

# 利用參考點壓痕量測技術檢測活體內骨骼組織之機械性質

## Probing *in vivo* Mechanical Properties of Bone Tissues by Reference Point Indentation Technique

陳柏宇

Po-Yu Chen

本文介紹一種新式的壓痕量測技術，可檢測活體內骨骼組織之機械性質。參考點壓痕量測裝置由參考探針與測試探針組成，從受測者小腿骨表面穿過皮下插入，可在非破壞情況下量測許多機械性質，如硬度、彈性係數、最大壓痕距離與壓痕距離增加值等。其中壓痕距離增加值，顯示骨折患者與正常受測者有顯著差異性，可做為評估骨骼斷裂風險之指標。此方法在醫學應用上極具潛力，可更進一步瞭解骨組織在活體中之機械性質。

A novel indentation technique which can probe the mechanical properties of bone tissues *in vivo* is introduced in this paper. The reference point indentation (RPI) instrument consists of a reference probe and a testing probe. By inserting the probes through the skin onto tibia bone, various mechanical properties such as hardness, elastic modulus, maximum indentation distance, indentation distance increase (IDI) can be measured non-invasively. The results showed that IDI were significantly higher in patients who suffered from bone fracture than in controls and can be used to evaluate fracture risk. The technique has a great potential in the medical field and can provide better understanding of the *in vivo* mechanical properties of bone tissues.

### 一、前言

骨骼是人體內重要的硬組織，具有支持身體、運動、保護器官、造血與儲存礦物質等功能<sup>(1)</sup>。正常的骨骼能不斷地再塑 (remodeling) 及自我修復，以適應外界的應力。隨著醫療科技的日新月異，人類的平均壽命逐年提高，骨骼及硬組織相關之疾病，如骨質疏鬆症、關節炎等，逐漸受到重視。此類疾病雖然不如心血管疾病致命，卻會嚴重

影響生活品質，造成諸多不便及痛苦。目前在醫療上對於骨骼健康狀況及骨折風險評估，以骨密度 (bone mass density)<sup>(2)</sup> 檢查為主，電腦斷層掃描 (computerized tomography)<sup>(3)</sup> 為輔，量測骨內之礦物質含量及觀察骨骼之微結構。這些方法並非實際測量骨骼之機械性質，而是建構於許多假設及間接的推估上。目前直接量測骨骼機械性質的方法有拉伸、壓縮、彎曲、扭轉、斷裂韌度測試及奈、微米壓痕量測等。然而這些方法皆為破壞性的量測，需

