

超声水冲印压系统： 小型化及软骨退化检测

Water-jet Ultrasound Indentation System: Its Miniaturization and Detection of Articular Cartilage Degeneration

黄燕平, 郑永平

香港理工大学 医疗科技及资讯学系, 香港

[摘要] 软组织超声印压是利用印压实验来压缩组织, 然后结合超声算出组织的厚度及形变, 进而求得组织力学特性例如弹性系数的一种技术。此技术已经在生物力学中被广泛应用于各种病变当中组织的特征化。超声水冲印压系统利用水射流来取代传统固体印压头(一般是超声探头本身)的印压作用, 可以解决高频超声探头前部不平整不适于用作印压头的缺点, 并且具有快速扫描组织弹性特征的优点, 可以应用在评估很薄的组织例如关节软骨上。本文描述一个小型化的超声水冲印压系统, 并且评估它在定量软骨质量检测当中的作用。我们用一个硬度系数来描述软骨的硬度, 用两组蛋白酶——胰蛋白酶和胶原蛋白酶消化分解软骨来模拟软骨质量的退化。初步结果(14个离体软骨样本, 每组各7个)显示在经过胰蛋白酶消化之后, 软骨的硬度系数从原来的 (9927 ± 3420) kPa (均值 \pm 方差, 下同)降到了 (2061 ± 721) kPa ($p < 0.001$, 配对 t 检验, 下同); 经过胶原蛋白酶消化之后, 从 (8275 ± 3209) kPa减到了 (3746 ± 916) kPa ($p = 0.001$)。结合高频超声, 此系统还可以测量软骨的形态学参数和声学特性参数。因此本研究结果显示超声水冲印压系统能很好的评估软骨在经过蛋白酶消化之后的各种参数变化。文章最后还讨论了此系统的进一步改进使其能逐步真正应用于临床活体软骨试验。

[关键词] 软骨; 骨关节炎; 胰蛋白酶; 胶原蛋白酶; 力学特性; 超声印压系统; 水射流; 内窥镜

Abstract: Ultrasound indentation, which utilizes ultrasound to extract the initial thickness and deformation of soft tissues during an indentation test, is a technique to investigate the biomechanical properties such as the elasticity of soft tissues. The water-jet ultrasound indentation further adopts a water-jet rather than a rigid indenter (normally the ultrasound transducer itself in a conventional ultrasound indentation) as a tool to indent the tissue. It solves the problem of difficulty in use when with high frequency ultrasound a non-planar tip of the transducer is used as the indenter. Furthermore, it has the advantage of a high-speed scan of the distribution of tissue elasticity and can be applied to assess small tissues such as the articular cartilage. In this paper, we described the development of a miniaturized water-jet ultrasound indentation system and evaluated its usefulness in assessing the quality of articular cartilage before and after degeneration. A stiffness ratio was used to represent the stiffness of the articular cartilage and two enzymes including trypsin and collagenase were used to digest the cartilage in order to simulate the degeneration. Preliminary results on 14 cartilage specimens (7 in each group) showed that the stiffness ratio decreased from (9927 ± 3420) kPa to (2061 ± 721) kPa ($p < 0.001$, paired t -test) in the trypsin treatment group, and it reduced from (8275 ± 3209) kPa to (3746 ± 916) kPa ($p=0.001$, paired t -test) in the collagenase treatment group, respectively. With the incorporation of high frequency ultrasound, this system can also be used to measure the morphological and acoustical properties of the articular cartilage. Therefore, the system can be

HUANG Yan-ping, 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 (PolyU5354/08E) 和香港理工大学 (J-BB69) 支持。

通讯作者: 郑永平, 教授。

通讯作者邮箱: ypzheng@icsee.org

used to assess the change of various properties of cartilage after degeneration. At the end of the paper some discussion is presented on further improvement of the system design towards its future clinical studies on articular cartilage in vivo.

