

• 论著-实验研究 •

大鼠感染性结石模型的探索研究*

洪扬¹ 叶海云¹ 黄晓波¹ 张丰识¹ 安立哲¹ 马凯¹ 熊六林¹ 许清泉¹

[摘要] **目的:**使用奇异变形杆菌构建大鼠肾脏感染性结石模型。**方法:**尝试尿道插管将菌液注入膀胱、肾盂穿刺注入菌液及开腹膀胱注射菌液的方法,最后选择膀胱注射法。将34只雄性Wistar大鼠分为四组。实验组根据奇异变形杆菌计数分为 10^6 、 10^7 和 10^8 三组,每组10只大鼠。异氟烷吸入麻醉,取耻骨弓上方下腹部正中切口,切开腹腔,提起膀胱,使用无菌1 ml注射器于膀胱顶部将0.5 ml不同浓度的菌液注入膀胱内,然后退出针头,关闭腹腔,术后6 h恢复进食和饮水。空白对照组4只大鼠,每天普通饲养,膀胱内注入0.5 ml生理盐水。手术后4周以过量麻醉处死所有大鼠。取下腹部正中切口(约3 cm)进入腹腔,将大鼠肾脏、输尿管和膀胱分离。观察脏器大小、表面色泽及结石形成情况,并称量。获取的尿路组织标本置入4%多聚甲醛固定24 h,常规石蜡包埋组织标本。结石标本行红外光谱分析成分。**结果:**所有大鼠肾脏均未见结石形成。 10^8 组中5只大鼠膀胱内有结石形成,成石率为50%。结石成分分析表明结石成分均以六水磷酸镁铵、碳酸磷灰石为主。对照组、 10^6 组和 10^7 组大鼠膀胱内无结石形成。**结论:**奇异变形杆菌可在大鼠膀胱中形成感染性结石,而如何有效构建肾脏感染性结石模型有待进一步研究。

[关键词] 感染性结石;奇异变形杆菌;动物模型

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2019.10.013

[中图分类号] R691.4 **[文献标志码]** A

Establishment of infection stone in rat

HONG Yang YE Haiyun HUANG Xiaobo ZHANG Fengshi

AN Lizhe MA Kai XIONG Liulin XU Qingquan

(Urology and Lithotripsy Center, Peking University People's Hospital, Beijing, 100034, China)

Corresponding author: XU Qingquan, E-mail: xuqingquan@pkuph.edu.cn

Abstract Objective: To establish infection stone in rat bladder using *Proteus mirabilis*. **Method:** Thirty-four male Wistar rats were divided into 4 groups. The experimental group was divided into 3 groups according to the burden of *Proteus mirabilis* (10^6 , 10^7 and 10^8). Each experimental group has 10 rats. Under isoflurane inhalation anesthesia and the lower middle abdominal incision was performed, the bladder was showed and lift. A sterile syringe of 1 ml was used to inject different concentrations of bacterial solution in 0.5 ml. For rats in control group, 0.5 ml saline was injected. Each rat ate and drank water after 6-hour recovery. Four weeks after surgery, all rats were sacrificed by overdose anesthesia. The bladder was checked for stones. The urine from bladder was smeared for bacterium identification. The kidney and ureter were also taken. All these organs were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h and then processed for histological observation. **Result:** There was no renal stone in all rats. In group of 10^8 , bladder stones were found in 5 rats (50%). There was no bladder stones in group 10^6 , 10^7 or control group. Stone composition analysis showed that the major components were ammonium magnesium phosphate hexahydrate and carbonated apatite. **Conclusion:** Infection stone can be developed in rat bladder by injection of *Proteus mirabilis*. Further investigations are needed for establishing the model of kidney infection stone.

