

## · 论 著 ·

## 模拟加速度对肾草酸钙结石模型大鼠氧化应激的影响

陈凯凯, 郭和清, 穆大为, 李建业, 严景民, 尹杏林, 张立铭

**[摘要]** **目的** 探讨加速度暴露对肾草酸钙结石模型大鼠氧化应激的影响。**方法** 采用乙二醇饮水和氯化铵灌胃法诱导建立大鼠草酸钙结石模型, 将 40 只 8 周龄 Wistar 健康雄性大鼠随机分为 4 组(每组 10 只): 空白对照组(A 组)、单纯诱石组(B 组)、加速度并诱石组(C 组)和单纯加速度组(D 组)。其中 A 组采用自来水饮水+生理盐水 2 mL/d 灌胃, B 组采用 1% 乙二醇+2% 氯化铵溶液 2 mL/d 灌胃, C 组在 B 组的基础上给予加速度(+6G)暴露, D 组单纯给予+6G 暴露。各组大鼠在相同条件下饲养 28 d 后收集血液及双肾标本, 左肾组织做石蜡切片 HE 染色, 光镜下观察草酸钙结晶情况; 右肾组织制成组织匀浆, 测定血液和右肾组织匀浆中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、还原性谷胱甘肽(GSH)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量, 以了解氧化应激情况。**结果** 单纯诱石组和加速度并诱石组肾组织草酸钙结晶评分较空白对照组和单纯加速度组均显著增高( $P<0.01$ ), 加速度并诱石组结晶评分亦较单纯诱石组增高( $P<0.01$ )。单纯诱石组和加速度并诱石组与空白对照组比较, 大鼠血、肾组织 MDA 浓度显著升高( $P<0.01$ ), 血、肾组织 SOD、CAT、GSH-Px 浓度显著降低( $P<0.01$ )。**结论** 加速度暴露可能是泌尿系结石形成的危险因素之一, 其机制可能与加速度暴露引起大鼠肾脏组织氧化应激损伤有关。

**[关键词]** 肾结石; 草酸钙; 加速度; 氧化应激; 大鼠

**[中图分类号]** R852 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.01.003

**Effect of acceleration on oxidative stress of renal calcium oxalate rat models**

CHEN Kai-kai, GUO He-qing, MU Da-wei, LI Jian-ye, YAN Jing-min, YIN Xing-lin, ZHANG Li-ming. Department of Urology, Air Force PLA General Hospital, Beijing 100142, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of acceleration on oxidative stress of renal calcium oxalate (CaOx) rat models. **Methods** The models of renal CaOx were established with Ethylene Glycol (EG) in drinking water and Ammonium Chloride (AC) by gavage. A total of 40 adult healthy male Wistar rats were randomly and averagely divided into 4 groups (10 of each): blank control group (A), stone forming group (B), stone forming with +6G exposure group (C) and +6G exposure naive group (D). Group A was established with drinking water and physiological saline by gavage (2 mL per day). Group B was established with 1% ethylene glycol in drinking water and 2% ammonium chloride by gavage (2 mL per day). Group C, with the foundation of group B, was exposed in +6G. Group D was exposed in +6G as same as group C. After feeding for 28 days, blood and renal samples were collected. The presence of CaOx crystals was scored in left renals under hematoxylin and eosin staining, and the level of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH) and glutathione Peroxidase (GSH) in the blood and right renal homogenate were measured as indicators of oxidative stress. **Results** For the formation of CaOx crystals, the score of group B and group C were significantly higher than group A and group D ( $P<0.01$ ), and the score of group C were significantly higher than group B ( $P<0.01$ ). For the parameter of oxidative stress, compared with group A, the concentration of MDA in blood and kidney tissues of group B significantly increased ( $P<0.01$ ), which significantly increased ( $P<0.01$ ) after the intervention of +6G (group C). Compared with group A, the content of SOD, CAT and GSH-Px in blood and kidney tissues of group B significantly decreased ( $P<0.01$ ), which significantly increased ( $P<0.01$ ) after the intervention of +6G (group C). **Conclusion** Acceleration would be one of the risk factor contributed to kidney stone formation. The mechanism is connected with the oxidative damage of renal tissue.

