

# 实验性大鼠肾草酸钙结石造模方法筛选研究

赖海标<sup>1</sup>, 刘朝晖<sup>1</sup>, 吴松<sup>1</sup>, 欧秀华<sup>2</sup>, 顾向明<sup>1</sup>, 王书芹<sup>1</sup>, 高玉桥<sup>1</sup>,

林慧<sup>1</sup>, 汪芸<sup>1</sup>, 戴卫波<sup>1</sup>, 范文昌<sup>1</sup>, 丘兰英<sup>1</sup>, 林家乐<sup>1</sup>, 梅全喜<sup>\*1</sup>

(1. 中山市中医院, 广东 中山 528400; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 筛选一种方法简便、稳定、成石效果好的实验性大鼠肾草酸钙结石造模方法。方法: 采用几种目前常用的实验性大鼠肾草酸钙结石造模方法(造模 I 组: 1% 乙二醇饮水 + 2% 氯化铵每天 ig 2 mL/只; 造模 II 组: 1.25% 乙二醇 + 1% 氯化铵, ig 20 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>; 造模 III 组: 每只每天饮用 1.25% 乙二醇 + 1% 氯化铵 10 mL, 水 30 mL; 造模 IV 组: 1% 乙二醇 + 1% 氯化铵自由饮用)进行造模, 并进行各组尿液、血液和肾组织中的多项生化指标【尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)、无机磷(IP)、Ca<sup>2+</sup>、草酸(OX)】检测以及肾脏病理标本观察, 综合评价造模效果。结果: 造模 I 组的 24 h 尿液中的 BUN, Cr, UA, IP, Ca<sup>2+</sup>, OX 均高于正常对照组(V组), 且统计学上有极显著性差异( $P < 0.01$ ); 血液中 BUN, Cr, UA, IP, Ca<sup>2+</sup> 均高于正常对照组, 且统计学上有极显著性差异( $P < 0.01$ ); 肾组织中 Ca<sup>2+</sup> 和 OX 均高于正常对照组, 且统计学上有极显著性差异( $P < 0.01$ ); 肾组织可见大量草酸钙结晶沉积。造模 II 组和造模 III 组的多项生化指标结果显示大鼠的肾功能下降, 但肾组织中未见结晶, 仅发现肾间质血管充血。造模 IV 组大鼠全部死亡。结论: 造模 I 组为最佳造模方法。

**[关键词]** 草酸钙; 肾结石; 动物模型; 大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0135-04

## Comparison of Experimental Renal Calculus of Calcium Oxalate in Rats

LAI Hai-biao<sup>1</sup>, LIU Zhao-hui<sup>1</sup>, WU Song<sup>1</sup>, OU Xiu-hua<sup>2</sup>, GU Xiang-ming<sup>1</sup>, WANG Shu-qin<sup>1</sup>, GAO Yu-qiao<sup>1</sup>,  
LIN Hui<sup>1</sup>, WANG Yun<sup>1</sup>, DAI Wei-bo<sup>1</sup>, FAN Wen-chang<sup>1</sup>, QIU Lan-ying<sup>1</sup>, LIN Jia-le<sup>1</sup>, MEI Quan-xi<sup>\*1</sup>

(1. Hospital of Traditional Chinese Medicine of Zhongshan, Zhongshan 528400, China;  
2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To select a simple, stable and satisfied experimental model of renal calcium oxalate calculus in rats. **Method:** After several renal calcium oxalate calculus models currently used (Model group I: administered intragastrically with 1% ethylene glycol free drink + 2% ammonium chloride 2 mL/rat per day; model Group II: administered intragastrically with 1.25% ethylene glycol + 1% ammonium chloride 20 mL·kg<sup>-1</sup> per day; model group III: drank 10 mL 1.25% ethylene glycol + 1% ammonium chloride and 30 mL water per day; model group IV: drank 1% ethylene glycol + 1% ammonium chloride freely.) experimental rat models were developed. Several biochemical indicators [urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), uric acid (UA), inorganic phosphorus (IP), calcium (Ca<sup>2+</sup>), oxalate (OX)] of urine, blood and nephridial tissue were measured and renal pathological specimens were observed. Then the modeling results were comprehensive evaluated. **Result:** The 24 h urinary BUN, Cr, UA, IP, Ca<sup>2+</sup>, OX of model group I were significantly higher than the normal control group

**[收稿日期]** 20100517(001)

**[基金项目]** 中山市科技计划项目(20071A016); 广东省中医药局科技基金项目(2007424)

**[第一作者]** 赖海标, 硕士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事泌尿生殖系统方面的研究, Tel: 0760-88923812, E-mail: lhb8829@163.com

