

细胞外溶液的近红外光热响应取决于其吸收特性*

关魁文 李新宇 刘佳 孙长森†

(大连理工大学, 物理与光电工程学院, 生物医学光学实验室, 大连 116023)

(2012年9月22日收到; 2012年10月18日收到修改稿)

光热效应是激光与生物组织相互作用中的一个主要因素,但其产生、传输和作用机理尚不十分清晰.本文采用双波长近红外激光辐照和膜片钳技术相结合的方法,选择980 nm和845 nm两个波长的近红外激光,因其在水中的吸收系数分别为 0.502 cm^{-1} 和 0.0378 cm^{-1} ,接近十倍差异.若溶液是产生光热响应的主要介导物质,则期望这两个波长的激光辐照所产生的溶液温升也将呈现相应的十倍比例关系.研究中把溶液光热响应过程分为温升的建立和耗散两个阶段.在温升建立阶段,理论模型的建立采用长时程(激光作用时程长于介质的热弛豫时间)作用理论的研究结果,实验是使用膜片钳系统来测量细胞外溶液中,已进行温度标定的、充灌溶液的玻璃微电极电导变化,根据这个电导变化来定量研究溶液光热响应与其吸收特性的关联性;在耗散阶段,使用膜片钳系统监测神经细胞的电生理功能变化.理论和实验两方面的结果都表明,溶液对低强度近红外激光的吸收特性决定了其光热响应.这一结果,可以直接用于生物组织光热响应特性相关的机理研究.

关键词: 光热响应, 双波长的方法, 近红外激光和生物组织相互作用, 空电极方法

PACS: 87.50.W-, 87.19.Pp, 65.20.-w, 87.50.Wf **DOI:** 10.7498/aps.62.058702

1 引言

在红外激光临床应用中生物组织的光热响应是一种主要的能量传递方式^[1],能量输运常用玻尔兹曼方程来描述^[2],而蒙特卡罗模拟是行之有效的将理论和实验联系起来的常用方法^[3].这种基于能量传递方法来研究激光与生物组织相互作用的机理已经比较系统,但就生物组织的活体角度来看,其生命体征如何来响应激光的辐照,仍然是一个研究热点,也为激光临床应用提出的更高要求^[4].目前的研究认识到,过量高强度激光辐照能够明显诱导组织的局部温升甚至造成其损伤和坏死^[5],而对适量曝光所产生温升的有效控制^[6],不但可以利用其诱导的光声效应来进行生物医学成像^[7],而且可以实现可逆的细胞功能调节^[8].比如,使用红外激光辐照诱发神经细胞动作电位等^[9,10].在这些实验中红外激光作为一种有效方法,刺激神经细胞并通过光热效应对其功能进行可控调制^[11].通过记

录钠、钾离子通道的响应特性,来定量研究弱激光辐照神经细胞的作用效果是一种有效手段^[12].研究表明,弱激光可导致神经元钠通道特性向去极化方向改变,致使动作电位容易产生,从而引起神经元兴奋性发生变化.另外,弱激光作用海马神经细胞可以改变其外向整流钾离子通道的时间特性^[13],进而影响动作电位的形成和发放.这种用弱激光调节神经元生理功能的方法有利于受损神经元的恢复和再生,但其作用机理有待进一步研究.尽管通过探测回波参数变化^[14]和基于测量溶液体积随温度变化的相差相干成像(differential-phase optical coherence tomography, DOCT)技术可以间接测量作用靶点的温升^[15],并用来探究激光与生物组织相互作用的机理,但找到光热响应的靶点分子色团依然是这一研究领域的基本问题^[16].最近Shapiro等^[17]证明了激光辐照是通过改变细胞膜电容来进一步影响细胞的电生理功能的,并且确定了细胞外溶液在光热响应中所起的作用主要是光吸收驱动的温升作用(absorption-driven temperature

* 国家自然科学基金(批准号: 30870582, 31070757)资助的课题.

† 通讯作者. E-mail: suns@dlut.edu.cn

risers, ATR). 他们的方法是使用重水 (D_2O) 取代纯水 (H_2O) 来做细胞外溶液的溶剂, 因为 1889 nm 激光在水中的光吸收系数^[18]是 60.6 cm^{-1} , 而在重水中这一系数大约为水的 1/5. 在同样的红外激光辐照下, 其光热响应相应地减少了 $65.3\% \pm 4.1\%$, 这证明了水在光热响应中所起的介导作用. 但问题是重水毕竟不是生物体液的组成成分, 很难讲重水对其他的生命过程会有怎样的影响.

