

鄂温克族骨性关节炎患者血浆中 21 种微量元素分析

唐思思¹ 王声雨² 党瑞¹ 吴俊华³ 高彦辉³ 陶树清² 任小平² 王德才^{1*}

1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 哈尔滨 150081

2. 哈尔滨医科大学第二附属医院, 哈尔滨 150086

3. 中国疾病预防控制中心地方病中心, 哈尔滨 150081

中图分类号: R684.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 07-0883-05

摘要: 目的 探讨鄂温克族骨性关节炎患者血浆中 21 种微量元素的含量水平。方法 采用 0.3 ml HNO₃ + 0.3 ml H₂O₂ 混合消解液消化血浆样品,用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定血浆中 Li、Mg、Al、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr、Mo、Cd、Ba、Tl、Pb 等 21 种微量元素,用 t 检验方法统计分析。结果 病例组和对照组血浆中 6 种元素(Ti、V、Ni、As、Mo、Tl)低于方法的定量检出限;其他 15 种元素均检出,其中,病例组血浆中 4 种元素 Al、Ca、Cr、Cd 的含量低于对照组;11 种元素 Li、Mg、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Se、Sr、Ba、Pb 的含量高于对照组,且 Co 和 Pb 含量在两组间比较具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 鄂温克族骨性关节炎患者血浆中微量元素普遍高于正常对照水平,且 Co 与 Pb 元素水平与骨性关节炎患者发病存在潜在的相关性。

关键词: 骨性关节炎;电感耦合等离子体质谱;微量元素

Analysis of 21 types of plasma trace element in Ewenki patients with osteoarthritis

TANG Sisi¹, WANG Shengyu², DANG Rui¹, WU Junhua³, GAO Yanhui³, TAO Shuqing², REN Xiaoping², WANG Decai¹

1. College of Public Health, Harbin Medical University, Harbin, 150081

2. The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150086

3. Laboratory of Nutrition and Food Hygiene, Harbin 150081, China

Corresponding author: WANG Decai, Email: wdc8089@sina.com

Abstract: Objective To investigate the distribution of 21 types of plasma trace element in Ewenki patients with osteoarthritis. **Methods** The plasma samples were digested in the mixture of 0.3 ml of HNO₃ and 0.3 ml of H₂O₂. Plasma Li, Mg, Al, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Sr, Mo, Cd, Ba, Tl, and Pb were detected using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Data were analyzed using t test. **Results** The concentrations of the six elements (Ti, V, Ni, As, Mo, and Tl) were lower than the quantitative detection limit of the method. The levels of Al, Ca, Cr, and Cd in the osteoarthritis patients was lower than those in the control group, while the concentrations of Li, Mg, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Sr, Ba, and Pb were higher than those in the control group. In addition, the levels of Co and Pb were significant different between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The content of trace elements in Ewenki patients with osteoarthritis is higher than that in control group. The levels of Co and Pb is potentially associated with osteoarthritis.

Key words: Osteoarthritis; ICP-MS; Trace Element

1 前言

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是以关节软骨生化代谢异常、变性、损伤及骨质增生为特征的慢性退行性骨关节病。流行病学调查显示,我国 60 岁以上

人群中骨性关节炎患者约占 55%,70 岁以上人群中,患病率高达 80%^[1]。近年来我国骨关节病患者数目持续增长,虽与我国进入老龄化的国情有关,也与人们的生活习惯密不可分,不正确的饮食结构,无规律的生活习惯,普遍增长的体重,滥用药物,以及过度运动锻炼等已成为导致骨关节疾病高发的诱因。目前已有确切的研究表明,年龄、性别、民族、地理环境、遗传等因素均与骨性关节炎的发病存在密

基金项目:国家自然科学基金(81172605)

* 通讯作者:王德才,Email:wdc8089@sina.com

切的关系^[2],但是针对我国少数民族人群患骨性关节炎状况的调查研究甚少,因此,本研究选取我国少数民族——鄂温克族人群的血浆为研究样本,应用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)进行 21 种微量元素含量测定,并结合该民族独特的生活规律及饮食习惯分析鄂温克族人群骨性关节炎患者血浆中的微量元素的含量水平以及潜在相关性。

