

不同剂量化学纯三聚氰胺诱发 SD 大鼠尿结石的比较

张薇¹, 陈苑², 邹移海^{2*}, 陈嘉², 张钟广², 梁韦波², 高伟²,
何国振², 林以理¹, 黎福荣¹, 郭学军², 符路娣², 伍军军²

(1. 中山大学实验动物中心, 广州 510080; 2. 广州中医药大学实验动物中心, 广州 510405)

[摘要] 目的: 探讨建立不合并肾损害的尿结石模型。方法: 100 只雄性 SD 大鼠, 随机分 5 组, 空白对照组、化学纯三聚氰胺 0.4~0.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组, 连续给药 20, 30 d, 观察比较结石形成率、肾功能损害情况。结果: 0.4, 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 化学纯三聚氰胺给药 20, 30 d, 膀胱结石率最高, 20 d 分别为 60%, 50%, 30 d 分别为 50%, 60%, 两组及与 0.6, 0.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组、空白对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$); 膀胱结石形成率与剂量、时间不成线性关系; 各组比较仅 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组肾和膀胱指数、肌酐、尿素氮、尿酸与空白对照组比较, 无显著性差异。结论: 化学纯三聚氰胺 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹ 给药 20 d 对肾脏几乎不造成损害, SD 大鼠膀胱结石率达 60%, 可建立不合并肾损害的尿结石模型。

[关键词] 尿结石模型; 三聚氰胺; 膀胱结石; 大鼠

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0102-04

Different Doses of Chemical Pure Melamine-induced SD Rats Comparison of Urinary Stone

ZHANG Wei¹, CHEN Yuan², ZOU Yi-hai^{2*}, CHEN Jia², ZHANG Zhong-guang², LIANG Wei-bo²,
GAO Wei², HE Guo-zhen², LIN Yi-li¹, LI Fu-rong¹, GUO Xue-jun², FU Lu-di², WU Jun-jun²

(1. Laboratory Animal Center of Sun Yat-sen University, Gungzhou 510080, China;

2. Laboratory Animal Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Gungzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the establishment of non-renal injury model of urinary stone. **Method:** One hundred SPF male SD rats were divided randomly into five groups. We administrated the animals chemical pure melamine 0.4-0.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ continuously 20 d and 30 d, then observed and compared the rate of stone formation and renal damage. **Result:** Administration of chemical pure melamine 0.4, 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹, 20, 30 d, gained the highest rate of bladder stones formation, respectively, 60% and 50% in 20 d, 50% and 60% in 30 d. The difference of rate of bladder stones formation between group 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹ and 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹, and between group 0.4, 0.5 and 0.6, 0.7 g·kg⁻¹·d⁻¹, blank control group were significant ($P < 0.05$). Rate of bladder stone formation was not correlated with the increase in dose and time. The group 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹ is the only group that has no significant difference in the compare of renal and bladder index, creatinine, urea nitrogen, uric acid with the control group. **Conclusion:** Administration of chemical pure melamine 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹ did not cause kidneys injury and was able to induce high rate of SD rat bladder stone formation (60%). So this method is suitable for the establishment a non-renal injury model of urinary stones.

[Key words] urinary stone model; melamine; bladder stone; rats

[收稿日期] 20100917(003)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)课题(2005CB523502); 广东省科技基础条件建设项目(2009B060300003); 广州市科技计划项目(2009J1-C461)

[第一作者] 张薇, 硕士, 高级实验师, 从事中西医结合基础和实验动物学研究, E-mail: zwygqj@163.com

[通讯作者] * 邹移海, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合基础和实验动物学研究, E-mail: zouyihai@gzhtcm.edu.cn

工业用三聚氰胺在诱发大鼠尿结石的同时,也对大鼠造成了不同程度的肾功能损害,而临床尿结石患者往往在肾功能损害未出现时已表现结石相关症状或体检发现而进行诊断治疗,患者多不合并肾脏损害和酸中毒。而合并肾脏损害的模型给结石机制的探讨、药物的筛选研究增加更为复杂的因素,不利于客观探讨和评价结石形成机制、药物预防及治疗疗效等。为此,我们用不同剂量的化学纯三聚氰胺进行诱发大鼠尿结石模型的实验研究。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠100只,体重(214±10)g,购于广州中医药大学实验动物中心,许可证号SCXK(粤)2008-0020。动物实验在广州中医药大学实验动物中心屏障环境实验室进行,许可证号SCXK(粤)2008-0001。