Key words infection stone; *Proteus mirabilis*; animal model

结石是泌尿外科常见疾病之一,其形成原因复杂,可能与代谢、泌尿系统解剖结构异常及尿路感染等因素有关^[1,2]。感染性结石占所有泌尿系结石的10%~15%^[3],也称为鸟粪石,通常是产尿素酶病原体引起尿路感染所造成的结果。感染性结石

最常见的致病性解脲酶菌为奇异变形杆菌,其产生的脲酶在感染性结石的发生中发挥重要作用^[4]。本研究的目的在于探索建立大鼠肾脏感染性结石模型的方法,为以后临床上感染性结石的预防和诊疗提供良好的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成年雄性Wistar大鼠34只,体重(180±10)g,由维通利华提供。大鼠均在中国疾病预防控制中心

*基金项目:北京大学人民医院研究和发基金(编号RDC2015-15)

¹北京大学人民医院泌尿与碎石中心(北京,100034)

通信作者:许清泉,E-mail:xuqingquan@pkuph.edu.cn

制中心动物实验中心的清洁级饲养室中饲养,可以自由获取食物及饮水,室温(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~60%。奇异变形杆菌由北京大学人民医院检验科微生物室提供。

1.2 菌液制备

在血琼脂平板上孵育奇异变形杆菌 24 h 后,从血琼脂平板上挑出单个菌落,用 5 ml 盐水制成悬液,涂片确定为奇异变形杆菌。在充足光线下,背对着有白色背景与黑色对比线条的卡片,将接种管与 0.5 号麦氏标准管进行目测比较,将菌液调至 0.5 麦氏浊度。此时菌液的浓度为 $1 \sim 2 \times 10^8$ CFU/ml,用盐水稀释 10 倍获得 10^7 CFU/ml 的菌液,再用盐水稀释 10 倍获得 10^6 CFU/ml 的菌液。

1.3 细菌植入方法的尝试和选取

大鼠经异氟烷吸入麻醉。首先,尝试尿道插管注入菌液,因大鼠阴茎弯曲角度大不能顺利置管而放弃该方法。其次,尝试肾盂穿刺注入菌液,取肋肋下切口,找到并游离肾脏,但大鼠输尿管及肾盂特别细小,无法显露获得稳定的细菌注入,因此放弃该方法。最后,选择膀胱直视下注射菌液,麻醉满意后腹部去毛以 1.5% 碘伏消毒,铺无菌手术巾。取耻骨弓上方下腹部正中切口,切开腹腔,提起膀胱,使用无菌 1 ml 注射器于膀胱顶部注射可以获得稳定的细菌注入。

1.4 动物分组与细菌植入

大鼠适应性饲养 7 d 后分组建模。Wistar 大鼠 34 只,分为四组。实验组根据细菌数量分为 10^6 、 10^7 和 10^8 三组,每组 10 只,异氟烷吸入麻醉后,采用直视下膀胱注射方法将不同浓度的菌液注入膀胱内,然后退出针头,关闭腹腔,术后 6 h 恢复进食和饮水。空白对照组 4 只,每天普通饲养,手术注入等量生理盐水。本研究经过北京大学人民医院医学伦理委员会批准。

1.5 标本获取及组织切片

手术后 4 周以过量麻醉处死所有大鼠。取下腹部正中切口进入腹腔。将大鼠肾脏、输尿管和膀胱分离。观察脏器大小、表面色泽及结石形成情况,并称重。获取的尿路组织标本置入 4% 多聚甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋切片。结石标本行红外光谱结石成分分析。

2 结果

所有大鼠肾脏均未见结石形成(图 1)。 10^8 组中有 5 只大鼠膀胱内有结石形成(图 2),成石率为 50%。 10^6 组、 10^7 组和对照组大鼠膀胱内均无结石形成。结石行红外光谱检测,报告结石成分以六水磷酸镁铵及碳酸磷灰石为主。实验中 10^6 、 10^7 组各有 2 只大鼠死亡。

