

组织表面附着水膜层对脉冲 CO₂ 激光 骨硬组织消融的影响

赵海滨 张先增 詹振林 谢树森

(福建师范大学激光与光电子研究所, 医学光电科学与技术教育部重点实验室,
福建省光子技术重点实验室, 福建 福州 350007)

摘要 评估组织表面附着水膜层对激光骨硬组织消融效果的影响。以新鲜离体牛胫骨组织为实验样品, 置于速度为 12 mm/s 的一维电动平移台上, 分别在有附着和无附着水膜层情况下使用脉冲 CO₂ 激光进行垂直照射, 来回扫描 5 次。激光波长 10.64 μm, 脉冲频率 60 Hz, 能量密度范围 18~84 J/cm², 光斑直径 400 μm, 水膜层厚度 0.4 mm。辐照后, 利用体视显微镜和扫描电镜 (SEM) 观察消融凹槽表面形貌改变和微结构变化, 利用光学相干层析成像 (OCT) 技术测量消融凹槽深度。结果表明, 组织表面附着水膜层可减少激光骨消融过程产生的碳化和热损伤, 有利于清洁消融凹槽, 且辐射曝光量为 50 J/cm² 和 70 J/cm² 时附着水膜层可提高消融速率。

关键词 医用光学; 生物技术; 激光消融; 骨硬组织; 脉冲 CO₂ 激光; 水膜层

中图分类号 R318.51 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201138.0104002

Influence of an Applied Water Film on Bone Hard Tissue Ablation with Pulsed CO₂ Laser

Zhao Haibin Zhang Xianzeng Zhan Zhenlin Xie Shusen

(*Fujian Provincial Key Laboratory for Photonics Technology, Key Laboratory of Optoelectronic Science and
Technology for Medicine of Ministry of Education, Institute of Laser and Optoelectronics Technology,
Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China*)

Abstract The influence of an applied water film on bone hard tissue ablation by pulsed CO₂ laser is evaluated. Fresh bovine shank bone in vitro used in the experiment is put on a PC-controlled motorized linear drive stage and is moved repeatedly with the speed of 12 mm/s through focused beam of laser. In each sample, two cuts are produced, one with water film and the other with not. The wavelength of pulsed CO₂ laser is 10.64 μm, the pulse repetition rate is 60 Hz, the energy density is 18~84 J/cm², the beam diameter is about 400 μm and the water film thickness is 0.4 mm. The scanning number is five. The surface morphology and microstructure of ablation grooves are examined by stereoscopic microscope and scanning electron microscope (SEM) respectively. The crater depth is measured with optical coherence tomography (OCT). It shows that water film can not only reduce carbonization and thermal damage, clean the ablation groove, but also augment ablation rate at the radiant exposure of 50 and 70 J/cm².

Key words medical optics; biotechnology; laser ablation; bone hard tissue; pulsed CO₂ laser; water film

OCIS codes 170.1420; 170.6930; 140.3470

1 引 言

激光硬组织消融技术的临床应用要求具有高的

消融效率和精确度以及小的热损伤。国内外学者已经对激光与生物硬组织(骨和牙硬组织)的相互作用

收稿日期:2010-04-29; 收到修改稿日期:2010-06-22

基金项目:国家自然科学基金(60578057)、卫生部科学研究基金(WKJ2008-2-035)、福建省自然科学基金(2008J0317)和福建省教育厅科研基金(JB09068)资助课题。