本文采用双波长近红外激光辐照和膜片钳技术相结合的方法, 在不改变细胞外溶液环境的情况下, 只通过改变辐照激光的波长, 来定量的分析细胞外溶液在光热响应过程中的作用. 研究中选取了 980 nm 和 845 nm 两个波长的近红外光, 这一方面是因为这两个波长是临床上常用的, 另一方面, 是基于它们在水中的光吸收系数 μ_a 分别为 0.502 cm^{-1} @980 nm 和 0.0378 cm^{-1} @845 nm (根据 0.0387 cm^{-1} @847 nm 和 0.0308 cm^{-1} @833 nm 线性插值得到)^[19], 其比值约为 10. 若溶液是产生光热响应的主要介导物质, 则期望辐照所产生的溶液温升也必将呈现相应的十倍比例关系. 研究中把溶液光热响应过程分为温升的建立和耗散两个阶段. 在温升建立阶段, 理论模型^[20-23]是在已经公认的激光脉冲时程长于水介质热弛豫时间 (17.6 ms ^[24]) 的研究结果基础上所做的简化, 且空间作用长度 (出射端到靶细胞的距离约 $108.0 \mu\text{m}$) 远远短于两个波长在水中的穿透深度 1.992 cm 和 26.455 cm 等因素, 主要考虑轴向吸收和径向热扩散两个方面. 实验上是采用膜片钳系统来测量细胞外溶液中, 已进行过温度标定的、充灌溶液的玻璃微电极 (open-pipette method^[25]) 的电导变化, 根据这个电导变化来定量研究溶液光热响应与其吸收特性的关联性. 实验结果显示温度场建立过程中双波长辐照产生的温升比大约为 10 倍. 而在耗散阶段 (关闭激光后), 理论方面主要是运用热扩散理论来分析温度场的衰减进程, 实验方面使用膜片钳监测神经元细胞的电生理功能在温度场衰减进程中的变化^[26], 这样可以最大限度地排除其他光学效应, 比如光电极化效应、光化学效应、光力学效应的影响. 又由于在实验过程中只改变激光波长, 其他实验条件保持一致, 因此这两个结果具有波长依赖的可比性. 理论和实验两方面的结果都表明, 低强度近红外激光的溶液吸收特性决定了其光热响应. 这一结果, 可以直接用于生物组织光

热响应特性相关的机理研究.

激光辐照下的温升过程通过激光辐照时程 (t_L) 划分为两个阶段: 激光辐照过程中 ($t \leq t_L$) 是建立温升过程; 激光耗散则是在 $t = t_L$ 时刻以后的区域, 即 $t > t_L$.

2 温升的建立

2.1 理论模型

为了建立长时程激光辐照的理论模型, 根据实验结果, 同时考虑轴向吸收 (沿光传输方向) 和径向热扩散两个方面的因素. 本文采用轴对称的柱坐标系, 在该坐标系下的热传导方程可以表述为

$$\rho C \frac{\partial \Delta T}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(\kappa r \frac{\partial \Delta T}{\partial r} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(\kappa \frac{\partial \Delta T}{\partial z} \right) + \mu_a Q_r, \quad (1)$$

其中 ρ , C 和 κ 分别为组织的密度, 比热和热传导系数; ΔT 是局部的温升; $\mu_a Q_r = \frac{\mu_a P}{\pi R^2}$ 表示光在介质中传输时, 由于吸收产生的内部热源, 它在被组织吸收时强度呈现有规律分布^[27], 该项反映了光热作用的贡献; Q_r 为能量密度; $P = P_0 \exp(-\mu_a z)$ 描述了光在吸收介质中的传输衰减; P_0 是入射的光功率; μ_a 为介质的光吸收系数; z 是光在媒质中的传输距离. 实验中使用单模光纤 (single mode fiber, SMF28) 传输光, 光和媒质的作用距离很短, 它的输出强度分布近似为高斯型, 如图 1(a) 所示.

光吸收驱动的温升理论描述在文献 [20] 的公式 (8a) 中已经给出, 此处我们对其解析解作进一步简化得到

$$\Delta T(t, z, r) = \frac{\tau 2 \mu_a P_0 \exp(-\mu_a z) \exp(-2r^2/R^2)}{\rho C \pi R^2} \times \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right\}, \quad t \leq t_L, \quad (2)$$

其中 t_L 为光辐照时间; τ 为时间常数, 变量 r 和 R 的意义在图 1(b) 给出, 其中芯径 $2r_0 = 10 \mu\text{m}$, $2R_0$ 通过角的几何关系计算得到, 而发散角 β 可以利用数值孔径公式 $NA = n_0 \sin(\beta) = 0.16$ 计算所得, 取光纤折射率 $n_0 = 1.429$, 则发散角 $\beta \approx 6.04^\circ$. 由于实验中光在细胞外溶液中的传输距离很短 (大约 $108.0 \mu\text{m}$ 即可到达靶细胞), 因此沿轴向的温升差异很小, 所以在该方向上由温差决定的热扩散可以

忽略, 而只考虑由于吸收造成的光功率衰减因素.

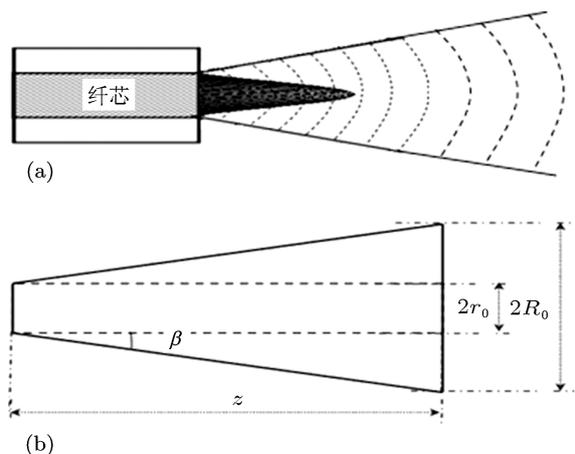


图 1 在 SMF28 光纤芯径 (大约 10 μm) 中传输的光强度分布以及由数值孔径 ($\text{NA} = 0.16$) 决定的传播截面 (a) 近光纤端面处的光强度分布为高斯型, 光束出射后没有考虑瑞利散射等其他效应对光束发散的影响; (b) 由 SMF28 光纤数值孔径决定的, 激光在溶液中传输时的发散情况

在 $t = t_L$ 时刻, 双波长激光辐照下光吸收造成温升的空间分布 $\Delta T(t_L, z, r)$ 可以由 (2) 式计算得到, 计算过程中所采用参量的取值如表 1 所示. 计算所得温升分布如图 2(a) 所示. 从图中可以清晰的看到在光线传播的子午线上温升, 其中 980 nm 激光辐照 500 ms 后大约升高 2.7 $^{\circ}\text{C}$, 而 845 nm 激光辐照同样的时程后约升高 0.2 $^{\circ}\text{C}$, 其比值约为 10, 这与这两个波长的激光在水中吸收系数的比值相符合. 而沿径向空间分布情况如图 2(b) 所示, 其径向呈现明显的指数衰减, 且分布形式近似为高斯型. 这是由于光能被水溶液吸收而引起溶液局部升温, 该模型可以很好的描述本文所使用激光 (光功率密度约 10^5 W/cm^2) 对水溶液的作用.

