

文章编号: 0258-7025(2005)05-0717-06

近红外反射光谱研究光透明剂渗透特性 对胃组织光学透明的影响

徐向群¹ 吴柳²

(¹浙江理工大学生命科学院, 浙江 杭州 310018)
²北京交通大学物理系, 北京 100044)

摘要 为了解高渗溶液渗透特性对生物组织的光学透明进程的影响,探索光透明剂的安全有效浓度,用近红外反射光谱和相干光断层成像(OCT)研究了两种光透明剂丙三醇(甘油)和二甲亚砜(DMSO)以及二者的混合溶液[体积分数为80%的甘油水溶液,50%的DMSO水溶液,50%的甘油+20%的DMSO水溶液(GD1)和50%的甘油+30%的DMSO水溶液(GD2)]对胃黏膜组织的光学透明作用。结果表明,这四种溶液都能显著增强近红外光在胃黏膜组织中的穿透能力,光学透明的能力由低到高依次为体积分数为50%的DMSO,80%的甘油,GD1和GD2。发现生物组织光透明进程的快慢和效果与光透明剂的渗透所导致的组织的失水速率和程度成正比。

关键词 医用光学和生物技术;光透明;近红外反射光谱;相干光断层成像;生物组织

中图分类号 R318.51 **文献标识码** A

Influence of Permeation Characteristics of Hyperosmotic Agents on Optical Clearing of Gastric Tissue Studied with Near-Infrared Spectroscopy

XU Xiang-qun¹ WU Liu²

(¹ Institute of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)
² Department of Physics, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China)

Abstract With an effort to understand the influence of permeation characteristics of hyperosmotic agents on tissue clearing progress and to look for effective concentrations that minimise the side effect for clinical applications, porcine stomach tissues (mucosa) applied with a mixed solution of glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO) are investigated with near-infrared reflectance spectroscopy and optical coherence tomography. Four solutions of 80% glycerol, 50% DMSO, 50% glycerol with 20% DMSO (GD1) and 30% DMSO (GD2) are studied, respectively. The significant improvement in light transmittance and thus enhancement of light penetration through tissue are demonstrated for all solutions. The development and effect of optical clearing accomplished by the four solutions in an increasing order for 50% DMSO, 80% glycerol, GD1, and GD2 are corresponding well to the rate and degree of water loss induced by the four solutions, which are in the same increasing order.

Key words medical optics and biotechnology; optical clearing; near-infrared reflectance spectroscopy; optical coherence tomography; bio-tissue

1 引 言

光学成像和激光治疗等光子技术在医学诊断和治疗中的应用是一个快速发展的国际前沿领域。然而,由于生物组织各种成分对光的强吸收和散射限

制了光在生物组织中的穿透深度,使得光子技术只能用于活体浅表组织^[1~5]。最近由 V. V. Tuchin^[6]提出的光折射率匹配技术是一个可以降低散射物理系统混浊的有效方法。在生物组织中,通

收稿日期: 2004-07-01; 收到修改稿日期: 2004-10-25

基金项目: 国家自然科学基金(30470426)和浙江省留学回国人员科技活动择优资助项目(浙人专[2004]252号)资助项目。

作者简介: 徐向群(1965—),女,浙江理工大学教授,主要从事相干光断层成像技术及医用光学、光谱诊断和生物组织光学性质控制研究。E-mail: xuxiangqun@zist.edu.cn

过施加高折射率的高渗溶液(光透明剂)来实现组织固体成分与胞内外液间的折射率匹配,从而降低生物组织对光的散射作用(光透明技术)^[6~14]。我们的研究表明,光透明技术可用于改善相干光断层成像(OCT)对生物组织的成像深度和对比度^[8,11];就目前研究最多的光透明剂甘油和二甲亚砜(DMSO)而言,对不同组织的光透明效果不同^[7,13,15]。因此,了解光透明剂进入目标组织的渗透过程以及影响光透明效果的渗透因素是十分必要的,这不但为研究光透明机理提供实验数据,还有助于在医学诊断应用中针对目标组织选取合适的有效光透明剂。

