

## 专论——生物组织弹性测量



栏目主编：郑永平（香港理工大学 医疗科技及资讯学系）

郑永平教授分别于1990年及1993年获中国科学技术大学电子信息工程学士及硕士学位，1997年获香港理工大学生物医学工程博士学位，其后在加拿大温莎大学（University of Windsor）就读博士后，于2001年成为香港理工大学助理教授，并于2008年在医疗科技及资讯学系晋升为教授。2008年8月~2010年7月，同时兼任香港理工大学新产品和技术研究所副所长。郑永平教授的主要研究方向包括超声弹性测量与成像、三维超声成像与测量、医用超声仪器的创新、研究与开发，以及可携带人体生理参数测量仪等。主持承担多项科研项目。他已发表及录用的SCI论文90余篇，国际会议论文150余篇，另有6项美国和4项中国授权的专利及另外12项受理中的专利。他所开发研制的组织超声弹性测量仪已被国内、外多所大学和医院用于各种软组织的评估，并有7项专利已成功转让给了工业界作产业化。

# 组织弹性测量之新型印压技术简介

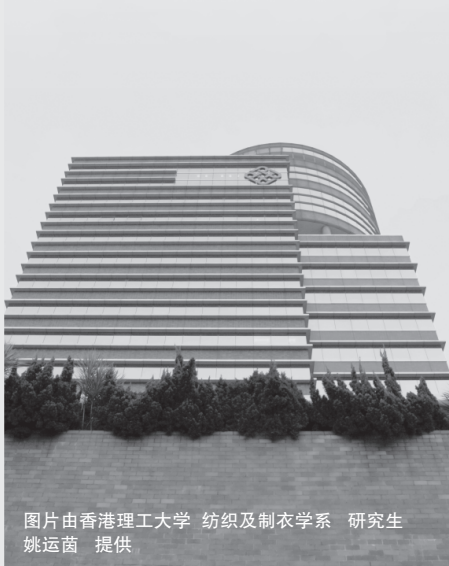
## Novel Indentation Techniques for Measurement of Soft Tissue Elasticity: A Brief Introduction

郑永平，黄燕平

香港理工大学 医疗科技及资讯学系，香港

ZHENG Yong-ping, HUANG Yan-ping

Department of Health Technology and Informatics,  
The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong,  
China



图片由香港理工大学 纺织及制衣学系 研究生  
姚运茵 提供

**[摘要]** 印压是一种常用的测量软组织弹性特征的测试方法，除了2011年第7期介绍的传统印压测试方法外，近来，还出现了一些新型的印压技术，如超声印压、光学印压、流体印压和纳米印压等。这些新型印压技术具有某些自己独特的优点，如超声印压系统便携性高，能够同时获得组织的初始厚度和形变，可以应用于多种组织的弹性测量；纳米印压能够非常小范围（微米或纳米级）地测量组织的弹性，可以分析组织的弹性分布，研究局部组织结构和弹性之间的关系。本文对这些技术及应用作一些介绍，最后讨论该领域的发展方向。

**[关键词]** 弹性；弹性测量；印压；超声印压；光学印压；水冲印压；气冲印压；纳米印压；杨氏模量；泊松比；粘弹性

**Abstract:** Indentation is a common method for the measurement of soft tissue elasticity. In addition to the traditional indentation methods that were introduced in issue7, some novel indentation techniques are emerging in recent years, for example, the ultrasound indentation, optical indentation, fluid-jet indentation and nanoindentation. All these techniques have their specific advantages, for example, the ultrasound indentation system is portable, able to measure the initial thickness and deformation simultaneously and appropriate for measurement of different kinds of soft tissues, while the nanoindentation can measure the elasticity in a very small region (in micro- or nano- scale), analyze the mapping of elasticity, and is suitable for studying the relationship between local structures and elasticity. This paper introduces these novel indentation techniques and their applications, and the future development of this field is discussed at the end.

**Key words:** elasticity;elasticity measurement;indentation;ultrasound indentation;optical indentation;water-jet indentation;air-jet indentation;nanoindentation;Young's modulus;poisson's ratio;viscoelasticity

[中图分类号] R445.1 [文献标志码] A

doi: 10.3969/j.issn.1674-1633.2011.09.001

[文章编号] 1674-1633(2011)09-0001-11

收稿日期：2011-08-13

基金项目：香港研究资助局（PolyU5354/08E）和香港理工大学（J-BB69）支持。

作者邮箱：ypzheng@ieec.org

## 1 简介

印压测试利用一个比组织面积小的印压头对组织进行压缩,然后利用实验测得的数据,计算组织的弹性特征。印压测试需要记录2个基本的物理量:力和形变(包括组织初始厚度)。印压力通常可以使用力传感器(load cell)<sup>[1-2]</sup>、应变传感器(strain gauge)<sup>[3]</sup>、光纤传感器(fiber optic sensor)(间接)<sup>[4]</sup>及光弹力压力传感器<sup>[5]</sup>测量获得。如果印压是用流体冲击完成的,可以利用液体的压强计算印压力<sup>[6-7]</sup>。在形变方面,传统印压主要利用印压头的位移来取代对组织形变的测量,可以测量位移的传感器主要有线性可变差动变送器(LVDT)<sup>[1,8-9]</sup>、电位器(potentiometer)<sup>[10-11]</sup>、电磁空间定位传感器<sup>[12-13]</sup>及机械臂三维定位系统<sup>[14]</sup>。这些位移测量系统都有各自一些明显的缺点,如LVDT、电位器或者机械臂做成的印压系统便携性不高,电磁传感器容易受周围环境干扰。随着医学成像技术的发展,也有学者尝试利用这些成像技术测量组织的厚度和印压形变。Armstrong等<sup>[15]</sup>利用X线成像观察活体软骨在承压时的形变;Gefen等<sup>[16]</sup>利用数字X线透视成像技术直接测量步态当中足跟软组织的形变情况。但是X线成像具有辐射性,且成像仪器庞大,不适宜作为便携式的系统使用。磁共振成像(MRI)系统也可以用来测量组织的厚度和形变<sup>[5]</sup>,但是MRI测量价格昂贵,系统体积也太大,所以也不适于作为临床上便携式的测量工具。超声作为另外一种成像方法,不同于X线成像和MRI,其非常适合用在印压测试里面作为同时测量组织厚度和形变的工具。一般称结合了超声来进行测量的印压系统为超声印压系统。虽然临床所见的超声成像系统显得很庞大,但是根据超声测量的特点,如果使用小型的探头,如单阵元超声探头,则超声印压系统可以有很大的便携性。Zheng和Mak<sup>[2]</sup>提出,利用超声测量印压过程当中组织的厚度和形变,他们设计了一个便携式的笔形超声弹性测量系统,该系统在各种软组织和生理病理状态的弹性特征化方面已经获得了成功的应用<sup>[17-27]</sup>。为了解决使用高频超声和实现快速弹性分布测试方面的一些问题,该研究小组又提出了水冲印压<sup>[7,28-30]</sup>和气冲印压<sup>[31-32]</sup>等新的印压系统,这些非接触式的印压系统在某些应用里面具有独特的优点。同样地,光学成像方法也可以被结合到印压测试技术里面,如基于OCT的印压<sup>[33]</sup>和基于OCT的气冲印压<sup>[31]</sup>。因为光学成像系统可以使用光纤技术进行传输和处理,所以这些印压系统在小型化方面也有优势,适合发展成内窥测量仪器<sup>[6]</sup>,在腔体测量,如关节内镜<sup>[34]</sup>及胃镜<sup>[35]</sup>测量方面具有很大的发展潜力。使用声学或者光学印压系统的另外一个优点是可以同时测量组织的声学或者光学特性及组织形态学特性。如对于超声来说,可供研究的声学特性包括组织的声速、表面反射、声衰减及散射强度;对于光信号来说,相关的光学参数可为折射率、光表面反射、内部光散射及光衰减。组

