

肾结石两种造模方式血、尿生化的动态比对研究

郝志强,王勤章,倪 钊,钱 成,申茂磊,钱 彪*

(石河子大学医学院第一附属医院,石河子 832000)

【摘要】 目的 构建两种大鼠肾结石疾病模型,为肾结石病因学的探索提供支持。**方法** 将60只大鼠随机分为纳米细菌(Nanobacteria, NB)组(NB组,尾静脉注射1.2 mL NB悬液,30只)和乙二醇组(EG组,1.25%乙二醇饮水+1%氯化铵2 mL/d灌胃,灌胃持续时间为2 w,30只),实验周期为10 w,每周每组各处死大鼠3只,处死前采集大鼠血、尿标本,肾脏标本。**结果** 两组大鼠一般情况差异显著,肾体比差异不显著;病理结晶数差异不显著;纳米细菌组与乙二醇组相比,血钙、血镁、血磷、肌酐、尿酸、尿素的差异不显著($P > 0.05$);尿钙、尿pH、尿比重、24 h尿量的差异不显著($P > 0.05$)。**结论** 两种造模方式,就研究指标来看,差异无显著性,表明了纳米细菌造模的可行性。相较于传统的乙二醇造模方式,NB造模具有更加温和的优点,且NB来源于肾结石本身,这一造模方式与人体肾结石形成更加相似,更有利于肾结石成因的研究。

【关键词】 肾结石;纳米细菌;乙二醇;生化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0015-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.003

Dynamic comparison of blood and urine biochemistry in two models of renal calculi

HAO Zhiqiang, WANG Qinzhang, NI Zhao, QIAN Cheng, SHEN Maolei, QIAN Biao*

(The First Affiliated Hospital of Medical School of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

【Abstract】 Objective Two models of rat kidney stone disease were constructed to provide support for exploration of the etiology of kidney stones. **Methods** Sixty rats were randomly divided into a nanobacteria group (NB group, tail vein injection of 1.2 mL NB suspension, 30 rats) and an ethylene glycol group (EG group, 1.25% ethylene glycol water + 1% ammonium chloride 2 mL/d gavage, gavage duration of 2 w, 30 rats). The experimental period was 10 w. In each group, 3 rats were sacrificed each week, with blood, urine, and kidney specimens being collected before sacrifice. **Results** There were no significant differences in the general conditions between the two groups, including no difference in renal body ratio ($P > 0.05$). There was also no significant difference in the number of pathological crystallizations. In addition, there were no significant differences of serum calcium, magnesium, phosphorus, creatinine, and uric acid between the two groups ($P > 0.05$), and also no difference of urea ($P > 0.05$). There were no significant differences of urine calcium, urine pH, urine specific gravity, and 24 h urine volume between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** No statistically significant differences in terms of research indicators were identified between the two modeling method, indicating the feasibility of nanobacterial modeling. Compared with the conventional method of using ethylene glycol, NB has the advantage of being milder and being derived from kidney stones themselves. This model is more similar to the formation of human kidney stones and more conducive to study of the causes of kidney stones.

