

DOI:10.16356/j.1005-2615.2015.03.016

关节软骨红外光谱成像及分析方法

吴曰超 尹建华 刘 玉 毛之华

(南京航空航天大学自动化学院,南京,210016)

摘要:作为一种新颖高效的光谱技术,傅里叶变换红外光谱成像(Fourier transform infrared spectroscopic imaging, FTIRI)可以在高分辨率下获得样品的组成和结构的信息,已开始深入应用到生物医学光子学研究领域。本文采用 FTIRI 技术进行关节软骨的主成分(胶原蛋白和蛋白多糖 PG)的红外光谱成像及分析方法的研究。首先对多组软骨切片进行 FTIR 成像及红外光谱分析,进而采用特征峰强度积分法和二次求导方法分别对这些特征带(Amide I, II, III and Sugar)进行表征,给出两种主成分或特征基团含量随软骨深度的变化关系。其次采用主成分回归方法定量计算二主成分的浓度,将这些浓度和对应位置的光谱特征峰积分面积及二次求导后的峰面积进行相关性研究。结果显示 Amide I 和 Amide II 特征峰的积分强度和胶原蛋白浓度的相关性最高。二次求导后 Sugar 带强度与蛋白多糖浓度的相关性最高。这些结果说明 Amide I 和 Amide II 带的积分强度适合用于定性表达胶原蛋白的含量及其随深度的变化,而 Sugar 带的二次求导强度更适于定性表达蛋白多糖的含量及其随深度的变化。Amide III 带积分和二次求导既不适合表征胶原蛋白也不适合表征 PG 的含量。这项研究为关节软骨和骨关节炎早期研究提供了更加快捷实用的方法,从而有利于早期骨关节炎的判断和修复监测。

关键词:红外光谱特征峰;二次求导;关节软骨;胶原蛋白;蛋白多糖

中图分类号:O433;O657.3

文献标志码:A

文章编号:1005-2615(2015)03-0421-07

Fourier Transform Infrared Spectroscopic Imaging and Analytical Method of Articular Cartilage

Wu Yuechao, Yin Jianhua, Liu Yu, Mao Zhihua

(College of Automation Engineering, Nanjing University of Aeronautics & Astronautics, Nanjing, 210016, China)

Abstract: As a novel and effective spectroscopic analytical tool, Fourier transform infrared spectroscopic imaging (FTIRI) can obtain composition and structure information of samples at high resolution and has been applied in biomedical photonics field. FTIRI is employed to analyze the characteristic IR bands of principal components of five articular cartilages and their attribution by integrated and second derivative methods. The depth dependent profiles of integrated absorbance and second derivative spectral intensity of these IR bands are lineally fitted to those of the concentrations of collagen and proteoglycan that are predicted by principal component regression algorithms. The correlation coefficients by linear fit suggest that the correlation coefficient (R) between the integrated absorbance of amide I (amide II) and collagen concentration ($R_{A\text{-amide I}}$ & $R_{A\text{-amide II}}$) is much higher than that between amide III absorbance and collagen concentration ($R_{A\text{-amide III}}$), namely, $R_{A\text{-amide I}}, R_{A\text{-amide II}} > R_{A\text{-amide III}}$, as well as the correlation coefficient between the second derivative spectral intensity of sugar band and PG concentration better than that between integrated absorbance of sugar band and PG concentration, $R_{D\text{-sugar}} > R_{A\text{-sugar}}$. It is concluded

基金项目:国家自然科学基金(61378087)资助项目;高等学校博士学科点专项科研基金(20133218120017)资助项目;南京航空航天大学2014~2015年本科专业建设(1403ZJ04XX03)资助项目。

收稿日期:2015-03-02; **修订日期:**2015-04-28

通信作者:尹建华,男,教授, E-mail: yin@nuaa.edu.cn。

that the integrated intensities of amide I and amide II are very suitable to qualitatively represent the content and depth dependence of collagen. The second derivative spectral intensities of sugar band is much fit to represent the contents and depth dependences of PG, respectively. The integrated or the second derivative spectral intensity of amide III band is unfit to represent either collagen or PG content in cartilage. This study provides a simpler and quicker method for the investigation on cartilage and early-stage osteoarthritis, which will be helpful for the diagnosis and recovery monitoring of early-stage osteoarthritis.