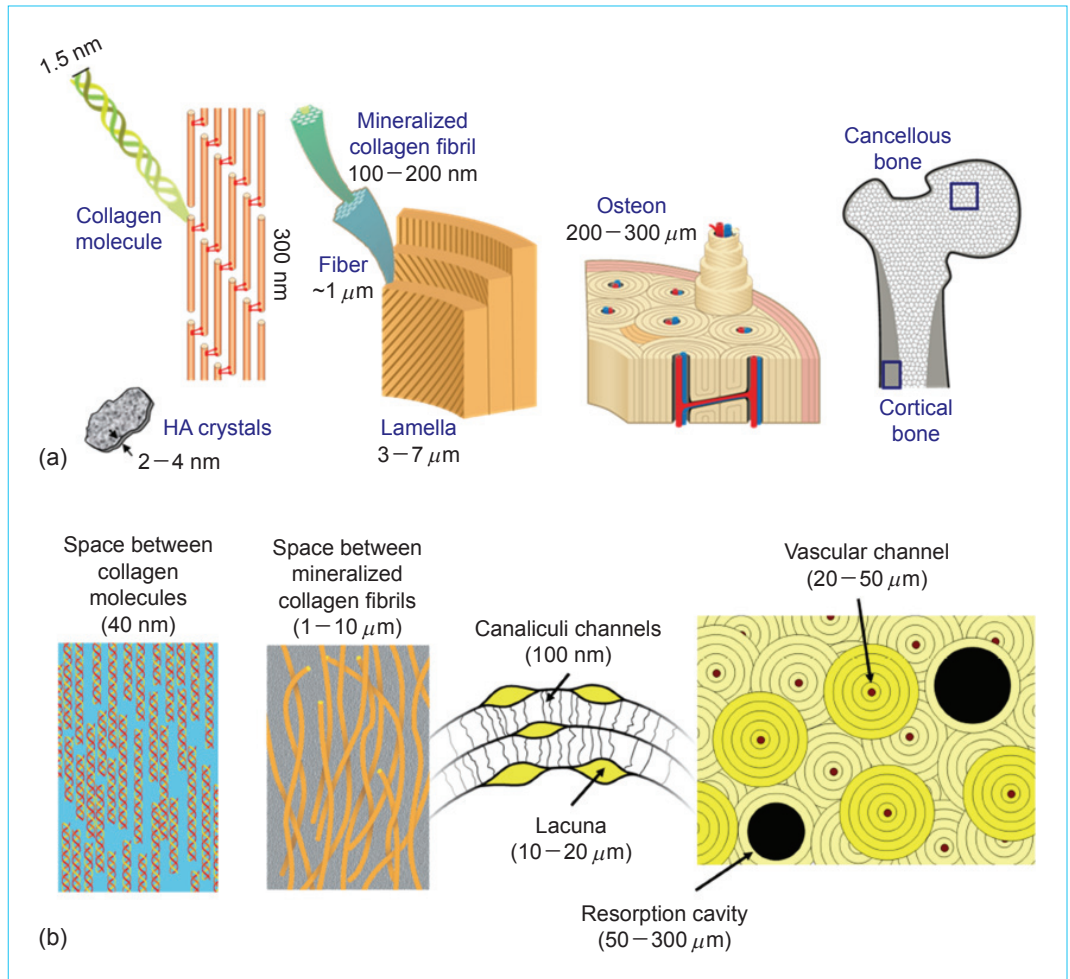


圖 1.  
(a) 骨骼在不同尺度下之階層結構 (hierarchical structure)。(b) 骨骼中不同大小之孔隙 (porosity)。

由手術或大體中取出骨骼樣本、處理、製備後進行測試，無法用於活的病患或常人。本文介紹一種新式微米壓痕技術—參考點壓痕測試 (reference point indentation, RPI)<sup>(4-8)</sup>。此量測技術可直接且非破壞地測量活體內骨骼及硬組織之機械性質，提供醫療上所需資訊，以彌補現有檢測方式之不足與限制。

## 二、骨骼的成分及結構

骨骼是天然的複合材料，由 33-43% 的礦物質、32-44% 的蛋白質及 15-25% 的水分所組成<sup>(9)</sup>。這些成分的體積百分比依骨頭的種類、年齡及健康狀況有所不同，其中礦物質主要為磷酸鈣 (hydroxyapatite) 及其他礦物質。蛋白質主要為第一型膠原蛋白 (type-I collagen) 及少量非膠原蛋白質 (noncollagenous proteins, NCPs)。骨骼具有獨特且複雜之階層式結構，從分子、奈米、微米至釐米等

尺度，可分為七個階層<sup>(10)</sup>，如圖 1(a) 所示。

第一層結構為基礎材料：膠原蛋白及磷酸鈣。膠原蛋白分子為三股螺旋結構 (tropocollagen)，直徑約 1.5 nm，長度約 300 nm。磷酸鈣成薄片狀，長寬約數十至一百奈米、厚度僅 2-4 nm。第二層結構：膠原蛋白分子組合成奈米纖維 (nanofibrils)，其具方向性、平行而交錯之堆疊，形成重疊 (overlap) 與空隙 (gap) 之區域，在電子顯微鏡下呈現出特有的 67 nm 規律週期。膠原蛋白奈米纖維與礦物質合成礦化之膠原蛋白纖維 (mineralized collagen fibrils)。第三層結構：礦化之膠原蛋白纖維形成微米尺度的纖維束 (micro-fibers)。第四層結構：微米纖維束平行排列，形成 3-7 μm 之薄板或層狀結構 (lamellae)。第五層結構為骨單元 (osteon)，由多層環狀的薄板組成 200-300 μm 之圓柱狀結構，中心有血管通過 (縱向的 Haversian canal 與橫向的 Volkmann canal)，層與層之間則

有放射狀的微小管 (canaliculi) 連繫，負責傳輸所需養分及礦物質。第六層結構則可分為外層的緻密骨 (cortical or compact bone) 及內部的海綿骨 (trabecular or cancellous bone)。第七層結構則為骨骼，其大小與形貌依功能而有所不同。

除了上述複雜的多階層結構，骨骼在不同的尺度具有各種有序及無序排列之孔隙 (圖 1(b))。如膠原蛋白分子間，礦化膠原蛋白纖維及纖維束之間的空隙、骨細胞所佔據之空間 (lacunae)、微小管、血管、再塑過程中蝕骨細胞 (osteoclast) 產生的空洞及海綿骨中的間隙等。由於骨骼複雜的層狀結構及孔洞，使其機械性質分析與模擬非常困難，無法用一般複合材料理論模型來預測<sup>(11)</sup>。此外，骨骼之成分與結構造成機械性質上非等向性 (anisotropic)、非均質性 (heterogeneous)、黏彈性 (viscoelastic) 等特性，提高了在機性量測上的難度與挑戰。

### 三、奈米壓痕技術於骨組織機械性質量測之應用

自 1970 年代迄今已發展出許多方法，用以量測骨骼之機械性質，如靜態的拉伸、壓縮、彎曲、扭轉、斷裂韌度測試、動態的衝擊測試、疲勞測試、間接的超音波速度量測及微觀的奈米壓痕及原子力顯微鏡量測等。由不同方法量測所得之機械性質有著明顯的差異<sup>(12)</sup>。一般而言，影響骨骼機械性質的變因有礦物質<sup>(13)</sup> 及水分含量<sup>(14)</sup>、孔隙<sup>(15)</sup>、方向性<sup>(16)</sup>、應變速率<sup>(17)</sup>、年齡<sup>(18)</sup> 與疾病<sup>(19)</sup> 等。本文針對奈米壓痕技術在骨骼及硬組織之機性量測作文獻回顧。

