

光源-探测器小距离散射光谱在疼痛测量中的应用

戴丽娟¹, 丁乐明¹, 李颢韬², 钱志余²

1. 南通大学机械工程学院, 江苏 南通 226019

2. 南京航空航天大学生物医学工程系, 江苏 南京 210016

摘要 提出了利用光源-探测器小距离散射光谱进行疼痛测量的一种新方法。首先, 基于修正的 Beer-Lambert 定律, 建立氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白浓度变化与光源-探测器小距离探头所采集的散射光谱强度变化的关系式, 通过悬乳液血液混合液体模型实验, 将公式计算结果与组织血氧仪测量结果进行对比。其次, 分别对 7 只大鼠的后肢注射福尔马林溶液以制造疼痛刺激, 用光源-探测器小距离光谱系统采集注射前、后大鼠前扣带回的散射光谱, 同时, 用生物电信号采集系统获取注射前、后大鼠前扣带回的局部放电信号。最后, 计算氧合血红蛋白浓度、脱氧血红蛋白浓度和总血红蛋白浓度的变化, 获取 β 波频段(13~30 Hz)每 10 s 的功率强度, 分析这些参数在注射前、后的变化。实验结果表明, 氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白浓度变化的公式计算值与仪器测量值在液体模型实验中吻合较好, 其相对误差平均值与标准偏差为 $14\% \pm 5\%$, 因此, 利用光源-探测器小距离散射光谱进行氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白浓度变化分析的准确度高。在大鼠疼痛刺激实验中, 前扣带回的氧合血红蛋白浓度在注射后的 5 min 内出现短期增大, 随后单调减少。反之, 脱氧血红蛋白浓度在注射后的 5 min 内出现短期减小, 随后单调增大。总血红蛋白浓度在注射后没有显著性变化。前扣带回局部电信号功率在注射后逐渐增大, 约 20 min 到峰值, 之后保持在峰值附近, 与注射前有显著性差异, 可以确认氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白浓度的变化是与前扣带回功能激活高度相关的。由此可见, 基于光源-探测器小距离探头的散射光谱系统可以有效地用于标记与疼痛处理相关的核团的功能激活和分析核团的神经-血管耦合机制, 为利用小动物模型增进对疼痛相关的脑血管功能的了解和疼痛测量提供了一种有效的新方式。

关键词 散射光谱; 疼痛; 血流动力学参数; 光源-探测器小距离

中图分类号: O433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)12-3743-05

引言

尽管数十年来神经成像技术的发现揭示了大脑各种功能背后丰富而复杂的过程, 但使用神经成像作为量化或测量疼痛的客观工具仍受到质疑。这是因为疼痛是一种多因素的主观体验, 在疼痛的处理过程中, 包含一个大的分布式脑网络, 从而导致神经成像信号的准确性和有效性有限^[1-5]。

最近一些使用功能磁共振成像(functional magnetic resonance imaging, fMRI)的研究证实, 源自局部脱氧血红蛋白浓度变化的 BOLD 信号因痛觉而改变^[6-9]。类似地, 一些使用功能近红外光谱成像(functional near infrared imaging, fNIRI)的人类研究表明, 热刺激或电刺激会导致不同脑区血红蛋白浓度的变化^[10-13]。因此, 了解脑功能活动中神经-血管

耦合的性质将有助于更好的量化或测量疼痛。

为了研究不同深度神经核团在疼痛处理中相关的神经-血管耦合问题, 利用一种简单的稳态光纤光谱仪和光源-检测距离小的 Y 型双光纤微创探头对大鼠前扣带回在疼痛过程中的散射光谱进行实时采集, 基于改进的 Beer-Lambert 定律(MBLL)获得血流动力学参数, 同时, 采集大鼠前扣带回的局部放电信号进行功率强度变化分析, 确认血流动力学参数在疼痛过程中的变化与前扣带回的功能激活相关, 从而评估这种技术作为疼痛测量方式和增进对疼痛相关的脑血管功能的了解的可行性。

