

文章编号: 0253-2239(2002)03-0369-05

# 热作用下蛋白及全血光学特性变化的实验研究\*

朱 骆清铭 曾绍群 阮 玉

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074)

摘要: 利用自行研制的双积分球系统, 对不同温度(37℃~80℃)加热后的蛋白及人全血的光学特性参数(对波长为 632.8 nm 的光而言)进行了实验研究。结果表明, 热作用下生物样品生理特性的改变可用光学特性参数的变化来描述。不同的热剂量作用下, 样品形态及结构的改变是不同的, 相应的光学特性参数(吸收系数与散射系数)变化也不同。相同热作用下, 样品成分的不同, 导致样品光学特性参数的改变也存在差别。光学检测技术可望为热疗的实时无损监测提供一种新的手段。

关键词: 人全血; 蛋白; 光学特性参数; 热作用; 双积分球系统

中图分类号: TN247 文献标识码: A

## 1 引 言

激光在医学中的应用之一就是病变组织的热凝固治疗, 为了有效地指导临床, 解决激光热疗中的最佳“热剂量”问题, 人们提出了各种理论模型<sup>[1~3]</sup>, 理论的准确性取决于组织光学特性参数的测量<sup>[4,5]</sup>。生物组织的光学特性常用吸收系数  $\mu_a$ 、散射系数  $\mu_s$  及各向异性因子  $g$  来表征, 这里  $\mu_a$  ( $\text{mm}^{-1}$ ) 和  $\mu_s$  ( $\text{mm}^{-1}$ ) 的倒数分别表示光子在介质中被吸收或散射前所走过的平均距离,  $g$  为光子在不同方向上的散射几率。当光通量的空间分布变化不是很大时, 或在远离边界及源的区域, 散射各向异性的细节并不重要, 因而常将  $\mu_s$  和  $g$  简化成单一的散射系数  $\mu'_s = \mu_s(1-g)$ , 即约化散射系数<sup>[6]</sup>。

热疗过程中, 被治疗组织的光学特性参数会发生变化, 虽然有文献对某些组织在热作用下光学特性参数的改变进行过研究, 但不同文献给出的结论却并不完全一致<sup>[7~9]</sup>。Roggan<sup>[7]</sup>在对人前列腺及狗肝脏凝固前后的光学特性参数(850 nm, 980 nm, 1064 nm)进行测量后, 认为凝固会引起散射系数急剧增加, 而对吸收系数及各向异性因子的影响却很小。Cilesiz<sup>[8]</sup>对人动脉的测量(400 nm~1300 nm)结果表明, 凝固会使约化散射系数与吸收系数显著增加。Pickering<sup>[9]</sup>给出的狗心脏测量结果(633 nm)与

Cilesiz 的类似, 但约化散射系数的增加源于散射系数的增加及各向异性因子的减小。这些差异是由生物组织的多样性决定的, 为此人们把目标开始转向对组织成分的研究, 如热作用所引起的血液及蛋白质光学特性参数的改变, 但所研究的温度范围较小(25℃~55℃)<sup>[10]</sup>, 或只研究了散射特性的变化<sup>[11]</sup>。热疗是一个温升的过程, 仅研究小温度范围内光学特性的变化或单一散射特性是不够的, 还应该了解凝固过程中光学特性的改变, 这对进一步研究生物组织的热损伤进程非常重要。

我们自行研制了一套用于组织光学特性参数测量的双积分球系统, 对室温(23℃)及不同温度(37℃~80℃)作用下的蛋白及人全血的光学特性参数(632.8 nm)进行了测量。文中简要介绍了该系统的工作原理及获取光学特性参数的方法, 在此基础上, 对所得实验结果进行了分析与讨论。

## 2 材料与方 法

### 2.1 样品的制备

蛋白的主要成分是蛋白质, 它常被用于研究组织的热凝固过程<sup>[10]</sup>, 蛋白样品源于市售的新鲜鸡蛋。

新鲜血液(60 ml)是从一健康男子(21岁)的静脉中抽取的, 为保证 5 h 内不出现血凝, 抽血前在注射器中加入了 50 U(1 mg 相当于 125 U)的肝素钠, 通过血常规检测, 其血细胞压积为 0.417。

