

运用四参数三相混合模型和瞬态超声成像技术提取关节软骨的弹性模量

牛海军 王 青 郑永平 蒲 放

(北京航空航天大学生物工程系, 北京 100083; 香港理工大学复康科技中心, 香港 00852. E-mail: hjniu@buaa.edu.cn)

摘要 作为一种覆盖在关节骨表面的重要承重组织, 关节软骨的结构或成分的细微变化都会造成软骨的退化, 最终导致如骨关节炎等疾病的发生, 因此研究软骨的力学性质有重要意义. 应用 50 MHz 高频瞬态超声系统观测关节软骨随深度变化的渗透性膨胀行为, 依据超声回波计算得到软骨不同深度的应变变量, 然后运用改进的四参数三相混合模型计算软骨的轴向弹性模量, 实验结果与模型预测趋势基本一致. 该研究表明利用瞬态超声技术, 可以有效观测软骨内部随深度变化的膨胀行为, 结合四参数三相混合模型, 可以更准确的描述关节软骨的力学性质.

关键词 关节软骨 瞬态超声 三相模型 渗透压

关节软骨是一种特殊形式的结缔组织, 表面光滑, 附有滑液, 可减小关节运动时的摩擦力, 独特的组织和结构决定了它独特的力学性质. 软骨组织由细胞、纤维和基质组成, 基质为水、蛋白多糖、胶原、少量脂肪和无机盐类. 蛋白多糖具有负电荷性, 多呈大分子聚合体状态; 胶原排列成网架结构, 决定软骨的形状和硬度; 蛋白多糖和水使得软骨富有弹性. 随着技术进步, 如扫描、透视和生化分析技术的发展, 人们对软骨的生理活动有了新的认识.

在生物状态下, 软骨中的蛋白多糖和水结合, 会在软骨组织间隙内产生膨胀压, 膨胀压的大小主要由唐南效应决定, 还受电荷的影响^[1]; 同时该膨胀压受胶原纤维网架结构的限制, 蛋白多糖的弹性和胶原纤维的张力之间保持着平衡, 这个平衡在维持关节软骨正常的生物力学行为方面具有重要作用. 在关节炎等病变条件下, 由于软骨组织的结构与组成发生改变(如蛋白多糖浓度的降低、胶原与蛋白多糖成分的变化、胶原连接结构的改变等等), 上述力的平衡被打破, 软骨组织就会膨胀, 组织的力学属性随之变化. 关节软骨的膨胀量主要由胶原阵列的结构和属性决定, 随着软骨深度的变化, 胶原阵列的结构、胶原纤维的方向和蛋白多糖的浓度都在变化^[2]. 过去的研究显示, 软骨的膨胀, 特别是表层区域的膨胀和关节软骨的力学性质及功能有密切关系, 对软骨膨胀效果的观察与测量可以预测关节软骨变性疾病^[3].

传统上对关节软骨的观察主要通过组织学和生化实验方法进行的, 近来的研究者用光学方法描述关节软骨的膨胀行为^[4], 取得较好效果, 但光学方法只能观察样品的表面变化, 对内部变化无能为力. 郑永平等^[5,6]发展了瞬态超声测量系统, 可以实时探测软骨样品内部变化, 并在研究软骨随深度变化的瞬时膨胀行为方面, 取得了良好进展.

目前用来描述关节软骨力学性质的生物力学模型主要有三种: 单相模型、二相模型和三相模型. 单相模型只考虑了关节软骨的固态组成, 因此难以解释软骨的蠕变和应力-弛张现象. 二相模型将软骨中的液体作为第二相, 描述了多孔介质中液体引起的黏性反应及固态基质形变引起的弹性反应, 很好地解释了关节软骨在压缩时表现出来的黏弹性行为^[7]. 而近年基于混合物理理论提出的三相模型将滑液中的 Na^+ 和 Ca^{2+} 等离子作为第三相, 模拟软骨的自由膨胀现象, 更全面地描述了软骨组织的力学特性^[4,8,9].

