DOI:10.16016/j.1000-5404.201511061

皮秒脉冲固体激光对乳猪皮肤组织的气化效应

薛冬冬[1],贺 佳[2],贺伟峰[1],黄智蒙[2],陈志强[1],杨 华[2],尹美芳[1],韩 梅[2],马 宁[1],罗高兴[1],张大勇[2],吴 军[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[1];621000 四川 绵阳,中国工程物理研究院流体物理研究所[2])

[**摘要**] **目的** 探索1 064 nm波长皮秒(ps)脉冲Nd:YAG激光对乳猪皮肤组织的气化效应及气化区周围的热凝固效应。**方法** 使用脉宽30 ps,频率10 Hz,最大单脉冲能量100 mJ的1 064 nm脉冲Nd:YAG激光照射离体乳猪皮肤组织,按照单脉冲能量0、20、40、60、80 mJ和100 mJ,每次辐照时间分别为2、5 s和10 s进行分组,组合形成18组激光剂量,每组3个标本。使用超景深显微镜即时观察记录气化区深度及宽度。取受照皮肤组织制作组织切片,HE染色,显微镜下观察测量气化区外围凝固区宽度。根据所得数据绘制单脉冲能量及辐照时间与气化区宽度、深度及凝固区宽度的量效关系曲线,分析其作用规律及临床意义。**结果** 气化区直径为740.66~1 455.32(1 168.85±188.57)μm,气化区深度106.44~1 314.80(412.16±289.84)μm;凝固区宽度65.35~238.73(141.10±47.68)μm。**结论** 1 064 nm波长30 ps脉宽Nd:YAG激光对乳猪皮肤组织有较强的气化作用,且气化作用的效应程度与单脉冲能量和每次辐照时间呈正相关趋势。用该激光气化目标皮肤组织时,对健康组织热凝固效应可控制在百微米级范围。

[**关键词**] 激光;气化效应;皮肤
[**中图法分类号**] R334.5; R454.2; R640.5 [**文献标志码**] A

Vaporization effect of picosecond pulse solid laser on suckling porcine skin tissue

Xue Dongdong[1], He Jia[2], He Weifeng[1], Huang Zhimeng[2], Chen Zhiqiang[1], Yang Hua[2], Yin Meifang[1], Han Mei[2], Ma Ning[1], Luo Gaoxing[1], Zhang Dayong[2], Wu Jun[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Institute of Fluid Physics, Chinese Academy of Engineering Physics, Mianyang, Sichuan Province, 621000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the vaporization effect and the surrounding thermal coagulation effect of the radiation of picosecond pulsed Nd:YAG laser at wavelength of 1 064 nm on suckling porcine skin tissue. **Methods** A 1 064 nm pulse Nd:YAG laser with a pulse duration of 30 ps and a frequency of 10 Hz was used to radiate suckling porcine skin *in vitro*. The porcine skin tissues were irradiated with different pulse energies (20, 40, 60, 80 and 100 mJ) for different time periods (2, 5 and 10 s per time). So there produced 15 different lesioning points and 3 normal control points (0 mJ and 2, 5 and 10 s endurance), and every point was repeated for 3 times. After irradiation, the width and depth of the evaporated zones of the lesioning points were measured with ultra-depth field microscopy. The coronal plane sections of every lesioning point were made into tissue slices, and then stained with hematoxylin and eosin. By the means of taking photomicrographs, the widths of the coagulation necrosis zones were measured. Finally, the curve of doses and effects was drawn. **Results** The average width of the evaporated zones of the lesioning points was 1 168.85±188.57 μm (740.66~1 455.32), while the depth was 412.16±289.84 μm (106.44~1 314.80), and the average width of the coagulation necrosis zones was 141.10±47.68 μm (65.35~238.73 μm).

