

心脏组织的自体荧光研究

徐正红^{1,2}, 张镇西^{1*}, 王晶¹, 李政¹, 刘雪良¹

1. 电力设备电气绝缘国家重点实验室, 西安交通大学电气工程学院, 陕西 西安 710049

2. 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安交通大学生命科学与技术学院, 陕西 西安 710049

摘要 测量并研究了家兔心脏组织自体荧光的三维光谱和发射光谱。果表明: 冰冻前后心室和心房组织的三维荧光光谱差异较主动脉明显, 说明冰冻后其 NADH 和 黄素的含量改变。心房、心室和主动脉组织在 340 nm 激发光下的自体荧光光谱具有特定的差异, 其主要荧光峰位于 460 nm 的 NADH, 以及 290~400 nm 之间的胶原蛋白和弹性蛋白。根据心房和心室组织的高斯拟和光谱发现, 光谱的峰位、相对荧光强度和半宽等参数各不相同。由此, 可以根据荧光光谱的谱形和峰强比可以显著区分出不同的心脏组织类型。此外, 研究首次发现心室组织 NADH 的荧光强度会随心肌死亡时间增加而衰减, 可作为死亡时间确定的新方法。

关键词 自体荧光; 荧光光谱; 内源性荧光物质; 心脏

中图分类号: O433 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)06-1651-05

引言

近年来, 国内外利用光与生物物质相互作用的医学光子技术发展迅猛, 其中激光诱导荧光光谱(Laser-induced fluorescence spectroscopy)技术在医学研究和诊断方面的应用也越来越普遍。激光诱导荧光光谱包括两大类: 自体荧光(内源性)光谱和药物荧光(外源性)光谱^[1-4]。由于自体荧光检测无须外加光敏物质, 其光谱检测更为便捷和可靠。相同类型组织的自体荧光光谱相似, 不同类型组织的荧光光谱存在差异。通过测量组织的自体荧光光谱不仅可以检测和确定组织的生化成份及含量, 而且还可以根据同一类型的正常组织与癌组织在自体荧光光谱的峰位、强度和峰值变化速率等项的差异性进行各种癌症的早期诊断^[5-10]。

为了分析心肌组织的自体荧光光谱特性, 本研究利用荧光分光光度计分别测量了家兔心房、心室和主动脉新鲜组织和低温快速冰冻组织的三维荧光光谱, 比较了它们各自的特点; 通过分析荧光的激发-发射对, 确定了组织自体荧光的内源性物质来源; 探讨了利用荧光光谱的峰值比判别心脏不同部位组织类型的可行性; 研究了心肌 NADH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)的荧光峰与心肌死亡时间的关系等内容。这些

研究结果为今后心肌组织自体荧光的进一步研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 样品及其制备

2 kg 左右的家兔 5 只, 耳廓后部静脉注射麻醉药戊巴比妥钠(35 mg · kg⁻¹)及肝素(1 000 单位 · kg⁻¹), 麻醉后剪开胸肋骨快速取出心脏。通过主动脉套管注入生理盐水, 冲洗冠状血管内的残留血液, 直到冲出液为无色后立即在心脏的左右心室、左右心房和主动脉 5 个部位取样, 样本大小约 10 mm × 10 mm × 1.2 mm。新鲜的待测样品浸泡在生理盐水中以保持组织活性, 测量时取出夹在光谱仪的固体样品支架中进行荧光光谱测量。新鲜组织的测量在 0.5~1 h 内完成。测量结束后, 将组织保存在低温冰箱中(-30 °C)冰冻, 经过 24 h 后再次进行上述测量。为了减少随机误差, 测量时每一样品改变位置测量 5 次后取平均值。

1.2 主要实验仪器

实验采用 HITACHI F-4500 荧光分光光度计, 荧光光谱的数据分析软件是和光度计配套的 FL Solution 软件。

收稿日期: 2008-03-03, 修订日期: 2008-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(60378018, 60578026)资助