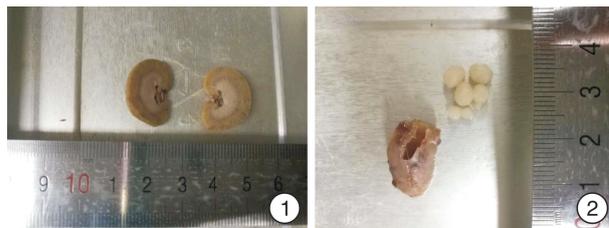


图 1 大鼠肾脏未见结石形成;图 2 大鼠膀胱内形成感染性结石

3 讨论

泌尿系结石主要包括代谢性结石和感染性结石,感染性结石占其中的 10%~15%。感染性结石可以在肾脏或膀胱中形成。当肾脏形成感染性结石时,约 15% 的结石是双侧结石^[5]。感染性结石是鹿角形结石形态学病因中最常见的一种,并且会在 4~6 周内迅速形成;而含钙结石形成时间可能超过 13 周^[6,7]。

感染结石的发病机制需要尿素、水、钙、镁、磷酸盐、尿液 pH $>6.8 \sim 7.2$ 、尿素酶等因素的参与。当存在脲酶时,水和尿素水解形成 CO_2 和氨;这些化合物进一步水解形成铵和碳酸氢盐。在尿液中存在天然存在的阳离子(如镁、钙和磷酸根阴离子)时,尿液 pH >7.2 则形成鸟粪石,而 pH $6.8 \sim 7.2$ 则形成碳酸磷灰石^[4]。感染性结石通常由 3 种成分的结晶(镁、铵和磷酸盐)形成。尿素分解产生氨和 CO_2 会使尿液 pH 值升高,通常从 7.2 上升到 8.0 左右。随后形成带有细菌或细胞内结晶的鸟粪石和磷灰石,然后迅速生长。如果结晶发生在细菌内,则在细菌溶解后形成微小结晶并促进结石的发生。另一方面,结晶发生在细菌周围,则认为细菌被包埋在结石中,那感染则存在于结石中。

感染性结石主要由可产生脲酶的细菌感染所致,奇异变形杆菌为常见致病菌之一。奇异变形杆菌是肠杆菌科的一种革兰氏阴性棒状杆菌,它能够产生脲酶将尿素分解为氨和 CO_2 ,使尿液 pH 值升高,磷酸盐溶解度降低析出形成结晶,继而形成结石^[8]。除了产生脲酶改变尿液 pH 值外,由于奇异变形杆菌感染所致的尿路上皮细胞受损后的病理生理改变在结石形成过程中也起了重要作用^[9]。本研究中膀胱中的感染性结石的结石成分分析结果以六水磷酸镁铵和碳酸磷灰石为主,与预期的结果相符。细菌注入膀胱后,高浓度的细菌侵入膀胱黏膜,受损的黏膜为细菌的增殖或结晶的附着提供部位。死菌及其碎片可沉积在膀胱上皮表面而加重膀胱黏膜的损伤,脱落的上皮细胞可降解为膜碎片与活性下降或死亡的奇异变形杆菌成为感染性结石的核心。

长久以来,为了研究感染性结石的具体机制及影响因素,人们建立了多种体内外模型来模拟奇异变形杆菌侵袭尿路上皮细胞的过程,体外模型主要应用奇异变形杆菌感染体外培养的尿路上皮细胞,观察细菌与细胞之间的相互作用^[10],无法完全模拟体内的微环境及尿流动力学变化;体内模型目前多为置入异物制造的动物模型^[11]。国内仅少量的感染性结石模型报道,均为大鼠膀胱感染性结石模型^[12,13]。目前尚缺乏一个有效的肾脏感染性结石模型。本研究拟采用奇异变形杆菌建立雄性大鼠的肾脏感染性结石模型,尝试了尿道置管、肾盂穿刺注射及直视下膀胱注射等方法,仅能通过直视下膀胱注射成功注入细菌,并建立膀胱感染性结石模型。但实验发现所有大鼠肾脏均未形成结石,膀胱内注射细菌之所以不能形成肾结石可能由于以下原因:①膀胱内感染时间相对较短,只有 4 周;②可能由于注入的奇异变形杆菌的负荷不是很大;③膀胱内注射的细菌在膀胱内定植存在不确定性,其形成逆行性上尿路感染的概率也很低。直接将菌液注入肾脏是较为理想的感染性结石模型,不过目前存在着一些技术难点,一般有 3 种方法:①逆行经尿道、膀胱、输尿管向肾脏内注入菌液,这是最符合感染性结石发病过程方法,但由于大鼠输尿管过细,无法在可视监测情况下进入膀胱、找到输尿管口上行;②在小型动物 B 超监测下行体外肾脏穿刺,将菌液注入肾盂,此方法在没有肾盂积水的情况下很难穿刺成功,且存在细菌进入血液导致感染性休克的风险;③开腹向肾盂内注射菌液,此方法可行性最高,不过根据以往经验来看,大鼠肾盂较小,注射菌液量较少,否则有因肾盂内压增高导致感染性休克可能,且麻醉手术会对大鼠免疫状态有一定影响。

