

草酸钙型肾结石小鼠模型的研究

曾春晖¹ 李先梅^{1,2} 蔡妮娜^{1,3} 谭娥玉^{1,4} 覃文慧¹ 韦乃球¹ 秦树森^{1,5} 马雯芳¹ 杨柯¹

(1 广西中医药大学药学院, 南宁, 530001; 2 广西钦州市卫生学校, 钦州, 535000; 3 南宁市中医医院, 南宁, 530001;

4 江门市五邑中医院, 江门, 529000; 5 桂林市妇女儿童医院, 桂林, 541001)

摘要 目的: 摸索简单易行的方法诱导草酸钙型肾结石小鼠模型, 为后续药效学研究提供可靠的动物模型。方法: 将健康小鼠分为正常组(A组)、模型组(B组)、模型组(C组), B组灌胃给予诱石剂(含0.75%乙二醇和0.75%氯化铵的水溶液), C组灌胃给予诱石剂(含1%乙二醇和1%氯化铵的水溶液), 1 mL/次, 3次/d, 连续28 d进行造模, A组平行灌胃给予等量生理盐水。实验期间观察小鼠的进食进水情况, 生命体征, 行为活动及体毛变化, 于造模后7、14、21、28 d收集24 h尿液进行草酸和钙含量的测定, 于末次造模后处死小鼠, 剖取肾脏进行病理学观察。结果: 于造模第3天开始, B、C组小鼠均出现后腿无力爬行, 食欲减退, 体毛呈进行性晦暗无光泽, C组小鼠的表现比B组小鼠严重; 造模7 d后, 模型组开始出现不同数量的动物死亡, 且C组死亡率高于B组; B组和C组小鼠尿液中草酸、钙浓度均明显高于A组($P < 0.01$), B组尿草酸浓度明显高于C组($P < 0.05 \sim 0.01$), 而尿钙浓度明显低于C组($P < 0.01$); 病理学结果表明, A组小鼠肾小管未见扩张和草酸钙晶体沉积, B组、C组小鼠肾组织均出现肿胀, 肾小管管腔明显扩张、变性、坏死, 肾间质有明显慢性炎症细胞浸润, 表面点状分布白色结晶或钙化, 在近曲小管和远曲小管有大片结晶存在, 且B组的成石率比模型C组高。结论: 采用0.75%乙二醇及0.75%的氯化铵混合溶液作为诱石液, 可成功诱导死亡率低、成石率高的草酸钙型肾结石小鼠模型。

关键词 草酸钙型肾结石; 小鼠; 动物模型

Study of Calcium Oxalate Crystallization Model in Mice

Zeng Chunhui¹, Li Xianmei^{1,2}, Cai Nina^{1,3}, Tan Eyu^{1,4}, Qin Wenhui¹, Wei Naiqiu¹, Qin Shusen^{1,5}, Ma Wenfang¹, Yang Ke¹

(1 Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2 Qinzhou Provincial Health School, Qinzhou 535000,

China; 3 Nanning Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 4 Wuyi Hospital of Traditional Chinese

Medicine, Jiangmen 529000, China; 5 Guilin Women's and Children's Hospital, Guilin 541001, China)

Abstract Objective: To explore a method of establishing mice model with calcium-oxalate kidney stones so as to provide the reliable animal models for follow-up study on pharmacodynamics. **Methods:** Mice were divided to normal group (A group), model group (B group) and model group (C group) randomly. 0.75% ethylene glycol and 0.75% ammonia chloride mixture were administrated orally 1 mL/time and 3 times/day to B group mice for 28 consecutive days. 1% ethylene glycol and 1% ammonia chloride mixture were administrated orally to C group mice as well as B group. The same volume of normal saline was administered in parallel to A group. Food and water intake, vital signs, behavior and change of hair were observed in experiment. 24 h urine of mouse was collected for detecting concentration of oxalic acid and calcium at 7, 14, 21, 28 days after modeling. All of mice were sacrificed at the last time, and took the kidney to carry out pathological observation. **Results:** The phenomenon of inability to crawl on the hind legs, loss of appetite and the dull hair were observed in B and C group mice after modeling 3 days. The situation of C group was more serious than B group. The model animals began to die after modeling 7 days and the mortality rate of C group was higher than that of group B. The concentration of oxalic acid and calcium in urine of B group or C group were more than A group ($P < 0.01$). The concentration of oxalic acid in B group was significantly higher than that in C group ($P < 0.05 \sim 0.01$), but the calcium concentration was significantly lower than that of the C group ($P < 0.01$). No abnormalities and Calcium oxalate crystal were found in the kidney of A group mice. In B and C groups, the renal tissues of mice were swollen. The renal tubular lumen showed obvious expansion, degeneration necrosis and there was obvious chronic inflammatory cell infiltration in renal interstitial. The surface of the kidney is dotted with white crystals or calcification. There are large tracts of crystal in the proximal and distal tu-