作者简介:赵海滨(1984—),男,硕士研究生,主要从事医学光子学方面的研究。E-mail:sxzhb25@163.com

导师简介:谢树森(1940—),男,教授,博士生导师,主要从事医学光子技术及其应用方面的研究。

E-mail:ssxie@fjnu.edu.cn(通信联系人,中国光学学会会员号:3509191#)。

进行了初步的研究^[1~14],结果表明,激光消融牙硬组织时进行水喷雾或在组织表面附着一层水膜层,可以清洁消融切口和降低热损伤,在一定辐照条件下,还可提高消融速率和效率^[1,5~10],并引起组织的化学成分的改变,进而对牙硬组织与修复材料的粘结力产生重要影响^[2~4]。M. Staninec 等^[3]进行牙釉质 Er:YAG 激光消融实验研究,通过激光辐照参数和喷水速率优化组合,提高了牙硬组织与复合树脂的粘结力;M. Mir 等^[7]研究水膜层厚度对 Er:YAG 激光消融牙釉质的影响,调节光纤与样品的距离控制水膜层厚度,在一定辐射曝光量下,水膜层厚度对消融效率影响的统计分析显示无显著性差异。已有文献在水介导生物硬组织激光消融的研究中,均采用牙硬组织(牙釉质和牙本质)为研究对象;实验光源均为 Er:YAG 或 Er:YSGG 激光,属于水对激光的吸收系数远大于对靶组织的吸收系数的情形,而在水对激光的吸收系数小于对靶组织的吸收系数的情况下,骨硬组织消融特性的实验研究尚未见报道,相关数据还相对缺乏。

本研究以新鲜离体牛胫骨为研究对象,以脉冲 CO₂ 激光为实验光源,其波长为 10.64 μm,对水和靶组织的吸收系数分别为 817 cm⁻¹ 和 1500 cm⁻¹,属于水的吸收系数小于靶组织吸收系数的情形。采用“排水法+液枪滴定法”控制水膜层厚度,评估有附着和无附着水膜层对骨硬组织激光消融效果的影响。

2 材料与研究方法

实验样品为新鲜离体牛胫骨组织,于牛死后 5~6 h 内获得。随后切除周围软连接组织,剥掉骨膜,通过刮擦使样品表面尽可能平滑,立即用浸过生理盐水的纱布包裹,密封冷藏于 4 °C 的冰箱中。实验时先将组织样品切为若干块,尺寸为 30 mm × 10 mm(厚度为牛胫骨原始尺寸,约 6 mm),并恢复至室温。

实验光源为脉冲 CO₂ 激光(以色列夏普兰公司,Sharplan 30C),波长 10.64 μm,脉冲频率 60 Hz,功率 0~30 W 可调。激光光束通过关节臂传输后经透镜直接聚焦于组织样品上,光斑直径约为 400 μm,辐射曝光量分别取 18, 32, 50, 70 和 84 J/cm²,并通过能量计(厂家:Orphir,表头型号:NOVA II,探头型号:PE50-BB-SH-V2)进行实时检测。样品置于计算机控制的一维电动平移平台上,速度设为 12 mm/s,进行垂直线性扫描,扫描次

数为 5 次,即实际作用于同一位置的等效脉冲数为 5 个。等效脉冲数可通过脉冲重叠因子 $n = f\omega/v$ 和扫描次数的乘积获得,其中 f 为脉冲频率, ω 为光斑半径, v 为移动速度。图 1 即为实验装置图。

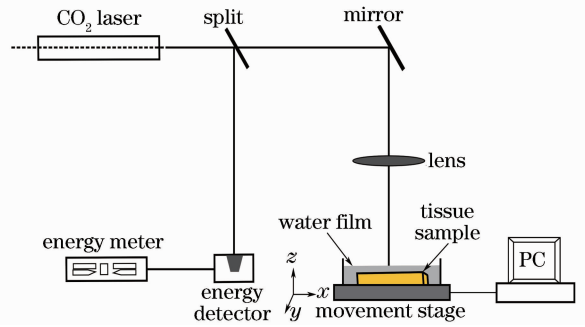


图 1 实验装置图

Fig. 1 Experimental setup

采用“排水法+液枪滴定法”实现组织表面附着 0.4 mm 水膜层。步骤为:游标卡尺测出玻璃皿内径 d , 计算其底面积 s , 分别取不同部位测量样品的厚度平均值 L , “排水法”获得骨样品体积 V_1 , 将样品擦干固定在玻璃皿底部; 计算当液面恰好与样品表面相切所需液体体积 V_2 , 可调式移液器(量程 100~1000 μL)精确移取体积 V_2 的生理盐水, 加入玻璃皿中, 注意该过程中液体不能滴在样品表面上; 随后移取体积 $V_3 = 0.4 \text{ mm} \times s$ 的生理盐水, 加在样品表面上, 并使其均匀铺开。