2.2 空电极实验 (open pipette test)

为了验证上面的理论预测, 设计使用膜片钳空电极实验测量光吸收产生的温升分布, 实验装置及原理详见参考文献 [26]. 该方法是在膜片钳实验中, 使用一个充灌细胞外溶液的玻璃微电极, 其直径在 1—2 μm 左右, 直接浸入到电极外液中并形成回路, 通过膜片钳可以读到 5—6 $\text{M}\Omega$ 的电极阻抗, 通过一个标准温度控制装置, 结合测量流过电极的电流来间接测量温升变化, 对此兆欧级电阻进行温度标定后, 流过该玻璃微电极的电流就是温度的函数, 因此该电极就成为一个微米尺度的温度传感器. 因为

表 1 理论计算所用参数

P_0/mW	100
$\rho/\text{kg/m}^3$	10^3
$\kappa/(\text{W/m}\cdot\text{K})$	0.6
$C/10^3\text{J/kg}\cdot\text{K}$	4.187
$D/10^{-7}\text{m}^2/\text{s}$	1.43
μ_{980}/cm^{-1}	0.502
μ_{845}/cm^{-1}	0.0378

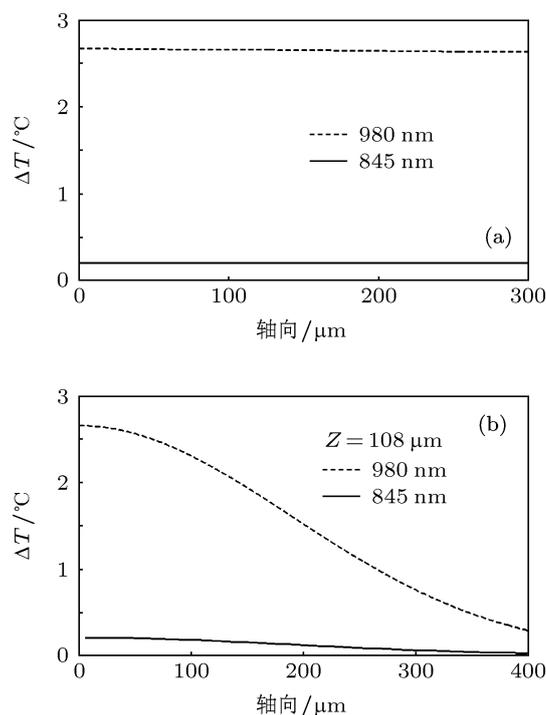


图 2 分别使用波长为 980 nm 和 845 nm 激光辐照 500 ms 后所产生的温升 (a) 轴向中轴线温升分布; (b) $z = 108.0 \mu\text{m}$ 处沿径向的温度分布

该传感器对于光热响应的时间精度为亚毫秒级, 空间分辨率可达微米级, 而成为目前通用的测温方法 [25,26]. 其原理是依据电极内溶液的电导对温度的依赖性 [28], 在实验中记录了近红外激光辐照下, 电极电流随时间变化的关系, 并根据标定的电流温度曲线计算出温升变化. 根据如图 3 所示实验中靶细胞和光纤端头的位置关系, 近似计算其几何尺寸, 并选择计算截面在轴向距离为 108.0 μm 的平面上.

在测温实验中, 玻璃微电极固定在三维显微操作器上 (MX7600 型), 该操纵器可以进行精度为微米的三维空间扫描. 在轴向 0—200 μm 和径向 0—100 μm 范围内进行步进扫描, 如图 4(a) 所示.

在每扫描一步后, 给予微电极 500 ms 的近红外激光辐照, 辐照的过程是在与膜片钳的同步下进行的, 同步精度为 0.1 ms, 同步测出激光辐照时程内的电极电流, 再根据已经标定好的电流温度关系, 得出相应的温度值. 如此反复, 直到关注区域内的点扫描结束为止. 这样就可以绘制出在 $t = t_L = 500$ ms 时刻温升的空间分布, 如图 4(b) 所示. 实验结果显示分布为近似轴对称, 决定于光纤纤芯的椭球度. 从图 4(b) 中取子午光线对应的温度变化并示于图 4(c), 从中可以读到在 $z = 108.0 \mu\text{m}$ 的平面上, 从光纤出射的子午光线对应的峰值温升分别为 2.5°C (980 nm) 和 0.25°C (845 nm), 其差异也是约为 10

倍, 这和理论计算的结果相符合.

