳态时, 有

$$N_2 = \frac{N_0 K}{2K + S_{21} + A_{21}} \quad (6)$$

血液中分子在单位时间内所发射的总荧光光子数就为

$$n_f = N_2 A_{21} V = \frac{N_0 K A_{21} V}{2K + S_{21} + A_{21}} \quad (7)$$

式中 V 为荧光发射体的体积。

又由于血液的荧光是血液在吸收光子以后发射出的波长较长的辐射, 因此, 血液的激发荧光强度就与血液的吸收光程差有关。

荧光量子产率定义为荧光物质吸收光辐射后所发射的荧光的光子数与所吸收的激发光的光子数之比值, 用 Y_F 表示, 即

$$Y_F = \frac{\text{发射的光子数}}{\text{吸收的光子数}} \quad (8)$$

在一般情况下, Y_F 数值总小于 1, 荧光量子产率的数值越大, 物质的荧光也就越强。

假设以每秒钟每平方厘米的光强度为 I_0 的入射光照射到一吸收截面积为 A 的血液样品上, 而由检测系统所测出的荧光强度为 I_F , 如图 2 所示, 根据 Beer 定律, 通过样品血液的投射光强度 I_t 为

$$I_t = AI_0 e^{-\epsilon bc} \quad (9)$$

其中 c 为血液中荧光物质的浓度, b 为样品血液的厚度, ϵ 为摩尔吸光系数。

现在考虑离表面 x 处的很薄的一层 dx 的吸收光和发射荧光的情况。设这一薄层所吸收的光能量为 dI , 所发射的荧

光强度为 dI_F , 则

$$dI_F = KY_F dI \quad (10)$$

其中 K 为检测系统的仪器常数。在进入该薄层之前的入射光的强度为 $AI_0 e^{-\epsilon cx}$, 而通过该薄层之后的透射光强度为 $AI_0 e^{-\epsilon c(x+dx)}$, 因此, 被 dx 薄层所吸收的能量为(见图 2),

$$dI = AI_0 [e^{-\epsilon cx} - e^{-\epsilon c(x+dx)}] = AI_0 e^{-\epsilon cx} (1 - e^{-\epsilon c dx}) \quad (11)$$

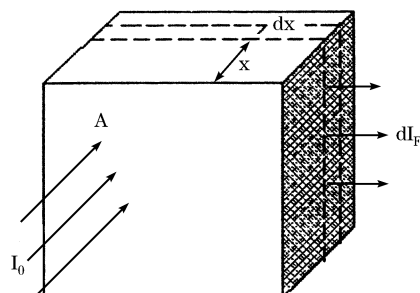


Fig. 2 Fluorescence intensity of blood

由于 $\epsilon c dx$ 的数值很小, 所以求样品血液的荧光强度时, 经对样品的整个厚度 b 积分, 可得

$$I_F = KY_F AI_0 (1 - e^{-\epsilon cb}) \quad (12)$$

于是, 每平方厘米面积上的荧光强度为

$$I_F = KY_F I_0 (1 - e^{-\epsilon cb}) \quad (13)$$

从式(13)可以看出, 荧光强度是与仪器条件有关的, 同一样品用不同的仪器或即使使用相同的仪器, 用不同的测定条件, 得到的值经常是不同的。从公式还可以看出, 荧光强度与样品本身的量子产率及激发强度成正比。量子产率是发射光子数与吸收光子数之比, 它本身就表示样品发射荧光的本领, 所以, 量子产率大, 发射的荧光就强。而激发光源的强度直接关系到激发能量的大小, 当然也就与荧光强度直接相关。除上述之外, 荧光强度还与摩尔吸光系数、样品的厚度及浓度这 3 个因素有关。摩尔吸光系数是表示样品吸收光的特性, 分子要发射荧光, 首先必须吸收能量, 所以吸收特性与荧光发射密切相关。而样品的厚度与浓度也直接影响样品对激发光能量的吸收, 因而也对样品荧光强度产生影响。

2 实验测试系统

血样的荧光激发和强度测试系统如图 3 所示, 所用探测系统为 4S01 高灵敏度微光 CCD 摄像机, 该探测系统主要由积累控制处理器、CCD 摄像头、光学镜头等部分组成。其中用于荧光收集的光学镜头焦距为 $f=8\text{mm}$, 相对孔径 $D/F=$

