

## 低频超声波和甘油对皮肤组织光学透明的反射光谱研究

钟会清<sup>1</sup>, 郭周义<sup>1</sup>, 魏华江<sup>1\*</sup>, 张祖德<sup>1</sup>, 杨洪钦<sup>2</sup>, 谢树森<sup>2</sup>

1. 华南师范大学激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631

2. 福建师范大学医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350007

**摘要** 研究了经低频超声波和促渗剂处理后的猪皮组织在波长为 400~860 nm 范围内随时间变化反射光谱特性的变化及各组于 580 nm 处分别在 0~15 min 和 15~30 min 时间段各组反射光谱的改变程度。实验采用带积分球附件的 AvaSpec-2048 光纤光谱仪测量系统。结果表明: 在波长为 400~860 nm 范围内, 空白对照组在整个过程中组织的反射光谱变化比较少; 经超声波处理后组织对光的反射率在 0~15 min 内是增加的, 而且变化相对明显, 但随着距超声波停止处理的时间加长, 组织对光的反射率又慢慢恢复原状; 经 80% 甘油处理组相对于空白对照组反射率减少得比较快; 经超声波和 80% 甘油处理后组织的反射率变化最明显, 特别是在 0~15 min 内下降速度最快, 而且对于波长 580 nm 处在 0~15 min 时间内第 4 组组织反射率变化的速率与其他组在相同时间段内比较是: 为第 1 组的约 4.0 倍和第 3 组的约 2.3 倍(在 0~15 min 时间内), 第 1 组组织反射率减少了 1.896%; 第 3 组组织反射率减少了 3.316%; 第 4 组组织反射率减少了 7.551%。从上面的结果发现, 超声波和促渗剂 80% 甘油对皮组织的光透明性不仅具有协同效应, 而且可以使皮组织在短时间改善光透明性。

**关键词** 光学透明; 甘油; 低频超声波; 反射光谱; 生物组织

**中图分类号:** R318.5 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)12-3190-05

### 引言

随着科学的发展, 医疗的需要, 光学成像和激光治疗等光子技术在生物和医学上的应用的发展已成为重要的课题之一。其研究的对象主要是生物组织, 但由于各种生物组织具有高散射性, 因此不利于对深层组织的成像, 使光子技术只能用于浅表组织<sup>[1-4]</sup>。

为了改善光子技术对组织的成像深度, 对于组织的研究主要采用了两种类型: 一类是化学方法; 另一类是物理方法。采用的物理方法有超声波、电穿孔法和离子电渗<sup>[5]</sup>等。化学方法有施加光透明剂, 如 Tuchin 和 He 等分别研究了只要提高组织固体成分和胞内外间的折射率匹配度, 就能降低生物组织对光的散射特性<sup>[6, 7]</sup>。主要采用施加高折射率的光透明剂, 就目前研究最多的光透明剂甘油和二甲基亚砜, 然而, 发现即使它们在相同浓度的条件下, 对相同的组织光透明效果也不同, 渗透的速度也不一样, 若再结合一些物理方

法, 其效果可能更加不一样<sup>[8-10]</sup>。虽然 Xu 等已经研究了 40% 和 60% 甘油和超声波相结合对离体新鲜猪皮的实验, 其所采用的超声波的频率是 1~1.1 MHz, 强度为  $0.75 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 超声时间是 15 min<sup>[11]</sup>, 同时 Huang 等也采用光学相干层析成像来检测超声波对组织的促渗作用<sup>[12]</sup>。但因超声波与光透明剂相结合对同一组织的促渗效果不仅与超声波的频率、强度、以及作用时间有关<sup>[12-15]</sup>, 且也与光明剂的种类和浓度有关, 因需要寻找一种最佳的搭配。本文研究的是经 80% 甘油和低频 20 kHz 处理(低频的范围:  $20 \text{ kHz} < f < 100 \text{ kHz}$ , 因 Tezel 等研究发现低频比高频超声波在经皮给药方面效果更明显)<sup>[16]</sup>, 然后利用光谱仪检测组织对光的反射率随时间在 400~860 nm 的变化, 同时在 580 nm 波长处对各组反射率进行定量的研究。目的是研究这种低频超声波与 80% 甘油相结合是否对组织的光透明性有相互促进的作用, 并进一步分析各自所起的作用。对以后提高光子技术在生物组织的成像深度的改善起到一定的作用, 也可能对研究经皮给药方面起到作用。