织形态学方面的参数包括组织的厚度和表面粗糙度等,本文在第2部分将进行详细介绍。

另一方面,生物组织结构的复杂性导致其力学特性具有局部性和各向异性等特点。如果能够微观地测量组织的弹性特征,那么就能更好地研究组织结构跟功能的关系,能进一步促进组织病理研究、组织修复质量评估和人工生物材料的研制。在某些情况下,组织本身的尺寸也比较有限,如常用的动物模型老鼠的软骨厚度很薄只有几百微米。因此,测量也需要较高的分辨率。为了测量生物组织的微观弹性特征,近年来,有学者引入了材料力学测量当中常用的纳米印压技术。根据可测量形变范围的不同,广义的纳米印压包括仪器化印压(instrumented indentation)和原子力显微镜印压(atomic force microscopy-enabled indentation)2种技术,在生物组织测量上有不同的使用范围和优、缺点<sup>[36]</sup>。纳米印压首先被广泛用于2种矿化硬组织,即骨骼<sup>[37-40]</sup>和牙齿<sup>[41-44]</sup>的弹性测量。主要是因为这些材料的硬度相对于软组织来说,与工程硬材料金属或陶瓷等的硬度更加接近,力和形变的测量范围也相似,因此,比较容易直接引入纳米印压仪器进行对应的测量。同时,硬组织样本比较容易准备、测量时容易固定,有利于得到可靠的测量结果。另外,这2种组织都具有明显的层状结构(在骨组织里面包括骨单位和骨层;在牙齿上包括牙釉质、牙本质和牙骨质结构),这些分层结构使局部化的弹性测量显得更加有意义。但是与传统的工程材料(金属)不同,对这些硬组织进行纳米印压测试的时候,结果会受很多外在因素的影响。如样本含水程度(hydration)、样本表面制备方法(切片还是打磨)、样本存放介质和存放时间及施加负载的频率(静态、准静态还是动态)<sup>[45]</sup>。因此,也需要对传统纳米印压测试进行一些改进。因为有了硬组织纳米印压测试的成功经验,所以学者们又将该方法用于软硬组织分界面处组织的弹性测试。如Gupta等<sup>[46]</sup>利用纳米印压研究骨与钙化软骨(calcified cartilage)交界界面附近组织的硬度及矿化程度的关系发现,硬度及钙化的相关性在钙化软骨层与骨层具有明显的不同。纳米印压在软组织弹性测量当中报导最多就是在软骨上的应用<sup>[47-52]</sup>;在皮肤角质层<sup>[53]</sup>和血管<sup>[54]</sup>弹性测量方面也有一些研究。这些测量所受外界因素的影响与硬组织的纳米印压测试又有一些不同,如压头形状和压头/组织之间粘附(adhesion)力的影响<sup>[55]</sup>,本文将在第3部分作简单介绍。

## 2 超声/光学/流体印压

### 2.1 印压系统

2011年第7期,我们介绍了传统组织印压系统的历史发展过程。从中可以看到,这些系统的发展经历了一个体积从大到小、操作可靠性由低到高、数据记录从手动到自动的过程。在传统印压测试中,一个始终没有解决的问题就是怎样同时

测量组织的厚度和形变。而超声印压就是这样一个符合测量要求的工具。Zheng 和 Mak<sup>[2]</sup> 使用单阵元超声探头设计了一个利用印压测试测量组织硬度的工具, 并称之为组织超声触诊系统 (Tissue Ultrasound Palpation System, TUPS)。该系统在笔形杆的前面安装一个中心频率为 5MHz (对不同组织可以选用 2.5~15MHz) 的单阵元超声平面波探头, 其形状为圆柱形, 后面连着一个测量一定范围印压力的压力传感器。超声探头连接到超声发射/接收仪, 压力传感器连接到传感器放大器进行信号放大作用, 最后这 2 个信号都连到电脑的采集卡进行实时信号同步采集。该系统对组织厚度和形变的测量是通过对不同组织的分界面产生的回波在印压开始和测试当中进行追踪测量获得的。因为尺寸小, TUPS 系统可以进行手工印压操作。实际当中可以利用实时力反馈进行预应力设置, 利用超声回波信号的移动控制最大印压形变。为了找到不同组织之间的分界面, 通常需要对超声探头的方向进行一定的调整, 当从组织界面获得最大超声反射时, 一般认为探头跟组织表面垂直, 可进行正式测量。为了消除或减小软组织测量的预适应 (preconditioning) 现象对结果的影响, 先对组织进行 3~5 个周期印压, 然后再进行正式的数据采集。因为组织的粘弹性, 组织弹性测试通常受印压速度快慢的影响。印压当中, 需要控制印压速度, 操作 TUPS 通常建议以操作者比较舒适的速度为宜进行印压测试, 以获得可靠有效的结果。Li 等<sup>[56-58]</sup> 提出一个和 TUPS 概念非常类似的超声印压系统, 二者最大的不同就是其引入了一个双晶超声探头, 该探头分成左右互相隔开的两个部分, 一部分负责信号发射, 另一部分负责信号接收。超声探头和力传感器被一个铝制外套包住以便测量。Suh 等<sup>[59]</sup> 提出, 利用超声印压测量软骨的声速。其方法是将超声印压系统固定在一个千分尺上, 然后对软骨进行印压。印压的形变可以根据千分尺的读数获得; 而传播时间可以通过超声信号获取。利用这两个信息就可以测量软骨的声速, 超声声速通常被认为可以用来检测软骨的退化<sup>[59]</sup>。因为在活体测量的时候很难在印压头后面安装精确测量探头位移的装置。因此, 该方法的缺点是测量只适用于离体情况。

为了测量心脏组织的弹性特征, 邓辉胜等<sup>[60]</sup> 设计了一个介入式气囊超声印压系统。该系统包括一个印压气囊, 气囊后面安装了一个中空的 5~10MHz 超声探头。使用中, 需要灌入无气水产生一定的压力来印压组织, 同时有利于超声信号的传播。印压力根据探头后安装的液体压强传感器测得的压强获得, 液体压强和印压力的关系需要进行校验。实际应用中, 该印压系统可以伸入活体心脏进行测量<sup>[61-64]</sup>。Laasanen 等<sup>[65]</sup> 将超声印压的方法结合到关节内镜系统里, 可对关节软骨进行测量。方法是, 将一个频率为 10MHz、直径为 3mm 的超声探头安装在内窥探头上, 使用时可以直接利用超声探头进行印压测试。但是值得注意的是, 如果需要利用该系统测量软骨声学特性, 特别是从软骨表面反射回来的超声信号, 需要

装上一个垫子让超声探头和软骨表面隔开一段距离后, 再进行测量。因为, 如果超声探头和软骨直接接触, 从探头表面反射回来的信号就会和软骨表面信号重叠, 两者不能区分开来; 需要额外加垫子的使用方法给测量带来不便。另一方面, 如果需要测量比较薄的组织, 就需要提高测量的分辨率, 这就需要高频超声探头。通常, 高频超声探头表面设计成内凹以用于聚焦, 因此, 不适宜直接作为压头使用。为了解决超声印压的这些缺点, Lu 等<sup>[7]</sup> 提出了水冲印压的新型超声印压系统。该系统利用水柱以非直接接触的形式对组织进行印压, 印压力可以通过调节水压的大小进行, 同时结合超声 (也可以是光学信号), 可以测量组织的初始厚度和形变。在硅胶仿体样本上进行的印压测量结果与标准压缩实验结果进行对比, 结果具有很强的相关性, 说明该系统可用于软组织的弹性测量。因为使用非直接接触式测量, 该方法还可以用来进行弹性分布图的快速测量, 其可行性也得到仿体实验验证<sup>[28]</sup>。

除了使用一维超声外, 二维的超声成像技术也可以用于生物组织的印压测试, Hsu 等<sup>[66]</sup> 在一个 7.5MHz 线性阵列超声探头后连结一个拉伸测力计, 然后将之固定在可手工操作的滑动轨道上, 对足底的软组织进行印压测试。软组织的形变通过二维超声图象的测量获得。之后, 他们对系统进行了改进, 引入了电子测力传感器, 并利用马达实现自动化测试<sup>[67]</sup>。Kawchuk 等<sup>[68-70]</sup> 也引入脊柱在印压当中的位移。因为脊柱组织弹性的改变在某些情况下是病变 (如退化) 的征兆, 该方法的原理是利用标准方法测量印压过程当中探头的总位移, 然后根据超声算出软组织厚度的改变, 两个进行相减就能获得脊柱在印压过程当中位移。Han 等<sup>[71]</sup> 为了方便测量一个 7.5MHz 线性阵列超声探头印压所产生的作用力, 引入一个六轴力 (力矩) 传感器。超声探头安装在该六轴传感器的一边, 另外一边安装手持外壳, 以方便进行印压力的测量。使用该系统可进行二维图象印压测量。