2 材料制备和实验方法

2.1 材料

实验用的新鲜猪胃组织来自合格的屠宰场,实验样品密封(防止自然失水)后保存在4℃环境下不超过宰杀后30 h,并在实验前置于室温下30 min。所用的四种光透明剂溶液如表1所示。

表1 本研究所用的光透明剂

Table 1 Chemical solutions used in this study

Solution	D	G	GD1	GD2
Glycerol	0	80%	50%	50%
DMSO	50%	0	20%	30%

2.2 组织厚度测定

所用相干光断层成像系统光源的中心波长和光谱带宽分别为820 nm和25 nm,纵向和横向分辨率分别为12 μm和16 μm,多普勒频率为40 kHz。波长605 nm的红光用来为样品相干光断层成像时定位。将黏膜组织平放在载玻片(作为反射片)上,在施加光透明剂前后分别扫描获得其相干光断层成像,所获图像两端必须包含空的反射片,即反射片上方为空气而不是样品。测出的从样品表面到空反射片表面的纵向距离即样品的物理厚度^[11,16]。为了减少噪声引起的误差,对相邻20个纵向扫描(覆盖约0.25 mm的横向宽度)进行平均值计算。所测样品厚度值为四次重复实验的平均结果。相干光断层成像系统及成像操作具体见参考文献^[8~10,17]。

2.3 光谱分析

光透射率和漫反射率的测定由内置积分球的Varian Cary 500光谱仪(Varian UK Ltd)完成,测定的波长范围为800~2200 nm。将厚度为(1.15±0.12) mm(相干光断层成像厚度测定结果)的新鲜

猪胃黏膜组织固定在开有矩形测量窗口的两个塑料夹片间,该窗口面积为12 mm×8 mm。先在未加光透明剂情况下扫描获得样品的光透射率和反射率光谱,然后在样品的上皮层表面施加表1中的某一种光透明剂溶液,分别经5 min,10 min,20 min和30 min时间间隔测定光透射率和反射率光谱,并在每次测定间隔都补充同一溶液。

将波长1400~2200 nm的漫反射率光谱转换为表观吸收率 $A[A=\log(1/R),R$ 为样品相对标准反射体的相对漫反射率]。因为散射介质的光衰减可由修正的朗伯-比尔定律得出,我们采用J. de Rigel等^[18]提出的由1936 nm和1100 nm两波长处的表观吸收率差值来检测水分的变化^[11]。由于生物组织的散射系数在这一波长范围内的变化很小,这两个波长的表观吸收率之差 ΔA 可以基本消除散射介质中散射造成的光衰减,从而较真实地反映生物组织中水的吸收。样品施加光透明剂一定时间后的水分相对含量(C_{water})由下式给出

$$C_{\text{water}} = \frac{\Delta A_{\text{treated}}}{\Delta A_{\text{control}}} \times 100\%, \quad (1)$$

光透射率增量 ΔT 和漫反射率减量 ΔR 由下式给出

$$\Delta T = \frac{T_{\text{treated}} - T_{\text{control}}}{T_{\text{control}}} \times 100\%, \quad (2)$$

$$\Delta R = \frac{R_{\text{treated}} - R_{\text{control}}}{R_{\text{control}}} \times 100\%, \quad (3)$$

其中 T 为波长1278 nm的光透射率值, R 为波长1066 nm的漫反射率值。下标control和treated分别表示处理前(对照)和处理后各时间点的测量值。水分相对含量、光透射率、漫反射率都为四次重复实验的平均结果。

3 结果与讨论

为了了解生物组织的光透明效果与光透明剂在目标组织中渗透的动态关系,研究了光透明剂进入组织和细胞后导致的生物组织水分含量的动态变化。图1给出了上皮层表面施加体积分数为50%的甘油+20%的DMSO混合溶液(GD1)的猪胃黏膜样品在波长范围1400~2200 nm的表观吸收光谱,曲线从上到下分别为,(1)对照(0 min)和施加溶液后(2) 5 min,(3) 10 min,(4) 20 min和(5) 30 min的光谱。光谱中主要特征带位于1450 nm和1936 nm附近,分别对应于水分子中OH键伸展与HOH键弯曲^[19]。样品在1450 nm和1936 nm的吸收随着处理时间的延长而减小,显示了施加光透明