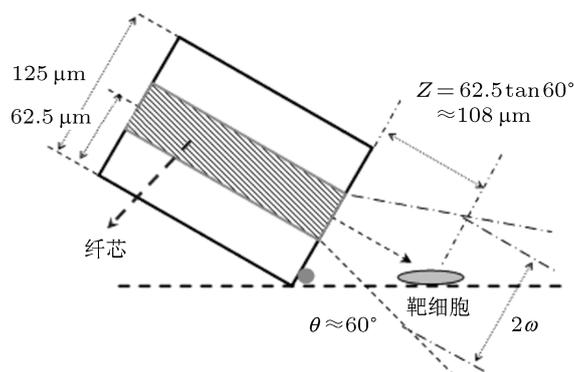


图3 靶细胞和激光辐照的几何关系

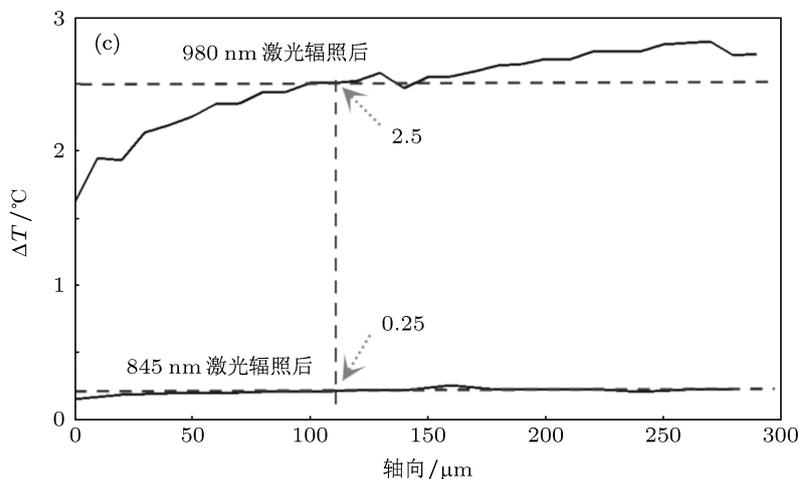
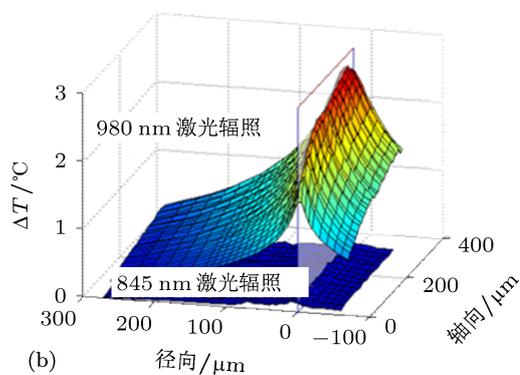
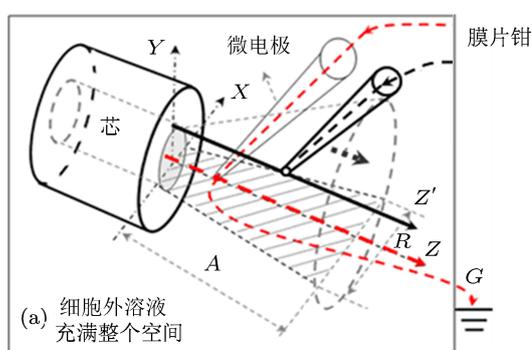


图4 空电极方法测量温升的扫描区域及相应的温度分布图 (a) 光纤出射端附近玻璃微电极的扫描示意图. A-轴向, R-径向, Z-设计扫描方向, Z'-可能的实际扫描方向; (b) 溶液吸收了 980 nm 和 845 nm 激光辐照能量后, 在轴向 $200 \mu\text{m}$ 范围内的温升空间分布; (c) 轴向子午线对应的温升, 箭头所示处距离光纤端面 $108 \mu\text{m}$ 处的温升实测值, 可见两个波长激光产生的温升比值也是 10

在近红外激光辐照过程中, 光吸收驱动溶液温升在理论和实验两方面都得到证明, 这可以确定细胞外溶液是激光产生光热效应的主要介质. 为进一步证明, 这一光热效应可以很好的传递给溶液中

的细胞, 需要进行相应的实验验证. 因为根据所采用光功率密度的不同, 激光与生物组织相互作用主要存在四种效果: 光电极化效应、光化学效应、光力学效应和光热效应. 有些情况下这几种效果共同

作用于生物组织,为了更好的区分出对光热效应的响应,实验中在停止激光辐照后,使用光吸收驱动的温升来调制神经细胞的生理功能,这样可以最大限度的排除其它因素的影响,突出光热效应的作用.

3 温升耗散

3.1 温升的耗散理论

在 $t = t_L$ 时刻,关闭光源后激光产生的局部温升,开始通过热扩散的形式耗散到周围环境中,热耗散过程可以使用文献 [20] 中的公式 (8b) 很好地描述:

$$\Delta T(t - t_L, z, r) = \Delta T(t_L, z, r) \times \exp\left(-\frac{t - t_L}{\tau}\right), \quad t > t_L, \quad (3)$$

其中 $\Delta T(t_L, z, r)$ 是关闭光源后,空间温升分布随时间的变化情况,通过计算所得的耗散曲线如图 5 所示.