Key words: articular cartilage; osteoarthritis; trypsin; collagenase; mechanical properties; ultrasound indentation system; water-jet; arthroscopy

[中图分类号] R445.1 [文献标志码] B

doi: 10.3969/j.issn.1674-1633.2011.01.003

[文章编号] 1674-1633(2011)01-0008-05

印压实验是用于测量软组织力学特性的最常用的方法之一^[1]。通过内窥镜操作的印压实验也可以应用在腔体组织的测试上,例如关节软骨的力学性能^[2-4]。在印压实验里当我们需要计算出被测组织的硬度时,其初始厚度是一个很重要的参数,特别是当它和印压头的大小相当的时候^[1]。然而,传统的印压实验一般利用不同的仪器测量组织的形变和它的初始厚度,降低了操作的简易性,也不利于开发小型紧凑的测量仪器。为了解决同时测量形变和厚度的问题,超声印压实验系统在数十年前被提出^[5],同时也被相关内窥镜设备研究者所采纳并用于关节软骨特性的检测^[6]。国内四川医学科学院和重庆医科大学的一个研究组也报导了内窥式超声印压系统方面的研究,并成功应用在心肌的被动力学特性检测上^[7-8]。在超声印压系统里面,通常超声探头前面的平整表面也当作印压头使用。为了测试某些比较薄的组织例如软骨时,我们需要采用高频超声以提高其分辨率。但是当使用高频超声的时候,因为聚焦缘故,探头一般是凹状的,不适宜作为印压头使用。为了解决这个问题,我们研究组就提出了利用水射流来代替传统固体印压头的方法,这就是超声水冲印压系统^[9]。这个新的测量系统及方法的可行性及在测试关节软骨和相关软组织时的作用已被成功论证^[9-11]。

骨关节炎是常见的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。许多病人到后期不得不选择进行人工关节置换,这给病人家庭及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,用传统的X光只能检测到晚期病变。最新研究显示骨性关节炎疾病改善药物在治疗骨关节炎方面有很好的发展前景^[12-13],但是前提是必须尽早检测出软骨的退化以尽早治疗。另一方面,经过手术修复后的软骨质量也需要一个可靠的手段来评估修复的效果。经过手术修复后的软骨表面看起来可能跟正常的一样,但是跟正常软骨相比质量方面例如受压性和耐用度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估软骨的完整度。在诊断和治疗上面,

微创手术是现代手术发展的方向,为使开发的仪器能进一步应用到真正的关节软骨上,系统必须朝小型化方面发展以适用于微创手术仪器。关节内镜是检测关节或进行微创关节手术的一种有效的手段,而且正被越来越多的医生和研究人员所使用。如果上面所述的超声水冲印压系统能够集成在关节内镜里面,那么将对退化性骨关节炎诊断和评估修复软骨质量的研究方面带来重要的契机。基于以上所述原因,本文着重向读者介绍一种小型化的超声水冲印压系统的研发,首先详细描述其结构,然后将系统初步应用于离体牛软骨样本上面,检测这些软骨样本在经过蛋白酶消化之后的硬度变化,然后跟标准力学测量仪测得的杨氏模量进行比较,以验证此系统应用于软骨检测的可行性和可靠性。以前的众多研究已经证明超声亦可以用来获得软骨形态学和声学参数以特征化软骨退化^[14],因为这些参数的获得比较直接,不会受设计太大的影响,所以本文在此方面不作赘述。

1 材料和方法

1.1 系统结构组成

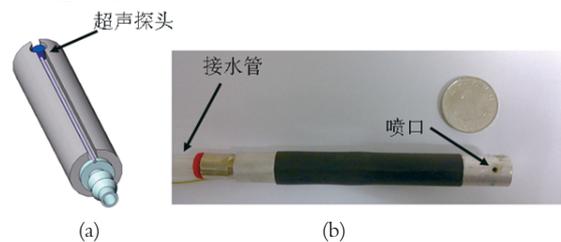


图1 小型化超声水冲印压系统组成

图1显示小型化的超声水冲印压系统的组成。探头的主要部分由一根铝棒组成,其长度为11cm,直径12mm。铝棒中心是一个直径为3mm的中空通道。探头的一侧用来接水管,另外一侧安装了一个直径为3mm的超声探头,超声探头的中心频率是10MHz。在超声探头的另外一侧是直径为2mm的出孔,用来产生水柱,并且是发射超声到组织和接收从组织反射回来超声的通道。由此设计可

