

强脉冲光对小鼠皮肤的损伤阈值及其修复过程*

肖郑颖, 吴淑莲, 谢志辉, 李晖⁺

(福建师范大学物理与光电信息科技学院,
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: 研究强脉冲光对皮肤的损伤, 确定其损伤皮肤的光剂量阈值并跟踪修复情况. 具体地, 以昆明小白鼠为实验动物, 去毛后, 用不同强度的强脉冲光(560-1200 nm)照射小鼠背部皮肤. 照射后肉眼观察皮肤的即时反应, 以出现红斑反应为损伤阈值标准, 采用加权概率单位法计算红斑发生率为50%时所对应的光剂量阈值 ED₅₀. 在此基础上, 结合切片的生物变化, 获取保护皮肤的光阈值. 采用光学相干层析成像跟踪皮肤的修复情况, 发现不同剂量、不同阶段皮肤光学特性参量的显著差异, 分析其原因, 为临床提供参考价值.

关键词: 光学相干层析成像; 强脉冲光; 损伤阈值; 修复

中图分类号: R318.51 文献标识码: A

0 引言

人类对美的追求一直在社会生活中占重要的位置, 人们渴望拥有永远年轻的皮肤, 所以各种医学嫩肤手段接踵而至. 风靡世界的光子嫩肤术是利用强脉冲光(Intense Pulsed Light, IPL)作用于皮肤组织的光热作用和光化学作用, 使皮肤组织中的胶原纤维和弹性纤维重新排列, 刺激胶原蛋白增生, 产生新的胶原蛋白, 达到皮肤年轻化的效果^[1].

IPL 在临床使用的过程中, 光剂量的选择更多是通过经验的把握. IPL 通过使用不同的滤波器(仅允许特定波长的光透过), 得到目标结构(包括不同深度和大小的血管、毛囊、色素组织)的深度相匹配的最佳光谱. 同时, 选择和病人个体的皮肤类型相符合的波长可以避免由于黑色素的吸收引起的强烈的副作用^[1].

为了防止皮肤的二次损伤以及在治疗过程中皮肤副作用的产生, 所使用的光剂量阈值就需要明确的界限, 因此如何界定皮肤的光剂量阈值是当前亟待解决的关键问题.

此外, 损伤的修复过程也是我们所关心的. 常规的手段是通过皮肤的活体组织切片来观察皮肤生理状况的改变, 但皮肤的活体组织切片势必引起初始皮肤形态学上的改变, (例如切片过程中脱水, 固定, 着色等程序), 而且也无法对同一位置重复取样, 存在医源性的损伤, 因此无损的观察方法在活体皮肤研究中有优势^[2]. 光学相干层析成像(Optical Coherence Tomography, OCT)就是一种很有前景的

无损的成像手段^[3-5], 可以对活体组织长期反复地测量. 其机理是皮肤的生理状况会影响皮肤的光学参量^[6-7], 而光学参量的改变会影响 OCT 图像中的图像灰度值, 通过对这些信息的分析, 我们就可以跟踪皮肤的修复状况.

本文主要通过 IPL 照射小鼠皮肤组织, 在肉眼观察、HE 染色切片的基础上, 研究不同辐照参量下皮肤损伤的光剂量阈值, 并用 OCT 跟踪高于损伤阈值的情况下皮肤的修复过程.

1 材料和方法

1.1 样品处理

昆明小白鼠 20 只, 鼠龄: 8 周, 体重 28±2g. 用 2% 的戊巴比妥钠 0.3 mL 腹腔注射对小白鼠进行麻醉, 在背部下侧, 用脱毛膏脱毛, 注意不能刮伤皮肤^[8]. 将每只小白鼠背部划分六个面积相近的区域, 以脊椎为分界线, 左右各三.

1.2 IPL 照射

采用 IPL Queen 光子多功能治疗仪(专业版), 波长为 560~1200 nm. 在预实验中已大致确定阈值的大致剂量, 以此剂量为中心, 设定 4 个剂量进行实验. 采用波长为 560~1200 nm 治疗头, 脉冲数为 2, 脉宽分别为 2.8 ms、3.4 ms, 脉冲间的延迟时间为 30ms, 能量密度分别为: 28 J/cm², 32 J/cm², 34 J/cm², 38 J/cm². 20 只小鼠分为两组, 第一组 10 只进行损伤阈值实验, 每个能量密度分别照射 5 只老鼠的一侧, 即每个剂量照射 15 个位置; 第二组 10 只, 照射方法相同, 但照前需先用 OCT 对初始状态的皮肤进行观察.

