

# 基于皮秒时间分辨的癌细胞荧光寿命研究

陈碧芳<sup>1</sup>, 刘天夫<sup>2</sup>

1. 嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001

2. 中国计量学院信息工程系, 浙江 杭州 310018

**摘要** 研究了用于癌症诊断与治疗的光敏剂血卟啉(hematoporphyrin derivative, HPD)的超快光动力学过程, 采用超短脉冲激光光谱技术和皮秒时间相关单光子计数系统, 测量了经血卟啉培养的活体癌细胞与正常细胞的皮秒时间分辨荧光光谱及荧光峰值强度随时间衰变曲线, 观测到: 癌细胞与正常细胞样品荧光寿命的快成分分别为 150 和 300 ps; 癌细胞与正常细胞的荧光峰值强度经 12 h 分别衰减 10% 和 55%。经对测量所得的荧光衰减曲线进行分析, 计算出癌细胞与正常细胞的荧光寿命分别为 824 和 1798 ps; 血卟啉在癌细胞与正常细胞样品中滞留时间分别为 17 天和 6 天。结果表明癌细胞与正常细胞对血卟啉亲和性及对血卟啉滞留的稳定性有显著差异, 测量结果确认了荧光光谱技术诊断与治疗癌症的可行性, 并对实时监测生物样品微弱超快荧光具有重要的指导意义和临床应用价值。

**主题词** 荧光寿命测量; 时间相关单光子计数; 癌细胞; 血卟啉

**中图分类号:** TN249 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)08-1513-03

## 引言

在生物医学研究领域, 生物样品荧光现象不仅十分微弱, 而且弛豫过程大多在  $10^{-9} \sim 10^{-15}$  s 范围。利用超短 ( $10^{-12} \sim 10^{-18}$  s) 激光脉冲抽运生物样品和超快时间分辨激光光谱技术, 就能够对生物样品微弱的超快荧光进行方便而有效的检测。随着超短激光技术的飞速发展, 高探测灵敏度、高时间分辨率光谱技术在生命科学中的应用也越来越广泛<sup>[1]</sup>。

为了研究用于癌症诊断与治疗的光敏剂血卟啉(hematoporphyrin derivative, HPD)的超快光动力学过程, 采用超短脉冲激光光谱技术和皮秒时间相关单光子计数系统, 测量经血卟啉培养的活体癌细胞与正常细胞的皮秒时间分辨荧光光谱及荧光峰值强度随时间衰变曲线, 并测量不同浓度血卟啉的时间分辨荧光光谱, 观测癌细胞与正常细胞及不同浓度血卟啉的时间分辨荧光光谱特性曲线, 并对时间分辨荧光光谱曲线进行分析, 以期找到其变化规律。

## 1 实验方法

### 1.1 细胞培养

活体癌细胞取自急性淋巴白血病人的 T 细胞系病源细

胞(分类为 MOLT-4), 正常细胞取自同一来源的 T 细胞系正常胸腺淋巴细胞(Thymus lymphocyte)。样品的制备方法: 分别将两种活体细胞在 37 °C 以下、 $0.6 \times 10^{-3}$  mg · mL<sup>-1</sup> 浓度的血卟啉水溶液中培养 4 h, 用离心泵将细胞以外的血卟啉洗净滤除后, 制成实验用的正常与癌变活体细胞样品。

### 1.2 实验仪器

美国光谱物理公司生产的 171 型主动锁膜 Ar<sup>+</sup> 激光器, 它能够产生脉冲宽度为 100 ps, 82 MHz, 波长为 488.0 nm, 功率 0~100 mW 可变的泵浦光源, 抽运经培养制备后的活体细胞样品。

样品发出的荧光很微弱, 因此采用高探测灵敏度、高时间分辨率的时间相关单光子计数系统检测, 该系统不但可以像普通光子计数器那样, 允许长时间数字化积累以提高检测灵敏度, 同时, 还可以像取样积分器那样, 方便地选择采样点数, 精确地记录被测周期信号的波形, 并采用日本滨松光电公司生产的 R1564U 型光电倍增管, 保证了检测系统皮秒分辨率<sup>[2]</sup>。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 癌细胞与正常细胞荧光寿命比较