[**基金项目**] 中国工程物理研究院科学技术发展基金(WSS-2014-10);中国工程物理研究院军民两用技术项目(JM201501)
[**通信作者**] 吴 军,E-mail:junwupro@126.com
黄智蒙,E-mail:zhimenghuang@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160304.1011.001.html(2016-03-04)

Conclusion Picosecond pulsed Nd:YAG laser of 1 064 nm wavelength irradiates good vaporization effect on suckling porcine skin tissue, and the effect is positively correlated with the pulse energy and irradiation duration of every pulse. When the laser is evaporating target skin area, the caused thermal damage is limited in hundreds microns to the surrounding healthy tissues of the lesioning point.

[**Key words**] laser; vaporization effect; skin

Supported by the Science and Technology Development Foundation of Chinese Academy of Engineering Physics (WSS-2014-10) and the Civil-military inosculation Project of Chinese Academy of Engineering Physics (JM201501). Corresponding author: Wu Jun, E-mail: junwupro@126.com; Huang Zhimeng, E-mail: zhimenghuang@126.com

清创即用各种清创方法,清除存在于伤口内的异物,去除失去活性的组织,减少感染,尽快痊愈。清创是创面治疗的第一步,清创的质量直接影响后续治疗的效果[1]。理想的清创效果是在清除全部坏死及感染组织的同时,最大程度地保留健康组织,即精确清创。短脉冲激光是一种精确可控的清创方法,当高能脉冲激光的脉宽小于热传导时间(热弛豫时间)时,受照组织将瞬间气化而明显减少对周边的热损伤[2]。较目前临床或医学研究常用的连续激光和低能量长、短脉冲激光而言,高能短脉冲激光可明显减少受照范围以外的热损伤,提高单脉冲能量可明显提高其气化组织的效率[3]。高能皮秒激光是脉宽仅为 10^{-12} s 的高能短脉冲激光,符合精确清创的需求。本研究使用高能皮秒激光辐照猪皮肤组织,通过超景深显微镜即时观察激光辐照所致气化区直径及深度,组织病理学观察气化区外围热损伤区域的宽度,探索在单脉冲能量,脉冲次数单因素变化时高能皮秒激光对皮肤组织的作用规律,以期为皮秒激光用于高精度、高效率创面清创奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选取雄性巴马小香猪,体质量 4~6.5 kg,购自第三军医大学实验动物中心。样品取自刚断奶的纯种乳猪腹部皮肤,其光热学特性和结构层次与人体皮肤类似,是理想的皮肤样品模型[4]。

1.2 实验装置

实验系统如图 1 所示。采用中国工程物理研究院研制的脉冲固体激光器,它是通过闪光灯泵浦 Nd:YAG 激光晶体,输出脉冲波长 1 064 nm,单脉冲最大能量 100 mJ,脉宽为 30 ps。使用功率计及配套探头测量并记录激光能量。采用凸透镜调节光斑,焦距为 20 cm,将样品置于焦点处,光斑直径为 106 μm。1 064 nm 激光不可见,故而使用 He-Ne 激光器示踪光路。

1.3 实验方法

1.3.1 实验步骤 ①对巴马小香猪进行麻醉(戊巴比妥钠 30 mg/kg)及备皮;②麻醉成功后获取实验动物的腹部全层皮肤组织,鼓式取皮机切除过多脂肪组织,制作为 3 cm×3 cm×0.5 cm 的均匀组织块;③固定组织块于载物台,正确摆放光路,调节激光器参数(单脉冲能量及辐照时间),辐照离体皮肤组织;④超景深显微镜观察并记录激光辐照皮肤组织后形成的气化区宽度及深度;⑤4% 中性多聚甲醛固定皮肤组织,进行组织学观察。