Key words: infrared characteristic band; second derivative; articular cartilage; collagen; proteoglycan

关节软骨覆盖在骨关节的连接表面,表面光滑,辅以关节滑液,有利于减少相邻两骨的摩擦,并具有承压和缓冲运动时产生的震动等重要作用。这些重要的生理功能主要是由关节软骨特殊成分的生理结构决定。它主要由Ⅱ类胶原蛋白(Collagen II)、蛋白多糖(Proteoglycan, PG)、水和少量的无机离子组成。胶原蛋白构成纤维网络的基本网络结构,保证了关节软骨的抗拉刚度和强度,从而有效地固定住 PG。而后者则能更好地保证软骨的弹性、耐压性和持久性。正是由于二者的有机组合(构成软骨基质),从而可以有效地保持水的含量以及与滑液的离子交换,承载人体运动和负重。一旦关节软骨的主成分含量和结构发生变化,则可能诱发骨关节炎(即关节软骨退化病变)等关节疾病。目前该类疾病仍不能很好地治愈和根除,已经成为影响人们健康的一大医学难题,所以非常有必要对关节软骨和骨关节炎进行更深入的研究,以便更有效地预防和治疗该疾病。

目前对骨关节炎的原发性原因仍然不明,还有许多问题需要探索,其中就包括胶原纤维的结构破坏和 PG 的含量损失以及二者之间的因果关系等。这些涉及到关节软骨的精细(微)结构、主成分含量分布的研究,将有利于实现对关节组织退化和修复过程的监测,进而有效地预防和治疗关节疾病。

在过去的相关研究中,人们采用的测试手段主要是生物化学分析^[1],磁共振成像^[1]、生物力学测量^[2]和各种形式的显微技术^[3-5]。然而这些技术方法不能实现在微结构水平上同时获得软骨主成分的含量分布和分子结构信息,傅里叶变换红外光谱成像(Fourier transform infrared spectroscopic imaging, FTIRI)技术的出现则有效弥补了这一缺憾^[6-7]。此外 FTIRI 还可以进行样品的形貌探测和光谱微成像^[8],具有测定时间短,精度高,并且可以进行多成分测定、无损和连续测定等优点,便于研究退变的软骨中组分含量与结构变化。

软骨中主成分含量的定性研究通常利用红外

光谱特征带强度进行分析^[9-11],但由于软骨中主成分间的特征谱带的大范围重叠极大地影响了对主成分的含量分析,并带来了一定的难度。虽然和化学计量学相结合进行的定量计算相对更精确^[12-13],但过程相对复杂繁琐。为对主成分含量及其变化实现更快速有效和准确的检测和判断,对主成分特征谱带进行深入分析及选择准确有效的研究方法则显得十分必要,有助于软骨主成分含量甚至骨关节炎的实时监测和修复。本文的目的即在于通过对主成分特征谱带的分析,采用特征带的积分强度(峰面积)和二次求导后的峰面积强度表达软骨主成分(光谱的二次求导处理可以提高光谱的分辨率^[14]),并和主成分回归(Principal component regression, PCR)的定量结果进行相关性分析,寻找和判断更合适的主成分表达和有效的定性分析方法。

1 实验材料与方法

1.1 样本制备

本实验中采用狗的关节软骨组织。首先将新鲜的健康狗(共 5 组)的肱骨软骨组织切成 2 mm × 2 mm × 2 mm 大小的切块,用生理盐水清洗后快速冰冻,然后用低温切片机(Leica CM 1950, Germany)在 -20℃ 条件下切片成 10 μm 厚度的显微切片,放在室温下风干用于显微成像及后面的相关性分析。

1.2 红外光谱成像及分析

实验采用的 FTIRI 系统是 Perkin Elmer 公司的 Spotlight 300,主要由一个傅里叶变换红外光谱仪(Spectrum One)耦合一个 Spotlight 300 显微镜装置。系统内部包含一个 16 × 1 单元(400 μm × 25 μm) HgCdTe (MCT) 线性阵列探测器,以液氮冷却。所探测的红外光谱范围从 744 cm⁻¹ 到 4 000 cm⁻¹,分辨率为 16 cm⁻¹,红外成像的空间分辨率为 6.25 μm × 6.25 μm/pixel。可见光成像的收集则通过一个 CCD 相机结合计算机控制的显微镜样品台的运动来最终实现,而后在可见光成像

