

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.19.006

生物磁谱分析技术在 OA 患者关节液磨屑颗粒评估中的初步应用*

牛舜¹ 龙华¹ 张艳² 李永伟¹ 赵振¹ 马保安^{1Δ}

(1 空军军医大学唐都医院骨科 陕西 西安 710038; 2 空军军医大学唐都医院肿瘤科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:随着人群的老齡化,骨关节炎(osteoarthritis, OA)已成为老年人最常见的疾病之一,严重影响老年人生活质量。而 OA 传统的诊断方法敏感性差,往往在确诊时,疾病已经发展到了晚期。本研究拟运用生物磁谱分析技术(bio-ferrography)来初步分析研究 OA 患者关节液中磨屑颗粒的参数,进而为 OA 的早期诊断提供依据。**方法:**选取符合纳入标准的 2017 年 9 月至 2017 年 12 月我科住院收治的 OA 患者。采集患者关节液后,运用 bio-ferrography 技术分离、收集关节液中的软骨磨屑颗粒和骨性磨屑颗粒,进一步通过扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观测磨屑颗粒的外形、数量和大小等参数。**结果:**随着患者 OA 等级的进展,软骨颗粒和骨性颗粒的数量均在增加,磨屑颗粒外形变得越来越锐利和不规则。在 Kellgren-Lawrence(K-L)1 级 OA 患者的关节液中,无骨性颗粒的存在,在 K-L 1~3 级 OA 患者的关节液中,软骨颗粒数量显著多于骨性颗粒。**结论:**我们初步探讨了通过 bio-ferrography 技术观测 OA 患者关节液中的磨屑颗粒,并评估了不同 K-L 分级 OA 患者关节液中磨屑颗粒的统计学特点,为今后建立以 bio-ferrography 技术为基础的 OA 早期诊断标准奠定了基础。

关键词:骨关节炎;生物磁谱分析;磨屑颗粒;早期诊断

中图分类号:R684.3;R604 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)19-3626-04

A Preliminary Use of Bio-ferrography in the Study of Wear Debris Evaluation in Arthritic Joint Fluid*

NIU Shun¹, LONG Hua¹, ZHANG Yan², LI Yong-wei¹, ZHAO Zhen¹, MA Bao-an^{1Δ}

(1 Department of Orthopedics, Tang Du Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Oncology, Tang Du Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: Osteoarthritis has been recognized as one of the most common diseases among old people, which has greatly reduced the quality of life. However, traditional OA diagnostic method lacks sensitivity that, most of the time, OA has developed to late stage until it was diagnosed. In this study, we aim to use bio-ferrography technique to analyze the wear particles in the synovial fluid of OA patients, which may provide references for early diagnosis of OA. **Methods:** OA hospitalized patients from 2017.09 to 2017.12 were selected according to our inclusion and exclusion criteria. The cartilage wear particles and bone wear particles in the synovial fluid were collected using bio-ferrography technique, and then, several parameters of these wear particles, such as shape, number and size, were observed by SEM. **Results:** The number of cartilage wear particles and bone wear particles increased with the OA classification, and the shape of these wear particles became more and more sharper and irregular. There were no bone wear particles in the synovial fluid of K-L 1 OA patients. Cartilage wear particles were more than bone wear particles in the synovial fluid of K-L 1~3 OA patients. **Conclusion:** In this study, a novel diagnostic method of bio-ferrography was used to briefly evaluate the wear particles in the synovial fluid of OA patients. Subsequently, the statistical characteristics of these wear particles from different OA classification patients were analyzed. This research established foundation to establish the OA early diagnostic criteria.

Key words: Osteoarthritis; Bio-ferrography; Wear debris; Early diagnosis

Chinese Library Classification(CLC): R684.3; R604 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)19-3626-04

前言

OA 以早期关节软骨的退变、磨损和晚期骨质增生为主要病理特点^[1,2],是老年患者最常见的关节疾患,也是人工关节置换的主要病因^[3]。临床表现为缓慢发展的关节疼痛、僵直、肿胀,

晚期伴有明显的活动受限及关节畸形,严重影响了老年人的生活质量^[4,5]。典型的 OA 常常通过 X 线片即可明确诊断,表现为关节间隙狭窄、软骨下骨质硬化和囊性变以及关节缘处骨赘形成等^[6]。临床应用最为广泛的是基于 X 线的 K-L 分级。但当 X 线出现以上征象时,患者往往只有通过人工关节置换术才能彻