1.2 三聚氰胺 三聚氰胺由国药集团化学试剂有限公司生产,化学纯试剂,纯度99.0%,批号20081016。用10 g·L⁻¹甲基纤维素将三聚氰胺等比稀释分别配制成80,100,120,140 g·L⁻¹的溶液。

2 方法

在前期工作中^[1]用1.5,1.0,0.5 g·kg⁻¹给药20 d,结果发现肾脏肿胀,剖面有黄色条索状沉淀物,分布在肾皮质和髓质,部分沉淀物已聚集成片状或颗粒状,并在肾皮质与髓质之间积聚成黄色弧形光环,0.5 g·kg⁻¹组结石发生率较高,与传统的诱石剂相同,剂量与结石发生率不成线形关系。且大鼠血清肌酐(CREA)、尿素氮(BUN)含量显著升高,与空白对照组比较,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。表明该剂量段的三聚氰胺连续给药导致肾脏功能受损,故应考虑使用0.5 g·kg⁻¹左右的剂量造模,以降低三聚氰胺的毒性,并提高成模率。

2.1 分组和给药 将大鼠随机分成A,B,C,D,E组,A~D4组分别按照0.4,0.5,0.6,0.7 g·kg⁻¹·d⁻¹剂量连续灌胃三聚氰胺,E组(空白对照组)灌胃无菌水1 mL/只/d,给药时间20,30 d。实验期间动物自由采食和饮水。

2.2 观察指标 每天观察记录大鼠的一般情况,如毛发、饮食、活动、精神状态和死亡情况。于连续给药第20,30天,5组各取10只大鼠;禁食12 h,乙醚麻醉后行眼眶静脉丛采血,应用Olympus 1000型生化全自动分析仪检测尿酸(UA),CREA,BUN含量。继而切开颈部血管放血,解剖观察和取材,称量肾脏

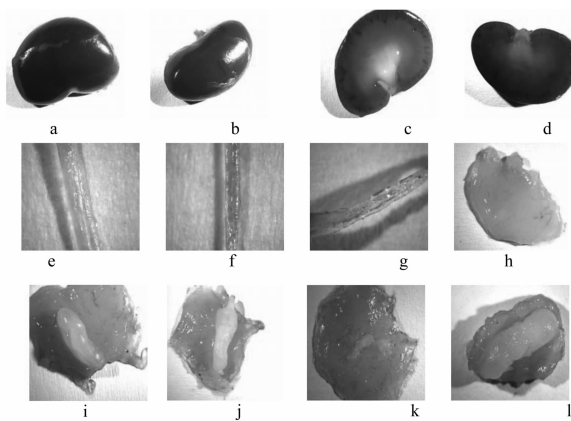
和膀胱质量,计算脏器指数。取左肾做冠状剖面,剖开膀胱,使用日本Olympus体视显微镜系统(型号SZ61),对肾脏、输尿管、膀胱进行观察。解剖后的动物尸体放低温冰箱保存。

2.3 统计学方法 采用SPSS 10.0统计软件进行统计学处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 0.7 g·kg⁻¹组1只大鼠在给药第23天死亡。给药部分大鼠出现消瘦、疲倦、毛松等现象。大鼠尿液从淡黄色逐渐转为深褐色、深黄色,粪便为颗粒状。