1 实验部分

1.1 动物准备

收稿日期: 2020-01-06, 修订日期: 2020-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(61405098, 61875085)和 2017 年江苏政府留学奖学金资助

作者简介: 戴丽娟, 女, 1980 年生, 南通大学机械工程学院副教授 e-mail: dai.lj@ntu.edu.cn

选用 7 只成年雄性 SD 大鼠, 平均年龄 (98.5 ± 1.5) d, 平均体重 (363.4 ± 11.2) g, 所有动物均经腹腔注射戊巴比妥钠溶液麻醉 $(50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1})$ 。将 PE10 导管插入颈静脉, 以 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的固定速率持续静脉注射戊巴比妥钠 $(5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1})$, 从而在整个数据采集过程中维持麻醉。将大鼠头部固定在脑立体定位仪上, 通过使用反馈控制加热毯将大鼠体温保持在 37°C 。沿头皮中线切开, 暴露前扣带回上方的头骨, 通过颅骨钻三个孔, 根据大鼠脑立体图谱中前扣带回的范围, 选择孔 1 坐标为前凶前 1.44 mm 、中线右侧 0.4 mm , 孔 2 坐标为前凶后 0.6 mm 、中线右侧 0.6 mm 。孔 3 用于安装地线螺钉, 选择在孔 2 附近的合适位置即可。

1.2 装置

实验系统结构如图 1 所示, 由光谱采集装置和脑局部电信号采集装置组成。光谱采集装置的基本组成部分是钨卤素光源 (HL2000HP, Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA)、光纤光谱仪 (USB 2000, Ocean Optics, Dunedin, FL, USA)、双光纤探头和用于控制和数据采集的计算机。双光纤探头包含两根多模光纤, 一根用于光传输, 另一根用于光检测。每根光纤直径均为 $200 \mu\text{m}$, 两纤芯距离 $400 \mu\text{m}$, 探头尖端的外径为 1 mm 。脑局部电信号采集装置主要由微电极、无线生物电记录器和用于数据采集的计算机组成。

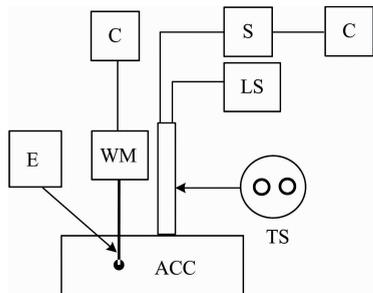


图 1 系统结构图

E: 微电极; C: 计算机; WM: 无线传输模块; S: 光谱仪; LS: 光源; TS: 光纤探针断面; ACC: 前扣带回

Fig. 1 System configuration

E: Electrode; C: Computer; WM: Wireless module; S: Spectrometer; LS: Light source; TS: The section of the optical probe; ACC: Anterior cingulate cortex

1.3 数据采集和处理

将双光纤探头经孔 1 放置于 ACC 上方, 由探测光纤传回的光信号经光谱仪传回电脑, 使用 LabWindows 编程软件记录 $350 \sim 1000 \text{ nm}$ 的散射光谱, 采样频率 2 Hz 。将微电极经孔 2 插入 ACC 内部, 植入深度约 3 mm 。地线螺钉插入孔 3, 用牙科胶固定微电极和螺钉。经微电极采集的脑局部电信号送入无线传输模块, 经放大、A/D 转换后以无线方式传输给电脑, 数据采集程序由 LabView 编写, 采样频率 500 Hz 。

实验开始后, 先记录 10 min 的基线数据, 然后向大鼠左后肢足底中心注射 0.1 mL 福尔马林溶液 (浓度 3%) 以产生疼痛。数据采集保持至注射后 60 min 。数据采集完成后, 选择 $500 \sim 600 \text{ nm}$ 波段的光谱进行 $\Delta[\text{HbO}]$ 和 $\Delta[\text{Hb}]$ 的计算。

