

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

膝關節軟骨之拉曼光譜研究(2/2) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2314-B-002-027-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：國立臺灣大學醫學院骨科

計畫主持人：王崇禮

計畫參與人員：學士級-專任助理：張貴珠
研究生：張鴻文
協同研究人員：邵耀華

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 96 年 10 月 31 日

一、摘要

退化性膝關節炎乃是臨床上常見之疾病，病理變化上軟骨先受磨損破壞，最後波及其下之骨骼。軟骨本身乃屬一種相當特殊的結締組織，其結構由可吸住水的蛋白聚醣(proteoglycans)及膠原纖維(collagen fibrils)的細胞基質所構成。蛋白聚醣結構是一種複雜的構造，中心乃蛋白質長型構造附著上葡萄糖胺聚糖(glycosaminoglycan)支鏈而成。臨床上關節鏡檢查，常將退化性程度分成數期：第0期乃正常、白色、光亮的軟骨；第一期為腫脹、軟化但表面完整的軟骨；第二期為表面小範圍(小於半英吋)龜裂與絲狀化的軟骨；第三期與前期同樣變化，但範圍較大(大於半英吋)；第四期則是軟骨剝落，侵蝕至軟骨下之骨頭部份。然而這些分類只是依據形態學的變化為基礎，相對主觀且比較粗糙，對於退化性關節炎成因之探討，及各類治療方式成效之評估幫助不大。

拉曼光譜依據雷射光打在物質上所產生的非彈性散射所造成光線頻率的變化，可以偵測該出該物質在分子層次上的化學組成。因而拉曼光譜分析技術逐漸成為一項具有深厚潛力的臨床診斷工具，能夠在活體原位(in situ)做即時性(real time)的疾病診斷。本研究計畫總計為兩年，企圖利用拉曼光譜對退化性膝關節軟骨進行分子層次的病因學研究。第一年的研究成果主要為建立膝關節軟骨正確而穩定的拉曼光譜分析技

術，以及不同部位軟骨受不同作用力(包括壓力和剪力)影響下，其分子變化之情形並比對各期別退化性關節炎軟骨其分子變化之情形。

第二年的研究成果為進一步得到長時間受力下關節軟骨分子鍵結變化與軟骨硬度的相關性，並且也對退化性關節炎的動物模式及人體體外樣本做拉曼光譜分析，成功的得到退化性關節炎之拉曼光譜特徵指標，主要為amide III envelope ($1300-1350\text{ cm}^{-1}$)及Mainly skeletal modes ($400-500\text{ cm}^{-1}$)。

關鍵詞：拉曼光譜、膝關節軟骨、退化性關節炎、散射

二、緣由與目的

目前臨床上判斷關節軟骨組織退化的方法主要仍是依據X光影片，觀測硬骨間沒有成像的關節空隙為主。即使進行關節鏡檢查亦僅能從其外表的顏色、亮度、硬度、微纖維化(fibrillation)或是糜爛(erosion)之程度等來觀察分類，一方面較不精準，一方面亦缺少客觀數字之依據。

有時一樣的X光影像表現，病人臨床上的症狀卻大不相同，主要是我們對軟骨基本的生化成分改變(biochemical composition change)並無真正的了解。而為什麼會產生退化性關節炎？為什麼退化性關節炎特別容易發生在膝關節？玻尿酸(hyaluronic acid)注射、

服用葡萄糖胺 (glucosamine) 與軟骨膠 (chondroitin) 是否對退化性關節炎產生影響？諸此種種都是我們目前所想要解答的問題。

關節軟骨是一種多相 (multiphasic) 材料，由固態包含軟骨細胞 (chondrocytes)，蛋白聚醣 (proteoglycans) 以及第二類型膠原 (collagen)，液態水和移動的離子態所組成的 (Maroudas 1979; Mow and Ratcliffe 1997)。帶負電的蛋白聚醣吸引水分子進入組織引起膨脹，直到包含溶解之電解質的生理液達到平衡。

關節軟骨是非均質 (inhomogenous) 組織，生物化學組成和結構隨深度的不同 (Maroudas 1979; Mow and Ratcliffe 1997) 導致深度相依 (depth-dependent) 的機械特性 (Kempson 1968; Akizuki 1986; Schinagl 1997; Wang 2002, 2003)。軟骨也已經被證明在拉力時是非等向性，並拉力剛度顯示在分裂線方向平行有更高的值，也是就膠原微纖維在表層區域的方向，而不是垂直的方向 (Kempson 1968; Akizuki 1986)。而且新近的研究已經證明當考慮到它的拉力—壓力非線性和非均質時，軟骨展現與正交對稱性一致的材料特性 (Wang 2003)。

振動光譜 (Vibrational spectroscopy) 是一個對瞭解組織裡隨病理學狀態的化學改變能提供解析證明

的工具 (Jackson et al., 2002; Edwards et al., 2001)。尤其無機組織的紅外光吸收 (infrared, IR) 及拉曼 (Raman) 光譜提供那些複合組織裡的無機質 (mineral) 與膠原 (collagen) 基質 (matrix) 部分詳細的化學資訊。紅外吸收光譜和拉曼光譜已經應用於許多完整組織樣本，並且兩者為骨頭分析很好的方法。(Drumm et al., 1995; Christensen et al., 1998; Timlin et al., 1999, 2000) 兩種方法能提供對無機質和基質的相互作用或者藉由光譜成像或者點光譜化學特定成分的化學性質了解 (Carden et al., 2000)。

近年來，振動光譜學逐漸被用來研究骨骼性質，而且是一個成效良好的技術 (Carden 2000)。紅外光 (IR) 和拉曼 (RAMAN) 的光譜學可以用來研究正常和骨質疏鬆的軟組織，以及探討各種骨骼疾病所造成的成份變化 (Carden 2000; Magne 2001; Ou-Yang 2001; Gadaleta 2000)。由於樣品完整性以及在水中不被強烈干擾的能力，使拉曼光譜 (RAMAN SPECTROSCOPY) 特別有用。拉曼光譜能夠收集微米尺度之空間解析度，並得到關於骨骼無機物和有機質的即時資訊。拉曼光譜也能夠在二維的區域上被收集，以得到相關的空間影像資訊。隨著多變數統計學的應用，能夠解決骨骼成份中小區域的變化 (Timlin 2000, 1999; Pezzuti 1998)，可同時獲得無機物和有機質的資訊，並得到探討範圍中骨骼成份的完整圖片。波數 (wave number) 在大約 960 cm^{-1} 的磷

酸 ν 1 帶，以及骨膠原帶（1250 cm^{-1} 的 Amide III、1450 cm^{-1} 的 CH₂ 擺動帶、以及 1665 cm^{-1} 的 Amide I）對於研究骨骼成份時具有特別的意義（Carden 2000）。

拉曼光譜對於生物組織是一個新的技術（Renugopalakrishnan 1985），可用來觀察藉由機械負載在聚合物（Yeh 1998, 1999）和蛋白質薄膜（Frushour 1974）所造成的材料變化，以及在溶液中蛋白質結構改變所引起的變化。通常，外加荷載所引起的結構變化會造成拉曼光譜（Yeh 1988, 1999；Frushour 1974）的平移。Amide I 大約在 1665 cm^{-1} 和 amide III 大約在 1250 cm^{-1} ，由於兩者在交差鏈結和鏈結中的角色眾所周知，因此是蛋白質構造非常好的標示（Bandekar 1992）。如矽或鈣的氫氧化磷的水晶材料光譜，外加荷載也會造成光譜平移，這大概是由於晶格受壓力所引起的晶格重新排列（Kailer 1999；Xu 1996；Butler 1997；Vaidya 1997）。

MAUGARS（1994）開始用 SEM、TEM、electron diffraction and Raman spectroscopy 量測髖關節軟骨、關節液、肌肉和肌腱，因為當時技術的不成熟所以無實際結果。Taddei（2002）運用拉曼光譜在人工關節研究，使用顯微拉曼光譜研究滅菌法（gamma and ethylene oxide (EtO) treatment）對超高分子量聚乙烯髖臼杯的結晶度改變的影響。Bagratashvili（2002）使用紅

