不同纵横比一水草酸钙晶体的合成、表征、 吸附性能及其对肾上皮细胞的毒性差异

程小燕 徐 猛 欧阳健明*

(暨南大学化学与材料学院,生物矿化与结石病防治研究所,广州 510632)

摘要:合成了长宽比分别为1:2、1:3、1:4和1:5的4种一水草酸钙(COM)晶体COM-1:2、COM-1:3、COM-1:4和COM-1:5,采用 X射线衍射、傅里叶变换红外光谱、扫描电子显微镜(SEM)、ζ电位仪和比表面测试仪等对其理化性质进行了表征。SEM图片显示晶体的宽度相近,但长度分别为(3±0.3) μm、(5.2±0.3) μm、(7.0±0.7) μm和(8.8±1.2) μm。随着反应温度升高,生成的晶体长度 变长;搅拌速度越大,生成的晶体尺寸越小;随着添加剂明胶的浓度减小,COM晶体的(Ī01)面被拉长。细胞活力、细胞总死亡 率和活性氧检测表明,不同长宽比COM对人肾近端上皮细胞(HK-2)的毒性大小为COM-1:2>COM-1:3>COM-1:4>COM-1:5>对 照组,SEM 检测证明4种COM晶体均能够黏附到细胞表面。毒性差异与以下各原因呈正相关:晶体大比例的(Ī01)晶面、大的 比表面积、大的细胞-晶体剪切应力。

关键词:一水草酸钙;尺寸效应;细胞损伤;肾结石;晶面 中图分类号:R69;0614.23 文献标识码:A 文章编号:1001-4861(2022)07-1261-11 DOI:10.11862/CJIC.2022.135

Synthesis, Characterization, Adsorption Properties of Calcium Oxalate Monohydrate Crystals with Different Aspect Ratios and Their Toxicity to Renal Epithelial Cell

CHENG Xiao-Yan XU Meng OUYANG Jian-Ming*

(Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, College of Chemistry and Materials Science, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Four kinds of calcium oxalate monohydrate (COM) crystals (COM-1:2, COM-1:3, COM-1:4, and COM-1:5) with the aspect ratio of 1:2, 1:3, 1:4, and 1:5, respectively, were synthesized. Their physicochemical properties were characterized by X - ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscope (SEM), ζ potentiometer, and specific surface tester. SEM images show that the widths of the crystals were similar, but the lengths of the crystals were (3±0.3) µm, (5.2±0.3) µm, (7.0±0.7) µm, and (8.8±1.2) µm, respectively. With the increase of reaction temperature, the length of the crystal increased. The faster the stirring speed, the smaller the crystal size. As the concentration of the additive gelatin decreased, the (101) faces of COM crystals were elongated. Cell viability, cell total mortality, and reactive oxygen species (ROS) tests showed that the toxicity of COM with different length-width ratios to the human proximal tubular epithelial cells (HK-2) was COM-1:2 > COM-1:3 > COM-1:4 > COM-1:5 > control group. SEM examination showed that all four COM crystals could adhere to the cell surface. The reasons for this difference are positively related to the following points: a large proportion of (101) crystal planes, large specific surface area, and small cell-crystal shear stress.

Keywords: calcium oxalate monohydrate; size effect; cell damage; kidney stones; crystal plane

收稿日期:2021-12-07。收修改稿日期:2022-04-20。

国家自然科学基金(No.21975105)资助。

^{*}通信联系人。E-mail:toyjm@jnu.edu.cn

0 引 言

肾结石是最常见的疾病之一,世界上大约有 10%的人正遭受到肾结石带来的痛苦^[1]。肾结石形 态的多种多样与其化学成分密切相关。草酸钙 (CaC₂O₄)是肾结石的主要成分,其中一水草酸钙 (COM)的发生率是二水草酸钙(COD)的2倍左右^[2]。 CaC₂O₄结石可呈鹿角状、不规则形和桑葚样。

CaC₂O₄肾结石的形成是一个与晶体成核、生长、 聚集和黏附密切相关的复杂的生物调控过程,其形 成机制至今尚未被完全阐明^[3]。肾小管上皮细胞 (REC)损伤是促进 CaC₂O₄结石形成的一个重要诱 因^[4],损伤的细胞不但为晶体成核提供了有效位点, 而且增强了细胞膜与矿物微晶的黏附,加速肾结石 形成。COM对肾小管上皮细胞的损伤大于COD。

尿液中的各种蛋白影响 CaC₂O₄结石的形成^[5]。 尿液中不但存在带负电荷的蛋白质如 Tamm-Horsfall 蛋白、凝血酶原、人血清白蛋白、糖蛋白、骨 桥蛋白等,还存在带正电荷的蛋白如组织蛋白酶G、 嗜酸性细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶前体等。 肾结石的形成还与尿液中的微晶密切相关,尿液中 的 COM 微晶有拉长六边形、圆形、菱形和不规则形。 由于个体的差异及饮食等生活习惯的差异,导致肾 管液中结石盐的过饱和度、pH 和抑制剂浓度及生物 大分子等存在差异;此外,尿微晶滞留在尿液中的 时间不同,也会导致不同尺寸、不同晶相、不同形貌 的尿微晶生成^[67]。但目前这些不同性质的晶体对 肾小管上皮细胞的毒性差异仍不清楚。