作者简介: 徐正红, 女, 1969 年生, 西安交通大学电气工程学院副教授 e-mail: zhxu@mail.xjtu.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: zxzhang@mail.xjtu.edu.cn

2 实验结果

2.1 心脏三维自体荧光光谱

实验测量新鲜和冰冻心脏的心房、心室和主动脉(外壁)的三维自体荧光光谱,其测量条件为:激发光波长 230~550 nm;发射波长 320~700 nm,狭缝 2.5 nm,步长 10 nm。测量发现,左右心房组织的三维荧光光谱近似,同样左右心室组织的光谱近似,但都与主动脉的荧光光谱有明显不同。如图 1 所示,冰冻 24 h 后心房和心室组织三维光谱与新鲜组织

相比有明显差异,见图中箭头所指区域。实心箭头所指部分是黄素的激发-发射对^[6-10],冰冻后心房和心室组织这一部分的自体荧光都明显增强。在心室组织光谱中,空心箭头所指区域(即激发波长 EX=320~400 nm,荧光发射波长 EM=400~600 nm)有明显的荧光峰,对应的主要荧光物质为 NADH^[6-10],而冰冻后其荧光强度则明显衰减。但是心房组织和主动脉组织冰冻前后在这一区域差异并不显著。而主动脉冰冻前后的三维荧光光谱差异很小,这说明所含的荧光物质基本不变。

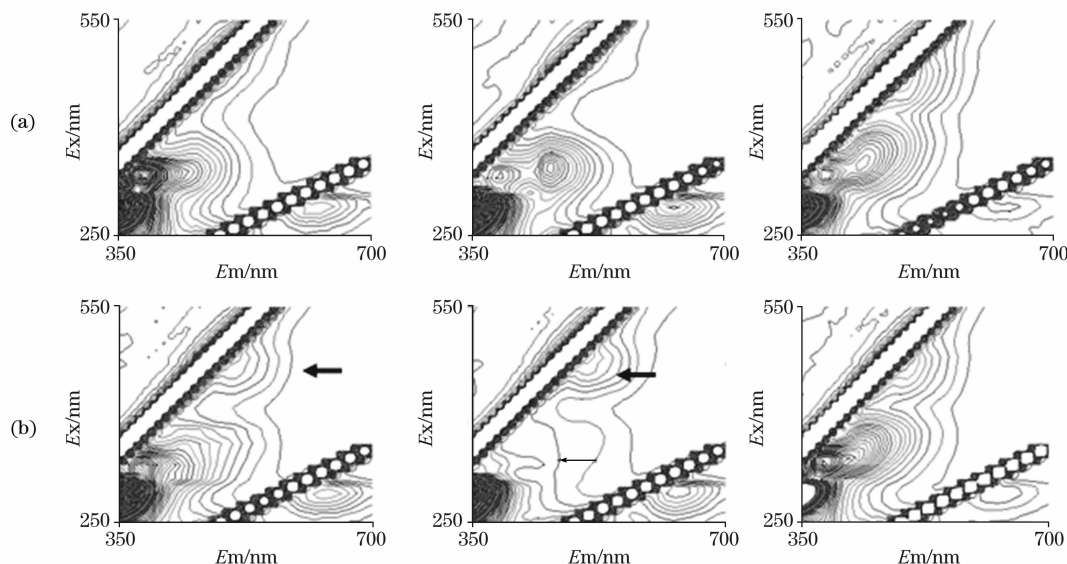


Fig. 1 Three-dimensional autofluorescence spectra of the fresh (a) and iced (b) tissues of a rabbit heart

Left: Atria; Middle: Ventricle; right: Main artery

2.2 新鲜组织的二维荧光光谱

为了比较不同部位组织自体荧光的特点,实验测量了上述三种组织的二维荧光发射光谱(见图 2)。选用的激发光波长是 340 nm,荧光发射波长为 360~520 nm,狭缝分别为 5.0 nm。这一激发波长和荧光测量范围是组织自体荧光研究中常用研究参数,对应的主要荧光物质是荧光峰为 460 nm 的 NADH,以及荧光峰约在 290~400 nm 之间的胶原蛋白和

