

拉曼光谱用于关节软骨和骨关节炎的研究进展

马丹英, 赵 远, 尚林伟, 朱勇康, 符娟娟, 陆燕飞, 尹建华*

南京航空航天大学生物医学工程系, 江苏 南京 210016

摘要 骨关节炎是由多种因素引起的慢性退行性关节疾病,严重影响患者的肢体功能和日常生活,是影响人类健康最常见的关节疾患之一。当骨关节炎发展到一定程度时,形成不可逆疾病。因此,骨关节炎的及时检测和诊断是至关重要的。拉曼光谱在分子水平上显示出微创、无标记和客观诊断的潜力,因此越来越多的被用于骨关节炎的研究。在目前本领域流行研究的基础上综述了拉曼光谱在关节软骨和骨关节炎研究中的创新性研究成果和进展,并简要分析了目前国内外拉曼光谱技术应用的部分局限性以及未来的发展方向。全文所述分别基于不同拉曼测量模式即宏观拉曼、显微拉曼、光纤拉曼三种拉曼光谱技术,检测在骨关节炎发展中关节软骨等组织中的细胞外基质、细胞周围基质、以及软骨细胞中蛋白质、脂质、核酸成分等的变化,甚至关联的软骨下骨和滑液的主要成分变化及其对应的部分骨关节炎特征或生理功能的变化。该综述表明拉曼光谱检测骨关节炎组织成分变化的有效性和可行性,可为骨关节炎的后续研究提供参考。另一方面,拉曼光谱技术诸多的检测和诊断优势,特别是不受水影响的特征,使其非常有潜力发展为本领域临床早期诊断和康复监测的有力的分子光谱技术和临床工具。

关键词 拉曼光谱;骨关节炎;关节软骨

中图分类号: O433

文献标识码: R

DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)07-2029-06

引言

软骨是人和动物体内重要的结缔组织,由软骨细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)构成。软骨细胞是一种代谢活性细胞,能合成和转换大量的ECM成分,如胶原、蛋白多糖(proteoglycans, PG)和透明质酸(hyaluronic acid, HA)。软骨细胞所处的化学和机械环境都会影响其代谢活动。人体中的关节透明软骨有承受负荷、减少关节间骨骼摩擦等重要功能,也因此而易被消耗磨损。在健康的成人软骨中,软骨细胞处于合成和分解代谢相对平衡的稳定状态,而在炎症、创伤及其他病理因素引起的软骨损伤中,这种稳定状态被打破,分解、代谢水平上调,最终导致关节失用。关节软骨由于自身修复能力极差,在长期负荷运转中一旦受到异常应力、机械创伤等损伤,往往逐渐引起软骨退变及关节其他组分病变,诱发骨关节炎(osteoarthritis, OA)。ECM主要由胶原纤维、蛋白多糖、水三部分组成,通过它们之间的有机结合,使软骨具有传递负荷、润滑关节等功能。健康的ECM主要由II型胶原组成,其为组织提供拉伸支撑,而在病

变ECM中I型胶原蛋白含量增加,II型胶原蛋白含量减少,并且在OA期间,聚集蛋白聚糖含量降低,而胶原蛋白含量增加。ECM成分的这种变化使组织易于发生机械损伤。因此,OA的进展可以通过ECM的组成和结构的变化来表征。

OA也称退行性骨关节病,是一种复杂的肌肉骨骼疾病,好发于负重较大的膝关节、髋关节等部位。随着社会人口的老齡化,该病的发生率越来越高,高于10%的60岁以上的老人都忍受着该疾病的折磨^[1]。在OA的第一阶段,生化、机械因素会引起关节软骨表层(如胶原变性)、滑膜液(如润滑剂含量下降)的轻微改变。这些变化增加了软骨之间的摩擦系数,并开始磨损。随着疾病的发展,软骨变薄,导致骨骼压力增加。随后,更多的滑膜液(synovial fluid, SF)被分泌,导致关节肿胀,疼痛和炎症。软骨下骨增厚,软骨表面粗糙并产生不规则骨赘。在这一阶段,随着摩擦系数的进一步增大,软骨退变会导致机械性能的退化。在最后的疾病阶段,软骨严重受损,软骨下骨出现裂缝。

在过去的关节软骨研究中,人们常用的测试手段有生物化学分析^[2],磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)^[2]、生物力学测量^[3]和各种形式的显微技术。生物化学

收稿日期: 2019-06-18, 修订日期: 2019-10-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(61378087), 江苏省“六大人才高峰”计划项目(SWYY-034)资助

作者简介: 马丹英, 1996年生, 南京航空航天大学自动化学院硕士研究生 e-mail: 1322014771@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: yin@nuaa.edu.cn