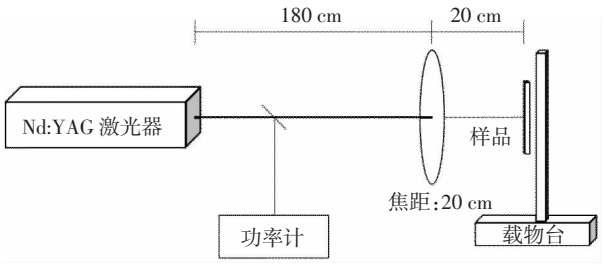


图 1 激光清创实验装置示意图

1.3.2 激光参数设定及分组 脉宽 30 ps,频率 10 Hz,单脉冲能量 0(对照组)、20、40、60、80、100 mJ,每次辐照时间 2、5、10 s 组成 18 种剂量,每种剂量为 1 组,共计 15 个实验组及 3 个对照组,每组 3 个皮肤标本,对照组进行操作相同的假照射,照射靶点面积为 1.12 mm×10^{-2} mm,各实验组实验过程相同。

1.3.3 超景深显微镜观察 使用 VHX-1000 型超景深显微镜,2D 成像即时观察记录激光辐照皮肤组织所致的气化区上表面直径,3D 成像观察记录气化区深度。

1.3.4 组织学观察 将激光辐照的皮肤组织置于 4% 中性多聚甲醛中固定,常规制作组织切片,HE 染色后光学显微镜(Leica DM6000B)观察,记录气化区之外的热损伤区域的深度及宽度。

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 软件处理,检验水准为 0.05。因 20 mJ 能量组的 3 个时间分类均无气化区宽度及深度数据,凝固带宽度测量仅有 20 mJ×10 s 组获得数据,故而在统计分析中舍弃 20 mJ 能量组。采用双因素方差分析对 4 个能量组的 3 个时间分类的气化区宽度和深度最大值以及凝固带

宽度最大值进行差异性比较。如果方差分析的结果显示组间差异,采用 Bonferroni 进行两两比较,探讨两组是否有统计学差异。对相同激光剂量的两种组合,40 mJ×5 s 和 100 mJ×2 s、40 mJ×10 s 和 80 mJ×5 s 的气化区宽度和深度进行独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　大体观察

激光照射皮肤组织时,靶点发出清脆响声,单脉冲能量增加可造成组织飞溅的效应。激光剂量较低时,靶点皮肤组织无反应或仅出现“白点”,1 min 到数分钟后消失;随激光剂量的增加,皮肤组织隆起,进而中央区炭化、凹陷,出现圆形缺损(气化区),气化区周围苍白,隆起。

2.2　超景深显微镜观察

如图 2 所示,超景深显微镜即时观察记录激光辐照后皮肤组织气化区的上表面直径,3D 成像观察记录气化区深度。气化区呈口小底大的类圆锥形。除对照组之外,20 mJ 能量组未见皮肤损害,其余各组均可肉眼或显微镜下见组织气化区。气化区直径为 740.66 ~ 1 455.32(1 168.85 ± 188.57) μm,气化区深度为 106.44 ~ 1 314.80(412.16 ± 289.84) μm。