3.2 膀胱结石率 给药20 d,0.4,0.5 g·kg⁻¹组膀胱结石率最高,分别为6,5例(结石率60%,50%),两组比较及与0.6,0.7 g·kg⁻¹组比较差异有显著性($P < 0.05$);0.6,0.7 g·kg⁻¹和空白对照组膀胱结石20%,0%,0%。给药30 d,0.4,0.5 g·kg⁻¹组膀胱结石分别为5例,6例(结石率50%,60%),两组比较及与0.6,0.7 g·kg⁻¹组比较,有显著性差异($P < 0.05$);0.6,0.7 g·kg⁻¹和空白对照组膀胱结石30%,44%,0%;膀胱结石形成率与剂量、时间不成线形关系(表1,图1)。



a. 空白对照组全肾;b. 0.4 g·kg⁻¹组全肾;c. 空白对照组右肾剖面;d. 0.4 g·kg⁻¹组左肾剖面;e. 空白对照组输尿管;f. 0.4 g·kg⁻¹组输尿管;g. 0.5 g·kg⁻¹组输尿管;h. 空白对照组膀胱;i. 0.4 g·kg⁻¹组雄鼠膀胱结石;j. 0.5 g·kg⁻¹组雄鼠膀胱结石;k. 0.6 g·kg⁻¹组雄鼠膀胱结石;l. 0.7 g·kg⁻¹组雄鼠膀胱结石

图1 给药20 d各组肾脏、膀胱和输尿管体视镜(大体)观察(全肾0.67×200,肾剖面0.8×200,输尿管4.5×200,膀胱1.0×200)

表 1 不同剂量三聚氰胺给药 20,30 d 膀胱结石发生情况

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	给药 20 d		给药 30 d	
		n	结石/例(%)	n	结石/例(%)
A	0.4	10	6(60)	10	5(50)
B	0.5	10	5(50)	10	6(60)
C	0.6	10	2(20)	10	3(30)
D	0.7	10	0(0)	9	4(44)
E	0	10	0(0)	10	0(0)

注:结石颜色为白色或淡黄色。

3.3 肾和膀胱损害情况

3.3.1 肾和膀胱的脏器指数比较 三聚氰胺给药

表 2 三聚氰胺连续给药 20,30 d 各组大鼠肾脏和膀胱脏器指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	左肾脏器指数		右肾脏器指数		膀胱脏器指数	
		20 d	30 d	20 d	30 d	20 d	30 d
A	0.4	0.38 ± 0.06	0.35 ± 0.03	0.38 ± 0.06	0.36 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01
B	0.5	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.05	0.41 ± 0.06	0.40 ± 0.04 ¹⁾	0.07 ± 0.02 ²⁾	0.06 ± 0.01 ²⁾
C	0.6	0.39 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.41 ± 0.07	0.39 ± 0.04	0.07 ± 0.02 ²⁾	0.05 ± 0.01 ¹⁾
D	0.7	0.40 ± 0.05	0.40 ± 0.07 ¹⁾	0.40 ± 0.06	0.38 ± 0.04	0.07 ± 0.02 ¹⁾	0.06 ± 0.02 ²⁾
E	0	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01

注:与 E 组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

3.3.2 尿素氮、肌酐和尿酸比较 三聚氰胺给药 20 d, 0.7 g·kg⁻¹ 组尿素氮、肌酐和尿酸均高于空白对照组, 有显著性差异 (P < 0.05); 0.4 ~ 0.6 g·kg⁻¹ 组与空白对照组比较, 无显著性差异; 三聚氰胺给药 30 d, 0.5 g·kg⁻¹ 组尿素氮和尿酸均高于空白对照组, 0.4, 0.6, 0.7 g·kg⁻¹ 组尿素氮、肌酐和尿酸与空白对照组比较, 无显著性差异 (图 2)。

4 讨论

尿结石的病因形成过程复杂, 涉及到社会环境、自然环境、种族遗传、饮食习惯、代谢异常、疾病、用药、泌尿系异物等因素。随着全球经济和工业化的日益发展, 化学污染将是人类必须重视的课题。食物污染导致的疾病成为威胁人类健康的严重问题; 其致癌性、致突变性将更严重的影响到人类正常繁衍和后代的健康。因此, 模拟食品污染诱发的疾病动物模型, 能为人类控制食品污染, 解决污染诱发的疾病提供研究基础和防治依据。