奈米壓痕量測技術始於 1980 年代初期<sup>(20)</sup>，當時主要應用於薄膜材料或其他奈米材料，自 1990 年代起開始，用以量測骨組織之微米及次微米尺度之機械性質<sup>(21-25)</sup>，目前已廣泛地運用於生物試片，如軟骨<sup>(26)</sup>、牙齒<sup>(27-29)</sup> 與各種礦化組織<sup>(30, 31)</sup>。奈米壓痕測試儀使用極小的荷重和尖銳的針，選定局部區域範圍，以設定之最大荷重及荷重速率進行負載 (loading) 與卸載 (unloading)，並由荷重-位移關係圖與卸載的初始釋放曲線斜率，以常用的 Oliver-

Pharr<sup>(32)</sup> 分析方法求得硬度 (hardness,  $H$ ) 及折合彈性模數 (reduced elastic modulus,  $E_r$ )。奈米壓痕技術在量測骨組織機械性質上有著其他大尺度方法無法取代之優勢，可檢測局部微小的區域，瞭解成分及微結構之差異性對其機械性質之影響。

圖 2 所示為緻密骨與海綿骨奈米壓痕測試所得之荷重-位移曲線<sup>(24)</sup>，海綿骨由於密度低、孔隙多，其彈性模數較緻密骨低許多。Rho 等人<sup>(22)</sup> 研究骨單元與間隙骨 (interstitial bone) 機械性質之差異性，發現骨齡長、礦物質含量高的間隙骨的彈性模數 (約 26 GPa) 較年輕、礦物質含量低的骨單元 (約 22 GPa) 高。圖 3 為牛大腿骨之背散式掃描電子顯微鏡圖與方框所示區域彈性係數之彩色對應圖 (color mapping)，數值高者標定為紅/黃色，數值低者為藍/綠色，清楚呈現出骨單元與間隙骨機械性質之差異性。圖 4 顯示高解析奈米壓痕量測可進一步區分出同一個骨單元內不同層之間機械性質之差異<sup>(23)</sup>。靠近中央處之內層有著較高之彈性係數 (約 22 GPa)，而外層之彈性係數逐漸減小 (約 18 GPa)，此與礦物質的含量遞減有關。

雖然奈米壓痕技術在量測骨組織之機械性質極具優勢，發展迄今仍有諸多限制。首先，待測試片需經裁切、鑲埋、研磨與拋光等製備步驟，形成平滑可量測之表面，實為破壞性之機性量測，無法用