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81401825);空军军医大学科技发展基金资助项目(2019XC063);

唐都医院科技创新发展基金项目(2018LCYJ013)

作者简介:牛舜(1984-),博士,主治医师,讲师,主要研究方向:人工关节置换,电话:13519114744, E-mail:21379067@qq.com

Δ 通讯作者:马保安(1961-),博士生导师,主任医师,教授,主要研究方向:人工关节置换, E-mail:baosanmatd@qq.com

(收稿日期:2019-01-31 接受日期:2019-02-27)

底治愈。OA 临床诊断的滞后正是因为其病理基础是软骨病变，而 X 线观测的是骨质的改变。因此，寻找一种更为有效的 OA 早期诊断方法很有必要。

在 1972 年, Seifert 等^[7]率先报道了一种分析发动机油液中磨屑颗粒的磁谱分析技术(ferrography), 通过对油液中金属磨屑大小、数量等参数的监测, 来评估机械部件的磨损情况。而 OA 的病理基础正是软骨的磨损, 关节液中会产生软骨磨屑颗粒, 而在晚期患者的关节液中, 还会有骨性颗粒产生。因此, 在本研究中, 我们试图初步探讨通过此技术在医学上的改进应用--生物磁谱分析技术(bio-ferrography)来观测 OA 患者关节液中的磨屑颗粒, 评估不同 K-L 分级患者关节液中磨屑颗粒的统计学特点, 为今后建立以 bio-ferrography 技术为基础的 OA 早期诊断标准做准备, 并为今后它在关节疾病的机制研究、早期诊断、评估疗效、预测预后等方面的进一步应用提供指导。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择 2017 年 9 月~2017 年 12 月我科住院收治的 OA 患者。纳入标准: 1) 住院患者第一诊断确诊为膝关节 OA; 2) 年龄为 22-75 岁; 3) 性别、职业不限。排除标准: 1) 患有严重的其他系统基础病变; 2) 患有感染性病变; 3) 膝关节周围皮肤破损; 4) 无法顺利交流; 5) 绝行关节腔穿刺。符合标准共 62 例膝, 其中 K-L 1 级 5 例, 年龄 22~48 岁(平均 36.8 ± 10.4 岁); K-L 2 级 7 例, 年龄 44~60 岁(平均 52.0 ± 5.4 岁); K-L 3 级 21 例, 年龄 49~71 岁(平均 66.6 ± 4.7 岁); K-L 4 级 29 例, 年龄 59~75 岁(平均 61.0 ± 10.0 岁)。本研究获得我院伦理委员会的批准, 所有患者均签署知情同意书。

小鼠抗 I 型胶原抗体、小鼠抗 II 型胶原抗体均购自美国 Sigma 公司; 羊抗小鼠 IgG 磁珠(IgG MACS Microbeads)、颗粒分选柱及磁珠分选器(MiniMACS Separator)均购自德国 Miltenyi Biotec 公司; Hitachi S-3400N 扫描电镜购自日本 Hitachi 公司。

1.2 研究方法

1.2.1 关节液采集 对于保守治疗患者, 常规消毒铺单后用无菌注射器抽取膝关节液 1 mL; 对于手术患者, 在切皮前, 用无菌注射器抽取膝关节液 1 mL。

1.2.2 目标磨屑颗粒收集 关节液在 4 °C、4000 rpm 下离心 15 min, 后将沉淀物加入 1 mL 蒸馏水中再次离心 10 min, 此步骤重复 3 遍后用 1 mL 生理盐水混悬。标本分为两份: 1) 0.2 mL 标本液 + 0.8 mL 去离子水 + 2 μL 小鼠抗 I 型胶原抗体 + 10 μL 羊抗小鼠 IgG 磁珠; 2) 0.2 mL 标本液 + 0.8 mL 去离子水 + 2 μL 小鼠抗 II 型胶原抗体 + 10 μL 羊抗小鼠 IgG 磁珠, 孵育 1 h。

1.2.3 目标磨屑颗粒分离 将孵育好的标本液先通过颗粒分选柱, 从而筛除掉 >100 μm 的颗粒。随后将标本液进一步滴入磁珠分选器中, 由于磁场作用, 被磁珠捕获的目标颗粒将吸附在分选柱壁上。将吸附于分选柱壁上的标本重新用 1 mL 生理盐水混悬后再次滴入分选器, 重复 3 遍后, 将标本涂抹在载玻片上, 供下一步观测。