由于海马神经细胞的钠离子通道是快通道,从其激活开放到失活关闭的总时程为 2—3 ms,根据图 5 的理论结果,可以用钠离子通道的特点来度量这个温度场的消逝影响.在经典理论中,电压依赖的钠通道离子电流可以采用 Hodgkin 和 Huxley 于 1952 建立的 HH 模型 (Hodgkin-Huxley model) 来描述 [29],该模型的数学表达形式为

$$\begin{aligned} I_{Na}(T) &= m^3 h \overline{G_{Na}} (V - E_{Na}) \\ &= m^3 h \overline{G_{Na}} \left(V - \frac{RT}{F} \ln \frac{C_o}{C_i} \right). \end{aligned} \quad (4)$$

那么激光辐照前后的钠离子通道的峰值电流变化可以近似表述为

$$\begin{aligned} \Delta I_{Na} &= I_{Na}(T) - I_{Na}(T_0) \\ &= m^3 h \overline{G_{Na}} \left(V - \frac{RT}{F} \ln \frac{C_o}{C_i} \right) \\ &\quad - m^3 h \overline{G_{Na}} \left(V - \frac{RT_0}{F} \ln \frac{C_o}{C_i} \right) \\ &= -m^3 h \overline{G_{Na}} \frac{R\Delta T}{F} \ln \frac{C_o}{C_i}, \end{aligned} \quad (5)$$

$$\frac{\Delta I_{Na980}}{\Delta I_{Na845}} \approx \frac{\Delta T_{980}}{\Delta T_{845}} = 10.0, \quad (6)$$

其中 $I_{Na}(T)$ 是温度 T 条件下通过 HH-model 描述的钠通道电流, m 和 h 分别用来描述钠通道的激活和失活动力学特性,且都是电压和时间依赖, $\overline{G_{Na}}$

是全细胞模式钠通道的平均电导, V 是去极化电压, E_{Na} 表示钠离子的平衡电势, R 是普适气体常数, F 为法拉第常数, T_0 为溶液的初始温度, C_i 和 C_o 分别表示细胞内外液中钠离子的浓度, $\Delta T = T - T_0$ 反映温度的改变, ΔI_{Na980} 和 ΔI_{Na845} 分别描述了温升诱导的钠电流变化, ΔT_{980} 和 ΔT_{845} 为双波长辐照后的温升,结合前面空电极的实验和理论结果,钠电流的变化之比应该满足 (6) 式.对应此理论预测,进行了下面的神经细胞温度特性实验.

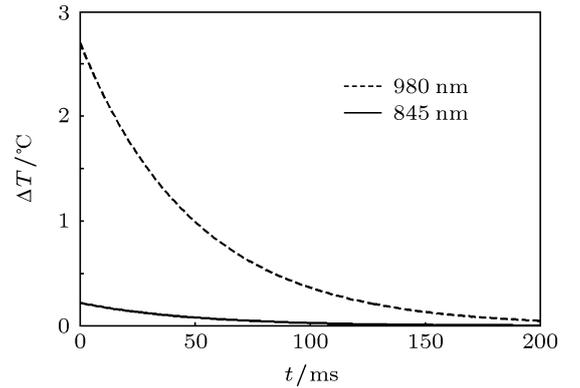


图 5 在 $t_L = 500$ ms 时关闭光源,在 $z = 108.0 \mu\text{m}$ 和 $r = 0 \mu\text{m}$ 处温升 $\Delta T(t - t_L, z, r)$ 的耗散情况

3.2 神经功能调制

钠离子通道的生理功能被选择用来监测温升对活细胞的响应.神经元细胞是从 7—10 天的 Sprague-Dawley 鼠急性分离得到,使用 tetraethylammonium (TEA) 阻断了电压依赖的 K 通道,研究温升耗散过程中钠电流变化.钠电流通过膜片钳 (EPC-10 amplifier driven by PULSE software, HEKA, Germany) 的全细胞模式监测其电生理功能变化.实验装置、方法、准备和协议的设计如参考文献 [26] 中图 1(a) 所示.实验中由 HEKA EPC10 膜片钳系统给出三个相同间隔的去极化电压脉冲 (-72 mV— 25 mV) 并将该系统前面板上的三个数模输出端中的两个 ($D/A0$ 和 $D/A1$),分别连接到两台半导体激光器驱动器 (ITC510, Thorlabs) 的外调制端上,以 0.1 ms 的时间精度实现对 980 nm 和 845 nm (LU0980M180, LU0845M150, Lumics) 两个光源的同步控制.这两个波长的激光通过一个 2×1 光纤耦合器输出到本文图 3 所示的光纤端并作用于神经细胞.实验是在同一个海马神经细胞进行两个波长激光的交替辐照,波长的切换是通过膜片钳

系统软件 (PULSE) 编程, 事先设计好的 980 nm 和 845 nm 驱动按钮交替选择 D/A0 或 D/A1 输出出来设定并完成的, 整个切换过程中外在条件保持一致, 只是波长改变, 切换时间是在几秒内.

图 6(a) 中 Control: 海马神经元正常电生功能下的整细胞钠电流; Laser: 激光辐照后, 同样的去极化电压诱导的电生功能. 激光的辐照是紧接着第一个去极化电压脉冲开启的, 激光辐照 500 ms 后即关闭, 其产生的光热效应会影响第二个去极化电压脉冲产生的电生功能, 因为在第二个去极化电压脉冲的开始激光器就关闭, 这样可以最大限度的减少激光辐照对细胞产生的其他效应, 比如: 光电极化效应、光力学效应、光化学效应等; Recovery: 细胞膜钠离子通道功能的恢复情形, 第三个去极化电压脉冲的施加条件与第一个完全相同, 以对比激光辐照前、后细胞功能的一致性. 我们采用的是不同波长的激光辐照同一细胞, 选择激光辐照的时间与强度以其在恢复阶段 (Recovery) 可以获