知, 实验中水射流的直径大概是 2 mm。

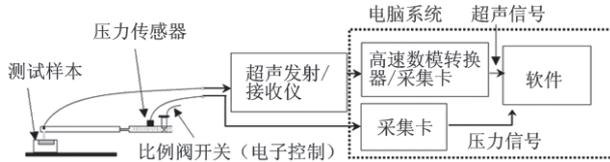


图2 基本数据采集系统

图2为当前印压系统的数据采集系统。两种类型的信号——超声信号和液体压力信号分别被数据采集卡记录在电脑作后续处理。一个超声脉冲发射/接收仪用来发射并接收从组织反射回来的超声信号。该超声信号以 500MHz 的频率被采样, 然后转化成一定长度的 A 模信号, 与从水压传感器获得的压强信号同步存储到个人电脑里面。A 模信号和压强信号的同步采样频率可以根据具体的应用决定, 本文设定为 10 Hz。一个以 C++ 编写的专用软件程序 (“wave”) 用来采集数据和进行后续信号处理。印压形变的计算是靠互相关的方法追踪在印压过程当中软骨样本表面信号的移动获得, 压强信号和样本受到的压力信号是通过一个校准过程来完成的^[9]。一个电子控制的比例阀开关用来控制水压的大小, 用来在样本表面产生压力, 完成周期性的印压过程。实验中用来计算软骨形变的水的声速采用实验测量值为 1470 m/s。

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本来进行实验, 验证系统的可行性和准确性。软骨连同下面的骨头被切成直径为 16 mm、厚度 10 mm 左右的柱形圆块, 然后埋在魔术钢胶里面, 硬化后固定在形状为六边形的金属样品盒里面 (如图 3 所示)。固定软骨的时候让样本表面调整到一个水平面上, 以利于印压时与水柱垂直。本实验测试了 14 个软骨样本, 其中 7 个样本属于胰蛋白酶消化组, 另外 7 个属于胶原蛋白酶消化组。胰蛋白酶主要用来消化分解软骨里面的蛋白聚糖 (对胶原蛋白也有轻微作用)^[15], 胶原蛋白酶 (类型 2) 主要用来消化分解软骨里面的胶原蛋白^[16]。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分解处理软骨用以模拟软骨的退化。胰蛋白酶消化过程让软骨在 37℃ 下浸泡在溶液里面分解 4h, 胶原蛋白酶消化让软骨在 37℃ 下浸泡在溶液中分解 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 (24 ± 1) °C 下进行。

实验中, 将样品盒再次固定在一个比较稳定的底架上面。这样在实验当中软骨本身就不会移动, 以免影响实验结果。这个实验在水槽当中进行。探头被固定在一个可以精确上下移动的支架上面, 样本放在探头的下方。探头跟

样本表面之间的距离可以通过支架的上下移动来调节, 本实验设置此距离为 1 mm。本实验水都来自普通自来水, 通过比例阀开关来调节压力的大小。一个典型印压过程包括 4 个周期, 每个周期 10 s, 前 5 s 压力逐渐增大压缩软骨, 后 5 s 压力逐渐减小释放被压缩的软骨, 每个周期水压从 0Pa 升到 260 kPa。经过校正, 最大水压下样本所受压力是 0.58 N。公式 (1) 定义的硬度系数可用以表达软骨的弹性力学特征:

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

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。本研究假设水冲击力作用在水柱直径大小的面积上也就是说水柱作用面积是直径为 2mm 的圆。在求参数的时候, 我们只用了加压阶段, 0.05N 作为预载压力, 最大形变选初始厚度的 3%, 第 1 个周期作为预压缩, 只选用了第 2 到第 4 个周期的数据用来进行 F/d 的回归计算。每个软骨测试在样本的中心进行, 重复了 3 次, 每两次实验间软骨放置在 0.9% 的生理盐水里至少半个小时让软骨完全恢复原状。3 次实验的平均结果代表样本的最终硬度系数。



图3 固定在魔术钢胶里面的典型软骨样本

(b) 是 (a) 经过胶原蛋白酶消化之后的对照。

作为对照, 我们还利用标准力学测试仪 (Instron 5569, 美国麻省 Instron 公司) 来进行传统的印压实验。实验当中选用了跟水射流操作相似的参数: 印压头直径 2 mm, 总共 4 个周期的加压、减压过程, 速度选用 1 mm/min, 以 20 Hz 的采样率采集力和形变数据, 选取后 3 个周期的上升段的最大形变为初始厚度 3% 的数据, 最后利用公式 (2) 计算软骨的杨氏模量:

$$E = \frac{1-\nu^2}{2\alpha\kappa(\nu, a/h)} \cdot \frac{F}{d} \quad (2)$$

此公式中 ν 是泊松系数, α 是印压头半径 (1mm), κ 是一个调整比例系数, 跟 ν 和印压头半径/组织初始厚度比 (a/h) 有关, 可根据文献中^[1]的表格查出。 F/d 代表涵义跟公式 (1) 相同。本文采用经验值 $\nu=0.45$ 作为软骨的泊松系数, 假设软骨在印压作用下体积基本不可压缩。软骨厚度根据软骨表面反射和软骨/骨头交接面反射之间的传播时间计算, 软骨声速采用以前实验数据 1636 m/s^[17]。

1.3 统计分析

对软骨厚度和硬度系数用配对 t 检验对比消化之前和

之后的结果,用 Pearson 相关系数分析水冲冲压系统获得的硬度系数和标准印压测试获得的杨氏模量之间的相关性。用 SPSS 软件(15.0 版本,美国芝加哥 SPSS 公司)完成统计分析,检测后以 $p < 0.05$ 作为临界点用来判断参数是否具有显著变化。

2 实验结果和相关讨论

对于胰蛋白酶消化组,软骨消化之前之后的平均厚度分别为 (2.38 ± 0.57) mm 和 (2.41 ± 0.60) mm。相对应的胶原蛋白酶消化组的数据为 (2.04 ± 0.21) mm 和 (2.08 ± 0.26) mm。消化前后厚度都没有发生显著的变化 ($p > 0.05$),说明消化分解对软骨厚度基本没有影响。