用 488.0 nm 波长的超短脉冲激光抽运样品, 测量癌细

收稿日期: 2005-06-24, 修订日期: 2005-11-11

基金项目: 浙江省自然科学基金(M603256)资助项目

作者简介: 陈碧芳, 女, 1960 年生, 嘉兴学院医学院高级讲师

胞 (MOLT-4) 和正常细胞两种样品的荧光寿命特性<sup>[3]</sup>, 其结果如图 1 所示。在图 1 中, 曲线 1 是癌细胞 MOLT-4 样品的荧光寿命特性曲线, 它的快成分  $T_1$  约为 150 ps, 慢成分  $T_2$  约为 1 200 ps。曲线 2 是正常细胞样品的荧光寿命特性曲线, 它的快成分  $T_1$  约为 300 ps, 慢成分  $T_2$  约为 2 500 ps。

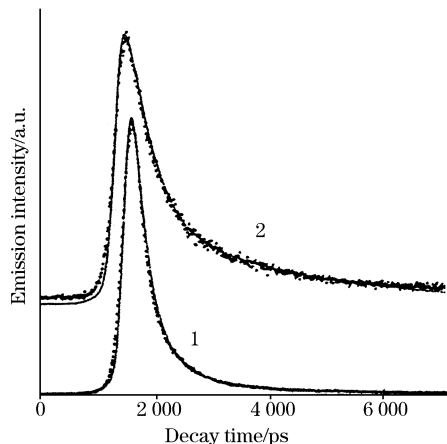


Fig. 1 Fluorescence decay of normal and cancerous cells

1: Cancerous cell (MOLT-4),  $T_1=150$  ps,  $T_2=1\ 200$  ps;  
2: Normal cell,  $T_1=300$  ps,  $T_2=2\ 500$  ps

癌细胞与正常细胞荧光寿命特性曲线的快成分与慢成分有明显差别, 反映了癌细胞对血卟啉高亲和性在荧光寿命上的特点。

## 2.2 癌细胞与正常细胞荧光峰值强度变化比较

血卟啉被吸收后, 两种活体细胞组织内的血卟啉浓度如何变化, 为此对两种活体细胞样品的荧光光谱峰值强度随时间的变化关系进行测量。如图 2 所示为癌细胞和正常细胞在  $15\ 500\ \text{cm}^{-1}$  ( $645\ \text{nm}$ ) 的荧光峰值强度随时间的变化曲线。

在  $15\ 500\ \text{cm}^{-1}$  ( $645\ \text{nm}$ ) 处荧光峰值幅度减少, 可认为是细胞组织血卟啉浓度降低所致。从图 2 可看到, 人体正常细胞内血卟啉浓度衰减很快, 经 12 h 其浓度衰减约 55%, 而癌细胞内血卟啉浓度却变化非常缓慢, 经 12 h 其浓度衰减约 10%, 这也显示出癌细胞对血卟啉很强的亲和性及对血卟啉滞留的稳定性。

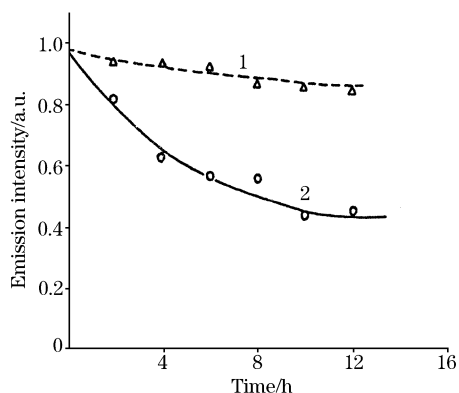


Fig. 2 Time dependent intensity of alive cells

1: Cancerous cell (MOLT-4); 2: Normal cell

## 2.3 不同浓度血卟啉荧光寿命比较

用  $488.0\ \text{nm}$  波长的超短脉冲激光分别抽运浓度  $0.6 \times 10^{-2}\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.6\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的血卟啉水溶液样品, 测量在  $15\ 500\ \text{cm}^{-1}$  ( $645\ \text{nm}$ ) 处两种样品的荧光寿命特性, 其结果如图 3 所示。在图 3 中,  $0.6\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  血卟啉水溶液样品的荧光寿命特性曲线出现了  $150 \sim 300$  ps 的快成分,  $0.6 \times 10^{-2}\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  血卟啉水溶液样品的荧光寿命特性曲线没有出现快成分。