激光辐照后,通过肉眼和体视显微镜(LEICA MZ16FA, Germany)观察组织消融凹槽表面形貌的改变,光学相干层析成像(OCT)系统获取消融凹槽截面图。实验所用 OCT 系统的中心波长 $\lambda_0 = 850 \text{ nm}$, 带宽 $\Delta\lambda = 50 \text{ nm}$, 功率 $P = 7 \text{ mW}$, 横向和轴向分辨率约为 10 μm。随后立即将样品放入体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液中,在 4 °C 冰箱中固定 3~12 h,再用 PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min,再放入体积分数为 1% 的锇酸溶液中用 4 °C 冰箱重固定 1 h,用 PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min;清洗后放入浓度递增(体积分数为 30%~100%)的丙酮溶液中脱水,冷冻干燥仪干燥制备标本,离子溅射镀膜。扫描电镜观察骨组织消融凹槽微结构的变化。

3 结果与讨论

3.1 消融凹槽表面形貌分析

图 2 为无水和附着水膜层情况下,脉冲 CO₂ 激光辐照牛胫骨组织产生的消融凹槽体视显微镜表面形态图,放大 80 倍。可以发现在两种情况下,消融切口表面宽度均随辐射曝光量增大而增大。当样品

表面无附着水膜层时,所有消融切口边缘均可见厚厚的黑色碳化层,其上缀有许多颗粒状玻璃般光亮的白色凝结物,外围有一层浅棕色的组织变性层[图 2(a)~(d)]。样品表面附着水膜层后,碳化层明显变薄,单位面积内颗粒状的白色凝结物明显减少,外围浅棕色的变性区范围变小[图 2(e)~(h)]。

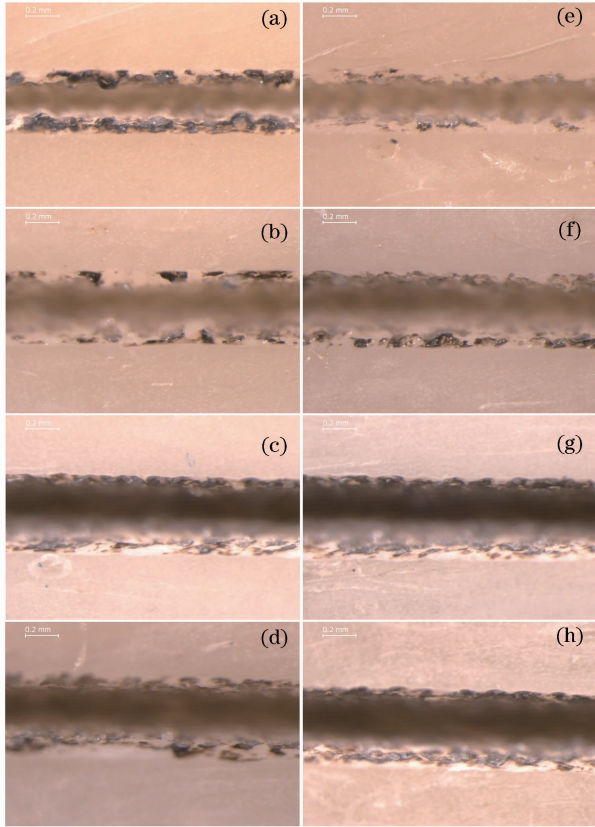


图 2 脉冲 CO₂ 激光辐照牛胫骨组织产生的消融凹槽表面形态图(80×)。(a)~(d) 无水:18,32,50,70 J/cm²,(e)~(h) 有水:18,32,50,70 J/cm²