和生物力学手段能探测大块组织或者较厚的平行切片,但不能获得高分辨率成像和进行微量样本浓度含量的测量。通常,大多数显微技术(如光学显微镜、扫描和透射显微镜)和 CT 技术仅用于研究组织的超微结构和形态,但不能同时得到分子浓度信息。MRI 是 OA 研究中一种主要的评估方式,临床较好的 MRI 可以在大约 $100\sim 300\ \mu\text{m}$ 的空间分辨率^[4]的基础上实现软骨的解剖定义,在一定程度上对软骨中水合作用和主成分含量评估进行补充。但 MRI 只能测量软骨的 PG 含量,不能同时探测胶原蛋白的含量分布,且分辨率不高。以上这些技术手段均为人们提供了重要诊断和发病过程信息,但它们却都不能给出 ECM 成分在分子水平的结构及构成。

在关节软骨和 OA 的研究中,傅里叶变换红外光谱(FT-IR)可以同时获取有关分子的生化组成和化学环境的信息,并能有效地反映胶原蛋白和 PG 在健康和病变软骨中的分布情况,但其易于受到水的影响、成像技术则囿于组织切片的样品限制。同为分子振动光谱,拉曼光谱技术则可以对未固定的、水化的组织样品进行成像,也不需要复杂的样品制备,并且能有效的避免化学固定伪影。因此,拉曼光谱技术被越来越多被用于关节软骨和 OA 的研究中。

拉曼光谱技术是一种非侵入的光谱技术,其原理是基于样品分子振动所引起的非弹性散射,不同物质分子有不同的振动和转动能级,因而在光谱上有特定的位置分布,光谱峰值强度则代表该物质相对含量。拉曼光谱测量过程中不需要对组织进行标记或染色,因此,拉曼光谱能直接提供被测样品的分子信息,并且样本细胞不会由于外部标记物的作用而变性^[5]。拉曼光谱由于其出色的光谱分辨率,对新鲜组织分析的适用性以及与其他技术相比较短的数据采集时间,已成为化学、物理学、生物学、医学等交叉学科领域卓有成效的研究手段。拉曼光谱成像是基于样品的拉曼光谱生成的伪彩图像,能直观的反映样本的成分和结构,能显示普通光学显微镜下观察不到的化学成分分布,因此,拉曼光谱成像在生物医学等很多不同领域更是非常有价值的技术。

因此,拉曼光谱技术在分子水平上显示出微创、无标记和客观诊断的潜力,使其有利于对软骨、软骨下骨、滑膜液等生化成分及其浓度含量变化等进行研究,并可根据拉曼峰值的强度提供精确的定量描述。拉曼光谱还能识别 OA 不同阶段蛋白质、脂质和核酸含量的相对变化,有助于从细胞水平探讨 OA 的发病机制,为 OA 的早期临床诊断奠定了基础。本文针对当前几种不同拉曼光谱技术在关节软骨和 OA 方面的创新性研究成果进行综述。

1 宏观拉曼在关节软骨和骨关节炎研究中的应用

宏观拉曼技术是直接利用拉曼光谱仪测量样品的拉曼光谱,不耦合显微镜等其他仪器,属自由拉曼模式。除了金属与合金材料,固体、液体、气体、胶体都可以使用宏观拉曼进行分析。

Mangueira 等^[6]试图用拉曼光谱提供的光谱信息阐明低

能量激光治疗(LLLT)对受损软骨的影响,通过主成分分析(PCA)表征激光治疗后损伤软骨上的拉曼特征。他们发现,LLLT 能刺激软骨修复和胶原合成的细胞活动,并刺激成纤维细胞合成修复 III 型胶原蛋白,表明 LLLT(主要在 $660\ \text{nm}$)能促进 OA 软骨修复。

为了使激发光透过软骨直接探测到软骨下骨,高浩等^[7]采用拉曼光谱技术结合组织光透明技术来研究软骨组织的光透明效果。采用磷酸基团与酰胺 I 带积分面积比值来定性表征软骨内矿物质与有机组分的变换及光透明效应。他们发现,相比于无透明剂情形,碘海醇、甘油两种透明剂均使该强度比信号增强。在同一时间范围内,甘油和碘海醇分别在 60% 和 $150\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下能获得较好的透明效果;而在不同浓度下,甘油的透明效果均在 $20\ \text{min}$ 最强,而碘海醇的透明效果一般是在 $50\ \text{min}$ 后开始增强。

Vardaki 等^[8]利用拉曼光谱扫描人类股骨头,研究关节软骨与软骨下骨之间的化学差异。他们发现,非矿化软骨中不存在矿物质带,还检测到软骨(II 型胶原)和骨(I 型胶原)中两种胶原蛋白二级结构的显著差异。另一方面,在骨关节炎中软骨并不表现出明显拉曼光谱的变化,但可以观察到钙化现象和板层厚度减少。