尿结石模型研究包括体外和体内两部分。体外实验主要在凝胶体系、有序分子膜体系、尿液体系等体外模拟体系中进行, 可以观察到结石成核、生长情况, 以及各种物质对结石生长的影响。但体外模拟条件不能全面反映体内真实环境, 多数实验停留在对现象的观察, 实验结果还不能有效的指导临床实践^[2]。体内实验主要使用肾草酸钙结石模型、肾磷酸钙结石模型、尿酸及尿酸盐结石模型、磷酸美铵结

20 d, 0.4 ~ 0.7 g·kg⁻¹ 组左右肾与空白对照组比较, 无显著性差异。三聚氰胺给药 30 d, 左肾 0.7 g·kg⁻¹ 组脏器指数高于空白对照组, 比较有差异 (P < 0.05), 0.4 ~ 0.6 g·kg⁻¹ 组与空白对照组比较, 无显著性差异; 右肾 0.5 g·kg⁻¹ 组脏器指数高于空白对照组, 比较有差异 (P < 0.05), 0.4, 0.6, 0.7 g·kg⁻¹ 组与空白对照组比较, 无显著性差异。0.5 ~ 0.7 g·kg⁻¹ 组给药 20, 30 d, 膀胱指数高于空白对照组 (P < 0.05)。0.4 g·kg⁻¹ 组肾、膀胱指数与空白对照组比较均无显著性差异, 提示 0.4 g·kg⁻¹ 药剂量组对肾和膀胱组织损害较小 (表 2)。

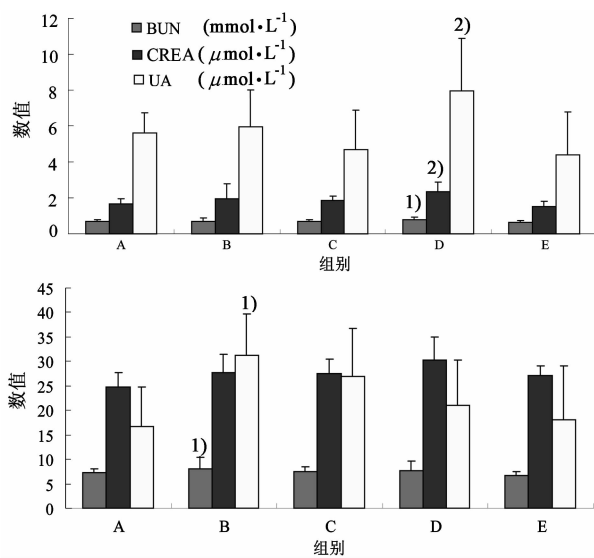


图 2 三聚氰胺给药 20,30 d 血 BUN, CREA, UA 比较
A 组. 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹; B 组. 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹;
C 组. 0.6 g·kg⁻¹·d⁻¹; D 组. 0.7 g·kg⁻¹·d⁻¹; E 组. 空白对照;
与空白组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01

图 2 三聚氰胺给药 20,30 d 血 BUN, CREA, UA 比较

石模型等动物模型进行研究^[3]。体内实验模型中部分动物模型在成模的同时, 发生肾功能损害和酸中毒, 且晶体主要沉积在肾皮质、造模时间长等问题。而临床尿结石患者往往在肾功能损害未出现时已表现结石相关症状或体检发现而进行诊断治疗, 患者多不合并肾脏损害和酸中毒。因此, 这些模型合并症的出现不利于客观的进行结石机制、临床治疗、药

物筛选等研究。

国际化学品安全卡指出^[4],长期或反复大量摄入三聚氰胺可能对肾与膀胱产生影响,导致产生结石。Hua A K等^[5]指出,三聚氰胺被添加在食物中以提高检验结果中蛋白质的含量,结果可能导致尿结石、慢性肾功能衰竭、膀胱癌。Okumura M等(1992)^[6]分别在大鼠饲料中加入3%,1%,0.3%三聚氰胺,连续喂饲6周龄F344雄性大鼠36周,再用正常饲料喂饲4周,大鼠膀胱结石出现率分别为90%,100%,70%。Melnick R L等^[7](1984)给雄性小鼠喂饲含一定量三聚氰胺饲料,诱发膀胱结石。虽然国外学者发现三聚氰胺可诱发大鼠和小鼠膀胱结石,但未对结石模型进行规范化造模方法研究,且该模型存在造模时间过长(36周),饲料喂饲造成给药剂量不均一等问题。

