

不同晶相的草酸钙晶体引起肾上皮细胞的毒性差异

孙新园 姚秀琼 余 凯 欧阳健明*

(暨南大学生物矿化与结石病防治研究所, 广州 510632)

摘要: 采用扫描电子显微镜(SEM)、激光共聚焦显微镜(LSM)、流式细胞仪、电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP)等方法比较研究了尺寸约 1.2 μm 的一水草酸钙(COM)和二水草酸钙(COD)晶体对非洲绿猴肾上皮细胞(Vero 细胞)的损伤差异。COM 和 COD 均能引起 Vero 细胞的细胞活力和超氧化物歧化酶(SOD)活力降低、丙二醛(MDA)含量升高以及碘化丙啶(PI)红染细胞数目增多,且均呈现浓度依赖性。在相同晶体浓度时,COM 的细胞毒性明显比 COD 强,引起细胞表面表达的粘附分子透明质酸(HA)比 COD 多,粘附量也显著增加。相比于 COM 晶体,Vero 细胞更容易内吞 COD 晶体。COM 与 COD 晶体对肾上皮细胞的毒性差异与晶面的离子密度以及细胞与晶体间的静电作用等因素密切相关。本文结果将有助于从分子水平上和细胞水平上阐释草酸钙结石的形成机理。

关键词: 一水草酸钙; 二水草酸钙; 细胞毒性; 浓度效应

中图分类号: R69; R329.2*8

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2016)05-0818-09

DOI: 10.11862/CJIC.2016.097

Toxicity Difference of Calcium Oxalate of Different Crystal Phases on Renal Epithelial Cells

SUN Xin-Yuan YAO Xiu-Qiong YU Kai OUYANG Jian-Ming*

(Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Scanning electron microscope (SEM), laser confocal microscope (LSM), flow cytometry, inductively coupled plasma emission spectrometer (ICP) methods were used to comparatively study the cell injury differences on the African green monkey kidney epithelial (Vero) cells by calcium oxalate monohydrate (COM) and dihydrate (COD) crystals with a size about 1.2 μm . Both COM and COD could decrease the cell viability and superoxide dismutase (SOD) activity, increase malondialdehyde (MDA) content and the number of red dye cells staining with propidium iodide (PI) in a dose-dependent manners. Compared to COD crystals, COM crystals induced significantly higher toxicity under the same crystal concentration, and COM crystals caused more adhesion molecules hyaluronic acid (HA) expression and higher adhesion amount than COD crystals. The ability of the Vero cells to endocytose COD crystal was stronger than that of COM. The cytotoxicity difference between COM and COD was closely related to ion density of crystal face and electrostatic interactions between the cell and crystals. The results in this paper can help to explain the formation mechanism of calcium oxalate stones at the molecular level and cellular level.

Keywords: calcium oxalate monohydrate; calcium oxalate dihydrate; cytotoxicity; concentration effect

收稿日期: 2016-01-14。收修改稿日期: 2016-03-04。

国家自然科学基金(No.21371077)资助项目。

*通信联系人。E-mail: toyjm@jnu.edu.cn

0 引言

肾结石是一种临床常见的多发病,肾中结石的主要组分为草酸钙(CaOx)^[1],其中一水草酸钙(COM)的发生率约是二水草酸钙(COD)的2倍^[2]。COD结石与高钙尿^[3-4]、低枸橼酸水平^[5]和高pH值^[6]有密切的联系,而COM结石经常出现在正常尿钙情况下^[7]。

晶体粘附是导致肾结石形成的重要原因之一^[8-9]。研究表明,尿微晶通过肾脏的时间只有5~10 min,在滞留时间内,晶体通过生长不足以达到足够的尺寸来堵塞管道。晶体的聚集是导致尿微晶尺寸迅速增大的重要原因^[10-11]。细胞损伤不但会增加尿微晶在细胞表面的粘附^[12-13],而且能够促进尿微晶在损伤细胞表面的聚集^[14]。研究表明,结石患者尿液中的COM含量常常高于健康对照者,而COD含量则低于对照者^[15],尿液中存在的这种组分差异的原因还不甚明了。前期我们研究了尺寸分别为50、100 nm,1.3和10 μm 的COM和COD晶体对非离子表面活性剂(NP-40)的吸附^[16],表明晶体尺寸越小,比表面积越大,对NP-40的吸附量越大;相同尺寸的晶体,COM的吸附量大于COD。

但草酸钙晶相不同导致的与肾小管上皮细胞间作用机制的差异还有待研究。基于此,本文比较研究了尺寸约1.2 μm 的COM和COD晶体对非洲绿猴肾上皮细胞(Vero细胞)的损伤差异及其被细胞粘附和内吞的差异,期望从细胞和分子水平上阐述尿液中不同晶相草酸钙晶体对肾上皮细胞损伤的机理,为抑制肾结石形成提供新的启示。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

非洲绿猴肾上皮细胞(Vero细胞)(暨南大学生物制药基地);DMEM培养基(Hyclone,海克隆生物化学制品(北京)有限公司)。细胞增生分析试剂盒(CCK-8,日本同仁化学研究所)。超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。碘化丙啶(PI)、4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、牛血清白蛋白(BSA)均购自上海碧云天生物技术有限公司;生物素化的透明质酸结合蛋白(bHABP, MERCK公司),异硫氰酸荧光素-亲和素(FITC-Avidin, 武汉博士德生物工程有限公司),12、24和96孔细胞培养板(NEST,中国)。青霉素、链霉素(北京普博生物技术有限公司)。