剂所导致的生物组织水分含量的减少过程。对照和处理后的样品光谱间的另一个差别是1450 nm和1936 nm的相对强度。光透明剂处理前(对照)的胃黏膜样品,这一强度比值要远高于处理后的样品,而且随处理时间增加逐渐减小,这一现象可能是光透明剂与生物组织的相互作用造成的。

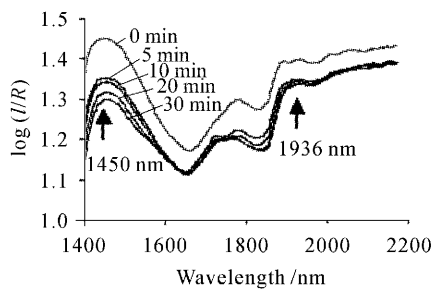


图1 胃黏膜组织样品的近红外表面吸收光谱(1400~2200 nm) ($n=4$)

Fig.1 NIR apparent absorbance spectra (1400~2200 nm) of stomach mucosa with the application of GD1 solution

图2为分别施加四种光透明剂溶液后样品失水量随时间变化的曲线。图中数值是按(1)式得到的样品处理后与处理前的相对水含量。所有样品在处理后的水含量都随时间减少,但由四种溶液引起的失水程度和动态过程并不相同:由体积分数为80%的甘油, GD1和GD2引起的失水速率在0~30 min间几乎是线性的,而由体积分数为50%的DMSO引起的失水速率在最初5 min更显著,其后降低。虽然体积分数为50%的DMSO的渗透压比80%的甘油小得多,但在前5 min由体积分数为50%的DMSO引起的失水几乎与体积分数为80%的甘油相同,表明在施加溶液的初始阶段, DMSO比甘油更快地渗透入胃黏膜组织。过去的研究^[13]已经证明,在处理后的前5 min,相同体积分数(即相同渗透压)为50%的DMSO和50%的甘油比较,体积分数

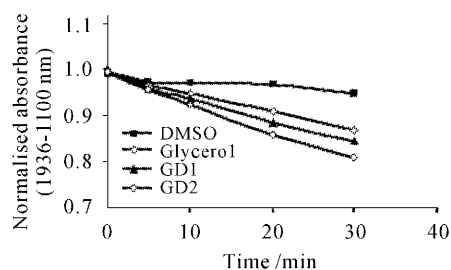


图2 胃黏膜组织样品的水分相对含量随时间变化的曲线($n=4$)

Fig.2 Relative water content to native tissue (control) in stomach mucosa samples as a function of time ($n=4$)

为50%的DMSO对黏膜组织的渗透性更强。虽然与体积分数为80%的甘油相比, GD2有与之相同的渗透压(13 Osm/L)而GD1的渗透压(11.5 OSM/L)较小,但在整个30 min里GD1和GD2引起的失水率却比体积分数为80%的甘油的大。这四种溶液引起的失水程度由小到大依次为体积分数为50%的DMSO, 80%的甘油, GD1和GD2, 四种溶液处理30 min后,猪胃黏膜组织失水率大约分别为5%, 13%, 15%和19%。

具有相同渗透压的80%甘油溶液与50%甘油+30% DMSO的混合溶液(GD2)所造成的组织失水率的差异,可以由DMSO和甘油的不同渗透特性来解释。已报道的研究表明甘油和DMSO渗透能力是不同的, DMSO渗透进入生物组织的速度更快^[20]。DMSO能非常迅速地渗入细胞膜和组织,甚至能够渗透甘油无法通过的皮肤角质层^[20]。随着光透明剂在目标组织中的渗透,扩散前沿及组织内部的水先后逐渐排出,形成一个空间浓度梯度^[21]。DMSO扩散前沿的推进比甘油迅速得多,因而甘油处理的组织表面水的排出所需的时间比DMSO处理的要长。这和实验结果相吻合。

