

文章编号: 0258-7025(2006)07-0998-05

不同结构生物组织光透明作用比较

徐向群¹, 吴 柳²

(¹ 浙江理工大学理学院, 浙江 杭州 310018; ² 北京交通大学物理系, 北京 100044)

摘要 为了了解生物组织不同结构对光透明进程的影响, 利用光相干断层成像术(OCT)和近红外光谱(NIR)对肌肉组织(猪骨骼肌)和上皮组织(猪胃黏膜)经丙三醇处理后的光透明效果进行了比较研究。结果表明, 这两种组织的光相干断层成像术成像深度和内层次结构的成像对比度均得到改善; 肌肉组织和胃黏膜组织的光透射率分别增加了 21% 和 16%, 而漫反射率分别降低了 33% 和 21%; 这两种结构组织的光透明效果(肌肉组织较好)和进程(肌肉组织较快)与各自的失水率和失水动力学成正相关, 肌肉组织失水过程为先快后慢; 胃黏膜组织的失水过程为先慢后快; 肌肉组织的总失水率大于胃黏膜组织。这表明结构不同的生物组织的光透明效果存在差异, 必须考虑其内部结构的影响。

关键词 医用光学和生物技术; 生物组织光透明; 光相干断层成像术; 近红外光谱; 生物组织结构

中图分类号 R318.51 **文献标识码** A

Dependence of Optical Clearing Effect on Tissue Structure

XU Xiang-qun¹, WU Liu²

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

Abstract The dependence of optical clearing on properties of the different tissue structures is investigated in order to better know the clearing mechanisms and effective clearing approach. Two typical tissues, muscle and epithelial, have been chosen as the targets and the effect of optical clearing has been comparatively studied by optical coherence tomography (OCT) and near infrared spectroscopy (NIR) with the clearing agent glycerol used. The results show that the improved imaging depth and contrast among different layers in the porcine skeletal muscle and stomach mucosa are visualised with the OCT assessment. The overall increases in light transmittance in the muscle tissue and the stomach mucosal tissue after 30 min treatment are observed to be approximate 21% and 16%, decreases in diffuse reflectance are 33% and 21%, respectively, with the quantitative measurement of NIR. The clearing progress of each tissue type as a function of time corresponds very well with the respective loss in water dynamics shown by the near infrared spectra: early rapid transport, mid-linear and slow exponential diffusion for muscle tissue, and contrarily for stomach mucosa with an early very slow transport and later linear increasing efflux. The different permeabilities of muscle tissue and mucosal tissue are thought to be accountable for the difference in clearing effect between the two tissues. These observations confirm expectation that optical clearing is dependent on tissue structure in an explainable manner.

Key words medical optics and biotechnology; biotissue optical clearing; optical coherence tomography; near infrared spectroscopy; tissue structure

1 引 言

生物组织对近红外光的散射作用是导致光在生

物组织中的探测深度和成像对比度减小的重要原因^[1~3]。最近发展起来的光透明技术^[4~10], 通过施加光透明剂改善生物组织中的散射体与基质(胞液

收稿日期: 2005-11-02; 收到修改稿日期: 2006-01-15

基金项目: 国家自然科学基金(30470426), 人事部留学回国人员科技活动择优项目(浙人专[2004]252号)和教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[2005]55号)资助课题。

作者简介: 徐向群(1965—), 女, 福建浦城人, 浙江理工大学研究员, 博士, 主要从事光相干断层扫描成像技术及医学应用、光谱分析和生物组织光学性质控制的研究。E-mail: xuxiangqun@zist.edu.cn

和组织间液)间的折射率匹配,降低生物组织对光的散射,可以有效地提高光的穿透深度(光透明)。实验研究表明,光透明技术能有效提高巩膜、皮肤、消化道等生物组织的光透深度^[7~10]。然而,不同结构类型的组织光透明效果差别很大,如巩膜的光透明作用较皮肤容易实现得多^[1,9,10]。因此,深入研究不同目标组织的内部结构对光透明剂在生物组织中的渗透过程及对光透明效果的影响是十分必要的,不仅有助于了解光透明的作用机制,也可为临床医学诊断提供针对目标组织实现光透明的有效途径。本文选取肌肉组织(猪骨骼肌)和上皮组织(猪胃黏膜)这两种具有代表性的结构组织作为研究对象,采用光相干断层成像术(OCT)和近红外光谱(NIR)研究施加光透明剂丙三醇(甘油)后产生的透明效果^[11]。