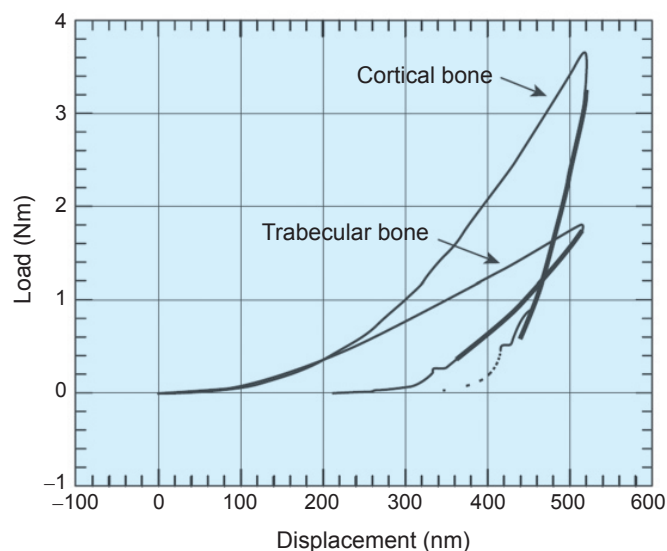


圖 2. 利用奈米壓痕量測緻密骨與海綿骨所得之荷重-位移關係與卸載的初始釋放曲線斜率  $S$  之比較<sup>(24)</sup>。

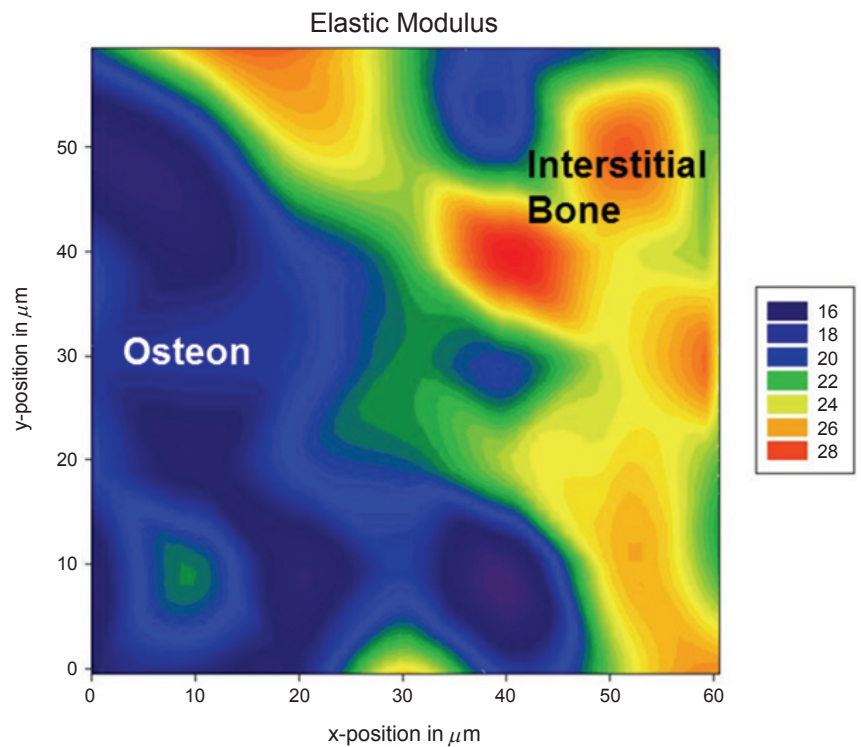
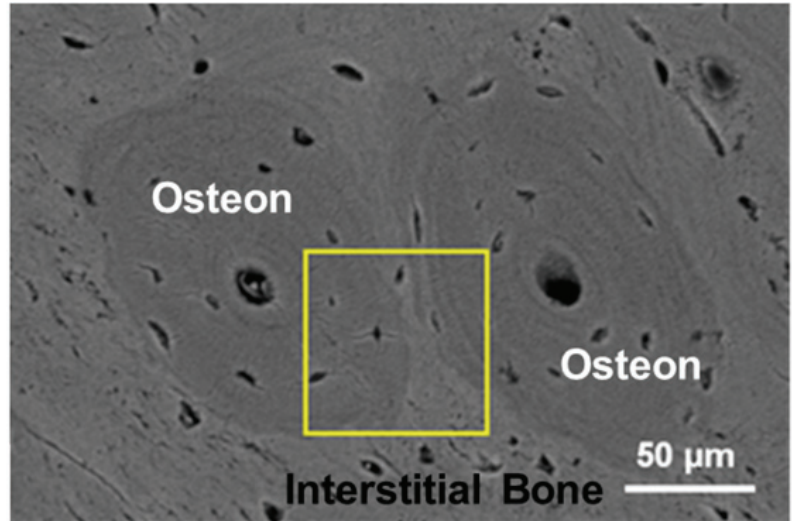


圖 3. 骨單元與間隙骨之背散式掃描電子顯微鏡圖。方框為奈米壓痕陣列所在區域。下方為彈性係數對應圖(單位：GPa)。

於活體、提供醫療診斷及實用之資訊，應用侷限於基礎科學之研究。再者，骨組織及其他生物組織之機械性質對於保存方法與測試時所選用之緩衝生理溶液非常敏感<sup>(28, 33)</sup>。隨著離開體內的時間增加，其機械性質顯著降低，若要量測骨組織真實的機械性質，時效性、試片準備及保存方法至關重要。接下來將介紹由奈米壓痕技術改良之非破壞性檢測方法，可量測活體內骨骼與硬組織之機械性質。

#### 四、參考點壓痕測試之原理及應用

參考點壓痕量測技術由美國加州大學聖塔芭芭拉分校 (University of California, Santa Barbara) 物理系 Paul Hansma 教授及其團隊開發，並成立 Active Life Scientific Inc. 公司，自 2006 年已生產數款量測儀器，從第一代的 Osteoprobe™ I<sup>(4)</sup>、第二代的 Osteoprobe™ II<sup>(5)</sup>、第三代的 Osteoprobe™ III<sup>(6)</sup>，到目前最新的產品 BioDent™<sup>(8)</sup>。原理及步驟如圖