Lim 等^[9]利用偏振拉曼光谱探测受不同压力冲击的猪胫骨软骨早期生化组成和方向变化。平行偏振条件下,吡喃糖环拉曼带在 $1\ 126\ \text{cm}^{-1}$ 处显著降低表明早期损伤软骨中糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)含量降低,这是早期骨关节炎的标志。因此,在平行偏振条件下,可利用平均吡喃糖环拉曼带强度将对照组与受冲击组分开。此外,受冲击组中显示平行偏振光谱中 $856\ \text{cm}^{-1}$ (脯氨酸)与 $875\ \text{cm}^{-1}$ (羟脯氨酸)的平均拉曼带面积比值显著降低($p<0.05$),该比值的提示提示胶原螺旋稳定性可能受到冲击的影响。利用该面积比区分对照组与实验组,灵敏度为 95% ,特异性为 88% 。在撞击后,酰胺 III 在垂直偏振拉曼光谱中,拉曼带表现出从 $1\ 264\sim 1\ 274\ \text{cm}^{-1}$ 的蓝移。与对照组 $1\ 268\ \text{cm}^{-1}$ 处的单峰相比,受冲击组酰胺 III 拉曼谱带在 $1\ 264$ 和 $1\ 274\ \text{cm}^{-1}$ 处表现为双峰,表明酰胺 III 振动受到抑制,反映了胶原纤维中 C—N 振动可能被抑制。垂直偏振拉曼带中也观察到酰胺 III 带的一个小分裂,表明偏振拉曼信号来自于软骨表层和深层受影响的羰基。表 1 列出了关节软骨及下骨中大部分主要拉曼带的特征分配,这有利于人们进一步理解软骨和下骨在 OA 前后的分子变化机制。

Takahashi 等^[10]也专注于关节软骨的拉曼光谱中的酰胺 III 带,首次将酰胺 III 带比($I_{1\ 241}/I_{1\ 269}\ \text{cm}^{-1}$)应用于人体关节软骨的分析。从健康到疾病状态,位于 $1\ 241\ \text{cm}^{-1}$ 的酰胺 III 带的强度显著增加。Dehring^[11]等也观察到了这一光谱变化趋势。值得注意的是, I 级 OA 到 II 级 OA,酰胺 III 比率显著增加,表明人类膝关节软骨的微结构变化也发生在 OA 的早期阶段。酰胺 III 带比($I_{1\ 241}/I_{1\ 269}$)可以被认为是关节软骨的胶原二级结构无序程度的标志。

胶原微观结构的快速退化是 I 级 OA 和 II 级 OA 之间的一个重要特征,其引发软骨表面的不可逆损伤并最终导致 III 级和 IV 级的更严重的 OA 状态发生。这一结果表明化学、机

械和环境因素都会导致人体软骨的微观结构的改变和退化。最近的研究证实^[13], 随着 OA 进展, 由于润滑素浓度降低, 摩擦系数显著增加, 特别是在软骨内侧区域。此外, 与 I 级 OA 相比, II 级 OA 的表面粗糙度明显增加, 导致接触处局部摩擦力增加, 润滑剂快速减少。

表 1 关节组织中典型的拉曼谱峰归属表^[9, 16, 19-21, 24-25, 29]

Table 1 Characteristic Raman bands and assignments of joint tissues^[9, 16, 19-21, 24-25, 29]

波数/cm ⁻¹	归属
785	核酸
856	C—C 脯氨酸
875	C—C 羟(基)脯氨酸
958	PO ₄ ³⁻ 对称伸缩振动
1 004	苯(基)丙氨酸
1 060	B 型碳酸盐
1 060	反映有机基质的酰胺 III 带
1 063	SO ₄ ²⁻ 糖胺聚糖中硫酸盐对称拉伸
1 070	CO ₃ ²⁻ 拉伸
1 126	吡喃糖环
1 235	酰胺 III, β-折叠蛋白
1 260	酰胺 III, α-螺旋蛋白
1 301	脂质中 CH ₂ 变形
1 375	PG 振动
1 375	CH ₃ 糖胺聚糖
1 655	酰胺 I, α-螺旋蛋白
1 670	酰胺 I, β-折叠蛋白
1 744	C=O 拉伸, 脂质
2 840	CH ₂ 对称拉伸, 不饱和脂肪酸

2 显微拉曼在关节软骨和骨关节炎研究中的应用

显微拉曼是拉曼光谱与显微镜的结合, 可以在获取拉曼光谱图像的同时, 提供关于生化成分的空间分布信息。拉曼光谱仪与光学显微镜的耦合具有比红外光谱成像更好的空间分辨率。通过使用电动显微镜载物台, 可以从任意点收集拉曼光谱, 获得样品的拉曼图谱, 并利用计算机处理所获得的高光谱数据集, 以生成、显示组织中存在的化学物质分布的图像。

