doi:10.11659/jjssx.05E018113

·基础研究·

关节周围慢性痛风石的结构及成分分析

汪群力[1],牛 成[2],陈 奇[1] (1.解放军第187中心医院骨科,海南 海口 571159;2.海南大学材料与化工学院骨科,海南 海口 570228)

[摘 要] **目的** 分析关节周围慢性痛风石的成分组成,观察其微观结构,为溶石溶剂和外科清理方法的选择提供依据。**方法** 选择解放军第187中心医院2016年1月至2017年12月6例患者临床切除的痛风石标本。将痛风石清洗、干燥及相应处理后用傅里叶变换红外光谱仪、扫描电镜、热重分析仪等进行观察和分析。**结果** 痛风石的主要化学成分是尿酸钠,占比约56%;有机成分约占14%。痛风石微观结构有两种形态,一种是柱状晶体略成放射状排列,另一种是颗粒状堆积成块。**结论** 慢性痛风石主要成分是尿酸钠和有机组织,溶石溶剂要考虑对两种成分都起作用。

[关键词] 痛风石;慢性痛风;成分;结构;关节;痛风石切除;关节镜
[中图分类号] R589.7 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-05-22

Structure and component analysis of uratoma around joint

WANG Qun-li[1], NIU Cheng[2], CHEN Qi[1] (1. Department of Orthopedic, 187 Hospital of PLA, Haikou Hainan 571159, China; 2. Department of Orthopedic, College of Materail and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou Hainan 570228, China)

Abstract: Objective To analyze the structure and component of gouty tophus around joint, and provide basis to select solvent of gouty tophus and surgical cleaning method. **Methods** The sample of gouty tophus were obtained from 6 patients in 187 hospital of PLA from January 2016 to December 2017, which were rinsed by distilled water, and then dried and accepted other dispose. The sample were analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), scanning electron microscope and thermal gravimetric analyzer. **Results** Sodium urate was the main component of the uratoma, the proportion was 56%; the organic component was about 14% of the uratoma. The microstructure of the uratoma under scanning electron microscope have two forms, the one looks like column crystal and the other like granules head up to lump. **Conclusion** The main component of the gouty tophus are sodium urate and organic tissues, the possible solvent should react on the both of them.

Keywords: gouty tophus; chronic gout; component; structrue; joint; gout removal; arthroscope

痛风石是由于尿酸盐结晶沉积于人体组织,引起慢性炎症及纤维组织增生形成的结石,近年来其发病率呈逐年上升趋势[1]。痛风石常见沉积于关节滑膜、软骨、骨骼、肌腱、韧带、皮下脂肪和皮肤[2]。多发生于拇趾的第一跖趾关节、指、腕、肘及膝关节等关节处,导致严重的疼痛和功能障碍,甚至致残[3-4]。症状较轻的患者用内科治疗能取得很好的疗效。对于病程较长、已经有明显痛风石形成的患者,只能通过外科治疗。传统的外科治疗包括开放式痛风石切除和关节镜下清理、冲洗、刮除等方法[5-7]。在较严重的痛风患者关节内,痛风石已渗入到组织里,用传统的外科手术的方法很难将其清理干净,导致手术效果不佳,病情迁延不愈。本课题组设想找到对组织无明显损伤的痛风石溶剂,辅助外科手术治疗渗入性痛风石。因此,有必要对痛风石的结构和成分进行研究,为临床提供辅助溶剂的选择或组合。目前对痛风的研究主要集中于降血尿酸的药物方面[8-10],对痛风石本身的结构分析、成分性质等研究国内罕有报道。国外有学者对复发痛风石的基质蛋白进行了研究,初步阐明在痛风石形成过程中,有130余种蛋白参与,通过微区X射线和红外光谱等方法发现痛风石的主要无机成分是一水尿酸钠[11-12]。但总的来说,对痛风石的结构和成分缺乏较系统的研究报道。本研究结合电镜、红外光谱、热重分析等各种仪器分析技术以及相关分析方法对痛风石进行分析,希望深入了解痛风石的组成、含量和结构特点。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