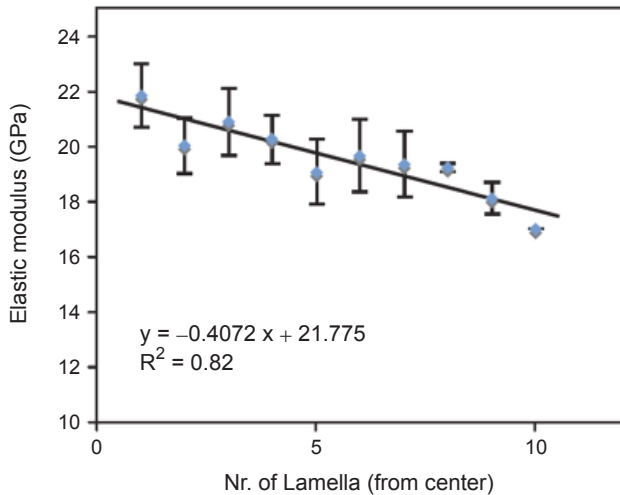


圖 4. 利用奈米壓痕量測單一骨單元內，層與層間彈性係數之變化。彈性係數由內層向外層遞減<sup>(23)</sup>。

5 所示<sup>(8)</sup>，其外觀類似注射器，由兩種探針：參考探針 (reference probe) 及測試探針 (testing probe) 所組成。主要步驟簡述如下：以酒精消毒，並局部麻醉受測區域 (通常為小腿骨前側，因為此區域肌肉及其他軟組織最少)，垂直插入探針，使參考探針置於骨頭表面，左右移動約 5 mm，以清除骨膜 (periosteum)，定位後插入測試探針，施以設定之荷重，並逐漸增加荷重，共 20 次之週期，完成後取出探針，消毒並以紗布包覆受測區域。壓痕區域小於 400 μm，量測所需時間約十分鐘，受測患者無顯著不適感。

可測量的參數依據不同機型而有所差異。第一代的 Osteoprobe™ I 有兩種操作模式：施予固

定應力，量測最大插入距離 (maximum insertion distance)，或插入至固定距離，量測最大應力 (maximum force reached)。圖 6 比較未處理 (unbaked) 與高溫處理 (baked) 牛骨之機械性質<sup>(4)</sup>，在相同的應力下，高溫處理過牛骨之最大插入距離明顯較未處理者高，顯示高溫會破壞骨骼之組織結構，降低其機械強度。第二代的 Osteoprobe™ II 則定義新的參數，稱為壓痕距離增加值 (indentation distance increase, IDI)，為第 1 次與第 20 次週期性量測值之距離差 (圖 7)<sup>(5)</sup>，此數值較前述之最大插入距離與應力，更能代表骨骼抵抗外界應力之能力。圖 8 以壓痕距離增加值比較年輕 (17 歲) 與年老 (79 歲) 受測者骨質強度之差異性，經統計分析，兩者差異顯著 ( $P < 0.001$ )<sup>(5)</sup>。第三代的 Osteoprobe™ III 則整合電腦系統及測試平台，用於活體動物實驗相關研究。最新的 BioDent™ 除上述功能外，還可測量潛變所造成的壓痕距離 (creep indentation distance)，提供骨骼之黏彈性和隨時間變化之參數。

目前常用的奈米壓痕技術，以量測硬度與彈性模數為主，參考點壓痕測試亦可獲得此兩項材料參數。然而，研究顯示這些參數無法有效判斷骨骼的斷裂風險。由於骨組織不是線性彈性 (linear elastic) 的材料，在斷裂前有部分的塑性變形，量測骨組織對於斷裂之阻抗能力 (fracture resistance)，宜使用裂縫成長韌性 (crack growth toughness)<sup>(34)</sup>，而不適用線性彈性斷裂力學之斷裂韌性  $K_{Ic}$ 。由於骨骼的微結構，在裂縫生成與成長時衍生出許多韌化機制，如裂縫偏轉 (crack deflection)、膠原蛋白纖

