

• 实验研究 •

N-乙酰半胱氨酸抑制大鼠肾草酸钙
结石形成机制的研究张雍德¹ 刘春¹

[摘要] 目的:探讨 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对大鼠肾草酸钙结石形成的影响及机制,为临床预防尿路结石提供理论依据。**方法:**将 30 只健康清洁成年雄性 Wistar 大鼠先在相同环境下适应性喂养 1 周,然后随机分为 3 组:A 组(空白对照组)、B 组(单纯诱石组)、C 组(诱石+NAC 干预组)。A 组饮去离子水,B 组饮 1% 乙二醇的去离子水,C 组饮 1% 乙二醇去离子水,并给予 NAC 100 mg/(kg·d)灌胃。第 4 周处死大鼠,取出双肾,左肾纵向剖开,用 10% 甲醛固定,HE 染色石蜡切片,在 100、400 倍光镜下观察肾组织草酸钙结晶沉积情况,并进行分级及评分。右肾皮质制成 10% 的匀浆,检测丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)。全部实验数据通过 SPSS17.0 统计软件分析处理。**结果:**①肾脏结晶沉积情况分级及评分结果:与 B 组相比,C 组的肾脏结晶沉积评分明显降低($P<0.05$)。②MDA 检测结果:与 B 组相比,C 组的 MDA 含量降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。③SOD 检测结果:与 B 组相比,C 组的 SOD 含量增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。④A、B、C 三组肾组织结晶等级评分与 SOD 含量的相关系数为 $-0.499(P<0.01)$,结晶评分与 MDA 含量的相关系数为 $0.592(P<0.01)$ 。**结论:** NAC 可以通过其抗氧化作用抑制大鼠肾草酸钙结石的形成。

[关键词] 肾结石;N-乙酰半胱氨酸;超氧化物歧化酶;丙二醛

[中图分类号] R692.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2013)03-0222-04

Research the mechanism of N-acetyl cysteine inhibiting
renal calcium oxalate stone formation in rats

ZHANG Yongcai LIU Chun

(Department of Urology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001, China)

Corresponding author: LIU Chun, E-mail: sxtlyliuchun@126.com

Abstract Objective: To study the effect and mechanism of N-acetyl cysteine(NAC) on renal calcium oxalate stone formation in rats, For clinical prevention urinary stones provide theoretical basis. **Methods:** At first, 30 health clean adult male Wistar rats adaptability feeding 1 week in the same environment, then randomly divided into 3 groups($n=10$): group A(Blank control group), group B(stone forming group), group C(stone forming+NAC intervention group), group A drink deionized water, group B drink 1% glycol in deionized water, group C drink 1% glycol in deionized water, and to give NAC100 mg/(kg·d) by lavage. After feeding for 4 weeks, remove double kidney, left renal opened longitudinally, with 10% formaldehyde fixed, HE dyeing paraffin section, the deposit condition of calcium oxalate crystals in nephridial tissue was observed and scored by 100, 400 times light-microscopy. Right renal cortex made 10% of slurry, detection of MDA and SOD. All the experimental data analysis by SPSS17.0 statistical software. **Results:** ①Classification and score the deposit condition of calcium oxalate crystals in nephridial tissue; Compared with group B, group C of kidney crystal deposition score significantly decrease ($P<0.05$); ②MDA test results; Compared with group B, group C of MDA content decreased, difference have statistical significance($P<0.05$); ③SOD test results; Compared with group B, group C of SOD content increased, difference have statistical significance($P<0.05$); ④The correlation coefficient of score(deposit condition of calcium oxalate crystals in nephridial tissue) and SOD content is $-0.499(P<0.01)$, the correlation coefficient of score and MDA content is $0.592(P<0.01)$. **Conclusions:** NAC can inhibiting renal calcium oxalate stone formation in rat through its antioxidation.