*国家自然科学基金(60578056)和教育部优秀青年教师资助计划(BD0050)资助

⁺Tel: 0591-83465373

Email: hli@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2008-9-10

1.3 观察及跟踪

1.3.1 皮肤损伤阈值研究

每照完一个剂量后,立即观察记录皮肤的情况,以刚出现肉眼可见红斑(血管充血)为损伤阈值判定标准,由至少两人观察并核对结果.测量损伤面积,并取下背部皮肤固定、石蜡包埋,制作 H.E 染色切片作为辅助比较.

1.3.2 OCT 对皮肤损伤修复的跟踪研究

OCT 是基于干涉原理的成像技术.本实验的 OCT 系统光源中心波长 850 nm,半高宽度 50 nm,功率 7 mW,参考臂使用快速光学扫描延迟线(RSOD),信号调制的频率是 42 K.系统轴向分辨率为 6.4 μm,横向分辨率为 20 μm.小鼠皮肤的有效穿透深度为 1 mm,扫描成像需要 3 s.在 IPL 照射前、照射后使用 OCT 对伤口进行观察,直到伤口基本修复.

1.4 统计处理

用 SAS 统计软件进行数据处理,采用加权概率单位法(Bliss 法)计算 560~1 200 nm 治疗头损伤阈值 ED₅₀及其 95%置信区间^[9].

2 结果与讨论

2.1 皮肤损伤情况

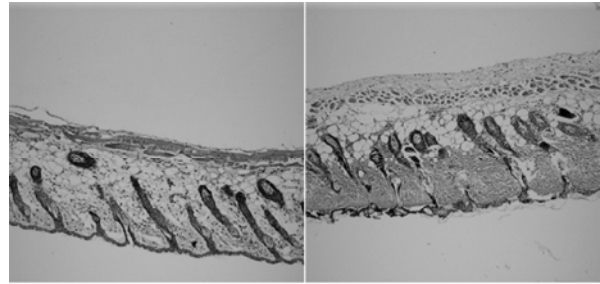
小鼠皮肤在 IPL 照射后出现的即时损伤见表 1.照射皮肤的 IPL 的能量密度越大,皮肤的受损越严重,损伤面积也越大.在能量密度较低的情况下(28J/cm²),IPL 照射后即时出现红斑,颜色较淡,并且持续时间很短,仅持续数分钟后消失.能量密度越高,则红斑越颜色越深,在能量密度较高的情况下,可出现较大面积的水泡.

表 1 560~1200 nm 治疗头下皮肤损伤情况

能量密度(J/cm ²)	28	32	34	38
损伤情况	微红,后消失	微红,稍微损伤	红,损伤斑较大	损伤面积较大,出现水泡
损伤面积/cm ²	未测得	0.18±0.03	1.27±0.09	1.77±0.05

图 1 为照射、观察损伤情况后立即处死小鼠,制作的皮肤 H.E 染色切片图片. IPL 对皮肤的损伤主要是热损伤,而热损伤会引起真皮形态学上显著的变化,因此胶原的玻璃样变是判断热损伤的主要标志.从图中可以看到,能量密度较大(38J/cm²)的情况下,有明显的胶原纤维玻璃样变症状,成纤维细胞减少,胶原纤维异常增多,彼此融合,失去正常丝网状结构,相邻的胶原纤维之间开始融合在一起,形成均匀嗜伊红的条片状无结构物质,皮肤受

损严重.而在能量密度较小(32J/cm²)的情况下,仅在靠近表皮处有轻微的玻璃样变,异常部位的也厚度远远小于能量密度大的情况.



(a)The energy density is 32J/cm² (b) The energy density is 38J/cm²

图 1 波长 560~1 200 nm,脉冲数 2,IPL 照射后小鼠皮肤的 HE 染色图片

Fig.1 The histological section with H.E staining (560~1200 nm), 2pulses

2.2 皮肤损伤阈值

对 IPL 照射下皮肤损伤阈值的研究是借鉴激光损伤阈值的研究的方法.采用加权概率单位法,以 IPL 剂量的对数值为横坐标,以损伤的百分率为纵坐标,进行加权直线回归分析,得到 50%的损伤概率作为损伤阈值.实验数据如表 2.

表 2 用 Bliss 法计算(560-1200nm)损伤阈值

剂量(J/cm ²)	照射数/个	损伤数/个	损伤百分率(%)	实验机率单位	回归率
28	15	5	33	4.1585	4.0432
32	15	9	60	4.9166	5.0362
34	15	10	67	5.4303	5.4871
38	15	14	93	6.5014	6.3142

SAS 统计软件的结果表明,560~1 200 nm 的治疗头下,皮肤损伤阈值剂量为 31.695 J/cm²,95% 置信区间为(26.682 ~ 34.620 J/cm²).皮肤的损伤阈值是通过即时红斑反应来判断的,表现为肉眼可见、边界清晰的淡红色斑疹.而即时红斑反应和真皮胶原蛋白增生的阈刺激强度很接近^[10],通过测量皮肤的损伤阈值,可以为标识治疗能量提供依据.