弹性蛋白。

从图 2 可以看出主动脉组织只有一个荧光峰,而心房与心室组织荧光发射光谱都有两个荧光峰。左、右心房组织的荧光光谱形态相似而左、右心室组织光谱形态也相似。其中,心房与心室组织的荧光峰位有一定差异。心房组织的第一荧光峰明显高于第二荧光峰,而心室组织恰恰相反,是第二荧光峰明显高于第一荧光峰。心房和心室组织的荧光发射光谱的峰位(λ_1, λ_2)、荧光强度(I_1, I_2)和峰强比(R)如表 1 所示。从表中可以看出,在多次测量中荧光峰位的变化小而荧光光强的变化比较大。其原因是每次实验的样本大小及荧光分光光度计的光源强度等因素有变化,从而造成这些差异。为了更好地根据荧光光谱区分心房和心室组织,我们采用了峰强比 R 这个特征参数,它表示荧光光谱中的第二个峰的荧光强度和第一个峰的荧光强度的比值。从表 1 的结果可以发现,心房的峰强比 R 是小于 1 的,而心室相反,峰强比 R 总是大于 1,两者的区别非常明显。

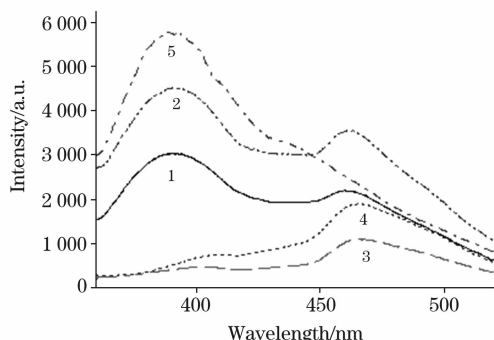


Fig. 2 Autofluorescence spectra of different heart tissues at the excitation wavelength of 340 nm

1: Right atria; 2: Left atria;

3: Right ventricle; 4: Left ventricle; 5: Main artery

为了进一步分析心房和心室组织荧光光谱的特性,我们用一组高斯函数分别拟合上述光谱曲线。采用的方法是:对上述两类荧光光谱曲线求负二阶导数,取该负二阶导数谱线的极大值位置(对应荧光光谱曲线的峰值位置或肩位置)所对应的波长作为各高斯函数见式(1)的初始中心波长 X_0 ;而

高斯函数的另外 2 个参量(强度 A 和半宽 W), 由拟合函数按最小二乘原则拟和而得到。

$$y = y_0 + \frac{A}{W \sqrt{\pi I/2}} e^{-2 \left(\frac{x-x_c}{W} \right)^2} \quad (1)$$

心房和心室组织都包含 4 个拟和荧光峰, 其峰位 (X_c)、

相对荧光强度(A)和半宽 W 等参数如表 2 所示, 其拟和光谱见图 3。结果表明, 心室组织的胶原质(390~400 nm)、弹性蛋白(420~440 nm)比心房要少; 心室组织的 NADH 峰(460 nm)明显高于心房组织, 说明心室组织中的 NADH 含量更高。

Table 1 Spectra characters of atria and ventricle at the excitation wavelength of 340 nm

组织	λ_1/nm	$I_1(\text{a. u.})$	λ_2/nm	$I_2(\text{a. u.})$	$R=I_2/I_1$
心房	390.30±0.469 6	3 653.90±317.95	460.31±0.556 8	3 735.60±364.38	0.821 6±0.027 3
心室	402.86±0.970 5	858.49±85.66	464.49±0.158 7	1 645.30±90.62	1.984 8±0.138 2
主动脉	390.13±0.354 2	2 196.67±96.34	0	0	0