收稿日期: 2009-03-23, 修订日期: 2009-06-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(60778047), 广东省自然科学基金项目(06025080, 0632270)和医学光电科学与技术教育部重点实验室(福建师范大学)开放课题项目(JYG0804, J YG0503)资助

作者简介: 钟会清, 女, 1979 年生, 华南师范大学激光生命科学教育部重点实验室在读博士研究生 e-mail: zhonghuiqing16@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: weihj@senu.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和样品的制备

新鲜猪皮组织(没去脂肪)来自合格的宰猪场,实验样品密封(防止自然失水)后保存在 4 ℃ 的环境下不超过 12 h,并在实验前把样品置于常温下 30 min,然后进行实验。每组切 16 个面积为 2.5 cm×2.5 cm,平均厚度为(2.0±0.12)cm 的组织。每组在处理前(第 1 组不处理,作为空白对照组,但检测时间与其他组一致。)都进行检测,第 2 组只用频率为 20 kHz,强度为 1.25 W·cm<sup>-2</sup> 的超声波处理 5 min,而第 3 组和第 4 组的样品表面都进行施加 80%甘油(99%甘油与蒸馏水按体积 4:1 的比例),然后再对第 4 组利用超声波处理 5 min。在处理前(设为 0 min)和处理后的 15, 30, 60, 90 min 分别利用光纤光谱仪进行检测。

### 1.2 实验装备

组织的反射光谱特性是由带积分球附件的 AvaSpec-2048 光纤光谱仪来完成,测量的波长范围:200~1 100 nm, SONY 公司 ILX554B 型线阵 CCD, 2 048 像素,积分时间 1.1 ms~10 min,光谱分辨率 2.4 nm,它的测量窗口直径大约为 1 cm。超声波购于广州市邦图美容美发设备有限公司,频率为 20 kHz,强度为 1.25 W·cm<sup>-2</sup>,有两个探头分别直径约为(8 和 44 mm),本实验采用的是直径为约 44 mm。

### 1.3 统计学处理方法

组织光学参数以均数和标准差( $X \pm SD$ )表示,采用  $t$  检验  $p < 0.05$  为有显著性差异,利用统计软件 SPSS10 作统计

处理。

## 2 结果

在相同的检测对象(新鲜猪皮组织)的实验条件下,分别用光谱仪对 4 组经过不同处理前、后的不同时间的反射进行检测,每组样品是 16 个,4 组总共 64 个组织样品,每个组织样品在每个时刻都被重复测量 6 次来获取每个测量值,4 组样品的测量结果具有很好的重复性,每一组样品所有测量得到的组织光学特性用( $X \pm SD$ )表示。图 1(a), (b), (c)和(d)分别是对空白对照组(第 1 组);只用超声波处理组(第 2 组)、只经 80%甘油处理组(第 3 组)、经 80%甘油处理后又利用超声波处理(第 4 组)描述各组组织反射率随着时间变化而变化的曲线。图 2 描述各组组织在 580 nm 波长处的 0~15 min 和 15~30 min 这两时间段反射光谱的变化率。其中表 1 是表示各组在 414, 540 和 580 nm 处的反射率的百分值。

## 3 讨论

测量结果获得了四组在波长为 400~860 nm 范围内处理前、后不同时间的反射光谱曲线,研究的重点是从光谱的角度来对各组进行分析、比较它们各自随时间的推移光谱反射率的变化,同时也对超声波和 80%甘油相结合使用时对组织的光透明性的影响如何,及进一步分析是如何影响,是否具有促渗协同的作用,下面是对实验结果进行详细的讨论和分析。从实验结果发现,图 1 在 400~414 nm 反射率呈急剧