除了超声成像外, 光学方法在印压测试当中也获得了应用。Duda 等<sup>[6]</sup> 报导了一个利用光信号强度检测软骨形变的水冲印压系统。该系统使用可见光, 利用接收到的可见光强度受反射面位置的变化而变化的原理测量印压形变, 设计成关节镜形式可进行关节内测量。该方法可以测量软骨上印压力/形变关系。但是其明显的缺点是, 测量可能受可见光, 如软骨表面颜色的影响。Liu 等<sup>[72]</sup> 也利用类似光强度的检测原理设计了一个滚轮印压系统。该系统中心含有一个滚轮印压头兼力传感器, 四周有 4 个位移传感器, 这些力和位移传感器都是基于印压产生的位移后利用光信号变化进行检测。近年来, 随着光学相干断层扫描成像 (OCT) 技术的快速发展, 人们也把目光投向其在生物力学工程当中的应用潜力。OCT 相对传统光学成像方法的优势是具有一定的扫描深度 (非透明组织 2~3mm) 和较高的分辨率 (微米级)。Yang 等<sup>[73]</sup> 提出了一个应用 OCT 对印压形变进行观测的光学印压系统。实验使用圆形压头在水凝胶上面

进行印压, 利用 OCT 从水凝胶层下面往上进行观测。值得注意的是, 该方法使用 OCT 从组织底部进行观测, 比较适合于薄层组织的离体实验, 但在活体测试上有很大的局限性。王立科等<sup>[3]</sup>提出, 从组织表面进行 OCT 印压。方法是将印压头改成透明材料, 该系统可以应用在活体组织的测试上。Huang 等<sup>[31]</sup>提出一个基于 OCT 的气冲印压系统用于生物组织弹性特征的测量。该系统使用气柱对被测材料进行印压测试, 然后用 OCT 从组织表面对印压的形变进行测量。下面介绍对这些新型印压系统测试获得的数据进行分析的常用方法。

### 2.2 印压数据分析

利用测得的力、形变和组织初始厚度数据, 可以使用经典的印压公式计算组织的平均弹性模量<sup>[74]</sup>:

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

式中,  $E$  为组织的杨氏模量;  $\nu$  为泊松比;  $a$  为圆柱形压头底面半径;  $P$  为印压力;  $w$  为印压形变;  $h$  为通过超声测量得到的组织的初始厚度;  $\kappa$  是跟组织泊松比  $\nu$  和压头半径/组织厚度比 ( $a/h$ ) 有关的比例因子。当组织产生大形变的时候, 可以使用修正后的公式进行计算<sup>[75]</sup>:

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

式中,  $\kappa$  增加了一个跟形变比  $w/h$  有关的因子用以修正大形变所产生的影响。基于软组织具有很明显的粘弹性特征, Zheng 等<sup>[17]</sup>又提出用以下准线性粘弹性模型 (QLV) 来计算组织的粘弹性参数<sup>[76]</sup>:

$$P(t) = P^{(e)}(u(t)) + \int_0^t P^{(e)}(u(t-\xi)) \frac{\partial G(\xi)}{\partial \xi} d\xi \quad (3)$$

式中,  $u(t) = w(t)/h$  为形变相对于组织初始厚度  $h$  的比例;  $P^{(e)}(u)$  为组织的印压形变为  $u$  时的瞬时作用力;  $G(t)$  为一个随时间单调下降的弹性松弛函数。 $P$  函数的形式通常可以取一个  $u$  多项式, 如<sup>[2]</sup>:

$$P^{(e)}(u) = C_1 u + C_2 u^2 + C_3 u^3 \quad (4)$$

或者写成常用印压公式<sup>[17,74,75]</sup>的形式:

$$P^{(e)}(u) = \frac{2ah\kappa(\nu, a, h, u)}{1-\nu^2} E^{(e)}(u) \quad (5)$$

其中, 弹性模量可取非线性形式。如:

$$E^{(e)}(u) = E_0 + E_1 u \quad (6)$$

式中,  $E_0$  称为原始模量,  $E_1$  为一个随形变增加而增加的非线性因子。相应松弛函数可以假设为:

$$G(t) = 1 - \alpha + \alpha e^{-t/\tau} \quad (7)$$

式中,  $\alpha$  为粘弹性常数;  $\tau$  为特征时间常量。根据测得形变历史  $u(t)$  和组织的厚度, 如果给出一系列模型参数值 ( $E_0, E_1, \alpha, \tau$ ), 那么就可以拟合出印压的反应力  $P_s(t)$ , 然后可以和实验测得的印压力  $P_e(t)$  进行比较, 算出一个误差系数:

$$S_{err} = \sqrt{\frac{\int_0^t (P_s(t) - P_e(t))^2 dt}{\int_0^t P_e^2(t) dt}} \quad (8)$$

可以利用最小化误差系数的方法来求出最佳的组织材料参数<sup>[17]</sup>。Ling 等<sup>[77]</sup>利用遗传算法也可以最优化地求出组织的弹性参数(包括泊松比  $\nu$ )。如果使用的是圆形印压头, 组织厚度远大于印压头半径, 在小形变单相组织模型假设下杨氏模量可以通过以下公式求得<sup>[73]</sup>:

$$E = \frac{3(1-\nu^2)}{4\sqrt{R}} \cdot \frac{P}{w^{3/2}} \quad (9)$$

其中,  $P$  为印压力;  $R$  为印压头半径;  $w$  为印压深度。如果印压头尺寸相对组织厚度不可忽略, 那么可以利用有限元方法进行优化求解<sup>[78]</sup>。

如果印压头接触面的形状是长方形的, 如大部分的线性阵列超声探头。假设其短边长为  $s$ , 长边长为  $l$ , 在单相均匀各向同性组织特性和小形变情况下, 组织的杨氏模量由以下公式求得<sup>[71]</sup>:

$$E = 2(1-\nu^2)\kappa(\nu, s/h) \frac{P}{wl} \quad (10)$$

式中,  $\kappa$  为一个比例因子, 与组织泊松比  $\nu$  和探头宽度/组织厚度比 ( $s/h$ ) 有关, 可以通过近似公式或者有限元方法获得。

据本文作者了解, 对于水冲和气冲印压测试, 到现在为止, 没有理论分析结果可以直接用来求得组织的本征杨氏模量。一个简单的方法就是使用传统压缩或者印压测试的理论公式算出一个硬度因子用于结果的分析, 如根据压缩公式里的应力/应变比算出一个弹性因子  $k$ <sup>[7,28]</sup>:

$$k = \frac{P/(\pi a^2)}{w/h} \quad (11)$$

式中, 假设接触面跟流体(水柱或气柱)尺寸一致, 为半径为  $a$  的圆;  $w$  为形变;  $h$  为组织的初始厚度;  $P$  为印压力。这方面, 将来的工作是通过理论分析或者有限元方法得出利用印压力/形变得到计算组织本征弹性参数, 如杨氏模量的方法。

### 2.3 测量可靠性及准确性分析

在实际应用前, 必须考虑这些新型印压测量的可靠性和准确性。对于超声印压, 需要考虑的是探头跟测量组织表面之间的垂直性。Zheng 等<sup>[18,79]</sup>通过离体组织样本实验, 研究超声印压角度对测量结果的影响结果发现, 这个影响随着组织厚度的增加而减小。如果增加一个适当的预应力, 如 0.5N, 也会减小其影响。所以建议测量的时候增加适量的预应力以提高测量结果的可靠性。除了杨氏模量, 计算厚度用的超声信号也受探头跟组织表面角度的影响。当探头与表面垂直的时候, 从底面骨层反射的超声信号最大, 测得的组织厚度最接近真实厚度。所以, 可以利用超声信号的幅度来判