XL-30型环境扫描电子显微镜(ESEM, Phillips公司,荷兰),样品喷金处理,测量电压为15~20 kV。日本理学D/max 2400 (Rigaku) X射线衍射仪,Cu靶, $K\alpha$ 射线($\lambda=0.154\ 08\ \text{nm}$),石墨单色器,40 kV,30 mA,扫描范围 $5^\circ\sim 55^\circ$ 。激光共聚焦显微镜(LSM510 META DUO SCAN, ZEISS, 德国)。倒置荧光显微镜 (IX51)(日本奥林巴斯公司)。酶标仪(safireZ, Tecan, 瑞士)。电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-AES)。

1.2 晶体的合成及其悬浮液配制

COM、COD晶体的合成及表征参照文献^[9]进行,其尺寸均分别约为1.2 μm 。

CaOx 晶体悬浮液配制:先将称好的晶体铺平,照紫外40 min除菌;然后把COM、COD晶体分别分散在一定体积的无血清培养液中,配制成400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的晶体悬浮液,超声5 min后再依次稀释成50、100和200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,备用。

1.3 细胞培养

Vero细胞采用含10%胎牛血清的DMEM培养液在 37°C 、5% CO_2 和饱和湿度下培养。细胞传代采用胰蛋白酶消化法。当细胞达80%~90%汇合后用PBS缓冲液洗涤2次,加入0.25%胰酶-EDTA消化液,置 37°C 培养箱消化3~5 min,消化适度后,加入10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化,充分吹打分散细胞,形成单细胞悬液。

1.4 细胞活力检测

细胞按浓度为 $1.0\times 10^5\ \text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、100 μL 每孔接种于96孔培养板中孵育24 h。实验模型分为3组:(A) Vero细胞对照组:不加任何试剂。(B) COM晶体处理组:加入分别含50、100、200和400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的COM晶体的无血清培养液,孵育6 h;(C) COD晶体处理组:加入分别含50、100、200和400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的COD晶体的无血清培养液,孵育6 h。达到粘附时间后,每孔加入10 μL 的CCK-8试剂,于 37°C 下孵育1.5 h,用酶标仪在450 nm处测量吸光度(A),各个条件下的Vero细胞平行测定3个复孔,求A值的平均值。

$$\text{细胞活力 Cell viability} = \frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100\%$$

1.5 超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量检测

细胞按浓度 $1.0\times 10^5\ \text{mL}^{-1}$ 、500 μL 每孔接种于24孔培养板,加入10%胎牛血清的DMEM培养液孵育24 h后,改用无血清DMEM培养液孵育12 h

同步化。实验模型分组情况与细胞活力检测相同。达到作用时间后,取上清液,按 SOD 试剂盒和 MDA 试剂盒的说明书分别测定 SOD 活性和 MDA 含量。

1.6 碘化丙啶(PI)染色检测

细胞按浓度 $1.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 、100 μL 每孔接种于 96 孔培养板,细胞同步化后,按照上述实验方法分组。达到作用时间后,吸除培养液,用 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PI 溶液, 37°C 孵育 10 min;再用 PBS 洗涤 3 次,最后每孔加入 100 μL PBS,然后在荧光显微镜下观察细胞死亡情况。当细胞核被染成红色时说明细胞已处于中晚期凋亡或坏死状态。

PI 定量分析:在未进行荧光显微镜拍照之前,采用酶标仪测定 PI 的荧光强度。

1.7 透明质酸(HA)表达观察及荧光强度的定量分析

细胞按浓度 $1.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 、1 mL 每孔接种于 12 孔培养板,细胞同步化后,按照上述实验方法分组。COM 和 COD 晶体浓度分别为 100、200 和 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。达到作用时间后,用 PBS 洗涤细胞 2 次,接着用固定液(由 5%冰醋酸、10%福尔马林和 70%酒精组成)固定细胞 20 min,然后用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,再加入 100 μL $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 bHABP 溶液(配制在 3%牛血清白蛋白溶液中,现用现配), 4°C 条件下孵育过夜;之后用 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min;再加入 100 μL 异硫氰酸荧光素-亲和素(FITC-avidin)染色 1 h,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入 4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液复染 4 min,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;最后用抗淬灭剂封片,置于共聚焦显微镜下观察,细胞表面表达透明质酸的地方为绿色,细胞核经 DAPI 染色为蓝色。

HA 定量分析:HA 的荧光强度由仪器附带的 Axiovision 软件(ZEISS, 德国)分析,每个样品对 100 个细胞的 HA 进行定量检测,取平均值。

1.8 扫描电子显微镜(SEM)观察

细胞种板密度和实验分组与 HA 检测相同。达到粘附时间后,吸除上清液,用 PBS 洗涤 3 次,2.5%的戊二醛于 4°C 固定 24 h 后,用 1% OsO_4 固定,接着用 PBS 洗涤 3 次,梯度乙醇(30%、50%、70%、90%和 100%)脱水,最后用乙酸异戊酯固定,固定后的细胞采用 CO_2 临界干燥,喷金包被。在 SEM 下观察晶体粘附和内吞情况。

1.9 晶体的粘附量测定

细胞种板密度和实验分组与 HA 检测相同,COM 和 COD 晶体浓度分别为 50、100、200 和 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 4°C 下作用 6 h 后,吸除上清液,取出玻片;用 PBS 洗涤玻片 3 次,洗去未粘附的晶体;将玻片置于 25 mL 烧杯中,加入 10 mL 浓 HNO_3 和 1.0 mL HClO_4 ,在电炉上消化至澄清,继续加热至 HClO_4 冒烟,蒸至近干时停止加热,利用余热把溶液蒸干,冷却,加 3 mL 超纯水,混匀待测,同时准备空白组(即 10 mL 浓 HNO_3 和 1.0 mL HClO_4 的混合溶液),利用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP)测定钙离子的浓度,然后换算成 CaO_x 晶体的粘附量。