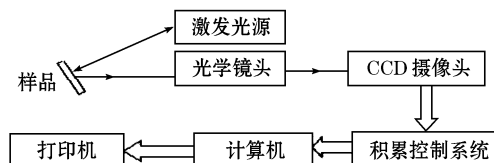


Fig. 3 Fluorescence intensity detecting system

1/1.4, 波长响应范围是 300~1 000 nm; CCD 摄像头选用的型号是 MTV-1881EX 1/2, 其水平解析度为 600 TV 线, 信噪比优于 48 dB, 因而适用于探测象荧光这样的微光。

待测血样经光照射后,激发出的荧光经光学镜头聚焦和 CCD 摄像头拍摄后,传至积累控制处理器,再经计算机对探测到的荧光信号处理后,在显示器上显示出待测血样的激发荧光的光斑,光斑的亮暗表征荧光总强度的大小。

3 实验及结果分析

本实验采用图 3 所示实验装置,实验样品分为三组,分别为:第一组为正常全血和血清;第二组血样为高血糖全血;第三组为高胆固醇血清;用波长分别为 300, 340, 435, 486 和 546 nm 的光作为激发光,得到的荧光图样见图 4,图 4 每组中从上至下激发光波长依次是 300, 340, 435, 486 和 546 nm。

实验,在相同实验条件下,激发光强均相同。

下面对所测实验结果进行分析。

第一组样品为正常全血和血清,其中第一份为全血,第二份为血清,在后面的分析中,把它们的激发荧光图样作为标准图样,其他异常血样的荧光分析均通过对两者进行比较而得到。

3.1 高糖全血

血液中的糖称为血糖(Blood sugar),主要是葡萄糖(Glucose),其他的糖如果糖、半乳糖、甘露糖、五碳糖等是极其微量的。人体生命活动所需能量的 70% 由糖氧化供给。正常人血糖的浓度较为恒定,其浓度大致在 $3.9 \sim 6.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。血糖浓度高于 $7.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时称为高血糖(Hyperglycemia)。

第二组血液样品即为高血糖血液,本组样品中第一份血液的血糖浓度较高,医院检验值为 $9.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,第二份血液样品的血糖含量则非常高,为 $15.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,已属异常血样。

将所得的高血糖血液的荧光图样与正常全血的荧光图样相比较,可以发现(见图 4),

(1) 3 种样品血液的激发荧光强度均与激发光波长紧密相关,当激发光波长位于紫外光波段时,血液的激发荧光强度非常明显,而当激发光波长处于可见光波段时,所得的血液荧光均较弱,也就是说,当激发光波长由可见光波段逐渐向紫外光波段过渡时,所得的血液激发荧光强度也逐渐增强。

(2) 比较所得的三份全血,即第一组中的第一份和第二组中的两份的荧光图样,还可以看到,在相同的实验条件下,全血的激发荧光强度与全血中血糖的浓度有较大的关系。在不同波长的激发光激发下,第一组中正常全血的激发荧光强度都比较弱,而第二组中两份全血在对应的激发光激发下所得的荧光强度都要比正常全血的荧光强度高,其中血糖含量很高即血糖浓度为 $15.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血样荧光强度又要比浓度为 $9.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血样的荧光强度高一些,这种差别在激发光波长为 300, 340 和 435 nm 时尤为明显。这就表明了血液中血糖的浓度影响血液的激发荧光,其大致趋势是:在相同波长的激发光激发下,随着血糖浓度的提高,血液的激发荧光强度也逐渐增强。显然可见,血液中的血糖

也是一种荧光物质,其浓度对血液的荧光强度的影响也正与(13)式所得结果一致,这表明所得的实验结果是合理的,同时还表明了可以通过比较血液的激发荧光强度来区分血液中血糖浓度的高低,从而进一步将其应用于医疗诊断上。