生物大分子在生物晶体形成中具有指导作用。 由于原位研究生物矿化过程存在一定的困难,人们 常常采用模拟体系在体外模拟生物矿物的形成^[8]。 Chen 等¹⁹利用明胶作为辅助模板合成了具有良好分 散性的片状ZSM-5沸石,体系中明胶浓度变化会影 响明胶链的展开和体系pH的变化,从而影响晶体 的形貌、尺寸等。晶体的生成与体系温度、pH、搅拌 速度、环境和剪切力等密切相关。根据经典的 Ostwald 熟化理论, 晶体形成的驱动力是粒子相总表 面积的降低,即产生的总界面自由能的降低,由于 小尺寸粒子比表面积(即吉布斯自由能)高于大尺寸 粒子,因此小尺寸粒子在熟化过程中会向大粒子沉 积^[10]。Pitto等^[11]研究了温度对晶体生长的影响,发 现反应温度越高,晶体越容易出现团簇,生长的速 度也越快,尺寸越大。随着溶液搅拌速度增加,颗 粒发生旋转,剪切力增大,溶质均匀分布在颗粒周 围,会增加成核并抑制生长,获得小尺寸的颗粒^[12]。

晶体尺寸的不同会导致晶体聚集程度、与细胞的接触面积、细胞毒性等发生变化。姚菊明等^[13]通过控制反应溶液的pH和运用水热法、化学沉淀法 合成了3种不同长径比的纳米磷酸钙颗粒:长径比 约为6:1的棒状磷酸钙、3:1的梭状磷酸钙和球形磷 酸钙。实验表明长径比的差异会造成磷酸钙颗粒 比表面积、晶面化学组分及与细胞间接触面积的不 同,导致对蛋白质的吸附存在差异,进而影响了与 细胞的黏附和增殖。Tamura等^[14]研究了不同尺寸Ti 对嗜中性粒细胞的毒性差异,大尺寸的Ti颗粒(10、 45和150μm)对细胞损伤较小,也无法进入细胞,而 2μm的小尺寸Ti对细胞的损伤显著增加,导致细胞 超氧化物阴离子、乳酸脱氢酶(LDH)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白介素-1β(IL-1β)的表达量明显增加。

为了探究尿液中不同尺寸、不同形貌尿微晶对 肾结石形成的影响,我们合成4种具有不同长宽比 的COM晶体,并比较研究了其对正常人肾近端上皮 细胞(HK-2)的损伤能力差异,期望为进一步阐明肾 结石形成机理、抑制肾结石形成提供新的启示。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

明胶为生物试剂。孔径0.22 μm的有机系微孔 滤膜购自上海兴亚公司。胎牛血清、细胞培养基 (DMEM/F-12)、胰酶均购自Gbico生化产品有限公司 (北京)。CCK-8细胞活性检测试剂盒(日本同仁化学 研究所)和Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒均购 自凯基生物(Keygen)技术有限公司。活性氧(ROS)检 测试剂盒、4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色液、牛 血清白蛋白(BSA)、4%多聚甲醛均购自上海碧云天 生物技术有限公司。其他常规试剂为分析纯试剂, 实验用水为蒸馏水。

主要仪器有 XL30 型环境扫描电子显微镜 (SEM,荷兰Philips公司)、D/max2400X射线粉末衍射 仪(XRD,日本理学)、傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, 美国 Nicolet公司)、Nano-ZS 型纳米粒度和ζ电位分 析仪(英国 Malvem公司)、Tristar 3000比表面积及孔 隙度分析仪(美国 Micromeritics公司)。

1.2 不同长宽比COM的合成

COM-1:2:取8g明胶加20mL水,加热至完全 溶解,离心除去明胶中的杂质,配成400mL的明胶 溶液(*ρ*_{selatin}=20mg·mL⁻¹)。在37℃下向上述明胶溶 液中加入 20 mL 20 mmol·L⁻¹的 K₂C₂O₄溶液,并加入 10 mL 0.5 mol·L⁻¹的 NaCl溶液维持离子强度。搅拌 10 min,然后在快速搅拌(900 r·min⁻¹)下加入 20 mL 20 mmol·L⁻¹的 CaCl₂溶液,继续搅拌反应 10 min,取 出溶液于室温中静置过夜,离心分离得到下层晶体,用蒸馏水和无水乙醇各洗涤 3次,于55℃的烘 箱中干燥,得到晶体。

COM-1:3:取2g明胶,在55℃反应5min,搅拌 速度600r·min⁻¹,其他同COM-1:2合成。

COM-1:4:取 0.2 g 明胶,在 70 ℃反应 5 min,搅 拌速度 600 r·min⁻¹,其他同 COM-1:2 合成。

COM-1:5:取0.2g明胶,在75℃反应5min,搅 拌速度300r·min⁻¹,其他同COM-1:2合成。

1.3 合成晶体的 SEM、XRD 和 FT-IR 表征

SEM 表征:将各尺寸的 COM 晶体分别分散在无 水乙醇中,配成 0.10 mg·mL⁻¹的悬浮液,超声 5 min 后,点样在 10 mm×10 mm 的玻片上,真空干燥后喷 金,在 SEM 下观察。工作条件:电压为 5.00 kV,工作 距离为 5~10 nm,放大倍数为 10 000。

