科学通报 2014 年 第 59 卷 第 27 期：2645 ~ 2651
进 展 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

关节软骨和骨关节炎的傅里叶变换红外光谱学显微成像研究进展

肖芝燕[②③†], 张学喜[①†], 尹建华[①*]

① 南京航空航天大学生物医学工程系, 南京 210016;
② 南京航空航天大学材料科学与技术学院, 南京 210016;
③ School of Medicine, Washington University, St. Louis, MO 63110, USA
† 同等贡献作者
* 联系人, E-mail: yin@nuaa.edu.cn

2014-03-10 收稿, 2014-05-14 接受, 2014-07-28 网络版发表
国家自然科学基金(61378087)、高等学校博士学科点专项科研基金(20133218120017)和南京航空航天大学引进人才科研启动基金(1003-56YAH13005)资助

摘要 傅里叶变换红外光谱学显微成像(FTIRI)将傅里叶变换红外光谱测量和微区成像技术有机结合起来, 同时采集样品的分子光谱和表面形貌信息, 可以获得样品空间各微区位置的组成和分子结构信息. 本文简述了该成像系统的构成、特点和工作原理, 介绍了 FTIRI 在生物医学/光学领域新开辟的关节软骨光谱成像. 重点介绍了该技术用于研究正常关节软骨和骨关节炎软骨所取得的代表性成果和进展, 分析了部分局限性及其在该领域的未来发展前景.

关键词
红外光谱
显微成像
高分辨
关节软骨
骨关节炎

傅里叶变换红外(Fourier transform infrared, FTIR)光谱技术在 20 世纪 80 年代后期兴起, 已被广泛应用于材料科学、化学、药理学和法医学等领域, 在生物医学研究中也起到越来越重要的作用[1]. 该方法便于进行物质结构和成分分析, 如组织的成分组成、蛋白质二级结构和相互作用、DNA 构象和结构转变、脂质构象的排序和相行为等. 然而, FTIR 光谱测量也存在明显的局限性, 如制样的特殊性、样品分布及所获样品信息的均匀化(所测得的光谱是整个采样区域的平均光谱)、所需样品的数量等, 由此限制了红外光谱在生物组织研究方面的应用.

FTIR 光谱的这些局限性促使人们将显微镜和红外光谱仪耦合进行局域或微量分析, 可针对非均质材料的研究. 人们发展了逐点采集数据(mapping)的红外显微镜[2]和基于焦平面阵列探测器的 FTIR 成像光谱仪[3]. 然而, 初期的这些探测器存在一些明显缺点, 比如成像复杂、不易操作、有较高噪声等. 2001 年, PE 公司推出一套傅里叶变换红外光谱成像(FTIR imaging, FTIRI)系统, 即采用高灵敏度的线性阵列探测器(16×1)并耦合一个可快速运动的样品台, 采集速度较快. 该仪器允许红外光谱成像以独立的样品尺寸采集, 所成图像中的每一个像素平面对应一个该位置区域的红外光谱, 通过红外光谱的吸收(或透射)与波长的变化关系, 可得到一个平均吸收率(或透过率), 该数值被对应于一定的颜色, 即假色(artifact)来表示该像素所在位置样品的形貌. 此系统不仅实现了对样品的形貌成像, 同时可以获得样品的光谱和空间各位置的组成及结构信息, 使得样品信息的表达更丰富、形象和直观.

关节软骨是一种透明的结缔组织, 覆盖在骨关节表面. 其表面光滑, 辅以关节滑液, 有利于减少关节摩擦、承受机械压力和缓冲震动, 由此保证躯体运动灵活, 在生命体活动中发挥着极其重要的作用. 关节软骨主要由 II 型胶原蛋白、蛋白多糖(PG, 主要是

引用格式: 肖芝燕, 张学喜, 尹建华. 关节软骨和骨关节炎的傅里叶变换红外光谱学显微成像研究进展. 科学通报, 2014, 59: 2645–2651
Xiao Z Y, Zhang X X, Yin J H. Fourier transform infrared spectroscopic imaging on articular cartilage and osteoarthritis (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 2645–2651, doi: 10.1360/N972014-00158

硫酸软骨素 CS-6)、水和少量无机离子组成. 胶原蛋白构成纤维网络的基本架构并有效固定住蛋白多糖. 后者则能更好地保证软骨的弹性和耐压性. 正是由于两者的有机组合(构成软骨基质), 从而可以有效地保持水含量以及与滑液的离子交换, 承载人体运动和负重. 关节软骨从表面到底层的钙化区之间可分成 3 个区, 即表层区(superficial zone, SZ)、过渡期(transitional zone, TZ)和放射区(radial zone, RZ). 3 个分区内, 胶原纤维的结构排列各不相同, 一旦出现胶原结构的破坏或蛋白多糖的流失, 则可能导致骨关节炎(即关节软骨退化病变, OA).