1.3 观测指标

分离后的标本用 Hitachi S-3400N 扫描电镜进行观测。并连续测量 3 个 500 μm × 500 μm 视野下磨屑颗粒的数量和大小, 取均值作为每个样本的参数。其中颗粒的大小由其最长径和最短径的均值确定。

1.4 统计学分析

所有结果均用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间多重比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义, 结果用 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

2 结果

2.1 不同 K-L 分级 OA 患者关节液内磨屑颗粒形态特点

如图 1 所示, 运用 bio-ferrography 技术收集到的磨屑颗粒形态各异, 有丝状、棒状(图 1e)、片状(图 1a)、球状(图 1c)、块状、团簇状(图 1d)、不规则状(图 1b)等。这与患者膝关节不规则的运动及磨损方式相关。经过我们的初步观测, 不同的 K-L 分级患者软骨和骨性磨屑颗粒的形态特点也有所差异。简单来说, K-L 1 级 OA 患者的关节液中, 片状软骨磨屑颗粒最为常见, 其次是球状; K-L 2 级和 3 级 OA 患者的关节液中, 片状软骨磨屑颗粒变少, 球状及不规则状软骨磨屑增多, 而骨性磨屑颗粒主要是块状和球状为主; 而在 K-L 4 级 OA 患者的关节液中, 团簇状及不规则状软骨磨屑颗粒明显增多, 骨性磨屑颗粒主要是块状和不规则状为主。磨屑颗粒的棱角锐利程度也随着 K-L 分级的增加而变得更加锐利。

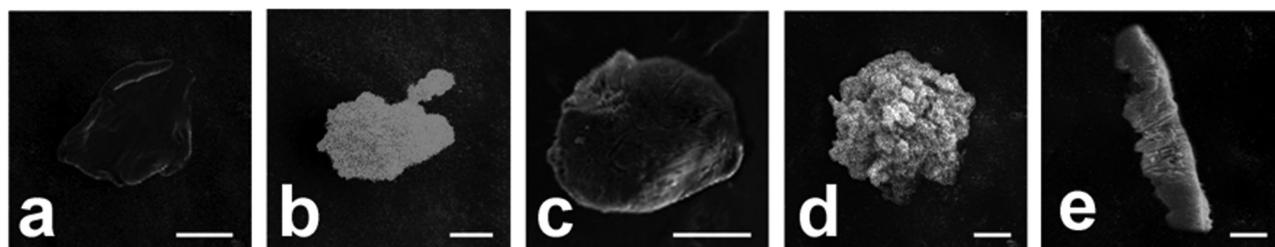


图 1 扫描电镜下的典型关节液中的磨屑颗粒

Fig.1 Typical wear particles isolated from the synovial fluid, as observed by SEM

Note: Bar=10 μm.

2.2 不同 K-L 分级 OA 患者关节液内磨屑颗粒数量变化

如图 2 所示, 随着 K-L 分级的进展, 无论是软骨磨屑颗粒还是骨性磨屑颗粒均比上一级患者关节液中磨屑颗粒的数量

显著增多。在 K-L 1 级患者的关节液里, 几乎无骨性颗粒。K-L 2 级患者的关节液里开始产生骨性磨屑颗粒, 但数量远远小于软骨磨屑颗粒, 并且在 K-L 3 级和 4 级患者的关节液里, 骨性

磨屑颗粒的数量均显著少于软骨磨屑颗粒。

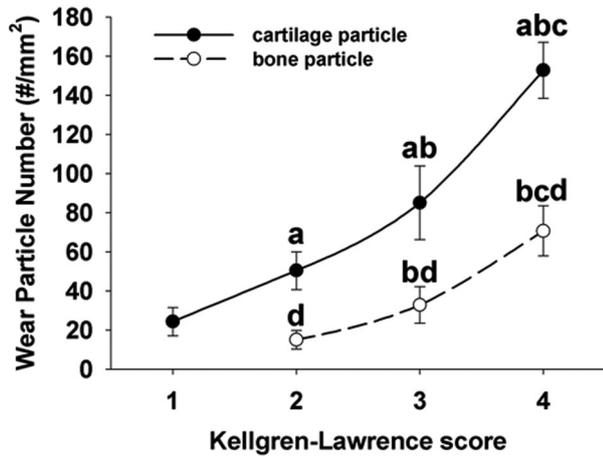


图2 磨屑颗粒数量

Fig.2 Number of wear particles

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$. a: $P < 0.01$, compared with K-L 1 patients; b: $P < 0.01$, compared with K-L 2 patients; c: $P < 0.01$, compared with K-L 3 patients; d: $P < 0.01$, within group significant compared with cartilage particles.