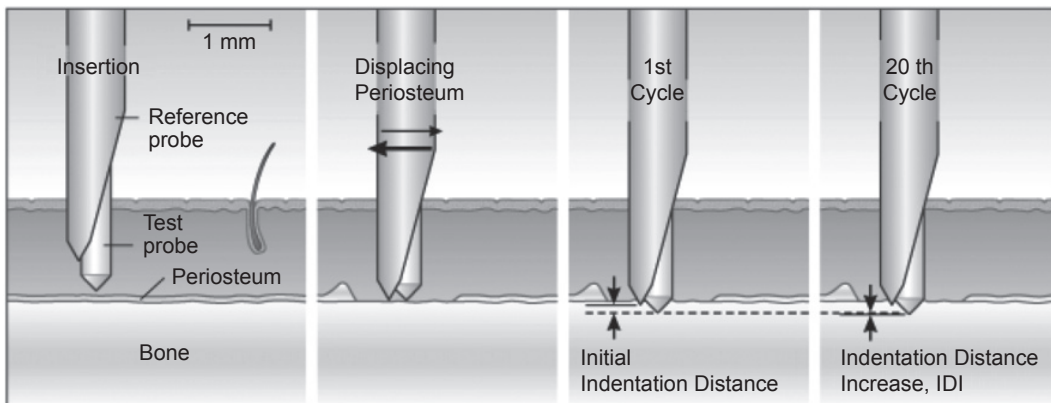


圖 5. 參考點壓痕量測原理及步驟示意圖<sup>(8)</sup>。

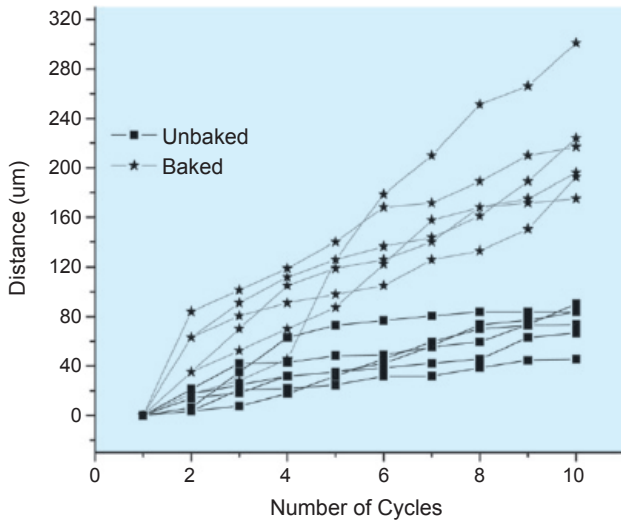


圖 6. 固定荷重下，未處理 (unbaked) 與高溫處理 (baked) 牛骨之壓痕插入距離在不同循環次數之比較，顯示高溫處理後骨骼之機械性質降低<sup>(4)</sup>。

維連結 (collagen fiber bridging) 阻止裂縫繼續擴大等，而有所謂的 resistant-curve (R-curve)<sup>(35-37)</sup>，隨著裂縫增長，斷裂韌性提高<sup>(34)</sup>。裂縫成長韌性即為 R-curve 的斜率，為骨骼抵抗斷裂能力的重要指標。圖 9 顯示由參考點壓痕法測得之壓痕距離增加值與裂縫成長韌性有著高度的關聯性<sup>(8)</sup>，IDI 值越低，探針越不易進入骨組織，其裂縫成長韌性越大。IDI 值量測可做為判斷骨骼健康狀況、評估斷

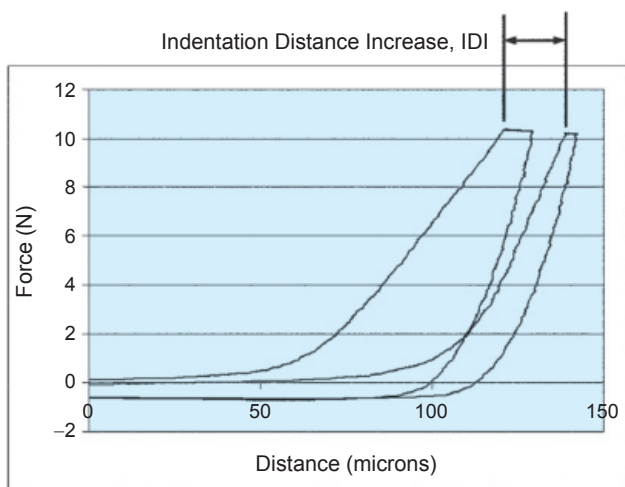


圖 7. 壓痕距離增加值之定義<sup>(5)</sup>。

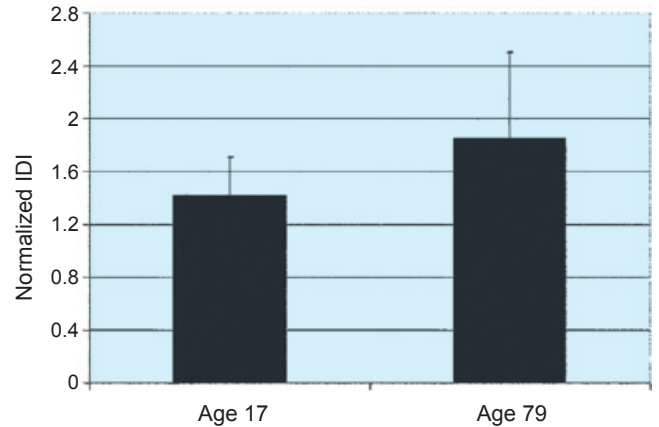


圖 8. 年輕 (17 歲) 與年老 (79 歲) 受測者小腿骨壓痕距離增加值之比較<sup>(5)</sup>。

裂風險重要之參考依據。圖 10 為掃描式電子顯微鏡照片<sup>(8)</sup>，參考點壓痕量測所造成裂縫與緻密骨斷裂時之微結構非常相似，皆可發現礦化的膠原蛋白纖維被分離而形成裂縫。

此方法具有諸多優點及應用上的潛力，但仍有一些限制及不足之處。量測之位置侷限於小腿骨前側的緻密骨，尚未測量其他區域或不同之骨骼種類，結果是否具有足夠的代表性而能夠代表所有的骨骼組織仍存疑。再者，目前臨床實驗所得之數據有限，受測者年齡偏高，多有骨折或骨骼相關疾病，仍需更多不同性別、年齡、健康情形之受測者，以建立較完整的資料庫。