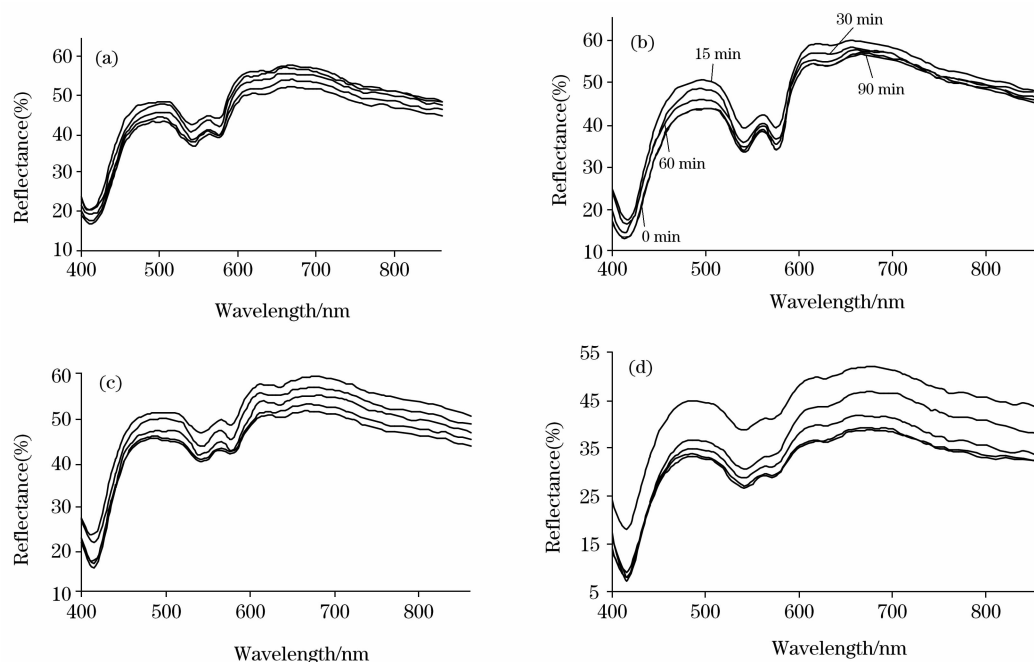


Fig. 1 Reflectance of the porcine skin tissue before and after dealt with different ways

(a): Reflectance after dealing by nothing at the time intervals of 0, 15, 30, 60 and 90 min(from top to bottom), respectively(Group 1); (b): Reflectance after dealing by ultrasound alone at the time intervals of 0, 15, 30, 60 and 90 min, respectively(Group 2); (c): Reflectance after dealing by 80% glycerol alone at the time intervals of 0, 15, 30, 60 and 90 min(from top to bottom), respectively(Group 3); (d): Reflectance after dealing by ultrasound and 80% glycerol at the time intervals of 0, 15, 30, 60 and 90 min(from top to bottom), respectively(Group 4)

Table 1 Reflectance (%) of each group at 414, 540, 580 nm

Wavelength/nm	Groups	0 min	15 min	30 min	60 min	90 min
414 nm	Group 1	21.0±0.5	20.8±0.5	19.6±0.5	17.7±0.4	17.3±0.4
	Group 2	16.2±0.4	17.2±0.4	14.4±0.4	13.9±0.3	13.1±0.3
	Group 3	23.1±0.6	21.1±0.5	17.1±0.4	15.3±0.4	16.3±0.4
	Group 4	17.9±0.4	8.9±0.2	7.9±0.2	8.0±0.2	7.2±0.2
540 nm	Group 1	42.7±1.1	40.6±1.0	38.6±1.0	38.1±1.0	37.3±0.9
	Group 2	33.7±0.8	38.9±1.0	35.4±0.9	33.2±0.8	34.3±0.9
	Group 3	46.3±1.2	43.2±1.1	41.3±1.0	40.1±1.0	39.6±1.0
	Group 4	38.9±1.0	30.6±0.8	28.8±0.7	27.0±0.7	26.6±0.7
580 nm	Group 1	45.1±1.1	43.2±1.0	41.0±1.0	41.1±1.0	40.0±1.0
	Group 2	45.0±1.1	50.3±1.3	47.1±1.2	45.1±1.1	46.4±1.2
	Group 3	45.4±1.1	42.1±1.1	39.5±1.0	39.1±1.0	38.6±1.0
	Group 4	45.1±1.1	37.6±0.9	35.1±0.9	33.1±0.8	32.9±0.8