读探头跟组织之间垂直的程度,以减小探头角度对组织厚度和弹性参数测量的影响。另外一个影响测量可靠性的因素是由组织粘弹性引起的印压速度。Zheng 等<sup>[18]</sup>在印压速度为 0.75~7.5mm/s 测量弹性系数发现,下肢软组织平均杨氏模量对这个范围内的印压速度不是很敏感,测量结果方差都在均值的 10% 以内。另外,超声测量组织厚度和形变的原理是基于一个在组织里面恒定声速的假设。因此,声速的准确性也会影响超声印压测量的准确性。对于二维超声测量,测量结果还受目标表面探测算法的影响。Kawchuk 和 Elliott<sup>[68]</sup>对比了二维超声测量位移和标准测量位移的误差。实验中,使用 5M 超声探头,校准声速后发现,误差与目标表面位移的探测算法有关,平均误差为 14%~22%。需要注意的是,超声的测量准确性受超声探头本身特性,如频率、聚焦点位置和信号模式(原始 RF 信号/解调后幅度信号/图象信号)的影响很大。因此,针对一个特定的系统很难借鉴其他系统的结论,其测量的准确性和可靠性必须进行单独测定。

## 2.4 相关多参数测量

在超声印压的同时,还可以进行与超声有关的参数测量和组织形态参数测量,以进行多参数特征化组织评估。可用于对组织进行特征化的超声参数有:超声声速、表面声反射系数及组织内部的声衰减和声散射系数。以软骨为例,Suh 等<sup>[59]</sup>提出了利用超声印压测量软骨的声速。实验发现,软骨的蛋白多糖被消化以后,其声速度(1598±28)m/s 明显小于正常软骨的声速(1735±35)m/s。但是在受骨关节炎影响退化后的软骨上测量的结果发现,其声速只是略小于正常软骨声速<sup>[80-81]</sup>。研究表明,软骨当中的声速还受压缩应变大小和压缩速度的影响<sup>[82-84]</sup>。因此,声速能否作为一个客观化软骨退化的参数并且怎样在活体上准确测量软骨的声速都需要更加深入的研究<sup>[85]</sup>。另一个通常用来研究软骨退化的超声参数是软骨表面反射系数,其可以通过时域或频域对软骨表面反射的超声信号进行定义,计算需要利用放置在相同深度的全反射板的超声反射信号进行校正,最后可以得到理论上与超声系统无关的反射系数<sup>[65]</sup>。通过蛋白酶分解软骨退化模型研究表明,如果软骨的蛋白多糖被分解,那么软骨表面的反射系数就不会有明显的变化。但是如果软骨的胶原蛋白网络受到破坏,软骨表面反射系数会有非常显著的减小<sup>[29,65,86-87]</sup>。在动物和人体自然退化的软骨上面测量结果显示,超声反射随退化程度的增大而减小<sup>[88-89]</sup>。因此,软骨表面超声反射系数具有很大的潜力作为诊断软骨退化的特征参数。也有部分学者尝试使用超声衰减或者散射来研究软骨的退化。此方面的研究比较少,有兴趣的作者可以参考最近的综述<sup>[85]</sup>。

使用超声还可以对组织的形态进行特征化,如在软骨里面,可以使用超声来研究其表面的粗糙程度。Sarakkala 等<sup>[90]</sup>提出一个超声粗糙指数(ultrasound roughness index)来研究软骨表面的退化。一般退化后的软骨因为表面的纤维化,所以具有

较大的粗糙系数。具有二维成像功能的内窥超声探头在评估关节内软骨形态变化方面具有很大的潜力,如使用血管内超声(intravascular ultrasound, IVUS)探头,可以进行辅助评估软骨的退化<sup>[91-94]</sup>。本文作者所在的研究小组正在进行相关的工作,目标是将小型超声探头成像技术应用在关节镜式超声印压系统里,就可以利用二维超声印压对软骨进行形态、超声和弹性等的多参数测量。相对应地,如果在印压测试里面使用的是光学信号,那么也可以使用相关的光学参数,如折射率、光反射和光散射及相关的形态学参数<sup>[95-97]</sup>对组织进行特征化研究用来辅助力学性能测量对组织的生理病理情况进行相关的诊断分析。

## 2.5 应用

因为其便携性,超声印压系统可以应用在各种不同组织的测量上。Zheng 等<sup>[20]</sup>研究利用 TUPS 测量颈部软组织杨氏模量,研究使用硬度评估放疗后正常组织纤维化严重程度的可行性。通过 8 例正常人和 4 例放疗后患者的初步研究显示,正常颈部软组织硬度为 12.8kPa。但是放疗后纤维化组织硬度(46.4~108.3)kPa,远远大于正常软组织硬度,随后进行的大规模临床测试<sup>[21]</sup>发现,放疗后患者颈部软组织的硬度与临床手触诊分数及颈部最大无痛活动角度都有明显相关性,证明了 TUPS 测量颈部软组织硬度可以作为一个量化的参数较客观地评估纤维化程度。便携式 TUPS 系统还可以用来评测足底软组织的硬度。通过其测量糖尿病患者足底组织硬度发现,老年糖尿病患者足底的软组织相对正常年轻人的足底软组织硬度明显增大<sup>[91]</sup>。部分原因可能是因为年龄的差异引起的。因为老年化过程能明显增加足底软组织的硬度<sup>[98]</sup>。因此,超声印压系统有潜力作为一个筛选的工具以评估糖尿病对患者的影响程度。然后选择适合的治疗方案,让患者得到及时治疗,可避免糖尿病患者足底病变恶化而导致更加严重的后果,如截肢。因此,有必要进行后续的研究。TUPS 在其他方面,如肌肉训练<sup>[26]</sup>、腕管综合症<sup>[99]</sup>、疤痕评估<sup>[23]</sup>和神经损伤对软组织的影响方面<sup>[25]</sup>都有不同的应用,其潜力还有待进一步挖掘。关节镜式的超声印压系统能对软骨进行离体和活体测量,特别是结合超声参数、形态参数和弹性参数的多参数测量。对于研究动物或者人体骨关节炎对软骨的质量退化影响方面是一个很重要的工具<sup>[65,89,100]</sup>。气囊式超声印压系统可以研究心脏不同部位的硬度。邓辉胜等<sup>[61]</sup>研究活体犬心脏的硬度发现,游离壁和心尖部的心肌硬度具有明显的差异。对于二维的超声印压系统,Li 等<sup>[101-102]</sup>研究月经周期当中不同时段荷尔蒙等因素对乳房不同区域硬度的影响发现,乳房不同区域硬度有很大的差异。在一个月经周期当中,硬度也有周期性的变化。这一研究对活体乳腺组织硬度的标准测量具有一定的指导意义。Kawchuk 等<sup>[70]</sup>利用超声印压观察椎间盘在印压测试下的形变,然后以此判断椎间盘是否有退化情况。利用动物模型发现,该无损检测方法检测性能相当或优于传统方法。Hsu 等<sup>[22,66,103-106]</sup>利用二维超声印压测量脚底软组织的弹性特征,研究对比年老和年轻受试者之间、正常人和糖尿病患者

组之间足底软组织的厚度、可压性、弹性系数、加载和卸载力/形变曲线非线性程度及能量损失百分比等之间的差异。利用超声印压测试还发现足跟微腔室 (microchamber) 和巨腔室 (macrochamber) 组织除了厚度差异外, 还具有不同的力学特性<sup>[67]</sup>, 在糖尿病患者里, 这两个部分与正常人相比也发生了改变。糖尿病患者足跟微腔室硬度相对正常人变软; 而巨腔室组织硬度相对正常人变硬<sup>[67]</sup>。因此, 这些不均匀的变化有可能导致患者足底的软组织缓冲作用减弱, 容易带来严重的足部问题。

非直接接触式的水冲印压或气冲印压也获得了一些应用。如水冲印压系统可以使用高频超声, 对软骨退化进行测量<sup>[29]</sup>; 对骨-筋腱结合处组织恢复情况进行评估<sup>[30]</sup>。使用光学系统的水冲印压也可以测量软骨的弹性模量<sup>[6]</sup>。Lee 等<sup>[78]</sup>利用 OCT 的光学印压测试老鼠脑组织硬度结果证明, 不同部位脑组织, 如大脑皮层和海马体具有不同的弹性模量。非接触式的基于 OCT 的印压系统在某些应用方面具有一些独特的优势, 其能避免接触印压可能产生的一些问题, 如感染, 其特别适合于某些特定场合下, 如伤口及伤口周围软组织的检测<sup>[108]</sup>。