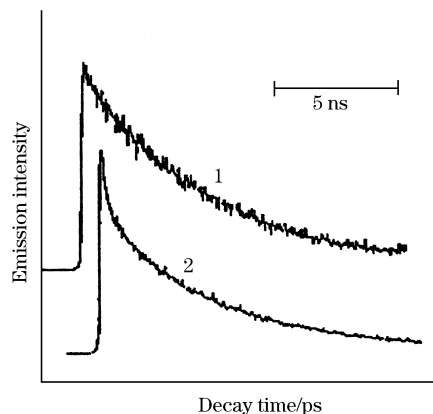


Fig. 3 Fluorescence decay of different concentration HPD

1:  $0.6 \times 10^{-2}\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 2:  $0.6\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

血卟啉是具有特殊活性的有机大分子, 血卟啉分子的大环形成一个  $P\pi$  共轭体系, 血卟啉浓度不同, 溶液中血卟啉的单体、二聚体和聚集体的比例也不同。在高浓度血卟啉溶液中二聚体和聚集体含量增加。测量中随着浓度增加, 血卟啉水溶液的荧光寿命曲线出现了  $150 \sim 300$  ps 快成分, 反映了高浓度血卟啉荧光寿命的特点。

## 2.4 荧光衰减曲线分析

由荧光衰减曲线经过多指数函数

$$I(t) = c_1 \exp(-t/\tau_1) + c_2 \exp(-t/\tau_2) + c_3 \exp(-t/\tau_3)$$

拟合后, 可根据公式

$$\langle \tau \rangle = \frac{c_1 \tau_1^2 + c_2 \tau_2^2 + c_3 \tau_3^2}{c_1 \tau_1 + c_2 \tau_2 + c_3 \tau_3}$$

计算出该荧光衰减曲线的荧光平均寿命<sup>[4,5]</sup>。

在 MATLAB 软件中, 对荧光衰减曲线数据进行多指数函数的最小二乘法拟合时, 拟合曲线与拟合曲线函数及统计检验指标同时产生, 非常方便。统计指标 SSE (the sum of squares due to error) 是拟合的最小误差平方和, 该值接近于 0 表示拟合较好, 统计指标 R-Square (the square of the multiple correlation coefficient) 是多重相关系数的平方, 该值接近于 1 表示拟合较好。

癌细胞与正常细胞样品的荧光寿命、不同浓度血卟啉的荧光寿命、血卟啉在癌细胞与正常细胞样品中滞留时间如表 1 所示, 结果表明: 癌细胞与正常细胞样品的荧光寿命分别为 824 和 1 798 ps, 两者存在显著差异; 浓度  $0.6\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  血卟啉和  $0.6 \times 10^{-2}\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  血卟啉荧光寿命分别为 4 690 和 5 092 ps, 血卟啉浓度提高 2 个数量级时荧光寿命变短; 血卟啉在癌细胞与正常细胞样品中平均滞留时间分别为

81.8 和 28.2 h。在理论上,当滞留时间为平均滞留时间的 5 倍时,荧光峰值强度将衰减到最大值的 1% 以下,即可认为血卟啉在癌细胞与正常细胞样品中滞留时间分别为 409 h(约 17 天)和 141 h(约 6 天),血卟啉在癌细胞与正常细胞样品中平均滞留时间及滞留时间存在显著差异。