痛风石由解放军第187中心医院提供,取自2016年1月到2017年12月6例患者临床切除的痛风石标本;尿酸购自上海晶纯生化科技股份有限公司;纯水由实验室自制。尿酸钠购自美国Sigma公司。傅里叶变换红外光谱仪(型号TENSOR27)购自德国Bruker公司;扫描电子显微镜(S-3000N型)购自日本日立公司;热重分析仪(型号Q600)购自美国TA仪器公司;真空冷冻干燥机(LGJ-10多歧管普通型)购自北京松源华兴科技发展有限公司。

1.2 样品制备

将手术采集的痛风石样品纯水清洗,简单去除附

[基金项目] 海南省自然科学基金(20168347)

着的组织成分,切割成细小的颗粒,纯水清洗,50 ℃干燥。取干燥样品敲击,显微镜下挑选,除去组织和骨成分,研磨,过 100 目筛,得到痛风石。

1.3 傅里叶红外光谱分析

取尿酸钠标准品和已处理的痛风石样品各约2 mg粉末分别与事先充分干燥的 200 mg 纯溴化钾进行充分的混合,再研磨。红外灯烘培约 10 min,压片机加压制成半透明片,迅速置入红外光谱槽中扫描,收集 400 ~ 4 000 cm^{-1}范围内震动信号。

1.4 扫描电镜观察

将导电胶粘结在样品座上,均匀地把痛风石粉末样品撒在上面,用洗耳球吹去未粘住的粉末,使用离子溅射,再镀上一层导电膜,上电镜观察。

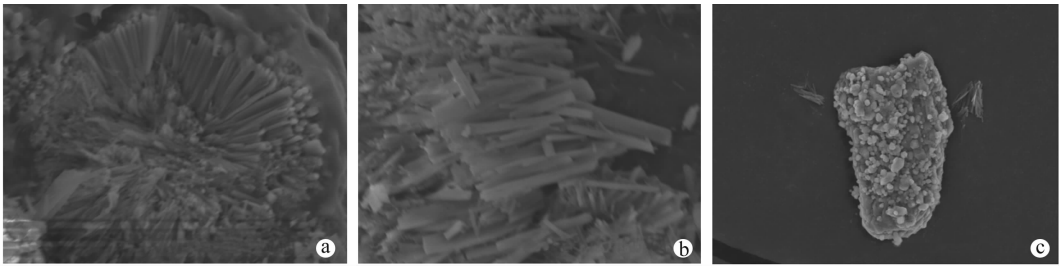
1.5 热重分析

测试条件:尿酸钠标准品和痛风石试样质量 10 mg,升温速率为 20 ℃/min,测温范围为 0 ~ 1 000 ℃,测试样本的失重及热效应。在空气介质中进行实验。

2 结果

2.1 场发射扫描电镜

电镜结果显示,痛风石结构有两种形态,一种是在组织内部有柱状的尿酸盐晶体生长,单个晶体大小约 10 μm × 1 μm × 0.2 μm,尿酸盐晶体聚集呈现球形,被组织包裹(图 1a、b),由此可以推测出组织内部出现成核剂诱导体内代谢产生的尿酸钠成核生长,形成柱状晶体,尿酸钠柱状晶体在组织中聚集形成球状物;另一种是尿酸盐晶体,呈颗粒状,堆积呈现块状(图 1c),由此可以推测出体内代谢产生的尿酸成分含量较高,从而析出,进一步堆积形成块状痛风石。

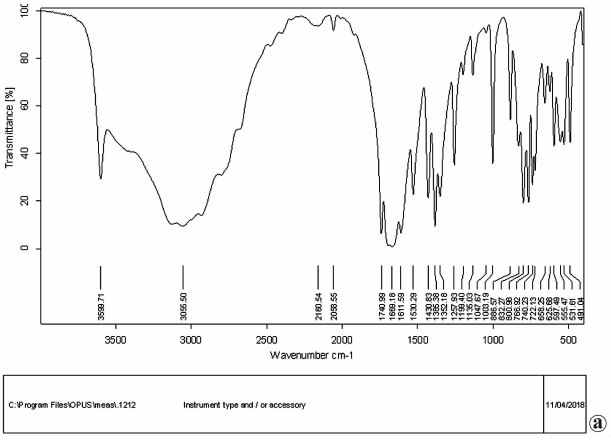


a:尿酸钠晶体略呈向心排列(×4.0K);b:尿酸钠晶体散乱堆积(×4.7K);c:尿酸钠堆积成块状(×3.2K)