**[Key words]** kidney calculi; calciumoxalate; acceleration; oxidative stress; rats

泌尿系结石是飞行人员常见疾病, 病因复杂,

绝大多数患者无明显解剖及生理异常, 主要表现为上尿路结石, 患病率达 2.6%~7.8%<sup>[1]</sup>。在因泌尿系统疾病住院的飞行员中, 泌尿系结石所占比例高达 70%左右<sup>[2]</sup>。主要原因考虑与患者饮食结构和自身职业特点有关, 如长期摄入高蛋白、高嘌呤、高蔗糖及高钙膳食, 长时间飞行时出汗, 尿中结晶盐经常处于过饱和状态, 均可促进泌尿系结石的形成<sup>[3-4]</sup>。

基金项目: 全军后勤科研“十二五”重大项目 (AKJ11J004)

作者单位: 100142 北京, 北京空军总医院泌尿外科

通讯作者: 郭和清, E-mail: guoheqing@sina.com

引用格式: 陈凯凯, 郭和清, 穆大为, 等. 模拟加速度对肾草酸钙结石模型大鼠氧化应激的影响[J]. 东南国防医药, 2016, 18(1): 10-12, 31.

有研究证实加速度暴露可诱导氧化应激从而引起肾小管上皮细胞氧化损伤<sup>[5]</sup>,而肾小管上皮细胞损伤是肾结石发生发展的重要环节<sup>[6]</sup>,但是关于加速度暴露是否是肾结石形成的危险因素,国内研究较少,本实验拟通过研究加速度对大鼠氧化应激及肾草酸钙结晶形成的影响,为临床防治飞行员泌尿系结石提供理论探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** SPF 级健康成年雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 180~220 g,由解放军 304 医院实验动物中心提供[批准文号:SYXK(军)2012-0014;合格证号:No.11401500002634];小动物专用离心机(长春奥普光电公司,中国)由航空医学研究所提供;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、还原性谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;1%乙二醇、2%氯化铵(生产批号:130105)购自西陇化学股份有限公司。

**1.2 实验方法** 本实验经院动物伦理委员会批准,大鼠的使用符合动物保护相关伦理条例。所有大鼠自由摄取食物、水,在 25℃ 空调恒温、12 h 昼夜循环环境下适应性饲养 1 周后,按随机分组法分为 4 组,每组 10 只,从第 2 周开始施加不同干预因素继续饲养 4 周。参考文献<sup>[7]</sup>复制肾草酸钙结石模型:空白对照组(A 组),自来水饮水+生理盐水 2 mL/d 灌胃;单纯诱石组(B 组),1%乙二醇+2%氯化铵 2 mL/d 灌胃;加速度并诱石组(C 组),在 B 组的基础上给予加速度干预,使用小动物离心机在加速度(+6G)下暴露 1 min,5 次/d,每次中间休息 5 min,每周 3 次,共 4 周;单纯加速度组(D 组),自来水饮水+生理盐水 2 mL/d 灌胃,加速度干预同 C 组。

**1.3 观测指标** 实验进行至第 4 周末,断颈处死大鼠,下腔静脉穿刺取血,迅速取出双肾。右肾使用组织匀浆器制成 10%组织匀浆待测氧化应激指标;左肾用 4%甲醛固定,石蜡切片,常规苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肾组织草酸钙结晶及病理改变情况。光镜观察左肾常规切片成石情况根据结晶的分布区域及结晶形成程度的双重因素进行评分<sup>[8]</sup>。结晶情况以积分值来评价,积分值<sup>[8]</sup>由结晶分布区域的分值与结晶形成程度的分值相乘得到,即:结晶分布区域以肾皮质内结晶为 1 分,肾皮质及肾髓质内结晶为 2 分,肾皮质、肾髓质、肾乳头内均有结晶为 3 分,肾皮质、肾髓质、肾乳头及肾盂内均有结晶为 4 分;结晶形成程度以无为 0 分,极少

