

[文章编号] 1674-8115(2011)07-0918-04

· 论 著 ·

## 飞秒激光切割大鼠膀胱上皮组织的体外实验

潘玉龙, 陈 方, 康 健, 梁军号

(上海交通大学 医学院附属新华医院泌尿外科, 上海 200092)

[摘要] **目的** 观察飞秒激光切割大鼠膀胱上皮组织的效率和副损伤范围。**方法** 采用不同功率(1倍、2倍、5倍、10倍和20倍阈值功率)和等效频率的飞秒激光切割SD大鼠膀胱上皮组织,切割后组织制作HE染色切片,光学显微镜下观察飞秒激光切割膀胱上皮组织的深度和副损伤范围,计算切割效率。**结果** 当飞秒激光功率为5~20倍阈值功率、等效频率为62.5~1 000 Hz时,对SD大鼠膀胱上皮组织的切割效率为10~120  $\mu\text{m}/\text{s}$ ,副损伤范围为10~100  $\mu\text{m}$ 。**结论** 飞秒激光可精细切割大鼠膀胱上皮组织,且副损伤范围小,是治疗尿路狭窄的潜在替代工具。

[关键词] 飞秒激光;等离子介导切割;尿路狭窄;腔内泌尿外科

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.07.011

[中国分类号] R693.2; R695

[文献标志码] A

### *In vitro* study of ablation of rat bladder epithelial tissues by femtosecond laser

PAN Yu-long, CHEN Fang, KANAG Jian, LIANG Jun-hao

(Department of Urology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

[Abstract] **Objective** To observe the efficiency and range of collateral tissue damage in ablation of rat bladder epithelial tissues by femtosecond laser. **Methods** Bladder epithelial tissues of SD rats were ablated by femtosecond laser with different working powers (1, 2, 5, 10 and 20 times of threshold power and equivalent frequencies). Sections with HE staining were prepared for the ablated tissues. The depth and range of collateral tissue damage of bladder epithelial tissues ablated by femtosecond laser were observed by light microscopy, and the ablation efficiency was calculated. **Results** When the working powers of femtosecond laser were 5 to 20 times of threshold power and the equivalent frequencies were 62.5 Hz to 1 000 Hz, the ablation efficiency varied from 10 to 120  $\mu\text{m}/\text{s}$  and the collateral tissue damage ranged from 10 to 100  $\mu\text{m}$ . **Conclusion** Femtosecond laser can precisely ablate the rat bladder epithelial tissues with minimal range of collateral tissue damage, and may be a potential alternative for treatment of urinary stricture.

[Key words] femtosecond laser; plasma-mediated tissue ablation; urinary stricture; endourology

尿路狭窄包括上尿路狭窄(输尿管狭窄)、下尿路狭窄(尿道狭窄)及各种吻合口狭窄(肾移植吻合口狭窄和输尿管肠吻合口狭窄等)。尿路狭窄主要由医源性损伤引起,如尿路内镜手术、前列腺手术、输尿管周围脏器手术误伤等<sup>[1,2]</sup>。尿路狭窄可导致尿路感染、肾盂积水等,进而导致肾功能衰竭。

目前有多种微创技术治疗尿路狭窄,包括球囊扩张术和尿路内切开技术<sup>[3,4]</sup>,后者根据切开工具又分为冷刀、电刀、激光内切开技术。这些技术治疗尿路狭窄均未能取得满意的结果,通常需多次重复扩张或内切开狭窄,即“狭窄—治疗—再狭窄—再治疗”的过程,且治疗效果通常越来越差,最终需行开

放手术(其总体效果同样不理想)或永久造瘘<sup>[2-7]</sup>。研究<sup>[2]</sup>表明:对于复杂性尿路狭窄,多次扩张或内切开并不能使患者受益,反而可导致患者出现顽固性的瘢痕增生和继发性的排尿障碍以及尿失禁等并发症。动物实验<sup>[8,9]</sup>表明:切割工具产生的热量或机械能量均可造成毗邻切开部位组织的损伤(即副损伤),从而刺激组织瘢痕增生形成狭窄。因此,提高微创手术治疗效果的关键在于寻找一种新的软组织切割工具,其在切割时对毗邻组织的副损伤应尽可能小,最理想的状况是“零副损伤”。

超短脉冲激光为一种新型激光,其脉冲时长通常为10~100 fs(1 fs =  $10^{-15}$  s),飞秒激光是超短脉

[基金项目] 国家自然科学基金(30801154/c160606)(National Natural Science Foundation of China, 30801154/c160606)。