液体样品分装在三种不同厚度(500  $\mu\text{m}$ , 750  $\mu\text{m}$  及 1000  $\mu\text{m}$ )的玻璃盒(50 mm×50 mm)中, 玻璃厚度为 200  $\mu\text{m}$ 。实验中, 保持玻璃表面的洁净

\* 国家自然科学基金(59836240) 国家杰出青年科学基金(60025514) 资助课题。

E-mail: qluo@hust.edu.cn

收稿日期: 2001-03-12; 收到修改稿日期: 2001-04-23

与干燥,以避免灰尘的散射和水的吸收。

## 2.2 实验系统

用于组织光学特性参数测量的双积分球实验系统框图如图 1 所示。该系统由以下几个部分组成:激光器、斩波器、积分球(三个)、锁定放大器、相关的探测电路及转换电路、计算机数据采集系统。样品

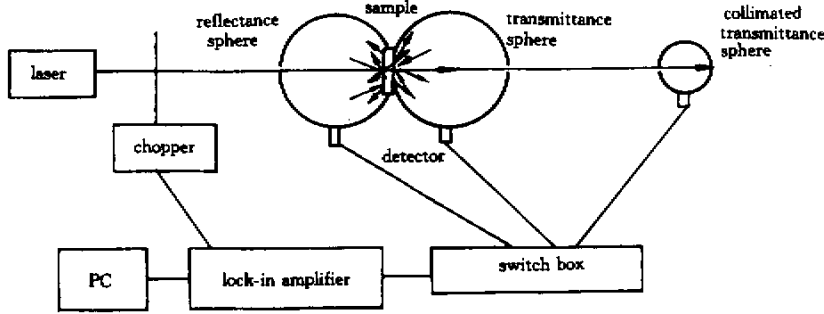


Fig. 1 Experimental apparatus consisting of two integrating spheres system

He-Ne 激光(250 mm 长的单模激光器,波长 632.8 nm,输出功率 1.6 mW,光斑直径为 1 mm)经斩波器(ND-3 型可变频率双参考光斩波器)后,通过反射球的入光口直接照在样品上。来自反射球、透射球及准直透射球上各探测器(Si PIN, S1223-01 型)的信号通过开关电路后,依次送入锁定放大器(SR830),最后被计算机采集。

用于反射及漫透射测量的积分球(内径为 220 mm)是完全对称的,其内表面具有较高的漫反射特性,它由 BaSO<sub>4</sub> 喷涂而成。样品口的直径为 25 mm,入光口(反射球)及出光口(透射球)的直径均为 7 mm。为使来自样品的规则反射的光不至于从入光口逃离出去,将样品口平面与垂直面设置成 3° 的夹角,这样反射球上所探测到的反射光是漫反射光与规则反射光之和,即总的反射光强。

由于光斑会聚成一个小点直接照在探测器上时,会降低探测器的线性度。为此,在准直透射的探测中,我们也采用了积分球(内径为 70 mm),入光口直径为 7 mm,这样可以使光经过漫反射后均匀地照射在探测器的光敏面上。为避免漫透射信号对准直探测的影响,准直探测球与透射球之间的距离设置为 800 mm。

在弱光信号检测中,斩波及锁定放大都能很好地消除背景光的干扰。我们将斩波器的频率设置为 1000 Hz,相应的锁定放大器的积分时间设置为 30 ms。为获取反射、漫透射、准直透射信号,并实现对光源本身的监测,本实验系统通过一个开关转换电路,将各路信号分时送到锁定放大器上。为避免

置于两个积分球之间,测量样品对光的反射、漫透射及准直透射光强;利用反向倍加法(Inverse Adding-Doubling)算法可得到样品的散射系数、吸收系数及各向异性因子<sup>[12]</sup>。双积分球技术是目前公认的最精确的一种测量技术<sup>[4,13,14]</sup>。