【Keywords】 renal calculus; nanobacteria; ethylene glycol; biochemistry

[基金项目] 国家自然科学基金(81460140)。

[作者简介] 郝志强(1993—),男,硕士研究生,研究方向:泌尿系结石。E-mail:934247812@qq.com

[通信作者] 钱彪(1978—),男,副教授,研究方向:泌尿系结石。E-mail:qb2003_2000@163.com

泌尿系任何部位均可发生结石但最常始发于肾,肾结石在形成时多位于肾盂或肾盏,肾脏内晶体和有机物质的大量异常累积,最终导致肾结石发病。结石中 90% 含有钙,其中草酸钙结石最常见。目前对于肾结石的研究最常用的是乙二醇实验动物模型,在本课题前期研究中发现纳米细菌(Nanobacteria, NB)是结石的原因之一,并且成功利用纳米细菌建立了动物模型^[1],为评价纳米细菌的成石效能,现将两种模型成石过程中血、尿生化做一个动态研究,旨在为肾结石病因学的研究提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 6 周龄左右,体重(200 ± 20) g, Wistar 雄性大鼠 60 只,实验动物均是来源于新疆医科大学实验动物中心的 SPF 级雄性大鼠。合格证号[SCXK(新)2013-0001];新医动字[SYXK(新)2010-0003];福利伦理审查证号[2016]院伦审动实字(001)号(NO)A2016-001。把 60 只大鼠按随机数表法分为纳米细菌组(NB 组,30 只)和乙二醇组(EG 组,30 只),两组大鼠均先于新疆地方与民族高发病教育部重点实验室适应性饲养 1 周,标准饲料喂养,饲料购自石河子大学实验动物中心。

1.2 实验试剂与仪器

电子天平(LT1000B,江苏常熟市大量仪器有限公司),全自动生化分析仪(Modual DPP,德国罗氏),多功能光学显微镜及图像采集系统(BX40,日本 Olympus),透射电镜(JEOL-1230 Electronics,日本 JEOL)。

纳米细菌悬浊液(自制)、0.9% 生理盐水(山东科伦药业有限公司)、1.25% 乙二醇(天津永晟精细化工有限公司)饮水、1% 氯化铵(天津永晟精细化工有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 纳米细菌的制备

纳米细菌来源于肾结石患者清洁中段晨尿,收集标本后提取并培养,具体操作如下:收集标本 5 mL,生理盐水稀释 2 倍后滤器过滤、离心取管底液 1 mL,加入 DMEM 及热灭活胎牛血清培养,5% CO₂, 37℃, 28~30 d 换液 1 次,培养 6~8 周,每 30 d 换液 1 次。筛选出无污染的标本制成 NB 悬液。

1.3.2 模型的建立及标本采集

将 60 只大鼠随机分为纳米细菌组(NB 组,尾静脉注射 1.2 mL NB 悬液,30 只)和乙二醇组(EG 组,1.25% 乙二醇饮水 + 1% 氯化铵 2 mL/d 灌胃,灌胃持续时间为 2 w,30 只),实验周期为 10 w,每周每组各处死大鼠 3 只,处死前采集大鼠血、尿标本,供生化分析,并取两侧鲜活肾脏标本,供病理结晶情况检测及肾体比(肾脏重量/体重 × 100%)的计算。

1.3.3 记录大鼠一般情况

连续观察 10 w 内各组大鼠饮食饮水、行为活动等情况,并实时测量记录其体重变化。

1.3.4 病理组织学检查

肉眼观察肾脏的颜色及其大小改变。将标本经固定、脱水透明、浸蜡包埋、切片贴片、脱蜡染色、脱水透明、封固等步骤,制成石蜡病理切片,常规 HE 染色,在光学显微镜下观察结晶的形成情况,按文献提供的肾脏结晶分级判定标准^[1],0 级记为阴性,I-IV 级记为阳性,进行综合、统计。

1.3.5 生化指标

使用全自动生化分析仪检测肌酐,尿素,尿酸,尿钙,血钙,血镁,血磷等生化指标,进行统计分析。

1.4 统计学方法

使用 SPSS22.0 统计学软件进行分析,所有数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同时间段的数据,组间分析运用重复测量的方差分析,血、尿生化及肾体比,组间比较用秩转换的非参数检验,组内的比较采用 SNK-q 检验,结晶情况分析用 Fisher 确切概率法,显著性水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况

第 1~2 周,两组大鼠均表现无异,饮食饮水良好,且性情安静温顺;自第 3 周开始,两组大鼠逐步出现差异,第 3~8 周,相较于 NB 组而言,EG 组大鼠在性情及活动度等方面表现更为强烈,后者活动度明显升高且变得烦躁不安;第 9~10 周,两组大鼠在饮食饮水、精神状态、活动度等方面均有不同程度下降。相比而言,NB 组大鼠食欲减低,活动减少,精神倦怠,而 EG 组在此基础上,更加表现出针刺反应迟钝等反应。且在造模期间,清理 EG 组大鼠垫料时,可见明显血尿痕迹,并有 2 只大鼠意外死亡。