为了验证拉曼光谱识别 OA 软骨下骨基质中异常分子变化的可行性, Kerns 等^[13]采用显微拉曼光谱、电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)和化学分析方法对人工关节样本进行分析。比较 OA 样本与非 OA 样本中的膝关节外侧谱带, 发现在 850 和 910 cm⁻¹ 处的谱带, 以及 963 和 956 cm⁻¹ (磷酸盐带) 存在差异。比较两组样本膝关节的内侧谱带, 发现在 944 和 953 cm⁻¹ (磷酸盐带), 1 275 cm⁻¹ (酰胺 III 带) 和 1 650 cm⁻¹ (横跨酰胺 I 的宽区域) 中存在差异。表明 OA 和非 OA 组织可以根据膝关节外侧和内侧区之间的光谱差异进行鉴别。拉曼光谱的磷酸盐与酰胺的比率与 CT 扫描结果表明, OA 期间, 软骨下骨不仅变厚, 还发生生化成分

的变化。在 OA 标本中, 还发现正常区域的外侧也发生相关的光谱变化, 表明整个关节受到影响。虽然该区域没有表现出 OA 的宏观症状, 但它表现出微小的变化, 暗示着 OA 的早期征象。

2012 年, Buchwald 团队^[14]应用显微拉曼技术, 对海绵骨和软骨下骨 ECM 的生化成分进行研究。实验观察到, 在不同载荷的股骨头部位, 羟基磷灰石与胶原、碳酸盐磷灰石与羟基磷灰石、α-螺旋与 β-折叠面积的比值无明显变化, 表明载荷的增加不会引起软骨下骨成分和结构的改变。他们还发现, 与对照组相比, OA 患者的软骨下骨矿化程度较低, 胶原基质排列有序性也相对较低, 并且随着 OA 疾病的进展, α-螺旋结构向无序结构转变的程度进一步增加。结果表明, 在 OA 中, 生物化学因素对软骨下骨的生化组成和分子结构的影响大于机械因素。

Pudlas 研究组^[15]利用显微拉曼光谱对人和猪关节软骨的 PG 含量及软骨分区进行了详细研究。脯氨酸振动谱带在表层区域获得更高的信号强度。但是, 硫酸软骨素(CS)、聚集蛋白聚糖以及 GAG 的拉曼谱带, 在深区显示出更高的信号强度。这些发现表明, 在软骨表层, 以胶原蛋白含量为主, 在软骨深部区域, 以 PG 和 GAG 含量为主。因此, 显微拉曼可根据蛋白质, PG 和 GAG 含量的差异来鉴定人和猪软骨的不同区域。

Gamsjaeger 团队^[16]也鉴定了表征 PG 的拉曼谱带, 并通过拉曼成像和层次聚类分析测试这些谱带在软骨和骨组织中的适用性。PG 振动产生 1 060 和 1 375 cm⁻¹ 的两条拉曼谱带。拉曼光谱分析发现酰胺 III 带、B 型碳酸盐带以及羟基磷灰石的磷酸盐带与 PG 的 1 060 cm⁻¹ 拉曼谱带重叠, 而 1 375 cm⁻¹ 拉曼谱带仅由 GAG 振动引起的。他们还发现 1 375 cm⁻¹ 拉曼谱带与组织取向无关, 因此, 1 375 cm⁻¹ 可用作软骨和骨中的 PG 标记谱带。

Albro 团队^[17]将拉曼光谱成像结合多元曲线分辨(MCR)定量测定软骨 ECM 组分(GAG、胶原和水)在动物关节软骨和工程软骨组织中浓度分布。分析动物关节软骨的拉曼光谱发现, GAG 和胶原浓度随着软骨的深度增加而增加, 而工程软骨的 GAG 和胶原浓度随着软骨的深度增加而降低, 经酶处理的软骨外植体的 GAG 浓度随着离外植体表面的深度距离的增加而增加, 但胶原的浓度基本不变, 生化测定显示类似的深度梯度。拉曼光谱还发现, 水的浓度随着离关节面的距离增加而降低。动物关节软骨对 GAG 和胶原均表现出较低的组织异质性, 工程软骨的组织异质性较高, 并且周围区域比中心区域进一步增加。

2017 年, Tong 等^[18]采用显微拉曼光谱法对猪软骨磨损样本和健康样本进行切片检测来表征磨损试验后 ECM 的全深度变化。他们发现早期软骨损伤的显著差异主要出现在软骨中上区, 这表明损伤不仅发生在表面, 也发生在表面以下。PCA 结合单变量分析表明, 在某些深度(相对于软骨表面 20%~30%)的胶原蛋白含量损失是磨损期间的主要变化, 胶原纤维取向和 PG 含量均未发生明显改变。