区域内选择感兴趣的目标区域(ROI)进行红外光谱成像。获得 ROI 的各彩色像素、相应的红外光谱以及成分图像,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。从 5 组样品的 FTIR 图像中提取 64 个 IR 光谱用于下面的 PCR 浓度计算及浓度和特征光谱强度的相关性分析,其中一组被选作典型性分析。

1.3 PCR 定量分析

PCR 是一种多元回归分析方法,旨在解决自变量间存在多重共线性问题。所采用的软件为 PE 公司的 Spectrum X。本研究中 PCR 模型的建立是基于两种主成分以不同比例混合后所测的标准光谱和已知浓度之间建立的数据库,用来预测关节软骨主成分含量^[12-13],并用于和定性方法所得结果之间的相关性统计和比较,为验证本实验的方法准确性提供标准参考。线性相关性分析采用 Origin 软件进行。前述光谱分析(峰面积积分和二次求导)则是在 FTIRI 系统自带软件中完成。

2 结果与讨论

2.1 软骨的红外光谱与成像

图 1 所示是从关节软骨切片的 FTIR 成像当中在某像素位置提取的红外光谱,各特征峰分别在相应的位置被标记。光谱分析^[15-16]得出,Amide I ($1\ 700\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$), Amide II ($1\ 600\sim 1\ 500\text{ cm}^{-1}$) 不仅是胶原蛋白的特征峰,同时部分来自 PG 的贡献;Amide III 带($1\ 240\text{ cm}^{-1}$)位置同时包含 $1\ 260\text{ cm}^{-1}$ (S=O stretching)^[17];PG 的红外特征峰则是 Sugar ring 带 ($1\ 125\sim 960\text{ cm}^{-1}$)^[18], Amide III & S=O stretching 带^[19]对其也可能有部分贡献。因为两种主成分的相应特征峰相互之间存在明显重叠^[19],所以在下面的软骨切片的 FTIRI 光谱分析中,将研究 Amide I, Amide II, Amide III (或 $1\ 240\text{ cm}^{-1}$) 和 Sugar 带能否分别用作胶原蛋白和 PG 的特征峰及含量表征。

图 2 所示分别为一健康软骨切片的可见图像,全吸收红外成像以及从全吸收红外图像所得到的 A I、A II、A III 和 Sugar 等特征带的红外图像(Chemimap),图 2(c~f)分别是酰胺 I, II, III 和糖带等特征带的红外图像。(A I), (A II), (A III) 和 (Sugar) 分别表示软骨内酰胺 I, II, III 和糖带的吸光度随软骨深度的变化关系(附标准偏差)。在图 2(b~f)中,色棒的最大值分别是 0.9, 0.5, 0.15, 0.24 和 0.15。SZ, TZ, RZ 和 TM 分别表示表层区、过渡区、放射区和潮线。从这些 Chemimap 可以判断各个特征带所对应的官能团

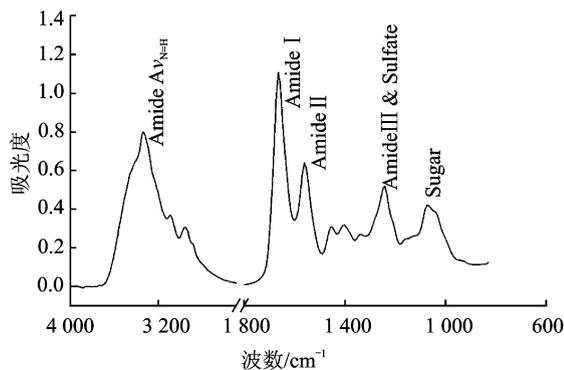


图 1 从关节软骨的 FTIR 图像中提取的一个红外光谱
Fig. 1 FTIR spectrum extracted from FTIR image of articular cartilage section

在整个成像范围内的分布情况。进一步,可以将这些特征红外图像转变为二维曲线,可更直观地表现这些特征基团含量随软骨深度的变化信息,如图 2 中的各个曲线所示。如果 A I (A II) 和 Sugar 特征带的贡献分别主要来源于胶原蛋白和蛋白多糖,则可以定性分析出两种主成分随软骨深度的分布是不均匀的。