[作者简介] 潘玉龙(1984—),男,住院医师,硕士生;电子信箱: yulong112358@163.com。

[通信作者] 陈 方,电子信箱: chenfang007@hotmail.com。

冲激光的一种;而钛激光、Q 开关脉冲激光等传统激光脉冲时长一般为几微秒至几百微秒( $1\ \mu\text{s} = 10^{-6}\ \text{s}$ )。超短脉冲激光对组织的作用原理是将被照射组织电离形成“等离子体”(即气化),因此也将其作用方式称为“等离子介导切割”<sup>[10]</sup>。脉冲时长越短,形成等离子体所需的绝对能量(阈值)就越小;汽化组织的能量越小,传导至周围组织的能量(无论是热量还是机械能量)也都越少。因此,超短脉冲激光切割组织对周围组织的损伤远小于长脉冲激光。目前超短脉冲激光已用于多个学科的临床实践或前期实验研究<sup>[11,12]</sup>,包括眼科、皮肤科、口腔科和神经外科等,以满足临床对组织精细切割的需求。本研究观察空气中飞秒激光对大鼠膀胱上皮组织的切割效果,探讨飞秒激光应用于尿路狭窄治疗的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

75 只健康 SD 大鼠,雌雄不限,体质量 200 ~ 250 g,由上海交通大学医学院附属新华医院动物房提供;动物生产许可证号码:SCXK(沪)2008-0016,动物使用许可证号码:SYXK(沪)2008-0052。

### 1.2 方法

**1.2.1 飞秒激光系统及参数设置** 因工程技术原因,目前未能制造出适合飞秒激光传播的光纤,因此本研究参照目前临床飞秒激光的运用方式使用一组透镜将飞秒激光束聚焦于大鼠膀胱上皮组织标本表面<sup>[13,14]</sup>。由啁啾脉冲放大系统(Coherent Inc.)产生脉冲时长约 60 fs、重复频率为 250 000 Hz、中心波长为 800 nm、最大输出功率约 1.5 W 的飞秒激光,使用可变能量密度滤镜调节激光功率为 0 ~ 140 mW,激光束通过显微镜的 10 倍物镜(数值孔径 = 0.3, Olympus)聚焦于大鼠膀胱上皮组织表面,由计算机控制 XYZ 三向载物台(Prior Scientific)水平匀速移动组织标本,通过不同的移动速度获取等效激光脉冲频率。标本移动速度(V)由光学公式推导计算: $V = f/f_1 \times \varphi$ ,其中 f 为飞秒激光频率,  $f_1$  为等效频率,  $\varphi$  为激光束通过物镜聚焦后在焦点平面的光斑直径;  $\varphi = 1.22 \times \lambda / \text{NA}$ ,其中  $\lambda$  为飞秒激光波长,1.22 为零阶贝塞尔函数的第 1 个零点值,NA 为 10 倍物镜的数值孔径。标本移动速度与等效频率对照见表 1。

**1.2.2 大鼠膀胱上皮组织标本制备** 以 3% 戊巴比妥钠溶液经腹腔注射麻醉大鼠,取出膀胱组织,纵向剖开膀胱,0.9% 生理盐水冲洗组织表面血迹并分离脂肪组织,立即置 0 ℃ 生理盐水中保存待用。使用

时将组织固定于两块透明塑胶玻片间,使组织表面尽可能平整,聚焦后的飞秒激光束通过钻有直径为 0.8 cm 小孔的塑胶玻片作用于膀胱组织黏膜面。由载物台作水平匀速移动,使激光在标本表面切割出一道深度均匀、长度为 2 mm 的沟槽。

表 1 标本移动速度与等效频率对照

Tab 1 Contrast of moving speed and equivalent frequencies

移动速度/( $\mu\text{m/s}$ )	等效频率/Hz
800	1 000
1 600	500
3 200	250
6 400	125
12 800	62.5

**1.2.3 空气中组织切割实验** 激光与尿路组织相互作用的阈值功率指能产生等离子体的最小功率。将飞秒激光通过 10 倍物镜聚焦于制备的膀胱组织,从低功率开始逐渐增加功率,直至在组织表面看到耀眼的白色光斑并闻及爆破声音,测量此时激光的功率,重复 10 次操作取均值即得飞秒激光与尿路组织作用的阈值功率。将制备的膀胱组织置于空气中进行飞秒激光切割。调整激光参数,分别设定激光功率为阈值功率的 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍和 20 倍,结合表 1 中各等效频率和移动速度,两两组合分别进行组织切割,每组激光参数分别切割 3 个标本,每个标本切割 3 道沟槽,保证每个标本在制作成 HE 染色切片时均能观察到切割痕迹。