2 材料制备和实验方法

2.1 材料

实验用的肌肉组织和上皮组织分别为新鲜猪骨骼肌和猪胃黏膜组织,它们取自合格的屠宰场。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。

2.2 光相干断层成像术成像及厚度测定

光相干断层成像术系统^[12~14]所用的光源中心波长和带宽分别为820 nm和25 nm,纵向分辨率和横向分辨率分别为12 μm和16 μm。1.5±0.2 mm厚的猪骨骼肌和1.5±0.1 mm厚的猪胃黏膜组织切片平放在载玻片(作为反射片)上,在样品表面局部施加光透明剂80%丙三醇(甘油)前及施加后5 min,10 min,20 min和30 min分别扫描获得图像。对于胃黏膜组织,光透明剂施加在上皮层表面。光相干断层成像术采用低相干光源和光外差测量技术,其核心由一个光纤化的迈克尔逊(Michelson)干涉仪实现干涉测量,通过纵向扫描(A扫描)探测物体内部不同深度的背散射(反射)光,进而通过横向扫描获得断层截面像。

将组织切片平放在一个载玻片(作为反射片)上,在施加不同的试剂前后分别获取其断层扫描图像,测出的从样品表面到反射片的轴向距离即样品的物理厚度^[14]。

2.2 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1.5±

0.2 mm的猪骨骼肌和1.5±0.1 mm的猪胃黏膜组织切片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。与光相干断层成像术成像相对应,在样品表面局部施加光透明剂80%甘油前及施加后1 min,5 min,10 min,20 min和30 min分别测定光漫透射率和漫反射率光谱^[15,16]。

光透明剂的渗透进程可以通过检测组织中水分的变化来实现。为此,需要将波长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),再由1936 nm和1100 nm两波长处的表观吸收率差值(ΔA)来检测水分的变化^[15,16]。样品施加光透明剂一定时间后的水分相对含量C_{water}表示为

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

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。光透射率变化量ΔT和漫反射率变化量ΔR表示为

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

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

式中选择T为峰值波长处的光透射率值(本实验测得透射谱的峰值波长为1278 nm),R为峰值波长处的漫反射率值来(本实验测得反射谱的峰值波长为1066 nm)计算ΔT和ΔR。水分相对含量C_{water},光透射率变化量ΔT和漫反射率变化量ΔR都为四次重复实验的平均结果。

3 结果与讨论

图1为猪肌肉组织表面局部施加光透明剂80%丙三醇(甘油)前和经不同处理时间后(0 min,1 min,5 min,10 min,20 min和30 min)的光相干断层扫描图像。由图可见,对照样品(处理前)中到达置于组织下的载玻片的光非常微弱(图1(a));随着时间的推移光透明剂进入组织,载玻片的亮度逐渐加强(图1(b)~(f)),处理30 min后的样品载玻片反射回来的光的强度是对照样品的3倍,而且肌肉样品的内部肌纤维结构的成像清晰度亦逐渐增加。这是由于随着光透明剂的进入,组织对光的散射减小导致光的穿透深度增加和散射噪声被抑制导致成像对比度增强的结果。

图2显示猪胃黏膜组织上皮层施加光透明剂

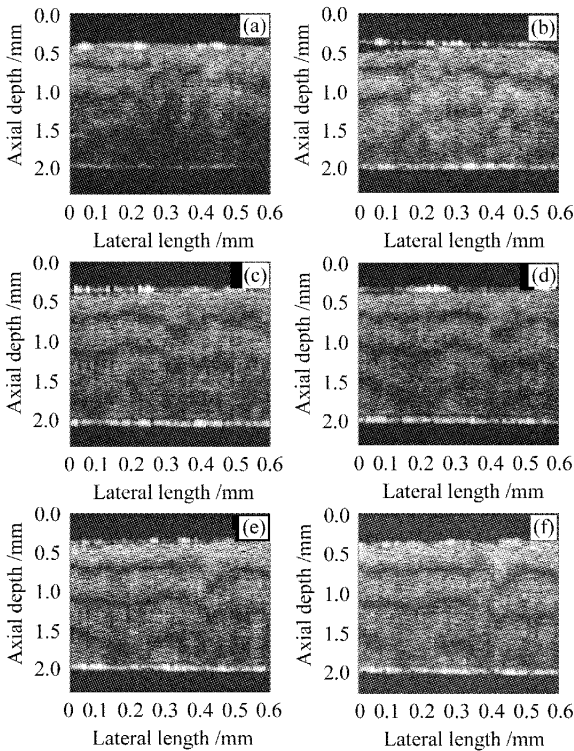


图 1 肌肉样品 80%丙三醇(甘油)处理前(a)和处理后 1 min (b), 5 min (c), 10 min (d), 20 min (e), 30 min (f)的光相干断层成像对照图