Key words renal calcium; NAC; superoxide dismutase; malondialdehyde

泌尿系结石是泌尿外科常见疾病,具有较高的

发病率,尤其在在我国南方,是世界上三个主要泌尿系结石流行区之一^[1]。手术治疗后复发率高,泌尿系结石在治疗后 5 年内 1/3 患者会复发,严重影响

¹山西医科大学第一医院泌尿外科(太原,030001)
通信作者:刘春, E-mail: sxtlyliuchun@126.com

了人体健康。其中大约 80% 泌尿系结石由草酸钙组成。对于泌尿系结石的复发,目前临床缺少有效的预防手段,主要原因是泌尿系结石的发病机制很复杂。随着对尿石症形成机制的研究向细胞和分子水平的扩展,研究者逐渐发现肾脏病理改变,特别是肾小管上皮细胞的氧化损害,是尿石形成的最早期的基础病变^[2]。很多实验证明氧自由基与尿石的形成关系密切,这为尿石的预防提供了新的思路^[3]。近年来发现 N-乙酰半胱氨酸(NAC)具有强抗氧化作用,可干扰自由基的产生、清除体内已生成的自由基^[4]。我们采用动物实验的方法探讨 NAC 能否通过抗氧化作用抑制尿草酸钙结石的形成。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

去离子水(太原理工大学新材料工程技术研究中心)、丙二醛(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、考马斯亮蓝试剂盒均购于南京建成公司。选用 OLYMPUS-BX51 光学显微镜、HH-S4 型电热恒温水浴锅、JJ-20 型定时电动搅拌机、CENTRIFUGE80-2 离心机、可见光分光光度计。

1.2 实验动物、分组及给药方法

山西医科大学动物实验中心提供健康清洁成年雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重 180~220 g。第 1 周在相同环境中进行适应性喂养,然后随机分为 3 组,每组 10 只。A 组为空白对照组,继续使用标准常规饲料及去离子水,喂养 28 天;B 组为单纯诱石组,将乙二醇与去离子水按 1% 的比例进行配置,喂养 28 天,诱导大鼠肾草酸钙形成;C 组为 NAC 干预组,饮 1% 乙二醇的去离子水,并给予 NAC100 mg/(kg·d)灌胃,喂养 28 天。28 天后解剖大鼠,取出双肾,检测指标。

1.3 检测指标和方法

肾组织草酸钙结晶沉积情况及评分:处死大鼠,取出双肾,左肾纵向剖开,用 10% 甲醛固定,HE 染色石蜡切片,在 100、400 倍光镜下观察肾组织草酸钙结晶沉积情况,按文献标准^[5]进行分级(0 级:无任何结晶亮点;I 级:细小的结晶亮点,广泛但不成堆;II 级:结晶变粗大、成堆,但散在不连接;III 级:成堆结晶局部互相连接;IV 级:广泛成堆结晶,连接成片)。

MDA、SOD 检测:脂质过氧化物 MDA 是一种自由基,具有细胞毒性。SOD 属于抗氧化酶,能够清除自由基,具有细胞保护作用。取右肾皮质制成 10% 的匀浆,用硫代巴比妥酸(TBA)法检测 MDA;用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD^[6](具体操作方法按试剂盒说明书进行)。

1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析。

定量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组肾脏结晶沉积情况比较采用秩和检验,各组 SOD、MDA 比较采用方差分析,结晶评分与自由基水平关系用等级相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾组织草酸钙结晶沉积情况及评分(评分标准:各结晶等级×相对应的结晶结果数目之和)

肉眼观察:对照组大鼠肾脏表面光滑,大小、色泽正常,其它两组大鼠肾脏颜色苍白,均有不同程度的肿大,其中以结石组为明显。光学显微镜下观察:A 组肾小管结构正常,未见明显草酸钙结晶;B 组肾小管明显扩张,多数肾组织内存在无色透明的草酸钙结晶,大部分结晶聚集成堆,广泛分布;与 B 组相比,C 组肾小管管腔扩张情况减轻,草酸钙结晶沉积情况明显减少,且结晶细小(图 1)。其评分见表 1。

表 1 各组大鼠肾组织草酸钙结晶的等级分布及评分

组别	结晶分级					结晶评分
	0	I	II	III	IV	
A 组	10	0	0	0	0	0
B 组	0	2	4	3	1	23
C 组	1	7	1	1	0	12