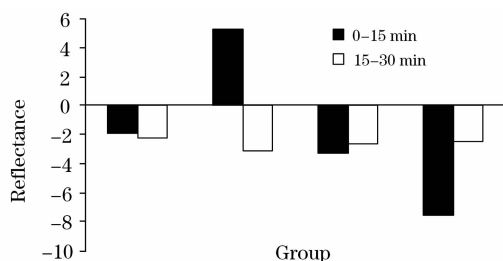


Fig. 2 Changes of each group reflectance during 0~15 min and 15~30 min at 518 nm

下降,在 414 nm 处存在一个吸收峰,其对应的是组织中的血红蛋白吸收峰,接下来在 414~490 nm 呈急剧上升的趋势,在 490~540 nm 又呈下降的趋势,在 540 和 580 nm 又分别存在一个吸收峰,同时在 630 nm 处也存在相对不明显的吸收峰,于 690~860 nm 是呈缓慢下降的趋势,因此 4 组组织反射光谱的谱形是基本相似。但是从各组随时间变化的反射率曲线图发现,图 1(a), (c)和(d)随着时间的延长其反射率都是呈下降的趋势,然而各组在不同的时间段反射率的变化速度却不同。例如:第 1 组在没有进行任何处理的情况下,由于受外界环境的影响,组织在 0~90 min 内反射率变化很小,而且相对其他组来说其变化是微不足道的,可以忽略不计,如图 1(a)所示;第 2 组是只用超声波按上面设计的频率、强度和时间进行处理,从图 1(b)发现,在 0~15 min 内组织的反射率与图 1(a), (c)和(d)不一样,其处于增加状态,随着时间的变化,而且增加相对比较明显,这是因为当组织特别是表皮组织被超声波处理后,其结构会发生短暂性无序化排列,因此使其反射率增加,但随着距停止超声的时间加长,组织将慢慢恢复原状,组织对光的反射率变化值越来越小,如图 1(b)中的 30~90 min 对应的谱线,随着时间的变化,其反射率一直处于下降的趋势,在 90 min 组织的反射率曲线几乎是与处理前(0 min)重合。这与 Mitragotri 等研究的相一致<sup>[15]</sup>。图 1(c)是组织只经 80%甘油处理的反射率随时间变化的曲线,该变化趋势与 Wang 和徐向群等研究结果相符<sup>[17, 18]</sup>,也是随着时间的加长组织的反射率越来越小,光透明特性变得越来越好,同时发现,在 0~30 min 内比在 30~60 min 和 60~90 min 内组织的反射率变化相对明显,而且

在 0~15 min 和 15~30 min 变化的程度差不多,在 30~90 min 这段时间,虽然变化很少,但是其反射值还在减少;在不同时间段的变化速度是与图 1(c)不同,图 1(d)是组织同时经过 80%甘油和超声波处理,从图 1(d)发现在 0~15 min 内变化特别明显,从图 2 中更加能够发现,第 4 组组织反射率变化的速率与其他组在相同时间段内比较是:为第 1 组的约 4.0 倍,第 3 组的约 2.3 倍,对甘油来说皮肤组织的角质层是主要障碍,而超声波对皮肤组织最大的优势是使角质层及其下层的结构发生短暂性无序化排列,又因甘油是亲水性物质,因此低频超声波使其在皮肤的渗透性获得较大的改善,这可能是因超声波的空化效应(在超声波的作用下,引起介质和细胞内气体分子、气泡的振动,以及气泡随后发生破裂形成空隙或空囊,称为空化效应)在皮肤角质层脂质区产生水性通道,亲水性物质更易渗透,这样更加有利于甘油的渗透,因此在 0~15 min 内甘油的渗透速度最快<sup>[19]</sup>。但在接下来的时间段例如:例如:15~30 min, 30~60 min, 60~90 min 组织的反射率减少很小,特别是后面 60~90 min 几乎没有变化,因浅表层组织的细胞内外液几乎达到饱和状态。