2 结 果

2.1 草酸钙晶体的合成与表征

图 1 为制备的 COM、COD 晶体的 SEM 照片及 XRD 图。由于人体内产生的草酸钙晶体多为不规则的形貌,因此我们未添加其他的添加剂调控晶体的形貌,从而更好的模拟尿微晶与肾小管上皮细胞间的作用。所合成的 COM 晶体主要为六边形,也存在部分不规则形貌,其粒径为 $(1.2 \pm 0.5) \mu\text{m}$ (图 1a)。在 XRD 图中(图 1c),检测到晶面间距 $d=0.595$ 、 0.365 、 0.298 和 0.236 nm 的衍射峰,分别归属于 COM 晶体的 $(\bar{1}01)$ 、 (020) 、 $(\bar{2}02)$ 和 (130) 晶面。COD 晶体主要呈四角双锥形貌及聚集体形貌,粒径为 $(1.2 \pm 0.4) \mu\text{m}$ (图 1b)。在 XRD 图中(图 1d),检测到 $d=0.618$ 、 0.442 、 0.278 和 0.224 nm 等处分别归属于 COD 晶体 (200) 、 (211) 、 (411) 和 (213) 晶面的特征吸收峰,表明所合成的晶体均为纯相的 COM 或 COD 晶体。

2.2 细胞活力、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量变化

图 2a 为 Vero 细胞与不同浓度的 COM、COD 作用后的细胞活力变化。可以看出,COM 对 Vero 细胞具有明显的毒性,并呈现浓度依赖性。随着 COM 浓度从 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增加到 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,细胞活力从对照组的 100%降低到 $(46.0 \pm 3.35)\%$ 。相比之下,COD 对 Vero 细胞的毒性明显小于 COM 晶体,即使浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 COD 与 Vero 细胞孵育 6 h 后,其活力仅降至 $(91.0 \pm 2.33)\%$ 。

SOD 是细胞内的一种重要的抗氧化酶,对机体内的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用,能清除氧自由基,保护细胞免受损伤。生物体内 SOD 活性的高低间接反应了机体清除氧自由基的能

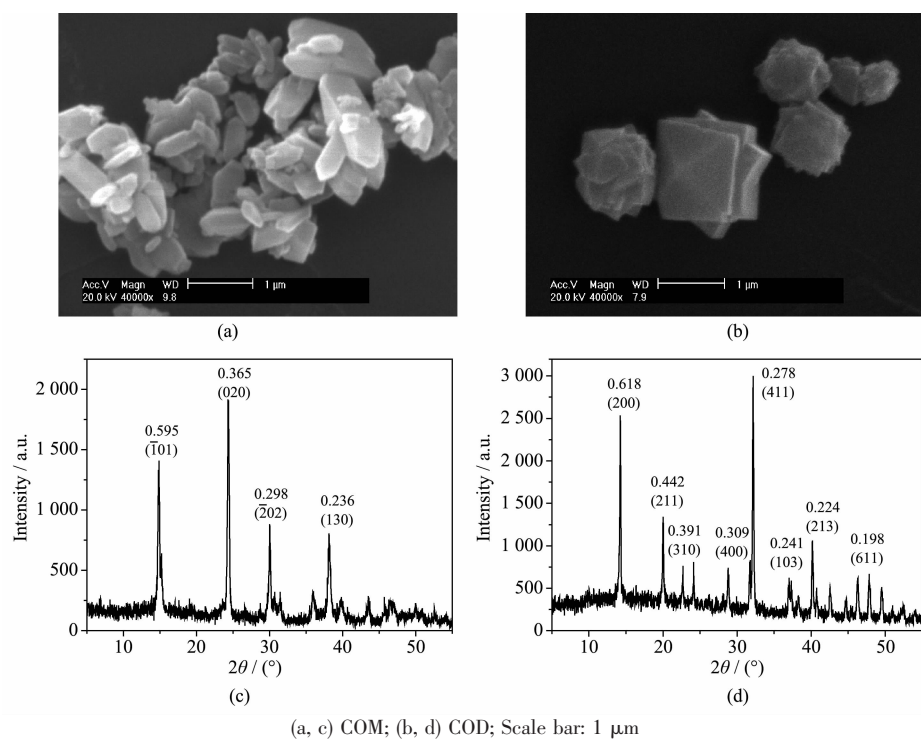


图1 COM、COD 的 SEM图像(a, b)和 XRD 图(c, d)