2.2 峰面积与二次求导

为方便进一步分析这些特征带的归属并减少工作量,在接下来的分析中将全吸收图像从软骨的表层区到潮线(TM)范围共分成 15 个区域分别提取平均光谱,而后对这 15 个光谱中的各个特征带(A I、A II、A III 和 Sugar)进行积分及二次求导(因为软骨最表层的光谱成像受散射效应的影响较大,该位置由表及里的 4 列像素数据未考虑在内)。这些特征带的积分面积随软骨深度的变化如图 3 所示,横轴表示软骨切片在 FTIRI 可移动平台上的绝对位置坐标。表层区位于左侧。从图中可见,无论是从积分强度还是二次求导后的面积强度来看,这些特征基团含量随软骨深度的增加均呈现不均匀分布。同一个特征带的积分和二次求导光谱强度随深度的变化趋势也较相似。

为精确分辨出特征峰积分及二次求导方法更适合哪一个特征带(基团)或主成分,引入主成分回归(PCR)^[12-13]方法对这 15 个光谱进行计算。PCR 作为一种常用的化学计量学方法,采用迭代和因子分析过滤掉冗余信号并获取主成分信息,常用于定量分析,计算结果也更准确^[13]。图 4 所示即为这组光谱经 PCR 计算后所得到的结果,横轴表示软骨切片在 FTIRI 可移动平台上的绝对位置坐标,表层区位于左侧。从图中可见,两种主成分随软骨深度的增加,呈不均匀分布。相较于蛋白多糖,胶原蛋白在软骨表层区甚至过渡区浓度较高,蛋白多