Fig.2 Surface morphology of grooves on bovine shank bone created by pulsed CO₂ laser (80×). (a)~(d) without water: 18, 32, 50, 70 J/cm², (e)~(h) with water: 18, 32, 50, 70 J/cm²

实验采用的脉冲 CO₂ 激光,正好处于骨组织中主要成分羟磷灰石的吸收峰,当激光辐照骨样品时,羟磷灰石强烈吸收激光能量,引起组织体温度升高,导致骨组织中的碳酸盐成分丢失和羟基磷灰石等矿物质发生重大变性,从而导致组织体碳化现象的发生^[4]。实验观察到的消融切口边缘的黑色碳化现象即为吸热引起组织重大变性的结果。切口边缘浅棕色的变性层则主要是由于蛋白质的缺失所致。实验观察到的白色凝结物疑为矿物质成分或矿物质的熔融再结晶。D. Fried 等^[2]研究牙釉质激光消融的水增强机制时,也观察到类似的白色凝结物,通过红外

傅里叶光谱分析认为是激光辐照时形成的非磷酸盐等矿物质。当组织表面附着水膜层后,水吸收部分激光能量,引发水的对流作用,限制热量聚集并缩短热扩散时间,从而抑制组织局部温升过高,减弱碳化 and 周边组织热损伤程度。

3.2 消融凹槽深度和消融速率分析

图 3 为无水和附着水膜层情况下,脉冲 CO₂ 激光辐照牛胫骨组织产生的消融凹槽的 OCT 纵截面图。消融凹槽形状清晰,呈 V 形,中心处凹槽最深,其原因与激光光束的分布有关,且凹槽深度随着辐射曝光量的增加而加深。当样品表面无附着水膜层时,消融凹槽底部细屑较多;样品表面附着水膜层后,凹槽底部细屑明显减少,由此可见水在消融过程中扮演着“清洁”的角色。

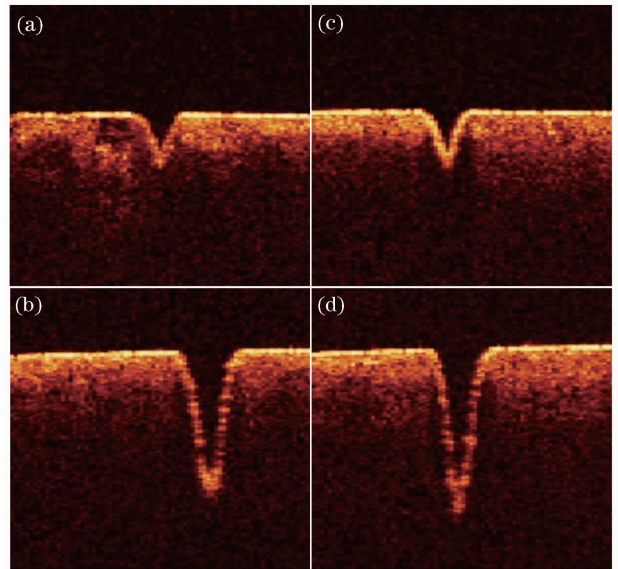


图 3 脉冲 CO₂ 激光辐照牛胫骨样品组织获得的消融凹槽纵截面图。无水,(a) 18 J/cm²,(b) 70 J/cm²;有水,(c) 18 J/cm²,(d) 70 J/cm²

Fig.3 Longitudinal section of grooves on bovine shank bone created by pulsed CO₂ laser ablation. Without water, (a) 18 J/cm², (b) 70 J/cm²; with water, (c) 18 J/cm², (d) 70 J/cm²

图 4 为无水和附着水膜层情况下,脉冲 CO₂ 激光辐照骨组织的消融凹槽深度随辐射曝光量的变化关系曲线,误差棒为实验标准偏差。凹槽深度随着辐射曝光量的增大逐渐加深。当辐照曝光量为 18,32,84 J/cm²时,有水和无水膜层消融凹槽深度相当;当辐射曝光量为 50,70 J/cm²时,附着水膜层时的消融凹槽深度略高于无水膜层时消融凹槽的深度。