XRD表征:取20mg晶体放入测量XRD的专用 凹槽中,用洁净载玻片压实后上机测试。测试条件:Cu Kα射线,石墨单色器,30kV,25mA,扫描范 围5°~60°,扫描速度8(°)·min⁻¹。

FT-IR表征:称取5 mg晶体和200 mg的KBr,在 玛瑙钵中研磨混匀,压片后在红外光谱仪上检测。 扫描范围为4000~400 cm⁻¹,分辨率为0.5 cm⁻¹。

1.4 晶体的 N₂吸附-脱附等温线测定

先将各晶体在 80 ℃进行脱气预处理,然后在温度 77 K(-196 ℃)下进行吸附--脱附实验,以高纯 N₂为吸附质。对脱气前后晶体的 XRD 检测表明,测试过程中 COM 晶体未发生晶相转化或分解。样品比表面积 (S_{BET})采用 BET(Brunauer - Emmet - Teller)方程计算。

1.5 培养液中各晶体ζ电位检测

称取各 COM 晶体分别分散在 pH=7.3 的培养液 中, 配成 0.10 mg·mL⁻¹的溶液, 超声 5 min, 在恒温 (25 ℃)下采用纳米粒度和ζ电位分析仪检测晶体的ζ 电位。

1.6 细胞培养和晶体损伤前后的细胞活力检测

HK-2 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37 ℃、CO₂体积分数 5% 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% 融合 后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2次, 加入 0.25% 胰酶- EDTA 消化液, 置于 37 ℃培养箱中 3~5 min, 在倒置 显微镜下观察消化程度。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。

将上述单细胞悬液按浓度为1.0×10⁵ mL⁻¹、每孔 100 μ L接种于96孔培养板孵育24h后,改用无血清 的DMEM培养液孵育12h,使细胞同步化,吸除培 养液,用PBS洗涤细胞2次。将实验模型分为2组: (A) 对照组,只加入无血清培养液;(B) COM 晶体处 理组,分别加入长宽比为1:2、1:3、1:4和1:5的 COM 晶体(200 μ g·mL⁻¹,用无血清培养液配制)。每 个实验重复3孔。孵育6h后,每孔加入10 μ L的 CCK-8试剂,孵育4h,用酶标仪在450 nm处测量吸 光度(A),求得3个复孔A值的平均值。细胞活力 (cell viability)用以下公式计算: $R_{cell}=A_t/A_c \times 100\%$,其 中 R_{cell} 表示活细胞率,即细胞活力; A_t 为晶体处理组 的吸光度; A_c 为对照组的吸光度。

1.7 透明质酸(HA)表达检测及 HA 荧光强度的定量分析

细胞按浓度 1.0×10⁵ mL⁻¹、每孔 1 mL 接种于 12 孔培养板。待细胞同步化后,将细胞按 1.6 节所述 分组。孵育 6 h 后吸除上清液,用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入固定液(由 5% 冰醋酸、10% 福尔马林和 70% 酒精组成)固定细胞 20 min,用 PBS 洗涤细胞 3 次。 再加入 100 μL 5 μg·mL⁻¹的 bHABP 溶液(用 3% 牛血 清白蛋白溶液配制,现用现配),4 ℃条件下孵育过 夜。用 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min。再加入 100 μL FITC-avidin(异硫氰酸荧光素-亲和素)孵育细胞 1 h,用 PBS 洗涤细胞 3 次。加入 DAPI 染色液复染 4 min, PBS 洗涤细胞 5 次。加入 DAPI 染色液复染 4

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

1.8 荧光显微镜观察晶体损伤前后细胞中 ROS 水平

细胞分组同上。到达作用时间后,吸除上清液,用2′,7′-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)在 37℃染色30min,用PBS清洗3次以去除未进入细胞内的DCFH-DA,在荧光显微镜下观察。

1.9 流式细胞仪检测细胞凋亡和坏死

细胞分组同上。用0.25% 胰酶消化后加入10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液使细胞悬浮,然后离

心(1 000 r·min⁻¹,5 min),吸除上清液后用PBS洗涤2 遍,重新离心得到细胞沉淀。加入200 μL PBS重 悬,1 000 r·min⁻¹离心5 min后弃去上清液。加入 200 μL binding缓冲溶液混匀,加5 μL Annexin V-FITC 在室温避光条件下孵育10 min,离心(1 000 r· min⁻¹)5 min后弃去上清液;加入200 μL binding缓冲 溶液混匀,再加5 μL PI 后采用流式细胞仪进行 检测。

1.10 细胞表面黏附晶体的 SEM 观察

细胞分组同上。达到黏附时间后,吸除上清液,用PBS洗涤3次,加入2.5%的戊二醛,于4℃固定细胞24h后再用1%OsO₄溶液固定,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后马上采用CO₂临界干燥,喷金包被。在SEM下观察晶体的黏附情况。

2 结 果

报

2.1 不同长宽比拉长六边形 COM 晶体的合成

通过改变反应温度、搅拌速度和控制添加剂的 比例(表1),得到了长宽比分别为1:2、1:3、1:4和1: 5的COM晶体(图1),依次命名为COM-1:2、COM-1: 3、COM-1:4和COM-1:5。晶体的长度分别为(3± 0.3)μm、(5.2±0.3)μm、(7.0±0.7)μm和(8.8±1.2)μm, 但晶体宽度相近。随着晶体尺寸增大,晶体(ī01)面 被拉长,长宽比也由1:2增大到约1:3、1:4和1:5 (图2)。