如前所述, FTIRI 技术较高的空间分辨率和丰富的光谱信息, 有利于研究和表征生物组织表面到内部的结构和成分分布差别, 可提供更精确的定量描述. 因此, FTIRI 适宜进行与年龄和位置等相关的关节软骨的各向异性、成分及其含量变化等研究, 从而定量判定软骨的空间差异、主成分含量变化及环境或具体的损伤对软骨退变或 OA 的影响, 为生物医学研究开辟了一个新的研究领域并提供了诊断和治疗依据. 本文针对 FTIRI 在关节软骨及 OA 方面的研究进展进行了综述.

1 红外成像系统及原理

1.1 FTIRI 系统

现有的红外光谱显微成像系统基本上是由红外光谱仪和红外显微镜系统两大部分组成. 以 PE 公司的 Spotlight 300 系统为例, 该系统是由一个红外光谱仪耦合了一个 Spotlight 300 显微镜装置. 系统内部包含一个 16×1 单元(400 μm×25 μm)汞镉碲(MCT)线性阵列探测器和一个单点(100 μm×100 μm)MCT 探测器, 并以液氮冷却. 所探测的光谱范围可从 720 cm^{-1}(后者甚至可更低一些)到 4000 cm^{-1}. 显微装置中配以物镜和聚光镜实现成像的 6×倍数放大, 红外成像的空间分辨率可达 25×25 和 6.25×6.25 μm^2/pixel 正常空间分辨率. 可见光成像(visual image)的收集则通过一个电荷耦合装置(CCD)相机结合计算机控制的显微镜样品台的运动最终实现, 是在白光发光二极管(LED)的照射下“拼接”而成. 而后, 在可见光成像区域内选择感兴趣的目标区域进行红外光谱成像. 因为系统集成阵列探测器和运动样品台, 所以红外光谱成像数据采集速度较快.

1.2 FTIRI 系统工作原理

FTIRI 有多种测量或成像模式, 主要包括反射模式、透射模式和衰减全反射(ATR)模式(图1). 成像时需要根据样品的特点、性质和测量要求进行选择, 同时所采用的载玻片也会截然不同. 对于透射模式(图 1 (a)), 可见光和红外光均从显微系统的底部进入, 从样品透射后进入显微镜, 而后被探测器接收. 此模式下红外成像时多采用对红外线光透明的 BaF_2晶片作为载玻片. 透射模式可提供最好的信噪比和较好的光谱质量, 但是光谱强度却易受样品厚度和样品吸光度影响, 更适用于测量透光性较好的样品.

由于 BaF_2 晶体自身的物理化学性质、价格和样品属性, 相对于透射模式, 反射模式则是在制样和操作上更易实现的一种成像模式. 为保证成像和光谱质量, 在中红外波段多采用特制的表面镀银的载玻片实现红外光谱显微成像, 不仅降低了实验成本, 而且可顺利实现可见光成像和红外光谱显微成像, 并