2.3 OCT 跟踪皮肤损伤修复

损伤皮肤的修复速度与照射的 IPL 的能量密度有关,能量密度为 28 J/cm², 32 J/cm², 34 J/cm², 38 J/cm²的 IPL 照射后,修复分别需要数分钟,10 天,13 天,17 天.(修复的时间均是按照最严重的伤口修复完成来计算的)可见,越大的能量密度造成的损伤越严重,完成修复所需要的时间也越长.各个剂量的损伤修复情况均较理想,小鼠的皮肤并未形成永久性瘢痕.

2.3.1 能量密度为 32 J/cm² 的 IPL 照射下的修复跟踪

从图 2 (a) 和 (b) 中可以看到, IPL 照射后,图像的深度明显降低(图中存在突起的包是由于小

鼠呼吸引起皮肤上下起伏引起的). 图 3 中, IPL 照射后即时, 图像的光强明显减弱, 散射光强度降低, 光强的衰减(波峰右侧曲线的斜率)并没有明显的变化. 这些是由于热损伤后皮肤的散射减少的缘故. OCT 的成像深度内包含了表皮层和真皮上层, 其中, 皮肤最重要得组成部分胶原也是皮肤组织主要的散射介质. 热损伤改变了皮肤的胶原结构, Ross 等的研究表明, IPL 的热效应能明显缩短 I 型胶原蛋白^[11], 这种脉冲光的热缩短效应导致了作为散射介质的胶原的特征长度的缩短. 使其远远小于光的波长(瑞利散射), 导致了光的散射减少. OCT 探测的是后向散射光的强度,光的散射减少必然引起后向散射光强度的减弱,从而导致整个 IPL 照射区域变暗,由于 OCT 系统去本底的影响,最终使得图像的深度明显降低^[12].

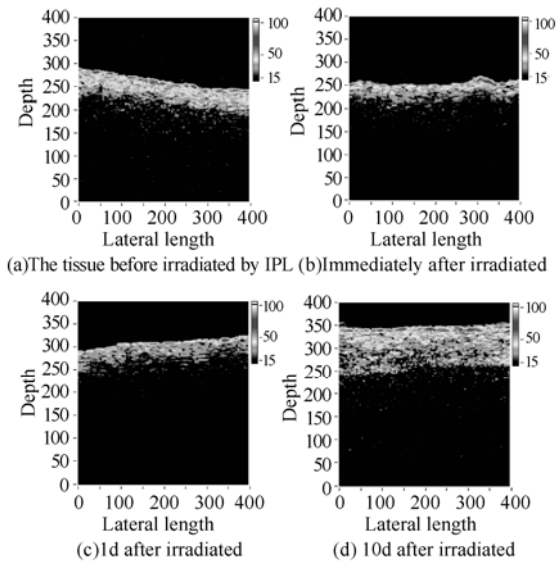


图 2 IPL 能量密度为 32 J/cm², 波长 560~1 200 nm, 双脉冲,同一位置的 OCT 图像

Fig.2 OCT image at 32 J/cm², 560~1 200nm, 2pulses

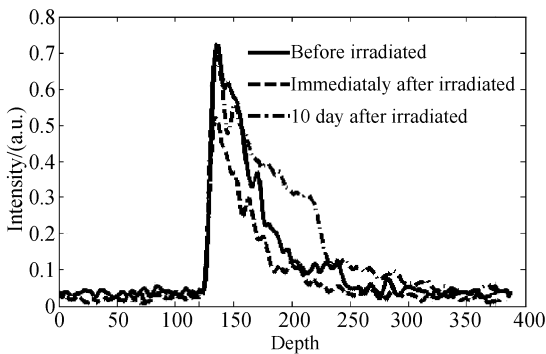


图 3 IPL 能量密度 32 J/cm², 波长 560~1 200 nm, 双脉冲,同一位置照射前,照射后即时,以及照射 10 天(修复完成)后的 OCT 图像强度分布曲线.

Fig.3 32J/cm², 560~1200nm, 2pulses, intensity profiles of the tissue before irradiated, immediatly after irradiated and 10d after irradiated by IPL.

