光学相干成像结合反射光谱技术对小鼠烫伤模型的评估

张 浩1,2, 孟耀勇1*, 张小燕1, 肖 军1, 刘颂豪1

1. 华南师范大学光子中医实验室, 广东 广州 510631

2. 中山大学物理科学与技术学院, 广东 广州 510275

摘 要 光学相干层析成像(OCT)和反射光谱技术用于精确地评估小鼠烫伤模型。在相同作用时间不同温 度下,皮肤厚度呈线性增加;皮下肌肉组织拟合吸收系数和斜率呈 V 字型变化,在 80 ℃时,处在最低处; 在 65~85 ℃时,光谱一次微商的波峰与波谷明显分离,85 ℃之后这种能力逐渐减弱;色坐标值中,红色数 值在 60~70 ℃和 90~95 ℃两个温度之间急剧减小,代表绿色数值一直缓慢减小,而蓝色数值增加。相同温 度不同热作用时间下,皮肤的厚度略微减小;拟合吸收系数在热作用少于 20 s 时间内数值较大,在 30 s 后 数值较小;构造的斜率变化很小;色坐标值在作用时间超过 20 s 时,变得相对稳定。以上参数主要发生在作 用时间为 10 s,超过这个时间,变化相对很小。这些变化能够反映出皮肤和皮下组织在热作用下,充血带、 水肿瘀滞带和凝固带的形成和转化。这两种技术结合能够为临床提供一种实时的、低消费的、非侵入的在体 的烫伤检测的新的光学活检手段。

关键词 光学相干层析成像;可见近红外反射光谱技术;皮肤烫伤;小鼠模型 中图分类号:04334 文献标识码:A **DOI**:10.3964/j issn 1000-0593(2011)04-0960-06

引 言

烫伤在医院急诊部门是一种常见的病患。对于深度烫伤的患者来说,及时的治疗对病人的生存显得极为重要。较早地对焦痂部位的切除和移植能够减少病人的死亡率。然而,供体的缺少、简化手术操作的潜在的优势以及减小供体的表面积促使用于愈合严重烫伤患者的精巧设计的皮肤替代品的产生和发展。例如培养上皮自体移植片层^{1,21}、皮肤替代物^[3,4]等。建立动物模型是烫伤外科领域基础和应用研究中一种极为重要的实验方法和手段,以科学、准确地认识烫伤后机体各系统及局部创面的发展演变规律,并探索针对性的预防治疗措施。根据动物的解剖生理特点和实验要求,本文实验研究了小鼠的烧伤形成机制。

热力烧伤的病理变化与热量在皮肤内的分布相关。短暂 的高温或者较长时间的低热可引起相似的损伤。由于皮肤是 良好的绝热材料,大多数烧伤仅累及表皮(一度烧伤)或者部 分真皮(二度烧伤),只有较长时间的接触才会使烧伤侵及整 个真皮层(三度烧伤),或者超过真皮层而深达脂肪、肌肉和 骨骼(四度烧伤)^[3]。Jackson 对烧伤组织病理学损伤描述为 三个带: 凝固带(焦痂或者坏死)是最接近热源的区域,此带 内的组织完全坏死或者出现蛋白严重变性,被认为是持续不 可逆转的损伤;凝固带的下方即水肿淤滞带,大分子中度变 性、血流缓慢。此带的水肿淤滞归因于毛细血管渗漏和细胞 膜破坏;此区以下是充血带,此区血流逐渐加速,在大约伤 后7天特别明显。随着淤滞带变成坏死,尤其是创面感染或 者创区血供不良时,浅表的烧伤在48~72 h 期间可能加 深^[4]。