图 5 为无水和附着水膜层情况下,脉冲 CO₂ 激

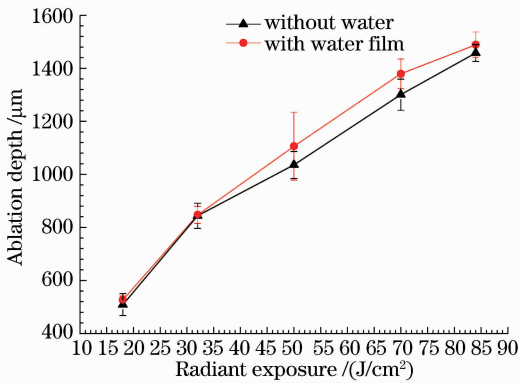


图 4 有水和无水膜层的情况下,脉冲 CO₂ 激光辐射骨样品组织获得的消融凹槽深度随辐射曝光量的变化曲线,误差棒为实验标准误差

Fig. 4 Grooves depth of bovine shank bone versus radiant exposure after irradiation with pulsed CO₂ laser in the case of without and with water film. The error bars are standard deviation of date

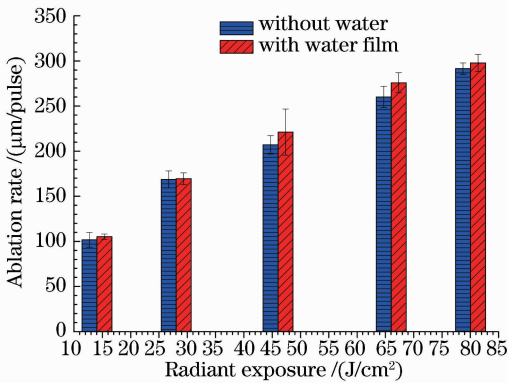


图 5 有水和无水膜层的情况下,脉冲 CO₂ 激光辐照骨样品的消融速率随辐射曝光量的变化曲线,误差棒为实验标准误差

Fig. 5 Ablation rate of bovine shank bone versus radiant exposure after irradiation with pulsed CO₂ laser in the case of without and with water film. The error bars are standard deviation of date

光辐照骨组织的消融速率(单个脉冲的平均消融深度)随辐射曝光量的变化关系柱状图,误差棒为实验标准偏差。消融速率随着辐射曝光量的增大逐渐增加。当辐射曝光量为 18, 32, 84 J/cm² 时,有水和无水膜层消融速率相当;当辐射曝光量为 50, 70 J/cm² 时,附着水膜层时的消融速率略高于无水膜层时的消融速率。

无附着水膜层时,CO₂ 激光消融骨硬组织时形成的组织细屑(图 3)和碳化现象(图 2)吸收大量的激光能量,抑制了消融的进一步深入。附着水膜层时水热动力学特性提高消融速率。辐照初始,水膜

层吸收部分激光能量产生气穴现象,并形成气穴通道,后续激光脉冲正是通过这一通道穿透水膜层后作用于靶组织的。由于形成气穴通道的水蒸气的密度远低于液态水的密度(约为液态水的 1%~0.1%),其吸收系数很小,使得激光脉冲可以穿透一定厚度的水膜层后与靶组织相互作用。组织内部的水和表面附着的水膜层吸收激光能量温度升高,当超过其平衡饱和温度时,将导致气穴坍塌及微爆并伴随较大的瞬时微爆压力^[6,8,15,16],提高了消融速率,并对消融凹槽有显著的冲刷和磨蚀作用。附着水膜层时(图 2)消融切口周围白色凝结物和(图 3)凹槽内组织细屑均明显减少,证明了水的冲刷效果。

3.3 消融凹槽微结构分析

图 6 为辐射曝光量 32 J/cm² 时,有水和无水膜层情况下消融凹槽扫描电镜图。无附着水膜层时凹槽边缘参差不齐,且粘附有大的组织碎片;当组织附着水膜层时,凹槽边缘整齐,无碎片的粘附[图 6(a), (d)]。无附着水膜层水时凹槽内壁粗糙,且有一层稀疏变性玷污层,有大的组织细屑和熔融物粘附在上面;当组织附着水膜层时,凹槽规则性和平整度明显变好,内壁附着的玷污层以及单位面积内的