Fig.1 SEM images (a, b) and XRD patterns (c, d) of COM and COD crystals

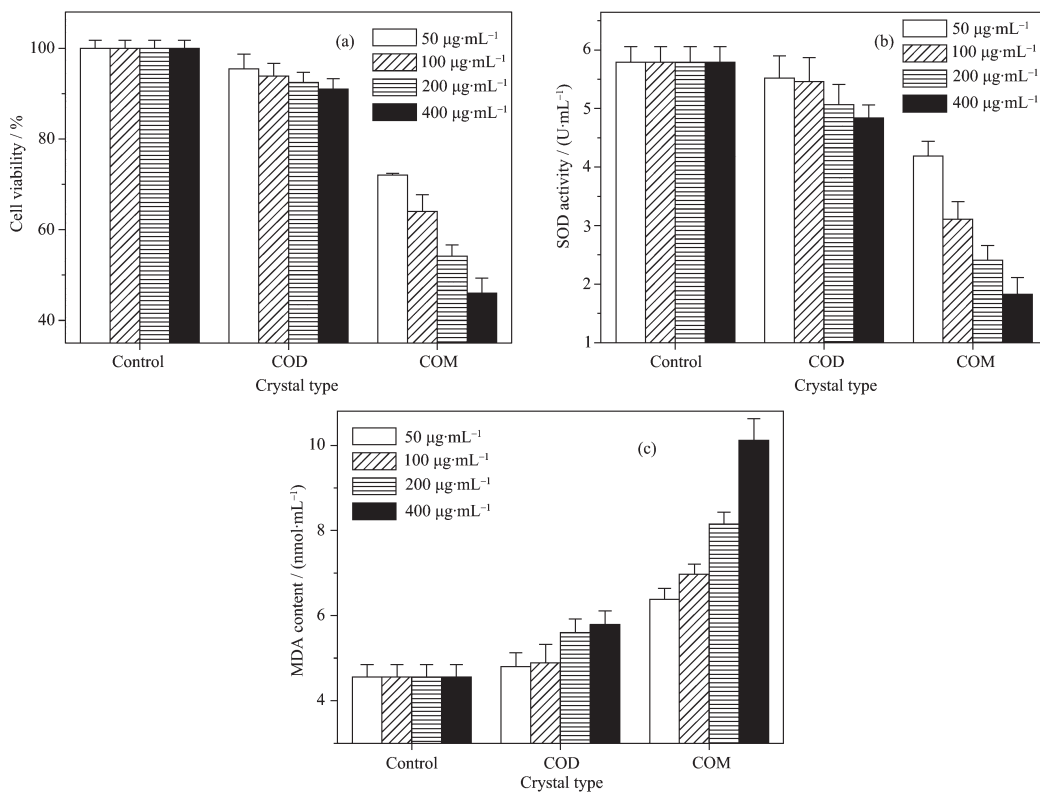


图2 Vero 细胞与 COM、COD 粘附 6 h 后细胞生化指标变化

Fig.2 Changes of biochemical indicators in Vero cells after exposure to COM and COD crystals for 6 h

力^[17]。从图 2b 可见,Vero 细胞粘附 COM 后 SOD 活力随着晶体浓度的增加而显著下降,说明 COM 的浓度越高,对细胞的损伤越大。而 Vero 细胞粘附 COD 后 SOD 活力降低不显著。

与 SOD 一样,MDA 也是反映细胞损伤程度的一项重要生化指标。MDA 是一种脂质过氧化产物,其含量变化可反映机体内脂质过氧化的程度^[18]。Vero 细胞粘附 COM 后,MDA 含量随着晶体浓度的增加而逐步升高(图 2c);而 Vero 细胞粘附 COD 后 MDA 含量增加很缓慢,说明 COM 晶体对细胞的脂质过氧化损伤较大,而 COD 晶体较小。

图 2 中 3 个生化指标的检测结果表明,COM 对细胞造成过氧化损伤显著大于 COD。有文献表明 COM 晶体作用于肾上皮细胞将诱发活性氧(ROS)的产生,而 ROS 可以介导一系列炎症的发生,激活许多信号分子如 p38 细胞分裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)、蛋白 N-末端激酶(JNKp)和转录因子 NF- κ B 等^[19]。这些物质可以导致基因和蛋白质的表达和上调,产生炎症细胞因子如单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和损伤分子 KIM-1^[20],一系列的级联反应最终导致细胞功能大大受损,造成细胞死亡。

2.3 Vero 细胞与 COM、COD 粘附后经碘化丙啶(PI)染色的结果

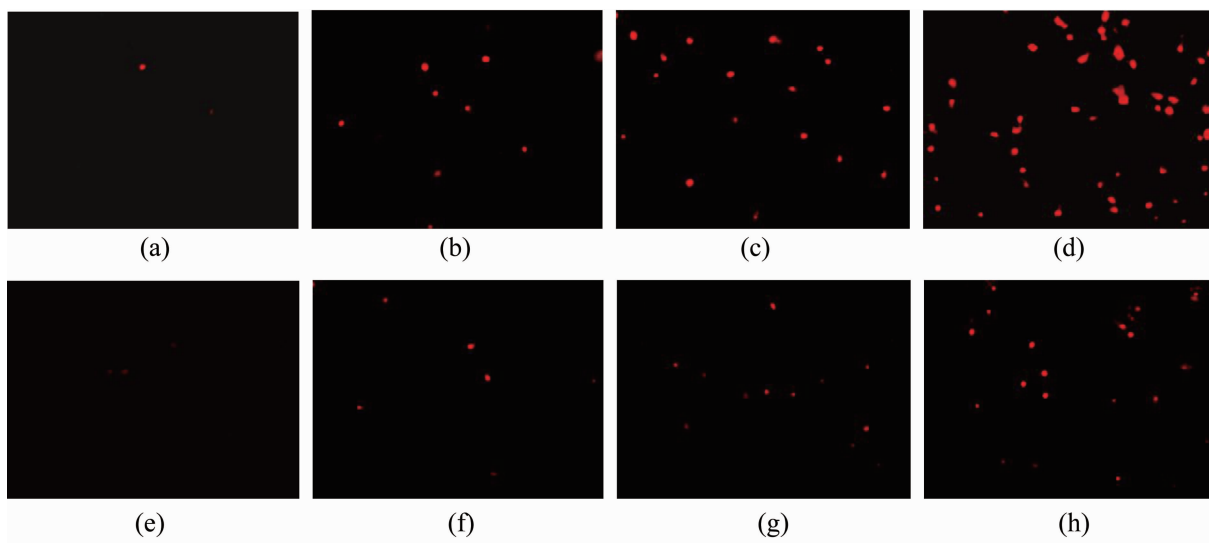
PI 是一种常用的细胞核荧光染色剂,在绿色光(540 nm)的激发下会发出明亮的红色荧光(600 nm)。