对采集的电信号, 用 MatLab 编程进行分割, 10 s 为一时间段, 计算每段数据 β 波频段 ($13 \sim 30 \text{ Hz}$) 的功率强度。

1.4 血流动力学参数相对变化估算法

生物组织光学常用扩散近似模型研究光 (包括近红外光) 在生物组织中的传播, 但当光源与探测器距离小于 1 mm 时, 扩散模型是无效的。Zonios 等对这一问题提出了解析的反射模型, 但需要经过严格的最小二乘拟合, 耗时较长, 限制了其在实时、随时间变化的测量中的使用^[14-15]。本文采用以下算法来估计氧合血红蛋白浓度 $[\text{HbO}]$ 、脱氧血红蛋白浓度 $[\text{Hb}]$ 和总血红蛋白浓度 $[\text{HbT}]$ 的变化。该算法基于修正的 Beer-Lambert 定律, 假设水和除血红蛋白衍生物外的其他吸光色团不随时间变化, 则可以通过下式将光强变化 $\Delta\text{OD}(\lambda)$ 与色团浓度的变化 $\Delta[\text{HbO}]$ 和 $\Delta[\text{Hb}]$ 联系起来。

$$\begin{bmatrix} \Delta\text{OD}(\lambda_1) \\ \Delta\text{OD}(\lambda_2) \\ \vdots \\ \Delta\text{OD}(\lambda_n) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \epsilon_{\text{Hb}}^{\lambda_1} & \epsilon_{\text{HbO}}^{\lambda_1} \\ \epsilon_{\text{Hb}}^{\lambda_2} & \epsilon_{\text{HbO}}^{\lambda_2} \\ \vdots & \vdots \\ \epsilon_{\text{Hb}}^{\lambda_n} & \epsilon_{\text{HbO}}^{\lambda_n} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Delta[\text{Hb}] \\ \Delta[\text{HbO}] \end{bmatrix} d\text{DPF} \quad (1)$$

其中, $\Delta\text{OD}(\lambda_n)$ 表示波长 λ_n 处的光强变化, $\epsilon_c^{\lambda_n}$ 表示吸光色团 c 在 λ_n 处的消光系数, DPF 是微分光程因子, 取决于组织的光学特性, 也具有轻微的波长依赖性, d 是光源-探测器距离。

原则上, 两个波长点的数据就足够计算式 (1) 的两个未知量 ($\Delta[\text{HbO}]$ 和 $\Delta[\text{Hb}]$)。为了消除实验噪声, 增加拟合精度, 在 $500 \sim 595 \text{ nm}$ 范围内使用 90 个波长点来确定 $\Delta[\text{HbO}]$ 和 $\Delta[\text{Hb}]$ 的值, 相邻波长点光谱分辨率约 1 nm 。 $\Delta[\text{HbT}]$ 等于 $\Delta[\text{HbO}]$ 与 $\Delta[\text{Hb}]$ 的和。

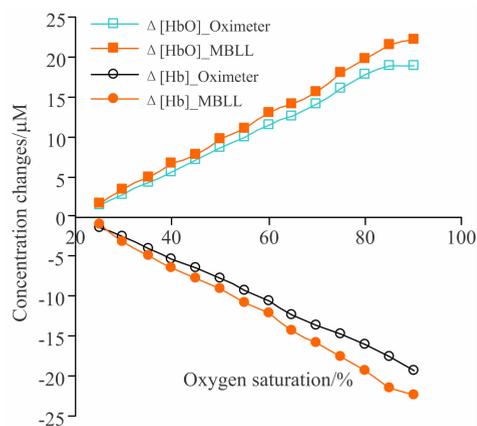


图 2 两种测量方法测得的 $\Delta[\text{HbO}]$ 和 $\Delta[\text{Hb}]$ 的比较
Fig. 2 Comparisons of $\Delta[\text{HbO}]$ and $\Delta[\text{Hb}]$ obtained by two methods