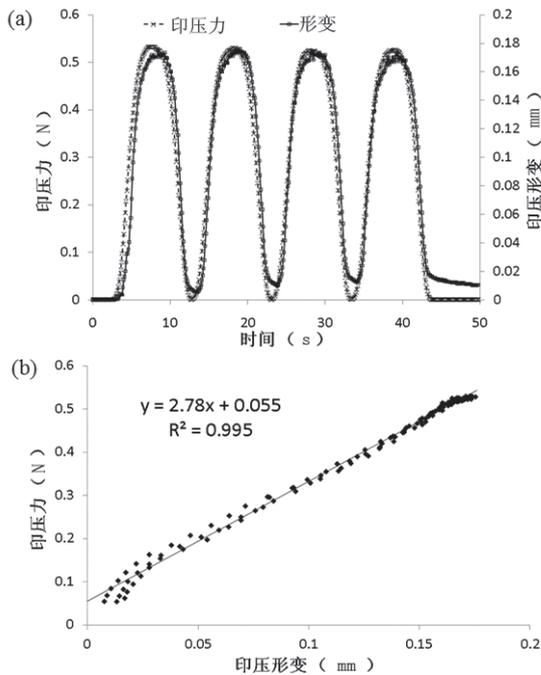


图 4 典型印压过程曲线

(a) 是印压力和形变随时间变化图。(b) 是印压力和印压形变的对应图,只包含用来计算硬度系数的加压部分数据。

典型的印压曲线如图 4 所示,印压力和形变之间的对应关系一致,相关性很高。两组蛋白酶消化之前和之后的硬度系数变化如图 5 所示。在胰蛋白酶消化组,硬度系数从 (9927 ± 3420) kPa 降低到了 (2061 ± 721) kPa,下降幅度(消化前后差异/消化前值)达到 $77\% \pm 11\%$ ($p < 0.001$)。在胶原蛋白酶消化组,硬度系数从 (8275 ± 3209) kPa 下降到了 (3746 ± 916) kPa,下降幅度为 $52\% \pm 10\%$ ($p = 0.001$)。由此可见,胰蛋白酶的消化水解作用对软骨的硬度影响比胶原蛋白酶对软骨的影响较大,其中一个可能的原因就是软骨的压缩特性中的一部分是靠附着在蛋白聚糖上面的负电子的相斥作用构成的,而胶原蛋白对软骨力学特性的贡献更多体现在拉伸特性当中^[18-19]。我们从实验结果中发现

软骨的粘弹性也发生了明显的改变,此项研究正在进行中,如果有确定性的结果将会有后续报导。硬度系数跟杨氏模量的对比结果在图 6 中显示,所有的硬度系数包括消化之前和之后的结果都包含在相关性分析中。硬度系数跟杨氏模量有一个明显的相关性 ($r = 0.79$, $p < 0.001$, Pearson 相关性),说明在相似的测试环境下,水冲冲压系统测得的硬度系数能够很好地反映组织的力学特性,这个结果我们在以前的仿真材料中已经得到验证^[20]。对于胰蛋白酶消化组,杨氏模量从 (958 ± 223) kPa 降到了 (384 ± 126) kPa;对于胶原蛋白酶消化组,杨氏模量从 (1069 ± 230) kPa 下降到了 (833 ± 183) kPa。所有杨氏模量的变化都是显著的 ($p < 0.001$),但是幅度相对于水冲冲压系统,有一些差别:对于胰蛋白酶消化组,硬度系数相对下降 $(60 \pm 7)\%$;对于胶原蛋白酶组,下降只有 $(22 \pm 8)\%$ 。水冲冲压系统获得的硬度系数远远大于通过接触式印压获得的杨氏模量,这说明在相同压力下,水冲冲压系统所产生的形变远远小于接触式印压头产生的形变,这个不同可能来源于跟软骨的互作用的印压头属性的不同,我们现在还不知道这两种不同系统印压的具体区别,将会在以后进行进一步研究。通过后续研究,希望可以在同一种材料上面,从两个系统拿到一个完全可以比较的反映材料力学特性的参数,例如杨氏模量。另外,对于胶原蛋白酶消化作用,这两个系统测得的硬度变化有比较大的区别 (52% 对 22%),其中的原因也有待于进一步研究。

