

飞秒激光与生物组织作用原理及其应用

王亚伟¹, 刘莹², 卜敏¹, 王立峰²

(1. 江苏大学理学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学机械学院, 江苏 镇江 212013)

摘要:飞秒激光由于其超快时间特性和极高的峰值功率特性在生物医学领域有着诱人的优势和广阔的发展前景。文章综述了飞秒激光与生物材料作用的原理,介绍了飞秒激光在生物医学方面的各种应用及发展动态。

关键词:飞秒激光;生物医学;生物组织

中图分类号:TN249;R454.2 **文献标识码:**A

Mechanisms of Femtosecond Laser Interaction with Biological Tissues and its Applications

WANG Ya-wei¹, LIU Ying², BU Min¹, WANG Li-feng²

(1. Faculty of Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. School of Mechanical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Femtosecond laser has attractive advantages and broad prospects for development due to its ultra-short time scale and ultra-high peak power density characteristics. In this paper, we review the working mechanisms of femtosecond laser interaction with biological tissues and introduce the recent applications of femtosecond laser in biomedicine field. Finally, the prospect of femtosecond laser technology is discussed.

Key words: femtosecond laser; biomedicine; biological tissue

1 引言

随着激光器的不断改进,激光在生物医学领域中的应用越来越广泛,尤其是飞秒激光的产生,为生物医学的发展揭开了新的篇章。飞秒激光与生物材料作用过程中显示出了很大的优势,有着非常高的精确度和非常小的副作用,飞秒激光具有脉冲宽度窄(几个到上百个飞秒),峰值功率高(最高可达到拍瓦量级)的特性,飞秒激光经过聚焦后可在焦点处达到 10^{20} W/cm^2 的峰值功率,相应的电场远远强于原子内库仑场,如此高的功率密度足以使任何材料发生电离。单个飞秒激光脉冲的蚀除深度达到 $0.01 \sim 1 \mu\text{m}$,因此飞秒激光蚀除能够达到非常高的精确度。在飞秒量级热传导过程可以忽略,所以飞秒脉冲作用过程中热损伤和热影响区域大大减

少了。

鉴于上述飞秒激光与生物组织作用的优势,飞秒激光在细胞和亚细胞水平手术上有着广泛应用。Wataru Watanabe^[1]等人用近红外飞秒激光辅助标定和追踪单个细胞,揭示了细胞器官动力学原理。Yuqiang Jiang^[2]等人利用飞秒激光非线性效应产生的机械力对溶液里的微粒($90 \mu\text{m}$)进行非接触式捕获和操纵,对微粒没有破坏,与传统光镊相比,这种方法不仅提供了更大的捕获力,而且对微粒没有损害。飞秒激光可用来精确地切割细胞和组织里的部分结构,还可用来分离脑血管^[3],为各种脑血管紊

作者简介:王亚伟(1957-),男,教授,博士,博士生导师,主要从事激光应用的科学研究工作。E-mail: jczjwzw@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-05-22; **修订日期:**2007-09-17

乱现象提供模型,以便于医学研究。飞秒激光的这些功能使得对生物动力学和生物反应的研究得到空前发展,进而可以对活体内某一特殊结构的功能进行研究。飞秒激光微纳米手术的应用越来越深入广泛,已成为当今科学研究的热点之一。

2 飞秒激光与生物细胞的作用机理

实验中常用两种类型的飞秒激光与生物材料作用,即高重复(80MHz)的脉冲激光和放大的低重复率(1kHz)的脉冲激光^[4],后者单个激光脉冲的能量是前者的10倍左右。不论是低重复率还是高重复率的飞秒激光与生物材料作用,其过程都是通过非线性吸收产生等离子体,从而达到蚀除目的。飞秒激光脉冲通过高数值孔径的显微物镜聚焦到生物材料上,在低辐照度的情况下可以达到精确的激光效应。对于兆赫兹重复率的光蚀除可能是由自由电子诱导产生的化学分解(化学键的破坏)引起的,与热效应或热弹性力无关,而千赫兹低重复率的光蚀除是由热弹性力诱导产生的瞬时气穴引起的^[5]。

飞秒激光与生物材料作用的基本原理是等离子体的产生。由于生物细胞中含水量较高,为了研究方便,科学家在研究飞秒激光与生物细胞作用机理时,以水为研究对象。在水中,击穿阈值离子体的形成过程如图1所示^[5]。