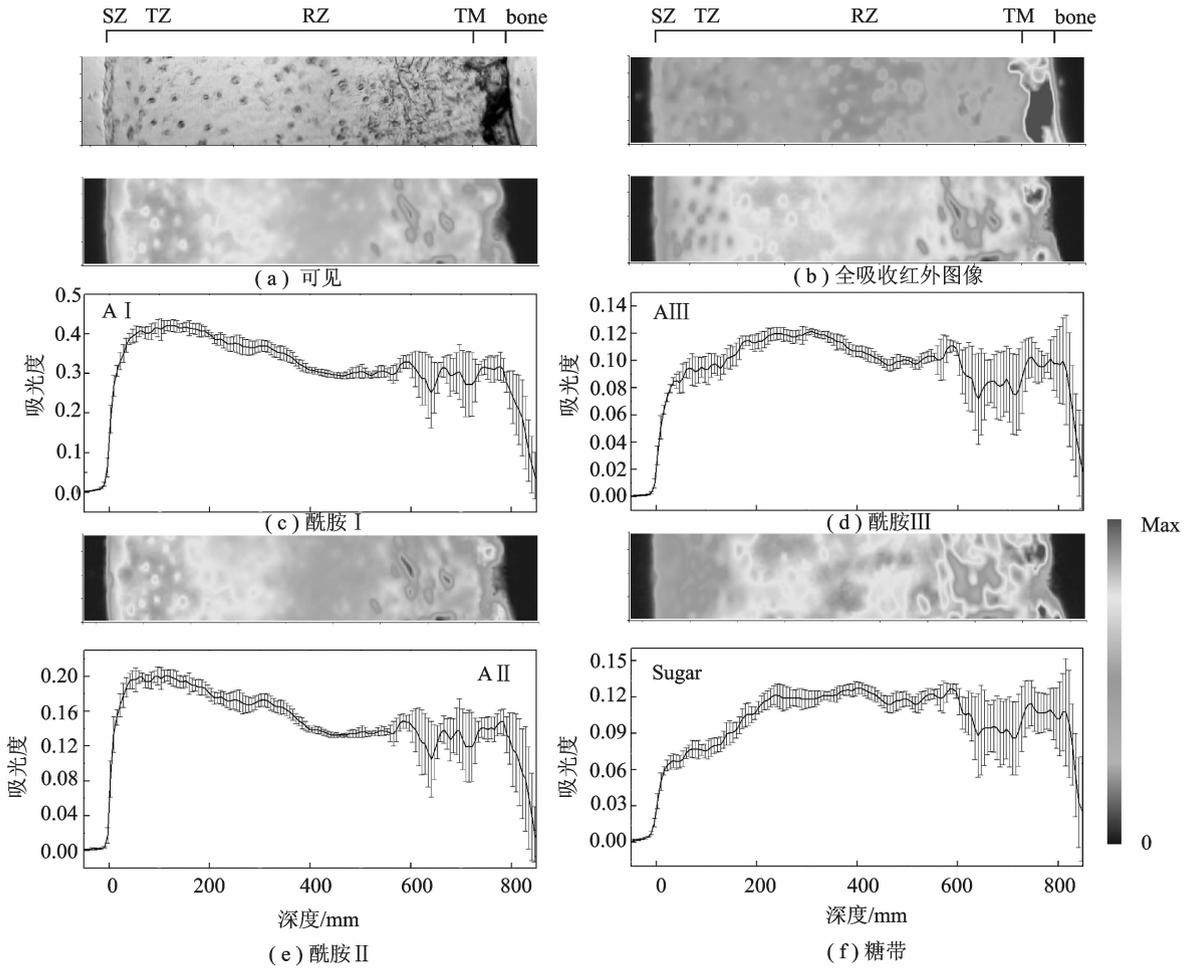


图2 关节软骨切片的可见、红外光谱图像及二维深度曲线

Fig. 2 Visible and infrared spectroscopic images and 2D depth-dependences of articular cartilage section

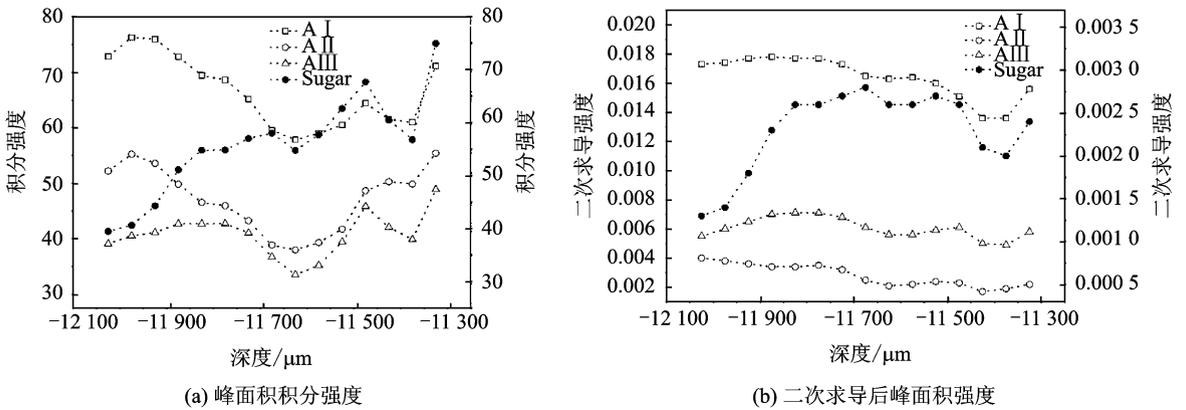


图3 酰胺 I、II、III 和糖带的峰面积积分强度和二次求导后各峰面积强度随深度的变化(实心圆对应右侧坐标,空心标记对应左侧坐标)。

Fig. 3 Depth-dependences of integrated absorbance (peak area) and 2nd derivative spectral intensity of amide I, amide II, amide III and sugar bands (solid circles correspond to the right coordinate, as well as empty signs correspond to the left coordinate)

糖则相反;前者总体浓度高于后者。胶原蛋白浓度的变化趋势和图3当中 A I 和 A II 的积分强度的变化趋势较为接近,蛋白多糖的变化趋势则和 Sugar 带二次求导强度的变化接近。

2.3 相关性分析

为定量研究图4和图3当中相关曲线之间的近似程度及各特征带的归属或表征,相关性分析的研究是非常必要可行的。分别将从多组样本不同深

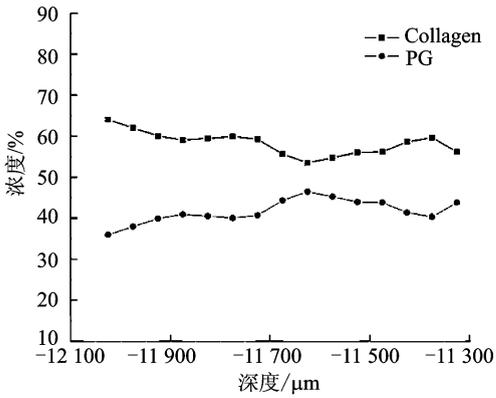


图 4 采用 PCR 算法预测得到的软骨切片内胶原蛋白和蛋白多糖的浓度变化

Fig. 4 Predicted concentrations of collagen and PG in the cartilage section by PCR algorithms