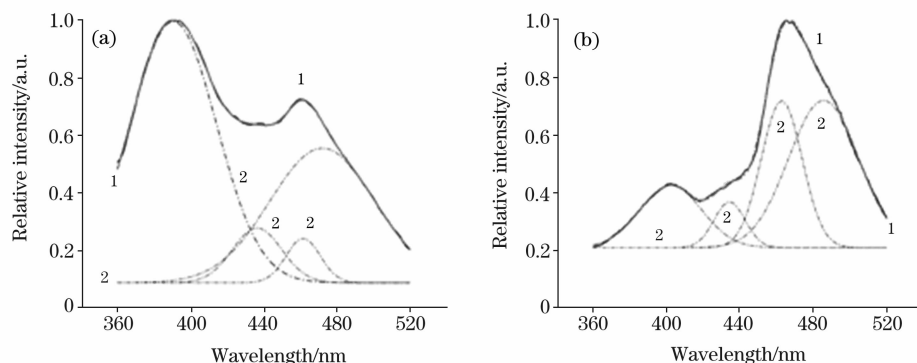


Fig. 3 Measured spectra and the Gauss spectra of atria and ventricle tissues

1: Measured spectrum; 2: Gauss spectrum; (a): Atria; (b): Ventricle

Table 2 Gauss spectra parameters of atria and ventricle

样品	参数	1	2	3	4
心房 ($y_0=0.088$)	X_c/nm	390.53	436.41	461.66	472.16
	W/nm	47.31	26.98	18.66	57.52
	A	53.82	6.44	3.61	33.67
心室 ($y_0=0.201$)	X_c/nm	402.23	434.30	462.76	485.61
	W/nm	33.72	16.87	22.29	38.17
	A	9.16	3.38	14.29	24.48

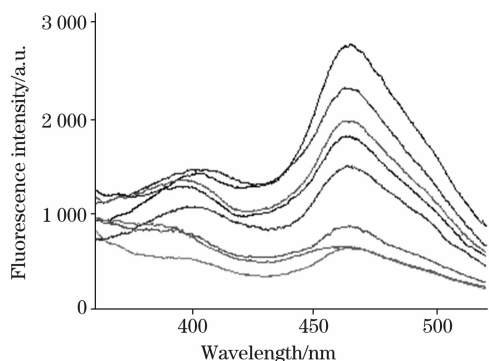


Fig. 4 Autofluorescence spectra of the left ventricle at the excitation wavelength of 340 nm in 0-315 min (spectra intervals are 45 min from the top to bottom)

2.3 NADH 荧光光谱特性

在室温 20 °C 下实验测量了 340 nm 激发光下心室肌组织在心肌死亡(即样本获取)后不同时间(0~315 min)测量到的荧光发射光谱, 测量间隔为 45 min, 如图 4 所示。结果发现, 心肌死亡时间不同则光谱的谱形和强度都有差异。从整体上看, 心室肌组织的自体荧光强度是随死亡时间的增加而下降的, 特别是 460 nm 所对应的 NADH 荧光峰的下降更为显著。

3 讨论与结论

根据心脏自体荧光光谱的特性和参数, 可以对以下几个方面进行讨论并获得结论。

(1) 冰冻对自体荧光光谱的影响

冰冻前后心室和心房组织的自体荧光有明显差异, 而主动脉的差异很小。新鲜心室组织有明显的 NADH 峰, 冰冻后 NADH 含量降低; 而新鲜心房和主动脉组织的 NADH 含量本来相对心室组织少, 所以冰冻前后差异较小。和新鲜组织相比, 冰冻后心房和心室组织则有明显的黄素峰。这一研究结果表明, 样本的冰冻处理对不同组织自体荧光的影响并不相同, 有些组织的影响小而有些组织的影响较大。所以在自体荧光研究中, 为了使测量更为准确应尽量采用新鲜组织样本并尽快进行光谱测量, 这样才能保证数据的精确性, 克服其他因素(如冰冻等)对测量结果的影响。