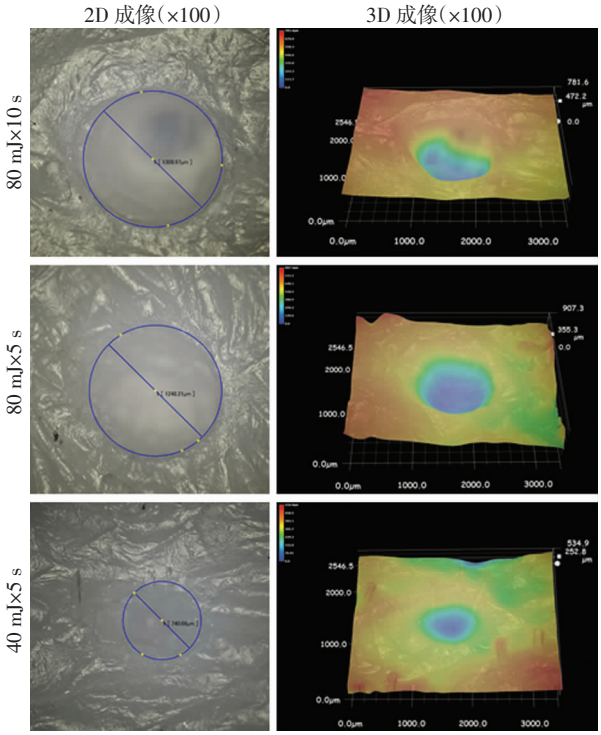


图 2　超景深显微镜 2D 及 3D 成像

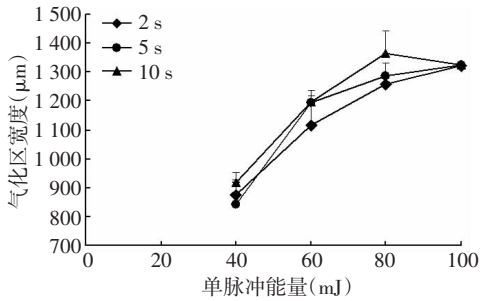
2.3　组织学观察

低倍镜下,损伤灶(气化区)呈口大底小的类圆锥形,局部嗜酸性染色。根据着色深浅及细胞形态,细胞外基质改变,由内向外依次分为气化区、凝固区、水肿区,气化区表现为表皮、部分真皮及皮下组织缺失。凝固区较周围组织红染,颜色均匀,低倍镜下组织结构尚存,但高倍镜下仅存细胞外形,核已固缩或消失,或呈条索状均质红染无结构状态。水肿区浅染,较窄,围绕在凝固区周围。20 mJ×2 s 组、20 mJ×5 s 组未见明显副损伤,其余各组都可见明显的凝固区。凝固区宽度为 65.35 ~ 238.73(141.10 ± 47.68) μm。

2.4　气化区宽度、深度及凝固区宽度与单脉冲能量、辐照时间之间的量效关系

2.4.1　气化区宽度与单脉冲能量及辐照时间之间的关系

根据超景深显微镜测得的气化区宽度及深度测量值、组织学观察测得的凝固区宽度随单脉冲能量与辐照时间的变化绘制量效曲线。随单脉冲能量的增加,气化区宽度测量值随之增大;辐照时间越长,气化区宽度测量值越大(图 3)。



能量分组因素:$F = 154.82$,$P < 0.01$;时间分组因素:$F = 4.440$,$P < 0.05$

图 3　气化区宽度与单脉冲能量、辐照时间的关系

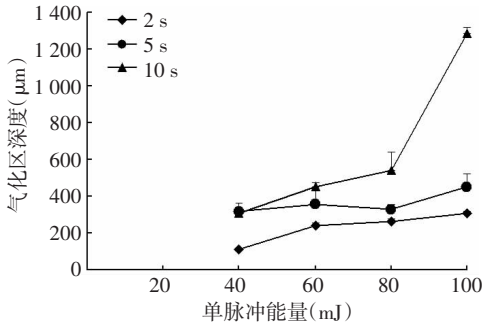
($n = 3$,$\bar{x} \pm s$)

气化区宽度测量值的方差分析结果示:能量因素的主效应 $F = 154.82$,$P < 0.01$,说明能量分组对气化区宽度有影响;时间因素的主效应 $F = 4.440$,$P = 0.023$,说明时间分组对气化区宽度有影响;能量分组和时间分组的交互效应 $F = 1.238$,$P = 0.322$,说明能量分组和时间不存在交互作用。4 个能量组的多重比较,应用的方法为校正的 Bonferroni 检验,结果显示,能量 100 mJ 组和 80 mJ 组的气化区宽度均值没有统计学差异($P > 0.05$),其余能量组两两比较都有统计学差异($P < 0.05$)。3 个时间组的多重比较,应用的方法为校正的 Bonferroni 检验,结果显示,2 s 组和 10 s 组的气化区宽度均值有统计学差异($P < 0.05$),2 s 组和 5 s 组的气化区宽度均值没有统计学差异($P > 0.05$),10 s 组和5 s 组的气化区宽度均值没有统计学差异($P > 0.05$)。

