

基于OCT的气冲冲压系统及应用： 检测软骨硬度变化

OCT-based Air-jet Indentation System and Applications: Detection of Change of Stiffness in Articular Cartilage

黄燕平, 王舒喆, 郑永平

香港理工大学 医疗科技及资讯学系,
香港

[摘要] 超声冲压是一种广泛用于获得软组织力学特性的测试方法, 其特点是操作简单, 对测试样品准备要求简单, 并且可以同时获得样品的初始厚度和形变。在此基础上, 我们提出并开发了基于光干涉断层成像 (OCT) 的气冲冲压系统。该系统利用气柱产生冲压作用, 利用OCT完成组织形变的追踪。相对于普通中低频超声冲压系统, 气柱操作简易, 同时OCT具有更高的成像分辨率, 因此OCT气冲系统在小组织例如关节软骨测试方面具有一定的优势。本文描述该系统的组成, 并评估该系统在检测软骨在两种蛋白酶消化后硬度改变的作用。实验取47个离体牛髌骨软骨样本, 进行胰蛋白酶 (20个) 和胶原蛋白酶 (20个) 消化分解 (剩余7个作为参考样本, 不作处理)。软骨力学特性用一个硬度系数表示。结果显示经胰蛋白酶消化后, 软骨硬度系数从 (734 ± 281) kPa 下降到 (230 ± 133) kPa ($p < 0.001$, 配对 t 检验, 下同), 经胶原蛋白酶消化后该参数从 (705 ± 286) kPa 下降到 (107 ± 74) kPa ($p < 0.001$)。实验结果表明该系统可以用于软骨力学特性的定量检测。本文最后讨论该系统进一步小型化以用于活体软骨检测的课题。

[关键词] 软骨; 骨关节炎; 胰蛋白酶; 胶原蛋白酶; 力学特性; 硬度; 光干涉断层成像; 气冲冲压; 小型化; 内窥镜; 超声

Abstract: Ultrasound indentation is widely adopted as a mechanical testing method to measure the mechanical properties of soft tissues. Advantages of this technique include an operation ease and less requirements for specimen preparation before testing, with acquisitions of both deformation and initial thickness of the soft tissue. Based on this technique, we have further proposed and developed an OCT-based air-jet indentation system, which utilizes the air-jet to indent the tissue and OCT to obtain the deformation. Compared to middle to low frequency ultrasound in the ultrasound indentation system, OCT has a better spatial resolution and thus it may be advantageous to use it for studying small tissues such as the articular cartilage. In this study, we described the construction of the OCT-based air-jet indentation system and demonstrated its usefulness for detecting the change of stiffness in cartilage before and after degeneration artificially induced by enzyme digestions. Forty-seven bovine patellar cartilage disks were tested with 20 treated with trypsin, 20 by collagenase and the last 7 serving as control without enzyme treatment. A stiffness coefficient was used to represent the cartilage elasticity. After digestion, the stiffness coefficient decreased from (734 ± 281) kPa to (230 ± 133) kPa in the trypsin group ($p < 0.001$, paired t -test) and from (705 ± 286) kPa to (107 ± 74) kPa in the collagenase group ($p < 0.001$, paired t -test), respectively. Results of the current study demonstrated that the OCT-based air-jet indentation can be a useful tool to quantitatively assess the mechanical properties of articular cartilage. The development of a further miniaturized probe suitable for arthroscopic applications to articular cartilage in vivo is discussed at the end of this paper.