图 2 描述各组组织在 580 nm 波长处的 0~15 min 和 15~30 min 这两时间反射光谱的变化率。该图可以更加清楚的了解各组在 0~15 min 和 15~30 min 的变化情况。第 1 组在两个时间段内变化的速度差不多;但第 2 组即单独采用超声波组在 0~15 min 内组织不但没有减少反而增加,然后在 15~30 min 组织的反射率又变为减少,而且减少的幅度值比第 3 组的还大;第 3 组在 0~15 min, 下降的很明显,在 15~30 min 下降的速度与在 0~15 min 内相差不大;从第 4 组发现组织在 0~15 min 内反射率变化特别明显,比其他各组在同一时间段成倍数变化。同时从表 1 可很明显发现各组在不同波长反射率的变化,虽然各个波长各组的变化速度有所不同,但是大体的趋势还是差不多,因此从这个表中可以更加详细的看出各组在不同时间反射率的变化。

## 4 结 论

通过对空白对照组、只施加超声波组、只施加 80%甘油处理组及同时经过 80%甘油和超声波处理组在波长为 400~

860 nm 范围内的不同时间检测组织反射光谱的比较,发现单独采用超声波不但不会使组织的光透明性加强反而会减弱(即反射率增加),特别是在 15 min 最明显,但是到 90 min 时几乎恢复到与超声波处理前的值;当采用 80%甘油处理可以很好的改善组织的光透明性;但是利用超声波和 80%甘油相结合可以发现其对组织的光透明性不但不会像单独使用超声波时阻止组织的光透明性,相反其比单独施加 80%甘油时使组织的光透明性的改善效果更好,且具有很好的短时改善作用,例如:各组组织于 580 nm 处,在 0~15 min 时间段

内,第 4 组组织反射率的变化值为第 1 组的 4.0 倍和第 3 组的 2.3 倍,说明导入低频超声波和促渗剂 80%甘油对组织的透明性是具有协同效应的作用。同时经过 Mitragotri<sup>[15]</sup> 对人离体皮肤在接受低频超声(20 kHz, 125 mW·cm<sup>-2</sup>, 100 ms·s<sup>-1</sup>)处理不同时间,结果发现低频超声波不会导致皮肤屏障功能的长时间改变。因此证明该频率、强度的超声波和 80%甘油相结合对改善皮组织的光透明性同时也具有安全性,为以后光子技术在深层组织的成像提供了可能性。

### 参 考 文 献

- [1] DENG Yong, LUO Qing-ming, LU Qiang(邓 勇, 骆清铭, 鲁 强). Acta Optica Sinica(光学学报), 2006, 26(03): 419.
- [2] WEI Hua-jiang, XING Da, HE Bo-hua, et al(魏华江, 邢 达, 何博华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(1): 10.
- [3] XIE Shu-sen, LI Hui, et al(谢树森, 李 晖, 等). Laser and Optoelectronics Progress(激光与光电子学进展), 2001, (9): 44.
- [4] Bashkatov A N, Genina E A, Kochubey V I, et al. Optical Biopsy III, 2000, 1(11): 256.
- [5] Kassan D G, Lynch Am, et al. J. Am. Acad of Dermatology, 1996, 34(4): 657.
- [6] Tuchin V V, Maksimova I L, Zimnyakov Dmitry A, et al. Mishin. J. Biomed. Opt., 1997, 2(4): 401.
- [7] He Yonghong, Wang R K. J. Biomed. Opt., 2004, 9(1): 200.
- [8] Moulton K, Lovell F, Williams E, et al. J. of Animal Science, 2005, 83: 246.
- [9] McClure R A, Bui A, Chang J, et al. Lasers in Surgery and Medicine, 2008, Suppl 20: 6.
- [10] Jiang J Y, Boese M, Turner P, et al. Journal of Biomedical Optics, 2008, 13(2): 021105.
- [11] Xu Xiangqun, Zhu Qihong. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2008, 55(4): 1432.
- [12] Huang C Y, Liu B, Brezinski M E. J. Opt. Soc. Am. A: Opt. Image. Sci. Vis., 2008, 25(4): 938.
- [13] Mitragotri S, Kost J. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, 56(5): 589.
- [14] Tezel A, Sens A, Mitragotri S. Pharmaceutical Research, 2002, 19(12): 1841.
- [15] Samir Mitragotri, Daniel Blankschtein A R L. Pharmaceutical Research, 1996, 13(3): 411.
- [16] Makoto Ogura, Sumit Paliwal S M. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60(10): 1218.
- [17] Wang Ruikang, He Yonghong, Valery Tuchin. SPIE, 2004, 5316: 119.
- [18] XU Xiang-qun, WU Liu(徐向群, 吴 柳). Chinese Journal of Lasers(中国激光), 2006, 33(7): 998.
- [19] Mitragotri S, Ray D, Farrell J, et al. J. of Pharmaceutical Sciences, 2000, 89(7): 892.