影响COM晶体尺寸和长宽比的因素包括:

(1)反应温度。反应温度越高,生成的晶体越长。合成COM-1:2、COM-1:3、COM-1:4和COM-1:5
 的反应温度依次为37、55、70和75℃,当温度升高

表1 不同长宽比COM晶体的合成条件及其部分理化性质

Table 1 Synthesis conditions and some physical and chemical properties of COM crystals with different aspect ratios a

Crystal	Aspect ratio	Crystal	Synthesis conditions			Physical and chemical properties		
		size / µm	$T / ^{\circ}\mathbb{C}$	$ ho_{ m gelatin}$ / (mg·mL ⁻¹)	Stirring rate / (r•min ⁻¹)	I_{101}^{-}/I_{010}^{-b}	$S_{\rm BET}/({\rm m}^2{\boldsymbol{\cdot}}{\rm g}^{-1})$	ζ potential / mV
COM-1:2	1:2	3.5±0.3	37	20	900	2.20	5	-16.2±2.6
COM-1:3	1:3	4.2±0.3	55	5	600	1.80	4	-12.6±0.8
COM-1:4	1:4	5.0±0.7	70	0.5	600	1.61	3	-11.1±2.1
COM-1:5	1:5	5.2±1.2	75	0.5	300	1.33	2	-9.93±1.34

^a $c_{\text{Ca}^2} = c_{\text{C}_2 O_4^2} = 20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and all the reactants were directly mixed; ^b I_{101} and I_{010} are the intensities of the spacing $d_{101} = 0.593 \text{ nm}$ and $d_{010} = 0.593 \text{$

0.365 nm of COM crystals, respectively.



图1 不同长宽比六边形 COM 晶体 SEM 照片

Fig.1 SEM images of hexagonal COM crystals with different aspect ratios



图2 不同长宽比COM晶体的示意图

Fig.2 Schematic diagram of COM with different aspect ratios

时,晶体的成核速率下降,生长速率增加¹¹¹,从而导 致晶体数量减少,晶体的尺寸增加。

(2)搅拌速度。搅拌速度越大,生成的晶体尺寸 越小。合成上述4个晶体的搅拌速度分别为900、 600、600和300 r·min⁻¹,搅拌速度增加后,成核速率 增大^[12],形成的晶核数量增加,晶体尺寸减小。

(3) 添加剂明胶的影响^[9]。随着明胶质量浓度减 小,COM 被拉长,晶体的长宽比由1:2 增大至1:5。 线状大分子明胶是胶原蛋白的降解产物,其主链由 不同氨基酸通过肽键链接而成,侧链含有大量 -OH、-NH₂和-COOH等极性基团,明胶分子形 成的网状结构可以有效构建仿生环境下生物晶体 的合成^[8]。在 COM 合成过程中,明胶先通过其 一COOH与Ca²⁺配位,再与晶体表面暴露的草酸根 形成"钙桥"(图 3B),完成在初始晶核表面的吸附过 程。COM不同晶面的C₂O₄²⁻密度大小为($\overline{1}$ 01)(5.42 nm⁻²)>($\overline{1}$ 20)(4.29 nm⁻²)>(010)(3.30 nm⁻²)¹⁵],因此,明胶 主要结合在C₂O₄²⁻密度高的($\overline{1}$ 01)和($\overline{1}$ 20)晶面,从而 抑制其($\overline{1}$ 01)晶面沿着[100]方向生长和($\overline{1}$ 20)晶面沿 着[$\overline{1}$ 20]方向生长¹⁶]。当明胶质量浓度较高(20 mg· mL⁻¹)时,抑制作用较为明显,导致COM晶体变薄,长 宽比较小,形貌为薄的平板状六边形(图 3C)。当明 胶质量浓度降低至 0.5 mg·mL⁻¹时,对 COM 晶体沿 着这 2 个方向的抑制作用减小,($\overline{1}$ 20)晶面沿着[$\overline{1}$ 20] 方向生长,($\overline{1}$ 01)面沿着[001]方向逐渐被拉长,棱角 变得尖锐,形貌演变为拉长的六边形(图 3D)。



图 3 不同长宽比 COM 晶体生长示意图: (A) COM 晶核; (B) 吸附在 COM 特定晶面的明胶分子; (C) 六边形 COM; (D) 拉长六边形 COM

Fig.3 Schematic diagram of crystal growth of COM with different aspect ratios: (A) COM crystal nuclei; (B) gelatin molecules adsorbed on specific crystal planes of COM; (C) hexagonal COM; (D) elongated hexagonal COM

2.2 COM 晶体的 XRD 和 FT-IR 表征

图 4A 为制备的不同长宽比 COM 晶体的 XRD 图 。主要检测到的衍射峰的晶面间距 d=0.593、0.365、0.296、0.235 和 0.197 nm,分别归属于 COM 的 (101)、(020)、(202)、(130)和(303)晶面(PDF No.20-231)^[17]。这些 XRD 图均没有除 COM 晶体以外的杂峰。