图 1 痛风石 SEM 图

2.2 傅里叶红外光谱分析

将沉淀物送至海南大学分析测试中心采用傅里叶红外光谱分析仪对痛风石进行红外光谱测定。同时用尿酸钠作对照。尿酸钠的特征峰为 3 003 cm^{-1}、1 676 cm^{-1}、1 586 cm^{-1}、780 cm^{-1}、743 cm^{-1}、475 cm^{-1}(图 2a)。在痛风石红外图谱中 3 055 cm^{-1}处为 N-H 的伸缩振动峰,1 674 cm^{-1}处为 RCONHR中羰基峰,1 586 cm^{-1}处为 C = C 的伸缩振动峰(图 2b)。痛风石和尿酸钠 IR 图谱高度拟合(图 2c),从而证实了痛风石中主要成分为尿酸钠。

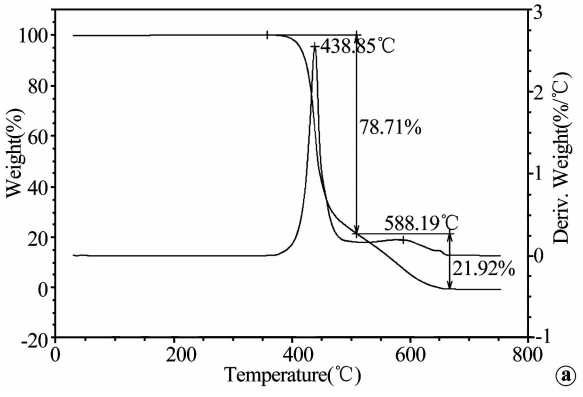


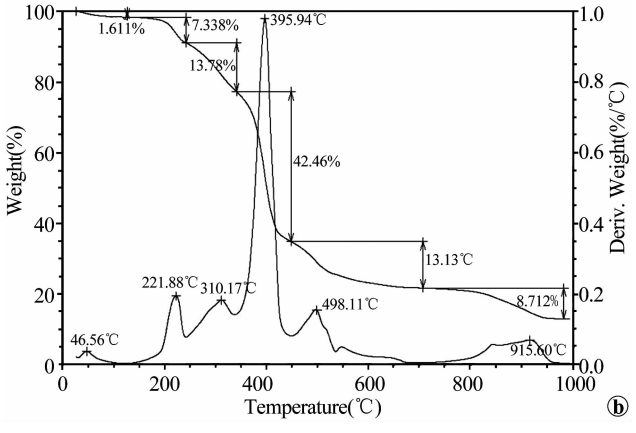
a:尿酸钠 IR 光谱图;b:痛风石 IR 光谱图;c:痛风石与尿酸钠的 IR 光谱重合图

图 2 傅里叶红外光谱分析

2.3 热重分析

利用热重分析技术对沉淀物进行分析。测定痛风石的热重损失和热分解信息。通过数据对比分析确定其中有机物的大致含量,获得痛风石的分解温度及相变情况,确定成分和存在形式。由图 3a 可见,尿酸的热重图可知尿酸分解分为两个阶段,第一阶段分解失重为 78.71%,第二阶段失重 21.92%。由痛风石与尿酸热重图可知,痛风石样品中自由水和结合水约占 9%;尿酸成分约占 56%;无机盐成分约占 9%,其他有机成分约占 14%(图 3)。





a:尿酸的 DSC-TGA 曲线;b:痛风石的 DSC-TGA 曲线

图 3 热重分析

3 讨论

电镜观察发现痛风石的微观结构主要有两种形式。一种是长方体状或棒状晶体聚合呈放射样球形,其基本结构是非常规则的长方体样的结晶,结晶堆积的方式可以是同心圆样放射性堆积,也可能是无明显规律的简单堆积。另一种是块状堆积的尿酸钠晶体构成痛风结节。前一种较常见,块状结构可能与结合有其他物质(如蛋白成分或机体的炎性细胞)包绕有关,其形态的多变可能与痛风石形成的过程和环境有关[13-14]。单钠尿酸盐结晶的形成除了与血尿酸水平、温度和 pH 等有关,中性粒细胞胞外网状陷阱也可能促进了痛风石形成,网状结构是由中性粒细胞被病原微生物激活后释放的脱氧核糖核酸(DNA)、组蛋白、蛋白酶类和抗菌肽等成分形成,其可以诱捕和杀灭病原微生物[15-16]。也有学者认为结晶程度好坏与形成过程快慢有关,过程慢结晶程度好,反之则结晶程度差。