本研究在前期工作中^[8]工业原料三聚氰胺连续给药诱发SD大鼠尿结石,0.4 g·kg⁻¹组给药20,30 d可成功诱导大鼠膀胱结石,结石形成率60%,但肌酐、尿素氮、尿酸高于空白对照组,表明该剂量的工业原料三聚氰胺在形成结石模型的同时,对肾脏造成一定程度的损害。2007年Puschner等^[9]和2008年Dobson等^[10]的研究分别证明了,单独给予三聚氰胺或三聚氰酸不影响猫和SD大鼠的肾功能,而联合给予三聚氰胺与三聚氰酸在48 h内造成急性肾衰。工业原料三聚氰胺有可能含有其同系物如三聚氰酸等,加重了其对肾脏的毒性。因此,我们选择化学纯三聚氰胺0.4~0.7 g·kg⁻¹·d⁻¹剂量段进行造模。实验显示,纯度99.0%的三聚氰胺诱发SD大鼠结石生成率与剂量、时间不成线形关系,而随着剂量的增大,对肾脏的毒性加重;对各组结石率的比较,以0.4,0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹分别在20,30 d结石率最高达60%,但0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹在给药20,30 d,肾、膀胱脏指数以及血液尿素氮、肌酐和尿酸与空白对照组比较差异无显著性,而0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹给药30 d时尿素氮和尿酸均高于空白对照组。血CREA, BUN升高是肾功能受损的重要观察指标。结果表明用0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹化学纯三聚氰胺给药20 d比0.5~0.7 g·kg⁻¹·d⁻¹以及工业原料三聚氰胺0.4 g·kg⁻¹·

d⁻¹剂量组^[8]对肾脏的毒性低,0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹化学纯三聚氰胺20 d,SD大鼠没有表现肾组织和功能损害的指征,可以成功模拟临床造成不合并肾损害尿结石的疾病模型,可为尿结石机制和治疗研究提供良好的研究模型。同时,该实验表明工业原料三聚氰胺、化学纯三聚氰胺均可诱发SD大鼠尿结石,但前者对肾脏的毒性较后者大,其原因是否是三聚氰胺及其同系物的协同毒性作用尚需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 邹移海,张薇,张钟广,等. 三聚氰胺诱发SD大鼠泌尿系结石初步观察[J]. 广州中医药大学学报,2009,26(1):95.
- [2] 朱军,沈玉华,谢安建,等. 草酸钙型泌尿系结石的研究进展[J]. 化学世界,2007(3):175.
- [3] 叶章群,邓耀良,董诚. 泌尿系结石[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:7.
- [4] 王娟娟,陈凯,朱小蕾. “宠物毒粮”中的假冒蛋白质——三聚氰胺[J]. 化学教育,2008(8):4,22.
- [5] Hau A K, Kwan T H, Li P K. Melamine toxicity and the kidney[J]. J Am Soc Nephrol,2009,20(2):245.
- [6] Okumura M, Hasegawa R, Shirai T, et al. Relationship between calculus formation and carcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the non-genotoxic agents thymine or melamine[J]. Carcinogenesis,1992,13(6):1043.
- [7] Melnick R L, Boorman G A, Haseman J K, et al. Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents[J]. Toxicol Appl Pharmacol,1984,72(2):292.
- [8] 邹移海,敖海清,张薇,等. 三聚氰胺诱泌尿系结石大鼠模型研究[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(7):5.
- [9] Puschner B, Poppenga R H, Lowenstine L J, et al. Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats[J]. J Vet Diagn Invest,2007,19(6):616.
- [10] Dobson R L, Motlagh S, Quijano M, et al. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs[J]. Toxicol Sci,2008,106(1):251.

[责任编辑 邹晓翠]