Key words: articular cartilage; osteoarthritis (OA); trypsin; collagenase; mechanical properties; stiffness; optical coherence tomography (OCT); air-jet indentation; miniaturization; arthroscopy; ultrasound

[中图分类号] R445.1 [文献标志码] B

doi: 10.3969/j.issn.1674-1633.2011.01.005

[文章编号] 1674-1633(2011)01-0017-05

HUANG Yan-ping, WANG Shu-zhe,
ZHENG Yong-ping

Department of Health Technology and
Informatics, The Hong Kong Polytechnic
University, Hong Kong, China

收稿日期: 2010-11-01

基金项目: 香港研究资助局 (RGC, PolyU5318/05E, PolyU5245/03E) 和香港理工大学 (J-BB69) 支持。

通讯作者: 郑永平

通讯作者邮箱: ypzhang@ieee.org

0 前言

在很多组织里面,很多病变如纤维化、水肿、肿瘤、退化往往伴随着其力学特性的改变。在这种情况下,按摸触诊往往是医生诊断的重要依据。但是触诊是一种定性的诊断方式,诊断很大程度依赖于操作者的经验,导致结果具有很大的主观性,所以有必要寻求一种量化的更加客观评价组织力学特性改变的测量方法。弹性成像作为一种新的成像模式,可以获得组织内部不同地方的弹性对比度,对很多病症的检测具有重要的临床价值^[1]。但是假如组织的硬度变化是整体性的而不是局部的,弹性成像就会显示出一定的局限性,这个时候测量组织的整体有效硬度对其病理的检测更加有效。在这些方法当中,印压实验是其中一种操作简单,对测试样本配备要求较低的测量方法,并被广泛使用。在计算组织力学特性参数例如杨氏模量的时候,组织的初始厚度是一个比较重要的参数,特别是当印压头大小跟组织初始厚度具有可比性的时候^[2]。但是传统印压方法一般需要依靠另外的测量方法获得组织的初始厚度,这给测试带来了很大的不便性,于是有学者提出了超声印压的概念^[3]。超声印压利用超声探头的平整面作为压头来对组织进行印压,并且可以利用超声信号同时测得组织的形变和厚度,已经成功应用于例如下肢组织硬度^[4],肌肉训练效果^[5],放疗后组织纤维化程度^[6],糖尿病病人足部组织病变^[7]等方面的评估。国内四川医学科学院和重庆医科大学的一个研究组也展开了内窥镜超声印压系统方面的研究,并把印压实验成功应用在心肌的被动力学特性检测上^[8-9]。

当在比较薄的组织中使用超声印压时,必须使用高频超声以提高空间分辨率。但是高频超声探头的表面一般是凹状的,不适合作为印压头使用。为了解决这个问题,我们提出了一种超声水冲印压系统,利用水射流作为工具来印压组织,实验证明该系统可行有效^[10-11]。利用流体作为印压工具同时还可以提高系统的测量速度,使硬度的表面成像(C扫描)成为可能^[12]。同时,流体印压因为对所作用组织的边界限制较小,可在一定程度上减少印压实验对组织的破坏性。除了用超声作为测量形变的手段,也有研究提出用光学的方法配合水冲印压来获得组织的硬度^[13]。但是我们注意到,如果在临床使用当中,使用液体射流印压的一个不方便的地方就是需要特殊处理这些液体(如生理盐水),需要特别的设计例如单独的通道来搜集并排出这些液体。鉴于此项缺点,本文提出另外一个流体印压方法:气体射流印压配合OCT成像技术来完成测量组织的力学特性。OCT是近年发展较快的一种可以用在生物学进行成像的方法,其工作原理接近超声脉冲回波方法,但是具有很高的空间分辨率,所以适合作为一种新的成像方式用在小型组织例如眼球结构、软骨等的研究上。

骨关节炎是常见特别是在老年人当中更加普遍的一种关节疾病,严重影响病人的生活质量,发展到中后期可能会导致病人的残疾,给家庭和社会带来很大的经济负担。骨关节炎中最重要的一个变化就是软骨的退化,传统的X光只能检测到后期病变,这种后期的病变现在还没有药物可以治疗,普通药物的目标是尽量降低病人的痛楚或者不适感。在早期软骨退化的治疗方面,最新研究显示骨性关节炎疾病改善药物有很好的发展前景^[14-15],但是这个治疗的前提是必须尽早检测出软骨的退化,尽早治疗。另一方面,经过手术修复后的软骨质量也需要很好的手段来评估修复的效果。经过手术修复后的软骨表面很可能看起来跟正常的一样,但是在质量方面例如负重性却可能不是很令人满意,这同样也需要一种量化的客观手段来评价软骨的完整度。