为 1 分,较多为 2 分,广泛形成 3 分。

按照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书,测定肾组织匀浆中 MDA、SOD、GSH、GSH-Px 及 CAT 含量。

**1.4 统计学处理** 采用统计软件 SPSS 19.0 进行数据分析,计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验,肾小管结晶评分比较采用秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

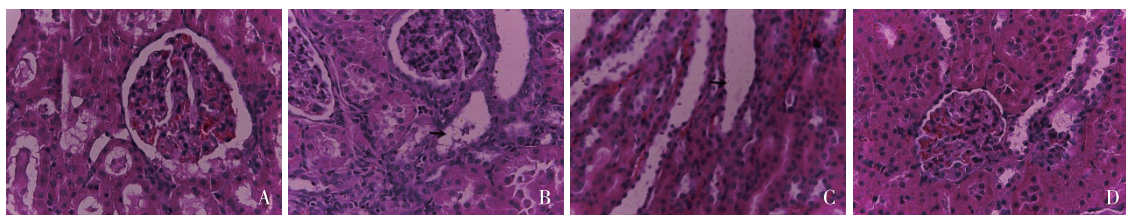
## 2 结果

**2.1 各组大鼠肾组织切片草酸钙结晶情况** A 组:肾组织无结晶形成,肾乳头、肾盂、肾盏结构清晰,细胞排列整齐、规则,肾小管腔内无坏死脱落样物质;B 组:肾组织部分可见皮质或髓质或肾乳头少量或较多结晶,形状不规则、折光性较强,少量炎细胞浸润,上皮细胞有时可见肿胀,间质有少量水肿;C 组大鼠:肾组织皮质、髓质、肾乳头皆可见大量无色透明草酸钙结晶形成,大部分肾组织切片内可见结晶结晶,切片各部分均可见大量炎细胞浸润,肾小管上皮细胞肿胀;D 组大鼠:肾组织无结晶形成,肾乳头、肾盂、肾盏结构清晰,肾小球形状较规则,少量炎细胞浸润,肾小管有时可见扩张,上皮细胞有时可见肿胀,间质有少量水肿(图 1)。B 组、C 组肾组织草酸钙结晶评分(分别为  $7.1 \pm 2.9$ 、 $10.3 \pm 3.6$ )比 A 组、D 组(均为  $0 \pm 0$ )显著增高( $P < 0.01$ ),C 组结晶评分亦较 B 组显著升高( $P < 0.01$ )。

**2.2 各组大鼠血、肾组织匀浆 MDA 等的比较** 与 A 组比较,B、C、D 组大鼠血、肾组织 MDA 浓度显著增加(表 1,  $P < 0.01$ ),加速度干预(C、D 组)可增加血、肾组织 MDA。与 A 组比较,B、C、D 组大鼠血、肾组织 SOD、GSH-Px、CAT 浓度显著降低( $P < 0.01$ ),且 C 组  $<$  B 组  $<$  D 组。与 A 组比较,B、C、D 组大鼠血、肾组织 GSH 浓度显著降低( $P < 0.01$ ),但 B、C、D 组大鼠血、肾组织 GSH 浓度比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

为研究加速度暴露因素对大鼠肾草酸钙结石的影响及其发生机制,我们采用乙二醇饮水和氯化铵灌胃法诱导建立了大鼠肾草酸钙结石模型<sup>[7]</sup>。乙二醇是草酸代谢的间接前体,在体内经过羟乙酸途径代谢产生草酸,是目前复制肾草酸钙模型最常用的基础诱石剂,常与肾毒性药物氯化铵联用加快



A: 空白对照组; B: 单纯诱石组; C: 加速度并诱石组; D: 单纯加速度组

图 1 光镜下各组大鼠肾组织草酸钙结晶(箭头所示)情况(HE ×400)