**[通讯作者]** \* 梅全喜, 本科, 教授, 主任中医师, 硕士生导师, 主要从事广东地产中草药研究与开发工作, Tel: 0760-88815106, E-mail: meiquanxi@163.com

(group V) ( $P < 0.01$ ); blood BUN, Cr, UA, IP,  $Ca^{2+}$  were significantly higher than the normal control group ( $P < 0.01$ ); nephridial tissue  $Ca^{2+}$  and OX were significantly higher than the normal control group ( $P < 0.01$ ); and calcium oxalate crystals were distributed in nephridial tissue. The several biochemical indicators of model group II and Model group III disclosed the rats' renal function breakdown, and renal pathological specimens only displayed vascular engorgement in renal interstitium and calcium oxalate crystals hadn't been seen in nephridial tissue. All rats of model group IV were dead. **Conclusion:** Model group I represents the best modeling for renal calculus of calcium oxalate.

[**Key words**] calcium oxalate; renal calculus; animal model; rat

肾结石是一种常见疾病,其中草酸钙结石居多。大鼠肾草酸钙结石模型是肾结石基础与临床研究的重要方法。乙二醇法是复制泌尿系统结石动物模型的常规方法,也是新药评审中规定选用的方法之一<sup>[1]</sup>。但是该法复制肾结石模型的给药方法有多种,成石液中所用剂量不统一,过程较长,且成石率和死亡率两者存在冲突,给与肾结石相关的实验研究的模型复制带来了一定的麻烦。本研究从目前常用的几种实验性大鼠肾草酸钙结石造模方法中筛选出成石效果好、方法简便、稳定的造模方法。

## 1 材料

**1.1 试剂与仪器** 乙二醇(分析纯,批号 090306,汕头市西陇化工厂有限公司);氯化铵(分析纯,批号 090508,汕头市西陇化工厂有限公司);雅培(Abbott) Aeroset 全自动生化分析仪(美国雅培公司);2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);GL-20G-II 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);F6/10 超细匀浆机(弗鲁克(上海)流体机械制造有限公司);JA1203 型电子天平(上海天平仪器厂)。

**1.2 动物** SD 大鼠 50 只,雄性,体重 130 ~ 150 g,由广东省医学实验动物中心提供,生产许可证号 SCXK(粤)2008-0004。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药方法** 动物饲养 1 周后,选体重 150 ~ 180 g SD 大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,正常颗粒饲料喂养。造模 I 组:1% 乙二醇饮水 + 2% 氯化铵每天 ig 2 mL/只<sup>[1]</sup>;造模 II 组:1.25% 乙二醇 + 1% 氯化铵,·d<sup>-1</sup>ig 20 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup><sup>[2]</sup>;造模 III 组:每天每只饮用 1.25% 乙二醇 + 1% 氯化铵 10 mL,水 30 mL<sup>[3]</sup>;造模 IV 组:1% 乙二醇 + 1% 氯化铵自由饮用<sup>[4]</sup>;V 组(正常对照组):正常饮水。各组大鼠均在相同的条件下饲养。造模共 6 周。

**2.2 观察指标及检测方法** 实验结束前用代谢笼收集并测 24 h 尿量以及尿素氮(BUN, UV-GLDH 法)、肌酐(Cr, 肌氨酸氧化酶法)、尿酸(UA)、无机磷(IP)、钙( $Ca^{2+}$ , 偶氮肿 III 法)、草酸(OX, 铬酸钾氧化-甲基红催化光度法)的排泄量。麻醉大鼠,腹腔静脉穿刺取血,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min 后取上层血清检测 BUN, Cr, UA, IP,  $Ca^{2+}$ , OX 的含量。脱颈椎处死大鼠,切取大鼠的双肾,观察其外观改变,左肾置 10% 中性福尔马林中固定,作常规 HE 石蜡切片和 Von-Kossa's 染色,偏光显微镜下观察肾组织的病理改变以及肾组织草酸钙结晶形态分布情况;右肾精密称重后加入 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 10 mL 浸泡 4 h 后用 F6/10 超细匀浆机制备组织匀浆,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min 后取上清液检测 UA, IP,  $Ca^{2+}$ , OX 的含量,并计算各组大鼠的肾脏(右肾)系数:

$$\text{肾脏系数} = 2 \times \text{肾脏质量} / \text{体重} \times 100。$$

**2.3 统计学分析** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 13.0 统计软件分析。计量资料组间比较用 One-Way ANOVA 方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 动物存活情况** 第 IV 组大鼠全部死亡,故取得的实验数据只有 4 组。其余 3 组造模组至实验结束均无动物死亡。