本文应用瞬态超声技术观测因外部浓度变化引起的关节软骨的渗透性膨胀变化, 计算软骨随深度变化的应变分布, 然后运用改进的四参数三相混合模型, 结合应变分布数据估计得到软骨的轴向弹性模量(即沿着软骨从底面到表面方向的弹性模量). 结果表明运用超声技术和四参数三相模型可以更准确地估计软骨的轴向弹性模量. 反过来, 运用估计得到的轴向弹性模量, 结合软骨的生化 and 几何参数,

又可以预测软骨因外部溶液浓度变化而引起的膨胀趋势。

1 实验

瞬态超声测量系统如图1(a), 系统由一个50 MHz 聚焦超声换能器(Panametrics Inc, Waltham, MA, USA, 聚焦长度 12.7 mm), 一台宽带超声脉冲发射接收器(5601A型, Panametrics Inc, Waltham, MA, USA), 一块由超声脉冲发射接收器触发的500 MHz 数据采集卡(Compu Scope 8500 PCI型, Gage, Canada)和信号采集与处理软件构成。换能器可上下移动, 盛放样品的容器固定在水平平台上, 平台可以前后左右移动。系统的理论轴向分辨率为10 μm , 在关节软骨测量中, 偏移量的分辨率为0.4 μm 。

软骨样品取自无病变牛膝盖骨, 屠宰后5 h内取材。样本用生理盐水纱布包裹后置密封塑料袋中, 贮存在-20 的冰箱内。实验前, 样品先在室温环境下(大约20)解冻, 并置于0.15 mol/L的盐溶液中1 h。样品为圆柱体如图1(b), 直径约为6.35 mm, 厚度约为1.4 mm, 但因为切割时存在误差, 在不同位置厚度有些差异, 软骨下连接着大约2 mm厚的骨。

实验时, 容器中注入2 mol/L的氯化钠溶液, 液面漫过超声探头, 软骨样品固定于容器的底部测试腔的中心, 软骨表面朝上与溶液接触, 周围用橡皮泥胶黏住以防止溶液从侧面渗入, 目的是尽量模拟软骨在体内的情况, 同时认为软骨只在一个方向上膨胀, 以便求取其单轴向弹性模量。本实验选择氯化钠浓度为2 mol/L时的软骨状态为参考状态, 在参考状态下离子被有效屏蔽, 膨胀效果可以被忽略^[4,10]。整个实验持续4 h, 溶液的浓度变化顺序为2 mol/L $\rightarrow$ 0.15 mol/L $\rightarrow$ 0.015 mol/L, 样品在每一次变换浓度后的溶液中膨胀直到平衡状态, 每次变换时间为2 h。本研究

只涉及第一次浓度变换, 即2 mol/L变换到0.15 mol/L。整个过程用超声系统监测, 超声回波信号被接收, 经数据采集板采集后存入计算机, 等实验结束后处理, 超声数据处理软件用C++语言编写。随着软骨组织的变化和软骨的膨胀, 超声在关节软骨中传播速度的变化必须考虑, 我们测定了始末时刻超声在软骨组织中的传播速度, 所有实验的测量数据按照始末时刻差值的深度比例进行了线性补偿。软骨组织不同深度的偏移量根据实时超声回波信号运用互相关跟踪算法计算^[5,6]。

2 方法

按照软骨三相混合模型, 渗透性负载和力学负载一样, 可以导致软骨组织形变, 即当无力学负载作用时, 渗透压使软骨产生的形变等同于有力学负载时外部拉压力或剪切力对软骨产生的形变。这也暗示应用渗透性负载结合合理的模型可以描述关节软骨的材料属性, 提取软骨的弹性模量。三相混合模型的理论基础是三相理论, 基本依据是力的平衡原理, 即软骨内所有力(渗透压、适用压和拉应力)的总和为零^[2-4]。按照三相模型, 平衡状态时软骨中混合物的总应力 σ 由两个分量组成, 即隙间流动压和与材料属性相关的弹性张力, 总应力可以用下列式子表示:

$$\sigma = \sigma^s + \sigma^w + \sigma^+ + \sigma^- = -pI + \lambda_s \text{tr}(\epsilon)I + 2\mu_s \epsilon, \quad (1)$$