2.4.2　气化区深度与单脉冲能量及辐照时间的关系

随单脉冲能量的增加,气化区深度测量值随之增

大;辐照时间越长,气化区深度测量值越大(图4)。



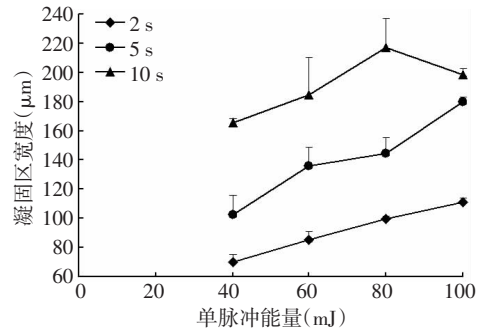
能量分组因素:$F=143.851$,$P<0.01$;时间分组因素:$F=249.188$,$P=0.023$;能量分组和时间点的交互作用:$F=66.128$,$P<0.05$

图4 气化区深度与单脉冲能量、辐照时间的关系 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

气化区深度测量值的方差分析结果示:能量因素的主效应 $F=143.851$,$P<0.01$,说明能量分组对气化区深度有影响;时间因素的主效应 $F=249.188$,$P=0.023$,说明时间分组对气化区深度有影响;能量分组和时间分组的交互效应 $F=66.128$,$P<0.05$,说明能量分组和时间存在交互作用。4个能量组的多重比较,应用的方法为校正的 Bonferroni 检验,能量60 mJ组和80 mJ组的气化区深度均值没有统计学差异($P>0.05$),其余能量组两两比较都有统计学差异($P<0.05$)。3个时间组的多重比较,应用的方法为校正的 Bonferroni 检验,可以得到,2 s组和10 s组的气化区深度均值有统计学差异($P<0.05$),2 s组和5 s组的气化区深度均值有统计学差异($P<0.05$),10 s组和5s组的气化区深度均值有统计学差异($P<0.05$),均值随着时间点下降。

2.4.3 凝固区宽度与单脉冲能量及辐照时间的关系

单脉冲能量增加,凝固区宽度测量值随之增大;辐照时间越长,凝固区宽度测量值越大(图5)。



能量分组因素:$F=32.632$,$P<0.01$;时间分组因素:$F=218.590$,$P<0.01$;能量分组和时间点的交互作用:$F=3.413$,$P<0.05$

图5 凝固区宽度与单脉冲能量、辐照时间的关系 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

凝固区宽度测量值的方差分析结果示:可以得到能量因素的主效应 $F=32.632$,$P<0.01$,说明能量分组对凝固区宽度有影响;时间点的主效应 $F=218.590$,$P<0.01$,说明时间分组对凝固区宽度有影响;能量分组和时间点的交互效应 $F=3.413$,$P<0.05$,说明能量分组和时间存在交互作用。4个能量组的多重比较,应用的方法为校正的 Bonferroni 检验,100 mJ组和80 mJ组的凝固区宽度均值没有统计学差异($P>0.05$),其余能量组两两比较都有统计学差异($P<0.05$)。3个时间组的多重比较,应用的方法为校正的 Bonferroni 检验,2 s组和10 s组的凝固区宽度均值有统计学差异($P<0.05$),2 s组和5 s组的凝固区宽度均值有统计学差异($P<0.05$),10 s组和5 s组的凝固区宽度均值有统计学差异($P<0.05$),均值随着时间点的延长而升高。