**3.2 各组大鼠体重增长幅度** 模型 I, II 和 III 组大鼠在实验期间的体重增长幅度分别为(215.6 ± 26.7)g, (222.8 ± 22.9)g 和(195.4 ± 12.6)g,均低于正常对照组(230.9 ± 16.9)g,其中造模 III 组与正常对照组在统计学上有极显著性差异( $P < 0.01$ ),余下 2 组与正常对照组的差异无统计学意义。

**3.3 各组大鼠肾脏系数** 模型 I, II 和 III 组大鼠的肾脏(右肾)系数分别为 1.205 ± 0.124 3, 0.888 ± 0.052 和 0.990 ± 0.046,其中模型组 I 和 III 均高于正常对照组 0.892 ± 0.038,且在统计学上有极显著性

差异 ( $P < 0.01$ ); 模型组 II 略低于正常对照组, 两者间的差异无统计学意义。

**3.4 24 h 尿 BUN, Cr, UA, IP,  $Ca^{2+}$ , OX 排出量** 各组大鼠 24 h 尿 BUN, Cr, UA, IP,  $Ca^{2+}$ , OX 排出量如表 1 所示, 模型组 I 的 24 h 尿液各项指标的排出量均高于正常对照组, 且在统计学上有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 模型组 II 的各项指标均高于正常对照组, 其中

表 1 造模 6 周后 24 h 尿 BUN, Cr, UA, IP,  $Ca^{2+}$ , OX 排出量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	BUN/ $mmol \cdot L^{-1}$	Cr/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	UA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	IP/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	$Ca^{2+}$ / $\mu mol \cdot L^{-1}$	OX/ $mmol \cdot L^{-1}$
模型 I	$9.93 \pm 2.80^{2)}$	$129.45 \pm 49.75^{2)}$	$11.38 \pm 7.51^{2)}$	$184.49 \pm 56.24^{2)}$	$8.59 \pm 2.13^{2)}$	$0.2159 \pm 0.0445^{2)}$
模型 II	$4.38 \pm 0.97^{1)}$	$57.57 \pm 7.17^{1)}$	$5.92 \pm 0.90$	$118.89 \pm 42.17^{2)}$	$4.96 \pm 1.99$	$0.1413 \pm 0.0333^{2)}$
模型 III	$4.32 \pm 0.84^{1)}$	$56.24 \pm 17.60^{1)}$	$7.38 \pm 3.17$	$105.72 \pm 75.49^{1)}$	$4.80 \pm 2.40$	$0.0761 \pm 0.0152$
正常对照 V	$2.00 \pm 0.58$	$28.68 \pm 6.69$	$3.69 \pm 1.30$	$46.01 \pm 29.22$	$3.99 \pm 0.39$	$0.0601 \pm 0.0127$

注: 与正常对照组 (V 组) 比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~3 同)。

**3.5 血生化检查** 模型组 I 的 OX 项略低于正常对照组, 两者间的差异无统计学意义, 其余各项指标 (BUN, Cr, UA, IP 和  $Ca^{2+}$ ) 均高于正常对照组 ( $P < 0.01$ )。模型组 II 的各项指标均高于正常对照组, 其中 BUN, Cr,  $Ca^{2+}$  和 OX 项无显著性差异, UA 和 IP

UA,  $Ca^{2+}$  两项在统计学上没有显著性差异, BUN 和 Cr 项在统计学上有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), IP 和 OX 项在统计学上有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 模型组 III 的各项指标均高于正常对照组, 其中 UA,  $Ca^{2+}$  和 OX 项在统计学上没有显著性差异, BUN, Cr 和 IP 项在统计学上有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

项有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。模型组 III 的 BUN, Cr, UA, IP,  $Ca^{2+}$  和 OX 项与正常对照组比较没有显著性差异, 其中 BUN, Cr, UA 项高于正常组, 其余项略低于正常组 (表 2)。