相互之间的影响,将每路信号进行采集的时间间隔设置为 500 ms,同时由于光源本身的波动非常缓慢,所以这样的延迟对测量带来的影响是可以忽略的。

## 2.3 光学特性参数的确定

在反射、漫透射及准直透射测量的基础上,利用反向倍加法算法即可得到样品的光学特性参数<sup>[12]</sup>:反照率  $\alpha$ 、光学深度  $\tau$  及各向异性因子  $g$ ,它们都是无量纲的,与常用的带量纲的光学特性参数(吸收系数  $\mu_a$ 、散射系数  $\mu_s$  及约化散射系数  $\mu'_s$ )之间有如下关系

$$\alpha = \mu_s / (\mu_s + \mu_a), \quad \tau = d(\mu_s + \mu_a), \quad (1)$$

式中  $d$  为所测样品的厚度。进一步,我们可以得到

$$\mu_s = \alpha\tau/d, \quad (2)$$

$$\mu_a = (1 - \alpha)\tau/d, \quad (3)$$

$$\mu'_s = \alpha\tau(1 - g)/d. \quad (4)$$

在有些情况下,准直透射光强非常弱,获取准直透射率会非常困难,此时不可能得到样品的各向异性因子,但通过反射及漫透射的测量可以得到样品的吸收系数及约化散射系数;如果样品太厚或吸收非常强,这时可能测不到任何的透射光强,那就只能推得样品的反照率,不能进一步准确估计出其吸收参数或散射参数了。

## 2.4 测量步骤

为了测量热作用下蛋白和人全血光学特性参数的变化,我们将密封的样品盒分放在不同温度(37 °C、43 °C、50 °C、55 °C、58 °C、60 °C、65 °C、70 °C、75 °C、80 °C)的水浴槽中加热 15 min,取出后

用冰水迅速冷却到室温。然后用镜头纸将样品盒的玻璃表面擦干,放置在两积分球之间,即可开始测量。

对每一片样品变换位置,正反两面各测量两次,每次的测量时间不得少于 60 s。

### 3 结果与分析

对 33 盒蛋白样品及 24 盒人全血样品进行了测量。绝大多数情况下都能同时测得蛋白样品对光的反射、漫透射及准直透射,因此能够得到它的吸收系数、散射系数及各向异性因子,经过较高温度处理过的蛋白样品,由于散射系数急剧增加,很难探测到准直透射光强。光对全血样品的准直透射光强总是很弱,难以探测,因此只能计算出其吸收系数及约化散射系数;只有在 60 °C 的温度下加热后的全血样品是一个例外。

#### 3.1 不同温度下加热对蛋白光学特性参数的影响

图 2 给出了蛋白在加热后不同温度下的光学特性参数(吸收系数、约化散射系数、散射系数及各向异性因子)变化情况。

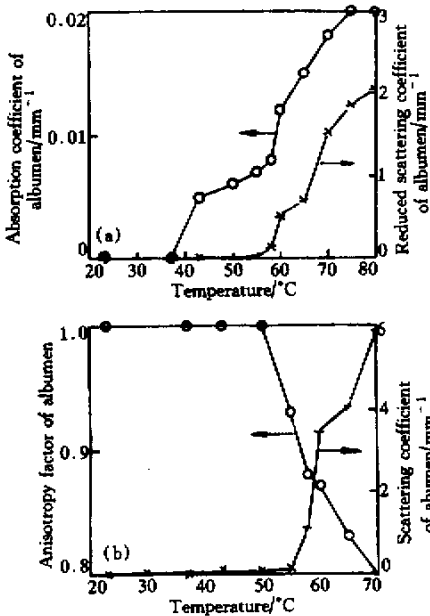


Fig. 2 Optical properties of albumen as the function of temperature

在室温(23 °C)及较低温度(37 °C、43 °C、50 °C)加热 15 min 后,蛋白仍保持透明,对 He-Ne 激光的吸收与散射都极其微弱,测得的吸收系数与散射系数近似为零,各向异性因子为 1。

在 55 °C 的温度下加热 15 min 后,蛋白样品对 He-Ne 激光开始表现出一定的吸收与散射,但仍然

很弱,此时从样品的外形看来,其流动性开始减弱,透明程度也有所下降。当蛋白在 58 °C 的温度下加热后,对光的吸收略有增加,而约化散射系数的变化量却非常显著,与 55 °C 时的值相比,增加了 10 倍以上,其各向异性因子也开始减小。此时从样品的外形看来,蛋白开始变混浊。