DMSO除了本身的高渗透能力以外还具有渗透促进作用。DMSO作为渗透促进剂已经在透皮给药系统^[22,23]中被研究过。低分子量的非离子化分子可随DMSO输运透过皮肤^[24]可能与此效应相同, DMSO作为渗透促进剂可以促使甘油渗入胃黏膜组织和细胞,因而掺有DMSO的GD1和GD2溶液比纯甘油渗入组织和细胞的量多,它们替换出来的组织液也更多。DMSO的快速渗透能力和渗透促进作用使得GD1和GD2溶液更易于透过组织因而产生更强的脱水效果。

具有膜渗透力的光透明剂,渗入组织细胞外空间后,会进一步透过细胞膜进入细胞,而胞液则透过细胞膜排出细胞。尽管甘油和DMSO都能进入细胞,但它们的跨膜渗透率比水低得多(水的跨膜渗透率在 10^{-2} cm/min数量级,而甘油和DMSO的跨膜渗透率在 10^{-5} cm/min数量级^[25]),这意味着组织经光透明剂处理后,细胞体积将减小,因为离开细胞的水分多于进入细胞的光透明剂。实验也观察到这一现象:随着处理时间的增加,相干光断层成像测定结果显示胃黏膜组织厚度逐渐减少,施加GD2溶液和体积分数为80%的甘油30 min后,胃黏膜组织厚度大约分别减少了 $15 \pm 1.8\%$ 和 $23 \pm 1.1\%$ 。该数据表明尽管GD2造成处理后组织水分的减少多于80%

甘油(见图2),但前者引起的细胞体积减小却比后者要小,主要原因可能归结为甘油和DMSO的膜渗透性不同。虽然甘油和DMSO都能透过细胞膜,但是甘油的渗透率不如DMSO^[20]。DMSO很容易穿过大多数生物膜^[20]组织,因此,尽管经GD2溶液处理的组织的细胞失水更多,但组织的收缩却比使用体积分数为80%的甘油的要小,因为前者有更多的光透明剂进入细胞取代水。结合上一段的分析,可以说DMSO的高渗透性和渗透促进作用,使得GD2溶液处理的组织因有较多的光透明剂进入细胞而使组织收缩的程度比用体积分数为80%的甘油处理的小。

由于渗透特性的不同,DMSO与甘油对生物组织所起的光透明效果不同。随着光透明剂扩散到组织的细胞外和细胞内空间,折射率同为1.47的无水甘油和DMSO部分取代折射率为1.33的组织液和胞液(基质)后,组织中的散射成分与被光透明剂部分取代后的基质形成了一个折射率匹配环境。除了直接的折射率匹配外,胞外液和胞内液的水分含量减少使得溶于组织液中的成分浓缩,进一步提高了基质的折射率,另一方面又提高了散射中心和基质之间折射率的匹配度。理论上说,散射中心和基质之间折射率的匹配效应将减弱目标组织的散射强度^[26,27],从而提高近红外光线进入生物组织的穿透

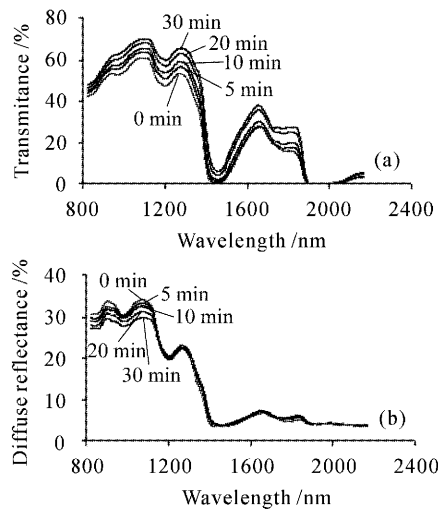


图3 施加GD1溶液前后胃黏膜样品在800~2200 nm范围由积分球测得的光谱变化($n=4$)。(a)光透射率,(b)漫反射率

Fig. 3 Measured optical changes for stomach mucosa samples before and after the application of GD1 solution over the range from 800~2200 nm with spectrophotometer ($n=4$). (a) Light transmittance, (b) diffuse reflectance