外光吸收光譜、拉曼光譜和熱補償式掃描熱卡儀系統來研究 2- and 3-W 紅外雷射照射所造成脂肪和纖維組織的結構改變。

Jones（2005）第一次提出拉曼光譜可作為非侵入技術來即時監測軟骨細胞在三維支架的生長反應概念。為開始運用拉曼的技術在軟骨培養監測，然無詳細描述如何應用。Morris（2004）發表骨關節炎的老鼠動物模式。他建議拉曼光譜能鑑別及量測眼睛膠原蛋白的不正常並且有作為量測眼睛膠原蛋白的損壞診斷的潛力。Heger（2006）利用拉曼陣列光譜在雷射照射兔耳關節時，軟骨細胞及細胞間質的結晶沈澱初步研究中，第一次驗證在兔耳關節雷射整形時細胞內硫酸鈣沉澱及細胞間磷酸鈣(磷灰石)結晶成分。

由於本計畫是關於關節軟骨組織的拉曼光譜研究。即是利用拉曼散射光譜的技術對退化之膝關節軟骨進行分子層次的病因學研究，並且驗證是否能應用於退化性關節炎的診斷。故本研究是使用拉曼散射光譜探討退化性關節炎中關節軟骨組織的生化成分特性，關節軟骨組織的結構改變是由於無機物，或是基質的變化所產生？因為疲勞、病變、外力的因素造成的關節軟骨退化，到底是關節軟骨中的何種成分改變了？關節軟骨的機械特性是否也改變了，都是我們要探討的主題。

一、 方法

樣本處理

在本計畫中我們將利用動物（豬）膝關節軟骨（第一年）、退化性膝關節軟骨（第二年）為樣本。並本實驗使用實驗當天市場的年輕溫體豬膝蓋股骨關節，首先以清水洗滌去除血水，再用鋸子把軟骨包含軟骨下方骨頭（subchondral bone）部分鋸下。把取下部分用生理食鹽水清洗後，再切成適當大小，泡於磷酸緩衝液（Phosphate Buffer Saline, PBS）中，置於4℃冰箱中等待實驗。

軟骨的力學特性之拉曼光譜分析實驗使用實驗當天市場的年輕溫體豬膝蓋股骨關節，首先以清水洗滌去除血水，再用鋸子把軟骨包含軟骨下方骨頭（subchondral bone）部分鋸下。把取下部分用生理食鹽水清洗後，泡於磷酸緩衝液中。然後再把樣本分成兩種，一為包含軟骨下方骨頭的關節軟骨而另一種為純關節軟骨並且都是完整的軟骨結構（表層、穿越層、中層及深層），切成2 mm×2 mm×2 mm左右大小的方塊，置於4℃冰箱中等待實驗。

退化性關節炎之動物模式是採取與人類相近之豬隻來作分析。本研究與台大獸醫系徐久忠教授合作，分析的樣本為老年有退化性關節炎的豬隻。樣本來自雲林屠宰場的老年母豬，平均體重150KG，從數十隻膝蓋關節中選出明顯退

化性關節炎的部分，總共取得前肢肱骨7隻及後肢股骨8關節。當天取得的骨頭，泡於生理食鹽水中，冷藏於冰桶，等候處理。回到實驗室，依照病變的型態進行分類，然後照相紀錄並同時確定即將進行拉曼訊號量測掃描的位置，以利之後的組織切片比對。照相完，為了避免樣本太大不方便拉曼光譜的掃描，再把每一隻骨頭軟骨含軟骨下方骨頭部分的部分鋸下來。接著將鋸下的部分泡於磷酸緩衝液中，置於4℃冰箱中等待實驗。



圖1:股骨關節軟骨退化病變形式之一



圖2:肱骨關節軟骨退化病變之一



圖3: 肱骨關節軟骨退化病變之一



圖4: 肱骨關節軟骨退化病變之一

人類退化膝蓋關節軟骨之拉曼分析本研究與台大醫學院骨科王崇禮教授合作，實驗的樣本為退化性關節炎的患者，其接受人工關節手術後所殘留之關節軟骨。每次患者在接受手術時即收集患部各區域的關節軟骨，anterior、medial distal、lateral distal、medial posterior、lateral posterior、medial tibia及lateral tibia 7個部分，將其浸泡於生理食鹽水中，置於4°C冰箱中等待實驗。當然每一部份都切割為適當大小，方便拉曼光譜的掃描。

拉曼顯微譜儀

本計畫利用一台商業用之拉曼顯微光譜儀（Almega，Thermo Nicolet，U. S. A.）收集軟組織樣本的拉曼光譜訊

號。主要使用785nm雷射光源透過 10×及 50×物鏡對焦樣本表面，收集400 到 1800 cm^{-1} 的拉曼訊號。

關節軟骨樣本放載玻片上，置於具有xyz三維步進馬達樣本平台，可由電腦直接控制xyz位置。進行拉曼實驗時，膝關節軟骨樣本受到 25 到100 mW 的雷射照射。每次曝光時間為2秒至5秒，累加40次，以得到較強之拉曼訊號，並防止螢光訊號及雜訊產生。

一個完整的拉曼光譜，是由目標沿著線的每個點即時的收集，藉著一個收集透鏡的聚焦，並且直接向一個軸向傳輸的拉曼散射譜線，這個訊號是被電熱冷卻CCD 照相機偵測到，並且儲存在個人電腦中。在雷射光束下，使用移動平台，當移動樣本時，每一步約移動1 μm ，而建立起2D 的影像，並且在每一個新的位置，獲得了新的光譜線。因此，每一組影像資料，包含了一個值，帶著每一個有完整拉曼光譜的點。為這些研究，在每一個區域都有二個位置的拉曼影像，每一個影像包含了二十五條光譜線，每一個影像面積大約是200×35 μm ，在這個樣品中的全部能量是230mW，分散在一個約200 μm 長及6 μm 寬的區域，因為雷射光束的形狀、能量密度相對的小，熱消耗是高效率的，所以在這個實驗中所使用的大小軟組織對無機的熱損害，在使用此技術時並沒有察覺到。

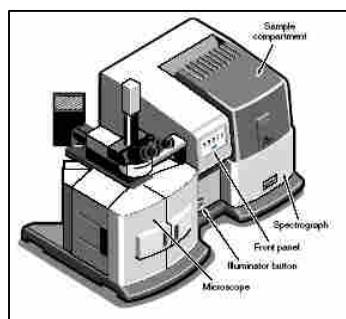


圖5:顯微拉曼光普儀及拉曼光譜顯微儀
示意圖 (Thermo Nicolet)

光譜訊號處理

分析分為兩部分，第一先對原始拉曼光譜訊號做處理及校正，第二對處理過的數據作分析，而本實驗即是用統計學的鑑別分析來分析軟骨病變差異。

首先將收集到的每一組拉曼訊號為 892 個的原始資料 (row data) 先降低資料量為所要的 728 ($400-1800\text{ cm}^{-1}$)，共 25 組數據成為 25×728 大小的矩陣，經過利用自行發展的 Matlab 程式降低雜訊，並自動校正每一組的基線，之後再線性的基線校正一次，最後再把每一組的值除以在 1450 cm^{-1} 的 CH_2 搖動帶的最高值作正規化 (Normalization) 處理。 CH_2 搖動帶之所以被選擇乃是由於受外力改變蛋白質結構時，比氨基化合物 (amide) 較不能改變形狀或平移。