研究显示OCT不仅可以定性分析软骨在病变当中微小的形态结构变化(也叫“光学活组织检查”),还可以定量获得软骨厚度、折射系数^[16]、光学反射系数^[17]和表面粗糙度^[17]等一系列参数来客观分析软骨状态的改变,在软骨方面的研究前景广泛。本文主要向读者介绍一种基于OCT的气冲印压系统,并将该系统应用在软骨的测试上面,评估该系统在检测软骨因退化而产生的硬度变化的作用,并探讨了其结合关节内窥镜^[18]用于真正临床实验的进一步的设计。

1 材料和方法

1.1 系统结构组成

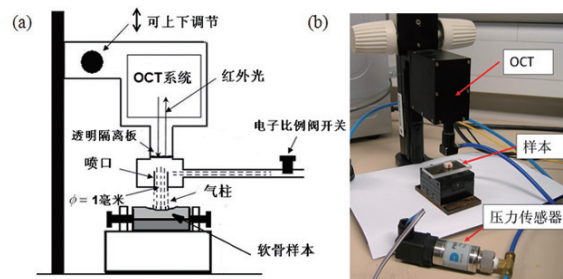


图1 (a) 基于OCT的气冲印压系统核心部分结构和 (b) 实物图

本实验所采用的基于OCT的气冲印压系统的结构图可以参照图1。实验OCT系统(清华大学深圳研究生院光学成像和检测实验室研制)光源中心波长1310nm, -3dB带宽为50nm, 输出功率为5mW。此系统理论空间分辨率为18 μ m, 在不透明组织的探测深度为2~3mm。为测量方便,该系统有红光引导探测点。我们在OCT信号出口处装上一个喷嘴,用来产生气柱,喷嘴上面有个透明玻璃隔离板既可以用来阻止气体进入OCT部分,又可以让红外光通过。红外光聚焦在喷嘴下面5mm处的地方,并把样本放置在此处。一个电压控制比例阀开关(ITV 1030-311L-Q, 日本东京SMC公司)用来控制产生气体的气压大小,该比例阀的

气压控制范围是 0.5MPa (5 个大气压), 并自带气压压强反馈信号, 用来获得实际气流的气压大小。本实验气体就是普通的空气, 来自学校自备的供气系统。为了使气柱更加平稳, 一条直径为 1mm 的气管安装在喷口的出口, 用来引导喷出的气体。

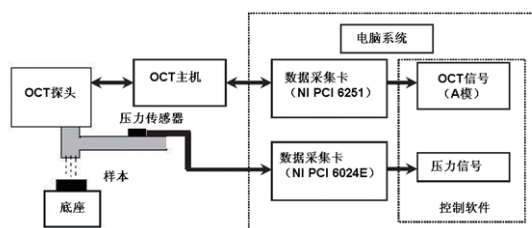


图 2 用于OCT气冲冲压系统的数据采集流程图

气冲冲压系统的数据采集系统如图 2 所示。一个用 Microsoft VC++ 编写的程序 (“wave”) 用于控制系统、实时显示和保存数据。比例阀开关控制电压由数据采集卡 (PCI 6024E, 美国奥斯汀 National Instrument 公司) 根据预编写的波形信号发出。A 模 OCT 信号和气压信号同步的采样频率为 16Hz。对于 A 模 OCT 信号, 信号长度为 7500 点, 经过标准厚度载玻片校正, 在空气中每点对应的物理长度为 $0.43 \mu\text{m}$ 。气压信号和印压力的对应关系也由实验进行确定。实验当中, A 模 OCT 数据可以用来观察样本表面反射的变化, 此变化会被当作样本的形变量进行处理 (如图 3 所示)。利用相关性追踪获得的移动点数再乘上每点所代表的实际物理长度, 就是印压过程当中组织的形变量。