得与正常电生状态 (Control) 相同的电生输出为标准, 也可以证明这次激光辐照效应已经不能影响下一次辐照了. 经过几个小时的试验之后, 细胞状态越差, 这种恢复就越差, 就必须更换细胞, 重新实验. 我们反复实验了 10 多个细胞, 显示出一致性. 膜片钳电流记录的实验结果如图 6(b) 和 (c). 双波长激光辐照都明显的增加了钠电流的幅值, 且作用效果可逆. 980 nm 激光辐照前后钠电流的峰值变化为 $\Delta I_{980} \approx -0.07$ nA (如图 6(b) 插图中虚线读数: 辐照前 -0.81 nA, 辐照后 -0.88 nA), 845 nm 激光辐照前后钠电流的峰值变化为 $\Delta I_{845} \approx -0.01$ nA (如图 6(c) 插图中虚线读数: 辐照前 -0.92 nA, 辐照后 -0.93 nA), 980 nm 激光辐照下钠电流的幅值增强明显高于 845 nm 激光作用, 且峰值电流变化之比为: $\Delta I_{980}/\Delta I_{845} \approx (-0.07\text{nA})/(-0.01\text{nA}) = 7.0$. 另外, 对比激光辐照前、后电流变化, 发现在去极化电压下, 通道电流开启的时间缩短, 这说明通道

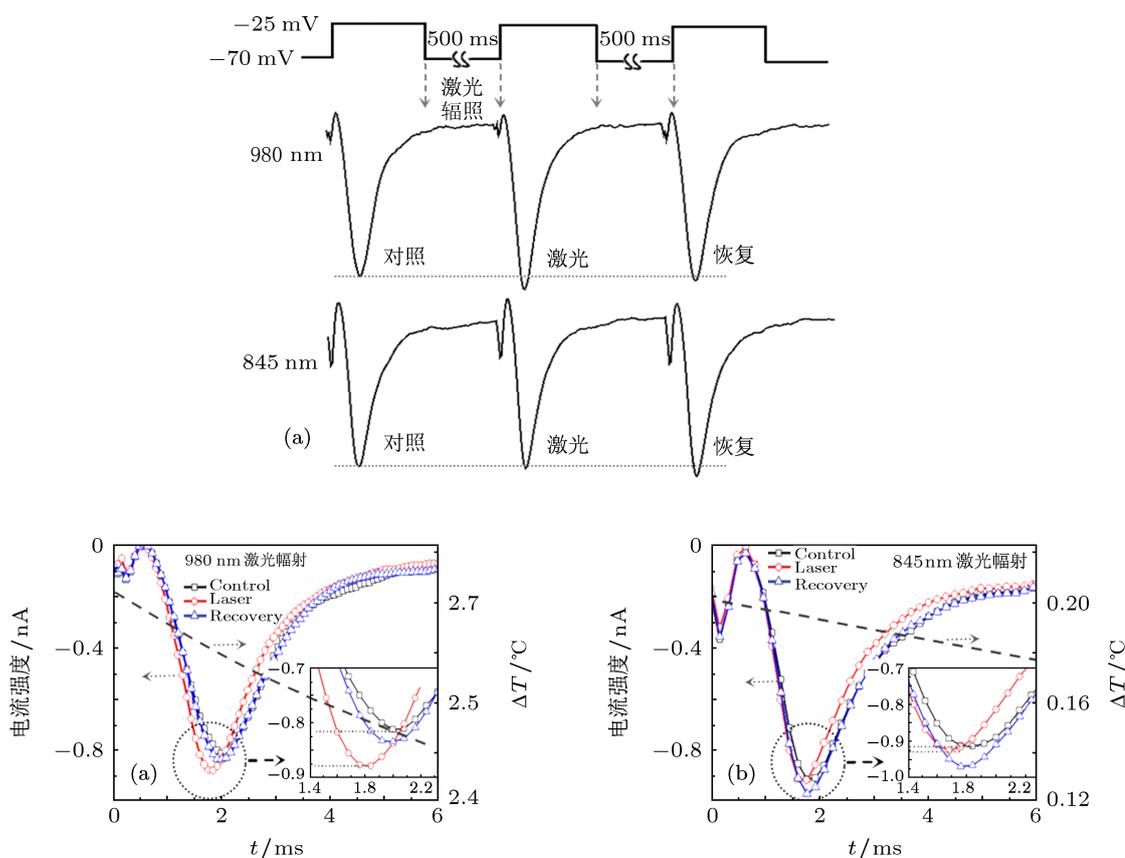


图 6 在温升耗散阶段的激光辐照协议及海马神经元钠离子通道电流对比的实验结果 (a) 激光辐照协议及整细胞钠电流对比; (b) 980 nm 激光辐照实验结果, 图中读数为: Control: -0.81 nA, Laser: -0.88 nA, 虚线所示是将图 5 中温度耗散曲线的起始阶段, 以便与钠电流的时程画到一起来对比温度的变化, 从图中可见 980 nm 激光作用后, 钠离子通道开启的 (0—6 ms) 时间内, 温度从 2.7°C 下降到 2.4°C ; (c) 845 nm 激光辐照结果, 图中读数为: Control: -0.92 nA, Laser: -0.93 nA. 虚线所示是将图 5 中温度耗散曲线的起始阶段, 从图中可见 845 nm 激光作用后, 钠离子通道开启的 (0—6 ms) 时间内, 温度从 0.20°C 下降到 0.17°C

活性得到了加强,即激光辐照还增强了钠电流的时间动力学特性.实验结果表明使用低功率的近红外激光辐照能够产生足够的热来增加钠离子通道的活性.