**1.2.4 切割效率和副损伤范围检测** 切割完毕的标本立即用 10% 甲醛溶液固定,制作 HE 染色切片,观察不同功率和等效频率飞秒激光的切割深度和副损伤范围。在使用同一组激光参数的所有标本中选取切割深度和副损伤范围最大的 5 张切片,取其均值作为该组激光参数的切割深度和副损伤范围,计算切割效率(切割效率 = 切割深度/切割时间)。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结 果

### 2.1 阈值功率

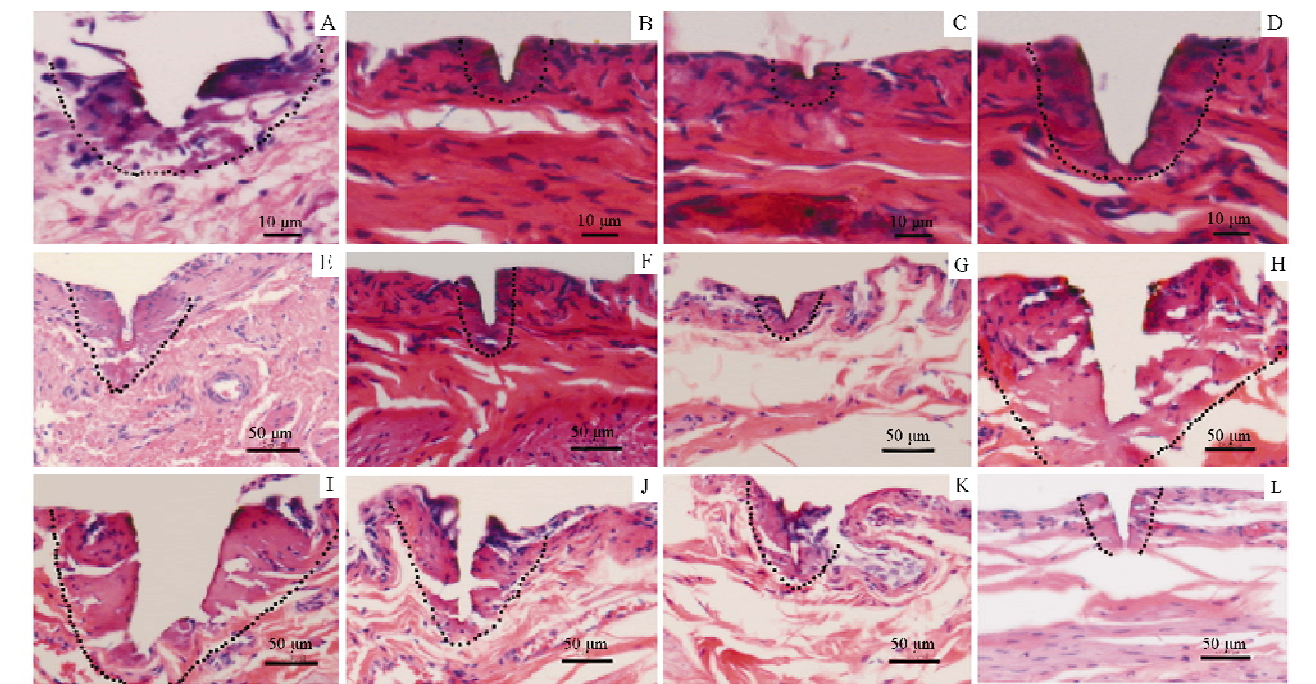
空气中飞秒激光经数值孔径为 0.3 的 10 倍物镜聚焦,作用于大鼠膀胱上皮组织的阈值功率为  $(7.0 \pm 0.3)\ \text{mW}$ 。

### 2.2 切割效率和副损伤范围

当飞秒激光功率为 7 mW 和 14 mW 时,光学显

显微镜可即时观察到飞秒激光与膀胱上皮组织的相互作用,但切割效果轻微,无法识别切割痕迹。图 1 为不同功率(35、70、140 mW)和等效频率飞秒激光对膀胱上皮组织的切割痕迹,切口表面距底部垂直深度为激光切割深度;切口周边组织凝固坏死区域胞质深染,胞核形变,为激光所致副损伤区域。表 2、3