2.3 不同 K-L 分级 OA 患者关节液内磨屑颗粒大小

如图 3 所示,随着 K-L 分级的进展,无论是软骨磨屑颗粒还是骨性磨屑颗粒的直径均在增加,但是 K-L 2 级和 3 级以及 3 级和 4 级患者关节液中软骨磨屑颗粒的直径无显著性差异。在 K-L 4 级患者的关节液里,软骨磨屑颗粒和骨性磨屑颗粒的直径无显著性差异。

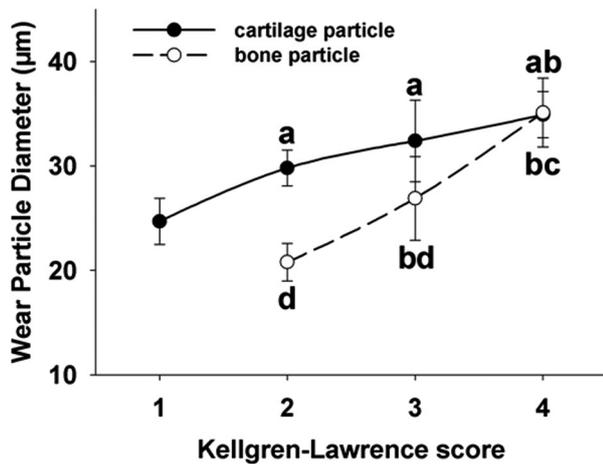


图3 磨屑颗粒大小

Fig.3 Diameter of wear particles

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$. a: $P < 0.01$, compared with K-L 1 patients; b: $P < 0.01$, compared with K-L 2 patients; c: $P < 0.01$, compared with K-L 3 patients; d: $P < 0.01$, within group significant compared with cartilage particles.

3 讨论

OA 是现今社会老年人的常见病,大大影响了老年人的生活质量。在 OA 早期,只需调整生活和运动方式,膝关节疼痛的

症状就能大大缓解,之后还可通过口服非甾体类消炎镇痛药等保守治疗措施来缓解症状。但是在临床上,不少患者前来就诊的时候,其 X 线表现已经到了 K-L 3 级以上,此时保守治疗效果非常有限,甚至不得不接受关节置换手术。因为此时患者的膝关节间隙已经开始狭窄,说明关节软骨已经有了广泛磨损剥脱。那么 OA 的早期诊断就显得很有必要。

但是,OA 的早期诊断存在不少困难^[8-10],患者的血常规、血沉,甚至 C 反应蛋白等常规血液指标往往无明显异常^[11]。而患者的症状常常与疾病的 X 线分级不符,经常出现症状重而 X 线改变轻或症状轻而 X 线改变重等情况,对医生的诊断及治疗措施选择造成了很大困扰。CT 同 X 线一样,是基于骨质的影像学检查,并不能较好的评估关节软骨的磨损情况。MR 可清晰的显示软骨病变,能早期诊断关节疾患^[6,11,12],而关节镜与之相比,又进一步提高了诊断的灵敏度,可在直视下观察关节软骨病变,但对于许多症状轻微的患者而言,大多不能接受较为昂贵的检查费用及有创性检查方式。所有影像学检查不可避免的局限性是阅片的主观性,这对于骨科和影像科医生的阅片经验有一定的要求,即使如此也不能保证阅片结果的一致性。因此,对于 OA 早期诊断来说,需要发展一种新的技术,同时兼顾灵敏度、客观性以及经济效益。

Ferrography 技术最早被应用于工科^[7],通过对机械部件润滑油中金属磨屑的监测,来评估机械部件的磨损情况。此项技术进一步发展,被改良为 bio-ferrography 技术而尝试应用于生物和医学领域。此技术到目前为止,已经有了以下成功的尝试:测量水中的细菌浓度^[13-15]、从人体外周血中分离癌细胞^[16-19]、分析胡蜂蜂巢中所含磁性矿盐的作用^[20]以及测量分析髌关节模拟器产生的聚乙烯颗粒^[21]等,从各个方面展示出了这项技术的普适性、灵敏性、客观性、便捷性以及经济性^[22]。