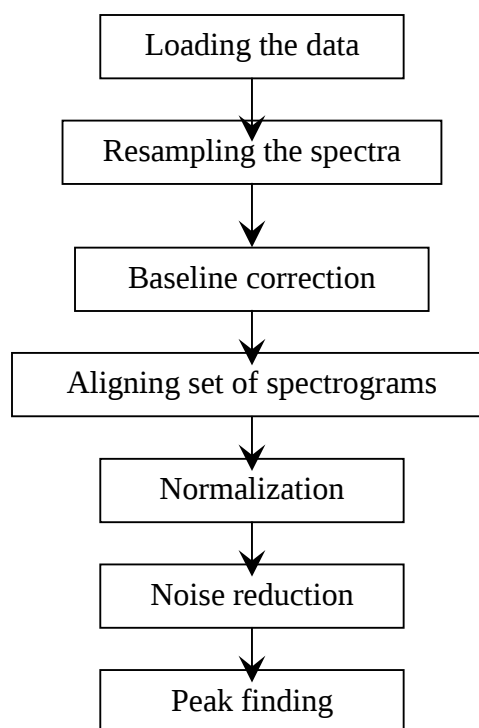


圖 6:拉曼光譜原始訊號資料處理

定性與定量分析之校正模型目的均為預測，定性分析預測未知樣品所屬的族群別，而定量分析則預測分析成分的數值。因此使用的統計方法，先以主成分分析(principal component analysis, PCA)或集群分析(cluster analysis)探討各樣品族群的光譜數據分布。再以幾何學的距離量測方法如馬氏距離 (mahalanobis distance) 等進行鑑別分析(discriminant analysis)。鑑別分析，其數學原理在於利用不同樣品族群的平均值及標準偏差，建立各族群在多維空間中所處的位置，並判斷未知樣品所歸屬的族群。

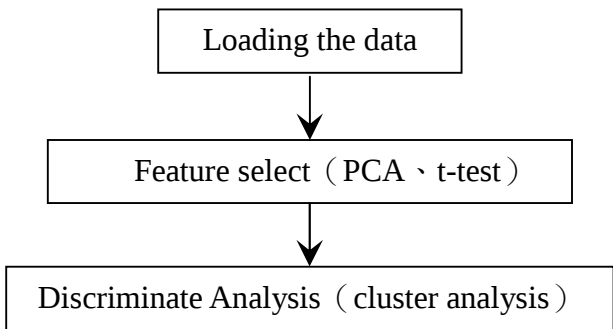


圖 7:拉曼光譜訊號分析

資料分析

單變數和多變數分析都被用來研究資料。使用的光譜參數與無機對有機質成正比。相似的參數以常被紅外光譜使用。這光譜的無機對有機質比是對所有影像的區域作計算。就是把光譜隨機分為十組，並計算每一組的平均光譜，接著讓它配合一個三階多項式以去除發光背景的以影響。再把在 959cm^{-1} 磷酸 ν_1 帶的最高值除以在 1450cm^{-1} 的 CH_2 搖動帶的最高值。 CH_2 搖動帶之所以被選擇乃是由於受外力改變蛋白質結構時，比氨基化合物(amide) 較不能改變形狀或平移。對每個影像而得到了十個無機對有機質的比並從這十個值中得到標準差。

因素分析也使用在每一組影像資料上。因素分析也是一個已建立好的多變數影像分析技術，用來在磁共振影像和螢光影像領域。我們常使用這樣的資料

分析方法作為拉曼光譜和影像資料的分析。在這技術裡，資料被視為帶著一空間和光譜行為的矩陣。這矩陣的共變數矩陣被計算，並且奇異值解離以用來得到共變數矩陣的特徵值和特徵向量。然後特徵向量能被結合在線性組合裡(或”旋轉”)，使用非負和帶狀的限制以產生拉曼光譜。值得注意的，這不是隨機的過程，光譜不能由旋轉產生;然而可以非常有效的從背景分離出來。更進一步的說，因為因素分析是一平均的技術，一般而言，在因素上的噪訊比是明顯的比未加工的光譜好。因素分析對分開重疊的光譜是有用的，但是在空間的分部上是不同的。同樣地，如果兩個樣本有不同的光譜，但在相同的空間分布，他們的光譜不會被分離。

一旦特徵向量(或稱為因素)已被有效的旋轉，但一獨立因素的探討範圍分布能藉著把因素帶回資料中而計算出來。這最後結果的影像，被稱為痕跡影像(score image)，並且是在這區域影像中很多因素強度的分部。

對這些實驗影像資料被分為2 個光譜子區域：1. 「有機區域」(約 $500\text{--}1200\text{cm}^{-1}$) 包含無機成分最激烈和獨特帶。2. 「有機質區域」(約 $1200\text{--}1800\text{cm}^{-1}$) 包含由於骨膠原質的最激烈帶。每一個光譜區域可以被分開分析。再本研究中，因素分析是採用MATLAB 分析，其中包括套裝軟體及因應需求自

行發展的軟體模組。

力學分析

因著不同的施力將造成軟骨內部結構及成分的變化。首先本計畫使用微米等級的應力分析，來模擬退化性關節炎的機械特性，以得到光譜與應力、應變的關係。接著，在連續施力下的動態分析，包括長時間施力或振動，來模擬軟骨組織在長期受力下的組織疲勞、退化。並進一步對照比較退化性關節炎患者的樣本，藉著統計分析，找出能代表退化性關節炎的因子。



圖8:攜帶式軟骨黏彈鬆弛特性力學測試平台

二、結果與討論

在此兩年期計畫中，我們將建立以拉曼光譜為檢測工具之分析系統，在第一年的研究以動物膝關節軟骨為樣本，

評估拉曼光譜顯微系統的功能應用性，建立因素分析與模擬，並且採集膝關節軟骨樣本，設計研究硬體測試平台。探討各種作用力（正壓力與剪應力）對於動物膝關節軟骨之影響為研究目標，建立完整的軟硬體資料處理系統與臨床相關性評估。第二年主要分析動物（豬）膝關節軟骨組織在長時將受力和振動下的機械特性和光譜的相關性。利用退化性膝關節炎病人進行全膝人工關節置換術時切下之軟骨組織為標本進行拉曼光譜分析。比較歸納第二年動物實驗結果和人體組織光譜的相關。分析人體膝關節病變和拉曼光譜的關係，找出代表因子。試圖建立判斷關節病變的光譜指標。