2.2 肾脏标本观察

连续性观察 10 周内两组大鼠肾脏大体标本,肉眼可见,第 1~2 周两组大鼠均无明显改变,肾脏表面光滑,肾皮质剖面为暗红色,髓质呈灰白色,肾门处可见肾乳头、肾盏、肾盂等正常结构;自第 3 周开始,乙二醇组较纳米细菌组大鼠肾脏略有增大,肾皮质剖面呈红褐色,髓质呈橘黄色,皮髓结构清晰,肾盏及肾盂良好。第 6 周以后纳米细菌组部分肾脏皮髓结构尚清晰,但有少量散在淡黄色颗粒沉积在肾组织中,触之有沙砾感。乙二醇组大鼠肾脏肿大,颜色变浅或发白,剖面呈淡黄色,皮髓结构不清晰,可见淡黄色颗粒沉积在皮髓交界处,触之有沙粒样感觉,在解剖显微镜下,晶体以肾盂为中心呈扇形分布。称重计算其肾体比结果显示,差异无显著性。(表 1)

2.3 光学显微镜观察

显微镜下可见:纳米细菌组大鼠自第 4 周起,其肾脏病理切片可见灰白色晶体,10 周计数,纳米细菌组大鼠肾脏晶体阳性 11 只(阳性率 52.4%),自第 3 周起,乙二醇组大鼠肾脏切片可见明亮晶体,主要分布于远曲小管,近曲小管及部分肾小球周围,形态不规则,晶体多呈零星散在分布,少量晶体互相连接成片成团。两组数据运用 Fisher 确切概率法计算其统计学意义,结果显示 $P \approx 0.889$,差异无显著性。(因 NB 组大鼠在第 4 周开始成石,EG 组大鼠在第 3 周开始成石,而前几周已处死的大鼠也存

在成石的可能,所以在计算成石率时将之前已处死的大鼠排除在大鼠总计数之外)(表 2)

2.4 血液生化分析比对

采集大鼠血液标本进行检测,结果显示:1~10 周内,纳米细菌组与乙二醇组在血钙、血镁、血磷、肌酐、尿酸、尿素等六个层面,均显示二者差异不显著($P > 0.05$)。(表 3)

2.5 尿液成分分析比较

收集两组大鼠尿液标本进行检测分析得:对 1~10 周内,纳米细菌组与乙二醇组的尿钙、尿 pH、尿比重、24 h 尿量等四个方面进行统计学分析,结果显示,两组差异无显著性($P > 0.05$)。(表 4)

3 讨论

肾结石是泌尿外科的常见病,容易复发,有资料显示,经体外冲击波碎石治疗后的泌尿系结石患者的结石复发率随着时间增长而有所升高,其中第 1 年复发率为 6.7%,至第 5 年复发率则增长到 41.8%^[2]。未解决这一问题,本课题组积极探寻一种与肾结石形成过程相似的方式,改进造模手段,旨在为肾结石病因学的研究寻求突破。

肾结石主要类型为草酸钙结石^[3],究其原因,系体内草酸代谢紊乱所致^[4]。以往的研究,大都通过乙二醇构建动物疾病模型^[5]。乙二醇为草酸代谢通路的中间产物,亦是草酸的前体^[6-7]。因此,摄入乙二醇可导致动物体内草酸增加而形成草酸钙^[8],从而成功构建 Wistar 雄性大鼠肾结石模型。

表 1 纳米细菌组与乙二醇组肾体比比较($\bar{x} \pm s$, %)
Table 1 Comparison of renal body ratios between nano-bacteria and ethylene glycol groups

组别 Groups	时间(w) Time									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
纳米细菌组 NB Group	0.64 ± 0.11	0.76 ± 0.57	0.91 ± 0.20	0.90 ± 0.24	0.94 ± 0.17	0.94 ± 0.13	0.95 ± 0.22	0.93 ± 0.08	0.91 ± 0.06	0.90 ± 0.06
乙二醇组 EG Group	0.63 ± 0.01	0.76 ± 0.05	0.92 ± 0.09	0.95 ± 0.08	0.98 ± 0.06	0.98 ± 0.07	1.01 ± 0.10	1.00 ± 0.09	0.95 ± 0.02	0.97 ± 0.06

注:与乙二醇组比较,肾体比差异无显著性。
Note. Compared with ethylene glycol group, there was no significant difference.