其中 w, s , 上标“+”和“-”分别表示水、固态、阳离子和阴离子, ϵ 是无穷小应变张量, λ_s 和 μ_s 表示固态的拉梅常数。 $p = p_{\text{donnan}} + p_0 - T_1$, p_{donnan} 和 p_0 分别是流体相中膨胀压的唐南分量和熵分量; 而 $T_1 = c_0^F kTN_{\text{avo}}/1.5(1-\phi_0^w)$, 其中 c_0^F 是固定电荷密度, ϕ_0^w 是水体积分数。用(1)式计算应变变量 ϵ , λ_s 和 μ_s 是非常复杂的, 为了简化计算, 假定软骨所有膨胀效果都是由唐南效应引起的, 以前的研究结果显示这个假设是

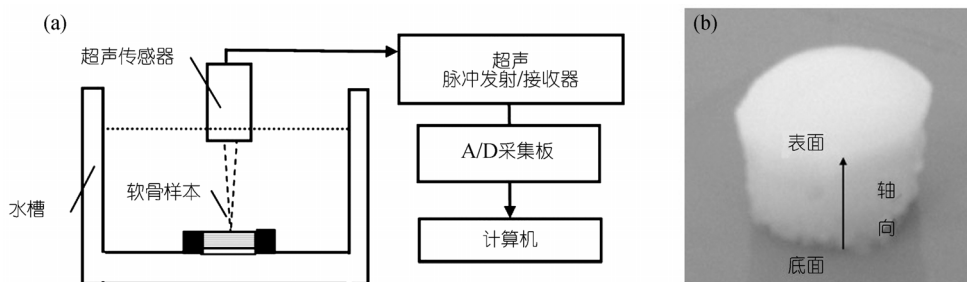


图1 关节软骨超声测量系统示意图(a)及关节软骨测试样品(b)

箭头表示轴向

合理的^[4]. 唐南压的线性本构表示可以从水和氯化钠离子穿过自由表面的平衡化学势的边界条件获得:

$$p \approx RT[(c_0^F)^2 + (2c^*)^2]^{1/2} - 2c^* - tr(\epsilon)(c_0^F)^2 / (\phi_0^W [(c_0^F)^2 + (2c^*)^2]^{1/2}), \quad (2)$$

其中 R 是常量, T 是绝对温度, c^* 是氯化钠溶液的浓度, 泊松比假定为常量, 固定电荷密度 c_0^F 和水体积分数 ϕ_0^W 能通过生化方法测量得到, 通过简化, 可以更方便计算 λ_s 和 μ_s .

过去的研究显示, 软骨组织内固态物质、电荷密度和水的分布都是不均匀的^[1,2]. 由三相混合理论可知, 膨胀压与组织的成分、电荷及水的分布息息相关, 膨胀引起的应变随软骨深度的变化而变化, 因此单参数均匀模型(图 2(a))不能准确描述膨胀引起的应变. 为了更准确描述软骨的轴向应变分布和力学性质, 我们在三参数三相模型(图 2b)^[4]的基础上建立了四参数三相混合模型, 如图 2(c). 在模型中, 软骨被分为两层: 第一层为与软骨层下的骨相连接的深层, 材料属性主要由轴向模量 Ha_1 , Ha_2 和泊松比 ν_s 这三个参

数确定, 并假设从软骨-骨界面开始到第一层和第二层的分界面之间, 轴向模量从 Ha_1 到 Ha_2 是线性变化的; 第二层是浅层, 材料属性由轴向模量 Ha_2 , Ha_3 和泊松比 ν_s 确定, 轴向模量也是线性变化的. 由于该模型增加了对中间分界面的轴向模量的估计, 从理论上说比单层模型和三参数模型更准确. 该模型定义了四个参数 Ha_1 , Ha_2 , Ha_3 和 h_1 , 结合软骨的生化参数和几何参数, 就可以预测因环境浓度变化而引起的软骨膨胀状况.

关节软骨中的固定电荷密度 c_0^F 和水体积分数 ϕ_0^W 可以通过生化方法获得, 为了简化研究过程, 本文参考了文献中测量得到的牛关节软骨的 c_0^F 和 ϕ_0^W 值^[11,12], 如图 3. 实线为拟和数据, 拟和公式在图的下方表示出来. c_0^F 和 ϕ_0^W 随软骨层的深度而变化, c_0^F 的幅值在中层和深层较大, 到表层明显减小. ϕ_0^W 在接近表层变得更大, 而在深层较小.