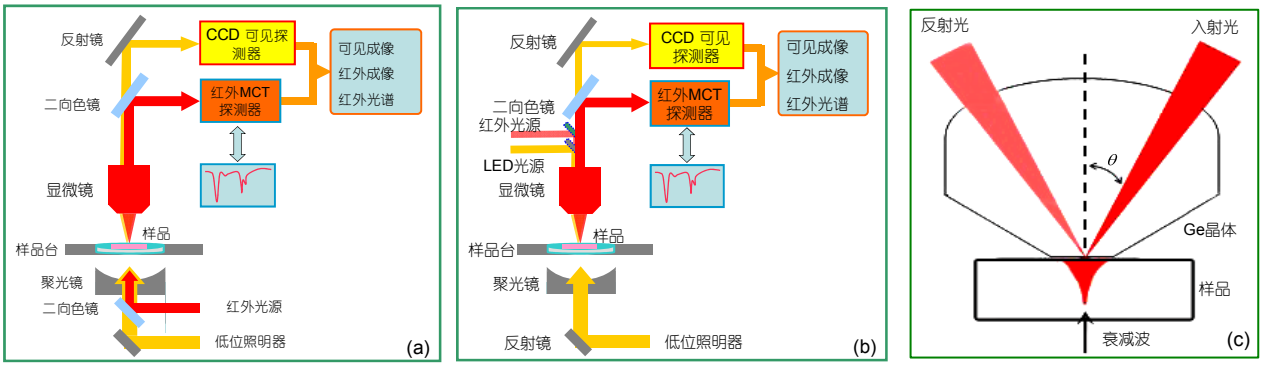

图 1 (网络版彩色)傅里叶变换红外光谱学成像的原理示意图

(a) 透射模式; (b) 反射模式; (c) 衰减全反射模式

提高红外成像的质量. 这主要是因为此种载玻片对LED 发出的白光透射而对红外光反射. 可见成像时, 白光同时从系统底部和上部照射, 经载玻片透反射后再经显微镜收集, 最后被 CCD 探测器接收; 红外成像时, 红外光则从顶部入射, 经显微镜聚集和对反射光收集, 最后成像于 MCT 探测器(图 1(b)).

对于衰减全反射模式, 主要采用折射率较大的晶体, 以实现更高的空间分辨率并获得更丰富的形态和结构信息, 实际上属于反射模式的范畴. 归因于衰减全反射的原理(图1(c))[4], 其对载玻片的要求并不高, 将衰减全反射晶体置于显微装置下, 且和样品紧密接触即可实现衰减全反射模式测量.

成像模式确定之后, 将软骨样品切片置于 FTIRI 系统样品台上, 进行 Z 轴方向的高度调节, 实现 LED 白光和入射红外光分别有效聚焦到待测样品位置. 首先实现可见光成像, 而后移动样品台在预定的可见光成像范围内选择 ROI(region of interest)进行红外光谱显微成像. 此时系统会联动实现样品台的精确移动、探测器对样品的同步扫描和计算机数据处理, 从而获得 ROI 的各彩色像素、相应的红外光谱以及化学成分图像(chemical image), 从而可形象直观地分析样品结构、组分及其空间分布和变化等.

2 FTIRI 在关节软骨和骨关节炎研究中的应用

在关节软骨及 OA 的研究中, 人们采用的测试手段主要是生物化学分析[5]、磁共振成像[5]、生物力学测量[6]和各种形式的显微技术[7~10]. 生物化学和生物力学能探测大块组织或者较厚的平行切片, 却不能获得高分辨率成像和小体积浓度含量. 磁共振成像功能虽然很强大但只能测量软骨的蛋白多糖含量, 不能同时探测胶原蛋白的含量和分布. 对于大多数显微技术(如光学显微镜、扫描和透射显微镜)通常仅用于研究组织的形态学和超结构, 而不能得到分子浓度. FTIRI 则可同时进行关节软骨的主成分含量分布和胶原纤维结构方向的研究. 自 2000 年 FTIRI 系统真正商业化开始, FTIRI 即开始被用于关节软骨的研究, 主要体现在以下 3 个相互交叉方向.

2.1 FTIRI 用于关节软骨结构变化研究

2001 年, Camacho 等人[11]运用 FTIRI 分析正常的牛关节软骨, 鉴定了软骨中对其红外光谱有贡献的特定分子成分. 他们发现, 在软骨切片不同的分区, 主要非水成分(胶原蛋白和蛋白多糖)红外光谱特征吸收带的强度发生了明显变化, 从而反映了这些特殊成分的质量差别或两者的含量比. 图 2 所示即为正常关节软骨切片的可见成像、FTIR 成像、化学成分成像及在不同分区的软骨基质的红外光谱[12]. 偏光实验发现, 在不同分区, 胶原蛋白空间分布也是不同的. 这一研究结果表明, FTIRI 可被用于评估各向异性组织的复杂病变.

因为胶原蛋白分子的排列决定了其在连接组织内的功能属性, 所以进行这些生物大分子排列结构的研究至关重要. Bi 等人[13]采用偏光显微镜(PLM)方法和 FTIRI-偏光技术, 探测了胶原蛋白分子在马软骨组织和人的关节炎组织切片当中的排列. 他们发现, FTIRI-偏光技术研究人的 OA 软骨相对于偏光显微镜方法, 可得到更明显的分区和排列, 意味着前者在探测分子排列变化方面要优于后者.