随着加热温度的升高,蛋白变得越来越混浊,对光的散射特性随之增强,各向异性因子也逐渐减小;蛋白的吸收系数继续增加。在 58 °C ~ 70 °C 的温度范围内,以上各量的变化呈近似的线性关系。

当加热温度超过 75 °C 时,准直透射光强减弱,难以被探测,因此无法准确推算出各向异性因子的变化情况。此时吸收系数基本不变,约化散射系数的增加也不再明显。

#### 3.2 不同温度下加热对人全血光学特性参数的影响

人全血在不同温度下加热 15 min 后,吸收系数和约化散射系数与温度的关系如图 3 所示。

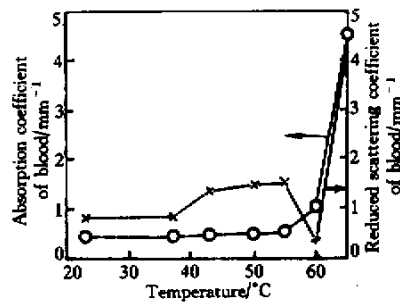


Fig. 3 Optical properties of whole blood as the function of temperature

新鲜的血液是从人的静脉血管中抽取的,室温下测得其吸收系数为 0.42 mm<sup>-1</sup>,约化散射系数为 0.83 mm<sup>-1</sup>,这与文献中的数据是吻合的<sup>[12]</sup>。

人全血样品在室温(23 °C)及 37 °C 下测得的光学特性参数几乎相同。在较低温度(43 °C、50 °C、55 °C)加热 15 min 后,吸收系数与散射系数随着温度的升高而增加。吸收系数随温度变化较慢,当水浴的温度从室温(23 °C)升至 55 °C 时,吸收系数仅增加了 25%,而约化散射系数增加了 82%。约化散射系数最大的变化发生在 43 °C,比室温时增加 63%。从样品的外形看,在这一温度范围内,样品的流动性较大,外观上并无明显的变化。

当全血样品在 60 °C 的温度下加热后,样品对 He-Ne 激光的透明度明显增强,此时不仅测得了样品对光的反射、漫透射,也测得了较大的准直透射光强,因此能够得到三个光学特性参数,即吸收系数、散射系数及各向异性因子。尽管其吸收系数仍有显

著增加,约化散射系数却明显下降,与室温时的值相比,前者增加了144%,后者减小了57%。从样品的外形看来,其颜色比低温时深,但却显得非常透明,此时的血液不再具有流动性,细胞与血浆混为一体。

继续在更高的温度(65℃)下加热后,血液变为深红色,并开始凝固结块,在封闭的样品盒中血清与固状物分离。此时所得到的吸收系数与其约化散射系数剧增,相对于60℃的情形而言,吸收系数增加了3倍以上,而约化散射系数增加了10倍以上。相对于室温而言,吸收系数增加了10倍以上,约化散射系数增加了5倍。

当全血样品在更高的温度下(70℃以上)加热15 min后,已不能探测到任何透射光强,因此无法准确计算样品的光学特性参数。血液样品的颜色变得更深,固状物继续萎缩,这是由于血细胞膨胀破裂后,水从细胞中析出的结果。萎缩的血细胞对光的吸收更强,光在其中的穿透深度也就进一步减小。

## 4 讨 论

热作用会引起生物组织形态及结构的改变,从而导致其光学特性参数的改变<sup>[2,7]</sup>。我们用双积分球技术对蛋白及人全血样品在常温(23℃)及37℃~80℃温度下加热15 min后光学特性参数的改变进行了较全面的研究。

蛋白常用于组织热凝固过程的研究,Meijerink<sup>[10]</sup>在完全不考虑其吸收特性变化的情况下,对蛋白在40℃~65℃加热时散射特性的相对变化作过初步探讨。在本研究中,我们对更大温度范围内(23℃,37℃~80℃)加热后的蛋白变化情况进行了研究,利用双积分球技术测得了所有光学特性参数的变化,这些数据能更完整地描述蛋白的热凝固过程。