2 资料与方法

2.1 研究对象

2.1.1 资料及样本来源:中国疾病预防控制中心中国地方病中心氟病所,《骨代谢相关基因多态性与饮茶型氟中毒种族差异关系的分子流行病学研究》临床调查表及血浆样本。所有调查人群均签署知情同意书,自愿参加或退出。

本研究以内蒙古鄂温克族自治旗鄂温克族骨性关节炎患者和健康正常人作为研究对象。其纳入标准:美国风湿病学会 1995 年的诊断标准和 X 线诊

断结果。X 线片采用北京朗安公司生产的便携式数字化 X 光机(DR)拍摄,拍摄部位为肘关节和膝关节,X 线诊断由中国疾病预防控制中心地方病控制中心的氟骨症专家和哈尔滨医科大学第二附属医院的骨科专家联合阅片完成。病例组排除标准:在样品采集前一月内用过非甾体抗炎药和环氧合酶抑制剂的患者。健康对照组排除标准:有癌症、糖尿病以及心脏病等代谢性疾病和骨性关节炎的既往病史。

骨性关节炎病例组 35 例,男 15 例,女 20 例,年龄 42 ~ 58 岁,平均年龄(47.8 ± 5.6)岁;对照组 34 例,男 12 例,女 22 例,年龄 40 ~ 67 岁,平均年龄(47.9 ± 8.3)岁。统计学分析,两组年龄无显著性差异,性别组成相近。

2.1.2 饮食习惯:使用统一制定的调查问卷,应用 3 d 24 h 回顾法获个人食物量,用中国居民平衡膳食宝塔(Chinese Balance Dietary Pagoda,简称 CBDP)^[3]评价鄂温克族人膳食模式。结果见表 1。

表 1 鄂温克族人的膳食模式分析(标准人日)

Table 1 Analysis of dietary pattern in Ewenki nationality people (standard person per day).

食物种类 Food	CBDP 中值(g) Median of CBDP (g)	鄂温克族人摄入量(g) Daily intake (g)	差值(g) Differentials (g)	差率(%) Percentage (%)
谷类 Frumentum	400	396.86	-3.14	-0.78
畜禽肉类 Meat	75	247.93	172.93	230.57
蛋类 Egg	38	27.95	-10.05	-26.45
奶类 Milk	200	291.41	91.41	45.70

CBDP 推荐中国成人居民每人每日吃谷类 300 ~ 500 g,畜禽肉 50 ~ 100 g,蛋类 25 ~ 50 g,奶类及奶制品 100 g(相当于鲜奶 200 g)。按 CBDP 中值(相当于标准人)评价,以差值和差率接近零为平衡点,鄂温克族人谷类、蛋类摄入不足,畜禽肉、奶类摄入过量。此外,分析调查问卷可以看出鄂温克族人摄入的蔬菜、水果种类单一,加上鄂温克族人多为牧民,以放牧为生。综合以上结果表明鄂温克族人独特的生活方式和饮食习惯可能导致该民族人群血浆中微量元素的含量水平不同。

2.1.3 样品采集:采用无菌真空负压抗凝采血管采集所有研究对象的晨空腹肘静脉血,置 3 000 r/min 离心,取上层黄色半透明状液体即得血浆样本,分装后, -80℃ 保存,备用。

2.2 仪器与试剂

7700x 型电感耦合等离子体质谱仪(美国 Agilent 科技有限公司)、1A-89 型电感耦合等离子体质谱仪自动进样器(美国 Agilent 科技有限公司)、U410 型 -80℃ 超低温冰箱(美国 NBS 公司)、A10 型 Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)、10 ml 聚四氟乙烯消解管(自制)。

硝酸(优级纯)、双氧水(优级纯)、调谐液(美国 Agilent 科技有限公司)、多元素内标混合液(美国 Agilent 科技有限公司)、21 种元素混合标准溶液(Li、Mg、Al、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr、Mo、Cd、Ba、Tl、Pb;美国 inorganic ventures 公司),所有标准溶液和样品制备过程全部经 Milli-Q 装置纯化的去离子水(>18MΩ·cm)。