Xia 研究组[8,14]利用 FTIRI 对狗关节软骨的胶原纤维方向及软骨分区进行了详细研究. 在入射光或探测光路中引入偏振技术, 发现关节软骨组织的 4 个红外特征带除糖(sugar)带外, 酰胺(amide)I, II 和 III 带的吸收强度随软骨深度变化(从 SZ 经 TZ 到 RZ)而变化, 均呈现各向异性. 酰胺 I 和酰胺 II(III)的线型在这个变化过程中刚好相反. 据此判断出胶原纤维的排列在表层区是和软骨表面平行, 而在深层区变为垂直排列[15]. 进一步研究发现了各特征带线型发生各向异性的翻转点(在 TZ), 且位置深度一致[16]. 在此基础之上发展了红外二向色性方法, 用于辨别关节软骨亚结构, 即各分区的边界[14,17].

FTIRI 各向异性进一步研究结果显示, 在外部压力作用下, 这两个酰胺组分(键方向和外部压力垂直, 即表层区的酰胺 II 和放射区的酰胺 I)仍保持各向异性[8]. 而此时对于表层区的酰胺 I 和放射区的酰胺 II, 其键方向平行于外部压力方向, 各向异性则呈现明显变化. 揭示了静负荷条件下随着软骨深度的改变, 其形态结构和成分分布的适应性变化[8].

若沿着平行于软骨表面方向进行组织切片, 在 SZ 所得平行切片的两特征带, 酰胺 I 和酰胺 II 均具有明显(相反)的红外各向异性; 而在放射区的平行切片的酰胺 I 仍显示各向异性, 酰胺 II 的吸收则近乎各向同性[18], 进一步揭示了酰胺 I 和 II 的键方向是垂直的. 更详细的研究显示, 从软骨表面开始, 随着软骨

深度的增加, 在垂直软骨表面方向(即竖直切片), 酰胺的各向异性增加, 而在平行方向所得切片随深度增加各向异性逐渐较小[19]. 在竖直方向, Xia 课题组[19,20]发现, 糖带在放射区至潮线范围显示可分辨的各向异性, 从而证明了 FTIRI 被成功用于探测关节软骨的三维大分子结构排列及内部纤维模型的拱廊结构, 同时有助于检测软骨退变或早期软骨病变.

Rieppo 等人[21]采用 FTIRI 研究了不同生长阶段猪的关节软骨内部胶原纤维排列, 发现胶原蛋白的排列随年龄的增长逐渐发生改变. 4 个月时, 大部分胶原纤维的排列在整个组织深度都是平行于软骨表面的. 随着骨骼的逐渐成熟, 到第 21 个月时, 放射区的纤维走向变得垂直于软骨表面, 同时随软骨深度增加胶原蛋白含量分布发生变化并伴随着胶原蛋白总含量的增加.

2.2 FTIRI 用于关节软骨成分含量研究

2001 年 FTIRI 技术被尝试用于研究牛鼻软骨(bovine nasal cartilage, BNC)主成分含量[22], 即研究胰蛋白酶处理过的 BNC 以及原生的和人工培养的 BNC 样品基质成分的空间分布. 此研究检测到胰蛋白酶处理过的 BNC 中只有痕量硫酸软骨素, 原生 BNC 中胶原蛋白含量占(54±13)%, 硫酸软骨素含量只有(37±16)%; 而在人工培养的软骨当中, 硫酸软骨素和胶原蛋白的含量分别为(15±5)%和(73±6)%, 明显低于(34%)和高于(5%)生化检测结果. 后两种情况定量计算出现的明显错误, 主要是由于所采用试剂和对蛋白质的标记缺乏某种特征性而导致. 也有人利用特征谱带强度(比)进行关节软骨主成分含量和分布的研究, 但仅可以进行定性分析[11,13,23]. 这是因为软骨中主成分(胶原蛋白和蛋白多糖)间的特征谱带大范围重叠, 极大影响了对主成分含量的分析, 给 FTIRI 定量研究带来了很大难度. Rieppo 等人[24,25]把 FTIRI 用于关节软骨和 OA 主成分含量的研究, 尝试采用二次求导和峰域计算等光谱处理方法研究蛋白多糖含量及其变化, 定性效果有所提高.

2005 年, FTIRI 被用于检验在人的 OA 软骨中定量测量胶原蛋白和蛋白多糖的组成和分布的可行性[26]. 结合偏最小二乘(PLS)分析得到在其培养的 OA 软骨中二主成分相对浓度分别是(38±10)%和(22±9)%. 发现从 SZ 到 RZ, 硫酸软骨素的含量逐渐增加, 中心感染区的硫酸软骨素明显少于周围区域, 软骨病变和 SZ 区域硫酸软骨素的减少密切相关.