度位置提取的光谱的各特征带积分强度及二次求导强度和其对应位置的 PCR 主成分浓度进行线性相关性比较,结果如图 5 所示,中级断线表示 95% 可信限度。两个灰线表示 95% 的预测限。两个变量之间的相关性系数在每个图中均已被标出。图 5(a)表示的是积分强度和 PCR 浓度的相关性比较,图 5(b)图表示的则是二次求导后特征带面积强度和 PCR 浓度的相关性比较。相关系数及其他统计参数列于表 1 中,蛋白多糖浓度和糖带的积分强度及二次求导强度之间进行相关性比较,胶原蛋白浓度则和酰胺 I、II、III 的积分强度及二次求导强度之间进行相关性比较。斜线前(后)面的数据是积分强度(二次求导强度)和主成分浓度之间的相关系数。

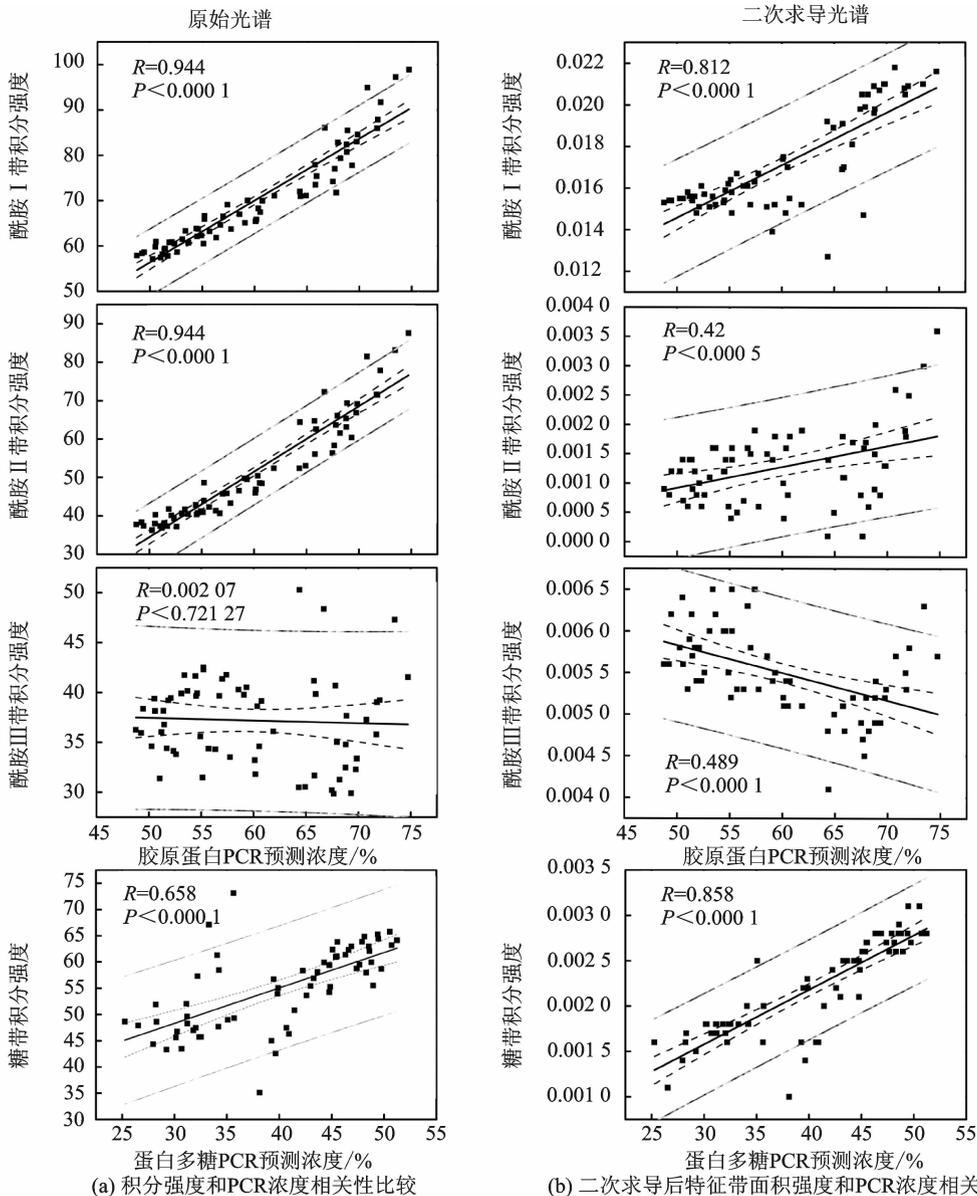


图 5 各特征带积分强度及二次求导光谱强度和对应位置 PCR 预测浓度之间建立的线性回归相关性

Fig. 5 Linear regression correlations between PCR-predicted concentrations of principal components and integrated/2nd derivative spectral intensities of each characteristic band

表1 四个光谱特征带的积分强度及二次求导面积强度的深度线型分别和胶原蛋白及蛋白多糖的PCR预测浓度线型之间的线性相关系数

Tab. 1 Linear correlation coefficients (R) between depth dependent profiles of integrated absorbance/ 2^{nd} derivative spectral intensity of four characteristic IR bands and PCR predicted concentrations of collagen and PG for total cartilage sections, respectively

	Amide I	Amide II	Amide III	Sugar
R	0.944/ 0.812	0.949/ 0.42	0.002/0.489	0.658/ 0.858
R^2	0.891/ 0.659	0.901/ 0.176	0/ 0.239	0.433/ 0.736
P	<0.000 1/ <0.000 1	<0.000 1/ 0.000 5	0.721/ <0.000 1	<0.000 1/ <0.0001