通过瞬态超声技术获得软骨不同深度的膨胀尺寸, 计算得到应变场 ϵ , 并设定泊松比 ν_s 为固定常量

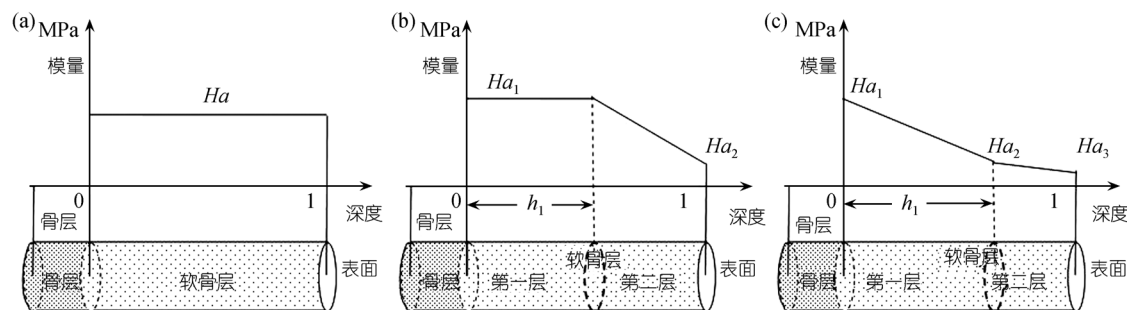


图 2 用于描述关节软骨力学性质的单参数均匀模型(Ha_1)(a), 三参数三相模型(Ha_1 , Ha_2 和 h_1)(b)以及四参数三相模型(Ha_1 , Ha_2 , Ha_3 和 h_1)(c) 软骨层的厚度作归一化

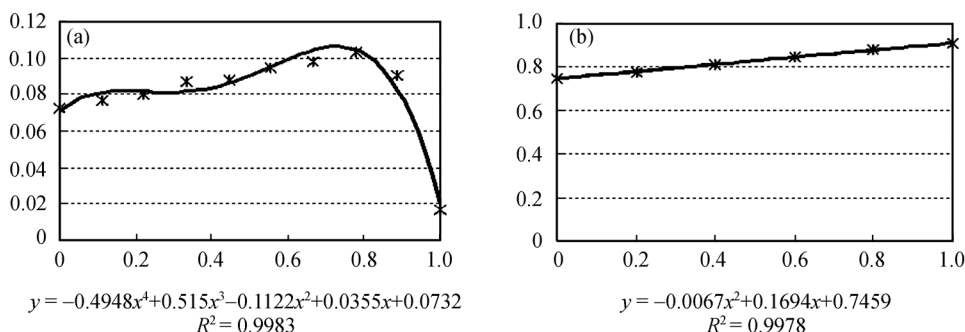


图 3 固定电荷密度 c_0^F (a)和水体积分数 ϕ_0^W (b)分别随软骨深度的变化曲线 公式为曲线拟合公式

($v_s = 0.25$), 就可以根据四参数三相模型估计四个参数 Ha_1 , Ha_2 , Ha_3 和 h_1 . 运算程序用 Mathematic 软件编写, 首先需要根据经验值设定四个参数的变化范围, 然后采用最小均方误差优化算法不断重复带入变化的参数值, 把计算数据与软骨实际的应变数据进行比较, 估计得到关节软骨样品的轴向模量. 反过来, 运用估计得到的轴向模量, 结合样品的生化和几何参数, 又可以计算软骨因外部溶液浓度变化而引起的膨胀趋势. 整个运算过程耗费时间较长, 在 CPU 为奔腾 2.0, 内存 1 G 的台式计算机上进行一个样品的运算大概需要 40 min.

3 结果与讨论

典型牛关节软骨样品在盐溶液浸泡过程中的超声回波信号如图 4, 横坐标表示样品的厚度. 为了便于估算软骨模量, 厚度作了归一化处理(即在计算中从软骨和骨界面层到软骨表面的厚度为 1), 纵坐标为回波信号的幅度. 白色三角所指位置为关节软骨表面, 黑色三角所指位置为软骨-骨界面.

当溶液浓度从 2 mol/L 变换到 0.15 mol/L 后, 从浓度变化时刻开始, 整个浸泡过程中软骨样品的组织膨胀过程的 M 模式超声图像如图 5, 轴为时间轴, 其中零时刻设为浓度变化后的初始时刻, 横坐标表示关节软骨的厚度, 从图 5 中可以观察不同深度的软

骨组织随时间变化的膨胀程度. 白色三角所指位置为关节软骨表面, 黑色三角所指位置为软骨-骨界面. 注意骨与软骨界面无论何时都在移动, 这是声速变化引起的, 实验部分已经介绍, 在计算中进行线性补偿.