Table 1 Measured fluorescence lifetimes

	荧光寿命 $\tau$ /ps	拟合函数	SSE	r-Square
癌细胞	824	双指数	0.907 6	0.9987
正常细胞	179 8	三指数	0.190 2	0.999 8
0.6 mg · mL <sup>-1</sup> 血卟啉	469 0	双指数	0.034 9	0.999 6
0.6 × 10 <sup>-2</sup> mg · mL <sup>-1</sup> 血卟啉	509 2	三指数	0.100 4	0.999 2
血卟啉在癌细胞中平均滞留时间	$\tau=81.8$ h	单指数	0.000 59	0.959 9
血卟啉在正常细胞中平均滞留时间	$\tau=28.2$ h	三指数	0.000 64	0.9975 3

### 3 结 论

实验研究了光敏剂血卟啉在癌细胞与正常细胞中的超快光动力学过程,测量经血卟啉培养的活体癌细胞与正常细胞的皮秒时间分辨荧光光谱及荧光峰值强度随时间衰变曲线,并测量不同浓度血卟啉的时间分辨荧光光谱,观测到:癌细胞与正常细胞样品荧光寿命的快成分分别为 150 和 300 ps;癌细胞与正常细胞样品荧光峰值强度经 12 h 分别衰减 10% 和 55%;随着浓度增加,血卟啉水溶液的荧光寿命出现了

150~300 ps 快成分。对测量所得的荧光衰减曲线分析,计算出:癌细胞与正常细胞样品荧光寿命分别为 824 和 1 798 ps;血卟啉浓度较高时荧光寿命较短;血卟啉在癌细胞与正常细胞样品中滞留时间分别为 17 天和 6 天。

测量结果表明癌细胞与正常细胞荧光寿命特性及荧光峰值强度随时间变化相差十分明显,反映了癌细胞与正常细胞对血卟啉亲和性及对血卟啉滞留的稳定性有显著差异。测量结果确认了荧光光谱技术诊断与治疗癌症的可行性,并对开展皮秒时间相关单光子计数系统实时监测生物样品微弱超快荧光具有重要的指导意义和临床应用价值。

### 参 考 文 献

- [1] Jung D, et al. *Opt. Lett.*, 1997, 22: 1009.
- [2] Kinoshita S, et al. *Journal of Luminescence*, 1988, 40-41: 581.
- [3] LIU Tian-fu, HU Gui-lin(刘天夫, 胡桂林). *Physics(物理)*, 2002, 31(9): 593.
- [4] LI Bu-hong, LU Zu-kang, XIE Shu-sen(李步洪, 陆祖康, 谢树森). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2003, 23(2): 331.
- [5] ZHANG Xiu-feng, SONG Ke-fei, YU Tao, et al(张秀峰, 宋克菲, 于涛, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(12): 1489.

## Study of Cancer Cells Fluorescence Lifetime Based on Picosecond Time Resolution

CHEN Bi-fang<sup>1</sup>, LIU Tian-fu<sup>2</sup>

1. Department of Medicine Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China

2. Department of Information Engineering, China Institute of Metrology, Hangzhou 310018, China

**Abstract** The object of the present study was the ultrafast photodynamic processes of hematoporphyrin derivative (HPD) for diagnosis and therapy of cancer. Time-resolved fluorescence spectra of cancerous and normal cells were measured using an ultra-short pulse laser spectral technique and picosecond time-correlated single-photon counting system. The fast part of cancerous and normal cells fluorescence decay was approximately 150 and 300 ps, the fluorescence peak intensity of cancerous and normal cells decayed about 10% and 55% in 12 hour, the lifetime of cancerous and normal cells was about 824 and 1 798 ps by calculating date of fluorescence decay, and HPD stay time was about 17 and 6 days in the cancerous and normal cells sample respectively. The data show that cancerous cells were greatly intimate with HPD. The results obtained can be used as an important basis for the diagnosis of cancer based on ultrashort pulse laser spectral technique. The results will contribute to feebleness ultrafast fluorescence of biology sample for real time measurement.

**Keywords** Fluorescence decay measurement; Time-correlated single-photon counting; Cancerous cells; Hematoporphyrin derivative

(Received Jun. 24, 2005; accepted Nov. 11, 2005)