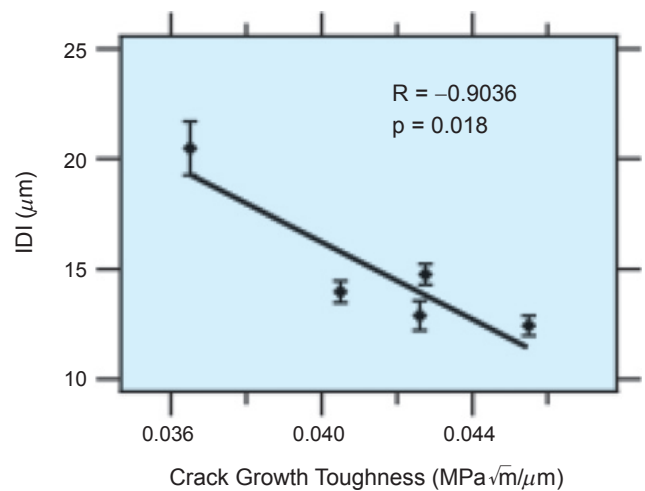


圖 9. 壓痕距離增加值與裂縫成長韌性之關聯性<sup>(8)</sup>。

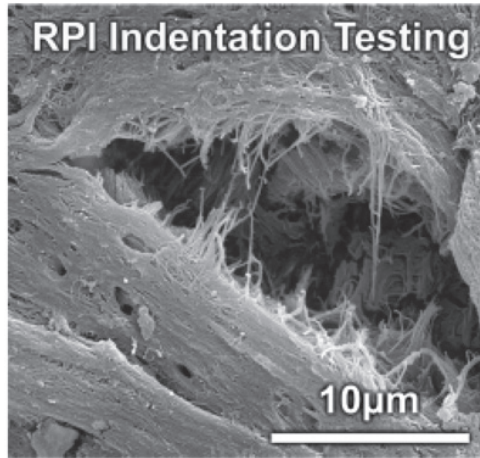
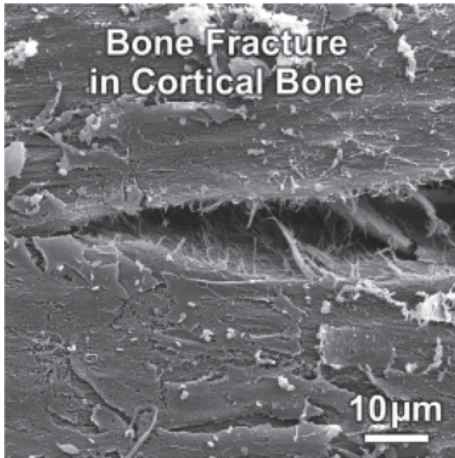


圖 10.  
電子顯微鏡照片比較緻密骨斷裂與參考點壓痕測試後裂縫之微結構(8)。

## 五、結論

本文介紹一種新式的參考點壓痕量測方法，可用以量測活體內骨骼之機械性質，作為醫療上評估骨骼健康狀況及斷裂風險之依據。此方法為非破壞性，無須進行手術以顯露出骨組織或切除取樣，受測者無顯著不適感，且簡單易操作。在數據分析方面，除了傳統壓痕測試所能獲得之硬度、彈性模數，此法可在不同的操作模式下量得壓痕距離增加值、潛變壓痕距離、能量耗損 (energy dissipation) 等參數。其中壓痕距離增加值與裂縫成長韌性呈高度相關，可做為判斷評估骨骼抵抗斷裂能力之重要參考。此方法雖歷經數代之改良，仍需更多的基礎科學研究、動物實驗及臨床研究，以建立更完整具代表性之資料庫，而能更廣泛地應用醫療及其他相關領域。