3.2 高胆固醇血清

胆固醇(Cholesterol)是人体内脂类的重要组成成分之一,它的分子结构是环戊烷多氢菲的衍生物,参与组成生物膜,也是合成胆汁酸、类固醇激素及维生素 D_3 的前提,在人体中扮演着十分重要的角色。实验中所研究的是血清中的总胆固醇。血清总胆固醇由游离胆固醇和胆固醇酯(Cholesterol ester)组成,其中游离胆固醇约占 25%~30%,胆固醇酯占 70%~75%。正常人的血清中总胆固醇的含量在 $2.9 \sim 6.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间。如果血液中胆固醇浓度增高,即可沉积于血管壁,形成动脉粥样硬化,同时,对总胆固醇的测定,也可用于高脂蛋白血症和冠心病的诊断及发病机理的研究,因此,对血清中的总胆固醇进行分析有十分重要的意义。

第三组样品胆固醇含量均比正常血清的高,其中第一份稍微偏高,其浓度为 $6.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,第二份样品血清总胆固醇含量则达到了 $7.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

比较本组中两份高胆固醇血清样欠的荧光图样与第一组中正常血清(即第二份)的荧光图样,经分析可知。

首先,3 种样品的荧光强度随波长变化的趋势和前面所得的结果一致。

其次,比较正常血清与胆固醇含量稍高(即第三组中第一份血清样品)的激发荧光强度,可以发现在各种波长的激发光激发下,两份样品的荧光强度变化都比较微弱,也就是说,胆固醇含量稍高(本实验中为 $6.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的血清的荧光强度比正常血清的荧光强度稍微增强。而对胆固醇含量高达 $7.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血清(即第三组中第二份血清样品)来讲,在各种不同波长的激发光激发下,其荧光强度比前两者有明显的增强。尤其是当激发波长处于可见光波段时,即 435, 486 和 546 nm,前两者,也就是正常血清和胆固醇含量稍高的血清,荧光强度非常弱,几乎不可分辨,而胆固醇含量非常高的血清则呈现出明显的荧光现象。特别是激发波长为 435 nm 时,区别十分显著。这可以说明,血清中胆固醇对 435 nm 附近的光强烈吸收,并进而通过辐射弛豫发射出荧光,而且胆固醇含量越高,所得的荧光强度也越强。因此,根据血清的荧光强度可以知道血清中胆固醇含量的高低,尤其是当使用波长位于 435 nm 附近的激发光时,结果非常明显。

4 结束语

本文对高血糖全血和高胆固醇血清的荧光强度分别与正常血液及血清荧光强度进行比较,研究发现。

(1) 血液中血糖的浓度影响血液的激发荧光,其大致趋势是:在相同波长的激发光激发下,随着血糖浓度的提高,血液的激发荧光强度也逐渐增强。显然可见,血液中的血糖也是一种荧光物质,其浓度对血液的荧光强度的影响与(13)式所得结果一致,这表明所得的实验结果是合理的,同时还

表明了可以通过比较血液的激发荧光强度来区分血液中血糖浓度的高低,从而进一步将其应用于医疗诊断上。

(2)胆固醇含量越高,所得的荧光强度也越强。因此,根据血清的荧光强度可以知道血清中胆固醇含量的高低,尤其是当使用波长位于 435 nm 附近的激发光时,结果非常明显。

本文研究结果表明了高糖全血及高胆固醇血清的激发荧光强度比正常血样的荧光要强。因此,通过荧光分析技术应用,可以定性分析血样的异常,为血液检测及疾病诊断提供了一种快速的分析新技术。