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:81260667); 广西科技厅面上项目(编号:2011GXNSFA018204); 广西卫生厅中医药科技专项课题(编号:GZKZ10-050); 广西重点实验室建设项目(编号:15-140-31、14-045-12、13-051-06); 广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心建设(编号:CICAR2015-Z1)

作者简介: 曾春晖(1974—), 女, 汉族, 教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事中草药炮制药理研究, Tel: (0771) 2279423, E-mail: chhzeng@163.com

通信作者: 杨柯(1975—), 男, 侗族, 教授, 理学硕士, 硕士研究生导师, 从事中草药药理学研究, Tel: (0771) 2279423, E-mail: kyang_11@126.com

bules and Number of crystals in B group was more than that in C group. **Conclusion:** It was found that 0.75% ethylene glycol and 0.75% ammonia chloride mixture can be successfully induced low mortality, high stone rate of calcium oxalate kidney stones in mice.

Key Words Calcium oxalate crystallization kidney stone; Mouse; Animal Model

中图分类号:R36 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.11.002

尿路结石是在泌尿系统中形成足够大的固体结晶,以至造成阻塞、感染等症状的病理矿化过程,是泌尿外科最常见的疾病之一,在泌尿外科住院患者中居首位^[1]。其中以草酸钙型结石为主的上尿路结石(即肾和输尿管结石)约占95%,已取代膀胱结石成为了尿石症的主要类型^[2]。尿石症实验动物模型不但可以深入了解尿结石的形成过程和机制及尿石成因的代谢问题,而且还可以帮助筛选抗结石的中西药物。因此,设计和建立与人类尿石症相类似的动物模型,对于探讨尿结石的发病机制,预防和延缓结石形成,寻找防治尿结石的药物等方面均有重要的意义。目前,大多以大鼠为研究对象进行模型研究^[3-6],而小鼠模型相对研究资料报道较少。因此,我们以小鼠为载体,以不同浓度的乙二醇和氯化铵为诱石剂进行研究,现报道如下。

1 实验材料

1.1 实验动物 雄性KM小鼠,由广西医科大学实验动物中心提供,许可证号:scxk桂2009-0002。

1.2 实验试剂 溴百里草酚蓝(国药集团化学试剂有限公司,F20100525);甲基红(国药集团化学试剂有限公司,F20071107);铬酸钾(国药集团化学试剂有限公司,F20071107);氧氯化锆(国药集团化学试剂有限公司,F20080604);铬黑T(天津市登科化学试剂有限公司,20101015);钙羧酸(天津市登科化学试剂有限公司,20101125)。

1.3 实验仪器 TU-1901/1900型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);EL204型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);HM355S切片机(德国);BX60OLYMPUS显微镜(日本)。

2 方法

2.1 草酸钙型肾结石模型的建立 取18~22g健康KM小鼠,适应性饲养3d后,随机分成3组,即正常对照组(简称A组)10只,模型组15只(简称B组)、模型组15只(简称C组)。B组灌胃给予诱石剂(含0.75%乙二醇和0.75%氯化铵的水溶液),C组灌胃给予诱石剂(含1%乙二醇和1%氯化铵的水溶液),1mL/次,3次/d,连续28d进行造模,A组平行灌胃给予等量生理盐水。实验期间各组小鼠自由