Mansfield 等^[19]将受激拉曼散射(SRS)应用于未染色的新鲜马掌指关节, 研究 ECM、细胞周围基质、软骨细胞和脂

滴的成分。ECM 在 $2\ 800\sim 3\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 范围的自发拉曼光谱分析显示, ECM 中以胶原含量为主, 蛋白多糖含量次之。SRS 光谱显示非钙化软骨的拉曼光谱主要由 II 型胶原的峰主导。在骨和钙化软骨中, 发现 $959\ \text{cm}^{-1}$ 处存在非常强的磷酸盐拉曼带, $1\ 070\ \text{cm}^{-1}$ 处存在较弱的碳酸盐拉曼带, 表明 SRS 还能对软骨的矿物质含量进行成像。在浅表软骨细胞的周围基质中还存在 $2\ 840\ \text{cm}^{-1}$ 拉曼谱带, 表明细胞周围基质中存在脂质, 并且为不饱和脂肪酸, 但 ECM 中不存在。拉曼成像揭示了浅表区和深部区域之间的差异, 最明显的是, 仅在浅表区域中细胞周围可检测到脂质。

Kumar 等^[20-21] 利用显微拉曼鉴定 OA 进程中生物分子变化的光谱特征和 OA 不同阶段的主要光谱差异。他们发现 $1\ 612\sim 1\ 696\ \text{cm}^{-1}$ (酰胺 I)、 $1\ 229\sim 1\ 300\ \text{cm}^{-1}$ (酰胺 III) 和 $1\ 001\sim 1\ 007\ \text{cm}^{-1}$ (苯丙氨酸) 的面积大小随着 OA 等级的增加而一致降低, 并且观察到细胞死亡的增加。在 OA 进程中, 软骨细胞内蛋白质含量普遍下降, 但 PG 含量的降低仅在 OA 晚期才显著。酰胺 III 强度比 ($I_{1\ 245}/I_{1\ 270}$) 随着国际软骨修复协会 (ICRS) 分级的增加而增加, 这意味胶原蛋白的紊乱程度随着 OA 的进展而进一步增加。此外, 随着细胞内核酸含量 ($780\sim 794\ \text{cm}^{-1}$) 的减少, 蛋白质含量也随之减少。PCA 和交叉验证能够鉴定 OA 软骨细胞的不同阶段, 发现 I 级 OA 软骨中获得的软骨细胞的分类精度高于其他级别。分类错误主要发生在 II 级和 III 级软骨细胞之间, 表明与 I 级 OA 软骨相比, II 和 III 级 OA 软骨细胞在生化成分上有更高的异质性。

Kunstar 等^[22] 利用胎儿股骨的关节软骨, 验证在无标记情况下, 显微拉曼光谱是否能有效的区分软骨样本中的不同组织成分。层次聚类方法分析拉曼光谱, 结果显示, 软骨细胞存在 $1\ 576\ \text{cm}^{-1}$ 处的 DNA/RNA 谱带, 而 ECM 中不存在该谱带, 这证实了软骨细胞和 ECM 可以根据拉曼光谱进行有效的分离。除了 $1\ 576\ \text{cm}^{-1}$ 谱带的差异外, 还发现 PG 峰在 ECM 中的峰值更强。主成分分析细胞聚类平均值, 发现软骨细胞与胎儿股骨生长面细胞之间的差异主要来源于细胞内蛋白质含量的不同。对 ECM 聚类均值的主成分分析, 发现软骨成骨 ECM 与其他部位的差异主要来源于磷酸盐含量的不同。

Bonifacio 等^[23] 采集猪肱骨肩胛关节软骨的拉曼光谱, 研究软骨组织中软骨细胞与 ECM 的光谱差异。分析 CS 和胶原蛋白的平均拉曼光谱发现 PG/胶原蛋白比值在深层高于浅表区。拉曼光谱的单变量分析发现 CS 在软骨细胞周围基质中有较高的浓度, 而胶原蛋白在 ECM 或区域间基质中最密集。四种多变量方法都能有效的区分软骨细胞与 ECM, 并且检测到 ECM 中主要由 PG 和胶原蛋白组成。但 PCA 能以较低的计算量有效地区分软骨细胞和 ECM, CS 和胶原蛋白。PLSR 模型可以区分 α -螺旋蛋白和 β -折叠蛋白, 可以观察到软骨细胞中含有更丰富的 α -螺旋蛋白, 而 β -折叠蛋白同时存在于软骨细胞和 ECM 中。层次聚类分析、模糊聚类分析发现 ECM 存在异质性, 即不同的区域的 ECM 具有不同的特性, 这清楚地显示了在 ECM 中胶原蛋白/PG 的比值的变化。