PI 不能透过正常细胞完整的细胞膜,但是能透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜并与细胞核中的 DNA 结合。与 DNA 结合的 PI 发出的红色荧光强度是未结合 PI 的 20~30 倍。被染色的细胞核越多,说明细胞的死亡率越高^[21]。

Vero 细胞与 COM、COD 晶体粘附后经 PI 染色的结果如图 3 所示。随着 COM 浓度增大,被 PI 染色的细胞核越来越多(图 3a~d),说明 COM 对细胞产生氧化损伤后,导致了 Vero 细胞的死亡率增大。由于对照组细胞被 PI 染色的很少,故没有给出其荧光显微镜图片。而 COD 晶体浓度增大后引起的红染细胞核数量远比 COM 的少(图 3e~h)。说明 COM 对 Vero 细胞的致死率大于 COD 晶体。此结果与细胞损伤后的生化指标检测结果(图 2)一致。

2.4 Vero 细胞与 COM、COD 粘附后透明质酸(HA)表达量变化

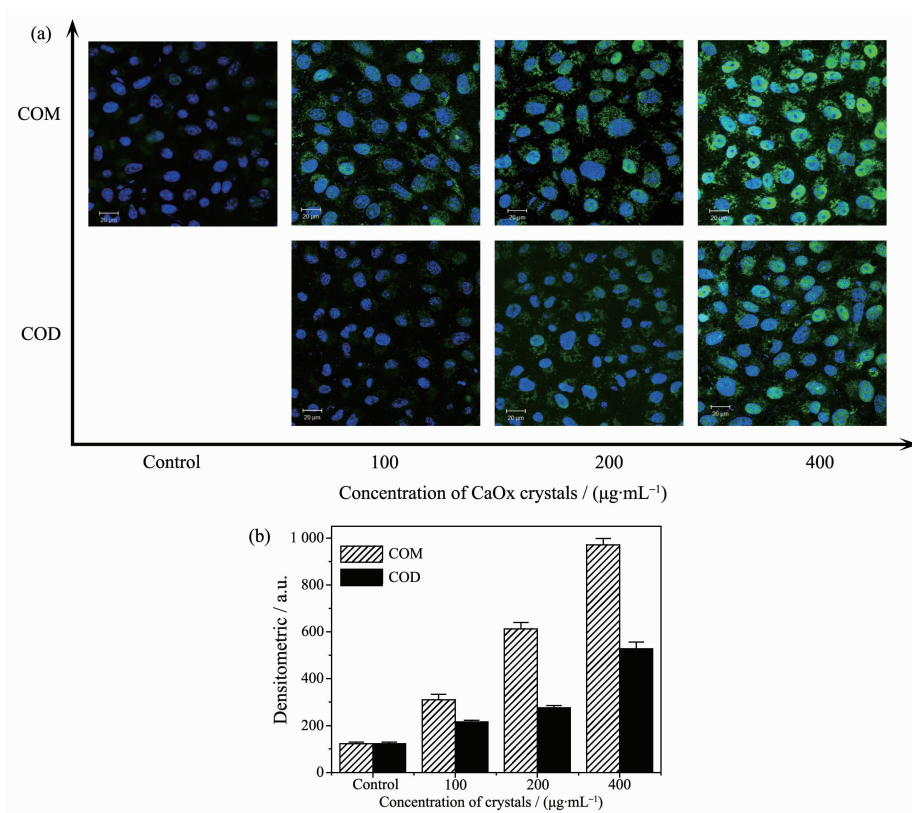
透明质酸(HA)是一种细胞膜表面的主要粘附分子之一^[22],细胞损伤越严重,细胞表面表达的 HA 越多。图 4 为激光共聚焦显微镜观察的 Vero 细胞与 COM、COD 粘附后的 HA 表达情况。与 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 COM 晶体粘附 6 h 后,Vero 细胞周围呈现明显的绿色荧光;绿色荧光随着晶体浓度的增加而增强,尤其是当浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,Vero 细胞周围出现明亮的绿色荧光,强度为 971 ± 27 ,表明此时表达了大量的 HA 分子。然而,Vero 细胞与低浓度



(a~d) COM treatment group, crystal concentration is 50, 100, 200 and $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; (e~h) COD treatment group, crystal concentration is 50, 100, 200 and $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; Magnification: $\times 600$

图 3 Vero 细胞与不同浓度的 COM、COD 粘附 6 h 后 PI 染色结果

Fig.3 Fluorescence images of Vero cells stained by PI after incubating with COM and COD with different concentrations for 6 h



(a) Laser scanning confocal microscope images; (b) relative fluorescent intensity; Blue region represents nucleus, green region represents HA (shown in online version); Adhesion time: 6 h. Scale bar: 20 µm

图 4 Vero 细胞与不同浓度 COM、COD 粘附后透明质酸(HA)的表达

Fig.4 Hyaluronan (HA) expression in Vero cells after exposure to COM and COD crystals with different concentrations