Bi 等人[27]将 FTIRI 技术结合磁共振成像(MRI)探测患有诱发 OA 的兔子的软骨组成和结构变化(通过韧带切割和半月板切除术实现的). 和标准软骨相比, 在韧带切割手术后的 2~4 周, 软骨蛋白多糖含量明显减少, 胶原蛋白(网络)的完整性在手术后 2~10 周发生变化, 但胶原蛋白含量没有明显变化. 这些 OA 早期关节软骨构成的变化和 MRI 所得结果相互印证. 采用 FTIRI 光谱特征带峰域比方法研究发现, 随着软骨的退化, 软骨细胞附近基质的蛋白多糖含量增加, 胶原蛋白含量不变, 但完整性降低. 对马软骨受损处的修复相对于临近的正常组织, 也显示出蛋白多糖含量流失和胶原蛋白分布的变化. 在大部分修复组织, 胶原纤维随机排列[23].

Yin 等人[28]将 FTIRI 和化学计量学中的主成分回归和 PLS 算法相结合, 系统研究了软骨主成分含量及分布, 在空间高分辨率(6.25 μm/pixel)的条件下计算出 BNC 两种主成分的含量及其分布. 结果发现, 在 BNC 中, 胶原蛋白和蛋白多糖均匀分布且含量接近, 这和生化方法所得结果非常吻合. 在关节软骨的研究中, 则发现胶原蛋白的含量高于蛋白多糖, 二者百分含量比略高于 60/40[29]. 两种主成分随软骨深度的分布是非均匀分布(干重条件下), 胶原蛋白在关节软骨头尾两端浓度均高于其在中间段位置的浓度, 而蛋白多糖则恰好相反[29]. 这种主成分含量分布恰好和关节软骨的生理功能属性是相吻合的. 还原湿重条件下所得结果和 μMRI 所得结果相对比是非常一致的. 在 FTIRI 高空间分辨率条件下, 还探测到在 OA 早期的关节软骨中, SZ 蛋白多糖发生明显损失, 胶原蛋白含量无明显变化, 但胶原纤维完整度有一定程度的降低[29]. 这一结果和前期对比研究[12,27]结果是一致的. 图 3 所示即为 OA 早期关节软骨切片的可见成像、FTIR 成像和化学成分成像[12], SZ 区域显示明显的蛋白多糖损失. 可见, FTIRI 结合化学计量学方法能实现在 10 μm 量级分辨率精确地探测主成分含量分布, 去除微成分和噪声的干扰, 从而使关节软骨主成分含量的定量研究成为可能.

2.3 FTIRI 用于骨关节炎的监测和诊断

West 等人[30]将 FTIRI 和光纤探针相结合尝试研究受损的关节软骨, 将光纤探针和关节表面相接触测量其红外光谱. 通过对红外光谱参数(峰高和峰域)

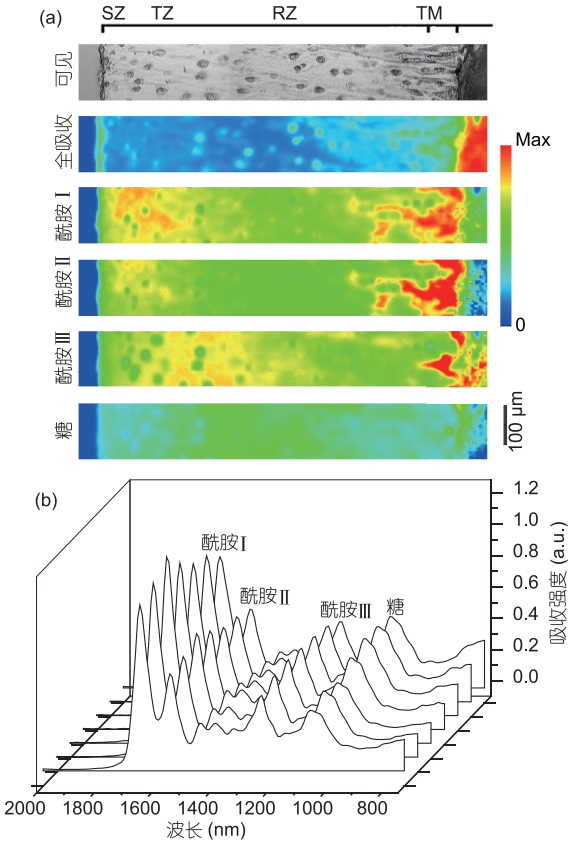

图 2　健康关节软骨切片的系列成像(a)和红外光谱(b)