利用悬乳液和血液的混合液体模型进行以上算法的验证。通过在液体模型中通氧气或氮气的方法来增加或减小氧饱和度, 从而改变氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白的浓度。在液体模型中放入本文所用光源-探测器小距离散射光谱采集系统的探头, 采集模型的散射光谱后再按式 (1) 计算 $\Delta[\text{HbO}]$ 和 $\Delta[\text{Hb}]$ 。同时, 在模型中放入组织血氧仪探头 (ISS Oximeter), 以组织血氧仪的测量值作为检验式 (1) 准确度的金标准。实验在氧饱和度范围为 $20\% \sim 90\%$ 的 14 个数值点进行

测量(氧饱和度 20%为基准),重复实验,使每个氧饱和度数值点都能获得 10 次采样。两种测量方法测得的 $\Delta[\text{HbO}]$ 和 $\Delta[\text{Hb}]$ 的比较如图 2 所示。式(1)中 DPF 取为常量 20,其给出的计算结果与期望值误差最小。经分析,式(1)计算值与标准值的相对误差为 $14\% \pm 5\%$ 。

2 结果与讨论

2.1 血流动力学参数相对变化

为了更好地显示前扣带回对福尔马林诱导的伤害感受所作出的区域性血液动力学反应,图 3 分别给出 $\Delta[\text{HbO}]$, $\Delta[\text{Hb}]$ 和 $\Delta[\text{HbT}]$ 在注射前、后 10 min 的变化曲线($n=7$,以平均值 \pm 标准偏差表示)。图上仅显示小部分标准偏差线,以更好地显示曲线。图中红色箭头处为注射的时间点。

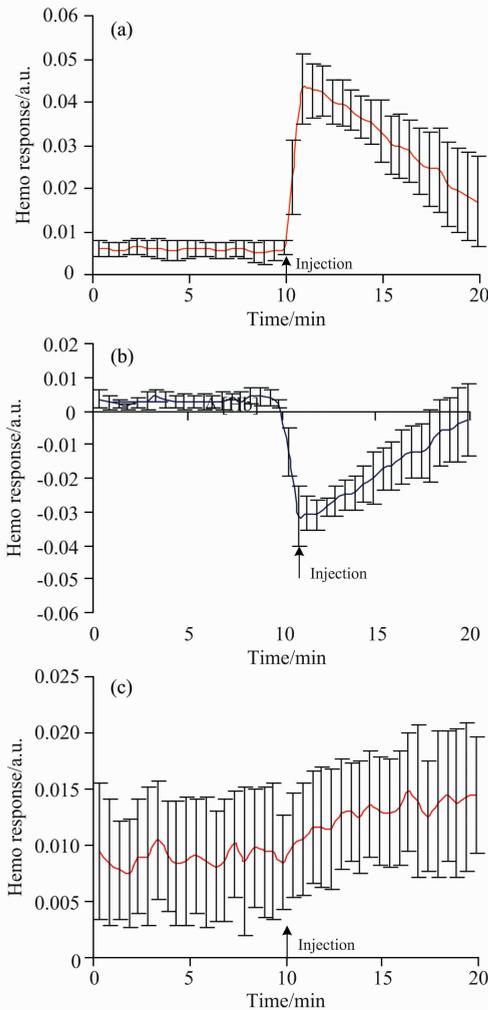


图 3 前扣带回血流动力学参数在注射前 10 min 和后 10 min 的变化

(a): 氧合血红蛋白浓度变化; (b): 脱氧血红蛋白浓度变化; (c): 总血红蛋白浓度变化

Fig. 3 Changes of hemodynamic parameters of ACC in 10 minutes before and 10 minutes after the injection

(a): $\Delta[\text{HbO}]$; (b): $\Delta[\text{Hb}]$; (c): $\Delta[\text{HbT}]$

图 4 所示为整个 70 min 内区域血流动力学参数的变化曲线。再按每 5 min 为一段的方式将数据按时间分组到 13 个时段,统计分析注射后每一时间段与注射前两个时间段的差异,结果如图 5 所示,图中 # 和 ^ 表示该时间段的参数变化与注射前有显著性差异($p=0.05$)。