### 3 纳米印压

在小体积材料上进行的形变在纳米量级、印压力在纳牛量级的印压通常称为纳米印压。纳米印压已经成为一个测量材料力学特征的重要方法<sup>[109-110]</sup>。为何要在生物组织弹性测量方面引入纳米印压技术? 主要的原因在于, 生物组织组成成分的多样性导致其力学特性的非均匀性。因此, 有需要研究组织不同部位的力学特性分布, 同时有些组织, 如小动物的软骨, 厚度非常小, 只有使用纳米印压技术才能进行准确的弹性测量。当把为传统工程材料测试量身定制的纳米印压技术应用在生物组织上的时候, 因为组织和工程材料不同的材料特性, 所以会产生一些新的问题。引起这些问题的主要原因有: 生物组织相对于工程材料, 如金属的硬度小很多、非线性应力/应变特性、粘弹性和生物组织材料的各向异性。相对于工程材料的测试, 生物软组织的纳米印压测试困难主要来自其较小的弹性系数和与时间有关的粘弹性 (相对于工程材料的弹塑性), 下面作简单讨论。

相对于工程材料 GPa 量级的高弹性系数, 生物软组织的有效弹性系数大概在 kPa~MPa 量级。因此, 在使用相同印压头产生相同的印压形变下, 在软组织上产生的印压力要小很多, 印压系统很可能达不到这样的探测精度。因为在相同的印压深度下, 印压力与接触面的面积成正比关系。因此, 解决印压力过小的一个方法就是, 使用较大一点接触面的印压探头, 如增大圆柱形/球形压头的半径或者金字塔形压头的坡口角度。需要注意的是, 增大压头大小的同时会损失纳米印压在空间的分辨率。但是因为组织印压不会产生永久性形变, 所以在使用小印压形变的情况下,

可以适当减小测量点的距离, 以提高弹性分布测量的空间分辨率。软组织弹性较小所引起的另一个问题就是接触点的检测问题。传统的硬材料纳米印压测试利用一个小印压力或印压力/形变斜率突变检测压头和材料的接触点<sup>[111]</sup>。但是在软组织上因为组织较小的弹性产生较小的印压力, 这些自动化印压检测算法都不太适合。因此, 一个比较好的解决方法是使用手动方法找到接触点, 然后让压头离开组织表面一点距离, 然后再正式进行印压测试<sup>[112-113]</sup>。

传统的纳米印压使用的经典的 Oliver-Pharr 方法分析数据<sup>[114-115]</sup>, 其利用初始卸载段的斜率计算被测材料的弹性模量:

$$E = \frac{(1 - \nu^2) \sqrt{\pi}}{2\sqrt{A}} \cdot \frac{dP}{dw} \quad (12)$$

其中, A 为压头与材料在最大印压力时的接触面积。该计算假设材料为纯弹性, 使用三角形印压力/时间曲线。当所测材料为生物组织时, 其粘弹性产生蠕变特性, 如果使用三角形印压力/时间曲线, 那么在印压/形变曲线顶点处很容易产生所谓的“鼻子”效应<sup>[55]</sup>。这个时候计算出来的印压力/形变斜率是负的, 计算完全错误。解决的方法是, 使用梯形的印压力/时间曲线, 在最高印压力点维持一段时间, 消除由粘弹性产生的蠕变效应的影响, 然后进行卸载测试<sup>[116]</sup>。当然, 因为生物组织粘弹性的特点, 可以完全舍弃 Oliver-Pharr 算法, 而在加载印压阶段利用蠕变测试测量组织的粘弹性参数<sup>[117]</sup>, 就像普通的宏观印压的分析一样。除了准静态的印压测试外, 还可以使用动态纳米印压测试测量组织弹性特征随频率变化的情况<sup>[55]</sup>。纳米印压在生物组织上面应用的另一个值得注意的问题就是压头与组织之间粘附力的影响。在宏观印压当中, 因为粘附力对接触面积的影响比较小, 所以可以不予考虑。但是在组织的纳米印压当中, 粘附力会增大接触面积, 导致计算出的弹性模量偏大, 在某些情况下必须予以补偿<sup>[118-120]</sup>。关于在组织中使用纳米印压技术相对于传统材料, 如金属和陶瓷的纳米印压新的技术特点、难点和分析方法, 读者可以参考相关的综述文章和参考书<sup>[55, 121-124]</sup>。下面举例来简要介绍纳米印压在软组织弹性测量当中的应用。

到目前为止, 纳米印压最常被用在研究软骨的弹性特征上。首先, 纳米印压可用来研究软骨硬度与自身形态结构或印压测试参数之间的关系。纳米印压测出来的主要是样本材料的表面特性。因此, 可通过纳米印压研究软骨表层的力学特性。Li 等<sup>[49]</sup>利用纳米印压研究兔前肢掌指关节软骨硬度和其表层 (superficial region) 厚度之间的关系。结果表明, 表层软骨表层硬度跟厚度有相关性, 表层软骨在应力负载上起到重要的作用。需要注意的是, 该研究样本数量较少, 结果是否能应用在大范围软骨样本上需要进一步研究。Franke 等<sup>[52]</sup>利用动态印压研究软骨硬度与测试频率间的关系。实验验证在纳米印压下, 与宏观印压测试一样, 软骨硬度随着测试频

率的增加而增加。但是与宏观测试结果不同的是,冷藏保存方法会明显降低软骨表面层的硬度。这是因为冷藏会破坏软骨的表面,这在宏观测试上很难分辨,但在微观上却可以被纳米印压检测到。其次,纳米印压可以用来评估软骨修复的质量。Ebenstein 等<sup>[47]</sup>使用纳米印压测量兔膝关节正常和修复后软骨的接触硬度发现,修复后的软骨即使外形具有与正常软骨相似的特性,如透明性,解剖分析也相差不大,但是其力学特性还没有恢复。所以评估软骨修复的效果除了进行解剖分析外,还有必要研究其功能性的弹性特征。Franke 等<sup>[50]</sup>也利用猪的膝关节软骨研究正常和修复后软骨质量区别,发现修复后软骨硬度明显小于正常软骨硬度,正常软骨硬度随印压深度增加而增加,但是在修复后软骨上面却没有观察到这个现象。这主要是由修复后软骨和正常软骨不同的结构引起的。实验还发现,使用多聚甲醛固定后的软骨硬度明显增加。因此,必须注意组织含水量(hydration)对组织硬度的影响。Gelse 等<sup>[125]</sup>利用纳米印压分析基于转基因细胞的软骨表面修复法效果,该研究同样发现在正常软骨上其硬度与印压力大小有关,其具有很强的非线性特性。基于转基因细胞的修复后软骨硬度跟印压力也有关,但是其随印压力增加而增加的幅度明显小于正常软骨。没有基于转基因细胞的修复软骨硬度不随印压力大小改变而改变。结果说明,基于转基因的细胞软骨修复法优于普通的无转基因细胞修复法。最后,纳米印压还可以用来分析软骨的撕裂强度。不同于一般的纳米印压用来测量组织的弹性模量,该方法测量的是软骨可承受负载强度特性<sup>[48]</sup>,是纳米印压在软组织上一个比较创新的应用。除软骨外,纳米印压还可以用于测试血管组织<sup>[54,126]</sup>及皮肤角质层<sup>[53]</sup>的硬度。在宏观测量方面,Srinivasan 等<sup>[127-128]</sup>通过纳米印压测量得到组织的弹性模量分布图,然后与弹性成像应变图(strain imaging)进行对比,证明两者之间具有很强的相关性。在更加微观方面,纳米印压可以用来测量单纤维和细胞的弹性特征,有兴趣的读者可以参考相关的文献<sup>[129-133]</sup>。

#### 4 新型印压技术的发展方向

本文介绍了几种新型的印压技术,包括超声印压、光学印压、结合超声和光学测量的流体印压及纳米印压,以及它们在生物软组织弹性测量当中的应用。这些印压技术的特点是印压系统具有便携性、印压测试的同时可以方便地进行多参数测量,如厚度、超声特性、光学特性等,或者可以测量小范围内组织的弹性特征(纳米印压)。新型印压技术虽然在基础研究上获得了一些应用,但是因为各种使用产生的问题,还远未成为临床使用的工具。本文作者认为,组织弹性测量在临床上是一个复杂的多学科交叉领域,需要科研工程开发人员和临床医护人员的广泛合作,才有可能将技术进行普及。因此,作者提出新型的印压技术在未来需要在以下方面进行