随着晶体长宽比增加,COM的(Ī01)和(010)晶面 强度比值(*I*₁₀₁/*I*₀₁₀)逐渐减小(表1)。其原因可能是随 着晶体尺寸的增大,晶体的厚度逐渐增加,(010)晶 面增大。从图2亦可以看出,COM-1:2晶体较薄, (010)晶面所占的面积比例也较小;而COM-1:4和 COM-1:5晶体变厚,(010)晶面所占的面积比例增加。



图4 四种不同长宽比 COM 晶体的(A) XRD 图和(B) FT-IR 谱图: (a) COM-1:2; (b) COM-1:3; (c) COM-1:4; (d) COM-1:5 Fig.4 (A) XRD patterns and (B) FT-IR spectra of four COM crystals with different aspect ratios: (a) COM-1:2; (b) COM-1:3; (c) COM-1:4; (d) COM-1:5

根据晶体生长的择优取向性^[18],晶体沿着[100]方向 生长趋势增强,(010)晶面变大(图2d),即*L*₁₀₁/*L*₀₁₀也逐 渐减小。

图 4B 为不同长宽比 COM 的 FT-IR 谱图,4种 COM 均呈现典型的 COM 特征吸收峰^[5]。各晶体在 3 047~3 485 cm⁻¹区间有 5个小峰,归属于 COM 结晶 水中 0—H 振动。COM 中的羧基(COO⁻)不对称伸缩 振动(*v*_{as})和对称伸缩振动(*v*_s)分别在 1 620 和 1 319 cm⁻¹附近。在指纹区,COM 晶体的吸收带出现在 780、661 和 514 cm⁻¹左右。

XRD和FT-IR分析结果表明,所合成的草酸钙均为单一的COM晶体。

2.3 不同长宽比COM的比表面积

图 5 为各 COM 晶体对 N_2 的吸附--脱附等温线。 这些曲线在高压部分(p/p_0 >0.85)仅有 1.5~6.0 cm³·g⁻¹ 的略微突跳,说明这些 COM 晶体是无孔材料。因为 这种突跳通常是颗粒间堆积产生的间隙所致,而非 材料中存在的介孔(2~50 nm)结构所贡献。SEM 图 像(图 1)也表明各 COM 不存在大的介孔。经计算, 各 COM 晶体的比表面积为 2~5 m²·g⁻¹,如此低的比 表面积亦说明 COM 晶体是一种无孔材料,即比表面 积主要是由晶体外表面所贡献。晶体尺寸越大,晶 体的比表面积越小(表 1)。例如,COM-1:2的比表面 积是5 m²·g⁻¹,而 COM-1:5减小至2 m²·g⁻¹。



图 5 不同长宽比 COM 的 N₂吸附-脱附等温线: (A) COM-1:2; (B) COM-1:3; (C) COM-1:4; (D) COM-1:5 Fig.5 N₂ adsorption-desorption isotherms of COM with different aspect ratios: (A) COM-1:2; (B) COM-1:3; (C) COM-1:4; (D) COM-1:5

2.4 不同长宽比 COM 在培养基中的 ζ 电位

分散在培养液中的各晶体的ζ电位值均是负值 (-9.93~-16.2 mV,表1),且随着晶体长宽比的增加,ζ 电位的绝对值不断增大,这有利于抑制晶体在溶液 中的聚集。其原因是:晶体长宽比增加后,其带正 电荷的(Ī01)晶面所占晶体表面积的百分比相对变 小(表1 中 *I*₁₀₁/*I*₀₁₀值),晶体表面吸附的培养液中带负 电荷的物质(如氨基酸和蛋白质等)减少,因此ζ电位 绝对值变小。

2.5 不同长宽比 COM 对 HK-2 活力和 HA 表达量 的影响

采用 CCK-8 法检测了各 COM 晶体对 HK-2 的氧化性损伤。如图 6A 所示,相比于对照组,COM-1:2 对细胞的损伤最为明显,造成了 HK-2 约 80.1% 的损伤。各 COM 晶体对 HK-2 损伤大小依次为 COM-1:2 >COM-1:3>COM-1:4>COM-1:5。

HA 是肾上皮细胞膜表面的主要黏附分子之一,在细胞受到损伤时将上调 HA 的量。相比于对

程小燕等:不同纵横比一水草酸钙晶体的合成、表征、 吸附性能及其对肾上皮细胞的毒性差异



COM-1:4

COM-1:5

Colors in fluorescence microscope image: green for HA and blue for nuclear; Conditions for fluorescence microscope observation: 6 h of incubation time and 200 μ g·mL⁻¹ of mass concentration of crystal

图6 不同长宽比COM引起的HK-2活力变化和细胞表面HA表达量变化:(A)细胞活力; (B)对HA的荧光显微镜观察;(C)HA表达量柱状图

Fig.6 Changes of cell viability and HA expression on HK-2 surface caused by COM with different aspect ratios: (A) cell viability; (B) fluorescence microscope observation; (C) histogram of HA expression

照组,各COM均导致了HA表达量的增加(图6B中 绿色),且COM-1:2引起的HA表达最强,COM-1:5 最弱(图6C)。

2.6 不同长宽比COM对ROS水平的影响

ROS能够迅速与细胞内大分子反应,导致正常 细胞功能损害,最终导致细胞死亡。这种氧化损伤 的细胞能够促进草酸钙晶体在肾脏部位的沉积^[19]。 图 7A 为采用 DCFH-DA 荧光探针测量的不同长宽比 COM 晶体诱导 HK-2 细胞产生的 ROS 情况。可以看 出,各组细胞的 ROS 荧光强度为 COM-1:2>COM-1:3>COM-1:4>COM-1:5>对照组,即 COM-1:2表现出 更高的细胞损伤,引起了更多的 ROS产生。