摄食饮水。重复实验1次。

2.2 小鼠情况观察 每日观察并记录大鼠的进食进水情况,生命体征,行为活动及体毛变化。

2.3 取材 于造模后第7、14、21、28天将小鼠置代谢笼中接24h尿液,对尿液中的草酸、钙进行测定。末次收集尿液后处死小鼠,剖取肾脏。

2.4 指标测定

2.4.1 尿草酸测定 采用铬酸钾催化甲基红光度法^[17]测定。按计算公式计算尿中草酸浓度, $C_{\text{草酸}}(\mu\text{mol/mL}) = (\text{空白管} - \text{样品管}) / (\text{空白管} - \text{标准管}) \times 0.05$ 。

2.4.2 尿钙测定 采用EDTA络合滴定法^[18]进行测定。按计算公式计算尿中钙浓度, $C_{\text{钙}}(\mu\text{mol/mL}) = V_{\text{样}} \times 0.001 / 1000 / 0.5 \times 10^6$ 。

2.4.3 HE染色常规病理 制片,HE染色,镜下观察肾小管中草酸钙结晶分布和肾小管扩张的情况。

2.5 统计学方法 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,2组间均数差异用 t 检验(方差不齐时采用 t 检验校正公式)。

3 结果

重复实验1次,两次结果基本一致。

3.1 小鼠一般情况 于造模第3天开始,造模组均出现小鼠后肢无力爬行,食欲减退,体毛呈进行性晦暗无光泽,C组小鼠的表现比B组小鼠严重,可能与体内钙的流失,导致骨钙含量降低有关。造模7d后,模型组开始出现不同数量的动物死亡。结果见图1。

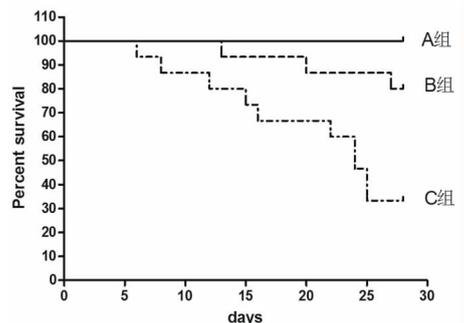


图1 不同诱石剂对小鼠存活情况的影响

3.2 对尿草酸和尿钙含量的影响 结果表明,与同期A组比较,B组和C组小鼠尿液中草酸、钙浓度均

显著升高 ($P < 0.01$)。同时间 B、C 2 组相比较, B 组生成的尿草酸浓度明显比 C 组高 ($P < 0.05 \sim$

0.01), 而尿钙浓度明显比 C 组低 ($P < 0.01$)。结果见表 1、表 2。

表 1 不同诱石剂对小鼠尿液中草酸含量的影响

组别	动物数				尿草酸含量($\mu\text{mol/mL}$)			
	1周	2周	3周	4周	1周	2周	3周	4周
A组	10	10	10	10	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.01
B组	15	14	13	12	$0.07 \pm 0.01^{**}$	$0.02 \pm 0.00^{**}$	$0.06 \pm 0.03^{**}$	$0.07 \pm 0.02^{**}$
C组	15	12	10	5	$0.05 \pm 0.01^{***}$	$0.01 \pm 0.00^{##}$	$0.04 \pm 0.03^{***}$	$0.04 \pm 0.02^{***}$

注:与 A 组比较, $^{**}P < 0.01$, $^*P < 0.05$; 与 B 组比较, $^{##}P < 0.01$, $^{\#}P < 0.05$, 下同。

表 2 不同诱石剂对小鼠尿液中钙含量的影响

组别	动物数				尿钙含量($\mu\text{mol/mL}$)			
	1周	2周	3周	4周	1周	2周	3周	4周
A组	10	10	10	10	1.10 ± 0.33	1.08 ± 0.15	0.92 ± 0.15	1.42 ± 0.46
B组	15	14	13	12	$2.32 \pm 1.17^{**}$	$1.90 \pm 0.85^{**}$	$3.94 \pm 2.18^{**}$	$2.71 \pm 1.21^{**}$
C组	15	12	10	5	$3.82 \pm 1.48^{***}$	$3.67 \pm 2.36^{***}$	$7.53 \pm 3.26^{***}$	$4.28 \pm 1.07^{***}$