(2) 心脏不同部位组织的光谱区分

Filippidis 等^[11]测量了激发光为 457.9 nm 羔羊不同部位心脏组织在 547~671 nm 范围的荧光光谱,并将光谱分为 12 个区域,每个区域光谱宽度为 5 nm(如 547~562 nm 等)。他们先计算每个区域内荧光的平均强度,再根据不同的内算法重构出 $A_1 \sim A_{12}$ 这 12 个特征值,并用来自区分心脏不同部位组织。而这种方法只能区分心室与主动脉或心室与心房组织,却无法分辨心房组织和主动脉。而在我们实验中,根据 340 nm 激发光下心脏不同部位组织荧光光谱的谱形和峰强比 R 两个特征值是可以显著区分出心室、心房和主动脉三种组织,其方法更为简便。

(3) NADH 的荧光强度随心肌死亡时间衰减

因为 NADH 在生物组织中主要用于糖酵解和细胞呼吸作用中的柠檬酸循环,它的含量变化和新陈代谢相关,所以这一荧光物质的含量会随死亡时间而衰减。心室肌死亡时间

越长,细胞的活性降低,则 NADH 含量越少。虽然量化这一特性有一定困难,需要考虑环境和测量条件等因素的影响,但通过多次实验发现,其光谱的变化趋势却是一致的。这样,根据光谱第一峰(约 400 nm)和第二峰(约 460 nm)荧光光强的比值,还是有可能准确判定出心肌组织在 0~300 min 的确切死亡时间。法医学现有确定早期死亡时间的方法主要是根据死者尸体现象,如尸斑、尸冷、尸温等^[12],也有文献报道利用骨骼肌 pH 值、肌红蛋白降解、视网膜细胞 mRNA 降解等技术来确定死亡时间^[13-15]。由于国内医学界普遍将心脏停跳作为人体死亡的依据,而心脏在体内受外界环境因素的影响较小,所以若能将这一发现做进一步的量化研究,充分掌握心肌组织 NADH 荧光强度随心肌死亡时间衰减的规律,将有助于法医精确确定死者的死亡时间,为侦破刑事案件提供有力证据。

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] A Amar O, Guillemin F, Begorre H, et al. Proc. of SPIE, 1997, 3197: 41.
- [3] XU Zheng-hong, ZHANG Zhen-xi, WANG Jing, et al(徐正红, 张镇西, 王 晶, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(7): 1359.
- [4] Perk M, Flynn G J, Smith C, et al. Lasers in Surgery and Medicine, 1991, 11(6): 523.
- [5] Xu Z H, Zhang Z X, Jin Y B, et al. Computers in Biology and Medicine, 2007, 37(5): 732.
- [6] Pitts J D, Sloboda R D, Dragenc K, et al. Journal of Biomedical Optics, 2001, 6(1): 31.
- [7] WANG Wei, SUN Yu-e, ZHOU Nai-kang, et al(王 伟, 孙玉鹏, 周乃康, 等). Chin. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.(中华胸心血管外科杂志), 2000, 16(4): 202.
- [8] SHI Xiao-feng, MA Jun, MAO Wei-zheng, et al(史晓凤, 马 君, 毛伟征, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(2): 295.
- [9] LUO Qing-ming, GONG Hui, LIU Xian-de, et al(骆清铭, 龚 辉, 刘贤德, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1997, 17(3): 105.
- [10] Zhao L L, Qu J L, Niu H B. Proc. of SPIE, 2007, 6826: 682614.
- [11] Filippidis G, Zacharakis G, Kochiadakis G E. Proc of SPIE, 2003, 5068: 202.
- [12] JIN Ju, LIAO Zhi-gang(金 菊, 廖志钢). Journal of Medical Forum(医药论坛杂志), 2006, 27(1): 93.
- [13] DANG Yong-hui, WANG Zhen-yuan, ZHANG Lian-he, et al(党永辉, 王振原, 张联合, 等). Chin. J. Forensic Medicine(中国法医学杂志), 2005, 20(4): 202.
- [14] BIAN Jie, SHEN Yi-wen, ZHAO Zi-qin(卞 杰, 沈忆文, 赵子琴). Journal of Forensic Medicine(法医学杂志), 2007, 23(2): 90.
- [15] CHEN Xiao-rui, YI Shao-hua, YANG Li-ping, et al(陈晓瑞, 易少华, 杨丽萍, 等). Chin. J. Forensic Medicine(中国法医学杂志), 2007, 22(3): 169.