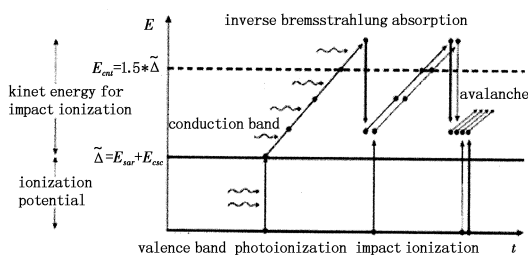


图1 等离子体形成过程示意图

Fig. 1 interplay of photoionization, inverse bremsstrahlung absorption, and impact ionization in the process of plasma formation

等离子体的最初产生是通过光致电离形成的,光致电离包括多光子电离和隧道电离。一旦介质中产生一个自由电子,该电子以逆向轫致辐射的方式吸收光子,通过一系列逆向轫致辐射吸收后,电子动能大到在碰撞电离中足以产生另外一个自由电子。这时就产生了两个低动能的自由电子,它们再以逆向轫致辐射方式获得动能,再与大的粒子(离子或原子核)碰撞,产生四个低动能的自由电子,以此方

式循环下去,导致雪崩电离,该过程如图1所示。对于碰撞电离,碰撞电子的动能必须大于有效电离势能。关于光致电离和雪崩电离哪个占主导作用还存在着不同意见^[6-8]。

3 飞秒激光在生物医学上的应用

3.1 飞秒激光在眼科纳米中的应用

由于飞秒激光脉宽窄,能量低,瞬时功率高,热与机械损伤小,因此在眼科手术中倍受重视。可用于准分子激光原位角膜磨镶术、角膜基质内切割、制作角膜基质环植入的切口等方面。飞秒激光不使用金属刀片,而是靠激光能量对角膜组织内任意位置进行精确切割,完全避免了传统手术交叉感染的可能,因此飞秒激光使得眼科手术变得更安全,而且还能达到更好的治疗效果。近年来,近红外飞秒激光受到科学家的一致青睐,在这个光谱段,生物材料对其基本上不吸收,所以在焦点区域外不会产生附带损害,与此相关的眼科学实验成为亚细胞范围内研究细胞生理学的里程碑。Fs-LASIK技术正在研究人眼屈光不正的矫正,为了矫正屈光不正,必须通过切割掉很小部分角膜改变角膜的表面曲率,从而改变眼睛的折射本领。飞秒激光的出现,使人类第一次在角膜制瓣手术上离开了手术刀,真正实现了全程无刀手术。与传统的金属角膜刀相比,飞秒激光制瓣时,可采用纯平制瓣技术保证瓣的厚度均匀一致,个性化设定角膜瓣的厚度、直径、形状、角膜瓣蒂的位置和蒂的宽度;可以精确地打开眼部组织分子链,制作出更均匀更完美的角膜瓣,有效避免金属角膜刀制瓣时可能出现的医源性像差等并发症,其精密度是金属角膜刀的100倍。飞秒激光在切割角膜瓣时,只是产生一些水和气泡推开角膜组织,而不是像金属刀片一样对角膜进行切割,因此,飞秒激光对组织几乎没有损伤,运用飞秒激光可对同一患处进行多次手术,安全性大大提高,飞秒激光让眼科患者获得更佳的视觉效果。在角膜基质切除术中,飞秒激光与传统PPK手术相比,避免了对角膜上皮的伤害,角膜透明恢复更快^[9]。在角膜内基质环植入术中,飞秒激光可以在确定深度和方向精确打通角膜内环隧道,提高了手术的安全性。

3.2 飞秒激光在细胞纳米手术中的应用

飞秒激光脉冲能够有选择地切除、分解细胞内的细胞器,并且不影响细胞的存活率,这在实验上已

经得到验证。Vikram Kohli^[10]等人将低于 10fs 的脉冲聚焦到细胞上,切割出细胞膜上小至亚微米尺寸的区域,成功蚀除与邻近上皮细胞的链接,所有实验中,手术的进行都没有影响到细胞形态,这个实验证明了飞秒激光在哺乳动物活体细胞上进行手术的可行性。Wataru Watanabe^[11-12]等人分别用重复率为 76MHz 的飞秒激光脉冲和重复率为 1kHz 的再放大飞秒激光脉冲切除了活体人宫颈癌传代细胞内的线粒体,也验证了在活体细胞内可蚀除亚细胞结构的结论,并且不影响到细胞的存活率,实验原理如图 2 所示^[11]。哈佛大学的 Nan Shen^[13]等人用聚焦的 1kHz 重复率,能量低至 2 ~ 5nJ 的飞秒脉冲成功蚀除了细胞内的支架微丝和个别线粒体,没有影响到邻近区域和细胞的存活率,证明了线粒体在结构上具有独立的功能。这项纳米剪刀技术使得非接触式操纵活细胞的部分结构成为可能,分辨率可高达几百纳米。