分别为不同功率(35、70、140 mW)和等效频率飞秒激光对膀胱上皮组织的切割深度和副损伤范围,功率越大,切割深度和副损伤范围也越大。当飞秒激光功率为 35 ~ 140 mW(5 ~ 20 倍阈值功率),等效频率为 62.5 ~ 1 000 Hz 时,对膀胱上皮组织的切割效率为 10 ~ 120  $\mu\text{m}/\text{s}$ ,副损伤范围为 10 ~ 100  $\mu\text{m}$ 。



A. 35 mW, 1 000 Hz; B. 35 mW, 500 Hz; C. 35 mW, 250 Hz; D. 70 mW, 1 000 Hz; E. 70 mW, 500 Hz; F. 70 mW, 250 Hz; G. 70 mW, 125 Hz; H. 140 mW, 1 000 Hz; I. 140 mW, 500 Hz; J. 140 mW, 250 Hz; K. 140 mW, 125 Hz; L. 140 mW, 62.5 Hz。切口表面距底部垂直深度为激光切割深度,虚线界限为激光切割所致副损伤区域。

图 1 不同功率和等效频率飞秒激光对膀胱上皮组织的切割痕迹

Fig 1 Ablation traces on bladder epithelial tissues by femtosecond laser with different working powers and equivalent frequencies

表 2 不同功率和等效频率飞秒激光对膀胱上皮组织的切割深度( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$ )

Tab 2 Ablation depth on bladder epithelial tissues by femtosecond laser with different working powers and equivalent frequencies ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$ )

功率	1 000 Hz	500 Hz	250 Hz	125 Hz	62.5 Hz
35 mW	41.49 $\pm$ 1.32	19.85 $\pm$ 1.08	8.16 $\pm$ 0.29	—	—
70 mW	56.74 $\pm$ 1.97	44.72 $\pm$ 2.37	42.24 $\pm$ 2.46	22.02 $\pm$ 0.76	—
140 mW	126.95 $\pm$ 4.59	120.07 $\pm$ 4.95	99.27 $\pm$ 3.98	53.90 $\pm$ 1.47	36.88 $\pm$ 2.96

表 3 不同功率和等效频率飞秒激光切割膀胱上皮组织的副损伤范围( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$ )

Tab 3 Range of collateral tissue damage on bladder epithelial tissues ablated by femtosecond laser with different working powers and equivalent frequencies ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$ )

功率	1 000 Hz	500 Hz	250 Hz	125 Hz	62.5 Hz
35 mW	38.65 $\pm$ 1.76	15.25 $\pm$ 0.41	6.38 $\pm$ 0.39	—	—
70 mW	35.21 $\pm$ 1.52	25.18 $\pm$ 1.73	17.69 $\pm$ 1.15	17.33 $\pm$ 0.58	—
140 mW	95.70 $\pm$ 4.01	72.70 $\pm$ 3.12	56.93 $\pm$ 3.17	26.95 $\pm$ 0.84	18.79 $\pm$ 0.65

### 3 讨论

飞秒激光与组织作用的原理<sup>[10]</sup>是通过光致破裂作用(photodisruption)将被照射组织电离形成“等离

子体”,等离子体又称为电浆,是由部分电子被剥夺后的原子及原子被电离后产生的正负电子组成的离子化气体状物质。等离子体之间相互作用转化为常态分子将释放能量形成冲击波以及气体,因此也将

其作用机制称为“等离子介导切割”<sup>[10]</sup>。阈值功率是等离子体形成的最小功率,是飞秒激光与具体组织间相互作用的基本研究参数。本研究测量结果为粗略估测所得,精确测量需声光探测仪在切割部位探测由飞秒激光与组织相作用时所产生的冲击波以及等离子与周围空气相互作用发出的光得到,由于缺乏此类设备且粗略测量对本研究不会造成无法弥补的影响,故采用粗略方法进行测量。在本研究中,通过多次实验取平均值获得飞秒激光的阈值功率。