2.5 相同激光剂量的不同单脉冲能量与辐照时间组合导致的差异

激光剂量是由单脉冲能量与辐照时间的乘积组成,在本实验中,有激光剂量相等而由不同参数组合的情况,分别是200 mJ×s(40 mJ×5 s、100 mJ×2 s)、400 mJ×s(40 mJ×10 s、80 mJ×5 s),而其组织效应测量值均不同。对200 mJ×s、400 mJ×s激光辐照剂量中的两种参数组合导致的气化区宽度、深度测量值使用单独样本 t 检验,发现200 mJ×s、400 mJ×s激光剂量中的两种参数组合导致的气化区深度的均值无明显差异($P>0.05$);气化区宽度均值有统计学差异($P<0.05$),100 mJ×2 s组>40 mJ×5 s组,80 mJ×5 s组>40 mJ×10 s组。

3 讨论

目前临床有多种清创方法,包括手术清创、自溶清创、酶解清创、生物清创、超声清创、“水刀”技术等。其中最常规使用的是手术清创,但其难以保证变性坏死组织清除程度[5]。自溶清创具有无创无痛的优点,但其清创周期一般需要1~2周,一般用于慢性创面[6-8]。2012年 Krieger 等[9]报道了一种可在4 h内完成清创的菠萝蛋白酶,但是这种酶清创失败后还需手术二次清创。生物清创也是一种有效的清创方法,但患者依从性较差[10-11]。超声清创对正常组织及新生肉芽组织无损伤作用,但面部、臀部等创面无法进行超声清创[12]。水刀清创具有一定的组织选择性,但会增加手术时间及开放性伤口暴露时间[13]。而高能短脉冲激光作为一种高能精确气化工具[14],在团队之前研发的“烧伤深度精确诊断多光谱仪”精确识别坏死和正常组织情况下(数据未发表),可实现精确控制气

化区域的范围,对受照组织周边区域的热损伤极小。

实验数据显示,气化区宽度随单脉冲能量的增加而增大,呈正相关关系,但增幅逐渐减小,说明皮肤对激光能量横向吸收到一定程度后逐渐饱和。随单脉冲能量的增加,气化区深度及凝固区宽度测量值基本上随单脉冲能量增加而增大,呈正相关关系。随单脉冲能量增大,每条线在快速到达一个相对高点后,测量值增幅减小,曲线走平,甚至逐渐减小。这一现象说明,组织结构的变化会对效应程度产生影响。具体到皮肤就是表皮、真皮、皮下组织对激光能量的吸收不同[15]。同时也说明,除了激光参数外,皮肤组织的光热参数也是影响测量值的组成因素,其影响为非线性的。激光辐照导致的凝固区在入口处较大而在底部较小,是因为激光能量的衰减以及皮肤各层次之间的光热参数不同所致。

相同激光剂量时不同单脉冲能量和辐照时间组合的气化区宽度及深度统计结果显示:相同激光剂量的不同参数组合导致气化区深度的改变微小;相同激光剂量时,单脉冲能量比辐照时间对气化区宽度的影响更大。

李文志等[15-16]研究微秒脉冲 Nd:YAG 激光对犬胃壁组织的量效关系,最大凝固带宽度即热损伤区域为(1 377 ± 165.9)μm,对犬膀胱组织的最大凝固带宽度为(2 078.2 ± 86.3)μm。Glatter 等[4]研究连续 CO_2 激光与猪皮肤组织的量效关系,得出其热损伤区域为(180 ± 50)μm。本实验中最大凝固带宽度及平均凝固带宽度分别为(217.03 ± 19.87)μm 及(141.10 ± 47.68)μm,说明本实验所采用的皮秒脉冲激光对皮肤的热损伤显著小于连续激光及微秒脉冲激光,若其应用于临床,则其工作时将具有百微米级的精度,而这样的精度是常规手术清创所远达不到的。

综上所述,本研究显示,1 064 nm 高能皮秒脉冲 Nd:YAG 激光对皮肤组织有较强的气化能力,副损伤小,且激光手术不接触创面,可减少感染的机会。尤其对于影响美观及功能的部位如面部、手部、关节部位的清创有重要意义,但应用于临床尚需更多研究。

参考文献:

[1] 陈孝平, 汪建平. 外科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 133 - 137.