Research on the Autofluorescence Spectroscopy of Heart Tissues

XU Zheng-hong^{1, 2}, ZHANG Zhen-xi^{1*}, WANG Jing¹, LI Zheng¹, LIU Xue-liang¹

1. State Key Laboratory of Power Equipment and Electrical Insulation, School of Electrical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China
2. Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

Abstract The present study investigated the three-dimensional spectra and emission spectra of the autofluorescence of rabbit hearts. The results suggested that the three-dimensional spectra of the iced atria and ventricle were observed more evidently different from that of the fresh tissue compared to the main artery, which indicated that the amount of flavins and NADHs changed. Also, the atria, ventricle and main artery have different specific excitation spectra at the wavelength of 340 nm. The

main fluorescence peaks were of NADH (at about 460 nm), collagen and elastin (at about 290-400 nm). The Gauss spectra of atria and ventricle were different in the peak value, relative intensity and half width. So the ratios of fluorescence intensities of peaks may be used to distinguish different heart tissues. Furthermore, a phenomenon was firstly uncovered that the autofluorescence intensity of NADH in ventricle decays with the time of death and it could be a useful method for the estimation of postmortem interval.

Keywords Autofluorescence; Fluorescence spectrum; Endogenous fluorophores; Heart

* Corresponding author

(Received Mar. 3, 2008; accepted Jun. 6, 2008)

学术活动简讯

February 2009

1-4 Advanced Solid-State Photonics 2009 OSA Optics & Photonics Congress (ASSP),
Grand Hyatt Denver, Denver, CO;

Contact: Optical Society of America, 2010 Massachusetts Ave., NW, Washington, DC 20036-1023; Tel. (202) 416-1907, or
(800) 723-4632, Fax: (202) 416-6140;

E-mail: custserv@osa.org

Web site: <http://www.osa.org/assp>

2-7 Young Optical Scientists Conference (YOSC),
Moscow, Russia;

Contact: Vahan Senekerimyan,

E-mail: vahan@caltech.edu

Web site: <http://www.yosconf.org/>

15-20 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry,
Graz, Austria;

Contact: Ms. Astrid Tuider, Conference Secretary, Karl-Franzens University Graz,

Institute of Chemistry/Analytical Chemistry, Universitätsplatz 1, A-8010 Graz,

Austria; Tel. 43 316 380 5300, Fax: 43 316 380 9845;

E-mail: astrid.tuider@uni-graz.at

Web site: <http://www.winterplasmagraz.at/>

20-22 National 2DCOS Symposium 2009,

Rincón, Puerto Rico;

Contact: Dr. Belinda Pastrana, Department of Chemistry, University of Puerto Rico, P. O. Box 9019, Mayaguez, PR 00681-9019; Tel. (787) 265-6520, Fax: (787) 265-3849;

E-mail: 2DCOS@uprm.edu

Web site: <http://www.2dcos.uprm.edu/>

March 2009

7-11 International Workshop on Optical Terahertz Science and Technology (OTST),
Santa Barbara, CA;

Contact: Andrea Markelz,

E-mail: amarkelz@buffalo.edu

Web site: <http://conference.iqcd.ucsb.edu/OTST/index.php>