2.7 流式细胞仪检测细胞的凋亡和坏死

采用 Annexin V/PI 双染法并通过流式细胞术对 凋亡和坏死细胞进行了定量检测(图 7B)。对照组总 的死细胞(Q1+Q2+Q4)比例为1.7%。而 COM-1:2、 COM-1:3、COM-1:4和 COM-1:5 与细胞作用6h后, 分别导致了19.4%、18.4%、15.9%和11.1%的细胞死 亡(图 7C)。

2.8 不同长宽比COM与HK-2黏附的SEM观察

图 8 为不同长宽比 COM 与正常 HK-2 孵育 6 h 后的 SEM 观察结果。在细胞表面特别是细胞的边 侧黏附有 COM 晶体。由于细胞与晶体之间存在相 互作用,细胞表面晶体的形状与初始晶体(图 1)存在



Quadrants Q1, Q2, Q3, and Q4 denote the ratio of necrotic cells, late-stage apoptotic cells, normal cells, and early stage apoptotic cells, respectively; Conditions: 6 h of incubation time and 200 μ g·mL⁻¹ of mass concentration of crystal

- 图 7 不同长宽比 COM 引起的 HK-2 的 ROS 水平、细胞凋亡和坏死变化: (A) ROS 水平; (B) Annexin V/PI 双染法定量 检测细胞凋亡和坏死的散点图; (C) 总的死细胞(Q1+Q2+Q4)比例(r_i)
- Fig.7 Changes in ROS expression, apoptosis and necrosis induced by COM crystals with different aspect ratios: (A) ROS on HK-2 surface; (B) dot plots of cellular apoptosis and necrosis detected quantitatively by annexin V/PI double staining; (C) ratio of total dead cells (Q1+Q2+Q4) (r_i)

程小燕等:不同纵横比一水草酸钙晶体的合成、表征、 吸附性能及其对肾上皮细胞的毒性差异





COM-1:4

Fig.8 SEM images of HK-2 adhered to COM crystals with different aspect ratios

一定的差异,但晶体的长度变化不大。

从图8可以看出,受到COM晶体损伤的细胞明显收缩,表面变得粗糙,有颗粒状物质出现,归因于细胞中的蛋白质、脂类和糖等物质附着。相比之下,没有黏附晶体的对照组细胞表面光滑平整。部分COM晶体与细胞黏附后存在聚集现象,这是由于被晶体损伤后的细胞表达的带负电荷的黏附分子不但能够促进晶体黏附,而且还促进晶体的聚集。

3 讨 论

3.1 不同尺寸COM晶体对HK-2的损伤模型

不同长宽比COM对HK-2产生损伤作用的机 理:当处在培养液中的COM晶体与HK-2作用时,会 引起细胞皱缩、细胞核变小(图 8)、细胞膜和溶酶体 破裂;COM 晶体引起 NADPH 氧化酶的激活,进而诱 发•0,一产生,•0,一的过量产生可以造成线粒体的功能 紊乱甚至衰竭、线粒体膜电位下降,引起ROS的生 成(图7A);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(JNK)和转录因子 NFκB等^[20]。一系列的级联反应最终使得细胞功能受 损,引起细胞的坏死性死亡以及部分凋亡性死亡(图 7B)。在细胞凋亡和坏死的过程中,会引起细胞表面 黏附分子如HA(图 6B)和骨桥蛋白(OPN)的表达升 高,磷脂酰丝氨酸(PS)外翻,以及细胞表面脂质过氧 化产物 MDA 产生。HA、OPN 表达量升高后,又进一 步增加了细胞对晶体的黏附,加重细胞的损伤。

ROS水平和HA表达量均与细胞的损伤程度呈正相 关。我们以前的研究^[21]表明,微/纳米COM可以导致 不同亚细胞结构的损伤,且发生明显损伤变化的时 间顺序为细胞膜损伤(1 h)<线粒体膜电位下降(3~6 h)≈细胞周期滞留(3~6 h)<细胞凋亡(12 h),其中尺寸 小的晶体导致细胞器的损伤更快,这归因于尺寸越 小的晶体越容易通过内化作用进入细胞内。

COM-1:5

黏附于细胞表面的晶体会与细胞相互作用,导 致晶体形貌发生改变。首先,细胞表面表达的带负 电荷的黏附分子如OPN、HA(图 6B)和PS等可以与 COM 晶体富含 Ca²⁺离子的(101)晶面作用,尤其是与 COM 晶体的棱和尖端暴露的 Ca²⁺离子产生螯合作 用;其次,细胞自身也可以通过网格蛋白介导的途 径或巨胞饮作用内吞晶体^[22];最后,细胞损伤后会引 起细胞膜的破裂,导致溶酶体中的基质金属蛋白酶 (MMP-7)、羧肽酶 M、亮氨酸氨肽酶和碱性磷酸酶等 释放到细胞外,从而增加了对晶体的溶解,引起晶 体的形态变化。Narula等^[23]也观察到在肾结石基质 蛋白存在下,COM 晶体边缘和表面的溶解很明显, 这种形态变化促进了晶体-细胞间的相互作用,增 加了细胞对晶体的吸附、溶解及内吞。