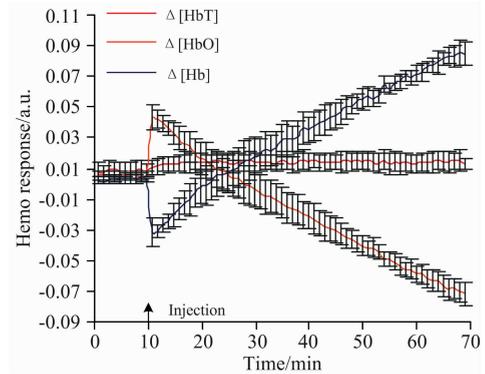


图 4 前扣带回血流动力学参数注射前 10 min 和注射后 60 min 的变化

Fig. 4 Changes of hemodynamic parameters of ACC in 10 minutes before and 60 minutes after the injection

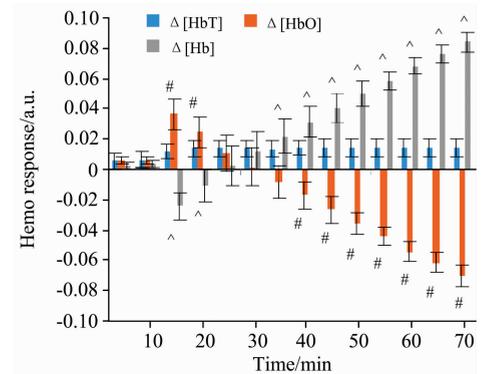


图 5 每 5 min 时间段血流动力学参数变化差异性统计

Fig. 5 Statistics of the difference of hemodynamic parameters every 5 minutes

从图 3、图 4 和图 5 可知,随着时间的推移,ACC 区域的 $\Delta[\text{HbO}]$ 和 $\Delta[\text{Hb}]$ 均有显著的变化。具体而言, $\Delta[\text{HbO}]$ 在注射后先是显著增加,然后在 10~20 min 之间恢复到基线水平,之后为持续的单调下降。反之, $\Delta[\text{Hb}]$ 在注射后开始显著下降,在注射后 10~20 min 之间恢复到基线水平,随后持续单调增加。与 $\Delta[\text{HbO}]$ 或 $\Delta[\text{Hb}]$ 不同,局部 $\Delta[\text{HbT}]$ 在注射后略增大,但没有显著性意义。

2.2 局部电信号功率变化

图 6 为 β 波频段(13~30 Hz)的功率强度与注射前 10 min 该频段功率强度平均值的比值变化曲线($n=7$,以平均值 \pm 标准偏差表示)。再以 5 min 为时间段,统计分析注射后每一时间段与注射前两个时间段的差异,结果如图 7 所示,图中 * 表示该时间段的功率比值与注射前有显著性差异($p=0.05$)。

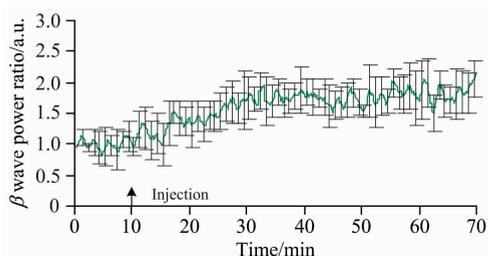


图 6 局部电信号 (13~30 Hz) 功率比在注射前后的变化

Fig. 6 The power ratio of local field potential (13~30 Hz) before and after the injection