表 1 各组大鼠血、肾匀浆组织 MDA 和 SOD 等的比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	A 组( $n=10$ )	B 组( $n=10$ )	C 组( $n=10$ )	D 组( $n=10$ )
血 MDA (nmol/mL)	20.35±2.35	36.92±3.23 <sup>#</sup>	43.22±3.52 <sup>#</sup>	27.95±1.87 <sup>#</sup>
肾匀浆 MDA (nmol/mg pr)	8.67±0.84	12.43±0.96 <sup>#</sup>	15.33±0.71 <sup>#</sup>	10.63±0.79 <sup>#</sup>
血 SOD (U/mL)	115.45±18.37	75.99±15.55 <sup>#</sup>	53.67±12.35 <sup>#</sup>	93.98±17.35 <sup>#</sup>
肾匀浆 SOD (U/mg pr)	324.36±26.67	198.71±32.32 <sup>#</sup>	116.85±18.25 <sup>#</sup>	246.11±26.58 <sup>#</sup>
血 CAT (U/mL)	6.64±0.69	4.32±0.46 <sup>#</sup>	3.32±0.41 <sup>#</sup>	5.38±0.62 <sup>#</sup>
肾匀浆 CAT (U/mg pr)	138.47±8.74	129.87±9.55 <sup>#</sup>	118.95±6.35 <sup>#</sup>	133.49±7.45 <sup>#</sup>
血 GSH-Px (U/mL)	26.84±2.86	21.06±3.61 <sup>#</sup>	15.33±4.56 <sup>#</sup>	24.73±3.54 <sup>#</sup>
肾匀浆 GSH-Px (U/mL pr)	46.28±3.47	33.63±4.63 <sup>#</sup>	37.62±2.97 <sup>#</sup>	38.94±3.99 <sup>#</sup>
血 GSH (nmol/mL)	38.98±4.55	26.87±3.92 <sup>#</sup>	23.72±3.24 <sup>#</sup>	25.33±2.53 <sup>#</sup>
肾匀浆 GSH (nmol/mL pr)	122.33±12.54	89.72±9.93 <sup>#</sup>	83.95±8.54 <sup>#</sup>	88.81±9.33 <sup>#</sup>

注:与 A 组比较, <sup>#</sup>  $P<0.01$

肾结石的形成,提高造模成功率。本实验中大鼠饮用 1%乙二醇溶液和 2%氯化铵溶液灌胃后肾小管内出现了结石结晶,说明造模成功,与国内外有关作者<sup>[7-8]</sup>报道一致。其中 C 组草酸钙结晶评分高于 B 组,说明大鼠暴露于加速度下促进了肾小管内草酸钙结晶量的增加。

加速度暴露促进肾结石的形成可能与肾脏氧化应激损伤有关。正常情况下,机体存在着氧自由基的产生与清除酶系统之间的动态平衡,一旦这种平衡遭到破坏即可造成细胞的损伤而致病。氧自由基不仅能直接损伤肾小管上皮细胞,还能引起脂质过氧化产物的增多,导致机体内氧化与抗氧化系统失衡,继而在各种大分子的作用下触发级联反应促进肾结石的最终形成<sup>[9]</sup>。Khan 等<sup>[10]</sup>研究认为肾小管管腔壁可能是草酸钙结石最初成核部位,草酸钙结晶体附着并生长依赖于肾小管上皮细胞的损伤。草酸钙会刺激肾小管上皮细胞产生活性氧簇 ROS 引起氧化应激反应,导致上皮细胞自身损伤进而产生带负电荷的物质如磷脂酰丝氨酸等并成为附着点,草酸钙即以此为中心进行黏附并生长<sup>[11]</sup>。肾小管上皮细胞损伤后还可以导致其能够抑制晶体结晶过程的物质生成减少,从而有利于肾结石的形成。