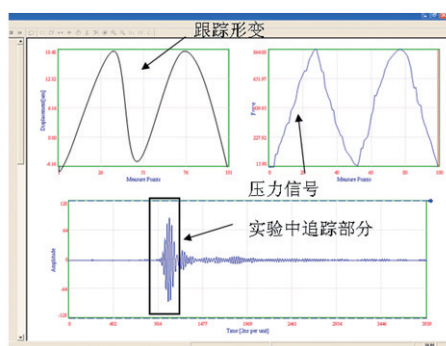


图 3 追踪获取软骨形变信号图

实验中, 追踪部分会随着气柱的作用前后移动, 表示升压和减压的过程

1.2 软骨样本测试

我们利用从市场获得的离体牛髌骨软骨样本来进行实验, 验证该系统测试软骨力学特性的可行性和可靠性。具体的样本制备过程可以参考以前的相关研究^[19], 这里只给出一个大致流程。在髌骨上面凿出直径为 6.35mm、厚度约 5mm 连同下面的骨头在一起的柱形圆块, 用一个特殊的固定装置固定测试的软骨样本 (如图 4 所示)。该装置将软骨放置在中心的柱形圆孔里面, 旁边用螺丝固定, 以保证实验中样本没有整体的移动。本实验测试了 47 个软骨样本,

其中 7 个属于没有处理的样本, 只用来进行染色实验, 20 个样本属于胰蛋白酶消化组, 另外 20 个属于胶原蛋白酶消化组。胰蛋白酶主要用来消化软骨里面的蛋白聚糖 (对部分胶原蛋白也有影响)^[20], 胶原蛋白酶 (类型 2) 用来消化软骨里面的胶原蛋白^[21]。实验使用 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 消化液 (GIBCO, 美国加州 Invitrogen 公司) 和 30 单位/mL (GIBCO, 美国加州 Invitrogen 公司) 的胶原蛋白酶溶液来消化分解软骨模拟软骨的退化。胰蛋白酶消化过程让软骨在 37℃ 下浸泡在溶液里面水解 4h, 胶原蛋白酶消化让软骨在 37℃ 下浸于溶液中浸泡 24h。在处理之后, 软骨在 0.9% 的生理盐水中冲洗放置最少 1.5h 后再接受测量。我们将对样本在酶消化之前和之后的结果进行对照。实验都在室温下 (24 ± 1)℃ 进行。完成所有力学测试后, 7 个没有经过酶处理的软骨, 7 个经过胰蛋白酶处理的和 7 个经过胶原蛋白酶处理的软骨样本被送去进行番红 O/ 固绿染色实验。为了获得软骨的厚度, 实验中还使用了 55MHz 超声系统 (RMV708 探头, Vevo770, 加拿大多伦多 VisualSonics 公司) 对软骨进行超声影像实验, 厚度的测试基于传播时间和声速的乘积^[19]。

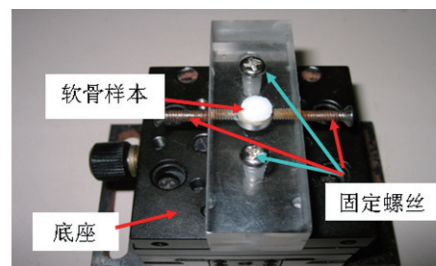


图 4 用于固定软骨样本的装置

测量在空气当中进行。我们将软骨放置在固定装置里面, 气柱作用在软骨的中心点。软骨的固定以获得最大的表面反射波作为标准, 此时光柱和气柱被认为是垂直于软骨表面。实验开始之前我们用 0.04N 的力预压软骨 3s 然后将压力在 6s 之内加到 0.1N 左右, 然后观察软骨的形变。每个软骨总共进行 3 次测试, 3 次的平均值作为代表样本的最终结果。每两次印压之间软骨放置在 0.9% 的生理盐水里面至少 0.5h 让软骨彻底恢复。消化之前之后使用同样实验设置和方法。为了进行对比实验, 样本也在标准力学测量仪 (Instron 5569, 美国麻省 Instron 公司) 上面进行印压测试。测试采取跟气冲冲压类似的实验条件。