表 2 造模 6 周后各组血清生化检查 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别	BUN/ $mmol \cdot L^{-1}$	Cr/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	UA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	IP/ $mmol \cdot L^{-1}$	$Ca^{2+}$ / $mmol \cdot L^{-1}$	OX/ $mmol \cdot L^{-1}$
模型 I	$9.55 \pm 1.62^{2)}$	$52.10 \pm 10.03^{2)}$	$108.10 \pm 57.17^{2)}$	$3.76 \pm 0.69^{2)}$	$2.68 \pm 0.21^{2)}$	$0.6195 \pm 0.1062$
模型 II	$7.00 \pm 0.50$	$33.80 \pm 1.81$	$67.20 \pm 12.25^{1)}$	$3.11 \pm 0.40^{1)}$	$2.52 \pm 0.10$	$0.6651 \pm 0.0824$
模型 III	$6.62 \pm 0.36$	$34.50 \pm 4.17$	$60.20 \pm 11.32$	$2.57 \pm 0.11$	$2.35 \pm 0.06$	$0.6094 \pm 0.1054$
正常对照 V	$6.33 \pm 0.75$	$30.00 \pm 1.83$	$38.40 \pm 5.78$	$2.66 \pm 0.12$	$2.46 \pm 0.03$	$0.6319 \pm 0.1090$

**3.6 肾组织中 UA, IP,  $Ca^{2+}$ , OX 的含量** 模型组 I 的 UA 项低于正常对照组, 两者间的差异无统计学意义; IP 项低于正常对照组, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ );  $Ca^{2+}$  和 OX 项均高于正常组, 有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。模型组 II 的 UA 和 IP 项均低于正常对照组, 其差异均无统计学意义;  $Ca^{2+}$  项高于正常对照组, 但两者间的差异无统计学意义; OX 项高于正常对照组, 有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。模型组 III 的 IP,  $Ca^{2+}$  和 OX 项均高于正常对照组, 其差异均无统计学意义; UA 项高于正常对照组, 有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 结果见表 3。

表 3 造模 6 周后大鼠肾组织中 UA, IP,  $Ca^{2+}$ , OX 含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	UA	IP	$Ca^{2+}$	OX
模型 I	$0.091 \pm 0.023$	$13.52 \pm 1.63^{1)}$	$72.09 \pm 9.19^{2)}$	$5.01 \pm 0.31^{2)}$
模型 II	$0.105 \pm 0.031$	$15.75 \pm 0.37$	$2.22 \pm 0.72$	$4.79 \pm 0.32^{2)}$
模型 III	$0.150 \pm 0.015^{2)}$	$17.72 \pm 0.86$	$2.84 \pm 0.65$	$4.51 \pm 0.10$
正常对照 V	$0.111 \pm 0.027$	$16.95 \pm 1.18$	$1.99 \pm 0.42$	$4.47 \pm 0.21$

**3.7 肾组织病理学检查及偏光显微镜检查** 肾脏病理检查结果显示, 造模 I, II, III 组大鼠的肾体积均较对照组 (V 组) 稍大, 外观灰白, 表面触摸粗糙不平, 造模 I 组尤为明显。造模 I 组所有大鼠肾脏均出现结晶, 镜下可见肾皮质近曲小管大量结晶体 (HE 染色中晶体为浅黄或棕黄色, Von-Kossa's 染色中晶体呈黑褐色), 结晶成堆分布相互连接, 部分近曲肾小管细胞疏松水肿、远曲小管扩张以及管腔内可见脱落细胞, 肾间质血管充血, 可见炎细胞。造模 II、III 组镜下未见结晶体, 仅发现肾间质血管充血 (见图 1)。

#### 4 讨论

肾结石患者可出现尿中钙、草酸盐、无机磷等排出增加, 且常伴有血清钙、草酸盐的增加, 其中钙与草酸盐的排泄量是形成结石的重要因素, 而无机磷排出增加可使磷酸盐易在尿中形成结晶, 成为微小核心, 导致草酸钙结石的形成或成为钙性尿石的组成成分; 部分尿酸结石和特发性含钙肾结石患者可出现高尿酸尿和高尿酸血症; 一般可出现肾功能不

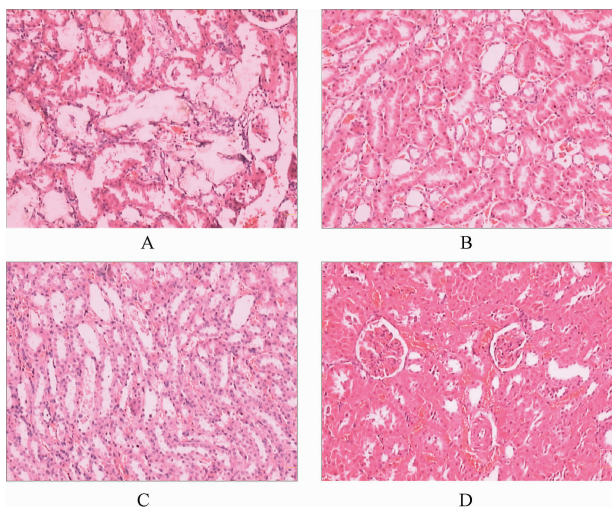


图 1 各组大鼠肾组织病理变化 (Von-Kossa's 染色 10 × 10)