腔内泌尿外科文献<sup>[2-7]</sup>中各种方法治疗尿路狭窄的成功率为20%~80%。该结果取决于一系列因素,包括手术技巧、尿路狭窄类型、既往治疗失败形成瘢痕组织、患者随访和评估、狭窄的定义等。虽然目前钬激光对尿路狭窄的治疗已取得明显进步,但可以推测,通过飞秒激光独特的“等离子介导切割”作用机制将进一步减少因手术所造成的毗邻组织副损伤,从而使狭窄的治疗成功率进一步提高。本研究中,使用飞秒激光在空气中进行组织切割实验时,副损伤范围为10~100  $\mu\text{m}$ ,而目前钬激光在人体以及动物(猪、兔)软组织上产生的副损伤范围为300~400  $\mu\text{m}$ <sup>[8,9,15-17]</sup>,结合飞秒激光在人体其他组织(脑组织,皮肤,角膜)的运用情况<sup>[11,12]</sup>,可以预见,飞秒激光运用于人体尿路组织的副损伤范围将小于钬激光所产生的副损伤范围。

当飞秒激光功率稍大于阈值功率时(1~2倍阈值功率),能通过显微镜即时观察到飞秒激光与组织的相互作用,但由于该作用较为微弱,所形成的切割效果很轻微,在HE染色切片上不能使用光学显微镜识别切割产生的痕迹。当飞秒激光功率为5~20倍阈值功率时,功率越高,切割作用越明显,切割效率为10~120  $\mu\text{m}/\text{s}$ ,该切割效率可满足腔镜手术治疗尿路狭窄的需要。本研究同时观察到,当切割功率相同时,等效频率越高(即移动速度越慢,能量越高),则切割作用越明显,副损伤范围也越大。在低能量时,飞秒激光切割痕迹边缘锐利、整齐,可能是因为低能量时产生等离子体少,机械损伤作用小,组织破损也较小;而当高能量时,切割痕迹不规则,副损伤范围内组织有破碎、撕裂作用,其可能是因为高能量时飞秒激光气化组织产生大量等离子体,等离子体在转化为分子的过程中释放大量能量,产生爆破冲击波、大量气体以及相应的热效应,从而导致组织破损、撕裂等机械损伤。但总体而言,飞秒激光的副损伤范围仍相对小于钬激光;因此,在不影响手术时间的情况下,为控制副损伤范围,应尽量考虑选择

低能量的激光参数设置。

在手术切割过程中将不可避免地损伤切割区域的血管,但当飞秒激光所致副损伤范围小于这些血管的直径时,可以预见术中出血不止,即飞秒激光没有电刀或钬激光等工具所具有的止血作用,届时手术部位的出血将干扰手术视野。处理该情况的可能办法为组合运用具有止血作用的激光,如Ho:YAG激光。

由于泌尿外科腔镜手术于冲洗液环境中进行,而目前飞秒激光的临床运用环境均为空气中<sup>[11,12]</sup>,因此需进一步研究飞秒激光在溶液环境中的传播特性及溶液环境对其作用机制的影响,并尝试进行活体动物实验。

## [参考文献]

- [1] Richter F, Irwin RJ, Watson RA, et al. Endourologic management of benign ureteral strictures with and without compromised vascular supply[J]. Urology, 2000, 55(5): 652-657.
- [2] Milhoua PM, Miller NL, Cookson MS, et al. Primary endoscopic management versus open revision of ureteroenteric anastomotic strictures after urinary diversion-single institution contemporary series[J]. J Endourol, 2009, 23(3): 551-555.
- [3] Razdan S, Silberstein IK, Bagley DH. Ureteroscopic endoureterotomy[J]. BJU Int, 2005, 95(Suppl 2): S94-S101.
- [4] Gerber GS, Kim JC. Ureteroscopic endopyelotomy in the treatment of patients with ureteropelvic junction obstruction[J]. Urology, 2000, 55(2): 198-202.
- [5] Dogra PN, Nabi G. Core-through urethrotomy using the neodymium: YAG laser for obliterative urethral strictures after traumatic urethral disruption and/or distraction defects: long-term outcome[J]. J Urol, 2002, 167(2 Pt 1): 543-546.
- [6] Nabi G, Dogra PN. Endoscopic management of post-traumatic prostatic and supraprostatic strictures using Neodymium-YAG laser[J]. Int J Urol, 2002, 9(12): 710-714.
- [7] Heyns CF, Steenkamp JW, De Kock ML, et al. Treatment of male urethral strictures: is repeated dilation or internal urethrotomy useful? [J] J Urol, 1998, 160(2): 356-358.
- [8] Anidjar M, Mongiat-Artus P, Broulard JP, et al. Thermal radiofrequency induced porcine ureteral stricture: a convenient endourologic model[J]. J Urol, 1999, 161(1): 298-303.
- [9] Meria P, Anidjar M, Broulard JP, et al. An experimental model of bulbar urethral stricture in rabbits using endoscopic radiofrequency coagulation[J]. Urology, 1999, 53(5): 1054-1057.
- [10] Holger L, Alexander H, Fabian W, et al. Ultrafast laser pulses for medical applications[J]. Proc SPIE, 2002, 4633: 38-49.
- [11] Friedlaender MH. LASIK surgery using the IntraLase femtosecond laser[J]. Int Ophthalmol Clin, 2006, 46(3): 145-153.
- [12] Chung SH, Mazur E. Surgical applications of femtosecond lasers[J]. J Biophotonics, 2009, 2(10): 557-572.