持续性加速度作用是航空航天飞行活动中的常见现象,随着新型战斗机的大量服役,这一问题

将更加突出。在加速度作用下,随着流体静压梯度的增加,器官的动脉血压降低,血流量下降到临界值以下时,组织发生急性缺血缺氧<sup>[12]</sup>,血液转移及血液动力学改变所引起的机体变化类似“缺血再灌注”的影响。组织缺血再灌注以及强烈的应激反应等均可引起机体氧自由基代谢异常<sup>[13]</sup>,从而引起肾结石的发生发展。MDA 水平可反映机体内脂质过氧化的程度,而 SOD 是在机体活性氧清除反应过程中发挥重要作用的抗氧化酶<sup>[14]</sup>。本实验大鼠暴露于加速度后,血和肾组织 MDA 较对照组显著升高 ( $P<0.01$ ),血、肾组织 SOD、GSH-Px、CAT 浓度显著降低 ( $P<0.01$ ),验证了加速度暴露不仅能直接导致氧自由基的产生,还能降低肾脏的 SOD 和 CAT 的活性,从而升高肾组织中氧自由基的水平,显著增加的氧自由基具有直接的细胞毒性而致肾损伤,并促进肾结石的发生及发展

综上所述,加速度暴露会促进肾小管内草酸结晶量的增加,其机制可能与加速度作用引起肾脏氧化应激损伤有关,建议临床上对暴露于持续性加速度的飞行人员采取相关防护措施。以上结论是在大鼠实验结果基础上的推测,飞行人员经受加速度暴露环境后,相关指标变化趋势是否与实验结果一致,还应进行进一步研究证实。

(下转第 31 页)



测方法。因此,将两者结合可使宫颈 CIN 和早期癌的筛查准确性明显提高<sup>[14]</sup>。本研究显示,单纯 TCT 检查阳性结果( $\geq$ ASC-US)与组织病理学诊断阳性结果( $\geq$ CIN I)的符合率为 82.4%,HPV DNA 检测阳性结果与组织病理学诊断的符合率为 77.2%,而 TCT 和 HPV DNA 联合检查与组织病理学诊断的符合率为 92.0%,其诊断灵敏度和特异度也高于单纯 TCT 检查或 HPV DNA 检测,这显示 TCT 联合 HPV DNA 检查明显优于 TCT 或 HPV DNA 单独检查的效果。HPV DNA 检测与 TCT 检查结果比较,差异无统计学意义;TCT 联合 HPV DNA 检测与单独 HPV DNA 检测及单独 TCT 检查结果比较,差异有统计学意义。这说明 TCT 联合 HPV DNA 检测在宫颈病变筛查中更具有实用价值,对提示宫颈上皮细胞癌变倾向,及时发现和预防、治疗早期宫颈癌有较大意义,同时可以减少不必要的阴道镜检查 and 宫颈活检,降低漏诊率和误诊率,减轻患者的经济负担,为临床提供更准确和具有实用价值的诊断。

# 【参考文献】

- [1] Burns A, Sanghvi H, Lu R, et al. Saving women's lives from cervical cancer[J]. Lancet, 2011, 377(9774): 1318.
- [2] 赵方辉,戎寿德,乔友林.宫颈癌及其癌前病变筛查方法现状[J].中国医学科学院院报,2007, 23(6): 638-641.
- [3] 周桂华,陈翠兰.液基薄层细胞学(ThinPrep)方法在宫颈癌筛

查中的应用[J].中国医师杂志,2004,6(11): 1566-1567.

- [4] 黄旭映,杨翠英,李艳萍,等.液基薄层细胞学检测在临床上的运用[J].检验医学与临床,2009,9(6): 734-735.
- [5] Neuzil KM, Canh do G, Thiem VD, et al. Immunogenicity and reactogenicity of alternative schedules of HPV vaccine in Vietnam: a cluster randomized noninferiority trial [J]. JAMA, 2011, 305(14): 1424-1231.
- [6] 朱皓峰,于晓红,杜丽英,等.宫颈癌中激活蛋白 1 通路的活化及临床意义[J].东南国防医药, 2014, 16(2): 128-131.
- [7] 刘丽静,任科,张忠梅.人乳头瘤病毒检测对诊治宫颈病变的价值研究进展[J].人民军医,2009, 52(7): 463-464.
- [8] 陈宝莲.HPV-DNA 检测筛查宫颈癌价值探讨[J].重庆医学, 2009, 38(7): 854-855.
- [9] 吴江平.妇科学查对筛查早期宫颈癌的临床意义[J].当代医学,2009, (9): 533-534.
- [10] Ngan HY, Garland SM, Bhatla N, et al. Asia oceania guidelines for the implementation of programs for cervical cancer prevention and control[J]. J Cancer Epidemiol, 2011, 2011: 794861.
- [11] Juric D, Mahovlić V, Rajhvajn S, et al. Liquid-based cytology- new possibilities in the diagnosis of cervical lesions [J]. Coll Antropol, 2010, 34(1): 19-24.
- [12] Skaznik-Wikiel ME, Ueda SM, Frasure HE, et al. Abnormal cervical cytology in the diagnosis of uterine papillary serous carcinoma: earlier detection of a poor prognostic cancer subtype? [J]. Acta Cytol, 2011, 55(3): 255-260.
- [13] Saito T. New staging system for uterine cervical neoplasms [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2011, 38(2): 207-210.
- [14] 邵红艺,张佳立,张江宇,等.比较人乳头瘤病毒检测与薄层液基细胞学在宫颈癌筛查中的应用价值[J].国际医药卫生导报,2007, 13(8): 8-11.