表 2 纳米细菌组与乙二醇组病理结晶情况(%)
Table 2 Pathological crystallization of nano-bacteria and ethylene glycol groups

组别 Groups	n	0	I	II	III	IV	成石率(%) Stone formation rate
纳米细菌组 NB Group	21	10	7	3	1	0	52.4
乙二醇组 EG Group	24	8	9	4	2	1	66.7

注:与乙二醇组比较,病理结晶情况差异无显著性。
Note. Compared with ethylene glycol group, there was no significant difference.

表 3 纳米细菌组与乙二醇组血液生化分析($n=60$)

Table 3 Blood biochemistry analysis of nano-bacteria and ethylene glycol groups

时间(w)	组别	血钙(μmol/L)	血磷(μmol/L)	血镁(μmol/L)	肌酐(μmol/L)	尿酸(μmol/L)	尿素(μmol/L)
Time	Groups	Blood calcium	Blood phosphorus	Blood magnesium	Creatinine	Uric acid	Urea
1	NB	2.39±0.09	2.71±0.18	1.06±0.13	41.10±3.89	85.00±13.00	5.34±1.45
	EG	2.46±0.11	2.46±0.10	0.93±0.08	39.37±1.82	80.33±9.87	5.45±1.54
2	NB	2.36±0.21	3.40±0.65	1.24±0.08	45.40±5.30	81.00±13.00	6.76±0.73
	EG	2.52±0.09	2.50±0.06	0.97±0.16	41.77±1.37	72.00±5.29	5.80±1.18
3	NB	2.52±0.07	3.04±0.24	1.10±0.11	48.57±9.80	84.67±11.02	5.93±1.02
	EG	2.56±0.05	2.66±0.02	0.99±0.14	40.73±3.18	77.00±2.65	4.49±0.35
4	NB	2.44±0.22	3.30±0.70	1.18±0.26	50.27±4.15	91.00±9.17	6.84±1.09
	EG	2.63±0.04	3.08±0.09	1.00±0.17	42.63±3.04	78.67±8.74	5.99±0.37
5	NB	2.41±0.18	3.05±0.21	1.16±0.28	61.63±6.15	92.67±17.56	6.39±1.16
	EG	2.81±0.14	2.92±0.25	1.13±0.22	52.83±4.05	81.33±6.11	5.93±0.79
6	NB	2.41±0.09	3.73±0.21	1.17±0.14	58.20±17.27	96.33±9.61	7.63±0.81
	EG	2.68±0.08	3.55±0.17	0.80±0.04	47.40±7.81	89.33±4.16	6.40±0.36
7	NB	2.43±0.07	2.61±0.24	1.14±0.22	61.87±6.90	92.33±11.55	7.41±1.67
	EG	2.67±0.11	4.45±0.33	1.60±0.17	50.40±3.06	81.33±11.68	5.84±0.21
8	NB	2.35±0.13	2.69±0.21	1.05±0.17	55.60±15.90	94.33±6.11	7.49±2.30
	EG	2.66±0.12	3.88±0.32	1.58±0.25	45.80±6.37	86.67±3.21	5.13±0.21
9	NB	2.37±0.08	2.33±0.39	1.08±0.08	53.60±11.92	86.67±8.08	6.73±1.44
	EG	2.53±0.11	4.54±0.26	1.70±0.20	49.33±3.23	79.67±3.21	5.47±0.46
10	NB	2.45±0.10	2.90±0.26	1.19±0.09	47.60±6.58	86.00±10.44	6.59±1.14
	EG	2.87±0.03	3.85±0.29	1.73±0.19	46.37±4.57	75.67±6.66	6.18±0.49

注:与乙二醇组比较,差异无显著性。
Note. Compared with ethylene glycol group, there was no significant differences.