Esmonde-White 等^[24-25] 将液滴沉积结合拉曼光谱技术, 检查 40 名膝关节炎患者的关节滑液, 识别与膝关节 OA 损伤相关的关节滑液中的化学变化, 并且利用损伤关节的 X 射线评估拉曼光谱的有效性。SF 收集的光谱中, 损伤组中 $1\ 235/1\ 260\ \text{cm}^{-1}$ (酰胺 III 比率) 和 $1\ 670/1\ 655\ \text{cm}^{-1}$ (酰胺 I 比率) 显著增加, 表明蛋白质二级结构无规卷曲的程度更高, 蛋白质的无序性增加, 进一步表明 SF 大分子之间相互破坏。比较样本 $1\ 080/1\ 001\ \text{cm}^{-1}$ 拉曼带强度比, 发现损伤组中该谱带的强度比显著升高, 表明 OA 损伤的过程中, 蛋白质骨架发生改变。拉曼光谱对蛋白质二级结构中的酰胺比率的变化极其敏感, 酰胺 I 拉曼带强度比、 $1\ 080/1\ 001\ \text{cm}^{-1}$ 拉曼带强度比可用于评估 OA “是/否” 损伤, 并且两个比率随着 K/L 得分而增加, 并显示出一定的线性变化。

Dehring 等^[26] 通过检测 SF 中透明质酸的拉曼光谱来验证表面增强拉曼光谱 (SERS) 用于体外 OA 生物标志物检测的可行性。他们发现, 不论是人造的 SF 还是犬的 SF, 在低浓度的 HA 下, 都能有效的检测到 HA, 并且发现其最低检出阈值为 $0.5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 接近病理性 SF 中的 HA 浓度。也说明了 SERS 技术用于组织液检测的潜力和可行性。

3 光纤拉曼在关节软骨和骨关节炎研究中的应用

光纤拉曼是在常规拉曼光谱仪上耦合光纤探针, 利用探针检测收集组织样本的拉曼光谱。光纤探针主要由激发光纤和收集光纤构成, 其中激发光纤将激光传输至目标区域, 再通过收集光纤将拉曼散射收集传输到检测器。光纤拉曼探针的引入使得基于拉曼光谱的人体体内组织的在体原位检测成为可能。

2013 年, Buckley 等^[27] 使用三种不同的多元技术 (带目标熵最小化 (BTEM)、多元曲线分辨和并行因子分析 (PARAFAC)) 来处理光纤拉曼光谱数据, 并比较三种技术的处理性能。这三种技术均能准确地重建磷酸盐与碳酸盐的比值, 每种分析的误差均小于 2%, 但 PARAFAC 最接近测定的矿物与胶原的比值。因此, 使用 PARAFAC 能够解决较复杂的矿物质与胶原的比值 (复杂程度取决于软组织层和骨中的胶原蛋白), 并且有足够的准确性来检测与骨关节炎、骨质疏松和成骨不全相关的成分差异。虽然不可能通过直接测量志愿者的骨骼来验证, 但这些数据与来自尸体组织的胫骨骨膜拉曼光谱吻合得很好。

2017 年, Stevens 等^[28] 将近红外光纤拉曼光谱结合组织工程 (TE) 技术, 进行在线监测并量化软骨构建过程中活细胞组织中的 ECM 成分含量变化。实验中发现动物关节软骨和 TE 构建软骨在不同时间点的平均拉曼光谱标准差表现出高度可重复性的特征, 具有微妙的生物分子可变性, 而且随着 ECM 沉积的积累, TE 构建软骨的生物分子组成逐渐变得与动物关节软骨更为相似。随着时间的推移, TE 构建软骨的光学性质不会因为激发和散射拉曼光子的穿透深度和收集效率的改变而导致生化定量改变。结构力学性能与 GAG 和胶原含量密切相关, 表明 ECM 生化指标可以作为工程软骨

组织力学完整性的可靠指标。

Esmonde-White 等^[29]利用光纤拉曼光谱对人关节组织进行了检测,重点研究了软骨下骨生化成分的变化。设计了一种钢笔式的光纤探针,用于检测膝关节组织中的软骨下骨。探针的外环中有激发光纤,内环中有收集光纤,其中收集光纤与激发光纤在空间上偏移,可以最大限度地收集关节组织信号。从这些探针中收集到的拉曼光谱主要由软骨和软骨下骨信号组成,存在少量脂肪信号。实验中发现, $1\ 063\ \text{cm}^{-1}$ 拉曼带是软骨中硫酸化 GAG 特有的拉曼带,可作为软骨的光谱标记物。碳酸磷灰石矿物骨特有的拉曼带在 958 和 $1\ 070\ \text{cm}^{-1}$ 处,对应于磷酸盐 ν_1 和碳酸盐 ν_1 ,可作为骨的光谱标记物。 $1\ 301$ 和 $1\ 744\ \text{cm}^{-1}$ 的谱带是脂质独有的,归因于松质骨中的骨髓脂质,作为松质骨的光谱标记物。完整软骨的拉曼光谱显示软骨和骨发出的信号,并且有少量的松质骨信号,但其贡献最小。与显微光谱相似, $1\ 200\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ 处有明显的重叠现象,因为软骨中的 II 型胶原和骨中的 I 型胶原具有相似的拉曼光谱。局部性病灶的光谱包含软骨的信号,和更强烈的磷酸盐 ν_1 信号,并且在 $1\ 072\ \text{cm}^{-1}$ 出现碳酸盐的谱带,表明软骨下骨的贡献强于软骨的信号。全深度腐蚀区域的拉曼光谱中,未观察到 $1\ 063\ \text{cm}^{-1}$ 的谱带,表明该区域只包含来自软骨下骨的信号。通过计算组织模型 $1\ 063/958\ \text{cm}^{-1}$ 拉曼带强度比发现,拉曼光谱信号与组织的散射水平有关,并且进一步证实可使用 $1\ 063/958\ \text{cm}^{-1}$ 比率作为软骨与骨的相对含量的光谱标记。人体关节和组织模型的测量表明,使用光纤探针在关节面采集的拉曼光谱包含了底层骨组织的贡献,骨信号随软骨厚度和散射水平的变化而变化。