3.2 不同长宽比 COM 晶体对 HK-2 损伤存在差异的原因

从细胞活力(图 6A)、HA 表达量(图 6B)、ROS 数据(图 7A)和细胞死亡率(图 7B)可以看出,不同长宽比 COM 对 HK-2 的细胞毒性呈现的变化规律为 COM-1:2>COM-1:3>COM-1:4>COM-1:5>对照组。

造成这种差异是以下各因素的综合影响:

(1) COM 晶体的(ī01)晶面大小。COM-1:2显露 出较大的(ī01)晶面,其*I*₁₀₁/*I*₀₁₀=2.20。而COM-1:5的 *I*₁₀₁/*I*₀₁₀=1.33。由于(ī01)面的钙离子密度(5.42 nm⁻²) 比(010)晶面(3.33 nm⁻²)高出约63%^[15],因此,富含Ca²⁺ 离子的(ī01)晶面与细胞表面存在更强的作用力。 Sheng 等^[24]研究表明,COM 的(ī01)晶面与羧基 (一COOH)修饰的AFM针尖的黏附力是(010)晶面的 4倍以上,即COM-1:2与肾小管上皮细胞的黏附能 力更大,引起的细胞损伤也更大。

(2) 晶体尺寸。从图1可以看出,各晶体尺寸大 小为COM-1:2<COM-1:3<COM-1:4<COM-1:5,尺寸 越小的晶体,其比表面积越大(表1),裸露在晶体表 面的活性位点越多,与细胞间的相互作用越强,对 细胞的损伤也越严重。

(3) 晶体的比表面积。当晶体的质量浓度相同时,小尺寸的晶体数量更多,拥有更大的表面积,即小尺寸 COM 晶体的表面裸露出更多的反应活性位点,这些活性位点可以捕获氧分子并制造超氧自由基以及通过歧化反应或芬顿反应产生 ROS^[25],因此小尺寸的晶体产生更大的细胞毒性。

(4) 晶体的颗粒数。由于晶体的细胞毒性实验 是用固定的晶体质量浓度(200 μg·mL⁻¹)进行,因此, 大尺寸晶体的数量较少,即作用于细胞表面的晶体 个数减少,对细胞的损伤机会降低,故COM-1:5 对 HK-2的损伤作用最弱。

(5) 细胞与晶体剪切应力的影响。随着 COM 晶体长度增加,晶体与细胞间的界面接触并不能完全地贴合。大尺寸的 COM-1:5 与细胞的临界剪切应力较小,导致其损伤细胞的能力减弱^[26]。因此,其损伤细胞的能力也减弱。

4 结 论

合成了4种长宽比分别为1:2、1:3、1:4和1:5 的COM晶体并对其进行了表征。升高反应温度、降 低搅拌速度和减小添加剂明胶的浓度,均可以增大 COM的长宽比。不同长宽比COM对人肾近端上皮 细胞的毒性大小为COM-1:2>COM-1:3>COM-1:4> COM-1:5>对照组。COM晶体的(101)晶面比例增 加、晶体的比表面积增大、细胞与晶体剪切应力增 大,均会增加COM晶体的细胞毒性。由于尿液中存 在不同尺寸、不同形貌的尿微晶,因此,本研究有助 于进一步阐明COM结石的形成机理,并对预防肾结 石形成提供启示。

参考文献:

报

- [1]Khan S R, Pearle M S, Robertson W G, Gambaro G, Canales B K, Doizi S, Traxer O, Tiselius H G. Kidney Stones. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2016.2(1):16008
- [2]Khan A H, Imran S, Talati J, Jafri L. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Analysis of Kidney Stones. *Invest. Clin. Urol.*, 2018,59(1): 32-37
- [3]Sun X Y, Zhang H, Chen J Y, Zeng G H, Ouyang J M. Porphyra Yezoensis Polysaccharide and Potassium Citrate Synergistically Inhibit Calcium Oxalate Crystallization Induced by Renal Epithelial Cells and Cytotoxicity of the Formed Crystals. *Sci. Eng. C*, 2021, 119: 111448
- [4]Liu H R, Ye T, Yang X Q, Liu J H, Jiang K H, Lu H Y, Xia D, Peng E, Chen Z Q, Sun F, Tang K, Ye Z Q. H19 Promote Calcium Oxalate Nephrocalcinosis-Induced Renal Tubular Epithelial Cell Injury via a ceRNA Pathway. *EBioMedicine*, **2019**,**50**:366-378
- [5]温小玲,孙新园,欧阳健明.带正电荷蛋白在纳米/微米草酸钙晶体上的吸附特性及其与带负电荷蛋白吸附的比较.无机化学学报,2017,33(1):49-56
- WEN X L, SUN X Y, OUYANG J M. Adsorption Properties of Positively Charged Proteins on Nano/Micron Calcium Oxalate Crystals and Their Comparison with Negatively Charged Proteins. *Chinese J. Inorg. Chem.*, **2017**, **33**(1):49-56
- [6]Ouyang J M, Xia Z Y, Zhang G N, Chen H Q. Nanocrystallites in Urine and Their Relationship with the Formation of Kidney Stones. *Rev. Inorg. Chem.*, 2012,32(2/3/4):101-110
- [7]Lou Y T, He W, Song Z Y. Aggregation of Nanochemical Microcrystals in Urine Promotes the Formation of Urinary Calculi. J. Chem., 2020:8516903
- [8]Jo M, Oh Y, Kim H J, Kim H L, Yang S H. Diffusion-Controlled Crystallization of Calcium Carbonate in a Hydrogel. *Cryst. Growth Des.*, 2020,20(2):560-567
- [9]Chen X S, Jiang R L, Zhou Z H, Wang X W. Synthesis and Catalytic Properties of ZSM-5 Crystals with Different Morphologies in Gelatin Hydrogels. J. Disper. Sci. Technol., 2019,42(4):561-568
- [10]An D C, Wang J J, Zhang J, Zhai X, Kang Z P, Fan W H, Yan J, Liu Y Q, Lu L, Jia C L, Wuttig M, Cojocaru-Mirédin O, Chen S P, Wang W X, Snyder G J, Yu Y. Retarding Ostwald Ripening through Gibbs Adsorption and Interfacial Complexions Leads to High-Performance SnTe Thermoelectrics. *Energy Environ. Sci.*, **2021**,**14**(10):5469-5479
- [11]Pitto-Barry A, Barry N P E. Effect of Temperature on the Nucleation and Growth of Precious Metal Nanocrystals. Angew. Chem. Int. Ed., 2019,58(51):18482-18486
- [12]Zhang X, Wang Y, Liu D R, Ji Z S, Xu H Y, Hu M L, Cui P X. Effect of Stirring Rate on Grain Morphology of Mg-Al Alloy Semi-Solid Structure by Phase Field Lattice Boltzmann Simulation. J. Cryst. Growth., 2020,543:125704
- [13]曹俊,蔡玉荣,马寅孙,姚菊明.纳米磷酸钙对 MG63 细胞生物学 行为的影响.中国组织工程研究,2012,16(29):5341-5344