深度,这就是组织的光透明效应。图3(a)和(b)分别是GD1溶液处理的新鲜猪胃黏膜组织样品在800~2200 nm范围内透射光谱和漫反射光谱随时间变化的情况。图3(a)中由下到上的透射光谱曲线和(b)中由上到下的反射光谱曲线对应处理的时间间隔分别为(1)0 min,(2)5 min,(3)10 min,(4)20 min和(5)30 min。随时间增加,光透射率逐渐增大,漫反射率在800~1370 nm范围内逐渐减小,其中在波长1278 nm处光透射率的增加最大,在1066 nm处光反射率减小最大。四种光透明剂溶液表现出相似的增加光穿透深度的趋势。然而,从随时间变化的光谱曲线可观察到,四种溶液的光透明能力以及光透明的进程模式是不同的。

为了进一步了解这四种溶液处理的组织光透明的进程,从它们各自的随时间变化透射光谱和反射光谱中分别定量提取1278 nm处的透射率和1066 nm处的漫反射率的数据,并用处理前的对照样品数据归一化后得到图4(a)(透射率)和(b)(反射率)。可见,GD2溶液处理的组织光透射率上升趋势最快,反射率下降趋势最快,这与GD2溶液进入组织时最快的渗透速率(图2)一致,表明它是这四种溶液中最有效的光透明剂。由方程(2)得到的经处理30 min后的组织的透射率,施加GD1和GD2溶液的大约分别增加25%和29%,然而施加80%

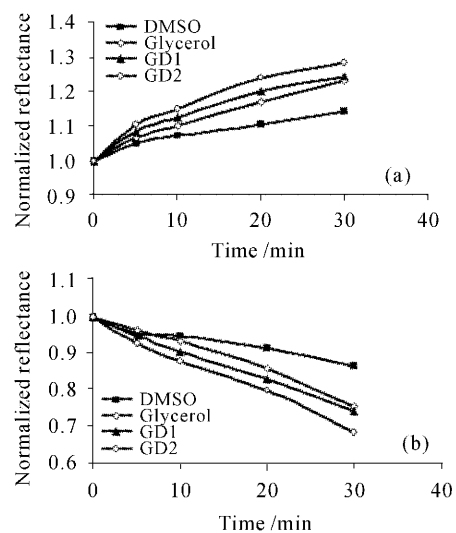


图4 分别为施加四种溶液的胃黏膜组织(a)在1278 nm处的光透射率,(b)在1066 nm处的光反射率随时间变化曲线($n=4$)

Fig. 4 Changes in light transmittance (a) at 1278 nm and reflectance (b) at 1066 nm as a function of time in stomach mucosa tissue applied with the four solutions, respectively ($n=4$)

的甘油和 50% 的 DMSO 的却只分别增加了 23% 和 15%; 而由方程(3)求得的漫反射率施加 GD1 和 GD2 的分别降低 28% 和 31%, 而施加 80% 甘油和 50% DMSO 却只分别降低了 24% 和 13%。从 GD1 和 GD2 溶液的结果可见, 50% 的甘油的光透明能力随加入的 DMSO 浓度增加(从 10% 到 30%, 本文未给出 10% 的结果)而提高, 也就是说加入 DMSO 越多, 光透明能力越强。混合溶液 GD1 和 GD2 都显示了优于 50% DMSO 的光透明能力。尽管溶液 GD1 的渗透压 (11.5 Osm/L) 比 80% 的甘油 (13 Osm/L) 低, 它的光透明效果却略好于甘油。GD1 和 GD2 优于 80% 的甘油的光透明效果是由于 DMSO 的高渗透性和渗透促进作用, 使得更多的光透明剂进入到目标组织中, 从而在组织内建立了更有效的折射率匹配环境, 使组织的散射得到更有效的降低。