目前也有一些关于光纤拉曼用于骨的研究报道。Schulmerich 等^[30]将拉曼光谱结合光纤探针准确无创地评估了活体小鼠皮肤下的骨组织成分,并采用多因素分析从经皮测量中恢复骨光谱。Maher 等^[31]将空间偏移拉曼光谱结合光纤探针进一步进行骨的非侵入性体内测量,准确预测样本的骨折状况。本课题组将内窥镜与光纤拉曼相结合,设计了一种可内窥光纤拉曼探针。该探针的整体设计思路是在尽量减小光

纤探针直径和体积的前提下,实现内窥成像与拉曼光谱的在体检测一体化。文献报道的现有的光纤拉曼探针则是将其放置于内窥镜器械通道,在内镜检查时进行拉曼检测,因此该类光纤拉曼探针尺寸受器械通道空间尺寸限制,而一体化设计的内窥成像与拉曼光谱相融合,探针直径将不再受限,使得探针适用于更多应用环境。

4 结论与展望

精确的原位探测及在高空间分辨率下主成分含量分布和结构排列变化探测,越来越成为各种软骨和 OA 研究中的硬性要求。拉曼光谱能以较高的灵敏度和特异性检测 OA 进程中关节软骨、软骨下骨、SF 中的生化成分的变化以及浓度分布,能根据光谱特性鉴定 OA 的不同阶段(即 ICRS 分级^[20]),评估不同方法手段对 OA 的诊疗效果,区分样本中的不同组织。即使是在疾病早期,也能在微米级水平提供各组织的生物分子变化^[32]。拉曼光谱峰值的强度与物质分子的浓度成正比,因此可对待测样本定量分析。在测量样本前,也不需要复杂的样本制备。

目前为止,现有宏观及显微拉曼系统体积较大,主要用于对生物的体外和离体(切片)组织的拉曼光谱采集,无法进行在体(活体内)生物组织拉曼检测。因此拉曼光谱仍多局限于实验室环境,直接应用于 OA 临床监测和诊断仍有较大难度。另一方面,由于 OA 病因及发病机制尚不明确,早期 OA 组织生化成分之间的关系也需要进一步的探索。

随着拉曼光谱技术的日益完善,越来越多的创新性研究成果被发现。特别是微型拉曼光纤探针的研制,将使得拉曼光谱从原先的实验室研究走向临床,使得基于拉曼光谱的人体内组织的在体原位检测成为可能。光纤探针整体体积小、高度灵活,更加适用于生物在体拉曼检测,开发新的内窥光纤拉曼探针,将为推进关节软骨和 OA 的诊断研究有着重要意义。

References

- [1] Sun Y, Responde D, Xie H, et al. *Tissue Engineering C*, 2012, 18: 215.
- [2] Zheng S, Xia Y, Bidthanapally A, et al. *Magn Reson Imaging*, 2009, 27: 648.
- [3] Huyghe J M, Wilson W, van Donkelaar C C. *Biomech Model Mechanobiol*, 2007, 6: 43.
- [4] Bhargava R, Levin I W. *Spectrochemical Analysis Using Infrared Multichannel Detectors*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2005.
- [5] Dittrich P, Jakubowski N. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, 406: 6957.
- [6] Manguiera N M, Xavier M, de Souza R A, et al. *Photomed. Laser Surg.*, 2015, 33: 145.
- [7] GAO Hao, ZHAI Ming-yang, SHANG Lin-wei, et al(高浩,翟明阳,尚林伟,等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2018, 38(8): 2425.
- [8] Vardaki M Z, Papachristou D J, Orkoulas M G, et al. *Raman Spectroscopy of Articular Cartilage and Subchondral Bone on Osteoarthritic Human Femoral Heads*. Panhellenic Chemistry Congress, 2011.
- [9] Lim N S J, Hamed Z, Yeow C H, et al. *J. Biomed. Opt.*, 2011, 16: 017003.
- [10] Outerbridge R E. J. *Bone Joint Surg. Br.*, 1961, 43(4): 752.
- [11] Karen A Dehring, Nicole J Crane, Abigail R Smukler, et al. *Appl. Spectrosc.*, 2006, 60: 1134.
- [12] Teeple E, Elsaid K A, Fleming B C, et al. *Journal of Orthopaedic Research*, 2008, 26(2): 231.
- [13] Kerns J G, Gikas P D, Buckley K, et al. *Arthritis & Rheumatology*, 2014, 66: 1237.