病人的康复情况与烫伤的程度、病人的年龄以及体制有 关,致伤深度是决定患者能否生存基本因素,也是决定病人 的机体功能和外观的主要因素。因此对烫伤深度的准确的评 估和确定,显得尤为重要。烫伤深度是一个动态的过程,随 着观测时间的不同,对于局部创面的护理会影响烫伤部位的 外观。这些因素对准确确定创面部位的情况有很大的影响。 因此,研发高精确度的检测技术与元件一直是比较活跃的技 术领域。活体组织切片检查、超声技术和染色技术等对检测 细胞的死亡和胶原蛋白的破坏上体现出良好的优势⁷⁹; 荧 光素、多普勒血流仪技术和温度记录仪技术等在测量血液流 速上展示出较强的能力^[810];核磁共振成像技术能够很好地 评估象水肿等身体的变化¹¹。本研究采用了 OCT 结合可见

基金项目:国家自然科学基金项目(60411130595)和广东中医药局科研项目(2008233)资助

收稿日期: 2010-05-10, 修订日期: 2010-08-20

作者简介: 张 浩, 1982年生, 华南师范大学光子中医实验室研究生 e-mail: haozh512@163 com

1 实验方法

1.1 材料准备

由中山大学动物养殖中心购买近交系 BALB/C 雌鼠 48 只,体重(28[±]2)g,采用0 9% 生理盐水制备的 20% 乌拉坦 腹腔注射麻醉;在背部下侧,用 70% 的酒精溶液配制 8% 硫 化钠溶液脱毛,不擦伤皮肤。按照平常的饲养,24 h 后进行 实验。

恒温的获得: 在数字显示恒温水浴锅中放置一个自制的

金属接触装置,用于接触脱毛的部位,形成烫伤创面。锅中水的温度从室温加热至60~95℃,间隔5℃。期间以温度计的测量为准,误差≤±05℃。

12 OCT 技术

本实验采用 OCT 系统, 光源中心波长是1 300 nm, 光 源的光谱宽度约 50 nm, 成像深度达1~3 mm、纵向分辨率 10~15µm、横向分辨率 25µm、成像速度每幅 1 s、系统信 噪比 100 dB, 应用 Lab View 编写软件操作平台。光源出来 的光经过 2×2 耦合器分别通过样品臂和参考臂照射样品和 反射镜, 样品的反射光与参考臂的反射镜反射光在耦合器中 汇合, 两臂光程差在一个相干长度内满足干涉条件。干涉信 号输出到探测器, 信号的强度对应样品的反射强度, 经过解 调电路的处理, 最后由 A/D 卡采集到计算机进行灰度成像。 OCT 的系统原理如图 1(a)。



Fig 1 (a) schematic of the OCT system and (b) schematic of reflection spectrum system

1.3 可见近红外反射光谱技术

美国 Ocean Optics 公司的光纤光谱仪,采用对称式 Czerny-Turner 光路设计,输入焦距为 44 mm,输出焦距为 68 mm,包括光纤接头、准直镜、衍射光栅、聚焦镜和 Toshiba TCD1304AP 型 3 648 像素线阵 CCD 探测器,测量范围是 200~1100 nm,最高分辨率为 0.3 nm,提供 USB2 0 接口。 采用直流 12 V 电源供电的卤灯光源产生的光谱带,通过光 纤产生入射光线,照射到检测部位,再由接收光纤传输至光 谱仪,最后在计算机的软件上实现光谱的存储和处理。其结 构原理如图 1(b)。

1.4 测量

测量共计 12 组,每组 4 只小鼠。正常体温 1 组;温度条件下 8 组;时间条件下 4 组。在每只老鼠的脱毛部位分别取 4 个不同的位置,于相同的位置进行 OCT 扫描和取反射光谱,获得数据。使用 Origin 8 0 进行数据处理,并用 Photoshop 7 0处理图片。