2.3 仪器工作条件

安捷伦 7700x 电感耦合等离子体质谱仪(美国

Agilent 科技有限公司),调谐后使仪器氧化物、双电 条件见表 2。
荷、灵敏度、分辨率等指标达到标准。仪器最佳测定

表 2 ICP-MS 最佳操作条件
Table 2 Optimum Operating Conditions for ICP-MS

ICP-MS 工作参数 Operation Parameters	设定值 Set value	ICP-MS 工作参数 Operation Parameters	设定值 Set value
等离子体工作线圈射频功率(W) RF power (W)	1550	提取锥孔 2 电压(v) Extract 2 voltage (v)	-200
载气流速(L/min) Carrier gas flow (L/min)	1.03	Omega bias voltage(v)	-100
采样深度(mm) Sample depth (mm)	7.9	Omega lens voltage(v)	7.4
样品提升速度(rps) Sample uptake rate (rps)	0.1	Octopole bias voltage(v)	-8
提取锥孔 1 电压(v) Extract 1 voltage (v)	4.7	雾化室温度(℃) Spray chamber temperature (℃)	2

注:Omega lens voltage;Omega 偏置电压;Omega lens voltage;Omega 透镜电压;Octopole bias voltage;八极偏置电压

2.4 标准曲线的绘制

移取多元素混合标准溶液(Ca:1 000 μg/ml, Mg:500 μg/ml, Li、Al、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr、Mo、Cd、Ba、Tl、Pb:10 μg/ml)5 ml,超纯水定容至 50 ml,即中间储备液。分别移取中间储备液 0.5 ml、1 ml、2 ml、4 ml、5 ml,超纯水定容至 50 ml,即得 Li、Al、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr、Mo、Cd、Ba、Tl、Pb 等元素浓度分别为 10 μg/L、20 μg/L、40 μg/L、80 μg/L、100 μg/L 的标准系列,其中 Ca、Mg 是其他元素浓度的 100 倍。

在仪器最佳测定条件下,内标溶液通过三通 1:1 在线加入,Bi²⁰⁹、Lu¹⁷⁵、Tb¹⁵⁹、Rh¹⁰³、Ge⁷²、Sc⁴⁵、Li⁶ 作为内标物以校正可能存在的基体干扰和仪器漂移,同时进行样品测定。

2.5 样品处理与测定

从 -80℃ 冰箱中取出冷冻血浆样品,室温解冻,用涡旋振荡器将血浆样品振荡混匀 30 s,移取血浆样品 0.2 ml 于 10 ml 聚四氟乙烯消解管中,加入 0.3 ml HNO₃、0.3 ml H₂O₂ 消解液,将样品消解管密封,置于 130℃ 烘箱中消化 2 h 至溶液澄清透明,取出冷却,移入 5 ml 定量瓶中,用经 Milli-Q 装置纯化的去离子水定容至刻度,待测。

取待测液样品置于电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)仪的自动进样瓶中,自动进样测定 Li、Mg、Al、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr、Mo、Cd、Ba、Tl、Pb 等 21 种微量元素含量。

2.6 统计分析

根据研究目的及样本构成特点,选择参数检验

(独立样本 T 检验)分析病例组与对照组血浆中微量元素含量的差异。采用 SPSS17.0 软件进行分析。

3 结果

3.1 方法的质量控制

3.1.1 方法的定量检出限和相关系数:方法的定量检出限是仪器能够识别并测定分析物中浓度含量的最小数值。本研究采用空白溶液 10 次平行测定值及一定浓度的各元素标准溶液平行测定值计算方法的定量检出限。

ICP-MS 线性范围较宽,一般在 9 个数量级的线性动态范围,考虑到血浆中各微量元素的含量,本实验标准曲线范围除 Ca、Mg 选用 0~10 μg/ml 外,其他元素 0~100 ng/ml。在此标准曲线工作范围内 21 种元素的相关系数和定量检出限见表 3。

表 3 血浆样品中 21 种元素检出限 (DL) 和相关系数(R)

Table 3 Detection limit (DL) and correlation coefficient (R) of 21 types of trace elements in the plasma samples

Name	R	DL(μg/L)	Name	R	DL(μg/L)
Li	0.9998	0.0931	Cu	0.9999	0.1286
Mg	0.9998	0.6426	Zn	0.9961	0.0767
Al	0.9994	0.8392	As	0.9995	0.5583
Ca	0.9998	5.0392	Se	0.9998	0.1297
Ti	0.9998	0.1525	Sr	0.9995	0.0305
V	0.9998	0.0048	Mo	0.9997	0.0118
Cr	0.9999	0.0218	Cd	0.9999	0.0070
Mn	0.9998	0.0121	Ba	0.9993	0.0664
Fe	0.9992	0.5896	Tl	0.9991	0.0026
Co	0.9999	0.0080	Pb	0.9991	0.0372
Ni	0.9994	0.1914			