第一年：膝關節軟骨組織拉曼光譜的資料分析的研究

（1）以動物（豬）膝關節軟骨組織建立分辨雜訊及正常光譜的能力

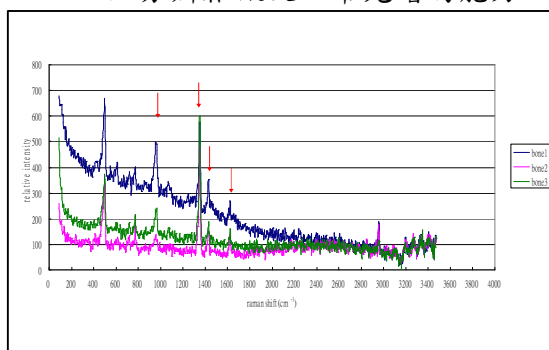


圖9:骨頭拉曼光譜訊號及螢光背景雜訊降低

（2）動物（豬）膝關節軟骨組織成分和光譜的關係

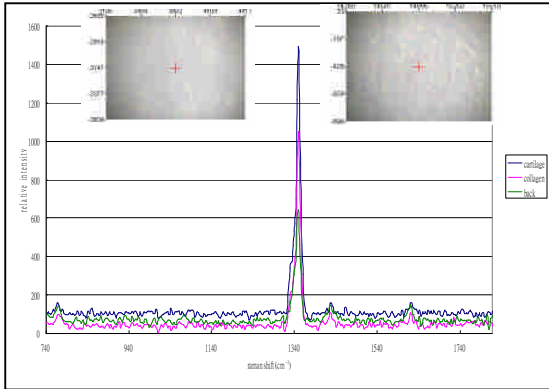


圖10:豬關節軟骨與純第二型膠原蛋白 (SIGMA, C9301)比較

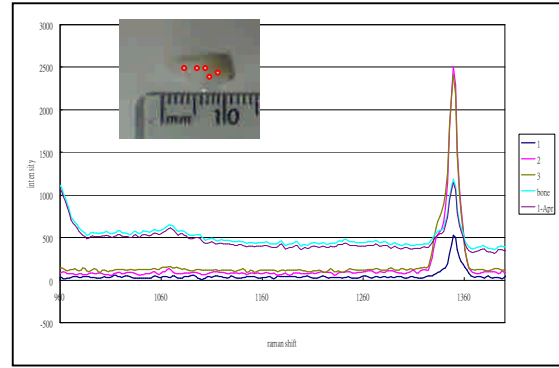


圖13:軟骨表面訊號比較

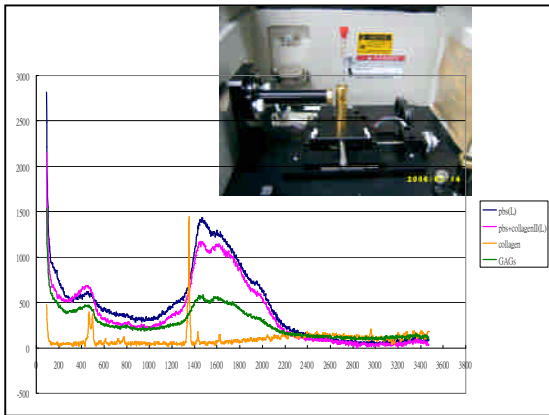


圖11:軟骨、膠原蛋白(SIGMA, C9301) 及玻尿酸拉曼訊號差異

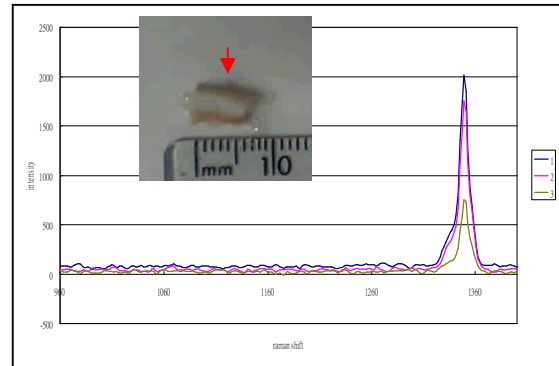


圖14:關節軟骨垂直表面之深度分析

(3) 建立動物(豬)膝關節軟骨組織的光譜資料庫

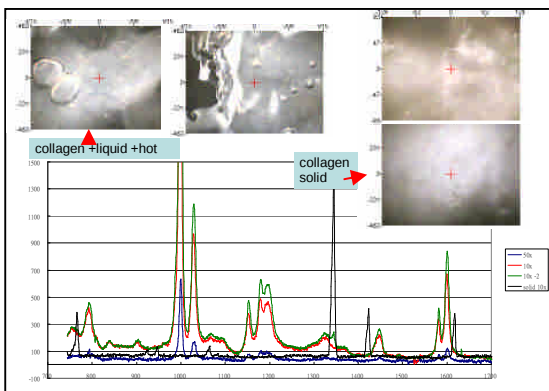


圖12:膠原蛋白(SIGMA, C9301)固態與液態結構失序拉曼訊號

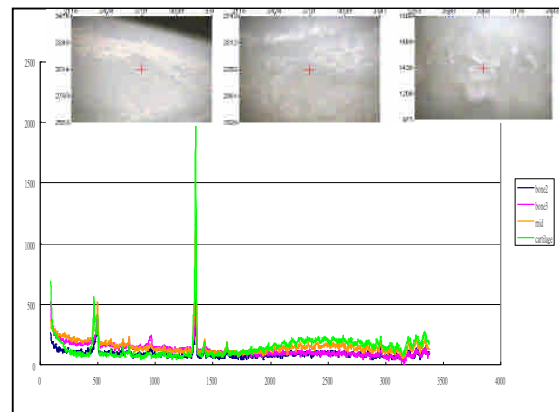


圖15:關節軟骨表層、中層、深層、鈣化軟骨層及骨頭之拉曼訊號比較

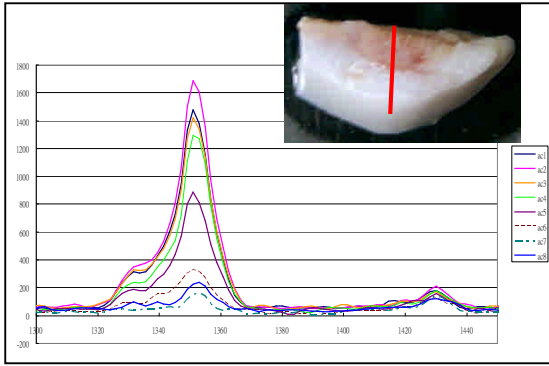


圖16:關節軟骨剖面拉曼訊號掃描

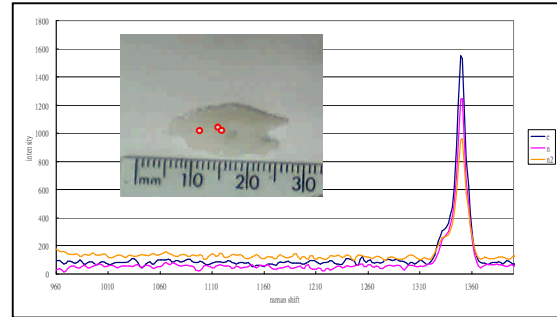


圖19:軟骨受到破壞後之正常與破壞部分比較

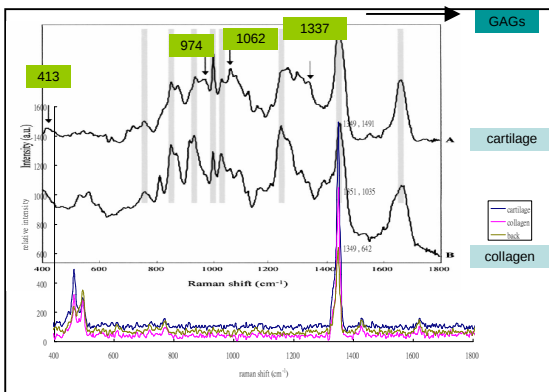


圖17:關節軟骨訊號與文獻比較

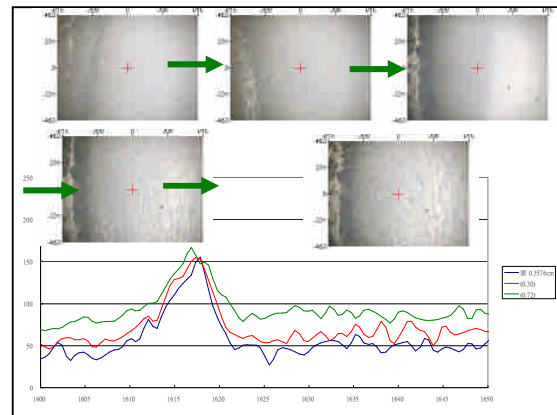


圖20:軟骨在不同受力下,形變量與拉曼光譜關係

(4) 動物(豬)各種關節軟骨組織在承受相同荷力之拉曼光譜變化



圖18:應力分析平台設計及製作

光譜分析

1. 比較 1349 cm^{-1} 相對強度
2. 譜線減掉純第二型膠原蛋白
3. 有機對無機質比
 - I_{1349} / I_{960}
4. Amide III to $\delta(\text{CH}_2)$ 比
 - I_{1349} / I_{1426}
5. $1322 \text{ cm}^{-1} - 1370 \text{ cm}^{-1}$ 面積 (強度累積)

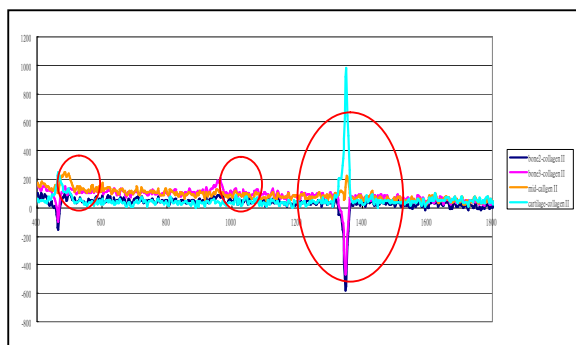


表1:關節軟骨拉曼譜線扣除膠原蛋白拉曼譜線

破壞距離	I_{1349}	I_{1349} / I_{960}	I_{1349} / I_{1428}
遠—正常	1549	16	9
近邊緣	1241	41	8
邊緣—破壞	955	5	5