我们用公式 (1) 定义的硬度系数来表达软骨的弹性特征:

$$k = \frac{F/S}{d/D} = \frac{F}{d} \cdot \frac{D}{S} \quad (1)$$

此公式中 F 是样本受到的压力, d 是软骨形变, D 是软骨初始厚度, S 是作用面积。本研究假设气冲击力作用在气柱直径大小的面积上, 也就是说气柱作用面积是直径为 1mm 的圆。在用线性回归获取参数的时候, 我们只用了上升阶

段,最大相对形变是初始厚度的3%。

1.3 统计分析和染色实验

对软骨硬度系数用配对 t 检验对比消化之前和之后的结果,用 SPSS 软件 (15.0 版本,美国芝加哥 SPSS 公司) 完成,检测后 $p < 0.001$ 作为临界点用来判断参数是否具有显著变化。实验对 21 个样本进行了番红 O/ 固绿染色处理,然后在光学显微镜下观察^[19]。那些被染成红色的部分就是代表蛋白聚糖存在的部分,绿色的部分代表蛋白聚糖已经被消化分解。

2 实验结果和讨论

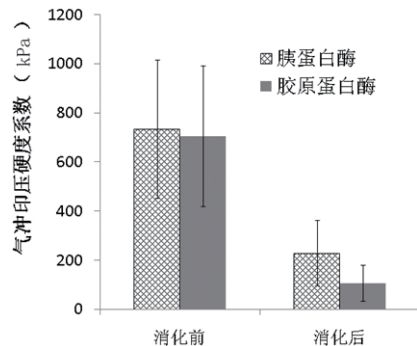


图 5 软骨硬度系数经过两种蛋白酶消化前后的硬度系数对照

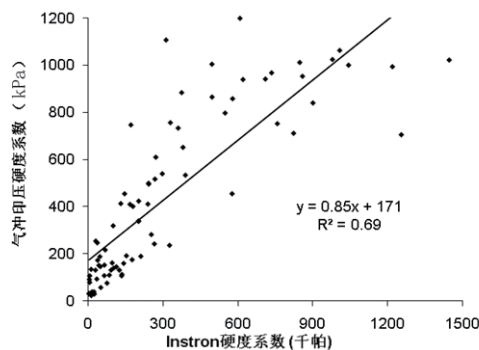


图 6 气冲印压和 Instron 印压的硬度系数的相关性结果

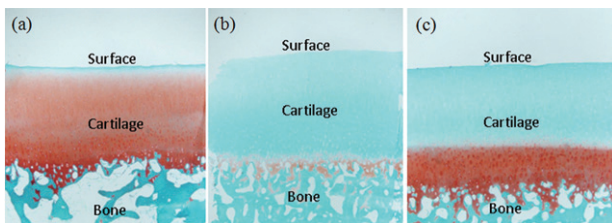


图 7 典型染色结果

(a) 没有经过酶处理的软骨; (b) 经过胰蛋白酶消化后软骨, 蛋白聚糖基本被分解; (c) 经过胶原蛋白酶消化后软骨, 部分蛋白聚糖被分解。

成功从所有软骨上面测得硬度系数。经过胰蛋白酶消化后, 软骨系数从 (734 ± 281) kPa 显著降到了 (230 ± 133) kPa ($p < 0.001$), 下降的幅度为 $(63 \pm 24)\%$; 经过胶原蛋白酶消化后, 该参数从 (705 ± 286) kPa 显著降到了 (107 ± 74) kPa ($p < 0.001$), 下降的幅度为 $(84 \pm 9)\%$ (如图 5)。跟 Instron 测量的系数进行比较, 结果具有很强的相关性 ($r =$