2 结果和讨论

皮肤由表皮和真皮构成。真皮下面主要是疏松结缔组织 构成的皮下组织。真皮位于表皮下面,主要由胶原纤维和弹 性纤维交织构成,并含有从表皮陷入的毛发和腺体,以及从 深层来的血管、淋巴管、神经及末梢^[12]。对皮肤和皮下组织 进行扫描,OCT 断层扫描图像如图 2(a)和(b)。图 2(a)显 示,皮肤和皮下结构可以清晰得出;a,b,和c,分别对应皮肤, 浅筋膜和皮下肌肉组。图 2(b) 展示了 OCT 图像随着扫描深 度的灰度值分布,与图 2(a)相对应,同样可以清晰得到三层 结构的分布。另外,在一定温度和时间的作用下,热作用导 致了蛋白质结构发生了变性,引起体液对在受热部位的富 集,产生水肿瘀滞带。这样的变化会对机体的折射率产生影 响,影响反射光强度,在 OCT 图像上显示出差异。

OCT 扫描图像灰度值反映的是反射光强度的强弱,与 反射点的组织特性有关。蛋白质变性的极限温度是 70 ℃, 而且发生变性时间过程是很短的^[13,14]。热作用会引起皮肤 微观结构发生变化。从图 3(a) 可以看到:在相同的热作用时 间,皮肤的厚度随着温度的增加而增大,在温度超过 85 ℃ 时,皮肤的厚度有所减小。我们认为皮肤层形成了凝固带。 从图 3(b) 可以看到:在温度为 90 ℃时,随着热作用时间增 加,超过 20 s,组织中的水肿瘀滞带向凝固带转化,真皮的 厚度呈减小的趋势,但厚度变化的幅度很小。

为研究皮下肌肉组织受到热作用的情况,我们对肌肉组 织的灰度值分布进行了拟合。采用朗玻 比尔吸收定律: $I = I_0 e^{-Kt}$ 得到了拟合的吸收系数的变化,如图 4(a)和(b)。吸收 系数 K,仅取决于吸收物质的特性,与深度无关。蛋白质的 变性温度相对比较低,而且速度也比较快。变性的蛋白质能 够改变组织的微观结构,影响组织的物理性质。在作用时间 为 20 s 条件下,在图 4(a)中,吸收系数 $K \cong^{\circ}$ V"字形。80 °C 是肌肉组织形成凝固带的临界温度。从 60~80 °C 的增温过 程中,吸收系数减小;而在 80~90 °C 的范围内,吸收系数增 加。我们认为温度 60~80 °C 时,皮肤中形成了水肿瘀滞带相 对较厚,凝固带较薄,组织的吸收系数较小;温度高于 80 ℃,形成的凝固带变厚,组织吸收增大。在温度为 90 ℃的情 况下,热作用时间在 20 s 前后,吸收系数变化比较大,如图 4(b)所示。我们认为皮肤完全发展成为现凝固带。皮肤是传 热系数低的介质,只有在温度较高和热作用时间相对较长条件下,皮下肌肉组织的蛋白结构才能发生变性。因为在烫伤 部位的热量在组织中会发生弥散作用,在创面感染或者创区 血供不良时,水肿瘀滞带发生坏死,延展成凝固带^[15]。



Fig 2 (a) OCT scanning image of mice model: *a*, *b*, and *c* are epidermis and dermis, superficial fascia, and subcutaneous tissue, respectively; (b) the grey value with scanning depth corresponding to the marks of (a)



热损伤导致微循环区的血管出现了血栓或者血管闭合的 OCT 检测相同的部位,可见近红外反射光谱技术用于反映 现象,影响到血液流动,血氧蛋白携氧发生异常¹¹⁰。在与 反射强度变化。在 200~350 nm 和 950~1 100 nm 范围内, ◎ 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net 噪声很大,我们忽略对这两个范围的研究。主要分析 350~ 950 nm 范围的光谱。在热作用下,545 和 575 nm 附近的血 红蛋白的特征峰强度发生变化。这些变化可以反映皮肤中血 流变化的情况。为了详细地说明在这两个特征峰之间光谱范 围内的变化,对500~650 nm 范围的谱线进行了一次微商计 算和构造了斜率 g 分布两种方案。其中,斜率 g 定义为在 545 和 575 nm 反射强度 的差与两者波长差的比值:g = $I_{575} - I_{545} \Delta \lambda = 575$ nm - 545 nm = 30 nm, 如图 5(a) 所示。