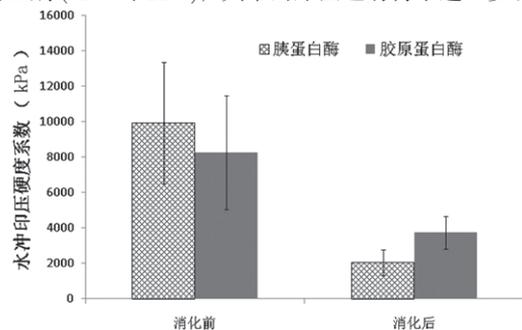


图 5 软骨硬度系数经过两种蛋白酶消化前后的对照

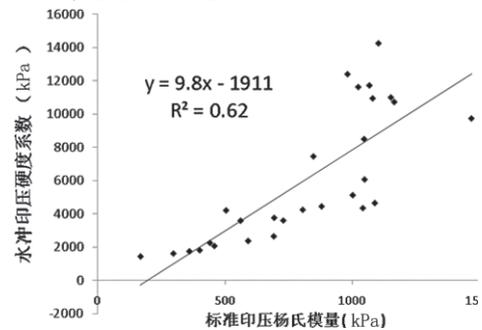


图 6 软骨硬度系数和杨氏模量的相关性

3 结束语和展望

本文主要介绍了一种超声水冲冲压技术,并介绍了其

小型化仪器设计过程和其在评估软骨力学特性变化当中的应用。主要研究结果表明该系统设计有效,在软骨上面测试得到的硬度系数跟标准测量结果具有很强的相关性,能准确测得软骨在经过蛋白酶消化分解这个模拟软骨退化的过程当中硬度的变化,具有很好的应用前景。接下来我们会结合超小型的超声仪器,如心脏血管超声(IVUS)探头^[21],进一步改进本文当中小型化探头的设计,使其能真正应用在关节内窥镜上面。根据超声影像获得的软骨形态学特性和声学特性,再结合超声印压获得的力学特性参数,我们可以定义一个反映软骨综合质量的参数,用以在活体上面检测软骨的退化程度或者修复效果。笔者相信这样的系统一定可以给关节软骨疾病的研究领域提供一个新的微创的、低成本的检测方法。

致谢

作者感谢张忠伟、何俊峰在探头机械加工和电路测试当中提供的帮助。本研究部分经费来自香港研究资助局(PolyU5354/08E)和香港理工大学(J-BB69)。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] Appleyard RC, Swain MV, Khanna S, et al. The accuracy and reliability of a novel handheld dynamic indentation probe for analysing articular cartilage [J]. *Phys Med Biol*, 2001,46(2):541-550.
- [3] Dashefsky JH. Arthroscopic measurement of chondromalacia of patella cartilage using a microminiature pressure transducer [J]. *Arthroscopy*, 1987,3(2):80-85.
- [4] Lyyra T, Jurvelin J, Pitkanen P, et al. Indentation instrument for the measurement of cartilage stiffness under arthroscopic control [J]. *Med Eng Phys*, 1995,17(5):395-399.
- [5] 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.
- [6] Laasanen MS, Toyras J, Hirvonen J, et al. Novel mechano-acoustic technique and instrument for diagnosis of cartilage degeneration [J]. *Physiol Meas*, 2002,23(3):491-503.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Lu MH, Zheng YP, Lu HB, et al. Evaluation of bone-tendon junction healing using water jet ultrasound indentation method [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2009,35(11):1783-1793.
- [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] 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.
- [13] 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.
- [14] Nieminen HJ, Zheng YP, Saarakkala S, et al. Quantitative assessment of articular cartilage using high-frequency ultrasound: research findings and diagnostic prospects [J]. *Crit Rev Biomed Eng*, 2009,37(6):461-494.
- [15] 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.
- [16] Shingleton WD, Hodges DJ, Brick P, et al. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover [J]. *Biochem Cell Biol*, 1996,74(6):759-775.
- [17] Patil SG, Zheng YP, Wu JY, et al. Measurement of depth-dependence and anisotropy of ultrasound speed of bovine articular cartilage in vitro [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2004,30(7):953-963.
- [18] Bader DL, Kempson GE, Egan J, et al. The effect of selective matrix degradation on the short-term compressive properties of adult human articular cartilage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992,1116(2):147-154.
- [19] Kempson GE, Muir H, Pollard C, et al. Tensile properties of cartilage of human femoral condyles related to content of collagen and glycosaminoglycans [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1973,297(2):456-472.
- [20] Huang YP, Zheng YP. Development and phantom test of a minimized water-jet ultrasound indentation system for arthroscopic measurement of articular cartilage integrity [C]. // Lim CT, Goh JCH. 6th World Congress on Biomechanics, IFMBE Proceedings, 2010, 31:903-906.
- [21] Huang YP, Zheng YP. Intravascular ultrasound (IVUS): a potential arthroscopic tool for quantitative assessment of articular cartilage [J]. *Open Biomed Eng J*, 2009,3:13-20. 