4 讨论

温升建立阶段:对比图 4(c) 中 980 nm 激光作用下,实验测量的温升 2.5 °C 和图 2(a) 低于理论计算所得的 2.7 °C,存在 0.2 °C 的差异,这主要存在两方面的原因:

第一个原因是在我们理论计算过程中没有考虑热透镜效应^[30] (thermal lens effect).热透镜效应是指当光通过吸收介质时在光传输路径上形成的介质折射率的改变,从而改变光的传输方向.介质在光传输路径上吸收能量诱导局部的温升,使其温度分布协同与光强度分布,这造成相应的局部密度改变,进而折射率发生变化.比如水介质,其折射率随着温度的升高而减小,也就是说,光强度最高的地方,折射率减小的最多.这样,在吸收介质中形成了类似凹透镜的作用,真实的光线发散角会比单纯根据数值孔径计算的发散角如图 1(b) 所示的 $\beta \approx 6.04^\circ$ 大.另一原因源于实验.我们的设计方案是测量激光辐照下沿轴向 Z 子午光线的温升,实验测量过程中可能会偏离光纤芯径中心,而实际测量了如图 4(a) 中 Z' 的方向,这样会造成实验测量的温升低于理论计算结果.但理论和实验结果都满足选择的双波长激光在溶液中的吸收系数之比,而且理论计算和空电极实验结果符合得较好.

温升耗散阶段:对于电生理记录,500 ms 双波长激光辐照后,钠电流的幅值由于激光诱导温升的影响得到了增加.结果表明使用低功率的连续近红外激光辐照可以产生足够的热来增强钠通道的活性.但是,对比图 6(b) 和 (c),发现使用 980 nm 激光辐照前后钠电流的峰值变化为 $\Delta I_{980} \approx -0.07$ nA,845 nm 激光辐照前后钠电流的峰值变化为 $\Delta I_{845} \approx -0.01$ nA,980 nm 激光辐照后变化明显高于 845 nm 激光辐照后.根据实验结果,峰值电流变化之比为 $\Delta I_{980}/\Delta I_{845} \approx 7.0$,实验结果低于 (6) 式理论计算所得的 $\Delta I_{Na980}/\Delta I_{Na845} \approx 10.0$.这个偏差主要由于以下几个原因:

1) 温度梯度:在激光辐照过程中形成的是局部的温度梯度场,钠电流的 HH 模型描述是恒温下的膜电流曲线,会有一定误差.但是基于对钠离子通

道开放期间温度场的下降情形的描述,如图 6 标题中:980 nm 激光作用后,钠离子通道开启的 (0—6 ms) 时间内,温度从 2.7 °C 下降到 2.4 °C;而 845 nm 激光作用后,温度从 0.20 °C 下降到 0.17 °C.这样小的温度变化应该不是这一问题的主要矛盾.

2) Soret 效应^[31]:局部的钠离子浓度 C_i 和 C_o 会随着局部温升改变而改变,500 ms 时程的激光辐照,会引起明显的溶液浓度变化.而能斯特 (Nernst) 方程是适用于均匀离子浓度条件.在讨论过程中认为激光辐照中溶液离子浓度不发生改变,实际上由于这种 Soret 效应而造成的空间浓度分布改变,会使能斯特方程的偏离实验测量结果,是一个主要原因.

3) 钠通道蛋白的温度特性:用来描述钠离子通道动力学激活特性的 m- 门 (activation) 和失活 h- 门 (inactivation) 也都是温度依赖的.实验中得出电压依赖钠通道的温度特性满足 $Q_{10} \approx 2-4$ (Q_{10} 是指 10 °C 的温度改变与其响应速率的关系满足: $Q_{10} = (X_2/X_1)^{10/(T_2-T_1)}$,其中 X_1 和 X_2 分别为温度 T_1 和 T_2 对应的某一参量),它取决于溶液温度的变化值,主要影响通道的开放概率.我们在结果讨论中近似认为这些参量都是常数,这会使实验结果和理论有所偏差.本文没有详细讨论这些方面对实验结果的影响,这将作为下一步研究的方向.

5 结论

本文基于双波长的方法,从理论和实验两方面,证明了细胞外溶液对近红外激光的光热响应取决于溶液对激光的吸收特性.理论模型主要是利用长时程 (辐照时间长于介质的热弛豫) 激光辐照过程中温升的建立和耗散,可以很好的描述该过程中的光热效应.在温升建立阶段,理论模型与空电极实验测量结果符合得很好;在耗散阶段,HH 理论模型近似计算所得结果 ($\Delta I_{Na980}/\Delta I_{Na845} \approx 10.0$) 与神经元细胞钠通道电流的实测结果 ($\Delta I_{980}/\Delta I_{845} \approx 7.0$) 存在一定偏差,但其基本变化趋势是一致的.这里根据其差异给出了其中可能存在的原因,详细讨论将在后续工作中深入探讨,包括温度梯度改变是如何改变离子通道电流,如何影响离子浓度分布和电压依赖钠通道的温度特性等.

综上所述,基于双波长的方法可以证明,生物组织中的溶液是产生光热响应的主要介质,其温度

改变在激光与生物组织相互作用中以热能的形式起主导作用. 本文从理论和实验两方面证明了光能

通过细胞外溶液转换成热能, 再通过热传导进一步调节靶细胞的电生理功能.