经红外光谱分析发现清洗过后的痛风石样本的特征峰与标准尿酸钠样本高度重合,证实痛风石晶体的主要成分是尿酸钠,这也与文献报道相符[17]。热重分析结果显示,200 ℃之前丢失的重量应该是自由水和结合水,共失重约 9%,200 ~ 320 ℃丢失了 13.78%,考虑是各种蛋白质等有机物的分解。而 400 ~ 700 ℃考虑是痛风石的主要成分尿酸钠的分解。700 ~ 1 000 ℃分解的失重大约占 8.71%,考虑是尿酸钠分解的最后阶段,因为尿酸钠的分子式是 $C_5H_3N_4O_3Na$,是含有碳、氮、氧、氢的杂环化合物,熔点很高,但也不排除是其他无机成分。本实验初步了解了痛风石各成分的占比,但由于个体的差别、形成速度和环境的不同,痛风石的成分会有所不同。体内的痛风石结晶会形成痛风结节,周围被纤维组织包绕,中间有炎细胞和巨细胞浸润,数个痛风结节集中在一起,外周再被纤维组织包裹形成体积较大的慢性痛风石[18]。对于慢性形成的痛风石,目前的治疗方法有内科用药和外科手术。国外报道用尿酸酶静脉注射,每 2 周 1 次,每次 8 mg,13 周及更长时间后,伴随血尿酸的持续下降,难治性痛风石患者的痛风石明显缩小甚至消失,提示药物溶石仍是很有价值的治疗方法,而对于那些保守治疗无效的难治性痛风石患者,外科手术仍是有效的治疗手段[19]。外科手术包括传统的切开清理术、关节镜技术、电动刨刀等技术,但外科手术很难将痛风石彻底清除,可以考虑术中使用辅助溶石剂以及术后使用降尿酸药辅助治疗[20-24]。有文献报道尿酸氧化酶体外溶石效果较临床常用的碳酸氢钠的效果好,痛风石在体内是由尿酸钠结晶与蛋白、网状结构等混杂组成[25]。因此,单纯溶解尿酸钠的溶剂对慢性痛风石的溶解效果有限,外科清理痛风石加入蛋白酶可望取得较好的效果。

[参考文献]

[1] Chhana A, Dalbeth N. The gouty tophus: a review[J]. Curr Rheumatol Rep, 2015, 17(3):19. doi: 10.1007/s11926 - 014 - 0492 - x.

[2] 冉 兵, 魏 俊. 痛风石诊断与治疗的研究进展[J]. 中国骨伤, 2017, 30(9):876 - 880. doi:10.3969/j.issn.1003 - 0034.2017.09.019.

[3] Blandin C, Forien M, Gardette A, et al. Tophus size is associated with

hallux valgus deformity in gout[J]. Eur J Clin Invest, 2018, 48(1): e12862. doi: 10.1111/eci.12862.

[4] Ma L, Sun R, Jia Z, et al. Clinical characteristics associated with subcutaneous tophi formation in Chinese gout patients: a retrospective study [J]. Clin Rheumatol, 2018, 37(5): 1359 - 1365. doi: 10.1007/s10067 - 017 - 3969 - y.

[5] Lee SS, Chen MC, Chou YH, et al. Timing of intra-lesion shaving for surgical treatment of chronic tophus[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2013, 66(8): 1131 - 1137. doi: 10.1016/j.bjps.2013.03.041.

[6] Li HL, Li SY, Li CB, et al. Clinical observation of arthroscopic debridement for acute gouty arthritis of the ankle[J]. Zhongguo Gu Shang, 2016, 29(3): 258 - 260.

[7] Choi S, Lee J, Roh YH, et al. Surgical treatment of knee and ankle joint contractures resulting from chronic tophaceous gout[J]. J Clin Rheumatol, 2015, 21(5): 281 - 282. doi: 10.1097/RHU.0000000000000265.