500~650 nm 光谱带的强度作为反映血液中的含氧血红 蛋白特征峰带。在不同的条件下,这个光谱带的波形大体相 似。为了能够细致地反映这个光谱带的变化,我们对此光谱 带作了一次微分运算。在作用时间为20 s 情况下,在65~85 ℃之间,500~650 nm 光谱的一次微分形式,变现出的波峰 与波谷强度能够作为区分热作用对组织影响的特征,见图 5 (b)。在作用温度相同的情况,作用时间少于 20 s,同样,此 光谱带的一次微商有相似的特征,如图 5(c)所示。由于热作 用致使皮肤中先产生充血带,充血带中血液流速加快。充血 带中的含氧血红蛋白的含量高于正常皮肤中的含量。这样在 70 ℃附近,特征峰带一次微商表现出与常温下的区别。随着 温度的身高或者作用时间的增加,充血带向水肿瘀滞带转化 并延伸,以及水肿瘀滞带向凝固带的转化,才会有图 5(b)中 超过 85 ℃和图 5(c)中作用时间长于 30 s时,一次微商的表 现。组织在这两个带的共同作用下,含氧血红蛋白的反射光 谱强度才能够表征热作用对皮肤的影响。

另外,构造的斜率,可以用于描绘含氧血红蛋白特征峰的变化。在热作用为 20 s 的条件下,斜率处在-004~-010之间,说明了 575 nm 处的强度要大于 545 nm 的强度。随着温度的升高,两者的强度的差距是先增大后减小。斜率的变化呈" V"字型,最低点出现在 80 ℃。在 80 ℃时,两个特征峰的反射强度相差最大。这一结果与 OCT 检测皮肤厚度的变化,极为相似。在 90 ℃的条件下,斜率在小幅度的变化。这样的变化,进一步显示了出了组织中毛细血管网受热作用的影响,如图 6。





反射光谱仪提供了采用 CIE 1976 标准中的 RGB 颜色参数。这三种光的颜色参数可以通过求取色坐标(*x*, *y*, *z*)获得。表征光所照射的物体表面的颜色经过量化,可以避免目测所带来的误差。在软件的界面上,色坐标值与反射光谱同时读取,同步保存。影响色坐标有多种因素,其中血喉素在热作用下的变化,能够影响皮肤的颜色。在本实验中,在同一时间不同温度和同一温度不同时间两种条件下,色坐标三维分布如图 7 所示。在图 7(a)中,表示绿色值的 y 基本保持

稳定,在 60 ℃红蓝颜色呈负相关的变化,20 s 热作用下,与 体温时相比,红颜色值减小,蓝色值增加。而在 65~85 ℃的 范围内,色坐标值稳定集中。在 90 ℃以上,蓝颜色值增加, 红、绿颜色值减小。而在图 7(b)中,10~20 s内,红蓝变化 剧烈,20 s之后的热作用时间,红绿蓝三色的变化不大。随 着温度或者热作用时间的增加,组织的蛋白结构发生了变 性,出现了凝固带和水肿瘀滞带,以及毛细血管网出现了异 常、造成了皮肤的色坐标发生了变化。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



(b): Temperature conditions; (c): Time conditions

3 结 论

OCT 技术能够直观地给出小鼠皮肤和皮下组织的纵向 断层扫描图像来表征皮肤和皮下组织的受热变化情况,反射 光谱技术能够反映血氧蛋白的特征谱带在热作用下的变化。 根据这两个指标,我们得到了温度对皮肤和皮下组织的影响。如果将这两种手段结合应用于烫伤临床,充分发挥这两种仪器的简单的灵活的操作,以避免目测的误差,这种综合的技术能够给临床诊断带来了直观的、实时的、低价位的、 非侵入的光学活检测技术手段。