## 參考文獻

1. J. D. Currey., *Bones: structure and mechanics.*, New Jersey: Princeton University Press (2002).
2. F. Rivadeneira, M. C. Zillikens, C. E. D. Laet, A. Hofman, A. G. Uitterlinden, T. J. Beck, and H. A. Pols, *J. Bone Miner. Res.*, **22**, 1781 (2007).
3. S. Boutroy, B. V. Rietbergen, E. Sornay-Rendu, F. Munoz, M. L. Bouxsein, and P. D. Delmas., *J. Bone Miner. Res.*, **23**, 392 (2008).
4. P. K. Hansma, P. J. Turner, and G. E. Fantner, *Rev. Sci. Instrum.*, **77**, 075105 (2006).
5. P. K. Hansma, P. Turner, B. Drake, E. Yurtsev, A. Proctor, P. Mathews, J. Lulejian, C. Randall, J. Adams, R. Jungmann, F. Garza-de-Leon, G. Fantner, H. Mkrtchyan, M. Pontin, A. Weaver, M.B. Brown, N. Sahar, R. Rossello, and D. Kohn, *Rev. Sci. Instrum.*, **79**, 064303 (2008).
6. P. K. Hansma and D. H. Kohn, *Rev. Sci. Instrum.*, **80**, 065108 (2009).
7. P. K. Hansma, H. Yu, D. Schultz, A. Rodriguez, E. A. Yurtsev, J. Orr, S. Tang, J. Miller, J. Wallace, F. Zok, C. Li, R. Souza, A. Proctor, D. Brimer, X. Noguez-Solan, L. Mellbovsky, M. J. Pena, O. Diez-Ferrer, P. Mathews, C. Randall, A. Kuo, C. Chen, M. Peters, D. Kohn, J. Buckley, X. Li, L. Pruitt, A. Diez-Perez, T. Alliston, V. Weaver, and J. Lotz, *Rev. Sci. Instrum.*, **80**, 054303 (2009).
8. A. Diez-Perez, R. Guerri, X. Noguez, E. Caceres, M. J. Pena, L. Mellibovsky, C. Randall, D. Bridges, J. C. Weaver, A. Proctor, D. Brimer, K. J. Koester, R. O. Ritchie, and P. K. Hamsma, *J. Bone Miner. Res.*, **25**, 1877 (2010).
9. M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y. Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Doublas, and L. B. Gower, *Mater. Sci. Eng. R*, **58**, 77 (2007).
10. S. Weiner and H. D. Wagner, *Ann. Rev. Mater. Sci.*, **28**, 271 (1998).
11. E. Hamed, E. E. Novitskaya, J. Li, P.-Y. Chen, I. Jasiuk, and J. McKittrick, *Acta Biomater.*, **8**, 1080 (2012).
12. E. E. Novitskaya, P.-Y. Chen, E. Hamed, J. Li, V. A. Lubarda, I. Jasiuk, and J. McKittrick., *J. Theo. Appl. Mech.*, **38**, 209 (2011).
13. J. D. Currey, *J. Biomech.*, **2**, 1 (1969).
14. J. D. Currey, *J. Biomech.*, **21**, 439 (1988).
15. J. D. Currey, *J. Biomech.*, **21**, 131 (1988).
16. W. Bonfield and M.D. Grynepas, *Nature*, **270**, 453 (1977).
17. J. H. McElhaney, *J. Appl. Physiology*, **21**, 123 (1966).
18. J. D. Currey, K. Brear, and P. Zioupos, *J. Biomech.*, **29**, 257 (1996).
19. P. Chavassieux, E. Seeman, and P. D. Delmas, *Endocrine Reviews*, **28**, 151 (2007).
20. D. Newey, M.A. Wilkins, and H.M. Pollock, *J. Phys. E.: Sci. Instrum.*, **15**, 119 (1982).

21. J. Y. Rho, T. Y. Tsui, and G. M. Pharr, *Biomater.*, **18**, 1325 (1997).
22. J. Y. Rho, M. E. II Roy, T. Y. Tsui, and G. M. Pharr, *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 48 (1999).
23. J. Y. Rho, P. Zioupos, J. D. Currey, and G. M. Pharr, *Bone*, **25**, 295 (1999).
24. P. K. Zysset, X. E. Guo, C. E. Hoffler, K. E. Moore, and S. A. Goldstein, *J. Biomech.*, **32**, 1005 (1999).
25. P. J. Thurner, *WILEY Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **1**, 624 (2009).
26. O. Franke, K. Durst, V. Maier, M. Goken, T. Birkholz, H. Schneider, F. Hennig, and K. Gelse, *Acta Biomater.*, **3**, 873 (2007).
27. S. Habelitz, S. J. Marshall, G. W. Marshall, and M. Balooch, *Archives of Oral Biology*, **46**, 173 (2001).
28. S. Habelitz, G. W. Marshall, M. Balooch, and S. J. Marshall, and *J. Biomech.*, **35**, 995 (2002).
29. J. H. Kinney, S. J. Marshall, and G. W. Marshall, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **14**, 13 (2003).
30. M. L. Oyen, *J. Biomech.*, **39**, 2699 (2006).
31. P.-Y. Chen, J. Schirer, A. Simpson, R. Nay, Y.-S. Lin, W. Yang, M. I. Lopez, J. Li, E. A. Olevsky, and M. A. Meyers, *J. Mater. Res.*, **27**, 100 (2012).
32. W. C. Oliver and G. M. Pharr, *J. Mater. Res.*, **7**, 1564 (1992).
33. S. Hengsbarger, A. Kulik, and P. Zysset, *Bone*, **30**, 178 (2002).
34. K. J. Koester, J. W. Ager, and R. O. Ritchie, *Nature Mater.*, **7**, 672 (2008).
35. D. Vashishth, J. C. Behiri, and W. Bonfield, *J. Biomech.*, **30**, 763 (1997).
36. R. K. Nalla, J. J. Kruzic, J. H. Kinney, and R. O. Ritchie, *Biomaterials*, **26**, 217 (2005).
37. R. O. Ritchie, M. J. Buehler, and P. Hansma, *Phys. Today*, **62**, 41 (2009).



陳柏宇先生為美國加州大學聖地牙哥分校材料科學與工程博士，現任國立清華大學材料科學與工程系助理教授。

Po-Yu Chen received his Ph.D. in materials science and engineering from the University of California at San Diego, USA. He is currently an assistant professor in the Department of Materials Science and Engineering at National Tsing Hua University.