- [14] Buchwald T, Niciejewski K, Kozielski M, et al. *J. Biomed. Opt.*, 2012, 17: 017007.
- [15] Pudlas M, Brauchle E, Klein T J, et al. *J. Biophotonics*, 2013, 6: 205.
- [16] Gamsjaeger S, Klaushofer K, Paschalis E P. *J. Raman Spectrosc.*, 2014, 45: 794.
- [17] Albro M B, Bergholt M S, St-Pierre, et al. *NPJ Regenerative Medicine*, 2018, 3: 1. doi: 10.1038/s41536-018-0042-7.
- [18] Tong L, Hao Z, Wan C, et al. *J. Biophotonics*, 2018, 11: e201700217.
- [19] Mansfield J, Moger J, Green E, et al. *J. Biophotonics*, 2013, 6: 803.
- [20] Kumar R, Grønhaug K M, Afseth N K, et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, 407: 8067.
- [21] Kumar R, Singh G P, Grønhaug K M, et al. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16: 9341.
- [22] Kunstar A, Leijten J, van Leuven S, et al. *J. Biomed. Opt.*, 2012, 17: 116012.
- [23] Bonifacio A, Beleites C, Vittur F, et al. *Analyst*, 2010, 135: 3193.
- [24] Karen A Esmonde-White, Gurjit S Mandair, Francis W L Esmonde-White, et al. *Proc. SPIE*, 7166, Optics in Bone Biology and Diagnostics, 71660J, 18 February 2009.
- [25] Esmonde-White K A, Mandair G S, Raaii F, et al. *J. Biomed. Opt.*, 2009, 14(3): 034013.
- [26] Dehring K A, Mandair G S, Roessler B J. *New Approaches in Biomedical Spectroscopy*, 2007, 963: 123.
- [27] Buckley K, Kerns J G, Parker A W, et al. *J. Raman Spectrosc.*, 2014, 45(2): 188.
- [28] Bergholt M S, Albro M B, Stevens M M. *Biomaterials*, 2017, 140: 128.
- [29] Esmonde-White K A, Esmonde-White F W L, Morris M D, et al. *The Analyst*, 2011, 136: 1675.
- [30] Schulmerich M V, Cole J H, Kreider J M, et al. *Appl. Spectrosc.*, 2009, 63(3): 286.
- [31] Maher J R, Inzana J A, Awad H A, et al. *J. Biomed. Opt.*, 2013, 18(7): 077001.
- [32] Pavlou E, Zhang X, Wang J, et al. *Ann. Joint*, 2018, 3: 83.

Research Progress of Raman Spectroscopy Application for Articular Cartilage and Osteoarthritis

MA Dan-ying, ZHAO Yuan, SHANG Lin-wei, ZHU Yong-kang, FU Juan-juan, LU Yan-fei, YIN Jian-hua*
Department of Biomedical Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China

Abstract Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative joint disease caused by many factors, which affects the limb function and daily life of patients seriously, and is one of the most common joint diseases affecting human health. When OA is severe, it will be irreversible. Therefore, it is critical for the timely detection and diagnosis of OA. Raman spectroscopy shows the potential of minimally invasive, label-free and objective diagnosis at the molecular level. So it is used increasingly in the study of OA. The creative findings and progress of the researches on articular cartilage and OA are reviewed in detail, as well as the limitations and prospects of Raman spectroscopy at home and abroad in future. This review mainly introduces that changes in protein, lipids and nucleic acid components which exist in the extracellular matrix, pericellular matrix, and chondrocytes as well as changes in main components of subchondral bone and synovial fluid. Their corresponding OA feature or physiological functions have been detected by three different Raman spectroscopy techniques that include macro-Raman, micro-Raman and optical fiber Raman modes. This review provides a reference for the coming study of OA and suggests the effectiveness and feasibility of Raman spectroscopy in detecting OA. On the other hand, Raman spectroscopy has many advantages in detection and diagnosis, especially not being affected by water. It is promising to be powerful molecular spectroscopy techniques and clinical tools for early clinical diagnosis and rehabilitation monitoring in this field.

Keywords Raman spectroscopy; Osteoarthritis; Articular cartilage

(Received Jun. 18, 2019; accepted Oct. 5, 2019)

* Corresponding author