从表3可见21种微量元素的相关系数均 ≥ 0.9961 ;定量检出限在 $0.0026 \mu\text{g/L} \sim 5.04 \mu\text{g/L}$ 范围。

3.1.2 方法的回收率和精密度:加标回收率测定是实验室确定方法准确性的质量控制手段之一。本研究采用样品加标回收实验进行考察,吸取血浆样品三份,加入21种元素混合标准储备液高、中、低三个浓度,按照本文1.5方法进行6次测定,计算各元素的回收率及相对标准偏差(RSD),结果:21种微量

元素的加标回收率均在 $94.24\% \sim 112\%$ 范围;RSD均 $\leq 4.35\%$ 。显示出较高的准确性和良好的重现性。

3.2 样品测定结果

采用此方法对调查对象病例组和对照组人群血浆中Li、Mg、Al、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr、Mo、Cd、Ba、Tl、Pb等21种元素进行测定,结果见表4。

表4 21种微量元素含量测定结果($\bar{x} \pm s$) ($\mu\text{g/L}$)

Table 4 Results of the measurement of 21 types of trace elements ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

元素 Elements	病例组(n=35) The case group (n=35)	对照组(n=34) The control group (n=34)	P值 P
Li	0.31 ± 0.15	0.27 ± 0.17	0.052
Mg	973.47 ± 121.00	864.93 ± 143.28	0.176
Al	11.86 ± 8.06	12.71 ± 8.15	0.714
Ca	4967.95 ± 943.77	4976.51 ± 1335.85	0.347
Ti	—	—	—
V	—	—	—
Cr	0.56 ± 0.39	0.64 ± 0.43	0.973
Mn	3.91 ± 3.76	3.09 ± 2.85	0.332
Fe	100.72 ± 86.56	77.29 ± 34.45	0.070
Co	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.008
Ni	—	—	—
Cu	50.94 ± 13.03	44.96 ± 11.06	0.223
Zn	32.93 ± 14.85	32.54 ± 18.17	0.636
As	—	—	—
Se	3.04 ± 6.69	2.80 ± 1.16	0.104
Sr	3.21 ± 2.07	2.52 ± 0.909	0.123
Mo	—	—	—
Cd	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.320
Ba	1.95 ± 0.54	1.81 ± 0.66	0.266
Tl	—	—	—
Pb	1.22 ± 1.14	0.94 ± 0.56	0.000

注:—代表未检出;— Not check out

从表4可见:有六种元素(Ti、V、Ni、As、Mo、Tl)低于方法的定量检出限,其他均检出。其中病例组和对照组血浆中钙、镁含量较高,但均低于正常人血浆中钙、镁的含量($10 \sim 11 \text{ mg/ml}$ 、 0.36 mg/ml)。另外检出元素病例组血浆的Al、Ca、Cr、Cd的含量低于对照组;Li、Mg、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Se、Sr、Ba、Pb的含量高于对照组,其中Co和Pb两组间比较有统计学意义($P < 0.05$),其他元素两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 讨论

血浆中微量元素的平衡在维系人体健康方面是不可缺少的。许多疾病的发生发展过程都伴随着微量元素的异常。微量元素在体内的含量与居住的地

理环境、饮食习惯等多因素有关。近年来关于微量元素与骨性关节炎相关性的研究,多集中在汉族内地人群,以及少数几个元素铜、硒、锌和铁等^[4,6]。对于我国少数民族骨性关节炎患者血浆中的微量元素含量分析研究甚少。本文对鄂温克族骨性关节炎患者血浆中21种微量元素进行测定,发现所检出元素的含量普遍高于的正常对照血浆中的含量。这可能与地域及生活饮食习惯有关,鄂温克族主要分布在我国东北黑龙江省讷河市和内蒙古自治区鄂温克自治旗,属游牧民族,牛乳、牛羊肉以及面粉是其主要食物^[7]。