在我们的研究中,通过 bio-ferrography 技术分别收集了不同 K-L 分级 OA 患者关节液中的软骨磨屑颗粒和骨性磨屑颗粒。由于关节软骨中的胶原主要是 II 型胶原,因此通过小鼠抗 II 型胶原抗体所捕获的是软骨磨屑颗粒;而骨组织中的胶原主要是 I 型胶原,因此通过小鼠抗 I 型胶原抗体所捕获的是骨性磨屑颗粒。通过我们进一步对这些颗粒的数量、大小和形态学分析,我们发现:随着 OA 患者 K-L 分级的进展,无论是软骨颗粒还是骨性颗粒的数量均在增加。除了 K-L 4 级 OA 患者之外,软骨颗粒的数量均显著多于骨性颗粒数量,另外,在 K-L 1 级患者的关节液中,无骨性颗粒的存在。这与临床实际是吻合的,由于 K-L 1 级 OA 患者主要病理改变是关节软骨的退变、磨损,而软骨下骨无裸露、磨损,因此 K-L 1 级 OA 患者关节液中无骨性颗粒存在。到了 K-L 2 级和 3 级,软骨进一步磨损、剥脱,软骨下骨外露,开始出现了骨性颗粒,但此时主要还是以软骨的磨损为主。最后发展为 K-L 4 级时,关节软骨大面积剥脱,软骨下骨广泛裸露,此时关节液中的软骨颗粒数量和骨性颗粒数量已经没有显著性差异了。通过我们对磨屑颗粒形态学的分析,我们发现,磨屑颗粒的外形变得越来越锐利,软骨颗粒开始由片状、球状为主转变为团簇状、不规则状为主;而骨性颗粒开始由球状、块状为主转变为不规则状为主。这也正说明了随着 OA 等级的增加,关节内的磨损越来越剧烈,关节内环境越来越差。

本实验是运用 bio-ferrography 技术对 OA 患者关节液中磨屑颗粒的初步评估,结果令人鼓舞。在下一步研究中,我们还将进一步结合 OA 患者的膝关节 HSS 评分和疼痛评分等综合分析,另外与患者疼痛、活动度、畸形等临床症状相比较,进行相关性分析。评估关节液中磨屑颗粒和上述症状的关系。最终,我们拟建立以 bio-ferrography 技术为基础的 OA 早期诊断标准,并为今后它在关节疾病的机制研究、早期诊断、评估疗效、预测预后等方面的进一步应用提供指导。

本研究还有一些不足之处,对于拟行关节置换或关节腔玻璃酸钠注射的患者来说,采集关节液没有困难,但是对于拟行口服药物保守治疗的患者来说,很多患者不能很好地接受关节腔穿刺,这就造成了我们的样本中 K-L 3、4 级 OA 患者的样本充足,而 K-L 1、2 级 OA 患者的样本较少。另外,本实验缺少健康人群的关节液样本对照。在今后的研究中,我们拟通过充分的前期沟通及适当的经费补助来鼓励自愿者及患者提供关节液样本。

目前 bio-ferrography 技术还是一个依靠人工处理和分析的方法,一次只能分离、收集一个样本,后期再依靠人工进行 SEM 等观测分析。国外已经有实验室开始试图进行将其改良为多样本同时分离、收集,并试图对收集的磨屑颗粒实时进行分析^[23]。可以想象的是,通过后期将自动图像分析处理设备集成在一起,可以改良为对于磨屑颗粒数量、大小、外形和化学组成的自动分析系统,从而对磨屑颗粒的来源、磨损程度进行自动判断。另外,通过更多特异性抗体磁珠的使用^[24,25],我们可以针对不同的磨屑颗粒进行分离、收集和分析,从而对类风湿性关节炎、关节感染、人工关节置换术后假体松动、运动损伤等多种关节疾病进行早期诊断,扩大此技术在骨关节领域的适用范围。

参考文献(References)