# Reflectance Spectroscopy Study of Low-Frequency Ultrasound and Glycerol on Skin Optical Clearing

ZHONG Hui-qing<sup>1</sup>, GUO Zhou-yi<sup>1</sup>, WEI Hua-jiang<sup>1\*</sup>, ZHANG Zu-de<sup>1</sup>, YANG Hong-qin<sup>2</sup>, XIE Shu-sen<sup>2</sup>

1. Ministry of Education Key Laboratory of Laser Life Science and Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

2. Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine of Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

**Abstract** In order to find a non-invasive way to improve the efficacy of skin optical clearing with topically applied optical clearing agents, the authors researched the changes of reflectance spectroscopy of skin tissues before and after being dealt by low-frequency ultrasound and osmotic active chemical agents within the wavelength range of 400-860 nm, and the degree of changes in reflectance spectroscopy of each group skin during 0-15 min and 15-30 min at 580 nm. The measurements were performed using a AvaSpec-2048 optical fiber spectrometer with integrating-sphere setup. The results of measurements showed that there were a few changes of the reflectance spectroscopy of skin tissues in the control group (Group 1) (The skin tissue was dealt with nothing.) during the whole observation; But in the Group 2 (The skin tissue was dealt with only low-frequency ultrasound), it was found that the reflectance of the skin tissue showed a significant increase comparing 15 min with 0 min, but the changes in reflectance of the tissues slowly restored the original form following the longer time since the ultrasound stopping; There was also a very fast changes in reflectance of the skins in the Group 3 (the skin were dealt with only 80% glycerol) compared with that in the Group 1. The authors also found that there was a very distinct decrease in the reflectance of skin tissues dealt with both low-frequency ultrasound and 80% glycerol group (Group 4), especially during the 0-15 min, and its speed was 4.0 times that of the Group 1 and 2.3 times that of Group 3 (During 0-15 min, the reflectance of skin tissues in the Group 1 decreased 1.896%; the reflectance of skin tissue in the Group 3 decreased 3.316%; the reflectance of skin tissues in the Group 4 decreased 7.551%). From the above results, it can be clearly seen that the low-frequency ultrasound and 80% glycerol not only have synergistic effect on optical clearing of skin tissue *in vitro*, but can change the optical clearing of the skin tissue in a short time.

**Keywords** Optical clearing; Glycerol; Low-frequency ultrasound; Reflectance characteristics; Bio-tissue

(Received Mar. 23, 2009; accepted Jun. 26, 2009)

\* Corresponding author

---

## 敬告读者——《光谱学与光谱分析》已全文上网

从 2008 年第 7 期开始在《光谱学与光谱分析》网站(www.gpxygpfx.com)“在线期刊”栏内发布《光谱学与光谱分析》期刊全文,读者可方便地免费下载摘要和 PDF 全文,欢迎浏览、检索本刊当期的全部内容;并陆续刊出自 2006 年以后出版的各期摘要和 PDF 全文内容。2009 年起《光谱学与光谱分析》每期出版日期改为每月 1 日。

光谱学与光谱分析期刊社