Fig.1 OCT images of an example of the fresh porcine muscle before (a) and at 1 min (b), 5 min (c), 10 min (d), 20 min (e), and 30 min (f) after the topical application of 80% glycerol

80%丙三醇前和经不同处理时间后(0 min, 10 min, 20 min, 和30 min)的光相干断层扫描图像。图 2 (a)中,对照样品下的载玻片只是模糊可见,意味着组织对光的散射较强,入射光很难透过未处理的组织;随着光透明剂进入组织,载玻片的亮度逐渐加强(图 2(b)~(d)图),意味着穿过组织的光的强度逐渐增强,组织随着光透明剂的扩散变得越来越透明。光透明剂处理30 min后(图 2(d))样品的内部结构层次即粘膜层中的上皮层(E)、固有层(LP)、黏膜肌层(MM)以及黏膜层下的黏膜下层(SM)清晰可见,而对照样品(图 2(a))未见这些内部结构。可见施加光透明剂后改善了胃黏膜组织光相干断层成像术成像的探测深度和对比度。

为了定量比较这两种不同微结构的生物组织的光透明效果,分析了这两种组织在施加光透明剂的过程中近红外光漫透射率和漫反射率的变化。图 3 (a) 和 (b) 分别是新鲜猪肌肉组织样品在 800~2200 nm范围内透射光谱和漫反射光谱随时间变化

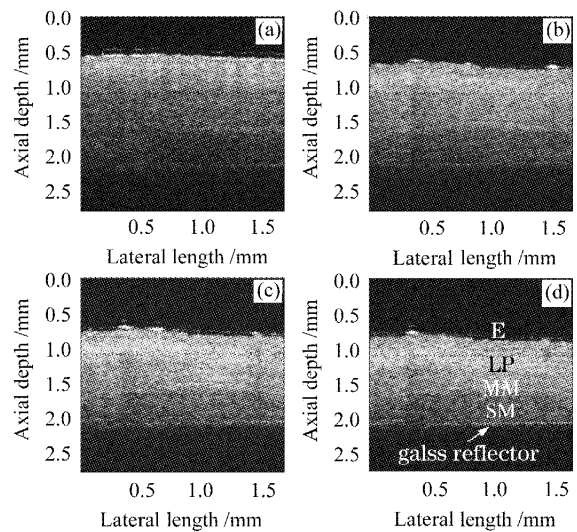


图 2 胃黏膜组织样品 80%丙三醇(甘油)处理前(a)和处理后 10 min (b), 20 min (c), 30 min (d)的光相干断层成像对照图

Fig.2 OCT images of an example of the fresh porcine stomach mucosa before (a) and at 10 min (b), 20 min (c), and 30 min (d) after the topical application of 80% glycerol

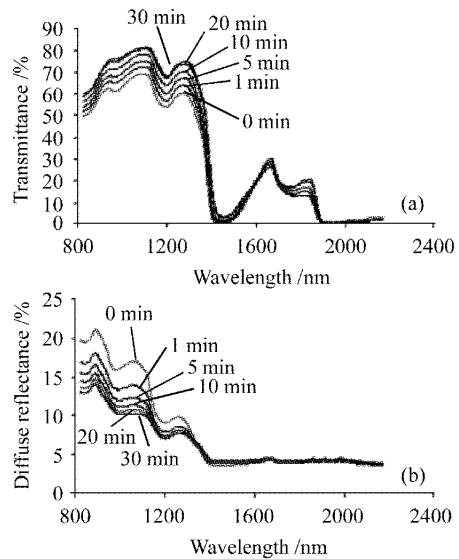


图 3 肌肉组织样品在 800~2200 nm 范围的光谱变化 ($n = 4$)

(a) 光透射率; (b) 漫反射率

Fig.3 Measured optical changes for muscle samples over the range from 800~2200 nm ($n = 4$)