实验结果表明:虽然蛋白的吸收系数相对于散射系数而言很小,但随着加热温度的升高而增加,热作用导致蛋白约化散射系数的增加,一方面源于散射系数本身的增加,另一方面,源于各向异性因子的减小,不同温度下加热,散射系数增加的趋势是不同的,温度较低时散射系数的变化较为缓慢,但在某一温度下(58℃)散射系数出现突变,当温度高达到一定值时(75℃)又逐渐趋于恒定。这说明蛋白的热凝固存在一定的阈值,而完全的凝固变形取决于温度及作用时间。我们所测得的蛋白结果与Pickering<sup>[9]</sup>测得的心肌组织光学特性参数(吸收系

数、散射系数及各向异性因子)的改变类似。

在25℃~55℃温度范围内,我们对全血的测量结果与Nisson<sup>[11]</sup>的研究结果基本吻合。

我们在进一步研究更高温度(60℃及65℃)下热对人全血光学特性的影响后,发现了散射特性的“异常”变化,即60℃的温度下加热15 min后,其约化散射系数比相邻较低温度(55℃)下或较高温度(65℃)下的值要小得多。一方面,可能是因为血液中包含多种蛋白质,它们的凝固阈值是不相同的,如红细胞的膜蛋白就比血液中的其他成分的损伤阈值高<sup>[15]</sup>,所以当温度超过65℃时,散射系数的增加才更为明显;另一方面,当血液被加热时,常规的两面凹的红血细胞会变成两面凸的形状,形成了球形红细胞<sup>[11]</sup>,这种变化会使样品变得更均匀透明。

热作用会使血液中各种成分发生不同的变化,从而导致了这种“褪色”——血液透明度增强的现象,Pfefer<sup>[15]</sup>在研究脉冲激光诱导全血热损伤的实验中,也提及到这一点。由于Nisson对人全血的研究只涉及到了25℃~55℃这一温度范围,所以未能观察到这一异常的现象。关于这一现象的病理学解释还有待于进一步探讨。

血液及蛋白质是生物组织的主要成分,分别研究它们在不同温度的热作用下光学特性参数的改变,将有助于进一步理解热作用下生物组织光学特性的变化,对研究生物组织的热损伤进程具有重要指导意义。

本研究还表明,生物组织的光学特性参数与其生理特性有一定的对应关系,热作用下生物组织生理特性的变化,可通过组织光学特性参数的测量来反映,因而可将光学检测技术应用于热疗的监测。由于光学检测技术是无损的,建立生物组织特性与生理特性间精确的对应关系,基于组织光学特性参数变化的光学检测技术可望为热疗的实时无损监测提供一种新的手段,在临床应用中具有重要的指导意义和广阔的应用前景。

结论 双积分球技术能够同时获取生物样品的多个光学特性参数,我们用自行研制的双积分球系统,对不同温度(37℃~80℃)加热后的蛋白及人全血的光学特性参数(632.8 nm)进行了测量。热作用下生物样品生理特性的改变可用光学特性参数的变化来描述。不同的热作用,样品结构与形态的变化不同,相应的光学特性(吸收特性与散射特性)也不同;相同热作用下,样品成分的不同,导致样品光学特性