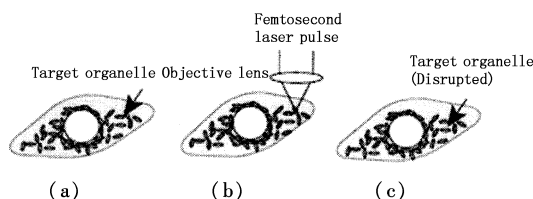


图 2 飞秒激光蚀除细胞内线粒体示意图

Fig. 2 schematic diagram showing the procedure of femtosecond laser photodisruption

连续波细胞手术的分辨率与温度的空间分布有关,飞秒激光与连续波在焦点区域产生的温度的空间分布类似,但是飞秒激光手术的空间分辨率不是由温度的分布决定的,而是由自由电子的分布决定的。在 Vogel^[5]等人的计算中,波长为 800nm 的飞秒激光经过数值孔径为 1.3 的聚焦镜聚焦后在焦点处产生的自由电子分布的径向半宽为 190nm,而脉宽分别为 10 μ s 和 10ms 的脉冲激光作用引起的温度分布半宽分别为 590nm 和 730nm。由此可见,飞秒激光手术的分辨率较连续波或长脉冲提高了好几倍。

飞秒激光手术的一个主要优点是可以精确作用于任意一个局部位置,而连续波或长脉冲激光作用于细胞或组织上时,则需要进行染色,这减少了该技术的一些功能。

3.3 飞秒激光光镊的应用

1986 年,贝尔实验室的 Anhur Ashkin^[14]等人发

现单独一束高度聚焦的激光形成三维稳定的能量阱,可以吸引电介质粒子并将其束缚在光腰中央,光镊(optical tweezers)的概念也就由此产生了,光镊的正式名称为单光束梯度力光阱(single-beam-optical gradient force trap)。他和他的合作者证明了整个细胞和细胞器能用激光捕获。光镊的发明使人们在许多研究中由从前的被动观察转而为主动的操控,由于其具有精确定位、选择个体、可实现对生物活体样品非接触无损伤操纵。

迄今几乎所有应用于生物医学的光镊都是用连续激光作为光源的。近年来,飞秒激光技术的迅速发展和其独特的优势,使得飞秒激光在生物学领域有着诱人的应用前景。Agate^[15]等人用飞秒激光光镊成功捕获带染料的聚合体小球,并研究了其双光子荧光发射特性,第一次将飞秒激光光镊技术与多光子处理方法结合起来,发现单一的光源也可以用来捕获并通过双光子显微得到被捕获的样品的成像,这对于显微仪器多功能性的发展有着重要意义。邢岐荣等人给出了飞秒激光光镊数值模型和理论分析,肯定了飞秒激光光镊的可行性,并用飞秒激光光镊成功捕获了红细胞^[16-17]。若在使用激光光镊的同时,第 2 束激光作为剪刀,则可在细胞器上进行精细的外科手术。激光光镊及剪刀的结合使得生物学家能够成为细胞外科医生,去探测和操纵细胞和细胞器。这将对生物学细胞结构和功能的研究及人类基因组织的破译都有深远的意义。

3.4 飞秒激光显微系统

在进行微纳米手术的同时,离不开显微成像技术的应用。飞秒显微的生物医学应用主要包括非线性显微和门控成像。飞秒激光非线性显微术有着诱人的优势:空间分辨率高,样品穿透深度深,光致损害少。飞秒激光显微术可用来观察亚细胞结构,提高所观察对象的光学对比度。其中多光子荧光显微应用最为广泛,不仅可以实现三维成像,而且热耗散较少,光致退色和焦点区域外的损害也大大降低了。Katja Schenke-Layland^[18]等人用近红外飞秒激光多光子显微术研究了血管的微结构特征, Bao-Gui Wang 等人^[19]用不同波长的近红外飞秒激光作为激发波,通过多光子显微研究活体内角膜和视网膜组织的光学切片,观察了角膜的前弹性层,可以选择性地观察细胞和胶原质成分,并且不需要任何的着色

和限制。多光子成像由于其高分辨率在医学诊断技术上有着极大的应用前景。此外,三次谐波的产生,偏振旋转和相干反斯托克斯拉曼散射也已成功用于生物样品的显微。

4 总结与展望

飞秒激光脉冲作用到生物组织上时,通过非线性吸收产生等离子体,产生极小空间上的化学、热和机械效应。目前飞秒激光技术的发展还不成熟,大部分还处于实验室研究阶段,摆在科技工作者面前还有许多技术和物理层面上的问题,但是可以肯定的是飞秒激光以其独特的优点和优异的表现,必将在生物医学领域得到重要得应用,同时也将推动相关学科和领域的进步,更好地应用于医学、生命科学与工程、生物细胞加工和功能材料微加工等领域。