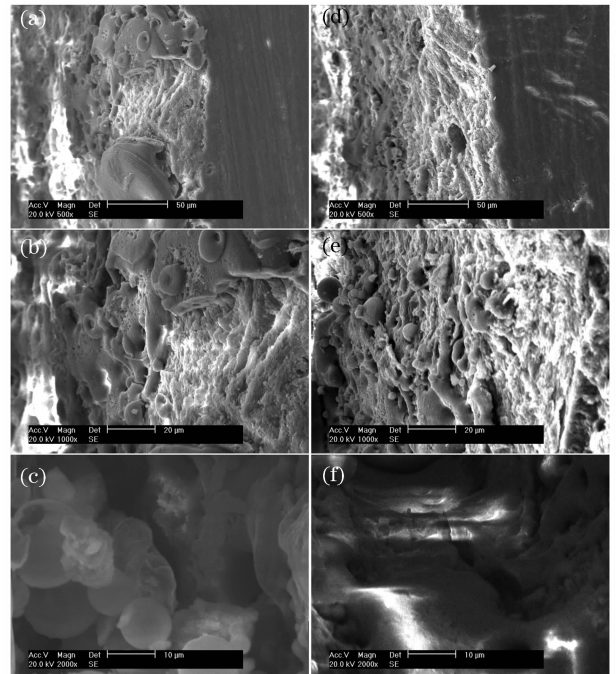


图 6 辐射曝光量为 32 J/cm² 时,脉冲 CO₂ 激光辐照牛胫骨样品组织获得的消融凹槽微结构图

(a)~(c) 无水, (d)~(f) 有水

Fig. 6 Microstructure of grooves on bovine shank bone created by pulsed CO₂ laser at the radiant exposure of 32 J/cm². (a)~(c) without water, (d)~(f) with water

组织细屑和熔融物大量减少,整个内壁变得相对光滑[图 6(b),(e)].无附着水膜层时凹槽底部堆有大量的块状细屑和熔融物,并且不平整;当组织附着水膜层时,底部单位面积内的细屑大量变少,并且变为颗粒状,平整度也明显变好[图 6(c),(f)].附着水膜层时,消融凹槽微结构明显改观,正是水的磨蚀效果所带来的。

4 结 论

在水的吸收系数小于靶组织吸收系数的情形下,对水膜层介导脉冲 CO₂ 激光消融骨硬组织进行了研究。通过对消融凹槽形貌、形态学和微结构以及消融速率等进行分析比较,评估不同辐射曝光量下,组织表面有附着和无附着水膜层对消融效果的影响。结果表明,水在激光硬组织消融中扮演着重要的角色,组织表面附着水膜层与激光相互作用,引发水的对流作用,限制热量聚集并缩短热扩散时间,从而抑制组织局部温升过高,减弱碳化 and 周边组织热损伤程度;同时产生的热动力效应对消融凹槽有显著的冲刷和磨蚀作用,明显改观了凹槽的表面形貌和微结构,且辐射曝光量为 50 J/cm² 和 70 J/cm² 时附着水膜层可提高消融速率。

本研究仅仅对水膜层介导骨硬组织激光消融进行了初步的研究,水介导消融的一些内在规律性问题还需要进一步归纳总结,水介导消融的机制还需要进一步探索。

参 考 文 献

- 1 M. Hossain, Y. Nakamura, Y. Yamada *et al.*. Ablation depths and morphological changes in human enamel and dentine after Er: YAG laser irradiation with or without water mist [J]. *J. Clin. Laser Med. & Surg.*, 1999, **17**(3):105~110
- 2 D. Fried, N. Ashouri, T. Breunig *et al.*. Mechanism of water augmentation during IR laser ablation of dental enamel [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2002, **31**(3):186~193
- 3 M. Staninec, J. Xie, C. Q. Le *et al.*. Influence of an optically thick water layer on the bond-strength of composite resin to dental enamel after IR laser ablation [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2003, **33**(4):264~269
- 4 A. D. Rosa, A. V. Sarma, C. Q. Le *et al.*. Perihelical thermal and mechanical damage to dentin with microsecond and sub-microsecond 9.6 μm , 2.79 μm , and 0.355 μm laser pulses [J].