表 4 纳米细菌组与乙二醇组尿液生化分析($n=60$)

Table 4 Urine biochemistry analysis of nanobacteria and ethylene glycol groups

时间(w)	组别	尿钙(μmol/L)	尿 pH	尿比重	24 h 尿量(ml)
Time	Groups	Urine calcium	Urine pH	Urine specific gravity	24 h urine output
1	NB	1.23±0.30	7.17±0.29	1.013±0.003	6.67±1.20
	EG	1.09±0.07	7.17±0.29	1.013±0.003	6.67±1.20
2	NB	1.60±0.58	7.33±0.29	1.010±0.005	7.77±2.14
	EG	1.13±0.09	7.33±0.29	1.010±0.005	7.77±2.14
3	NB	2.24±0.52	7.67±0.29	1.012±0.006	8.13±1.84
	EG	1.60±0.25	7.67±0.29	1.012±0.006	8.13±1.84
4	NB	2.64±1.34	7.50±0.50	1.015±0.005	8.87±3.17
	EG	2.00±0.78	7.50±0.50	1.015±0.005	8.87±3.17
5	NB	3.07±0.66	7.50±0.50	1.013±0.003	9.47±0.87
	EG	2.35±0.52	7.50±0.50	1.013±0.003	9.47±0.87
6	NB	3.09±1.12	7.33±0.58	1.017±0.008	9.53±1.31
	EG	2.35±0.18	7.33±0.58	1.017±0.008	9.53±1.31
7	NB	3.14±0.82	7.67±0.58	1.015±0.005	9.07±1.00
	EG	2.20±0.28	7.67±0.58	1.015±0.005	9.07±1.00
8	NB	2.67±0.47	8.33±0.29	1.015±0.005	9.27±1.35
	EG	1.98±0.26	8.33±0.29	1.015±0.005	9.27±1.35
9	NB	2.29±0.41	8.33±0.29	1.015±0.009	8.47±1.16
	EG	1.88±0.04	8.33±0.29	1.015±0.009	8.47±1.16
10	NB	2.14±0.26	8.00±0.50	1.015±0.005	8.80±0.87
	EG	2.08±0.15	8.00±0.50	1.015±0.005	8.80±0.87

注:与乙二醇组比较,差异无显著性。
Note. Compared with ethylene glycol group, there was no significant differences.

近年来,纳米细菌在机体钙化性疾病中的作用逐渐凸现出来,据资料显示,NB 是体内唯一可以产生羟基磷灰石的生物^[9],在泌尿系结石的发生发展过程中扮演着重要角色^[10],NB 所特有的生物矿化功能在临床许多钙化性疾病中都得到了有效验证^[11]。NB 作为钙化的核心^[12-13],进一步促进了钙

化的发展。NB 在吸引并聚集的同时,还能够侵入并破坏肾集合管的肾乳头细胞和肾小管上皮细胞^[14],形成结晶核心,这种晶体核心作为常见的结石前体^[15],最终诱发结石形成。

本研究同时构建了两种 Wistar 大鼠肾结石模型,最终两种方法都成功使大鼠形成肾结石。检测两组大鼠的成石率、血、尿生化,显示二者差异无显著性,两种造模方式均可应用于肾结石的研究。但纳米细菌来源于肾结石本身,这一造模方式与肾结石形成更加相似,更有利于肾结石成因的研究。另外两种造模方式各项指标的统计学检验,表明 NB 造模得以实施。从血、尿生化等各项指标来看,NB 成石效能有一定意义。

造模期间观察两组大鼠一般情况,NB 组大鼠食欲减低,活动减少,精神倦怠,而 EG 组在此基础上,发生针刺反应迟钝等反应。且在造模期间,清理 EG 组大鼠垫料时,可见明显血尿痕迹,并有 2 只大鼠意外死亡。表明传统的乙二醇造模方式,对大鼠机能的损害更为严重,纳米细菌造模稍加温和。