- [1] Welch A J, Martin J C van Gemert 2011 *Optical Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue* (Springer), 2nd Edition
- [2] Liu Y, Liu X J, Qi B B 2011 *Acta Phys. Sin.* **60** 074204 (in Chinese) [刘迎, 刘小君, 齐贝贝 2011 物理学报 **60** 074204]
- [3] Deng Y, Igor M 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 1396 (in Chinese) [邓勇, Igor Meglinski 2010 物理学报 **59** 1396]
- [4] Jacques S L 1992 *Surg. Clin. North Am.* **72** 531
- [5] Vogel A, Venugopalan V 2003 *Chem. Rev.* **103** 577
- [6] Lapotko D, Tat'yana R, Zharov V 2002 *J. Biomed. Opt.* **7** 425
- [7] Yang S H, Yin G Z 2008 *Acta Phys. Sin.* **58** 4760 (in Chinese) [杨思华, 阴广志 2008 物理学报 **58** 4760]
- [8] Lapotko D, Shnip A, Lukianova E 2005 *J. Biomed. Opt.* **10** 014006
- [9] Wells J, Kao C, Mariappan K 2005 *Opt. Lett.* **30** 504
- [10] Hirase H, Nikolenko V, Goldberg J 2002 *J. Neurobiol.* **51** 237
- [11] Wells J, Kao C, Konrad P 2007 *Biophys. J.* **93** 2567
- [12] Qiao X Y, Li G, Dong Y E 2008 *Acta Phys. Sin.* **57** 1259 (in Chinese) [乔晓艳, 李刚, 董有尔 2008 物理学报 **57** 1259]
- [13] Qiao X Y, Li G, Lin L 2007 *Acta Phys. Sin.* **56** 2448 (in Chinese) [乔晓艳, 李刚, 林凌 2007 物理学报 **56** 2448]
- [14] Chu Q J, Yin H W, Weng Y X 2007 *Chin. Phys.* **16** 3052
- [15] Wells J, Konrad P, Kao C 2007 *J. Neurosci. Meth.* **163** 326
- [16] Li W, Stuurman N, Ou G S 2012 *Neurosci. Bull.* **28** 333
- [17] Shapiro M G, Homma K, Villarreal S 2012 *Nat. Commun.* **3** 1
- [18] Wieliczka M, Weng S, Querry R 1989 *Appl. Opt.* **28** 1714
- [19] Palmer K F, Williams D 1974 *J. Opt. Soc. Am.* **64** 1107
- [20] Martin G, Gerald L, Welch A 1996 *Phys. Med. Biol.* **41** 1381
- [21] Guan K W, Jiang Y Q, Sun C S 2011 *Opt. Laser Technol.* **43** 425
- [22] Bao M F, Qian Z Y, Li W T 2011 *Acta Opt. Sin.* **40** 718 (in Chinese) [包美芳, 钱志余, 李韪韬 2011 光子学报 **40** 718]
- [23] Zhou J W, Xu X, Yin Z Q 2005 *Chin. J. Lasers* **32** 139 (in Chinese) [周静伟, 徐旭, 尹招琴 2005 中国激光 **32** 139]
- [24] Choi B, Welch A J 2001 *Lasers Surg. Med.* **29** 351
- [25] Yao J, Liu B, Qin F 2009 *Biophys. J.* **96** 3611
- [26] Liang S S, Yang F, Zhou C 2009 *Cell Biochem. Biophys.* **53** 33
- [27] Xu T, Zhang C P, Chen G Y 2005 *Chin. Phys.* **14** 1813
- [28] Kuyucak S, Chung S H 1994 *Biophys. Chem.* **52** 15
- [29] Hodgkin A, Huxley A 1952 *J. Physiol.* **117** 500
- [30] Abbate G, Bernini U, Ragozzino E 1978 *J. Phys. D: Appl. Phys.* **11** 1167
- [31] Jean K P 2006 *J. Appl. Mech.* **73** 5

Photothermal response of extracellular solution to the near-infrared laser irradiation determined by its optical absorption properties*

Guan Kui-Wen Li Xin-Yu Liu Jia Sun Chang-Sen[†]

(Lab of Biomedical Optics, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China)

(Received 22 September 2012; revised manuscript received 18 October 2012)

Abstract

Photothermal effect has been proved to mediate the interaction of near-infrared laser with biological tissue. However, the generation and transformation mechanism of the photothermal effect is still unclear. In this paper, we combine a patch clamp technique with the laser simulation to figure out the chromophores, which are responsible for the photothermal effect generation. This method is based on the fact that temperature dependence of solution can be measured as resistance changes. A dual-wavelength infrared light irradiating the open pipette in extracellular solution is designed to study the relation between the photothermal effect and the absorption property of solution. The principle is based on that the nearly ten times difference in the magnitude of the optical absorption coefficient in water (0.502 cm^{-1} at 980 nm and 0.0378 cm^{-1} at 845 nm), makes the corresponding proportional absorption-driven temperature rise. The photothermal effect in laser-tissue interaction can be assessed in two stages: the establishment and the dissipation of the temperature rise. In the establishment stage, an open pipette method is employed to measure the temperature rise by fabricating a glass pipette which is filled with electrolyte solution. In the dissipation stage, the electrophysiological function of a living neuron cell is studied based on a patch clamp. Theoretical calculation and experimental results show that the optical absorption properties of solution determine the photothermal effect. The results can be used to study the photothermal effect in laser-tissue interaction.

Keywords: photothermal response, dual-wavelength method, near-infrared laser interaction with biological tissue, open pipette method

PACS: 87.50.W-, 87.19.Pp, 65.20.-w, 87.50.Wf

DOI: 10.7498/aps.62.058702

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 30870582, 31070757).

[†] Corresponding author. E-mail: suncs@dlut.edu.cn