表2:軟骨受破壞之正常與受剪力破壞部分拉曼訊號強度差異及譜線比

側面表面	I_{1349}	I_{1349} / I_{960}	I_{1349} / I_{1428}	$\Sigma I_{1322} - I_{1370}$
mid	2471	24	6	17050
surface	2382	18	10	15047
Bone1	1186	8	5	8199
mid2	1001	12	10	6081
Bone2	733	6	4	4328

表3:軟骨各層拉曼訊號強度差異及譜線比

第二年:進一步得到長時間受力下關節軟骨分子鍵結變化與軟骨硬度的相關性，並且也對退化性關節炎的動物模式及人體體外樣本做拉曼光譜分析

(1) 關節軟骨拉曼訊號相對應的鍵結

Raman	Assignments
-------	-------------

shift (cm-1)	
1677	Amide I (β -sheet and disordered)
1668	Amide I
1657	ν (C=C)cis(lipids) , Amide I (α helix)
1643	Amide I
1574	Amide II
1457	Fermi interaction δ (CH ₂) and γ (CH ₂)
1448	δ as(CH ₂) and δ (CH ₂) of proteins
1349	Amide III (α helix) (δ (NH ₂))
1333	Amide III (α fibrous) (δ (NH ₂))
1257	Amide III (δ (NH ₂))
1253	Amide III - β and random (δ (NH ₂))
1230	SO ₃ ⁻ asymmetric stretch
1067	SO ₃ ⁻ sys. stretch
495	C=O inplane bending
477	Mainly skeletal modes
467	Primary , inplane C-C=O def

表4:整理之有機質部分拉曼光譜譜線相對應鍵結

(2) 關節軟骨相對於彈性變形之拉曼分析

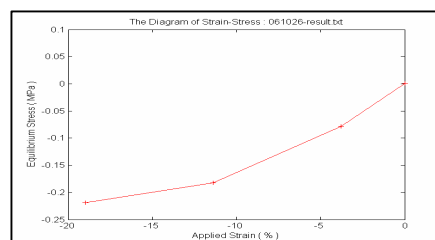


圖21:high incremental strain relaxation外施應力對應變圖

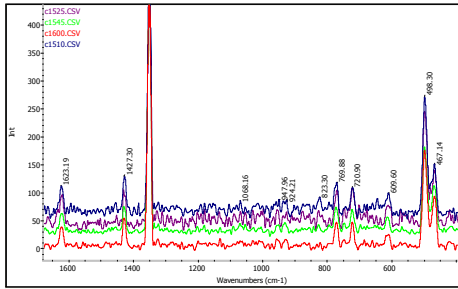


圖22:在high incremental strain relaxation 實驗中，四個平衡點時的拉曼光譜掃描。藍色為開始平衡點，紫色為第一次壓縮平衡點，綠色為第二次壓縮平衡點，紅色為第三次壓縮平衡點

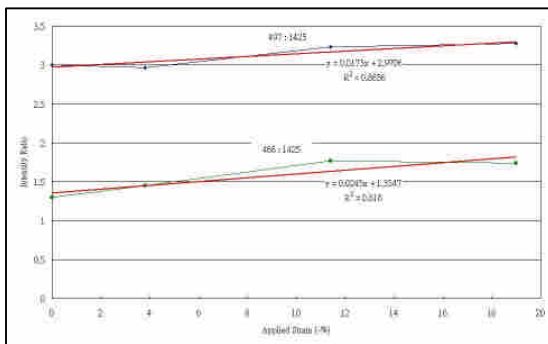


圖23:high incremental strain relaxation 497cm⁻¹及466cm⁻¹強度比較。四個平衡點時的拉曼光譜掃描。466cm⁻¹為無機質鍵結，497cm⁻¹為基質鍵結

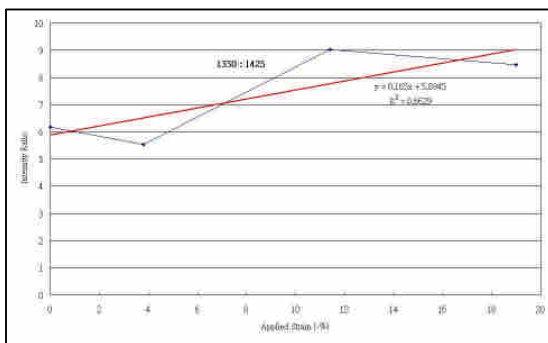


圖24:high incremental strain

relaxation 1350cm⁻¹強度比較。四個平衡點時的拉曼光譜掃描。1350cm⁻¹為基質鍵結

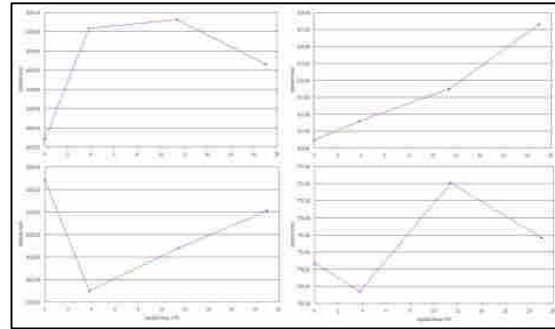


圖25:在high incremental strain relaxation 之拉曼平移比較圖。四個平衡點時的Raman marker為左上角1427cm⁻¹、右上角616cm⁻¹、左下角1633cm⁻¹及右下角770cm⁻¹