0.83 , $p < 0.005$, Pearson 相关系数, 如图 6), Instron 印压测量结果显示软骨在经过胰蛋白酶和胶原蛋白酶分解后, 硬度系数分别降低了 $(66 \pm 23)\%$ 和 $(87 \pm 15)\%$ 。所有这些结果说明两种仪器的测量结果具有很强的可比性, 验证了气冲印压系统的操作可行性。图 7 显示了典型的正常软骨和经过两种蛋白酶消化之后的软骨进行番红染色实验的结果。经过胰蛋白酶消化之后, 软骨当中的蛋白聚糖被分解完全, 附着在蛋白聚糖上面的固定电荷密度减少, 压缩过程中互斥作用减小导致软骨硬度大幅度下降; 胶原蛋白酶虽然只对胶原蛋白结构进行作用, 但是因为胶原蛋白的分解, 形成许多小孔, 吸附在这个网络上的蛋白聚糖也会随之流出, 这可以从图 7 (c) 中看出, 所以, 胶原蛋白酶分解也会导致软骨硬度的大幅下降。实验结果证明基于 OCT 的气冲印压系统能成功测量软骨的硬度和其在两种蛋白酶消化之后的改变。显然当前的实验还有一些不足的地方, 例如 OCT 信号受样本表面变化影响比较大, 导致表面反射信号部分发生去相关, 给形变的追踪获取带来一定的噪声; 当前 OCT 系统也不能测得软骨的厚度, 但是通过对 OCT 系统设计方面的改进, 已经证明利用 OCT 进行软骨厚度的测量是可行的^[22]。

3 结论和展望

本文主要介绍了一种基于 OCT 的气冲印压系统的结构组成, 然后通过检测软骨的退化, 证明该系统可以用来评估离体软骨样本的力学特性。因为力学特性的改变是软骨早期退化或者修复质量不佳的重要表现, 所以本文提出的气冲印压系统在研究软骨力学及光学特性方面具有很广阔的发展前景。接下去, 我们将会结合关节内镜技术, 将这个系统的光学部件小型化后安装在关节镜里面, 这样结合微创关节镜手术, 我们就可以以客观的手段来评估活体软骨在自然退化当中的各项性质的改变或者手术修复后软骨质量的恢复情况。

致谢

作者感谢张忠伟在准备软骨样本当中的大力帮助。本研究部分资助来自于香港研究资助局 (RGC, PolyU5318/05E, PolyU5245/03E) 和香港理工大学 (J-BB69)。

[参考文献]

- [1] 郝轶, 柳莉莎. 超声弹性成像技术及其临床应用[J]. 医学综述, 2010, 16(3): 453-455.
- [2] Hayes WC, Herrmann G, Mockros LF, et al. A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage [J]. J Biomech, 1972, 5(5): 541-551.
- [3] Zheng YP, Mak AFT. An ultrasound indentation system for biomechanical properties assessment of soft tissues in-vivo [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 1996, 43(9): 912-918.