由图5和表1可见,Amide I和Amide II带的积分强度和胶原蛋白的浓度相关性很强($R_{A\text{-amide I}}=0.944$, $R_{A\text{-amide II}}=0.949$, $n=64$),预示着其可以用来定性表征胶原蛋白的含量及分布; Sugar带二次求导强度和蛋白多糖浓度的相关性最高($R=0.858$, $n=64$),高于积分强度和蛋白多糖的浓度相关性($R=0.658$, $n=64$),说明Sugar特征带二次求导强度表征更适用于蛋白多糖的含量及分布研究,也说明样品当中蛋白多糖的含量对该带的贡献比较大^[19]。这一研究结果和报到的关于蛋白多糖的二次求导和积分强度和光密度的相关性研究^[11]结果是一致的,并且相关性更高,说明本结果具有更高的可信度和准确度。交叉研究显示Amide I和Amide II的积分强度或二次求导面积强度和蛋白多糖浓度具低相关性,暗示着这两个特征带均不适合表征蛋白多糖;相反,Sugar带也不适合表征胶原蛋白。这一结果也说明了文中正常组织切片采用Sugar带定性表征蛋白多糖含量的可行性^[8,13]。

这些相关性的研究说明以上3个特征带在分别对胶原蛋白和蛋白多糖的表征中起关键和主导作用,也说明3个特征带都是由不同的成分综合贡献的。Amide III带的相关系数则比较低,不能直接用于表征关节软骨中的两种主成分及其分布^[19]。

3 结束语

本文进行了关节软骨切片的FTIR研究,获得各特征谱带对应的Chemimap,定性或半定量地描述了软骨中相应特征基团的分布。这些特征带的积分强度及二次求导面积强度和不同主成分的PCR预测浓度的相关性各不相同:(1)Amide I、II带的积分强度和胶原蛋白的浓度相关性很强,预示着它们均可用来定性表征胶原蛋白的含量及分布;(2)Sugar带的二次求导面积强度和蛋白多糖浓度的相关性高于积分强度和蛋白多糖的浓度相

关性,前种方法的Sugar特征带表征更适用于蛋白多糖的含量及分布研究;(3)Amide III带任一方法表征既不适合表征胶原蛋白也不适合表征PG的含量;(4)这些特征带均对主成分的回归定量计算起到重要的贡献。最终可见各主成分含量或浓度随软骨深度的变化呈不均匀分布。

综上,在关节软骨和骨关节炎的研究中,可针对性地选择不同的分析方法,定性或定量地探测软骨中主成分含量及分布、排列结构变化等,实现关节软骨及其退行性病变的快速高效研究,有效监测软骨退化和修复,促进关节疾病的预防和治疗。