对实验结果,包括肾体比、病理结晶数、血液生化、尿液生化等诸多指标进行统计学分析,结果显示,上述指标之中,两组差异均无显著性,在造模的完成度上,二者没有差异,均可以达到理想状态,并成功构建 Wistar 雄性大鼠肾结石模型。提示改良的造模方式是有意义的。

综上所述,纳米细菌作为肾结石的成因之一,可通过其自身的矿化反应,影响草酸钙代谢,形成结石。

致谢:

本文研究得到了钱彪副教授的大力支持,同时感谢石河子大学医学院第一附属医院、新疆地方与民族高发病教育部重点实验室的众多帮助,在此谨致真诚谢意。

参考文献:

[1] 褚浩,王勤章,钱彪,等. 纳米细菌大鼠肾结石模型肾脏结石形成时间的动态研究[J]. 中国全科医学杂志,2017,20(21): 2613-2618.

- [2] Sommer AP, Oron U, Pretorius AM, et al. A preliminary investigation into light-modulated replication of nanobacteria and heart disease [J]. J Clin Laser Med Surg, 2003;21(4):231-235.
- [3] 杨立军,刘国华,朱江等.肾结石动物模型的建立[J],腹腔镜外科杂志,2013,18(10):785-787.
- [4] Thongboonkerd V, Semangoen T, Sinchaikul S, et al. Proteomic analysis of calcium oxalate monohydrate crystal-induced cytotoxicity in distal renal tubular cells [J]. J Proteome Res, 2008,7(11):4689-4700.
- [5] 曾春晖,李先梅,蔡妮娜,等.草酸钙型肾结石小鼠模型的研究[J],世界中医药,2016,11(11):2213-2215.
- [6] Zuo J, Khan A, Glenton PA, et al. Effect of NADPH oxidase inhibition on the expression of kidney injury molecule and calcium oxalate crystal deposition in hydroxy-L-proline-induced hyperoxaluria in the male Sprague-Dawley rats[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(6): 1785-1796.
- [7] Mirian EC, Juanita NM, Christophe BO, et al. Molecular mechanisms involved in the protective effect of the chloroform extract of *Selaginella lepidophylla* (Hook. et Grev.) Spring in a lithiasic rat model[J]. Urolithiasis,2013,41(3):205-215.
- [8] 张薇,邹移海,段宏莉,等.加味乌茹汤治疗尿石症的实验研究[J]. 中国比较医学杂志,2006,16(4):204-207.
- [9] 胡卫国,王晓峰,徐涛,等. 纳米细菌大鼠肾结石模型初步建立及成石因素分析[J]. 北京大学学报(医学版), 2010, 42(4):433-435.
- [10] 粟宏伟,王杰,朱永生,等. 钙化性纳米微粒致大鼠肾结石模型的构建[J]. 重庆医学,2016,45(3):310-312,316.
- [11] Shiekh FA, Miller VM, Lieske JC. Do calcifying nanoparticles promote nephrolithiasis? A review of the evidence [J]. Clin Nephrol, 2009, 71(1):1-8.
- [12] 粟宏伟,朱永生,邓清富,等. 上尿路结石患者血清、尿液、结石中纳米细菌的检测[J]. 重庆医学, 2013,42(31):3754-3756.
- [13] Abrol N, Panda A, Kekre NS, et al.. Nanobacteria in the pathogenesis of urolithiasis: Myth or reality? [J]. Indian J Urol, 2015,31(1):3-7.
- [14] 刘森,谷江,董安涛,等. 乌梅提取物对纳米细菌致大鼠肾结石形成的影响及机制探讨[J],山东医药,2017,57(14):14-17.
- [15] 马宏亮,杨彬,张雁钢,等. 纳米细菌与感染和相关钙化性疾病研究进展[J],山西医科大学学报,2017,48(9):963-965.

[收稿日期]2018-03-06