图 2 (c) 和 (d) 是皮肤组织在 IPL 损伤后的修复过程,从图中可见, IPL 照射 1 天以后,图像

的深度已有一定提高,至第 10 天修复完成时,图像的深度甚至已超过 IPL 未照射前.而在图 3 中,在 10 天完成修复后,散射光强度较照射后即时有所增强,接近照射前水平(二者峰值接近),而光强的衰减较照射前则有明显的降低(斜率变小).在修复过程中, IPL 的热损伤导致炎症介质释放入间质,刺激成纤维细胞活性,启动组织修补机制,促进新胶原合成^[13-14],形成了真皮上层平行皮肤表面紧密排列的由胶原蛋白组成的纤维结构.因此修复完成的皮肤中的胶原空间分布比未照射前更规则,折射率的各向异性也较照射前弱,导致散射系数和衰减系数的降低,因此图像的深度较照前更深,强度分布曲线的斜率变小.

2.3.2 不同能量密度修复情况的比较

图 4 将不同能量密度的 OCT 图像进行比较,不同能量密度下,小鼠皮肤修复完成后的 OCT 图像有明显差别,能量密度较大的情况下,图像深度明显较大. H.E 染色切片中发现(图 1),能量密度大的情况下,产生玻璃样变的厚度较大,症状也更为严重,损伤也较大,因此,可以在更深部位的真皮刺激成纤维细胞活性,形成更大厚度的平行皮肤表面紧密排列的纤维结构,光在皮肤真皮中受到的衰减也就更小,因此,图像的深度有明显增加.目前这方面的研究尚处于探索阶段,还有待于进一步深入研究.

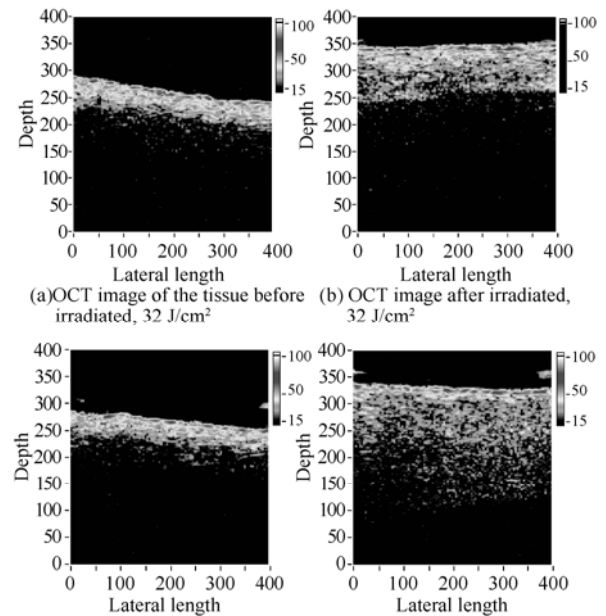


图 4 IPL 波长 560~1 200 nm ,IPL 照射下的 OCT 图像
Fig.4 OCT image at 560~1 200 nm

3 结论

本文通过 IPL 的 560~1 200 nm 治疗头照射小鼠皮肤组织,研究不同强度的光照射下皮肤组织的损伤情况,得出皮肤损伤阈值剂量为 31.695 J/cm²,

95% 置信区间为(26.682 ~ 34.620 J/cm²), 同时分析 IPL 对生物组织的光热效应, 并用显微观察手段观察了不同光照射下生物组织胶原纤维玻璃样变症状的差异. 光致皮肤的损伤受波长、能量、照射时间(脉宽)、皮肤类型和部位等因素的影响. 为了达到更好的治疗效果, 应该根据组织的光学参量、热学参量、组织结构、环境和边界条件等选择合适的 IPL 参量. 此外, 用 OCT 来跟踪观察同一能量密度光照前后和修复, 以及不同能量密度光照下的修复, 发现散射光强以及光强衰减存在明显变化和区别, 体现了这一系列过程中光学参量变化的整体趋势. 本文只是 IPL 对小鼠皮肤损伤的一个初步探索, 还需要进行更系统、更深入的研究. 此外, OCT 在研究活体皮肤的性质特异性方面也表现出巨大的潜力, 有待发掘其进一步的应用.