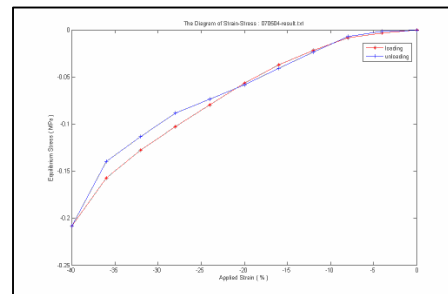


圖26:關節軟骨包含骨頭loading 和 unloading之黏彈特性

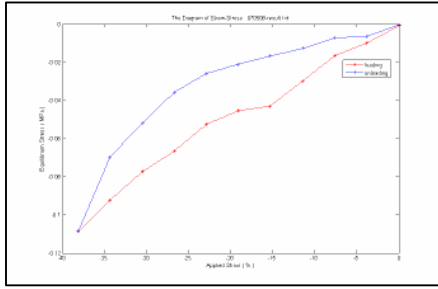


圖27:關節軟骨不包含骨頭loading 和 unloading之黏彈特性

(3) 豬隻骨關節炎診斷方法之拉曼分析

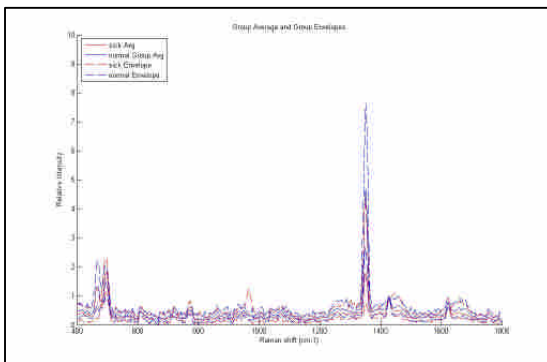


圖28:目視初步分類正常與非正常軟骨拉曼光譜平均值及包絡線。藍色線為正常軟骨拉曼光譜，紅色非正常軟骨的拉曼光譜

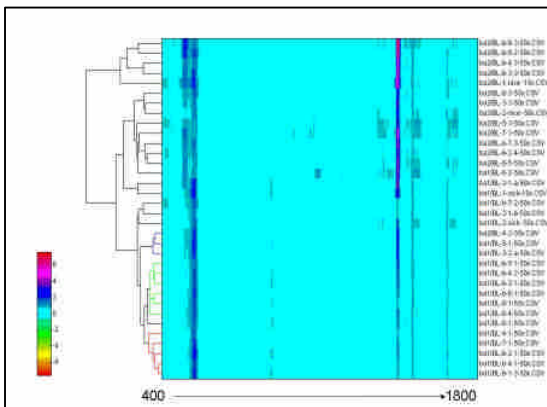


圖29:豬退化性關節炎拉曼光譜集群分析

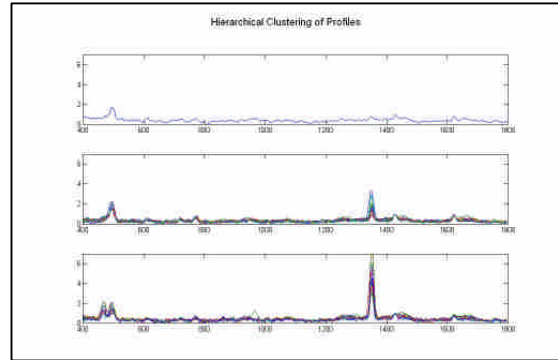


圖30:豬退化性關節炎拉曼光譜波型鑑別分為三群

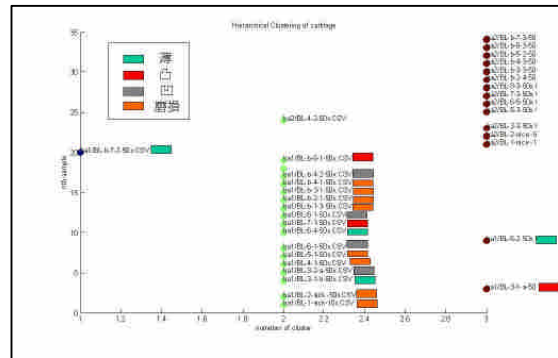


圖31:豬退化性關節炎拉曼光譜波型鑑別分為三群，各群列表

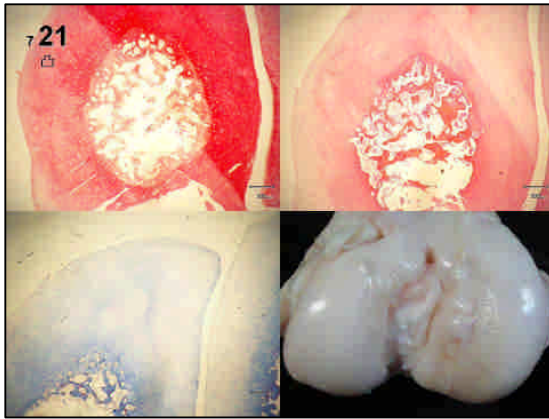


圖32:股骨關節軟骨凸狀病變。左上方 Picro-sirius stain，左下方Trichrom stain，右上方HE stain

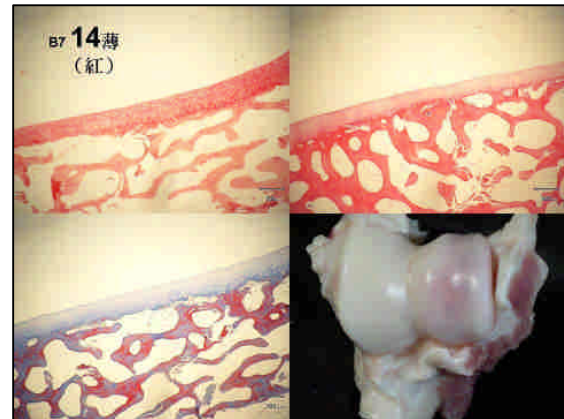


圖34:肱骨關節軟骨變薄病變。左上方 Picro-sirius stain，左下方Trichrom stain，右上方HE stain

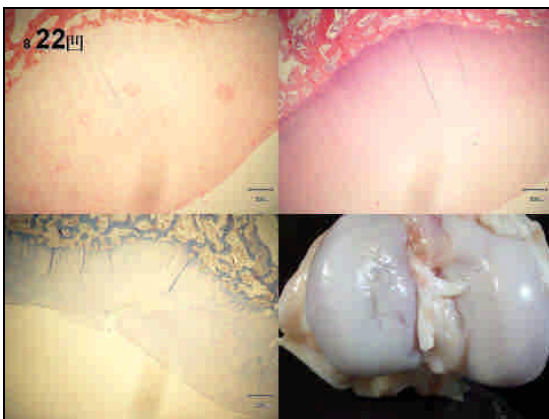


圖33:股骨關節軟骨凹狀病變。左上方 Picro-sirius stain，左下方Trichrom stain，右上方HE stain

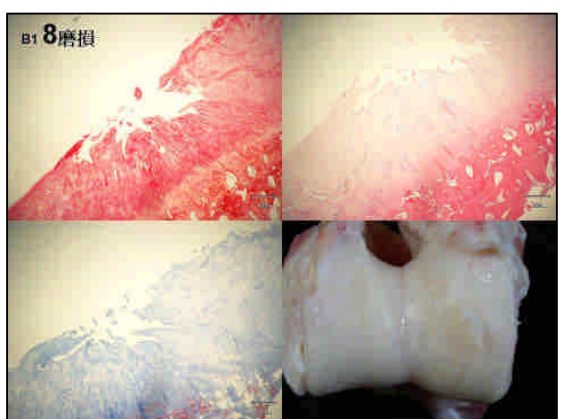


圖35:肱骨關節軟骨鬚狀病變。左上方 Picro-sirius stain，左下方Trichrom stain，右上方HE stain

(4) 人類退化膝蓋關節軟骨之拉曼分析

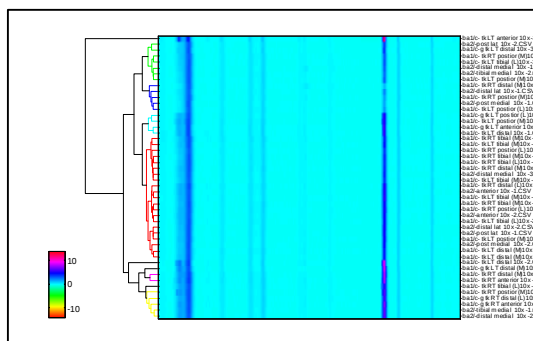


圖36:人類退化性關節炎拉曼光譜集群分析

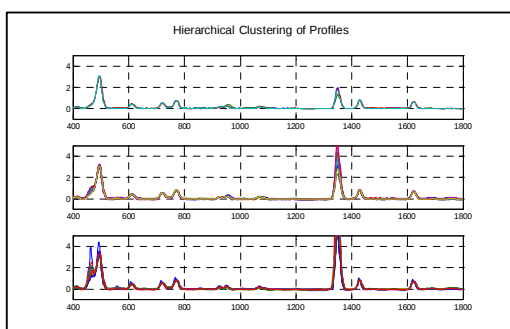


圖37:人類退化性關節炎拉曼光譜波型樣式鑑別分為三群

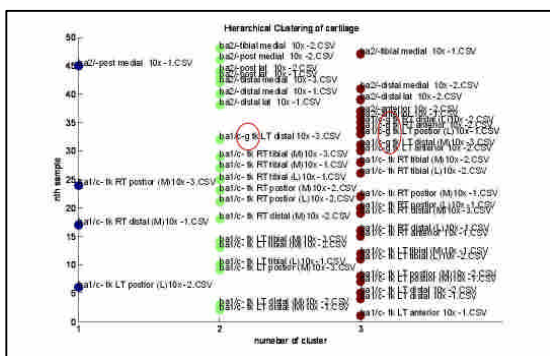


圖38:人類退化性關節炎拉曼光譜波型鑑別分為三群，各群列表。紅色所圈出的檔案為實驗前對樣本目測為正常部分。

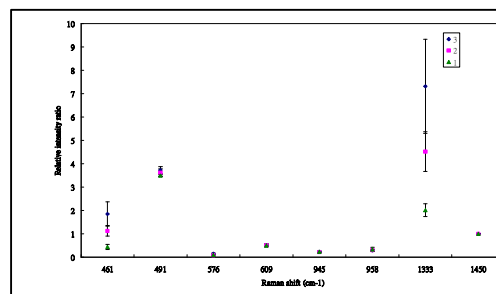


圖39:拉曼光譜波型樣式依照強度之 Raman marker analysis。綠三角點為第一群，粉紅方點為第二群，藍菱形點為第三群

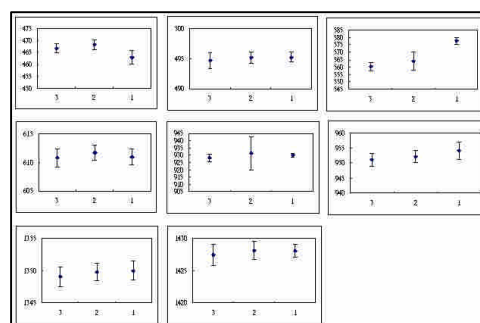


圖40:人類退化性關節炎拉曼光譜波型樣式raman shift 比較

討論

關節軟骨是無機質與膠原蛋白的組成。400 - 1100 cm^{-1} 帶是無機質部分，464 cm^{-1} phosphate ν_2 ，960 cm^{-1} phosphate ν_1 。1000 - 1800 cm^{-1} 帶有機部分，1349 cm^{-1} amide III，1430 cm^{-1} CH_2 bending mode of lipid，protein，1621 cm^{-1} amide I。