参数的改变也存在差别。

感谢美国俄勒冈激光医学研究中心 Steven L Jacques 教授在我们实验室讲学期间,对本工作所给予的指导。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Welch A J. The thermal response of laser irradiated tissue. *IEEE J. Quant. Electron.* , 1984 , **QE-20**( 12 ) : 1471 ~ 1481
- [ 2 ] Kim B M , Jacques S L , Rastegar S *et al.* . Nonlinear finite-element analysis of the role of dynamic changes in blood perfusion and optical properties in laser coagulation of tissue. *IEEE J. Selected Topics in Quant. Electron.* , 1996 , **2**( 4 ) : 922 ~ 933
- [ 3 ] Inner M G , Iizuka M N , Kolios M C *et al.* . A theoretical comparison of energy sources——microwave , ultrasound and laser——for interstitial thermal therapy. *Physics in Medicine Biology* , 1998 , **43**( 12 ) : 3535 ~ 3547
- [ 4 ] Cheong W F , Prahl S A , Welch A J *et al.* . A review of the optical properties of biological tissue. *IEEE J. Quant. Electron.* , 1990 , **QE-26**( 12 ) : 2166 ~ 2185
- [ 5 ] Li Hui , Xie Shusen , Lu Zukang *et al.* . A new model of the light scattering in biological tissue for visible and near infrared region. *Acta Optica Sinica* ( 光学学报 ) , 1999 , **19**( 12 ) : 1661 ~ 1666 ( in Chinese )
- [ 6 ] Wilson B C , Jacques S L. Optical reflectance and transmittance of tissues : principles and applications. *IEEE J. Quant. Electron.* , 1990 , **QE-26**( 12 ) : 2166 ~ 2185
- [ 7 ] Roggan A , Muller G. Dosimetry and computer-based irradiation planning for laser-induced interstitial thermotherapy. In : Gerhard M J , Andre R ed. . *Laser-Induced Interstitial Thermotherapy*. Bellingham , Washington : SPIE Press , 1995. 114 ~ 115
- [ 8 ] Cilesiz I F , Welch A J. Light dosimetry : effects of dehydration and thermal damage on the optical properties of the human aorta. *Appl. Opt.* , 1993 , **32**( 4 ) : 477 ~ 487
- [ 9 ] Pickering J W , Bosman S , Posthumus P *et al.* . Changes in the optical properties ( at 632.8 nm ) of slowly heated myocardium. *Appl. Opt.* , 1993 , **32**( 4 ) : 367 ~ 371
- [ 10 ] Meijerink R , Essenpreis M , Pickering J W *et al.* . Rate process parameters of egg white measured by light scattering. In : Gerhard M J , Andre R ed. . *Laser-Induced Interstitial Thermotherapy*. Bellingham , Washington : SPIE Press , 1995. 66 ~ 80
- [ 11 ] Nisson A M K , Lucassen G W , Andersson-Engles S *et al.* . Changes in optical properties of human whole blood in vitro due to slow heating. *Photochemistry and Photobiology* , 1997 , **65**( 2 ) : 366 ~ 373
- [ 12 ] Prahl S S , van Gemert J C , Welch A J. Determining the optical properties of turbid media by using the adding-doubling method. *Appl. Opt.* , 1993 , **32**( 4 ) : 559 ~ 568
- [ 13 ] Pickering J W , Prahl S A , van Wieringen N *et al.* . A double integrating sphere system for measuring the optical properties of tissue. *Appl. Opt.* , 1993 , **32**( 3 ) : 399 ~ 410
- [ 14 ] Roggan A , Dorschel K , Minet O *et al.* . Optical properties of biological tissues in the near-infrared wavelength range : Review and measurements. In : Gerhard M J , Andre R ed. . *Laser-Induced Interstitial Thermotherapy*. Bellingham , Washington : SPIE Press. 1995. 10 ~ 44
- [ 15 ] Pfefer T J , Choi B , Vargas G *et al.* . Pulsed laser-induced thermal damage in whole blood. *ASME J. Biomechanical Engineering* , 2000 , **122**( 2 ) : 196 ~ 202

## Changes in the Optical Properties of Slowly Heated Human Whole Blood and Albumen

Zhu Dan Luo Qingming Zeng Shaoqun Ruan Yu

( The Key Laboratory of Biomedical Photonics , Ministry of Education , Huazhong University of Science and Technology , Wuhan 430074 )

( Received 12 March 2001 ; revised 23 April 2001 )

**Abstract :** A double-integrating-spheres system for measuring the optical properties of tissue was designed. The optical properties have been measured ( at 632.8 nm ) when human whole blood and albumen were slowly heated in water bath at room temperature ( 23 °C ) and 37 °C ~ 80 °C for 15 minutes. There were different changes in optical properties when albumen and whole blood underwent denaturation and conformation changes. It was the reason that there were different components between the two samples. It is demonstrated that physiological characteristic is described by optical properties of tissue. Optical detecting will provide a new method to monitor thermal therapy.

**Key words :** human whole blood ; albumen ; optical properties ; slowly heated ; double-integrating sphere system