参考文献

- [1] CHRISTIAN R, BARBEL G, HORTENSIA G. IPL Technology: A Review[J]. *Lasers surg med*, 2003, **32**:78-87.
- [2] GAMBICHLER T, KÜNZLBERGER B, PAECH V, *et al*. UVA1 and UVB irradiated skin investigated by optical coherence Tomography in vivo: a preliminary study[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2005, **30**(1): 79-82.
- [3] GAMBICHLER T, BOMS S, STÜCKER M, *et al*. Epidermal thickness assessed by optical coherence tomography and routine histology: preliminary results of method comparison[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2006 Aug; **20**(7):791-5.
- [4] WANG Ling, DING Zhihua. Phase modulation by resonant driving of the galvo in rapid scanning optical delay line[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2008, **37**(2):351-355.
王玲, 丁志华. 基于快速扫描光学延迟线谐振扫描的相位调制方法[J]. *光子学报*, 2008, **37**(2):351-355
- [5] LIU Xin-wen, WANG Hui-nan, QIAN Zhi-yu. Denoising process of OCT image based on wavelet transform[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2006, **35**(6): 935-939.
刘新文, 王辉南, 钱志余. 小波变换对 OCT 图像的降噪处理[J]. *光子学报*, 2006, **35**(6): 935-939.
- [6] WELZEL J, REINHARDT C, LAKENAU E, *et al*. Changes in function and morphology of normal human skin: evaluation using optical coherence tomography[J]. *Br J Dermatol*, 2004; **150**: 220-225.
- [7] CHEN Wei, XUE Ping, YUAN Tao, *et al*. Development of fiber-based optical coherence tomographic imaging system[J]. *Acta Photonica Sinica*, 1999, **28**(11): 970-973.
陈伟, 薛平, 袁韬, 等. 光学相干层析成像技术的医学诊断应用[J]. *光子学报*, 1999, **28**(11): 970-973.
- [8] SHAO Yi-xiang. The Tutorial of Laboratory Animal[M]. Nan jing: Southeast University Press, 2003: 229-234.
邵义祥. 医学实验动物学教程[M]. 东南大学出版社, 2003, 229-234.
- [9] SLINEY DH, MELLERIO J, GABEL VP, *et al*. What is the meaning of threshold in laser injury experiments Implications for human exposure limits[J]. *Health Phys*, 2002 Mar; **82**(3):335-47.
- [10] DENG Xiang-dong; LI Shi-rong. The study of the relationship between erythematous response and ideal photorejuvenation[J]. *Chinese Journal of Practical Aesthetic and Plastic Surgery*, 2006, **17**(6): 404-406.
邓向东, 李世荣. 红斑反应与理想光子嫩肤术关系的研究[J]. *中国美容整形外科杂志*, 2006, **17**(6):404-406.
- [11] ROSS EV, SMIRNOV M, PANKRATOV M, *et al*. Intense pulsed light and laser treatment of facial telangiectasias and dyspigmentation: some theoretical and practical comparisons[J]. *Dermatol Surg*, 2005 Sep; **31**(9):1188-98.
- [12] YEH AT, KAO B, JUNG WG, *et al*. Imaging wound healing using optical coherence tomography and multiphoton microscopy in an in vitro skin-equivalent tissue model[J]. *J Biomed Opt*, 2004, **9**(2): 248-53.
- [13] OMI T, KAWANA S, SATO S, *et al*. Ultrastructural changes elicited by a nonablative wrinkle reduction laser[J]. *Lasers Surg Med*, 2003, **32**: 46-49.
- [14] ZELICKSON B, KIST D. Effect of pulsed dye laser and intense pulse light source in dermal extracellular matrix remodeling[J]. *Lasers Surg Med*, 2000, **12**:68.

Study of Mouse Skin Injury Threshold of IPL Exposure

XIAO Zheng-ying, WU Shu-lian, XIE Zhi-hui, LI Hui

(Key Laboratory of OptoElectronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education, Fujian Provincial Key Lab of Photonic Technology, School of Physics and OptoElectronics Technology, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, Fujian, China)

Received date:2008-09-10

Abstract: This thesis is devoted to investigate injury effects of mouse skin exposed to intense pulsed light (IPL), establish injury threshold of light dose, and observe recovery process. A mouse was chosen and moulted, and then irradiated by the IPL system in vivo under certain wavelengths with different energy densities. The immediate effect was observed for determine of ED₅₀ right by naked eye and histological examination of skin sections after IPL exposure. And then, the skin injury recovery process was observed by optical coherence tomography. The results indicate that the optical parameters of tissue with different energy densities exposure and different stages have changed distinctly. The reasons concerning some complications were analyzed by the optical parameters' changes and it could provide reference for clinical value.

Key words: Optical coherence tomography; IPL; Injury threshold; Recovery



XIAO Zheng-ying was born in 1985. She received her B.S. degree from Fujian Normal University in 2006. At present, she is a Master's degree candidate at School of Physics and OptoElectronics Technology, Fujian Normal University. Her research interests include biomedical imaging especially optical coherence tomography.