综上所述,本研究尝试尿道置管、肾盂穿刺注射及直视下膀胱注射等方法探索建立感染性肾结石动物模型,最终只有通过直视下膀胱内注射 $(1\sim 2)\times 10^8$ CFU/ml 奇异变形杆菌成功建立了感染性膀胱结石模型,但未成功建立感染性肾结石动物模型。因此如何建立有效的肾脏感染性结石模型有待进一步研究。

[参考文献]

1 洪扬,许清泉,黄晓波,等.超声引导下经皮肾镜取石术

- 治疗肾盂憩室结石的安全性和有效性分析[J].临床泌尿外科杂志,2018,33(2):107-109.
- 2 洪扬,许清泉,黄晓波,等.经皮肾镜取石术治疗 14 岁以下小儿上尿路结石的疗效分析[J].临床泌尿外科杂志,2018,33(7):542-544,550.
- 3 Flannigan R,Choy W H,Chew B,et al. Renal struvite stones—pathogenesis, microbiology, and management strategies[J]. Nat Rev Urol,2014,11(6):333-341.
- 4 Bichler K H,Eipper E,Naber K,et al. Urinary infection stones[J]. Int J Antimicrob Agents,2002,19(6):488-498.
- 5 Schwartz B F,Stoller M L. Nonsurgical management of infection-related renal calculi[J]. Urol Clin North Am,1999,26(4):765-778.
- 6 Torzewska A,Rozalski A. Inhibition of crystallization caused by *Proteus mirabilis* during the development of infectious urolithiasis by various phenolic substances [J]. Microbiol Res,2014,169(7/8):579-584.
- 7 杨勇,姚启盛,王黎,等.可视穿刺经皮肾镜取石术治疗鹿角形肾结石术后残留结石[J].临床泌尿外科杂志,2017,32(9):698-702.
- 8 郭涛,明星,张岗,等.尿激酶对草酸钙晶体成长和聚集的抑制作用[J].临床泌尿外科杂志,2016,31(7):643-646.
- 9 Lu X,Gao B,Wang Y,et al. Renal tubular epithelial cell injury,apoptosis and inflammation are involved in melamine-related kidney stone formation [J]. Urol Res,2012,40(6):717-723.
- 10 Torzewska A,Budzynska A,Bialczak-Kokot M,et al. In vitro studies of epithelium-associated crystallization caused by uropathogens during urinary calculi development[J]. Microb Pathog,2014,71/72:25-31.
- 11 Janssen C,Lo J,Jäger W,et al. A high throughput,minimally invasive,ultrasound guided model for the study of catheter associated urinary tract infections and device encrustation in mice[J]. J Urol,2014,192(6):1856-1863.
- 12 吕建林,孙西钊,朱怀军.改良感染性膀胱结石大鼠模型的构建[J].中华医学杂志,2010,90(34):2433-2435.
- 13 刘永达,袁坚,曾国华,等.排石汤颗粒对大鼠膀胱感染性结石的影响[J].临床和实验医学杂志,2007,6(6):87-89.

(收稿日期:2018-06-09)