[2] Evison D, Brown R, Rice P. The treatment of sulphur mustard burns with laser debridement[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2006, 59(10): 1087 - 1093.

[3] 陈家璧, 彭润玲. 激光原理及应用[M]. 3 版. 北京: 电子工业出版社, 2013: 193 - 195.

[4] Glatter R D, Goldberg J S, Schomacker K T, *et al*. Carbon dioxide laser ablation with immediate autografting in a full-thickness porcine burn model[J]. Ann Surg, 1998, 228(2): 257 - 265. DOI: 10.1097/00000658-199808000-00016

[5] Lobo T M, Pol D G. Evaluation of the use of a 940 nm diode laser as an adjunct in flap surgery for treatment of chronic periodontitis[J]. J Indian Soc Periodontol, 2015, 19(1): 43 - 48. DOI: 10.4103/0972-124X.145808

[6] Reyzelman A M, Vartivarian M. Evidence of intensive autolytic debridement with a self-adaptive wound dressing[J]. Wounds, 2015, 27(8): 229 - 235.

[7] Madaghiele M, Demitri C, Sannino A, *et al*. Polymeric hydrogels for burn wound care: Advanced skin wound dressings and regenerative templates[J]. Burn Trauma, 2014, 2(4): 153 - 161. DOI: 10.4103/2321-3868.143616

[8] Applewhite A J, Attar P, Liden B, *et al*. Gentian violet and methylene blue polyvinyl alcohol foam antibacterial dressing as a viable form of autolytic debridement in the wound bed[J]. Surg Technol Int, 2015, 26: 65 - 70.

[9] Krieger Y, Bogdanov-Berezovsky A, Gurfinkel R, *et al*. Efficacy of enzymatic debridement of deeply burned hands[J]. Burns, 2012, 38(1): 108 - 112. DOI: 10.1016/j.Burns.2011.06.002

[10] Lin L M, Ricucci D, Lin J, *et al*. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts[J]. J Endod, 2009, 35(5): 607 - 615. DOI: 10.1016/j.Joen.2009.02.012

[11] Hoppe I C, Granick M S. Debridement of chronic wounds: a qualitative systematic review of randomized controlled trials[J]. Clin Plast Surg, 2012, 39(3): 221 - 228. DOI: 10.1016/j.cps.2012.04.001

[12] 蒋琪霞, 李晓华. 清创方法及其关键技术的研究进展[J]. 中华护理杂志, 2009, 44(11): 1045 - 1047.

[13] Keiner D, Gaab R, Backhaus V, *et al*. Water jet dissection in neurosurgery: an updateafter 208 procedures with special reference to surgical technique and complications[J]. Neurosurgery, 2010, 67(2 Suppl Operative): 342 - 354. DOI: 10.1227/NEU.0b013e3181f743bb

[14] 滕立新. 钬激光切除术治疗浅表性膀胱肿瘤的疗效观察[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(5): 448 - 450.

[15] 李文志, 孙智, 刘筑闻, 等. 1.44 μm 波长脉冲 Nd: YAG 激光对犬胃壁组织作用的量效关系研究[J]. 中国激光医学杂志, 2009, 18(1): 10 - 15, 63. DOI: 10.13480/j.issn1003-9430.2009.01.018

[16] 孙智, 李文志, 刘筑闻, 等. 新型波长 1.44μm 脉冲 Nd: YAG 激光治疗机对犬膀胱组织作用的量效关系研究[J], 中国医疗设备, 2009, 24(2): 22 - 25.

(**收稿**:2015-11-09;**修回**:2016-01-26)

(编辑 龙 亮)