以實測純固態膠原蛋白 (SIGMA，C9301)及前人GAGs譜線比較，

軟骨部分與膠原蛋白峰值一致，唯在 1349 cm^{-1} amide III 有較高強度，這部分可能與GAGs有關。在骨頭部分比膠原蛋白多了 960 cm^{-1} phosphate ν_1 ，骨頭有較多無機部分。比較 1349 cm^{-1} 強度無法分辨鈣化軟骨層與骨頭差異，若是要分辨軟骨和骨頭差異，則以有機對無機質比分辨，若是軟骨間的比較，則以 Amide III 對 $\delta(\text{CH}_2)$ 比分辨差異， 1322 cm^{-1} 到 1370 cm^{-1} 強度累積方式則與直接比較 1349 cm^{-1} 強度結果一致。

High incremental strain relaxation 實驗中，關節軟骨的 incremental Young's Modulus 在 4% strain 時比 low incremental strain 的數值偏高，其原因可能為在快速變形時，所受的滲透壓的阻泥效應影響。而且不論從文獻或是 low incremental strain 的實驗都可發現從 10% strain 到 20% strain 是常數的 incremental Young's Modulus，屬於彈性體的材料特性，但 high incremental strain 實驗發現在 19% strain 的係數遠低於 10% strain 的值，雖然最後的楊氏係數都是約 0.5MPa 左右。這部分說明當關節軟骨一步步的壓縮時，包含在軟骨中的液體有充分的時間釋放出去，液體較小的狀況下造成平衡時的拉應力相對較小所以材料係數會偏低，若是突然大幅的壓縮，液體短時間無法釋出殘留的液體量相對較多，使平衡時的拉應力增高，之所以到 20% strain 左右時不管是逐步壓縮或者是大幅壓縮的結果都大致相同，

其原因可能為此時的軟骨內液體已大部分排出，而表現出關節軟骨的固體本身的材料特性。在拉曼平移 (Raman shift) 方面，只有 616 cm^{-1} 無機質 ($\nu_4\text{ PO}_4^{3-}$) 對壓力敏感有較明顯的訊號平移。對照前人 (Andrew 2005) 的骨頭受力下造成骨頭成分分子鍵結改變的研究解釋為無機質結晶格鍵結改變所造成。另一方面，基質方面則無明顯變化。可能為軟骨中細胞間質的材料特性在 20% strain 以下，不致於產生鍵結結構的劇烈變化。

病變豬隻每塊關節軟骨分類後，根據分類的狀況分別在軟骨上標出需要做拉曼掃描的點，包括關節面上正常與不正常的部分。總共得到了 34 組的原始數據，經過訊號處理後，對所有的數據作了初步的分析。收集的每一組空間頻率 $400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ 為 728 個的原始資料 (row data) 共有 50 組的原始數據，對這樣龐大的資料 (728×34) 無法表現出成分的差異，因此運用數值的方法尋找全部資料的特徵指標，以減少變數並選出能辨別差異特徵的空間頻率。使用統計的 t-test 方法及迴圈合格測試 (multiple validations)，可以發現兩個明顯的特徵空間頻率， 1348.4 cm^{-1} 及 462.4 cm^{-1} 。 1350 cm^{-1} 代表軟骨中膠原纖維的次級結構 (Amide III、 α helix)， 462 cm^{-1} 代表軟骨中蛋白質結構鍵結 ($\text{C}=\text{O}$ inplane bending)。因此這兩個特徵可以做豬關節軟骨退化時可參考的指標 (Raman marker)。此研究利用 Matlab toolboxes 自行發展之鑑別分析軟體，對

豬退化性關節炎樣本所有的拉曼訊號作叢集分類。初步發現，可把樣本中軟骨膠原纖維結構的部分差異區別出三種樣式的譜線。把這三種樣式的光譜比對實驗前的分類，在目視的分類中正常的譜線都分佈在同一群，有相似光譜，其特徵為在 1348 cm^{-1} 及 462 cm^{-1} 的正常部分的明顯與其他兩群的強度高出許多。比對與樣本表面的狀況與拉曼光譜的相關性，發現較正常的軟骨（表面稍光滑）那一類的 1333 cm^{-1} 峰值相對最高並且在 461 cm^{-1} 有明顯的峰出現，在其餘兩類的樣本譜線中並不明顯，甚至消失。這個結果與前面Raman marker一致。所以，退化性關節炎拉曼光譜波型的差異與關節軟骨破壞程度有一定的相關性，軟骨破損從表面、穿越層、深層，甚至到達鈣化軟骨層，膠原纖維在軟骨中的結構及本身的鍵結受到損害，根據關節軟骨剖面表面拉曼散射掃描的結果可解釋其表現。

人體體外實驗研究的樣本來源為膝退化性關節炎患者置換人工關節時所取下的，故樣本大多屬於表面破損嚴重的關節軟骨組織包含軟骨下方骨頭，一個膝關節有anterior、medial distal、lateral distal、medial posterior、lateral posterior、medial tibia及lateral tibia 7個部分，全部共48個樣本。進行關節軟骨病變分類時，無法如前動物實驗時對病變詳細的分類。並且在做拉曼實驗時關節軟骨表面嚴重破損造成高低起伏大，無法以儀器之50x物鏡

觀測（極短的焦距），故只做10x掃描，光點大小為 $20\text{ }\mu\text{m}$ 的掃描相對於50x可以得到大範圍分子鍵結結構資訊。對48組的資料作集群分析如圖4.5.2，依照譜線樣式相似程度分為三組（圖4.5.3），再把分在同族群的列出來（圖4.5.4）。集群分析是利用Matlab toolboxes 自行發展之鑑別分析軟體，對所有人類退化性關節炎樣本的拉曼訊號譜線作叢集分類。初步發現，可把樣本中軟骨膠原纖維結構的部分差異區別出三種樣式的譜線。分析這三種的譜線樣式，主要的差異為 461 cm^{-1} 及 1333 cm^{-1} 兩個峰值在整個譜線中的比例。其中 1350 cm^{-1} 代表軟骨中膠原纖維的次級結構（Amide III、 α helix）， 462 cm^{-1} 代表軟骨中蛋白質結構鍵結（C=O inplane bending）。其中一個譜線樣式的 1333 cm^{-1} 峰值強度最高在2，幾乎沒有 461 cm^{-1} 的譜線。第二種譜線樣式 1333 cm^{-1} 峰值強度最高在4.5，稍微可見些微 461 cm^{-1} 的譜線。第三種譜線樣式 1333 cm^{-1} 峰值強度都大於4.5，明顯見到 461 cm^{-1} 的譜線。

四、結論

目前有關於拉曼光譜與關節軟骨相關的研究中，以美國密西根大學M. D. Morris團隊為主，然而本研究中比其具有更新的地方在於：不只單純從化學的觀點探討軟骨表面的化學鍵結，乃更從關節軟骨本身的材料及結構對照切片及前人各種的探討，以期拉曼光譜分析更準確的描繪軟骨材料特性。所以本研究

可實際應用在軟骨病變的偵測。為了確實比對軟骨切片結果，並確認拉曼訊號與軟骨的結構關係，以作此後相關研究的標準如軟骨之機械特性、豬隻及人類的退化性關節炎比對等。因此對關節軟骨橫切面方向作精確定位拉曼掃描。根據關節軟骨橫切面的掃描分析結果可以把 1350 cm^{-1} 與 462 cm^{-1} 兩個鍵結當作日後軟骨研究的Raman marker，可以進一步應用軟骨機械特性探討或在軟骨退化疾病的分析。