图 6 中黑色圆点为当外部盐溶液浓度由 2 mol/L 变为 0.15 mol/L 时, 根据超声回波信号计算得到的典型软骨样品(通过初始时刻的声速计算得到厚度约为 1.159 mm)在不同深度时的应变量. 根据四参数三相模型估计得到由深到浅的三个轴向弹性模量参数 Ha_1 , Ha_2 和 Ha_3 的模量值分别为 8.8, 0.3 和 0.45 MPa, 分层位置 $h_1 = 0.54$ (软骨厚度归一化后的位置). 为了便于对比, 当模量取上述值时, 根据模型预测的软骨随深度变化的应变趋势也显示在图 6 中, 用实线表示. 二者之间的误差可能是由于模型的近似假设, 以及计算过程中的简化等因素引起的. 实验结果与模型预测趋势基本一致.

4 结论

关节软骨生物力学特性的改变是组织退变的重要指征, 本研究基于关节软骨四参数三相模型, 结合瞬态超声技术估计组织的弹性模量, 能更准确地描述软骨的力学特征. 从实验结果可以看到, 当外部环境浓度变化后, 利用瞬态超声成像可以实时观测软骨

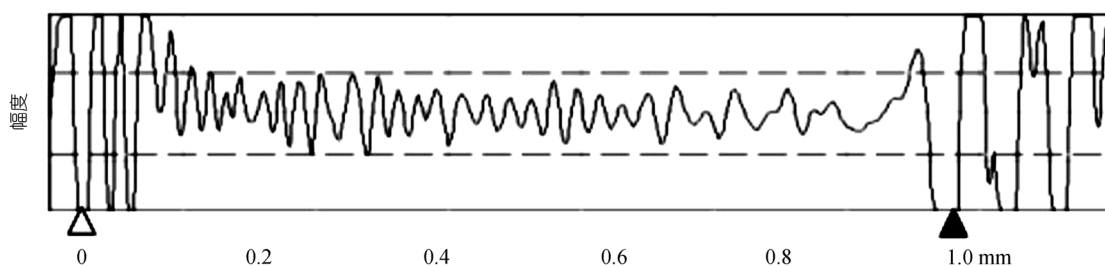


图 4 典型牛关节软骨样品不同深度的超声回波

△示软骨表面, ▲示软骨-骨界面

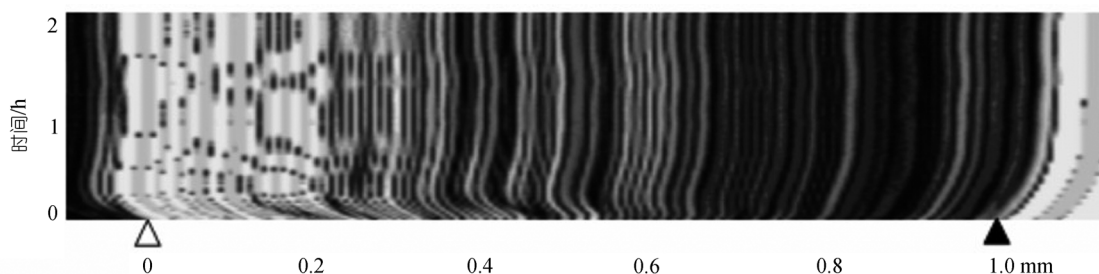


图 5 典型牛关节软骨样品的 M 模式超声图像

△示软骨表面, ▲示软骨-骨界面

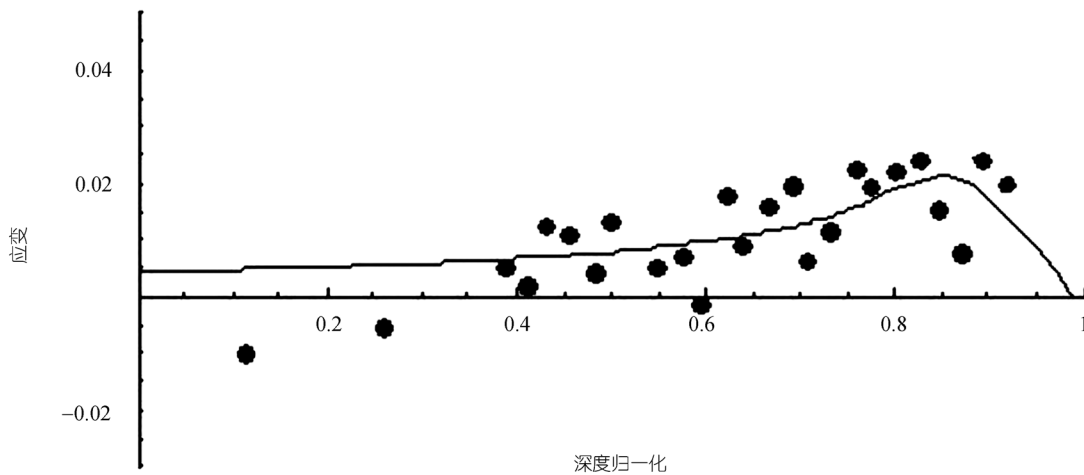


图 6 牛关节软骨样品在溶液浓度从 2 mol/L 变为 0.15 mol/L, 膨胀达到平衡状态后, 组织在不同深度时的应变分布
圆点示通过实验测量计算得到的数据; 实线示四参数三相模型预测的结果

组织随深度变化的膨胀行为。与光学等^[4]其他方法相比, 超声可以对组织内部的变化进行无损观测, 因而最有希望成为临床在体软骨早期病变检测的技术^[5]。另外, 本研究采用了与骨相连接的软骨组织样品, 新鲜的带骨样品更接近于在体环境, 因而实验中得到的超声图像对膨胀特征的描述更接近于在体软骨组织。