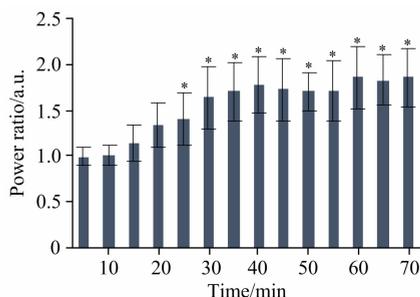


图 7 β 波每 5 min 时间段功率谱数据差异性统计

Fig. 7 Difference statistics of power spectrum data of β wave every 5 minutes

从图 6 可知, 注射福尔马林前, β 波段的功率比值较平稳, 变化范围小。注射福尔马林后, 功率比值呈现逐渐升高的趋势, 在注射后约 20 分钟达到峰值, 之后保持在峰值附近。根据图 6 与图 7, 可以确认前扣带回在疼痛传导通路中产生响应, 在注射后 60 min 内都处于功能激活状态。

2.3 讨论

有研究表明, 与人类视觉、体感和运动刺激相关的皮质的血流动力学模式是 [HbO] 的增加伴随着 [Hb] 的减少。但当受试者执行字谜任务时, 在人类前额叶皮层中发现了一种

相反的模式, 即 [HbO] 减少伴随着 [Hb] 的增加。因此, 脑功能的血流动力学模式与脑区和所执行的任务相关。

根据 ACC 区域局部电信号功率变化曲线分析, 注射福尔马林后, ACC 区域即被激活, 且持续时间可达数小时。ACC 中的神经元随着被激活而氧需求增加。局部血管通过一系列潜在的作用对其作出反应: 通过动脉血管扩张提供更多的 HbO, 加快 HbO 的释氧速度, 将 Hb 转移到小静脉, 并加速 Hb 的转运。因此, [HbO] 增加, 而 [Hb] 减少。然而, 福尔马林诱导的氧气需求持续数小时, 局部血管将达到极限, 无法进一步扩张, 因此不能通过血管扩张和动脉血流入来维持 [HbO] 的增加。[HbO] 随着神经元持续的高耗氧而降低。同时, 局部血管的能力达到上限水平, 不能有效地清除累积的血红蛋白, 导致 [Hb] 增加。本研究结果显示, 在福尔马林注射后的最初阶段, 区域 [HbO] 增加, 同时 [Hb] 减少。在注射后晚期, 区域 [HbO] 减少, 同时 [Hb] 增加。这一结果与上述分析相吻合。

3 结论

基于修正的 Beer-Lambert 定律, 建立氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白浓度变化与光源-探测器小距离探头所采集的散射光谱强度变化的关系式, 计算结果经验证具有较高的准确性。通过对大鼠后肢注射福尔马林溶液使大鼠产生疼痛刺激, 利用光源-探测器小距离探头获得散射光谱, 在此基础上计算氧合血红蛋白浓度、脱氧血红蛋白浓度和总血红蛋白浓度的相对变化, 分析核团激活期间血流动力学的响应模式, 同时, 利用微电极采集脑局部放电信号, 经功率变化分析, 确认大鼠前扣带回区域血流动力学参数在注射后的变化与该区域功能激活高度相关。以上结果表明, 基于光源-探测器小距离探头的局部散射光谱系统可有效地用于标记与疼痛处理相关的核团的功能激活和分析核团的神经-血管耦合机制, 为利用小动物模型增进对疼痛相关的脑血管功能的了解和疼痛测量提供了一种有效的新方式。