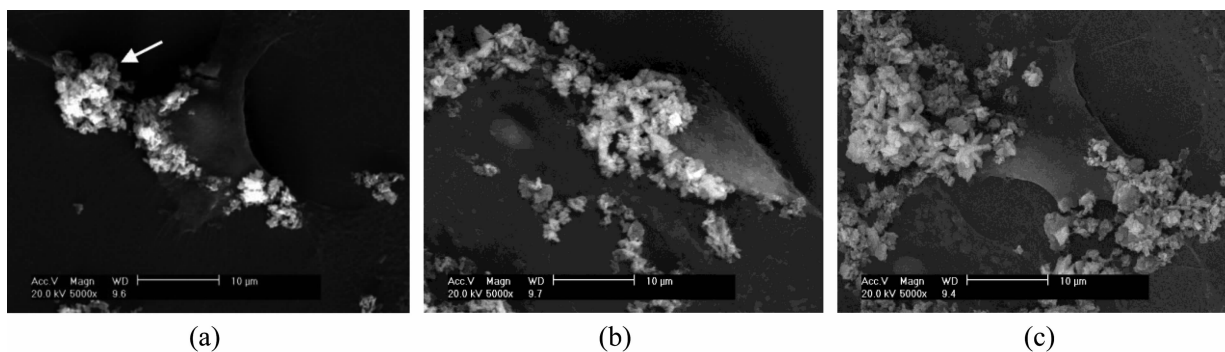
的 COD 粘附后的绿色荧光很弱,只有在晶体浓度 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,才出现明显的绿色荧光,但比相同浓度的 COM 晶体的弱。

上述结果表明,COM、COD 与 Vero 细胞作用后,都可以诱导粘附分子 HA 的表达,其表达量均呈现浓度依赖性;且相同浓度下,COM 处理组中细胞表面表达的 HA 的量明显高于 COD 处理组,因此

COM 损伤后的细胞更容易粘附更多的晶体,形成结石的风险更大。

2.5 Vero 细胞与 COM、COD 粘附后的 SEM 观察

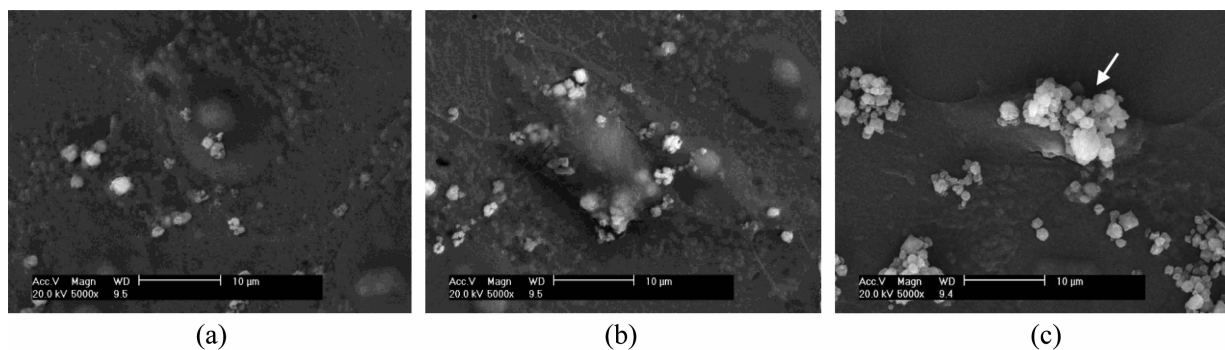
在低浓度($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)时,COM 晶体处理组中就有较多的晶体粘附在 Vero 细胞的表面(图 5a),同时,细胞的微绒毛也粘附有 COM 晶体(图 5a 中箭头所示)。随着晶体浓度的增大,不但粘附量逐渐增加,



(a) $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; (b) $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; (c) $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Adhesion time: 6 h; Scale bar: 10 µm

图 5 Vero 细胞与不同浓度 COM 晶体粘附的 SEM 照片

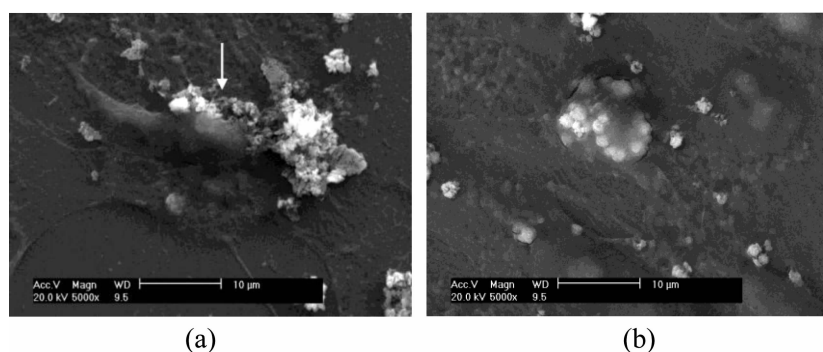
Fig.5 SEM images of Vero cells after exposure to different concentrations of COM crystals



(a) $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; (b) $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; (c) $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Adhesion time: 6 h; Scale bar: $10 \mu\text{m}$

图 6 Vero 细胞与不同浓度 COD 晶体粘附的 SEM 照片

Fig.6 SEM images of Vero cells after exposure to different concentrations of COD crystals



Crystal concentration: $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

图 7 Vero 细胞对 COM (a)和 COD b)晶体吞入的观察

Fig.7 SEM observation of COM (a) and COD (b) endocytosis by Vero cells

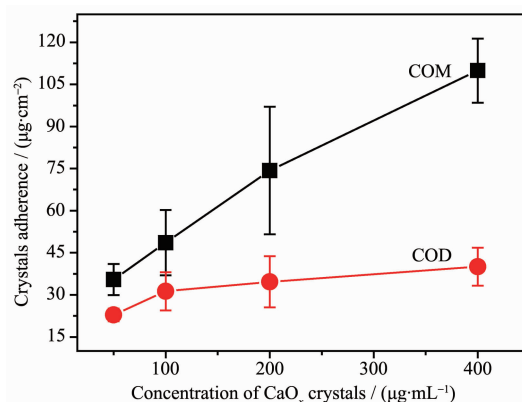
而且晶体的聚集程度也逐渐增加(图 5b,5c)。

相比之下,Vero 细胞与 COD 的粘附量要小得多。低浓度时($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)时,粘附的 COD 晶体较少且几乎不聚集。随着 COD 晶体浓度的增加,粘附的晶体数量有所增大(图 6b);当浓度升高到 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,粘附的 COD 晶体也会发生聚集,但只是多个小晶体松散的堆积在一起(图 6c 中白色箭头所示)。同时可以明显的观察到 Vero 细胞对 COD 晶体的吞入(图 6b,7b),而在 COM 晶体与细胞作用时,吞入现象不明显(图 7a)。