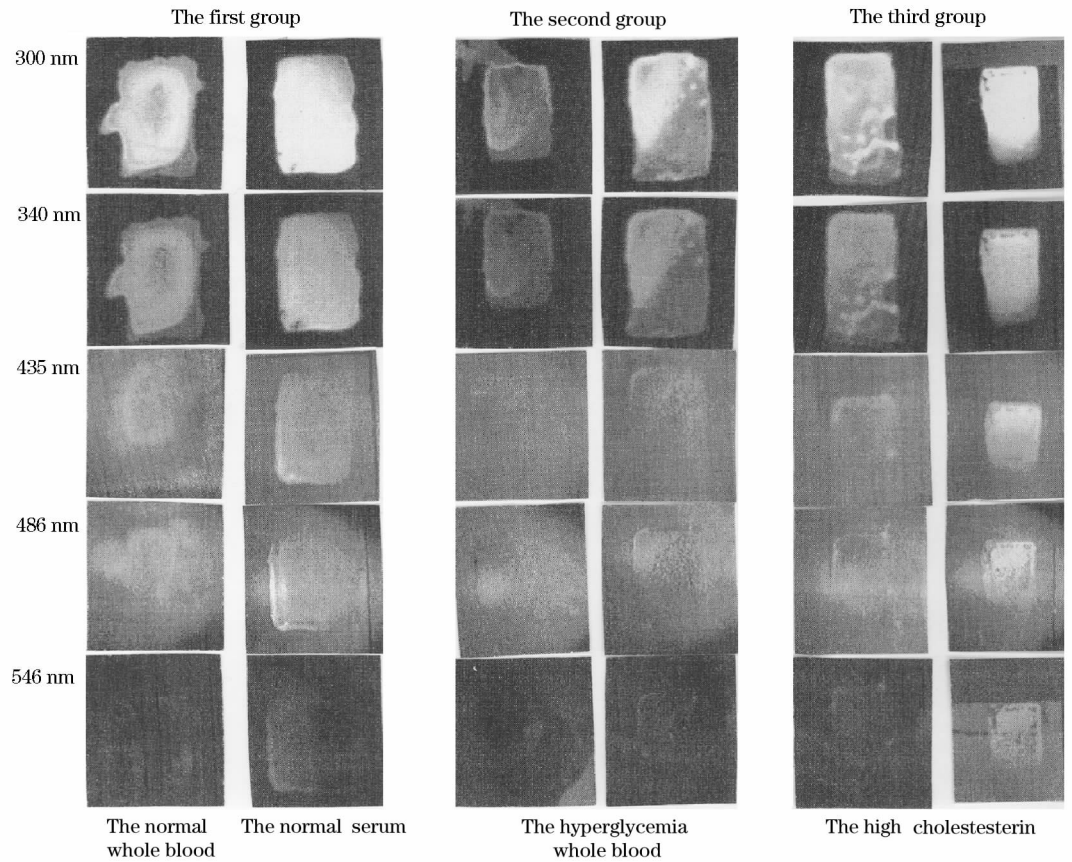


Fig. 4 Fluorescence intensity images of different blood samples

参 考 文 献

- [1] SHUN Zhou(孙州编译). Nanjing Daly(南京日报), 2004-02-20.
- [2] Li W, et al. Acta Biophysica Sinica, 1990, 6(2): 224.
- [3] El-Kashef H, Atia M A. Optics and Laser Technology, 1999, 31(2): 181.
- [4] DING Xiao-ping, MENG Chao, WANG Jian-lin, et al(丁小平, 孟超, 王建林, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(2): 225.
- [5] WANG Le-xin, ZHAO Zhi-min, YAO Hong-bing, et al(王乐新, 赵志敏, 姚红兵, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(6): 980.
- [6] ZHAO Zhi-min, CHEN Yu-ming, YU Xiao-lei, et al(赵志敏, 陈玉明, 俞晓磊, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(5): 922.

Analysis and Application of Excitation Fluorescence Intensity of Blood

ZHAO Zhi-min¹, GUO Lin-feng¹, YU Xiao-lei¹, MA Jun-yan², WANG Le-xin¹, XIN Yu-jun¹

1. College of Science, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China

2. Science and Technology College of Qingdao University, Qingdong 266071, China

Abstract The analysis technique of fluorescence is adopted to study the intensity of excitation fluorescence of blood in the present paper. The theoretical analysis and differences of normal and abnormal blood (hyperglycemia, hyperlipemia) are presented. The theoretical analysis was proved by experiment results. It was discovered that blood sugar consistency has an effect on blood fluorescence. In other words, with the same excitation wavelength and with blood sugar consistency increasing, the fluorescence intensity increases gradually. It is obvious that blood sugar is also a kind of fluorescein, and its consistency has an effect on fluorescence intensity, which is identical with the theoretical analysis, indicating that the experiment is successful, and it is possible to distinguish blood sugar consistency by comparing the fluorescence intensity in blood. It was also discovered that the higher the cholesterol content, the more intense the fluorescence, When excitation wavelength is especially 435 nm, the phenomenon is very obvious. The study paves a new way for the blood quick check and diagnosis of diseases.

Keywords Blood; Excitation fluorescence; Fluorescein Fluorescence intensity

(Received Dec. 10, 2004; accepted Apr. 20, 2005)