[8] Jordan KM, Cameron JS, Snaith M, et al. British society for rheumatology and british health professionals in rheumatology guideline for the management of gout[J]. Rheumatology, 2007, 46(8): 1372 - 1374. doi: 10.1093/rheumatology/kem056a.

[9] Khanna D, Khanna PP, Fitzgerald JD, et al. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 2: therapy and antiinflammatory prophylaxis of acute gouty arthritis[J]. Arthritis Care Res(Hoboken), 2012, 64(10): 1447 - 1461. doi: 10.1002/acr.21773.

[10] 贾 西. 痛风治疗新理念——EULAR2016 痛风诊治指南的更新要点和解读[J]. 上海医药, 2018, 39(2): 3 - 7. doi: 10.3969/j.issn.1006 - 1533.2018.02.022.

[11] Bolzetta F, Veronese N, Manzato E, et al. Chronic gout in the elderly [J]. Aging Clin Exp Res, 2013, 25(2): 129 - 137. doi: 10.1007/s40520 - 013 - 0031 - z.

[12] Vorobjeva NV, Pinegin BV. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease[J]. Biochemistry (Mosc), 2014, 79(12): 1286 - 1296. doi: 10.1134/S0006297914120025.

[13] 王礼灿, 温成平, 谢志军. 痛风石的诊疗与研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(13): 1468 - 1469. doi: 10.3969/j.issn.1008 - 8849.2012.13.064.

[14] Dalbeth N, Pool B, Gamble GD, et al. Cellular characterization of the gouty tophus: a quantitative analysis[J]. Arthritis Rheumatol, 2010, 62(5): 1549. doi: 10.1002/art.27356.

[15] Holzinger D, Nippe N, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 contribute to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in gout[J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(15): 1327 - 1339. doi: 10.1002/art.38369.

[16] Kaneko K, Iwamoto H, Yasuda M, et al. Proteomic analysis to examine the role of matrix proteins in a gouty tophus from a patient with recurrent gout[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2014, 33(4-6): 199 - 207. doi: 10.1080/15257770.2014.880476.

[17] Abhishek A. Managing gout flares in the elderly: practical considerations[J]. Drugs Aging, 2017, 34(12): 873 - 880. doi: 10.1007/s40266 - 017 - 0512 - 4.

[18] 熊洋洋, 李源杰, 曾学军. 痛风石的基础研究与临床诊治进展[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(12): 1743 - 1746. doi: 10.16352/j.issn.1001 - 6325.2016.12.026.

[19] Baraf HS, Becker MA, Gutierrez-Urena SR, et al. Tophus burden reduction with pegloticase: results from phase 3 randomized trials and open-label extension in patients with chronic gout refractory to conventional therapy[J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(5): R137. doi: 10.1186/ar4318.

[20] 张伟强, 李具宝, 李帆冰. 关节痛风石取出手术对痛风患者血尿酸水平的影响[J]. 昆明医科大学学报, 2017, 38(1): 61 - 64. doi: 10.3969/j.issn.1003 - 4706.2017.01.013.

[21] Humphrey C, Hulme R, Dalbeth N. A qualitative study to explore health professionals' experience of treating gout: understanding perceived barriers to effective gout management[J]. J Prim Health Care, 2016, 8(2): 149 - 156. doi: 10.1071/HC15017.

[22] Pan FX, Li Q, Tang X, et al. Method and effectiveness of arthroscopic debridement for treating gouty arthritis of the knee[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2011, 25(8): 937 - 940.

[23] de ávila Fernandes E, Kubota ES, Sandim GB, et al. Ultrasound features of tophi in chronic tophaceous gout[J]. Skeletal Radiol, 2011, 40(3): 309 - 315. doi: 10.1007/s00256 - 010 - 1008 - z.

[24] Lipsky PE, Calabrese LH, Kavanaugh A, et al. Pegloticase immunogenicity: the relationship between efficacy and antibody development in patients treated for refractory chronic gout[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(2): R60. doi: 10.1186/ar4497.

[25] 冉 兵, 谢远龙, 冯 帆, 等. 应用液质联用技术定量分析尿酸氧化酶体外溶解痛风石疗效[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(4): 346 - 348. doi: 10.13507/j.issn.1674 - 3474.2016.04.012.

(编辑: 刘 艺)