2.6 COM、COD 的粘附量测定

Vero 细胞吞入 COM 和 COD 晶体为主动运输的过程,而在 4°C 的环境下晶体的吞入过程会受到抑制。为了证实 SEM 观察的 Vero 细胞与 COM、COD 晶体粘附量的差异,在 4°C 的条件下,我们采用 ICP 检测了不同浓度的 COM 和 COD 晶体在细胞表面的粘附量(图 8)。当晶体浓度从 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加到 100、200 和 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 细胞表面粘附的 COM 从 $(35.5\pm5.5) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 持续增加到 (48.6 ± 11.6) 、 $(74.3\pm$

$22.7)$ 、 $(109.9\pm11.4) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。而 COD 的粘附量从 $(22.9\pm2.3) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 依次增加到 (31.3 ± 6.8) 、 (34.7 ± 9.1) 、 $(40.0\pm6.8) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。由此可见,在相同晶体浓度



Crystal concentration: $50\sim400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Adhesion time: 6 h

图 8 ICP 法测定不同浓度 COM、COD 晶体在 Vero 细胞表面的粘附量

Fig.8 Quantitative analysis of adhesion amount of COM and COD with different concentrations to Vero cells using ICP-AES method

时,COM 晶体在 Vero 细胞表面的粘附量均比 COD 晶体的高,尤其在 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,两者粘附量的差值达 $69.9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。

3 讨论

为了比较COM 和 COD 两种晶相的晶体与肾小管上皮细胞间的作用机制的差异,我们通过 CCK-8 和 PI 染色的方法对细胞的活力进行了分析;通过 SOD 和 MDA 含量变化对细胞的氧化损伤进行了评估;并通过 SEM 和 ICP 方法观察和检测了晶体粘附和内吞的差异。COM 和 COD 晶体都可以诱导 Vero 细胞的损伤,且呈现浓度依赖性。在相同晶体浓度下,COM 晶体表现出比 COD 晶体更高的细胞毒性,且 COM 晶体更容易粘附和聚集在细胞的表面。

3.1 COM 的细胞毒性显著大于 COD

相同浓度下,COM 晶体表现出了明显高于 COD 晶体的细胞毒性,尤其是高浓度的 COM 晶体不仅会造成细胞的过氧化损伤,引起 SOD 活性的显著降低和 MDA 含量的明显升高(图 2b,2c),同时还严重破坏了细胞膜的完整性,造成细胞的死亡(图 3)。高浓度的 COM 晶体更容易产生聚集(图 5),晶体的聚集会加重对肾上皮细胞产生的损伤作用。有研究者通过观察草酸钙结石病人的病理组织切片,发现靠近钙化和聚集晶体的区域的上皮细胞均明显遭到破坏^[23]。而 COD 晶体造成的细胞损伤明显减弱,导致的细胞死亡率较小^[24]。

由于 COM 和 COD 晶相的不同,两种晶体在晶体结构、晶面性质以及结晶水含量等方面都存在差异,这就导致它们表现出的细胞的毒性存在明显的不同。有研究表明,COM 和 COD 晶体的主要晶面(图 9)与羧基的粘附力大小呈现以下规律:COM($\bar{1}01$)>COD(100)>COM(010)>COD(101)^[25],归因于这 4 个晶面的钙离子密度依次降低;COM 的($\bar{1}01$)和(010)晶面分别有 5.42 和 3.33 个 $\text{Ca}^{2+}/\text{nm}^2$;COD 的(100)和(101)晶面则分别有 4.39 和 2.25 个 $\text{Ca}^{2+}/\text{nm}^2$ ^[26]。这种晶面性质的不同可能是导致 COM 和 COD 晶体的细胞毒性存在差异的主要原因,这为 COM 和 COD 的病理行为及它们各自晶面的粘附强度之间建立了一个重要的联系。COM 的最主要晶面($\bar{1}01$)面与肾上皮细胞间的粘附力最强,导致在细胞表面的大量粘附和聚集,加剧了结石形成的风险。对于 COD 晶体,其粘附力最强的(100)晶面面积较小,而粘附力最弱(101)晶面面积最大,因此 COD 晶体与细胞作用时的总的粘