发展,才有可能成为临床普及广泛使用的工具:①开发适合特定组织部位测量的仪器。某些情况,如关节内镜操作,需要更进一步开发小型化的仪器;②提高测量的可靠性和准确性;③提高测量的可操作性,提供友好的用户界面;④找到适合印压分析的组织模型和测试模型,计算组织的本征参数;⑤提供简洁的组织准备、测试操作过程指引,方便临床工作者掌握和实践,然后可进行大规模临床测试。

志谢:感谢香港研究资助局(PolyU5354/08E)和香港理工大学(J-BB69)基金对本研究的资助。

#### [参考文献]

- [1] Mak AFT,Liu GHW, Lee SY. Biomechanical assessment of below-knee residual limb tissue [J]. *J Rehabil Res Dev*, 1994, 31(3):188-198.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Komi PV, Belli A, Huttunen V, et al. Optic fibre as a transducer of tendomuscular forces [J]. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1996, 72(3):278-280.
- [5] Gefen A, Megido-Ravid M, Azariah M, et al. Integration of plantar soft tissue stiffness measurements in routine MRI of the diabetic foot [J]. *Clin Biomech*, 2001, 16(10):921-925.
- [6] Duda GN, Kleemann RU, Bluecher U, et al. A new device to detect early cartilage degeneration [J]. *Am J Sports Med*, 2004, 32(3):693-698.
- [7] 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.
- [8] Vannah WM, Childress DS. Indentor tests and finite element modeling of bulk muscular tissue in vivo [J]. *J Rehabil Res Dev*, 1996, 33(3):239-252.
- [9] Rome K, Webb P. Development of a clinical instrument to measure heel pad indentation [J]. *Clin Biomech*, 2000, 15(4):298-300.
- [10] Xiong S, Goonetilleke RS, Witana CP, et al. An indentation apparatus for evaluating discomfort and pain thresholds in conjunction with mechanical properties of foot tissue in vivo [J]. *J Rehabil Res Dev*, 2010, 47(7):629-641.
- [11] Bader DL, Bowker P. Mechanical characteristics of skin and underlying tissues in vivo [J]. *Biomaterials*, 1983, 4(4):305-308.
- [12] Vannah WM, Drvaric DM, Hastings JA, et al. A method of residual limb stiffness distribution measurement [J]. *J Rehabil Res Dev*, 1999, 36(1):1-7.
- [13] Lu MH, Yu WN, Huang QH, et al. A hand-held indentation system for the assessment of mechanical properties of soft tissues

- in vivo [J]. *IEEE Trans Instrum Meas*,2009,58(9):3079–3085.
- [14] Klaesner JW,Commean PK,Hastings MK,et al.Accuracy and reliability testing of a portable soft tissue indenter[J].*IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*,2001,9(2):232–240.
- [15] Armstrong CG,Bahrani AS,Gardner DL.In vitro measurement of articular cartilage deformations in the intact human hip joint under load[J].*J Bone Joint Surg Am*,1979,61(5):744–755.
- [16] Gefen A,Megido–Ravid M,Itzchak Y.In vivo biomechanical behavior of the human heel pad during the stance phase of gait[J].*J Biomech*,2001,34(12):1661–1665.
- [17] Zheng YP,Mak AFT.Extraction of quasi–linear viscoelastic parameters for lower limb soft tissues from manual indentation experiment[J].*J Biomech Eng–Trans ASME*,1999,121(3):330–339.
- [18] Zheng YP,Mak AFT,Lue B.Objective assessment of limb tissue elasticity: development of a manual indentation procedure[J].*J Rehabil Res Dev*,1999,36(2):71–85.
- [19] Zheng YP,Choi YKC,Wong K,et al. Biomechanical assessment of plantar foot tissue in diabetic patients using an ultrasound indentation system[J].*Ultrasound Med Biol*,2000,26(3):451–456.
- [20] Zheng YP,Leung SF,Mak AFT.Assessment of neck tissue fibrosis using an ultrasound palpation system: a feasibility study[J].*Med Biol Eng Comput*,2000,38(5):497–502.
- [21] Leung SF,Zheng YP,Choi CYK,et al.Quantitative measurement of post–irradiation neck fibrosis based on the young modulus–description of a new method and clinical results[J].*Cancer*,2002,95(3):656–662.
- [22] Huang YP,Zheng YP,Leung SF.Quasi–linear viscoelastic properties of fibrotic neck tissues obtained from ultrasound indentation tests in vivo[J].*Clin Biomech*,2005,20(2):145–154.
- [23] Lau JCM,Li–Tsang CWP,Zheng YP.Application of tissue ultrasound palpation system (TUPS) in objective scar evaluation [J].*Burns*,2005,31(4):445–452.
- [24] Li–Tsang CWP,Lau JCM,Chan CCH.Prevalence of hypertrophic scar formation and its characteristics among the Chinese population[J].*Burns*,2005,31(5):610–616.
- [25] Makhosus M,Venkatasubramanian G,Chawla A,et al. Investigation of soft–tissue stiffness alteration in denervated human tissue using an ultrasound indentation system[J].*J Spinal Cord Med*, 2008,31(1):88–96.
- [26] Siu PM,Tam BT,Chow DH,et al.Immediate effects of 2 different whole–body vibration frequencies on muscle peak torque and stiffness[J].*Arch Phys Med Rehabil*,2010,91(10):1608–1615.
- [27] Chao CYL,Zheng YP,Cheing GLY.Epidermal thickness and biomechanical properties of plantar tissues in diabetic foot[J]. *Ultrasound Med Biol*,2011,37(7):1029–1038.
- [28] Lu MH,Zheng YP,Huang QH.A novel method to obtain modulus image of soft tissues using ultrasound water jet indentation: a phantom study[J].*IEEE Trans Biomed Eng*,2007,54(1):114–121.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Huang YP,Zheng YP,Wang SZ,et al.An optical coherence tomography (OCT)–based air jet indentation system for measuring the mechanical properties of soft tissues [J].*Meas Sci Technol*,2009,20(1):015805.
- [32] Chao CYL,Zheng YP,Huang YP,et al.Biomechanical properties of the forefoot plantar soft tissue as measured by an optical coherence tomography–based air–jet indentation system and tissue ultrasound palpation system[J].*Clin Biomech*,2010,25(6): 594–600.
- [33] 王立科,郑永平,黄燕平等.应用于组织力学性能分析的光学 印压系统研究 [J].*中国医疗设备*,2011,26(1):22–24,33.
- [34] Pan YT,Li ZG,Xie TQ,et al. Hand–held arthroscopic optical coherence tomography for in vivo high–resolution imaging of articular cartilage[J].*J Biomed Opt*,2003,8(4):648–654.
- [35] Izatt JA,Kulkarni MD,Wang HW,et al.Optical coherence tomography and microscopy in gastrointestinal tissues[J].*IEEE J Sel Top Quant Electron*,1996,2(4):1017–1028.
- [36] Van Vliet KJ.Instrument and experiment. In: Oyen ML, editor. *Handbook of Nanoindentation with Biological Applications*[M]. Chapter 3.Singapore:Pan Stanford,2011:39–75.
- [37] Ferguson VL,Bushby AJ,Boyde A.Nanomechanical properties and mineral concentration in articular calcified cartilage and subchondral bone[J].*J Anat*,2003,203(2):191–202.
- [38] Haque F.Application of nanoindentation to development of biomedical materials[J]. *Surf Eng*,2003,19(4):255–268.
- [39] Rho JY,Tsui TY,Pharr GM.Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation[J]. *Biomaterials*,1997,18(20):1325–1330.
- [40] Turner CH,Rho J,Takano Y,et al.The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques[J].*J Biomech*,1999,32(4):437–441.
- [41] Angker L,Swain MV.Nanoindentation:application to dental hard tissue investigations [J].*J Mater Res*,2006,21(8):1893–1905.
- [42] Cuy JL,Mann AB,Livi KJ,et al.Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel[J].*Arch Oral Biol*,2002,47(4):281–291.