2.2 各组大鼠肾组织 SOD、MDA 检测结果 详见表 2。

表 2 各组大鼠肾组织自由基水平 $\bar{x} \pm s$

组别	SOD/ U·mg	SOD 增幅 /%(与 B 组相比)	MDA/ nmol·mg	MDA 降幅 /%(与 B 组相比)
A 组	195.21±11.01	14.7	2.74±0.48	39.2
B 组	170.23±13.59		4.51±1.47	
C 组	188.71±17.25	10.9	3.00±0.78	33.5

注:B 组与 A、C 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);A 组与 C 组相比,差异无统计学意义

2.3 肾组织结晶评分与自由基的关系

各组肾小管结晶等级评分与肾组织自由基水平关系密切,结晶评分与 SOD 活性的相关系数为 $-0.499(P < 0.01)$,结晶评分与 MDA 含量的相关系数为 $0.592(P < 0.01)$ 。

3 讨论

在正常情况下,肾小管尿液中新生的草酸钙结晶很快被尿流冲走,无法停留聚集形成结石。因此,在结石形成过程中,草酸钙结晶滞留在肾小管内是必要的前提条件^[7]。研究发现,当肾小管上皮细胞遭到致病因素破坏时,草酸钙结晶能黏附于肾

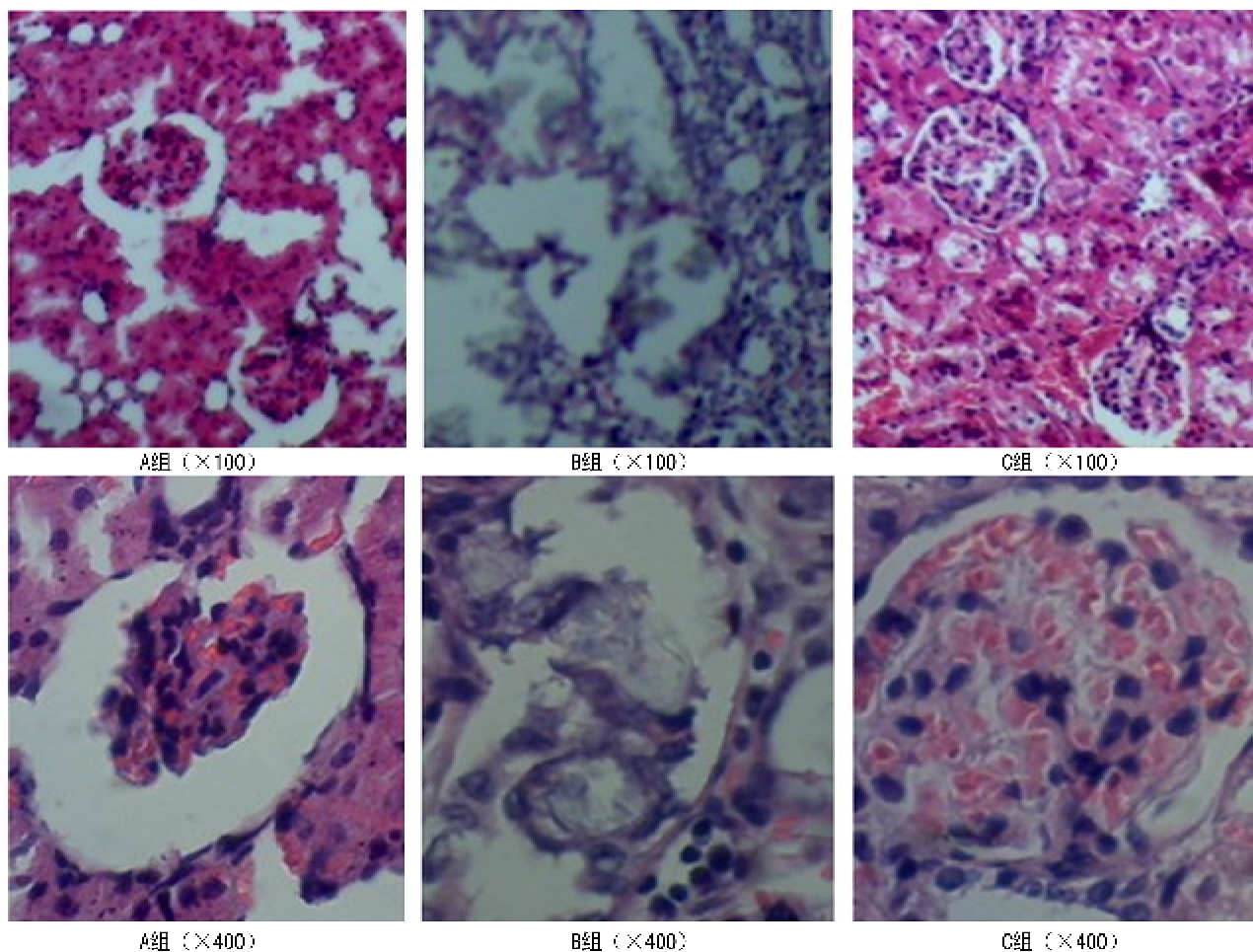


图 1 肾组织切片(HE 染色)

小管内壁,进而形成结石^[8]。高浓度尿酸能使肾小管上皮产生大量的自由基,从而损伤肾小管上皮细胞,造成结晶黏附于受损的肾小管内壁^[9]。本实验给大鼠饮用诱石剂后,肾组织 MDA 含量增加了 1.65 倍, SOD 含量降低了 12.8%, 肾小管结晶评分明显增加。

NAC 是谷胱甘肽(GSH)合成前体,为一含巯基化合物,以往多将其作为黏液溶解剂,是一种疗效良好而且安全的呼吸道感染用药中的祛痰剂^[10]。近年来发现 NAC 具有强抗氧化作用,具有干扰自由基生成、清除已生成的自由基、调节细胞的代谢活性、预防 DNA 的损伤、调整基因的表达和信号转导系统、抗细胞凋亡、抗血管生成、抑制恶性肿瘤发展、抑制新生物的生成和转移等作用^[4]。