(a) 从上到下依次是可见成像、FTIR 全吸收成像(FTIRI)、各吸收带的化学成分成像(酰胺 I 带、II 带、III 带和糖带). 色棒所示最大吸收从上到下依次是 1.45, 0.5, 0.35, 0.15 和 0.3[28]. (b) 光谱分别是在该软骨切片的表层区、过渡区和放射区(基质)的红外光谱图像中每间隔 62.5 μm 提取的

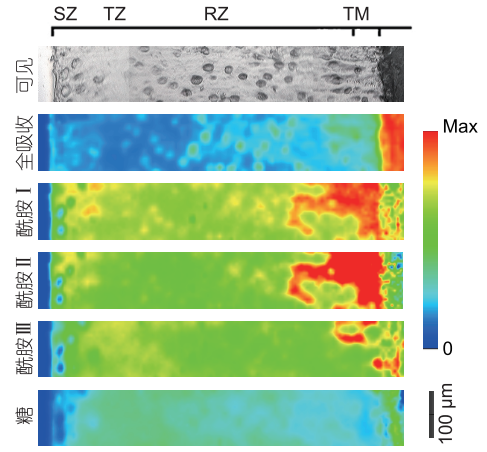

图 3　OA 软骨切片的系列成像

从上到下依次是可见成像、FTIR 全吸收成像(FTIRI)、各吸收带的化学成分成像(酰胺 I 带、II 带、III 带和糖带). 色棒所示最大吸收从上到下依次是 1.45, 0.5, 0.35, 0.15 和 0.3[28]

的对比来判断 OA 软骨表面的病变程度. 研究发现, II 型胶原蛋白的红外吸收带随着软骨退变而发生变化. 退变严重部位的酰胺 II/1338 cm^{-1} 峰域比值增加, 1238/1227 cm^{-1} 降低. 类似的变化同样出现在 FTIRI 光谱分析中. 酰胺 II, III 和 1338 cm^{-1} 带显示一致的光谱差异分别对应于 Collins 1 级和 3 级的软骨组织. 所以这些特征带不仅和胶原蛋白的退变有关, 同时还可能预示着软骨的病变程度.

Hanifi 等人[31]的研究中, FTIRI 结合光纤探针和 PLS 算法被用来鉴别软骨组织中的胶原蛋白类型. 发现正常软骨当中主要是 II 型胶原蛋白和蛋白多糖. 而在 OA 修复的软骨中, 则主要是 I 型和 II 型胶原蛋白, 这与通过免疫组织化学方法所得到的结果一致. 半月板内外侧区域则主要分别由 II 和 I 型胶原蛋白组成.

本课题组[32]最近的研究中, 采用 FTIRI 结合计量学方法, 尝试性进行了定量预测 OA 早期不同阶段关节软骨主成分的含量和 OA 的病理研究. 结果发现, 随韧带手术后时间的延长, 蛋白多糖损失增加, 但是不同表面部位及对应的分区位置(SZ, TZ, RZ), 蛋白多糖损失的规律并不相同; OA 发展同时也诱发对侧关节的软骨发生退化(蛋白多糖流失及胶原纤维的完整性降低). 以上这些研究说明, FTIRI 和其他方法结合起来具有很大的潜力, 可用于 OA 早期病变和软骨组织修复的临床原位监测.

2.4　FTIRI 的若干局限

FTIRI 对软骨和 OA 的研究也有一些局限性. 首先是软骨样品制备较繁琐, 目前多局限于组织切片, 常采用固定后包埋的方法, 即包埋在可变形基底里面, 从而可以用低温切片机进行切片制样. 这种方法比较耗时, 而且所采用包埋材料的光谱, 某种程度上会干扰软骨成分的光谱, 影响主成分含量的分析. 第二, 针对于人体研究的活检样品(即使是离体样品)较难于获得, 因而可用于分析的样品数量及研究结果通用性受到限制. 第三, 因为显微系统对客观条件的要求较高, FTIRI 仪器比较昂贵, 限制了其在临床应用方面的发展.

3　结论和展望

FTIRI 实现了同步采集样品的分子光谱和表面形貌, 可同时获得样品光谱和空间各位置的组成和结构信息, 实现了样品成分的可视化、微区化、图像

和光谱分析的高精度和高灵敏度. 在各种软骨研究中, 精确探测及高空间分辨率下主成分含量分布和结构排列变化探测, 正被应用于 OA 疾病的监测和诊断研究中.