- [43] Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW, et al. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale[J]. *Arch Oral Biol*, 2001, 46(2):173–183.
- [44] Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2003, 14(1):13–29.
- [45] Lewis G, Nyman JS. The use of nanoindentation for characterizing the properties of mineralized hard tissues: state-of-the art review[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008, 87B(1):286–301.
- [46] Gupta HS, Schratte S, Tesch W, et al. Two different correlations between nanoindentation modulus and mineral content in the bone-cartilage interface[J]. *J Struct Biol*, 2005, 149(2):138–148.
- [47] Ebenstein DM, Kuo A, Rodrigo JJ, et al. A nanoindentation technique for functional evaluation of cartilage repair tissue[J]. *J Mater Res*, 2004, 19(1):273–281.
- [48] Simha NK, Carlson CS, Lewis JL. Evaluation of fracture toughness of cartilage by micropenetration[J]. *J Mater Sci-Mater Med*, 2004, 15(5):631–639.
- [49] Li C, Pruitt LA, King KB. Nanoindentation differentiates tissue-scale functional properties of native articular cartilage[J]. *J Biomed Mater Res Part A*, 2006, 78A(4):729–738.
- [50] Franke O, Durst K, Maier V, et al. Mechanical properties of hyaline and repair cartilage studied by nanoindentation[J]. *Acta Biomater*, 2007, 3(6):873–881.
- [51] Simha NK, Jin H, Hall ML, et al. Effect of indenter size on elastic modulus of cartilage measured by indentation[J]. *J Biomech Eng-Trans ASME*, 2007, 129(5):767–775.
- [52] Franke O, Goken M, Meyers MA, et al. Dynamic nanoindentation of articular porcine cartilage[J]. *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl*, 2011, 31(4):789–795.
- [53] Yuan YH, Verma R. Measuring microelastic properties of stratum corneum[J]. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 2006, 48(1):6–12.
- [54] Ebenstein DM, Coughlin D, Chapman J, et al. Nanomechanical properties of calcification, fibrous tissue, and hematoma from atherosclerotic plaques[J]. *J Biomed Mater Res Part A*, 2009, 91A(4):1028–1037.
- [55] Ebenstein DM, Pruitt LA. Nanoindentation of biological materials[J]. *Nano Today*, 2006, 1(3):26–33.
- [56] Li XF, Ying S, Freiheit T. A portable measurement instrument for soft tissue mechanical properties[J]. *Instrum Sci Technol*, 2004, 32(6):611–626.
- [57] Li XF, Huang LH, Zhang GX, et al. Performance comparison of algorithms for estimating the strain of soft tissue from ultrasound[J]. *Instrum Sci Technol*, 2005, 33(6):673–689.
- [58] Li XF, Wang GL, Huang LH, et al. Young's Modulus extraction methods for soft tissue from ultrasound measurement system[J]. *Instrum Sci Technol*, 2006, 34(4):393–404.
- [59] Suh JKF, Youn I, Fu FH. An in situ calibration of an ultrasound transducer: a potential application for an ultrasonic indentation test of articular cartilage[J]. *J Biomech*, 2001, 34(10):1347–1353.
- [60] 邓辉胜, 黄晶, 李进嵩, 等. 介入超声印压系统的压力和超声校验研究[J]. *医疗设备信息*, 2007, 22(7):2–4.
- [61] 邓辉胜, 黄晶, 郑永平, 等. 介入超声印压检测活体心肌硬度的实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2007, 23(3):164–166.
- [62] 李进嵩, 黄晶, 江永红, 等. 离体心肌被动力学属性超声印压检测[J]. *重庆大学学报(自然科学版)*, 2007, (4):121.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] Hsu TC, Wang CL, Tsai WC, et al. Comparison of the mechanical properties of the heel pad between young and elderly adults[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 1998, 79(9):1101–1104.
- [67] Hsu CC, Tsai WC, Hsiao TY, et al. Diabetic effects on microchambers and macrochambers tissue properties in human heel pads[J]. *Clin Biomech*, 2009, 24(8):682–686.
- [68] Kawchuk GN, Elliott PD. Validation of displacement measurements obtained from ultrasonic images during indentation testing[J]. *Ultrasound Med Biol*, 1998, 24(1): 105–111.
- [69] Kawchuk GN, Fauvel OR, Dmowski J. Ultrasonic quantification of osseous displacements resulting from skin surface indentation loading of bovine para-spinal tissue[J]. *Clin Biomech*, 2000, 15(4):228–233.
- [70] Kawchuk GN, Kaigle AM, Holm SH, et al. The diagnostic performance of vertebral displacement measurements derived from ultrasonic indentation in an in vivo model of degenerative disc disease[J]. *Spine*, 2001, 26(12):1348–1355.
- [71] Han LH, Noble JA, Burcher M. A novel ultrasound indentation system for measuring biomechanical properties of in vivo soft tissue[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(6):813–823.
- [72] Liu HB, Li JC, Song XJ, et al. Rolling indentation probe for tissue abnormality identification during minimally invasive surgery[J]. *IEEE Trans Robot*, 2011, 27(3):450–460.
- [73] Yang Y, Bagnaninchi PO, Ahearne M, et al. A novel optical coherence tomography-based micro-indentation technique for mechanical characterization of hydrogels [J]. *J R Soc Interface*, 2007, 4(17):1169–1173.
- [74] 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.
- [75] Zhang M,Zheng YP,Mak AFT.Estimating the effective Young's modulus of soft tissues from indentation tests—nonlinear finite element analysis of effects of friction and large deformation[J]. Med Eng Phys,1997,19(6):512-517.
- [76] Fung YC.Bioviscoelastic solids.Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues[M].Chapter 7.New York:Springer-Verlag,1993:23-65.
- [77] Ling HY,Choi PC,Zheng YP,et al.Extraction of mechanical properties of foot plantar tissues using ultrasound indentation associated with genetic algorithm[J].J Mater Sci-Mater Med,2007,18(8):1579-1586.
- [78] Lee SJ,Sun J,Flint JJ,et al.Optically based-indentation technique for acute rat brain tissue slices and thin biomaterials[J].J Biomed Mater Res B Appl Biomater,2011,97B(1):84-95.
- [79] Zheng YP.Development of an ultrasound indentation system for biomechanical properties assessment of limb tissues in vivo[D].Hong Kong:Hong Kong Polytechnic University,1997.
- [80] Myers SL,Dines K,Brandt DA,et al.Experimental assessment by high-frequency ultrasound of articular cartilage thickness and osteoarthritic changes[J].J Rheumatol,1995,22(1):109-116.
- [81] Toyras J,Laasanen MS,Saarakkala S,et al.Speed of sound in normal and degenerated bovine articular cartilage[J].Ultrasound Med Biol,2003,29(3):447-454.
- [82] Ling HY,Zheng YP,Patil SG.Strain dependence of ultrasound speed in bovine articular cartilage under compression in vitro[J]. Ultrasound Med Biol,2007,33(10):1599-1608.
- [83] Nieminen HJ,Julkunen P,Toyra J,et al.Ultrasound speed in articular cartilage under mechanical compression[J].Ultrasound Med Biol,2007,33(11):1755-1766.
- [84] Kiviranta P,Lammentausta E,Toyra J,et al.Differences in acoustic properties of intact and degenerated human patellar cartilage during compression[J].Ultrasound Med Biol,2009,35(8):1367-1375.
- [85] 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.
- [86] Wang SZ,Huang YP,Saarakkala S,et al.Quantitative assessment of articular cartilage with morphologic,acoustic and mechanical properties obtained using high frequency ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol,2010,36(3):512-527.
- [87] Toyra J,Rieppo J,Nieminen MT,et al.Characterization of enzymatically induced degradation of articular cartilage using high frequency ultrasound[J].Phys Med Biol,1999,44(11):2723-2733.
- [88] Saarakkala S,Laasanen MS,Jurvelin JS,et al.Ultrasound indentation of normal and spontaneously degenerated bovine articular cartilage[J].Osteoarthritis Cartilage,2003,11(9):697-705.
- [89] Kiviranta P,Lammentausta E,Toyra J,et al.Indentation diagnostics of cartilage degeneration[J].Osteoarthritis Cartilage,2008,16(7):796-804.
- [90] Saarakkala S, Toyra J, Hirvonen J, et al. Ultrasonic quantitation of superficial degradation of articular cartilage[J].Ultrasound Med Biol,2004,30(6):783-792.
- [91] 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.
- [92] Viren T,Saarakkala S,Kaleva E,et al.Minimally invasive ultrasound method for intra-articular diagnostics of cartilage degeneration[J].Ultrasound Med Biol,2009,35(9):1546-1554.
- [93] Viren T,Saarakkala S,Jurvelin JS,et al.Quantitative evaluation of spontaneously and surgically repaired rabbit articular cartilage using intra-articular ultrasound method in situ[J].Ultrasound Med Biol,2010,36(5):833-839.
- [94] Viren T,Saarakkala S,Tiitu V,et al.Ultrasound evaluation of mechanical injury of bovine knee articular cartilage under arthroscopic control[J].IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control,2011,58(1):148-155.
- [95] Wang SZ,Huang YP,Wang Q,et al.Assessment of depth and degeneration dependences of articular cartilage refractive index using optical coherence tomography in vitro[J].Connect Tissue Res,2010,51(1):36-47.
- [96] Saarakkala S,Wang SZ,Huang YP,et al.Quantification of optical surface reflection and surface roughness of articular cartilage using optical coherence tomography [J].Phys Med Biol,2009,54(22):6837-6852.
- [97] Huang YP,Saarakkala S,Toyra J,et al.Effects of optical beam angle on quantitative optical coherence tomography (OCT) in normal and surface degenerated bovine articular cartilage[J].Phys Med Biol,2011,56(2):491-509.
- [98] Kwan RLC,Zheng YP,Cheing GLY.The effect of aging on the biomechanical properties of plantar soft tissues[J].Clin Biomech, 2010,25(6):601-605.
- [99] Zheng YP,Li ZM,Choi APC,et al.Ultrasound palpation sensor for tissue thickness and elasticity measurement - assessment of transverse carpal ligament [J].Ultrasonics,2006,44:E313-E317.
- [100] Kiviranta P,Toyra J,Nieminen MT,et al.Comparison of novel clinically applicable methodology for sensitive diagnostics of cartilage degeneration[J].Eur Cell Mater,2007,13:46-55.
- [101] Li JW,Chan ST,Huang YP,et al.Menstrual cycle dependences of in vivo breast elasticity measured using ultrasound indentation,October 27-30[C].USA:The 7th International Conference on the Ultrasonic Measurement and Imaging of Tissue Elasticity,2008.
- [102] Li JW,Chan ST,Huang YP,et al.Menstrual cycle,site and