近年研究表明, NAC 作为巯基供体,具有强抗氧化作用,对肝脏损伤、肾脏损伤、心肌损伤、肺脏损伤、胃肠损伤、听力损伤、中枢神经系统损伤具有保护作用^[11~14],在临床和实验中均得到广泛应用。在泌尿系统的相关研究中, NAC 的研究主要集中于对肾脏的保护作用,如造影剂肾病、MODS^[15,16]等。

本实验用 NAC 对结石大鼠进行干预后,与结石组大鼠相比,肾组织 MDA 含量降低了 33.5%, SOD 含量增加了 10.9%, 肾小管结晶评分明显减

小。由于本实验 A、B、C 三组的 SOD、MDA 含量与肾小管结晶评分密切相关,提示氧自由基在肾结石的形成过程中有重要作用。

本实验结果表明, NAC 可以明显减少诱石剂诱导的大鼠肾草酸钙结石的形成,其作用机制是通过其抗氧化作用,抑制自由基的产生,改善肾组织的抗氧化能力,拮抗自由基对肾组织的损伤,进而抑制结石的形成。但对 NAC 使用的剂量及疗程有待进一步研究。

[参考文献]

- 1 叶章群,邓耀良,董诚等主编. 泌尿系结石[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,2010:24.
- 2 沈绍基,吴阶平,夏同礼,等. 肾结石形成过程中肾病理和超微结构的变化—动物实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 1986, 7(1):10.
- 3 杜杏坤,王幸栓. 自由基与草酸钙尿石形成的相关性实验研究[J]. 现代中西医结合杂志,2011, 20(9):1063—1064.
- 4 De Backer W A, Amsel B, Jorens P G, et al. N-acetylcysteine pretreatment of cardiac surgery patient influence splasma neutrophil elastase and neutrophil influx in bronchoalveolar lavage fluid[J]. Intensive Care Med, 1996, 22(9):900.
- 5 安瑞华,冯陶,郭应禄,等. 香豆素对实验性大鼠草酸钙