除了光透明效果不同外, 四种溶液对组织的光透明时间进程也有所不同。用 50% DMSO 处理的样品, 在前 5 min 光透射率增加和漫反射率减小的速度相当快, 之后光透明的速率就降低了(图 4)。施以体积分数为 80% 的甘油 GD1 和 GD2 的样品, 漫反射率在 0~30 min 内几乎都以相同的速率减小。比较图 4 和图 2 各对应溶液的曲线, 分别观察施以这四种溶液的样品组织的失水进程, 可以看到各溶液对组织的光透明时间进程模式与组织失水的进程模式相吻合。这和关于光透明效果与组织失水过程有关的研究结论相一致^[11]。生物组织光透明的进程对应着光透明剂进入目标组织的随时间渗透进程, 这一结果进一步证实了光透明过程与光透明剂进入目标组织的渗透特性有极大关系。

4 结 论

研究^[13]表明, 高浓度甘油(80%)是一种能够提高生物组织光穿透深度的非常有效的透明剂。然而, 高浓度甘油会引起组织的显著收缩, 这在临床安全上必须加以考虑。而另一种有效透明剂, 高浓度的体积分数为 50% 的 DMSO 则可能导致组织成分的化学结构改变, 观察到胃黏膜组织施加体积分数为 50% 的 DMSO 仅 5 min 后, 其表观吸收光谱在 1675 nm 处出现了一个新的吸收峰(本文未给出其表观吸收光谱), 这一现象在其他透明剂, 包括高浓度甘油和低浓度 DMSO 处理 30 min 都未观察到, 说明高浓度 DMSO 可能导致组织中化学成分

种结构改变。这些副作用会影响这些高浓度透明剂在活体组织中的应用的安全性。由此得出结论, 含 50% 的甘油和 20%~30% DMSO 的混合溶液可能是同时满足高效透明和临床安全要求的选择。

致谢 作者感谢英国 Cranfield 大学 R. K. Wang 教授的帮助。

参 考 文 献

- 1 C. Dunsby, P. M. W. French. Techniques for depth-resolved imaging through turbid media including coherence-gated imaging [J]. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2003, **36**(14): R207~R227
- 2 Zheng Wei, Huang Zhiwei, Xie Shusen *et al.*. Intrinsic microscopic fluorescence and imaging of human lung tissues [J]. *Chinese J. Lasers*, 2001, **A28**(7): 587~590
郑蔚, 黄志伟, 谢树森等. 人肺组织内源性显微荧光特性研究 [J]. *中国激光*, 2001, **A28**(7): 587~590
- 3 Zhu Dan, Luo Qingming, Zeng Shaoqun *et al.*. Study on kinetics of thermally induced damage of rat liver with light scattering technique [J]. *Chinese J. Lasers*, 2002, **A29**(7): 667~672
朱丹, 骆清铭, 曾绍群等. 大鼠肝脏热损伤的光散射研究 [J]. *中国激光*, 2002, **A29**(7): 667~672
- 4 Shusen Xie, Hui Li, Buhong Li. Measurement of optical penetration depth and refractive index of human tissue [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2003, **1**(1): 44~46
- 5 Wenliang Chen, Rong Liu, Houxin Cui *et al.*. Application of transcutaneous diffuse reflectance spectroscopy in the measurement of blood glucose concentration [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2004, **2**(7): 411~413
- 6 V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov *et al.*. Light propagation in tissues with controlled optical properties [J]. *J. Biomed. Opt.*, 1997, **2**(4): 401~407
- 7 G. Vargas, F. K. Chan, S. L. Thomsen *et al.*. Use of osmotically active agents to alter optical properties of tissue; effects on the detected fluorescence signal measured through skin [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2001, **29**(3): 213~220
- 8 R. K. Wang, X. Xu, V. V. Tuchin *et al.*. Concurrent enhancement of imaging depth and contrast for optical coherence tomography by hyperosmotic agents [J]. *J. Opt. Soc. Am. B*, 2001, **18**(7): 948~953
- 9 V. V. Tuchin, Xu Xiangqun, Wang Ruikang. Dynamic optical coherence tomography in optical clearing, sedimentation and aggregation study of immersed blood [J]. *Appl. Opt.*, 2002, **41**(11): 258~271
- 10 Xu Xiangqun, Wang Ruikang, J. B. Elder *et al.*. Effect of dextran-induced changes in refractive index and aggregation on optical properties of whole blood [J]. *Physics in Biology and Medicine*, 2003, **48**(9): 1205~1221
- 11 Xu Xiangqun, Wang Ruikang. The role of water desorption on optical clearing of biotissue; studied with near infrared reflectance spectroscopy [J]. *Medical Physics*, 2003, **30**(6): 1246~1253
- 12 Xu Xiangqun, Wang Ruikang, J. B. Elder. Optical clearing effect on gastric tissues immersed with biocompatible chemical agents investigated by near infrared reflectance spectroscopy [J]. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2003, **36**(14): 1707~1713
- 13 Wang Ruikang, Xu Xiangqun, He Yonghong *et al.*. Investigation of optical clearing of gastric tissue immersed with