Narmoneva等人^[4]的研究认为软骨组织的材料属性是随深度变化而变化的, 并且在有三个参数的模型中也把浅层软骨组织的轴向模量看作是线性变化的, 但是却把软骨深层组织的模量看作是不变的, 即从底层到分界面的组织轴向模量是相同的。本研究建立了四参数三相模型, 模型假设软骨深层组织的轴向模量是线性变化的, 由于增加了对中间分界面的轴向模量的估计, 因而从理论上讲, 与单相模型和三参数三相模型相比, 该模型能更准确地描述随深度变化的软骨组织的力学特征。尽管我们对轴向模量的预测值是基于文献中提取的固定电荷密度 c_0^F 和水体积分数 ϕ_0^W 的结果得到的, 但预测结果与Mow等人^[13]对牛软骨进行直接轴向拉伸测试得到的拉伸模量的值基本一致。这也说明, 运用瞬态超声测量技术, 结合关节软骨的四参数三相模型, 可以有效的以非接触方式测量关节软骨的材料属性, 如果通过生化分析得到实验中具体样品的固定电荷密度和水体积分数的值, 结果会更理想。

研究者一般把关节软骨分为三层, 即表面层(约占整体深度的 10~20%)、中间层(约占整体深度的

40~60%)和深层(约占整体深度的 30%)。我们得到不同层的三个轴向弹性模量从底层到表面分别约为 8.8, 0.3 和 0.45, 其中 0.3 Mpa 为中层的 0.54 处(归一化后的位置)的轴向模量, 这些数字说明从底层到表层, 软骨的硬度变化很大。

已经知道, 由于软骨组织的非均匀性引起了组织应变的不一致性, 所以因膨胀引起的组织应变随着软骨深度的变化而变化。当外部溶液浓度变小时, 尽管从表面观察软骨是膨胀的, 但在软骨的深层, 从超声图像观测到组织实际上处于被压缩状态, 只有中层组织和表层组织表现为拉伸状态, 该实验结果与Narmoneva等人^[4,10]用光学方法对软骨侧表面测试得到的研究结果是一致的, 这也说明软骨样品内部轴向膨胀效果和侧表面轴向膨胀效果是基本一致的。我们认为深层的压缩实际上是由于中层和表层的过渡膨胀引起的; 而中层和表层的膨胀量是由软骨组织复杂的非均匀结构和不同层固态组成成分的变化等多方面因素决定的。