References

- [1] Bergmann Til Ole, Karabanov Anke, Hartwigsen Gesa, et al. *Neuroimage*, 2016, 140: 4.
- [2] Randy L Buckner. *Neuron*, 2013, 80(3): 807.
- [3] Mouraux Andre, Diukova Ana, Lee Michael C, et al. *Neuroimage*, 2011, 54(3): 2237.
- [4] Roger B Fillingim, John D Loeser, Ralf Baron, et al. *The Journal of Pain*, 2016, 17(9): T10.
- [5] Woo C W, Wager T D. *Pain*, 2015, 156: 1379.
- [6] Taras Usichenko, Rene Laqua Bianca Leutzow, Martin Lotze. *Brain Imaging and Behavior*, 2017, 11(1): 30.
- [7] Tobias Schmidt-Wilcke. *Best Practice & Research in Clinical Rheumatology*, 2015, 29(1): 29.
- [8] Wager T D, Atlas L Y, Lindquist M A, et al. *N. Engl. J. Med.*, 2013, 368: 1388.
- [9] Kraus T, Kiess O, Hösl K, et al. *Brain Stimulation*, 2013, 6(5): 798.
- [10] Ahmad Pourshoghi, Issa Zakeri, Kambiz Pourrezaei. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(10): 101411.
- [11] Amanda Mazzoni, Rachel Grove, Valsamma Eapen, et al. *Social Neuroscience*, 2019, 14(5): 505.
- [12] Meryem A Yucel, Christopher M Aasted, Mihayl P Petkov, et al. *Sci. Rep.*, 2015, 5: 9469.
- [13] He Jiwei, Liu Hanli, Peng Yuanbo. *Brain Sci.*, 2015, 5: 400.
- [14] Zonios G, Dimou A. *Opt. Express*, 2006, 14: 8661.
- [15] Zonios G, Dimou A. *Opt. Express*, 2009, 17: 1256.

Study on the Application of Scattering Spectrum With Small Source-Detector Separation in Pain Measurement

DAI Li-juan¹, DING Le-ming¹, LI Wei-tao², QIAN Zhi-yu²

1. Department of Mechanical Engineering, Nantong University, Nantong 226019, China

2. Department of Biomedical Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China

Abstract A new method of pain measurement using scattering spectrum with a small source-detector separation is proposed. First, the relationship between the change of oxy-hemoglobin and deoxy-hemoglobin concentrations and the change of scattering spectrum intensity sampled through an optical probe with a small source-detector separation is established based on the modified Beer-Lambert's law. The formula calculating results are compared with those measured by tissue oximeter in experiments using Intralipid mixed with blood. Secondly, the formalin solution was injected to seven rats' hind paws to create pain stimulation. The spectrum system with a small source-detector separation was used to measure the scattering spectrum of the anterior cingulate cortex (ACC) of rats before, and after injection, meanwhile, the local field potential of ACC before and after injection were acquired by the bioelectrical signal acquisition system. Finally, the change of oxy-hemoglobin, deoxy-hemoglobin and total hemoglobin concentration were calculated. The power spectrum intensity of β wave (13~30 Hz) was obtained every 10 seconds, respectively. The changes in these parameters before and after injection were analyzed. The results showed that the values of the oxy-hemoglobin and deoxy-hemoglobin concentration change calculated by the formula are in good agreement with those measured by the Oximeter in the liquid model experiment, in which the average relative error with the standard deviation is $14\% \pm 5\%$. Therefore, the analysis of the change of oxy-hemoglobin and deoxy-hemoglobin concentration by the spectrum system with a small source-detector separation could have high accuracy. In the pain stimulation experiments of rats, the oxy-hemoglobin concentration of ACC increased rapidly for a short time within 5 minutes after the injection of formalin and then decreased monotonously. Meanwhile, the deoxy-hemoglobin concentration decreased in a short time within 5 minutes after injection and then increased monotonously. There was no significant change in total hemoglobin concentration after injection. The local field potential power of ACC gradually increased after the injection and reached the peak value about 20 minutes after injection, and then remained near the peak value, which was significantly different from that before injection. It can be confirmed that the oxy-hemoglobin and deoxy-hemoglobin concentration changes were correlated highly with ACC's functional activation. It can be seen that the local scattering spectrum with a small source-detector separation can be effectively used to mark the functional activation and analyze the neural-vascular coupling mechanism of the nuclei related to pain, which provides an effective new way to improve the understanding of cerebrovascular function related to pain and pain measurement in small animal models.

Keywords Scattering spectrum; Pain; Hemodynamic parameters; Small source-detector separation

(Received Jan. 6, 2020; accepted May 9, 2020)