A. 造模 I 组; B. 造模 II 组; C. 造模 III 组; D. 正常对照组 (V 组)

全, 如尿肌酐排出量减少等现象<sup>[5]</sup>。本研究中各组模型动物的各项生化指标结果以及病理切片观察结果显示, 造模 I 组大鼠肾结石模型造模成功。

乙二醇法是目前复制泌尿系统结石动物模型比较成熟的方法, 其成石液大多为乙二醇 + 氯化铵。乙二醇为草酸代谢通路中的中间产物, 亦是草酸的前体, 进入体内后转化成羟乙酸, 后者既可以在羟乙酸氧化酶的作用下直接转化为草酸, 也可以通过乳酸脱氢酶的催化转化成乙醛酸, 乙醛酸又可以直接在非酶作用下转化为草酸。因此, 摄入乙二醇可导致动物体内草酸增加而形成草酸钙, 而氯化铵可损害肾小管上皮, 有利于结晶的滞留和生长, 有促成石作用, 可缩短乙二醇的造模时间。

尽管目前大多采用乙二醇 + 氯化铵来复制泌尿系统结石动物模型, 但具体造模还是存在着差异, 主要表现在以下几个方面: ①组成成石液的药物浓度不同: 有文献报道乙二醇溶液的浓度和肾草酸钙结晶的形成有一定的相关性, 但各个浓度之间并不成比例增加; ②给予成石液的剂量不同: 有的文献选择成石液不限量, 饮水不限量; 有的文献选择成石液限量, 饮水不限量; 有的文献选择成石液和饮水均限量; ③给药方式不同: 有的文献选择 ig 方式; 有的文献选择自由饮用的方式; 有的文献选择乙二醇自由饮用, 氯化铵 ig 的方式; ④造模时间不同: 相关文献造模时间 3 ~ 5 周, 少的有 15 d 的, 不过大多集中在

4 周。本研究所采用的几种实验性大鼠肾草酸钙结石造模方法是从众多相关文献报道中筛选实验证实成功率比较高的几种造模方法, 期望能获得给药方便、模型成功率高、动物死亡率低的最佳造模方法进行防治肾结石的中药复方的药效学实验。但本研究部分结果与有关文献报道有所不同, 造模 II, III 组造模并不成功, 这可能是由于肾结石大鼠模型的建立受大鼠的个体差异、饮食习惯、肝脏将乙二醇等草酸前体转变为草酸的速度以及草酸的排泄、晶体生长等许多因素影响, 从而造成实验结果无法重现。

本研究中造模 IV 组的死亡率为 100%, 推测可能是氯化铵摄入过多, 毒性过大所致, 尸体解剖表明, 动物的肾、肝、心肺等重要器官均有病变, 可将造模时间相应缩短; 造模 II 组和造模 III 组的死亡率为 0, 但是成石效果不佳, 仅出现肾功能下降及肾脏病变, 可能是乙二醇的量不够, 其中造模 III 组的动物明显消瘦, 可能是成石液长时间刺激胃肠道以及限制饮水导致食欲减退所致; 造模组 I 的死亡率为 0, 成石率为 100%, 为本研究中最佳造模方法, 可能是该法成石液剂量设计合理, 氯化铵限量可控制了其对动物的毒性, 避免动物死亡, 而可自由摄取的乙二醇保证了成石效果。

### [参考文献]

- [1] 曹正国, 刘继红, 吴继洲, 等. 泽泻不同溶剂提取物对大鼠尿酸钙结石形成的影响[J]. 中草药, 2003, 34(1): 45.
- [2] 赵宗江, 于波, 宋秀英, 等. 筛选乙二醇法复制大鼠肾结石模型最佳剂量的比较研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(11): 628.
- [3] 邵绍丰, 张爱鸣, 刘耀, 等. 单味中药金钱草、石韦、车前子对大鼠肾结石肾保护作用的实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(6): 342.
- [4] 王军, 宋波, 叶章群, 等. 苏子油对大鼠体内细胞因子及肾草酸钙结晶形成影响的研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(18): 1881.
- [5] 赖海标. 泌尿系结石的中西医最新治疗[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 20.

[责任编辑 聂淑琴]