- Lasers Surg. Med.*, 2004, **35**(3):214~228
- 5 J. Meister, R. Franzen, K. Forner *et al.*. Influence of the water content in dental enamel and dentin on ablation with erbium YAG and erbium YSGG lasers [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2006, **11**(3): 034030
- 6 A. Welch, T. Milner, Chen Shaochen *et al.*. Enhancement of High Power Pulsed Laser Ablation and Biological Hard Tissue Applications [D]. Texas: The university of Texas at Austin, 2006, 65~93
- 7 M. Mir, J. Meister, R. Franzen *et al.*. Influence of water-layer thickness on Er:YAG laser ablation of enamel of bovine anterior teeth [J]. *Laser Med. Sci.*, 2008, **23**(4):451~457
- 8 H. W. Kang, J. Oh, A. J. Welch. Investigations on laser hard tissue ablation under various environments [J]. *Phys. Med. Biol.*, 2008, **53**(12):3381~3390
- 9 V. Colucci, F. L. Amaral, J. D. Pecora *et al.*. Water flow on erbium: yttrium-aluminum-garnet laser irradiation: effects on dental tissues [J]. *Laser Med. Sci.*, 2009, **24**(5):811~818
- 10 M. Mir, N. Gutknecht, R. Poprawe *et al.*. Visualising the procedures in the influence of water on the ablation of dental hard tissue with erbium: yttrium-aluminium-garnet and erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet laser pulses [J]. *Lasers Med. Sci.*, 2009, **24**(3):365~374
- 11 Xianzeng Zhang, Shusen Xie, Qing Ye *et al.*. Influence of scanning velocity on bovine shank bone ablation with pulsed CO₂ laser [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2009, **7**(2):138~141
- 12 Zhang Xianzeng, Xie Shusen, Zhan Zhenlin *et al.*. Influence of different defocus conditions on bone hard tissue ablation with pulsed CO₂ laser [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(7):1116~1120
- 张先增,谢树森,詹振林等.不同离焦条件对骨硬组织消融的影响[J]. *中国激光*, 2008, **35**(7):1116~1120
- 13 Zhang Xianzeng, Wang Xiaoyan, Zhan Zhenlin *et al.*. Comparison of skull tissue ablation with pulse CO₂ and Er: YAG lasers [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10):2577~2581
- 张先增,王晓燕,詹振林等.脉冲 CO₂ 激光与 Er: YAG 激光颅骨组织消融的比较[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10):2577~2581
- 14 Lin Shi, Peng Qiming, Zhan Zhenlin *et al.*. Study of the ablation threshold of Er: YAG and Er,Cr: YSGG lased dental enamel [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10):2598~2602
- 林实,彭奇明,詹振林等. Er: YAG 激光和 Er,Cr: YSGG 激光消融牙釉质的阈值研究[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10):2598~2602
- 15 Xin Hui, Zhou Zhifu, Wang Guoxiang *et al.*. Evaporation characteristics of single R404a droplet in laser treatment of PWS in conjunction with cryogen spray cooling [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10):2691~2695
- 辛慧,周致富,王国祥等.激光手术喷雾冷却中 R404a 液滴的蒸发特性[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10):2691~2695
- 16 Zhou Yamin, Liu Qizhong, Zhang Xiaohui *et al.*. An efficient method for simulating time-domain broadening of laser pulse propagating underwater [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(1): 143~147
- 周亚民,刘启忠,张晓晖等.一种激光脉冲水下传输时域展宽模拟计算方法[J]. *中国激光*, 2009, **36**(1):143~147