但目前为止, FTIRI 直接应用于 OA 临床监测和诊断仍有较大难度, 和微光纤探针及其他方法的联用是其在临床监测和诊断方面的重要发展方向. 另一方面, 人们对 OA 的发病机理仍然不清楚, 不能确定胶原纤维的破坏和蛋白多糖流失的因果关系, 特别是 OA 发病早期的成分和结构变化. 因此, 未来对关节软骨大分子之间的相互作用机制、主成分结构和含量分布之间的功能关系等基础研究仍需加强, 同时需要尽快实现对组织退化和修复过程的早期监测, 并从分子水平上揭示 OA 发病机理. FTIRI 恰好提供了此方面的契机.

虽然囿于 FTIRI 的部分局限性, 但其所带来的技术和信息突破, 特别是和其他方法的联用, 获得了很多新的研究和应用成果, 将有助于人们在分子水平上认识 OA 发病机理, 进而有效地预防和治疗关节疾病. FTIRI 也将对其他学科领域, 如组织工程、生物功能材料、医药、生物医学、环境分析等学科的研究带来深远影响.

参考文献

1 Petibois C, Deleris G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: Towards molecular histopathology. Trends Biotechnol, 2006, 24: 455–462

2 Wood B R, Chiriboga L, Yee H, et al. Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium. Gynecol Oncol, 2004, 93: 59–68

3 Lewis E N, Treado P J, Reeder R C, et al. Fourier transform spectroscopic imaging using an infrared focal-plane array detector. Anal Chem, 1995, 67: 3377–3381

4 YIN J H, Xia Y. Chemical visualization of individual chondrocytes in articular cartilage by attenuated-total-reflection Fourier transform infrared microimaging. Biomed Opt Express, 2011, 2: 937–945

5 Zheng S, Xia Y, Bidthanapally A, et al. Damages to the extracellular matrix in articular cartilage due to cryopreservation by microscopic magnetic resonance imaging and biochemistry. Magn Reson Imaging, 2009, 27: 648–655

6 Wilson W, Huyghe J M, van Donkelaar C C. Depth-dependent compressive equilibrium properties of articular cartilage explained by its composition. Biomech Model Mechanobiol, 2007, 6: 43–53

7 Chen S S, Falcovitz Y H, Schneiderman R, et al. Depth-dependent compressive properties of normal aged human femoral head articular cartilage: Relationship to fixed charge density. Osteoarth Cart, 2001, 9: 561–569

8 Xia Y, Alhadlaq H, Ramakrishnan N, et al. Molecular and morphological adaptations in compressed articular cartilage by polarized light microscopy and Fourier-transform infrared imaging. J Struct Biol, 2008, 164: 88–95

9 Tan A H C, Mitra A K, Chang P C C, et al. Assessment of blood-induced cartilage damage in rabbit knees using scanning electron microscopy. J Orthop Surg, 2004, 12: 199–204

10 Yamamoto K, Shishido T, Masaoka T, et al. Morphological studies on the ageing and osteoarthritis of the articular cartilage in C57 black mice. J Orthop Surg, 2005, 13: 8–18

11 Camacho N P, West P, Torzilli P A, et al. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. Biopolymers, 2001, 62: 1–8

12 Yin J H, Xia Y, Xiao Z Y. Comparison of macromolecular component distributions in osteoarthritic and healthy cartilages by Fourier transform infrared imaging. J Innov Opt Health Sci, 2013, 6: 1350048

13 Bi X, Li G, Doty S B, et al. A novel method for determination of collagen orientation in cartilage by Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS). Osteoarth Cart, 2005, 13: 1050–1058

14 Ramakrishnan N, Xia Y, Bidthanapally A, et al. Determination of zonal boundaries in articular cartilage using infrared dichroism. Appl Spectrosc, 2007, 61: 1404–1409

15 Xia Y, Ramakrishnan N, Bidthanapally A, et al. The depth-dependent anisotropy of articular cartilage by Fourier-transform infrared imaging (FTIRI). Osteoarth Cart, 2007, 15: 780–788

16 Ramakrishnan N, Xia Y, Bidthanapally A. Polarized IR microscopic imaging of articular cartilage. Phys Med Biol, 2007, 52: 4601–4614