本研究中,我们发现骨性关节炎患者血浆中钴的浓度明显高于健康对照组。钴作为人体的一种必需微量元素,主要参与核酸、胆碱、蛋氨酸的合成以

及脂肪、糖的代谢并以维生素 B₁₂ 的形式发挥着重要的生理作用。关于钴的神经毒性^[8]及生理生化作用的研究虽然有一些,如钴可以降低许多种酶的活性以及降低机体抵抗力甚至激发癌变^[9],但我们很难将钴的生理功能与骨性关节炎患者血浆中钴升高的可能原因联系起来。不过,钴与锌、铜、锰有协同作用^[10],本研究骨性关节炎患者血浆中锰、铜、锌的含量也高于对照组,锰、钴、铜、锌元素过多的蓄积并产生协同作用可加剧基础氧化应激,促进自由基的形成,引起骨组织的损伤和纤维化^[11],进而可能是导致骨性关节炎发生的一个因素。铅对人体健康危害较大,它能够在体内积聚而引起中毒。铅对机体的影响是多系统的,其中就包括骨骼系统。骨骼是铅毒性的重要靶器官系统。铅对骨骼的毒性作用之一是影响钙信使系统而直接干扰骨细胞的功能^[12]。血浆中铅的浓度在骨性关节炎患者中明显升高,并且血浆中钙的含量也低于对照组,说明血浆中铅含量的升高影响了骨骼中钙信使系统,干扰了钙的正常代谢,可能导致骨性关节炎疾病的发生。

采用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定血浆中 Li、Mg、Al、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr、Mo、Cd、Ba、Tl、Pb 等 21 种微量元素,方法准确度高,重现性好。鄂温克族骨性关节炎患者血浆中有 6 种元素(Ti、V、Ni、As、Mo、Tl)的测定含量低于方法的定量检出限;其余 15 种元素均检出。病例组血浆中 Co、Pb 元素的含量高于对照组,并且两组之间统计学有显著差异,表明 Co、Pb 元素水平与骨性关节炎的发病存在潜在相关性。

【参 考 文 献】

[1] Ren Li-min. Talk about prevention and control of older osteoarthritis [J]. Every One is Well, 2011, 7: 21. (in Chinese)

- [2] Wang Xin-jun, Shen Ming-qiu, Liu Jun-chang, et al. The present situation of the causes of knee joint osteoarthritis research [J]. Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2011, 29(3):77-79. (in Chinese)
- [3] Ge Ke-you, editor-in-chief. The nutritional sciences of China [M]. Bei Jing: People's Medical Publishing House. 2004. 1262-1266. (in Chinese)
- [4] Yazar, M., et al. Synovial fluid and plasma selenium, copper, zinc, and iron concentrations in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. Biol Trace Elem Res, 2005, 106(2): 123-132.
- [5] Krachler, M., W. Domej. Clinical laboratory parameters in osteoarthritic knee-joint effusions correlated to trace element concentrations [J]. Biol Trace Elem Res, 2001, 79(2): 139-148.
- [6] Krachler, M., W. Domej, K. J. Irgolic. Concentrations of trace elements in osteoarthritic knee-joint effusions [J]. Biol Trace Elem Res, 2000, 75(1-3): 253-263.
- [7] Bao Yu, Yi Le-tai. Characteristics of Ewenki health care culture [J]. Journal of Medicine & Pharmacy of Chinese Minorities, 2012, 18(12): 75-76. (in Chinese)
- [8] Li Peng, Ding Da-lian, Zeng Xiang-li, et al. Neurotoxicity and Ototoxicity of Cobalt [J]. Chinese Journal of Otology, 2015, (1): 57-63. (in Chinese)
- [9] Humans IWGoEoCRt. Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans/World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 2006, 86: 1.
- [10] Wu Mao-jiang. Cobalt and human health [J]. Studies of Trace Elements and Health, 2013, 30(4): 61-62. (in Chinese)
- [11] Luo Hai-ping, Geng Pai-li. Transport of iron and copper element and disease [J]. Foreign medical (medical geography booklet), 2002, 23(4): 163-166. (in Chinese)
- [12] Zhang Xiao-feng. The relationship of Pb and human health [J]. Journal of Mathematical Medicine. 2004, 17(5): 473-474. (in Chinese)

(收稿日期: 2015-10-20)