References

- [1] O' Connor N, Mullik en J, Banksschlegel S, et al. Lancet, 1981, 1(8211): 75.
- [2] Arons J, Wainwright D, Jordon R. Surgery, 1992, 111: 4.
- [3] Boyce S T, Goretsky M, Greenhalgh D G, et al. Ann Surgery, 1995, 222(6): 743.
- [4] Boyce S T, Kagan R J, Yakuboff K P, et al. Ann. Surgery, 2002, 235(2): 269.
- [5] Moritz A R, Henriques F C. Am. J. Pathol., 1947, 23: 695.
- [6] Jackson D.M. Br. J. Surgery, 1953, 40: 588.
- [7] Watts A M, Tyler M P, Perry M E, et al. Burns., 2001, 27: 154.
- [8] Foster F S, Pavlin C J, Harasiewicz K A, et al. Adva. Ultrasound Med. Biol. 2000, 26: 1.
- [9] Atiyeh B S, Gunn S W, Hayek S N. World J. Surgery, 2005, 29: 131.
- [10] Kamoloz L P, Andel H, Haslik W, et al. Burns., 2003, 29: 785.
- [11] O'Reilly T J, Spence R J, Taylor R M, et al. J. Burn. Care. Rehabil., 1989, 10: 1.
- [12] Lawson R N, Gaston J P. Ann. N Y Acad. Sci., 1964; 121: 90.
- [13] Jones O C, Wilson D I, Andrew S. J. Telemed. Telecare., 2003, 9: S22.
- [14] Lawson R N, Gaston J P. Ann N Y Acad Sci. 1964; 121: 90.
- [15] Fritz D A. In: Stone CK, Humphries RL, eds. Current Diagnosis & Treatment: Emergency Medicine. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2008: 836.
- [16] Nigel R. J. R. Coll. Surg. Edinb, 44; 6: 386.

Mice Scald Model Investigated by OCT Combined with Reflection Spectrum

ZHANG Hao1,2, MENG Yao yong1*, ZHANG Xiao yan1, XIAO Jun1, LIU Song-hao1

1. Lab of Photonic Chinese Medicine, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

2. School of Physics and Engineering, Sun Yatsen University, Guangzhou 510275, China

Abstract OCT combined with reflective spectrum was employed to precisely evaluate the mice scald model. Under the conditions that the temperature increased by 5 °C from 60 to 95 °C with 20 s thermal effect, the cut is depth linearly increased. The fitting absorption parameters and the gradients showed the V trends. Wave peaks of first order differential were legible from 65 to 85 °C, then wave peaks became worse over 85 °C. At color coordinates, red value decreased severely from 65 to 85 °C and from 90 to 95 °C, green value continuously decreased, but blue value increased. Under the conditions that thermal effect time increased from 10 to 40 s at 90 °C, the main changes of above factors happened at about 20 s, and after 20 s effect time the change of these factors was weak. These factors could reflect the form and progresses of zones of coagulation, injury of cutis and hypodermis. So OCT combined with reflection spectrum could provide a novel method that can be applied for the real-time, low-cost, *invivo* and noninvasive optical biopsy on scald.

Keywords OCT; Reflection spectrum; Skin scald; Mice model

(Received May 10, 2010; accepted Aug. 20, 2010)

* Corresponding author

2012 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry January 9-14, 2012, Tucson, Arizona

wc2012@ chem. umass. edu http://icpinformation.org 18241 Beauty Berry Court Lehigh A cres, FL 33972-7525 USA Tel: 239-674-9430 Fox: 239-674-9431

Meeting History

- 1998 January, Scottsdale Arizona Double Tree Paradise Valley Resort
- 2000 January, Fort Lauderdale Florida Wyndham Bonaventure Resort and Spa
- 2002 January, Scottsdale Arizona Double Tree Paradise Valley Resort
- 2004 January, Fort Lauderdale Florida Bonaventure Resort and Spa
- 2006 January, Tucson Arizona Hilton El Conquistador
- 2008 January, Temecula California Pechanga Resort & Spa
- 2010 January, Fort Myers Florida Sanibel Harbour Resort & Spa
- © 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net