(下转第947页)

- [11] 高峰,李艳,刘巍,等. 急性髓性白血病 E-cadherin 基因表达和 CpG 岛甲基化状态的研究[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(1): 25 - 27.
- [12] Canalli AA, Yang H, Jeha S, et al. Aberrant DNA methylation of a cell cycle regulatory pathway composed of P73, P15 and P57KIP2 is a rare event in children with acute lymphocytic leukemia[J]. Leuk Res, 2005, 29(8): 881 - 885.
- [13] Kim M, Yim SH, Cho NS, et al. Homozygous deletion of CDKN2A (p16, p14) and CDKN2B (p15) genes is a poor prognostic factor in adult but not in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a comparative deletion and hypermethylation study [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2009, 195(1): 59 - 65.
- [14] Benites BD, Fattori A, Hackel G, et al. Low expression of APAF-1XL in acute myeloid leukemia may be associated with the failure of remission induction therapy [J]. Braz J Med Biol Res, 2008, 41(7): 571 - 578.
- [15] Hoshino K, Quintas-Cardama A, Yang H, et al. Aberrant DNA methylation of the Src kinase Hek, but not of Lyn, in Philadelphia chromosome negative acute lymphocytic leukemia[J]. Leukemia, 2007, 21(5): 906 - 911.
- [16] San JE, Agirre X, Roman-Gomez J, et al. Downregulation of DBC1 expression in acute lymphoblastic leukaemia is mediated by aberrant methylation of its promoter[J]. Br J Haematol, 2006, 134(2): 137 - 144.
- [17] Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world[J]. Cancer Sci, 2005, 96(11): 729 - 737.
- [18] Merlo P, Fulco M, Costanzo A, et al. A role of p73 in mitotic exit [J]. J Biol Chem, 2005, 280(34): 30354 - 30360.
- [19] Liu ML, Taketani T, Li R, et al. Loss of p73 gene expression in lymphoid leukemia cell lines is associated with hypermethylation [J]. Leuk Res, 2001, 25(6): 441 - 447.
- [20] Pluta A, Nyman U, Joseph B, et al. The role of p73 in hematological malignancies[J]. Leukemia, 2006, 20(5): 757 - 766.
- [21] 刘壮,张义堂,吴香苓,等. P73 基因在儿童急性淋巴细胞白血病的表达[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(5): 410 - 413.
- [22] 刘明利,李蓉生,林泰秀,等. 儿童急性淋巴细胞白血病患者 p73 基因异常表达的研究[J]. 中华血液学杂志, 2002, 23(5): 239 - 242.
- [23] Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL, et al. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(7): 2217 - 2224.
- [24] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2004, 104(8): 2492 - 2498.

[收稿日期] 2011-01-11

[本文编辑] 周珠凤

(上接第 921 页)

- [13] David MB, Ilev IK, Waynant RW, et al. Pulse dispersion in hollow optical waveguides[J]. Opt Eng, 2005, 44(9): 095001.
- [14] Yoshihiro H, Minoru O, Akihito H. Ablation processing of biomedical materials with femtosecond double-pulse lasers through hollow fibers[J]. Proc SPIE, 2005, 5714: 283 - 289.
- [15] Fried NM, Tesfaye Z, Ong AM, et al. Optimization of the Erbium: YAG laser for precise incision of ureteral and urethral tissues: *in vitro* and *in vivo* results[J]. Lasers Surg Med, 2003, 33(2): 108 - 114.
- [16] Gnessin E, Yossepowitch O, Holland R, et al. Holmium laser endoureterotomy for benign ureteral stricture: a single center experience[J]. J Urol, 2009, 182(6): 2775 - 2779.
- [17] Hibi H, Ohori T, Taki T, et al. Long-term results of endoureterotomy using a holmium laser[J]. Int J Urol, 2007, 14(9): 872 - 874.

[收稿日期] 2011-02-21

[本文编辑] 刘晓华