- individual dependences of breast elasticity measured in vivo using ultrasound indentation, September 14–17 [C]. Netherlands: The 8th International Conference on the Ultrasonic Measurement and Imaging of Tissue Elasticity, 2009.
- [103] Hsu TC, Lee YS, Shau YW. Biomechanics of the heel pad for type 2 diabetic patients [J]. *Clin Biomech*, 2002, 17(4): 291–296.
- [104] Hsu TC, Wang CL, Shau YW, et al. Altered heel–pad mechanical properties in patients with Type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetic Med*, 2000, 17(12): 854–859.
- [105] Hsu CC, Tsai WC, Chen CPC, et al. Effects of aging on the plantar soft tissue properties under the metatarsal heads at different impact velocities [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31(10): 1423–1429.
- [106] Hsu CC, Tsai WC, Shau YW, et al. Altered energy dissipation ratio of the plantar soft tissues under the metatarsal heads in patients with type 2 diabetes mellitus: a pilot study [J]. *Clin Biomech*, 2007, 22(1): 67–73.
- [107] Hsu CC, Tsai WC, Wang CL, et al. Microchambers and macrochambers in heel pads: are they functionally different? [J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102(6): 2227–2231.
- [108] Chao CYL, Zheng YP, Cheing GLY. A novel noncontact method to assess the biomechanical properties of wound tissue [J]. *Wound Repair Regen*, 2011, 19(3): 324–329.
- [109] Cook RF. Probing the nanoscale [J]. *Science*, 2010, 328(5975): 183–184.
- [110] 黎明, 温诗铸. 纳米压痕技术及其应用 [J]. *中国机械工程*, 2002, 13(16): 1437–1439.
- [111] Fischer–Cripps AC. Review of analysis and interpretation of nanoindentation test data [J]. *Surf Coat Technol*, 2006, 200(14–15): 4153–4165.
- [112] Kaufman JD, Klapperich CM. Surface detection errors cause overestimation of the modulus in nanoindentation on soft materials [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2009, 2(4): 312–317.
- [113] Kaufman JD, Miller GJ, Morgan EF, et al. Time–dependent mechanical characterization of poly(2–hydroxyethyl methacrylate) hydrogels using nanoindentation and unconfined compression [J]. *J Mater Res*, 2008, 23(5): 1472–1481.
- [114] Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments [J]. *J Mater Res*, 1992, 7(6): 1564–1583.
- [115] Oliver WC, Pharr GM. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: advances in understanding and refinements to methodology [J]. *J Mater Res*, 2004, 19(1): 3–20.
- [116] Briscoe BJ, Fiori L, Pelillo E. Nano–indentation of polymeric surfaces [J]. *J Phys D–Appl Phys*, 1998, 31(19): 2395–2405.
- [117] Oyen ML. Spherical indentation creep following ramp loading [J]. *J Mater Res*, 2005, 20(8): 2094–2100.
- [118] Carrillo F, Gupta S, Balooch M, et al. Nanoindentation of polydimethylsiloxane elastomers: Effect of crosslinking, work of adhesion, and fluid environment on elastic modulus [J]. *J Mater Res*, 2005, 20(10): 2820–2830.
- [119] Ebenstein DM, Wahl KJ. A comparison of JKR–based methods to analyze quasi–static and dynamic indentation force curves [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2006, 298(2): 652–662.
- [120] Grunlan JC, Xia XY, Rowenhorst D, et al. Preparation and evaluation of tungsten tips relative to diamond for nanoindentation of soft materials [J]. *Rev Sci Instrum*, 2001, 72(6): 2804–2810.
- [121] Franke O, Goken M, Hodge AM. The nanoindentation of soft tissue: current and developing approaches [J]. *Jom*, 2008, 60(6): 49–53.
- [122] Oyen ML. Nanoindentation of biological and biomimetic materials [J]. *Exp Tech*, 2011, (1): 1–15.
- [123] Lin DC, Horkay F. Nanomechanics of polymer gels and biological tissues: A critical review of analytical approaches in the Hertzian regime and beyond [J]. *Soft Matter*, 2008, 4(4): 669–682.
- [124] Oyen ML. Handbook of nanoindentation with biological applications [M]. Singapore: Pan Stanford, 2011.
- [125] Gelse K, Muhle C, Franke O, et al. Cell–based resurfacing of large cartilage defects [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(2): 475–488.
- [126] Ebenstein DM, Pruitt LA. Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues [J]. *J Biomed Mater Res Part A*, 2004, 69A(2): 222–232.
- [127] Srinivasan S, Krouskop T, Ophir J. Comparing elastographic strain images with modulus images obtained using nanoindentation: preliminary results using phantoms and tissue samples [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2004, 30(3): 329–343.
- [128] Srinivasan S, Krouskop T, Ophir J. A quantitative comparison of modulus images obtained using nanoindentation with strain elastograms [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2004, 30(7): 899–918.
- [129] Koay EJ, Shieh AC, Athanasiou KA. Creep indentation of single cells [J]. *J Biomech Eng–Trans ASME*, 2003, 125(3): 334–341.
- [130] Shin D, Athanasiou K. Cytoindentation for obtaining cell biomechanical properties [J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(6): 880–890.
- [131] Costa KD. Single–cell elastography: Probing for disease with the atomic force microscope [J]. *Dis Markers*, 2003, 19(2–3): 139–154.
- [132] Radmacher M. Studying the mechanics of cellular processes by atomic force microscopy [J]. *Method Cell Biol*, 2007, 83: 347–372.
- [133] Wenger MPE, Bozec L, Horton MA, et al. Mechanical properties of collagen fibrils [J]. *Biophys J*, 2007, 93(4): 1255–1263. 