(a) light transmittance; (b) diffuse reflectance

的情况。图 3(a)中由下到上的透射光谱曲线和图 3 (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 0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 20 min 和 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。猪胃黏膜组织表现出相似的增加光穿透深度的趋势,即施加光透明剂后,随时间增加组织样品的光透射率提高而漫反射率降低(光谱未给出)。这和我们研究不同光透明剂处理猪胃黏膜组织时的 80% 丙三醇处理结果相一致^[15]。由图可见,这两种组织均在波长 1278 nm 处光透射率的增加最大,在 1066 nm 处光反射率减小最大。为便于了解这两种组织光透明效果和进程,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峰值波长 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透射率变化(式(2))曲线(图 4(a))和反射率变化(式(3))曲线(图 4(b))。可见,肌肉组织的光透射率上升和反射率下降趋势较快(菱形◆),在处理的 0~1 min 范围内变化最快,1~10 min 期间减慢,10~30 min 趋于平稳而变化很小。黏膜组织的情形不同(正方形■),在处理后的 5 min 内变化较小,5~30 min 期间光透射率的增加和漫反射率的降低逐渐实现。由式(2)得到的经处理 30 min 后的肌肉组织和黏膜组织的透射率变化(增加)的百分比大约分别为 21% 和 16%,而由式(3)求得的漫反射率变化(减少)的百分比分别为 33% 和 21%。这些结果提示,对光透明剂(丙三醇)而言,肌肉组织的光透明效果比黏膜组织好,而且进

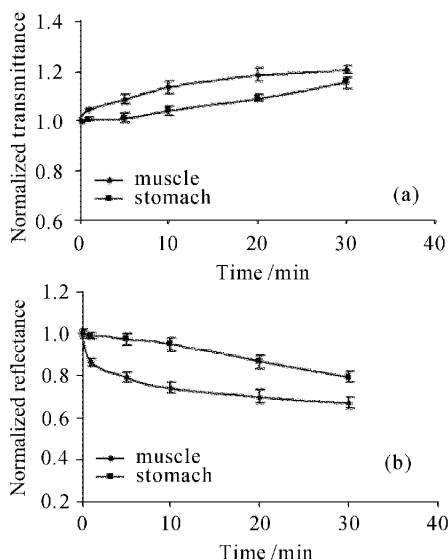


图 4 肌肉和胃黏膜组织在(a)1278 nm 处的光透射率和 (b)1066 nm 处的光反射率随时间变化曲线 ($n = 4$)

Fig. 4 Changes in light transmittance (a) at 1278 nm and reflectance (b) at 1066 nm as a function of time in muscle and stomach mucosa tissue applied with 80% glycerol, respectively ($n = 4$)

程较快。这是由于两种组织的结构不同而导致丙三醇(甘油)进入组织的难易程度不同造成的。肌肉组织内部的松散结构,使得丙三醇能够更快更多地进入到组织中,从而更容易建立起折射率匹配环境,使光散射得到更有效的抑制。而黏膜上皮层细胞的紧密排列结构,使得丙三醇渗透进入黏膜组织较难,影响了光透明效果。这种差异还可以从丙三醇进入组织后造成组织失水的水含量动力学进程得到佐证。

图 5 为这两种组织失水量随时间变化的曲线。图中数值是按式(1)得到的样品处理后与处理前的相对水含量。从图可以看出,两种组织在处理后的水含量都随时间减少,但失水程度和动态过程并不相同,黏膜组织(正方形■)在处理后的 5 min 内变化很小,失水在 5~30 min 间线性增加;而肌肉组织的失水在 0~1 min 内最快,1~10 min 期间失水速率减慢,20~30 min 间趋于平稳。表明在施加光透明剂的初始阶段,光透明剂(丙三醇)更快地渗透入肌肉组织。这与前面光相干断层成像术的结果相互对应。在整个 30 min 里肌肉组织和胃黏膜组织的失水率大约分别为 38% 和 10%。比较图 4 和图 5 可见,这两种组织的光透明进程和它们各自的失水动力学进程是相一致的。

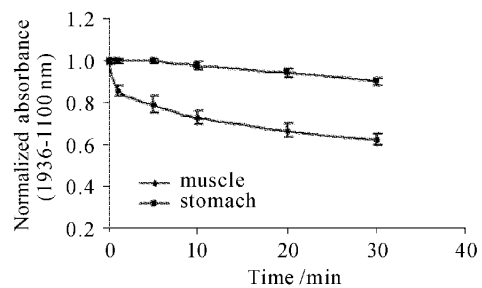


图 5 肌肉和胃黏膜组织样品的水分相对含量随时间的变化曲线 ($n = 4$)

Fig. 5 Relative water content to native tissue (control) in muscle and stomach mucosa samples as a function of time ($n = 4$)