3.3 对肾脏结石及组织损伤的观察 草酸钙结晶在常规 HE 病理切片为无色透明晶体, 结果表明, A 组小鼠肾小管未见扩张和草酸钙晶体沉积, B 组、C 组小鼠肾组织肿胀, 表面点状分布白色结晶或钙化, 镜下观察见肾小管管腔明显扩张, 上皮细胞明显肿胀、变性、坏死、管腔扩张, 肾间质有明显慢性炎症细胞浸润。有大片结晶存在, 结晶主要位于近曲小管和远曲小管, 且 B 组的成石率比模型 C 组高。结果见图 2。

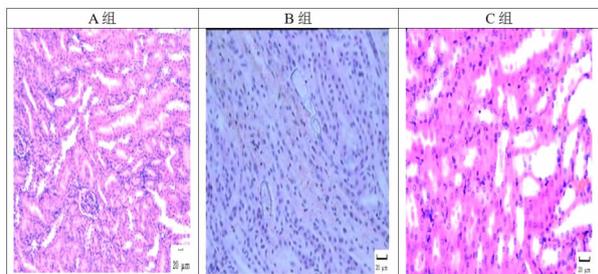


图 2 不同诱石剂对肾脏结石及组织的损伤的影响

4 讨论

目前动物模型的建立模式是在诱石剂^[6]如乙二醇加氯化铵或乙二醇加 $1\alpha(\text{OH})$ 维生素 D_3 的作用下, 诱导生成含草酸钙结石。乙二醇在体内代谢为草酸, 从肾脏分泌排泄。 $1\alpha(\text{OH})$ 维生素 D_3 可促进肾小管上皮细胞对钙的吸收, 长期应用 $1\alpha(\text{OH})$ 维生素 D_3 可使尿钙浓度升高, 尿钙与草酸结合成为草酸钙, 在肾组织内形成晶体, 晶体逐渐生长、聚集形成结石。氯化铵可以酸化尿液, 长期服用可造

成肾小管功能障碍, 许多研究表明肾小管损害利于晶体滞留和生长^[7]。因此本研究采用乙二醇及氯化铵的混合溶液作为诱石剂。2 个浓度下的混合溶液均能促进尿草酸、尿钙的升高, 病切结果显示肾脏有晶体沉积。但 1.0% 乙二醇及 1.0% 的氯化铵混合溶液作为诱石液时, 小鼠出现无力爬行, 死亡率较高, 且晶体量少, 这有可能是与氯化铵浓度高, 对肾小管损伤大, 导致钙离子流失过多有关, 且该诱石剂在造模过程中动物死亡率较高, 成石率较低, 故认为 0.75% 乙二醇及 0.75% 的氯化铵混合溶液更合适作为诱石液诱导草酸钙型肾结石小鼠模型。

参考文献

- [1] 吴阶平. 泌尿外科学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2005.
- [2] Breslau N, Brinkely L, Hill K, et al. Relationship of animal protein-rich diet to kidney stone formation and calcium metabolism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1988, 66(1): 140-146.
- [3] 巴元明, 曹秋实. 两种草酸钙结石大鼠模型的比较研究[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2014, 34(11): 1595-1598.
- [4] 黄幼霞. 乙二醇和氯化铵灌胃建立大鼠肾草酸钙结石模型的探讨[J]. 海峡药学, 2014, 26(1): 48-49.
- [5] 甘谢, 王树声, 向松涛, 等. 改良大鼠肾草酸钙结石模型与传统模型比较[J]. 中国中医急症, 2010, 19(6): 1004-1006.
- [6] 曹正国, 刘继红, 段永芳, 等. 几种实验性大鼠肾草酸钙结石模型比较研究[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2002, 31(5): 556-559 + 563.
- [7] Kumar S, Sigmond D, Miller T et al. A new model of nephrolithiasis involving tubular dysfunction/injury[J]. J Urol, 1991, 146: 1384.

(2016-10-17 收稿 责任编辑: 洪志强)