致谢:本文作者感谢美国Oakland大学Xia Yang教授对本次光谱测量所提供的设备支持。

参考文献:

- [1] Zheng Shaokuan, Xia Yang, Bidthanapally A, et al. Damages to the extracellular matrix in articular cartilage due to cryopreservation by microscopic magnetic resonance imaging and biochemistry [J]. Magn Reson Imaging, 2009, 27(5): 648-655.
- [2] Wilson W, Huyghe J M, van Donkelaar C C. Depth-dependent compressive equilibrium properties of articular cartilage explained by its composition [J]. Biomech Model Mechanobiol, 2007, 6(1/2): 43-53.
- [3] 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 [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2001, 9(6): 561-569.
- [4] Xia Yang, Alhadlaq H, Ramakrishnan N, et al. Molecular and morphological adaptations in compressed articular cartilage by polarized light microscopy and Fourier-transform infrared imaging [J]. Journal of Structural Biology, 2008, 164(1): 88-95.
- [5] 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]. J Or-

- thopaedic Surgery, 2004, 12(2):199-204.
- [6] 尹建华,黄凤玲,钱志余,等. 傅里叶变换红外光谱学显微成像技术在骨病研究中的应用和进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(2): 340-343.
- Yin Jianhua, Huang Fengling, Qian Zhiyu, et al. Applications and progress of fourier transform infrared spectroscopic microimaging in bone disease research [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 34(2): 340-343.
- [7] Yin Jianhua, Xia Yang, Ramakrishnan N. Depth-dependent anisotropy of proteoglycan in articular cartilage by Fourier transform Infrared Imaging[J]. Vibrational Spectrosc, 2011, 57(2): 338-341.
- [8] Ramakrishnan N, Xia Yang, Bidthanapally A. Polarized IR microscopic imaging of articular cartilage [J]. Physics in Medicine and Biology, 2007, 52(15): 4601-4614.
- [9] Camacho N P, Torzilli P A, Mendelsohn R, et al. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage [J]. Biopolymers, 2001, 62(1): 1-8.
- [10] 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) [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(12): 1050-1058.
- [11] Rieppo L, Närhi T, Helminen H J, et al. Infrared spectroscopic analysis of human and bovine articular cartilage proteoglycans using carbohydrate peak or its second derivative[J]. J Biomed Opt, 2013, 18(9): 1-6.
- [12] Yin Jianhua, Xia Yang. Macromolecular concentrations in bovine nasal cartilage by Fourier transform infrared imaging and principal component regression [J]. Applied Spectroscopy, 2010, 64(11): 1199-1208.
- [13] Yin Jianhua, Xia Yang. Concentration profiles of collagen and proteoglycan in articular cartilage by Fourier transform infrared imaging and principal component regression [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular & Biomolecular Spectroscopy, 2012(88): 90-96.
- [14] Hun Caiqin, Song Chunyuan, Wu Bin, et al. Fluorescence spectrum analysis of ether-water solution based on gaussian decomposition method [J]. Transactions of Nanjing University of Aeronautics & Astronautics, 2010, 27(1): 70-71.
- [15] Iconomidou V A, Georgaka M E, Chryssikos G D, et al. Dogfish egg case structural studies by ATR FT-IR and FT-Raman spectroscopy [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 41(1): 102-108.
- [16] Jackson M, Choo L P, Watson P H, et al. Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues [J]. Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease, 1995, 1270(1): 1-6.
- [17] Amarasekara A S, Opoku G, Qiu X, et al. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of chondroitin-6-sulfate [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(1) : 116-121.
- [18] Crombie D E, Turer M, Zuasti B B, et al. Destructive effects of murine arthritogenic antibodies to type II collagen on cartilage explants in vitro [J]. Arthritis Research & Therapy, 2005, 7(5): R927-R937.
- [19] 肖芝燕,尹建华. 关节软骨主成分的红外光谱学分析及表征[J]. 光散射学报, 2014, 26(2): 213-218.
- Xiao Zhiyan, Yin Jianhua. Fourier transform infrared spectroscopic analysis and characterization of principal components of articular cartilage [J]. The Journal of Light Scattering, 2014, 26(2): 213-218.