这两种组织失水率的差异,也反映了组织结构不同对物质转运过程的影响。光透明剂被涂抹在组织表面后,由于具有比组织液高的渗透压,会由外向内渗透进入组织,而部分组织液和细胞液则从组织中被置换并排出。这一物质转移和交换过程与水与光透明剂对细胞膜和整体组织的渗透能力有关^[16]。显然,肌肉组织内由于肌纤维的排列较松散,且含有大量胶原形成的水溶性区域,光透明剂(丙三醇)较易渗透进入^[17,18],随着光透明剂在目标组织中的渗

透, 渗透前沿所及组织内部的水被逐步置换排出^[14]。这一进程在肌肉组织中要比在胃黏膜中迅速得多, 表现为肌肉组织表面水的排出所需时间比胃黏膜组织的要短。

无水丙三醇(甘油)的折射率为 1.47, 它部分取代折射率为 1.33 的组织液和胞液(基质)后, 与组织中的散射成分形成了一个折射率匹配环境, 而且随着胞外液和胞内液的水分含量减少, 散射中心和基质之间折射率的匹配度得到进一步提高^[4]。理论上, 这种散射中心和基质之间折射率的匹配效应将减弱目标组织对光的散射强度^[19], 从而增加近红外光进入生物组织的穿透深度, 实现组织的光透明。

4 结 论

采用 80% 丙三醇(甘油)作为光透明剂, 能够提高光对肌肉组织和胃黏膜组织的穿透深度。然而, 由于这两种组织在结构上的差异, 光透明剂进入这两种组织的动力学过程和水分排出量都不同。肌肉组织较胃黏膜上皮组织松散的结构使得光透明剂在肌肉组织中的渗透更快更多, 光透明效果也更好。结果提示为了实现高效光透明, 应该针对目标组织的内部结构寻求相应的易渗透且匹配效率高的光透明剂。

致谢 本文部分工作在英国 Cranfield 大学完成, 作者感谢 Ruikang Wang 教授的帮助。

参 考 文 献

- 1 Valery V. Tuchin, Irina L. Maksimova, Dmitry A. Zimnyakov *et al.*. Light propagation in tissues with controlled optical properties [J]. *J. Biomed. Opt.*, 1997, **2**(4): 401~407
- 2 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
- 3 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
- 4 Gracie Vargas, Kan F. Chan, Sharon 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**: 213~220
- 5 Ruikang Wang, Xiangqun Xu, Valery 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
- 6 Valery V. Tuchin, Xiangqun Xu, Ruikang Wang. Dynamic optical coherence tomography in optical clearing, sedimentation and aggregation study of immersed blood [J]. *Appl. Opt.*, 2002, **41**(1): 258~271
- 7 Xiangqun Xu, Ruikang Wang, James 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**:1707~1713
- 8 Ruikang Wang, Xiangqun Xu, Yonghong He *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
- 9 Xiangqun Xu, Yonghong He, S. G. Proskurin *et al.*. Optical clearing in vivo of human skin with hyperosmotic chemicals investigated by optical coherence tomography and near infrared spectroscopy [C]. *SPIE*, 2004, **5194**:129~135
- 10 Misbah H. Khan, Bernard Choi, Samuel Chess *et al.*. Optical clearing of in vivo human skin implications for light-based diagnostic imaging and therapeutics [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2004, **34**:83~85
- 11 B. Yonng, J. W. Heath. *Wheater's Functional Histology* [M]. Churchill Livingstone, 2000
- 12 Xiangqun Xu, Ruikang Wang, Alkia 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
- 13 Xiangqun Xu, Ruikang Wang, James 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**:1205~1221
- 14 Xiangqun Xu, Ruikang Wang. The role of water desorption on optical clearing of biotissue: studied with near infrared reflectance spectroscopy [J]. *Medical Physics*, 2003, **30**(6): 1246~1253
- 15 Xiangqun Xu, Ruikang Wang. Synergistic effect of hyperosmotic agents of dimethyl sulfoxide and glycerol on optical clearing of gastric tissue studied with near infrared spectroscopy [J]. *Physics in Medicine & Biology*, 2004, **49**: 457~468
- 16 Xu Xiangqun, Wu Liu. Influence of permeation characteristics of hyperosmotic agents on optical clearing of gastric tissue studied with near-infrared spectroscopy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2005, **32**(5):717~722
- 徐向群, 吴柳. 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[J]. *中国激光*, 2005, **32**(5):717~722
- 17 B. W. Barry. Mode of action of penetration enhancement in human skin [C]. The Third International symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, February 24~27, 1987, Salt Lake City, USA 85~96
- 18 R. J. Scheuplein, J. H. Blank. Permeability of the skin [J]. *Physiological Reviews*, 1971, **51**:702~747
- 19 H. Liu, B. Beauvoit, M. Kimura *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