(收稿日期:2015-08-24; 修回日期:2015-10-29)

(本文编辑:齐名; 英文编辑:王建东)

(上接第 12 页)

# 【参考文献】

- [1] 郑杰,郭和清,潘广新,等.缺氧或+Gz 暴露对大鼠肾结石形成影响的实验研究[J].中华航空航天医学杂志,2012, 23(2): 98-101.
- [2] 刘永胜,郭和清,汪泽厚,等.1991~2007 年泌尿外科飞行员住院疾病谱分析[J].空军总医院学报,2009, 25(3): 134.
- [3] 金磊,徐斌先,向军吉,等.驻苏某飞行部队泌尿系结石相关因素调查和分析[J].东南国防医药,2014, 16(5): 529-530.
- [4] 孙斌,郭和清,李建业,等.飞行员肾脏小结石带石飞行初步观察[J].中华航空航天医学杂志,2013, 24(1): 40-42.
- [5] 魏日胞,王永新,詹皓,等.复方天葡片对高+Gz 应激致大鼠肾损伤的保护作用[J].中国中西医结合肾病杂志,2012, 13(3): 206-209.
- [6] Hirose M, Yasui T, Okada A, et al. Renal tubular epithelial cell injury and oxidative stress induce calcium oxalate crystal formation in mouse kidney[J]. Int J Urol, 2010, 17(1): 83-92.
- [7] Touhami M, Laroubi A, Elhabazi K, et al. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model[J]. BMC Urol, 2007, 7: 18.
- [8] 向松涛,甘澍周,建甫,等.广金钱草水提取液对肾尿酸钙结

石模型大鼠氧化应激的影响研究[J].中华泌尿外科杂志, 2014, 35(6): 465-468.

- [9] Davaios M, Konno S, Eshghi M, et al. Oxidative renal cell injury induced by calcium oxalate crystal and renoprotection with antioxidants: a possible role of oxidative stress in nephrolithiasis [J]. J Endourol, 2010, 24(3): 339-345.
- [10] Khan SR. Calcium oxalate crystal interaction with renal tubular epithelium, mechanism of crystal adhesion and its impact on stone development [J]. Urol Res, 1995, 23(2): 71-79.
- [11] Khan SR. Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stones [J]. Urol Res, 2006, 34(2): 86-91.
- [12] 刘建彬,王洪波,刘丽,等.离心机训练对大鼠脑及其它组织 IL-6 和 TNF- $\alpha$  基因表达水平的影响[J].中国生物化学与分子生物学报,2002, 18(5): 649-653.
- [13] 马良,胡敏,孙振宇,等.持续性高正加速度重复作用导致大鼠损伤的自然修复模型[J].军医进修学院学报,2005, 26(6): 401-403.
- [14] 蔡辉,赵凌杰,董晓蕾,等.吡格列酮对高脂血症大鼠 SOD 活性和 MDA 水平的影响[J].东南国防医药,2011, 13(2): 97-99.

(收稿日期:2015-10-18; 修回日期:2015-11-22)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)