- the hyperosmotic agents [J]. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 2003, **9**(2): 234~242
- 14 Cen Jian, Luo Qingming, Zeng Shaoqun. Monitoring osmotic agents induced the change in optical properties of mouse skin [J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(7): 873~876
岑建, 骆清铭, 曾绍群. 渗透剂对小鼠皮肤光学特性影响的实时动态监测 [J]. *光学学报*, 2004, **24**(7): 873~876
- 15 Martin D, Hauthal H. Dimethyl Sulphoxide [M]. New York: Wiley, 1975. 467
- 16 G. J. Tearney, M. E. Brezinski, J. F. Southern *et al.*. Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography [J]. *Opt. Lett.*, 1995, **20**(21): 2258~2260
- 17 X. Xu, R. K. Wang, A. El Haj. Investigation of changes in optical attenuation of bone and neuronal cells in organ culture or 3 dimensional constructs in vitro with optical coherence tomography: relevance to cytochrome-oxidase monitoring [J]. *European Biophys J.*, 2003, **32**: 355~362
- 18 J. de Rigal, M. J. Losch, R. Bazin *et al.*. Near-infrared spectroscopy: A new approach to the characterization of dry skin [J]. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1993, **44**: 197~209
- 19 K. Martin. In vivo measurements of water in skin by near-infrared reflectance [J]. *Appl. Spectroscopy*, 1998, **52**(7): 1001~1007
- 20 W. M. Bourne, D. R. Shearer, L. R. Nelson. Human corneal endothelial tolerance to glycerol, dimethylsulphoxide, 1, 2-propanediol, and 2, 3-butanediol [J]. *Cryobiology*, 1994, **31**(1): 1~9
- 21 J. O. M. Karlsson, Toner Mehuret. Long-term storage of tissues by cryopreservation: Critical issues [J]. *Biomaterials*, 1996, **17**(3): 243~256
- 22 B. W. Barry. *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption* [M]. New York: Marcel Dekker, 1983. 85
- 23 B. W. Barry, S. L. Bennett. Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin [J]. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, **39**: 535
- 24 B. W. Barry. Mode of action of penetration enhancers in human skin [R], the Third International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems. Salt Lake City, U S A, 1987. 85~96
- 25 J. Frim, P. Mazur. Interactions of cooling rate, warming rate, glycerol concentration and dilution procedure on the viability of frozen-thawed human granulocytes [J]. *Cryobiology*, 1983, **20**(5): 657~676
- 26 R. Graaff, J. G. Aarnoudse, J. R. Zijp *et al.*. Reduced light scattering properties for mixtures of the optical properties: A simple approximation derived from Mie calculation [J]. *Appl. Opt.*, 1992, **31**(10): 1370~1376
- 27 Liu Hanli, Beauvoit Bertrand, Kimura Mika *et al.*. Dependence of tissue optical properties on solute-induced changes in refractive index and osmolarity [J]. *J. Biomedical Optics*, 1996, **1**(2): 200~211