17 Lee J H, Xia Y. Quantitative zonal differentiation of articular cartilage by microscopic magnetic resonance imaging, polarized light microscopy, and Fourier-transform infrared imaging. Microsc Res Technol, 2013, 76: 625–632

18 Ramakrishnan N, Xia Y, Bidthanapally A. Fourier-transform infrared anisotropy in cross and parallel sections of tendon and articular cartilage. J Orthop Surg Res, 2008, 3: 48

19 Xia Y, Mittelstaedt D, Ramakrishnan N, et al. Depth-dependent anisotropies of amides and sugar in perpendicular and parallel sections of articular cartilage by Fourier transform infrared imaging (FTIRI). Microsc Res Tech, 2011, 74: 122–132
20 Yin J H, Xia Y, Ramakrishnan N. Depth-dependent anisotropy of proteoglycan in articular cartilage by Fourier transform infrared imaging. Vib Spectrosc, 2011, 57: 338–341
21 Rieppo J, Hyttinen M M, Halmesmaki E, et al. Changes in spatial collagen content and collagen network architecture in porcine articular cartilage during growth and maturation. Osteoarth Cart, 2009, 17: 448–455
22 Potter K, Kidder L H, Levin I W, et al. Imaging of collagen and proteoglycan in cartilage sections using Fourier transform infrared spectral imaging. Arthr Rheum, 2001, 44: 846–855
23 Bi X, Yang X, Bostrom M P, et al. Fourier transform infrared imaging spectroscopy investigations in the pathogenesis and repair of cartilage. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758: 934–941
24 Rieppo L, Saarakkala S, Narhi T, et al. Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of Fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. Osteoarth Cart, 2012, 20: 451–459
25 Rieppo L, Narhi T, Helminen H J, et al. Infrared spectroscopic analysis of human and bovine articular cartilage proteoglycans using carbohydrate peak or its second derivative. J Biomed Opt, 2013, 18: 097006
26 David-Vaudey E, Burghardt A, Keshari K, et al. Fourier transform infrared imaging of focal lesions in human osteoarthritic cartilage. Eur Cell Mater, 2005, 10: 51–60
27 Bi X, Yang X, Bostrom M P G, et al. Fourier transform infrared imaging and MR microscopy studies detect compositional and structural changes in cartilage in a rabbit model of osteoarthritis. Anal Bioanal Chem, 2007, 387: 1601–1612
28 Yin J H, Xia Y. Macromolecular concentrations in bovine nasal cartilage by Fourier transform infrared imaging and principal component regression. Appl Spectrosc, 2010, 64: 1199–1208
29 Yin J H, Xia Y, Lu M. Concentration profiles of collagen and proteoglycan in articular cartilage by Fourier transform infrared imaging and principal component regression. Spectrochim Acta A, 2012, 88: 90–96
30 West P A, Bostrom M P G, Torzilli P A, et al. Fourier transform infrared spectral analysis of degenerative cartilage: An infrared fiber optic probe and imaging study. Appl Spectrosc, 2004, 58: 376–381
31 Hanifi A, McCarthy H, Roberts S, et al. Fourier transform infrared imaging and infrared fiber optic probe spectroscopy identify collagen type in connective tissues. PLoS One, 2013, 8: e64822
32 Yin J H, Xia Y. Proteoglycan concentrations in healthy and diseased articular cartilage by Fourier transform infrared imaging and principal component regression. Spectrochim Acta A, 2014, 133: 825–830

Fourier transform infrared spectroscopic imaging on articular cartilage and osteoarthritis

XIAO ZhiYan[2,3], ZHANG XueXi[1] & YIN JianHua[1]

[1] *Department of Biomedical Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China;*
[2] *College of Materials Science and Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China;*
[3] *School of Medicine, Washington University, St. Louis, MO 63110, USA*

Fourier transform infrared spectroscopic imaging (FTIRI) system can simultaneously collect molecular spectra and morphological information by effectively integrating Fourier transform infrared spectroscopy (FTIRS) and microimaging technique. Thus, the components and molecular structure at micro-specimen can be obtained by FTIRI analysis. This paper introduced the development, operating principle and features of FTIRI, especially the research on cartilage by FTIRI that has become a new research area in biomedical optics. The typical findings and progress of the researches on normal and osteoarthritic cartilages (degeneration) by FTIRI were reviewed in detail, as well as the limitations and prospects of FTIRI in future.

infrared spectroscopy, microimaging, high resolution, articular cartilage, osteoarthritis

doi: 10.1360/N972014-00158