豬隻和人體體外骨關節炎診斷方法之拉曼光譜分析利用t-test及PCA等分析法可找出軟骨病變時之特徵指標，主要為Amide III envelope ($1300\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$) 及 Mainly skeletal modes ($400\text{--}500\text{ cm}^{-1}$)。利用叢集分析辨別正常與病變軟骨分子層次的差異，可應用為退化性關節炎更精確的診斷。然而從切片結果發現，軟骨病變的原因有可能為物理破壞造成發炎增生、表面破損毛糙、或凹陷。其中膠原纖維和蛋白聚糖的變化可為病變的精確分期依據。拉曼光譜是一種非接觸及非破壞之方法，有潛力應用於關節鏡手術時軟骨微結構變化之偵測，尤其加上本研究所發展的分析方法對骨關節的病變應能作診斷的應用。

三、計畫成果自評

本研究主要依據計畫書所規劃事項，逐年分階段完成，第一年工作進行

相當順利，主要重點在於拉曼顯微光譜儀實驗平台建置，如樣本處理、儀器校正、訊號處理及資料收集等。總體而言，本研究計畫均按照計畫書所規劃項目逐項完成，此計畫在台大化學系林金全教授提供儀器及相關資訊的幫助下，使得本研究能深入並得到具體結果。

參考文獻

1. Maroudas, A. 1979: Physicochemical properties of articular cartilage. Adult Articular Cartilage. Pitman Medical, Kent. In: Freeman, M. A. R. (Ed.): 75.
2. Mow, V. C. and A. Ratcliffe. 1997: Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: Mow, V. C., Hayes, W. C. (Eds.). Basic Orthopaedic Biomechanics. Lippincott-Raven. Philadelphia: 65.
3. Kempson, G. E., M. A. Freeman, et al. 1968: Tensile properties of articular cartilage. Nature 220: 2.
4. Akizuki, S., V. C. Mow, et al. 1986: Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. Journal of Orthopaedic Research 4: 14.
5. Schinagl, R. M., Gurskis, D., Chen, A. C., Sah, R. L. 1997: Depthdependent confined compression modulus of full-thickness bovine articular

- cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 15, 499 – 506.
6. Wang, C. C., J. M. Deng, et al. 2002: An automated approach for direct measurement of two-dimensional strain distributions within articular cartilage under unconfined compression. *Journal of Biomechanical Engineering* 124: 11.
 7. Wang, C. C. B., N. O. Chahine, et al. 2003: "Optical determination of anisotropic properties of bovine articular cartilage in compression." *Journal of Biomechanics* 36:15.
 8. M. Jackson and H. H. Mantsch, *Pathology by Infrared and Raman Spectroscopy* (John Wiley and Sons, New York, 2002).
 9. H. G. M. Edwards and E. A. Carter, *Biological Applications of Raman Spectroscopy* (Marcel Dekker, New York, 2001).
 10. C. A. Drumm and M. D. Morris, *Applied Spectroscopy* 49, 1331 (1995).
 11. K. A. Christensen and M. D. Morris, *Applied Spectroscopy* 52, 1145 (1998).
 12. J. A. Timlin, A. Carden, and M. D. Morris, *Applied Spectroscopy* 53, 1429(1999).
 13. J. A. Timlin, A. Carden, M. D. Morris, R. M. Rajachar, and D. Kohn, *Anal.Chem.* 72, 2229 (2000).
 14. Magne D, Weiss P, Bouler J-M, Laboux O, Daculsi G. 2001: Study of the maturation of the organic (type I collagen) and mineral (nonstoichiometric apatite) constituents of a calcified tissue (dentin) as a function of location: a Fourier transform infrared microspectroscopic investigation. *J Bone and Miner Res* 16:750 – 757.
 15. Ou-Yang H, Paschalis EP, Mayo WE, Boskey AL. 2001:Mendelsohn R. 2001:Infrared microscopic imaging of bone: spatial distribution of CO_3^{2-}). *J Bone Miner Res* 16:893 – 900.
 16. Gadaleta SJ, Boskey AL, Paschalis E, Carlson C, Menschik F, Baldini T, Peterson M, Rimnac CM. 2000:A physical, chemical, and mechanical study of lumbar vertebrae from normal, ovariectomized, and nandrolone decanoate-treated cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone* 27:541 – 55.
 17. Pezzuti JA, Morris MD, Bonadio JF, Goldstein SA. 1998:Hyperspectral Raman imaging of bone growth and regrowth chemistry. *Proc of the SPIE* 3261:270 – 276.
 18. Renugopalakrishnan V. 1985: Low-frequency Raman spectra as a conformational probe for polypeptides and proteins. *Macromolecules* 18:1786 – 1788.
 19. Yeh W-Y, Young RJ. 1998:Deformation processes in poly(ethyleneterephthalate) fibers. *J Macromol Sci Phys* B37:83 – 118.

20. Yeh W-Y, Young RJ. 1999: Molecular deformation processes in aromatic high modulus polymer fibers. *Polymer* 40:857 - 870.
21. Frushour BG, Koenig JL. 1974: Raman spectroscopic study of mechanically deformed poly-L-alanine. *Biopolymers* 13:455 - 474.
22. Bandekar J. 1992: Amide modes and protein conformation. *Biochim Biophys Acta* 1120:123 - 143.
23. Kailer A, Nickel KG, Gogotsi YG. 1999: Raman microspectroscopy of nanocrystalline and amorphous phases in hardness indentations. *J Raman Spectroscopy* 30:939 - 946.
24. Xu J, Gilson DFR, Butler IS, Stangel I. 1996: Effect of high external pressures on the vibrational spectra of biomedical materials: calcium hydroxyapatite and calcium fluorapatite. *J Biomed Mater Res* 30:239 - 244.
25. Butler IS, Gilson DFR. 1997: Recent studies of the highpressure vibrational microspectra of solid inorganic materials. *J Mol Struct* 408/409:39 - 45.
26. Vaidya SN, Karunakaran C, Pande BM, Gupta NM, Iyer SB, Karweer SB. 1997: Pressure-induced crystalline to amorphous transition in hydroxylapatite. *J Mater Sci* 32:3213 - 3217.
27. Maugars, Y. M., L. F. Peru, et al. 1994: Pelvic Pseudotumoral Calcium Pyrophosphate Dihydrate Deposition - an Ultrastructural-Study. *Journal of Rheumatology* 21(3): 573-576.
28. Taddei, P., S. Affatato, et al. 2002: Vibrational spectroscopy of ultra-high molecular weight polyethylene hip prostheses: influence of the sterilisation method on crystallinity and surface oxidation. *Journal of Molecular Structure* 613(1-3): 121-12.
29. Bagratashvili, V. N., N. V. Bagratashvili, et al. 2002: Structural changes in connective tissues caused by a moderate laser heating. *Quantum Electronics* 32(10): 913-916.
30. Jones, J. R., A. Vats, et al. 2005: In situ monitoring of chondrocyte response to bioactive scaffolds using Raman spectroscopy. *Bioceramics* 17: 623-626.
31. Morris, M. D. and W. F. Finney 2004: Recent developments in Raman and infrared spectroscopy and imaging of bone tissue. *Spectroscopy* 18: 5.
32. Morris, M. D., W. F. Finney, et al. 2004: Bone tissue ultrastructural response to elastic deformation probed by Raman spectroscopy. *Faraday Discuss.* 126:10.
33. Heger, M., S. Mordon, et al. 2006: Raman microspectrometry of laser-resaped rabbit auricular cartilage: preliminary study on laser-induced cartilage mineralization. *Journal of*

- Biomedical Optics 11(2):024003.
34. Andrew F. Callender , William F. Finney , Michael D. Morris , Nadder D. Sahar David H. Kohn , Kenneth M. Kozloff , Steven A. Goldstein. 2005: Dynamic mechanical testing system for Raman microscopy of bone tissue specimens. Vibrational Spectroscopy 38 :101 - 105.