- [1] DeFrate LE, Kim-Wang SY, Englander ZA, et al. Osteoarthritis Year in Review 2018: Mechanics [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 28 [Epub ahead of print]
- [2] Saberi Hosnijeh F, Bierma-Zeinstra SM, Bay-Jensen AC. Osteoarthritis year in review 2018: biomarkers (biochemical markers)[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 12 [Epub ahead of print]
- [3] 尹志强,潘惟丽,金昊,等.骨性关节炎病因的研究进展[J].*现代生物医学进展*,2016, 16(7): 1369-1371
- [4] Mandl LA. Osteoarthritis year in review 2018: clinical[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 16 [Epub ahead of print]
- [5] Arnscheidt C, Meder A, Rolaußs B. Early Diagnosis of Osteoarthritis: Clinical Reality and Promising Experimental Techniques[J].*Z Orthop Unfall*, 2016, 154(3): 254-268
- [6] Nieminen MT, Casula V, Nevalainen MT, et al. Osteoarthritis year in review 2018: imaging[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 25[Epub ahead of print]
- [7] Seifert WW, Westcott VC. A method for the study of wear particles in lubricating oil[J]. *Wear*, 1972, 21: 27-42
- [8] Madry H, Kon E, Condello V, et al. Early osteoarthritis of the knee[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016, 24(6): 1753-1762
- [9] Kandahari AM, Yang X, Dighe AS, et al. Recognition of Immune Response for the Early Diagnosis and Treatment of Osteoarthritis [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 1-13
- [10] 陈亮,刘玉杰,魏民.瘦素对骨关节炎影响的研究进展[J].*现代生物医学进展*, 2017, 5: 203-206
- [11] 王亮,陈祁青,童培建,等.膝骨性关节炎早期诊断的研究进展[J].*中国骨伤*, 2016, 29(3): 288-291
- [12] De Sousa EB, Dos Santos GC, Duarte MEL, et al. Metabolomics as a promising tool for early osteoarthritis diagnosis [J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2017, 50 (11)[Epub ahead of print]
- [13] Zhang P, Johnson WP, Rowland R. Bacterial tracking using ferrographic separation[J]. *Environ Sci Technol*, 1999, 33: 2456-2460
- [14] Zhang P, Johnson WP. Rapid selective ferrographic enumeration of bacteria[J]. *J Magn Magn Mater*, 1999, 194: 267-274
- [15] Johnson WP, Zhang P, Fuller ME, et al. Ferrographic tracking of bacterial transport in the field at the Narrow Channel Focus Area, Oyster, VA[J]. *Environ Sci Technol*, 2001, 35: 182-191
- [16] Zborowski M, Fuh CB, Green R, et al. Immunomagnetic isolation of magnetoferritin-labeled cells in a modified ferrograph [J]. *Cytometry*, 1996, 24(3): 251-259
- [17] Fang B, Zborowski M, Moore LR. Detection of rare MCF-7 breast carcinoma cells from mixture of human peripheral leukocytes by magnetic deposition analysis[J]. *Cytometry*, 1999, 36: 294-302
- [18] Levi O, Shapira A, Tal B, et al. Isolating epidermal growth factor receptor overexpressing carcinoma cells from human whole blood by bio-ferrography [J]. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2015, 88 (2): 136-144
- [19] Levi O, Tal B, Hileli S, et al. Optimization of EGFR high positive cell isolation procedure by design of experiments methodology[J].*Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2015, 88(5): 338-347
- [20] Ishay JS, Barkay Z, Eliaz N, et al. Gravity orientation in social wasp comb cells (Vespinae) and the possible role of embedded minerals[J]. *Naturwissenschaften*, 2008, 95(4): 333-342
- [21] Meyer DM, Tillinghast A, Hanumara NC, et al. Bio-ferrography to capture and separate polyethylene wear debris from hip simulator fluid and compared with conventional filter method[J]. *J Tribol*, 2006, 128: 436-441
- [22] 牛舜,朱庆生.生物磁谱分析技术在关节疾病方面的应用前景[J].*中华临床医师杂志(电子版)*, 2012, 6(2): 134-136
- [23] Centers PW. Laboratory evaluation of the on-line ferrograph [J]. *Wear*, 1983, 90: 1-10
- [24] Herrero-Beaumont G, Guerrero R, Sánchez-Pernaute O, et al. Cartilage and bone biological markers in the synovial fluid of osteoarthritic patients after hyaluronan injections in the knee [J]. *Clin Chim Acta*, 2001, 308: 107-115
- [25] 徐锋,高晓峰.透明质酸钠对兔膝骨性关节炎关节液中 TNF- α 、IL-6 和 MMP-3 的影响[J].*中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5(13): 3904-3905