软骨的组成成分之一的胶原纤维是高度非匀质并且表现为各向异性的, 在软骨表面的胶原纤维的走向是切向的(对关节软骨表面而言), 这种排列方式又阻止着软骨的进一步向外膨胀, 所以造成了中表层组织向内膨胀。Torzilli等人^[14,15]证明了当表层软骨损伤后, 可产生不正常的溶质通道, 引起溶质输送及力学反应的改变, 从而导致软骨进一步退变, 因而表层关节软骨对维持软骨生物力学性质是相当重要的。

与表面不同的是,中层的胶原纤维排列杂乱,且大部分蛋白多糖存在于中层,与之共存的孔间液体中的固定电荷在自由膨胀过程中也扮演着重要角色。在深层,胶原纤维的主要走向是垂直方向的,不能有效抑制膨胀,因而中层表层的过渡膨胀导致了深层的压缩。深层的压缩和中层表层的膨胀现象反映了软骨力学行为的差异^[13,16]。

总之,该研究结果对关节软骨力学特征和材料属性的估计、对软骨组织进行性退变的研究、对软骨病变的检测以及人工关节软骨材料的研制都有重要意义。除此之外,该研究对于在体关节炎的早期诊断具有潜在的应用价值,对材料的多孔介质力学研究以及生物机械工程领域的研究也具有借鉴意义。

参 考 文 献

- Ehrlich S, Wolff N, Schneiderman R, et al. The osmotic pressure of chondroitin sulphate solutions: Experimental measurements and theoretical analysis. *Biorheology*, 1998, 35 (6): 383—397^[DOI]
- Clark J M. Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: A scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit, and man. *J Orthop Res*, 1991, 9(2): 246—57^[DOI]
- Maroudas A. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and abnormal cartilage. *Nature*, 1976, 260(5554): 808—809
- Narmoneva D A, Wang J Y, Setton L A. A noncontacting method for material property determination for articular cartilage from osmotic loading. *Biophys J*, 2001, 81(6): 3066—3076
- Zheng Y P, Shi J, Qin L, et al. Dynamic depth-dependent osmotic swelling and solute diffusion in articular cartilage monitored using real-time ultrasound. *Ultrasound Med Bio*, 2004, 30(6): 841—849^[DOI]
- Zheng Y P, Bridal L, Shi J, et al. Ultrasound elastomicroscopy for articular cartilage: From static to transient and 1D to 2D. In: *SPIE Medical Imaging: Ultrasonic Imaging and Signal Processing Conference*. San Diego: The International Society for Optical Engineering, 2003. 2: 15—20
- Mow V C, Kuei S C, Lai W M, et al. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression? Theory and experiments. *J Biomech Eng*, 1980, 102(1): 73—84
- Lai W M, Hou J S, Mow V C. A triphasic theory for the swelling and deformation behaviors of articular cartilage. *J Biomech Eng*, 1991, 113(3): 245—258
- Setton L A, Gu W, Lai M W, et al. Predictions of swelling-induced pre-stress in articular cartilage. In: *Selvadurai A P, ed. Mechanics of Poroelastic Media*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. 299—320
- Narmoneva D A, Wang J Y, Setton L A. Nonuniform swelling-induced residual strains in articular cartilage. *J Biomech*, 1999, 32(4): 401—408^[DOI]
- Wang C C B, Guo X E, Sun D N, et al. The functional environment of chondrocytes within cartilage subjected to compressive loading: A theoretical and experimental approach. *Biorheology*, 2002, 39(1-2): 11—25
- Shapiro E M, Borthakur A, Kaufman J H, et al. Water distribution patterns inside bovine articular cartilage as visualized by magnetic resonance imaging. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001, 9(6): 533—538^[DOI]
- Setton L A, Tohyama H, Mow V C. Swelling and curling behaviors of articular cartilage. *J Biomech Eng*, 1998, 120(3): 355—361
- Torzilli P A, Rose D E, Dethmers D A. Equilibrium water partition in articular cartilage. *Biorheology*, 1982, 19(4): 519—537
- Torzilli P A. Influence of cartilage conformation on its equilibrium water partition. *J Orthop Res*, 1985, 3(4): 473—483^[DOI]
- Mow V C, Zhu W, Ratcliffe A. Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: *Mow V C, Hayes W C, eds. Basic Orthopaedic Biomechanics*. New York: Raven Press, 1991. 143—198