CAO J, CAI Y R, MA Y S, YAO J M. Effects of Nano-Calcium Phosphate on Biological Behavior of MG63 Cells. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, **2012**,**16**(29):5341-5344

- [14]Tamura K, Takashi N, Kumazawa R, Watari F, Totsuka Y. Effects of Particle Size on Cell Function and Morphology in Titanium and Nickel. Mater. Trans., 2002.43(12):3052-3057
- [15]Sheng X X, Ward M D, Wesson J A. Crystal Surface Adhesion Explains the Pathological Activity of Calcium Oxalate Hydrates in Kidney Stone Formation. J. Am. Soc. Nephrol., 2005,16(7):1904-1908
- [16]Farmanesh S, Ramamoorthy S, Chung J, Asplin J R, Karande P, Rimer J D. Specificity of Growth Inhibitors and Their Cooperative Effects in Calcium Oxalate Monohydrate Crystallization. J. Am. Chem. Soc., 2014,136(1):367-376
- [17]King M, Mcclure W F, Andrews L C. Powder Diffraction File Alphabetical Index, Inorganic Phases/Organic Phases. International Center for Diffraction Data, U.S.A., 1992.
- [18]Wang L, He X M, Sun W T, Wang J L, Li Y D, Fan S S. Crystal Orientation Tuning of LiFePO₄ Nanoplates for High Rate Lithium Battery Cathode Materials. *Nano Lett.*, 2012,12(11):5632-5636
- [19]Jiang K H, Hu J X, Luo G H, Song D L, Zhang P, Zhu J G, Sun F. MiR-155-5p Promotes Oxalate- and Calcium-Induced Kidney Oxidative Stress Injury by Suppressing MGP Expression. Oxid. Med. Cell.

Longevity, 2020:5863617

- [20]Zhang L M, Zhen R R, Gu C, Zhang T L, Li Y, Jin M, Hu B, An H M. Chinese Medicine Di-Huang-Yi-Zhi Protects PC12 Cells from H₂O₂-Induced Apoptosis by Regulating ROS-ASK1-JNK/p38 MAPK Signaling. BMC Complement. Med. Ther., 2020,20(1):54
- [21]Sun X Y, Yu K, Ouyang J M. Time-Dependent Subcellular Structure Injuries Induced by Nano-/Micron-Sized Calcium Oxalate Monohydrate and Dihydrate Crystals. *Mater. Sci. Eng. C*, 2017,79:445-456
- [22]Sun X Y, Gan Q Z, Ouyang J M. Size-Dependent Cellular Uptake Mechanism and Cytotoxicity toward Calcium Oxalate on Vero Cells. *Sci. Rep.*, 2017,7:41949
- [23]Narula S, Tandon S, Singh S K, Tandon C. Kidney Stone Matrix Proteins Ameliorate Calcium Oxalate Monohydrate Induced Apoptotic Injury to Renal Epithelial Cells. *Life. Sci.*, 2016,164:23-30
- [24]Sheng X X, Jung T S, Wesson J A, Ward M D. Adhesion at Calcium Oxalate Crystal Surfaces and the Effect of Urinary Constituents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005,102(2):267-272
- [25]Nel A, Xia T, Madle L, Li N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. Science, 2006,311(5761):622-627
- [26]Patil V R S, Campbell C J, Yun Y H, Slack S M, Goetz D J. Particle Diameter Influences Adhesion under Flow. *Biophys. J.*, 2001, 80(4): 1733-1743