- 结石形成的影响[J]. 中华泌尿外科杂志, 1994, 15: 209—211.
- 6 赵克然. 氧自由基过多的诊断及治疗[M]. 见: 赵克然, 杨毅军, 曹道俊主编. 氧自由基与临床. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 490—527.
- 7 Finlayson B, Reid E. The expectation of free and fixed particles in urinary stonedisease [J]. Invest Urol, 1978, 15: 442—448.
- 8 Itoh Y, Yasui T, Okada A, et al. Examination of the anti-oxidative effect in renal tubular cells and apoptosis by oxidative stress[J]. Urol Res, 2005, 33(4): 261—266.
- 9 Huang H S, Ma M C, Chen C F. Lipid peroxidation and its correlations with urinary levels of oxalate, citric acid, and osteopontin in patients with renal calcium oxalate stones[J]. Urology, 2003, 62: 1123—1128.
- 10 李长生, 杨炯, 李清泉, 等. 乙酰半胱氨酸胶囊止咳祛痰作用的临床研究[J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(11): 676.
- 11 周晓燕, 张建福, 张咏梅. NAC 对器官缺血/再灌注损伤保护作用的研究进展[J]. 徐州医学院学报, 2009, 29(7): 478—481.
- 12 Baniasadi S, Eftekhari P, Tabaris P, et al. Protective effect of N-acetylcysteine on antituberculosis drug-induced hepatotoxicity[J]. Eur J Gastroenterol, 2010, 22(10): 1235—1238.
- 13 宋健文, 刘增甲, 谭晓辉, 等. N-乙酰半胱氨酸减轻大鼠纹状体甲基苯丙胺神经毒性[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(6): 765—769.
- 14 陈远华, 徐德祥, 赵磊, 等. N-乙酰半胱氨酸在脂多糖诱发的胚胎损害中的双向作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(11): 1446—1449.
- 15 戴宁, 吴华, 李天慧, 等. N-乙酰半胱氨酸对碘海醇诱导肾小管上皮细胞损伤的保护作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2010, 26(5): 370—375.
- 16 谢伟霖, 蒋更如, 尤新民, 等. N-乙酰半胱氨酸对多器官功能障碍综合征大鼠器官的保护作用及其机制[J]. 上海医学, 2009, 32(11): 987—991.

(收稿日期: 2012-12-02)

(上接第 219 页)

性膀胱与高顺应性膀胱相比, 差异无统计学意义($\chi^2=2.3687, P>0.05$), 提示低顺应性膀胱与高顺应性膀胱对肾功能的损害有相同的危险。因此, 研究结果提示良性前列腺增生患者膀胱顺应性异常与其肾功能的损害具有相关性。

本组研究表明膀胱逼尿肌收缩力异常与膀胱逼尿肌收缩力正常相比, 肾功能损害的发生, 差异无统计学意义($P>0.05$)。膀胱逼尿肌收缩无力与膀胱逼尿肌收缩力正常相比, 差异无统计学意义($P>0.05$)。膀胱逼尿肌收缩力增强与膀胱逼尿肌收缩力正常相比, 差异无统计学意义($P>0.05$)。膀胱逼尿肌收缩力增强与膀胱逼尿肌收缩无力相比, 差异无统计学意义($P>0.05$)。本组研究结果提示良性前列腺增生患者膀胱逼尿肌收缩力异常与其肾功能的损害无相关性, 这可能由于排尿期时间短暂, 相对于储尿期而言, 膀胱逼尿肌收缩不能引起持续的膀胱内高压, 因此, 其对肾功能影响相对较小。此外, 本组研究的样本相对较小, 可能需要大样本的研究来进一步明确。

综上所述, BPH 患者膀胱顺应性异常(低顺应性或高顺应性)与其肾功能的损害具有相关性, 而膀胱逼尿肌收缩力异常与其肾功能的损害无相关性。

[参考文献]

- 1 王国民, 许伟刚. 上海市良性前列腺增生症危险因素调查[J]. 上海预防医学, 1997, 15: 107—110.
- 2 Mc Connell J D. Epidemiology, etiology, pathophysiology and diagnosis of benign prostatic Hyperplasia [M]. 见: 沃尔什主编. 坎贝尔泌尿外科学. 第 7 版. 北京: 科学出版社, 2001: 1429—1452.
- 3 吴阶平主编. 吴阶平泌尿外科学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2004: 1789.
- 4 金锡御, 宋波主编. 临床尿动力学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 59—61.
- 5 那彦群, 叶章群, 孙光主编. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南(2011 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 116—117.

(收稿日期: 2012-07-23)