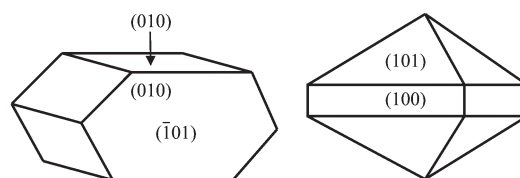


图9 微米级 COM、COD 的晶体结构模型图

Fig.9 Model diagram of crystal structure of micron-grade COM and COD

附力下降,导致 COD 与细胞膜间的粘附不牢固,形成的聚集体不稳定,在体内容易被肾小管中的尿液冲走,从而降低了结石形成的风险^[26-27]。

3.2 Vero 细胞内吞 COM、COD 晶体存在差异

SEM 结果可以明显的观察到细胞对 COD 晶体的内吞(图 6b,7b),而这种现象在 COM 晶体处理组中不明显。细胞的内吞作用是机体自我保护的一种机制,以去除表面潜在的粘附和聚集位点。内吞的晶体会在细胞内的溶酶体中缓慢溶解,而不再暴露在过饱和的肾管流体中作为晶体聚集的一个位点^[28]。细胞对 COM 晶体的内吞作用弱于 COD 晶体,这可能是因为 COM 的粘附对细胞产生较严重的过氧化损伤(图 2b,2c),细胞膜破裂(图 3),导致细胞正常的内吞功能也受到损害。COM 晶体也可能影响了内吞相关蛋白如 CLC-5 的表达,导致内吞作用减弱,细胞清除晶体的能力降低,从而削弱了细胞膜表面抗晶体粘附和聚集的能力^[29]。

4 结论

不同晶相的 COM 和 COD 晶体都能引起 Vero 细胞的细胞活力和 SOD 活性降低、MDA 含量升高以及 PI 红染细胞数目增多,且均呈浓度依赖性。在相同晶体浓度时,COM 的毒性和损伤作用明显比 COD 强,使得 Vero 细胞表达的粘附分子 HA 比 COD 多,更易引起晶体在细胞表面的聚集。同时,Vero 细胞内吞 COD 晶体的能力比 COM 强,进一步减弱了 COD 对细胞的损伤作用。尿液中 COM 和 COD 晶体的大量产生都会引起肾上皮细胞的损伤,导致晶体在细胞表面的粘附和聚集。而相同浓度下,COD 晶体的产生会极大地减弱晶体对肾脏的损伤,降低结石形成的风险。探索抑制 COM 晶体形成而促进 COD 晶体形成的药物可能是降低结石风险的重要途径。本文对不同晶相、不同浓度的草酸钙晶体作用于肾上皮细胞时毒性差异的研究,将会为肾结石的预防和治疗提供一定的启示。

参考文献:

- [1] Moe O W. *Lancet*, **2006**, **367**(9507):333-344
- [2] Mandel N S, Mandel G S. *J. Urol.*, **1989**, **142**:1516-1521
- [3] Gal  n J A, Conte A, Llobera A, et al. *Urol. Int.*, **1996**, **56**:79-85
- [4] Parent X, Boess G, Brignon P. *Prog. Urol.*, **1999**, **9**:1051-1056
- [5] Asplin J R, Lingeman J, Kahnoski R, et al. *J. Urol.*, **1998**, **159**:664-668
- [6] Pierratos A E, Khalaff H, Cheng P T, et al. *J. Urol.*, **1994**, **151**:571-574
- [7] Conte A, Genestar C, Grases F. *Urol. Int.*, **1990**, **45**:25-27
- [8] Domingos F, Serra A. *Scand. J. Urol.*, **2014**, **48**(5):414-419
- [9] Sun X Y, Ouyang J M, Liu A J, et al. *Maert. Sci. Eng. C-Mater.*, **2015**, **57**:147-156
- [10] Finlayson B, Reid S. *Invest. Urol.*, **1978**, **15**:442-448
- [11] Kok D J, Khan S R. *Kidney Int.*, **1994**, **46**:847-854
- [12] Wang B, Wu B, Liu J, et al. *PLoS One*, **2014**, **9**(7):e101306
- [13] TAN Jin(谈金), DENG Sui-Ping(邓穗平), OUYANG Jian-Ming(欧阳健明). *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2010**, **26**(12):2131-2137
- [14] Fujii Y, Okada A, Yasui T, et al. *PLoS One*, **2013**, **8**(4):e61343
- [15] Shapur N K, Uvarov V, Popov I, et al. *Urology*, **2012**, **80**(5):980-985
- [16] WEN Xiao-Ling(温小玲), GAN Qiong-Zhi(甘琼枝), OUYANG Jian-Ming(欧阳健明). *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2015**, **31**(10):2021-2029
- [17] Unterstab G, Gosert R, Leuenberger D, et al. *Virology*, **2010**, **399**:322-331
- [18] Thongboonkerd V, Semangoen T, Sinchaikul S, et al. *J. Proteome Res.*, **2008**, **7**(11):4689-4700
- [19] Zuo J, Khan A, Glenton P A, et al. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **2011**, **26**(6):1785-1796
- [20] Huang H S, Ma M C, Chen J. *Am. J. Physiol-Renal.*, **2009**, **296**(1):F34-F45
- [21] Schepers M S J, Van Ballegooijen E S, Bangma C H, et al. *Kidney Int.*, **2005**, **68**:1543-1553
- [22] Poon N W, Gohel M D I. *Carbohydr. Res.*, **2012**, **347**(1):64-68
- [23] Kramer G, Steiner G E, Prinz-Kashani M, et al. *BJU Int.*, **2003**, **91**(6):554-559
- [24] Yuen J W M, Gohel M D I. *Clin. Chim. Acta*, **2010**, **411**:1018-1026
- [25] Lieske J C, Toback F G, Deganello S. *Calcif. Tissue Int.*, **1996**, **58**:195-200
- [26] Sheng X, Ward M D, Wesson J A. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2005**, **16**:1904-1908
- [27] Wang T T, Thurgood L A, Grover P K, et al. *BJU Int.*, **2010**, **106**(11):1768-1774
- [28] Grover P K, Thurgood L A, Fleming D E. *Am. J. Physiol-Renal.*, **2008**, **294**:F355-F361
- [29] Lieske J C, Norris R, Swift H, et al. *Kidney Int.*, **1997**, **52**:1291-1301