- [4] Zheng YP, Mak AFT. Effective elastic properties for lower limb soft tissues from manual indentation experiment[J]. IEEE Trans Rehabil Eng, 1999, 7(3): 257-267.
- [5] Siu PM, Tam BT, Chow DH, et al. Immediate effects of 2 different whole-body vibration frequencies on muscle peak torque and stiffness[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2010, 91(10): 1608-1615.
- [6] Leung SF, Zheng YP, Choi CYK, et al. Quantitative measurement of post-irradiation neck fibrosis based on the young modulus-description of a new method and clinical results[J]. Cancer, 2002, 95(3): 656-662.
- [7] Zheng YP, Choi YKC, Wong K, et al. Biomechanical assessment of plantar foot tissue in diabetic patients using an ultrasound indentation system [J]. Ultrasound Med Biol, 2000, 26(3): 451-456.
- [8] 李进嵩, 黄晶, 邓辉胜, 等. 介入超声印压系统检测软组织力学特性实验研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2008, 25(2): 591-597.
- [9] 李进嵩, 黄晶, 邓辉胜, 等. 犬离体心肌应力-应变关系超声印压方法研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2008, 25(3): 649-653.
- [10] Lu MH, Zheng YP, Huang QH. A novel noncontact ultrasound indentation system for measurement of tissue material properties using water jet compression[J]. Ultrasound Med Biol, 2005, 31(6): 817-826.
- [11] Lu MH, Zheng YP, Huang QH, et al. Noncontact evaluation of articular cartilage degeneration using a novel ultrasound water jet indentation system[J]. Ann Biomed Eng, 2009, 37(1): 164-175.
- [12] Lu MH, Zheng YP, Huang QH. A novel method to obtain modulus image of soft tissues using ultrasound water jet indentation: a phantom study [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2007, 54(1): 114-121.
- [13] Duda GN, Kleemann RU, Bluecher U, et al. A new device to detect early cartilage degeneration[J]. Am J Sports Med, 2004, 32(3): 693-698.
- [14] 张立强, 杨米雄. 骨性关节炎疾病改善药物的研究进展 [J]. 医学综述, 2008, 14(18): 2814-2816.
- [15] Marliese A. 硫酸氨基葡萄糖: 第1个经临床证明的骨关节炎疾病改善药物[J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(4): 259-262.
- [16] Wang SZ, Huang YP, Wang Q, et al. Assessment of depth and degeneration dependences of articular cartilage refractive index using optical coherence tomography in vitro [J]. Connect Tissue Res, 2010, 51(1): 36-47.
- [17] Saarakkala S, Wang SZ, Huang YP, et al. Quantification of optical surface reflection and surface roughness of articular cartilage using optical coherence tomography [J]. Phys Med Biol, 2009, 54(22): 6837-6852.
- [18] Tearney GJ, Brezinski ME, Bouma BE, et al. In vivo endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography[J]. Science, 1997, 276(5321): 2037-2039.
- [19] Wang SZ, Huang YP, Saarakkala S, et al. Quantitative assessment of articular cartilage with morphologic, acoustic and mechanical properties obtained using high frequency ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 2010, 36(3): 512-527.
- [20] Harris ED, Radin EL, Krane SM, et al. Effects of proteolytic-enzymes on structural and mechanical properties of cartilage [J]. Arthritis Rheum, 1972, 15(5): 497-503.
- [21] Shingleton WD, Hodges DJ, Brick P, et al. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover [J]. Biochem Cell Biol, 1996, 74(6): 759-775.
- [22] Rogowska J, Bryant CM, Brezinski ME. Cartilage thickness measurements from optical coherence tomography [J]. J Opt Soc Am A-Opt Image Sci Vis, 2003, 20(2): 357-367. 

上接第7页

- 乳腺病灶良恶性鉴别上的价值[J]. 中国医学计算机成像杂志, 2007, 13(2): 124-126.
- [44] 俞清, 徐智章, 毛枫, 等. 超声弹性成像在乳腺疾病中的初步应用[J]. 上海医学影像, 2005, 14(2): 102-103.
- [45] Rago T, Santini F, Scutari M, et al. Elastography: New developments in ultrasound for predicting malignancy in thyroid nodules[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007, 92(8): 2917-2922.
- [46] Lyschik A, Higashi T, Asato R, et al. Thyroid gland tumor diagnosis at US elastography[J]. Radiology, 2005, 237(1): 202-211.
- [47] 俞清, 徐智章, 王水平, 等. 甲状腺占位性病变的实时超声弹性成像表现[J]. 中国医学影像技术, 2007, 23(11): 1612-1614.
- [48] 罗葆明, 曾婕, 欧冰, 等. 乳腺超声弹性成像检查压力与压放频率对诊断结果影响[J]. 中国医学影像技术, 2007, 23(8): 1152-1154.
- [49] 罗葆明, 曾婕, 欧冰, 等. 乳腺超声弹性成像检查感兴趣区域大小对诊断结果影响[J]. 中国医学影像技术, 2007, 23(9): 1330-1332.
- [50] 钟文景, 罗葆明. 乳腺疾病超声弹性成像诊断中的现状[J]. 中国医疗器械信息, 2008, 14(4): 4-5, 12.
- [51] 郑永平, 周永进, 黄铮铭. 一种基于传统超声成像系统平台的组织超声弹性成像功能的实现[J]. 中国医疗设备, 2011, (1): 1-3. 