参考文献:

- [1] Wataru Watanabe, Tomoko Shimada, S Matsunaga, et al. Single-organelle tracking by two-photon conversion[J]. Optics Express, 2007, 15(5): 2490 – 2498.
- [2] Yuqiang Jiang, Yashitaka Matsumoto, Yoichiroh Hosokawa, et al. Trapping and manipulation of a single micro-object in solution with femtosecond laser-induced mechanical force[J]. Appl. Phys. Lett., 2007, 90(06): 1107 – 1110.
- [3] N Nishimura, C B Schaffer, B Friedman, et al. Targeted insult to subsurface cortical blood vessels using ultrashort laser pulses: three models of stroke[J]. Nature Methods, 2006, 3(2): 99 – 108.
- [4] W Meier-Ruge, W Bielser, E Remy, et al. The laser in the Lowry technique for microdissection of freeze-dried tissue slices[J]. The Histochemical Journal, 1976, 8(4): 387 – 401.
- [5] A Vogel, J Noack, G Huttman, et al. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues[J]. Appl. Phys. B, 2005, 81(8): 1015 – 1047.
- [6] A Kaiser, B Rethfeld, M Vicanek, et al. Microscopic processes in dielectrics under irradiation by subpicosecond laser pulses[J]. Phys. Rev. B, 2000, 61(17): 11437 – 11450.
- [7] B Rethfeld. Unified model for free-electron avalanche in laser-irradiated dielectrics[J]. Phys. Rev. Lett., 2004, 92(18): 187 401 – 1 – 187401 – 4.
- [8] A P Joglekar, H Liu, et al. Optics at critical intensity: Applications to nanomorphing[J]. Proc. Nat. Acad. Sci., 2004, 101(16): 5856 – 5861.
- [9] Christian Meltendorf, Guido J, Burbach, Jens Bühren, et al. Corneal femtosecond laser keratotomy results in isolated stromal injury and favorable wound-healing response[J]. IOVS, 2007, 48(5): 2069 – 2075.
- [10] Vikram Kohli, Abdulhakem Y Elezzabi, et al. Cell nanosurgery using ultrashort (femtosecond) laser pulses: applications to membrane surgery and cell isolation[J]. Lasers in Surgery and Medicine, 2005, 37(3): 227 – 230.
- [11] Wataru Watanabe, Sachihito Matsunaga, Tomoko Shimada, et al. Femtosecond laser disruption of mitochondria in living cells[J]. Medical Laser Application, 2005, 20: 185 – 191.
- [12] Tomoko Shimada, Wataru Watanabe, Sachihito Matsunaga, et al. Intracellular disruption of mitochondria in a living HeLa cell with a 76 – MHz femtosecond laser oscillator[J]. Optics Express, 2005, 13(24): 9869 – 9880.
- [13] Nan Shen, Dabajyoti Datta, Chris B Schaffer, et al. Ablation of cytoskeletal filaments and mitochondria in live cells using a femtosecond laser nanoscissor[J]. MCB, 2005, 2(1): 17 – 25.
- [14] Ashkin A, Dziedzic J M, Bjorkholm J E, et al. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles[J]. Optics Letters, 1986, 11(5): 288.
- [15] Agate B, Brown C TA, Sibbett W, et al. Femtosecond optical tweezers for in-situ control of two-photon fluorescence[J]. Optics Express, 2004, 12(13): 3011 – 3017.
- [16] Q R Xing, F L Mao, L Chai, et al. Numerical modeling and theoretical analysis of femtosecond laser tweezers[J]. Optics and Laser Technology, 2004, 36(8): 635 – 639.
- [17] Fang-lin Mao, Qi-rong Xing, Kai Wang, et al. Optical trapping of red blood cells and two-photon excitation-based photodynamic study using a femtosecond laser[J]. Optics Communications, 2005, 256: 358 – 363.
- [18] Katja Schenke-Layland, Iris Riemann, Ulrich A Stock, et al. Imaging of cardiovascular structures using near-infrared femtosecond multiphoton laser scanning microscopy[J]. Journal of Biomedical Optics, 2005, 10(2): 024017 – 1 – 024017 – 5.
- [19] Bao-Gui Wang, Karsten Koenig, Iris Riemann, et al. Intraocular multiphoton microscopy with subcellular spatial resolution by infrared femtosecond lasers[J]. Histochemistry and Cell Biology, 2006, 126(4): 507 – 515.