

服药前后草酸钙结石患者尿微晶的性质变化

李君君, 侯善华, 夏志月, 欧阳健明*

暨南大学生物矿化与结石病防治研究所, 广东 广州 510632

摘要 采用X射线衍射(XRD)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、纳米粒度仪和透射电子显微镜(TEM)研究了6例草酸钙结石患者在服药前后尿微晶性质的变化。结果表明,服药后尿pH值由服药前的 5.87 ± 0.51 增加至 6.23 ± 0.74 ;服药前的主要成分为尿酸、一水草酸钙(COM)和磷酸氢盐,服药后尿微晶种类和数量均比服药前减少;服药前,尿微晶的平均粒径为 (579 ± 326) nm,服药后减小至 (404 ± 338) nm;服药前尿微晶的Zeta电位为 (-4.28 ± 2.55) mV,服药后为 (-7.29 ± 4.16) mV, Zeta电位变负有利于防止尿微晶沉积;服药前尿微晶棱角尖锐,有明显的团聚现象,而服药后尿微晶形貌圆钝,团聚较少。采用现代仪器分析研究服药前后草酸钙结石患者尿液微晶的性质变化,对临床上预防和治疗尿结石具有重要的临床意义。

关键词 尿微晶; 草酸钙; Zeta 电位; 粒径分布; XRD; FTIR

中图分类号: O434; O611.6 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)08-2263-05

引言

含钙结石,包括草酸钙(CaOxa)和磷酸钙,是尿结石的最普遍的形式^[1]。目前,临床上治疗尿结石的主要方法是体外碎石,但其治愈后复发率很高,大约25%~75%的患者在初次发病后的半年至20年内会再次发生结石,这给结石患者带来了很大的痛苦。

治疗草酸钙结石的药物有枸橼酸盐、磷酸盐和镁制剂等。其中,枸橼酸钾(K_3cit)是治疗和预防草酸钙结石的主要药物。通过长期观察结石病人服用 K_3cit 后的晶体聚集情况,发现草酸钙晶体聚集的时间增加了,且服用者新结石的发生率为未服用 K_3cit 者的五分之一^[2]。

草酸钙结石患者在服用 K_3cit 前后的尿纳米微晶性质是否发生了某些变化,国内外未见报道。因此,本文研究了六例草酸钙结石患者在服用 K_3cit 前后尿液中纳米微晶性质的变化。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

无水乙醇,叠氮化钠均为分析纯,所有玻璃器皿均用二次蒸馏水清洗干净。

日本理学 D/max 2400 (Rigaku) X 射线衍射仪(XRD); 美国 Nicolet 公司傅里叶变换红外光谱仪(FTIR); 英国 Malvern 公司 Zetasizer Nano-ZS 型纳米粒度仪; PHILIPS TECNAI-10 型透射电子显微镜(TEM); 荷兰飞利浦公司 XL-30 环境扫描电子显微镜(ESEM)和 PHS-3C 型酸度计。

1.2 尿石的收集、处理和组分表征

六例草酸钙结石均为暨南大学第一附属医院泌尿外科手术取石所得,其中男3名,女3名,平均年龄57.2岁。结石标本用清水洗后,放入体积分数为75%的乙醇中消毒(杀死细菌);低温烘干,然后在研钵内研磨成粉末,分别采用XRD和FTIR进行组分分析。本文所选6例结石的组分均为 CaOxa 。

1.3 尿液的收集、处理和组分表征

收集服药前和服用枸橼酸钾(K_3cit)一周后的草酸钙结石患者的新鲜晨尿,测定其pH值;然后加入2%(质量分数)的叠氮化钠溶液(加入量为 $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿液)防腐。按照文献[3]方法进行尿微晶的Zeta电位、XRD、FTIR和TEM测定。

2 结果与讨论

2.1 草酸钙结石的组分分析

采用XRD和FTIR对6例手术取出的 CaOxa 结石组分

收稿日期: 2010-10-15, 修订日期: 2011-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30672103)和广东省科技攻关项目(2009B030801236)资助

作者简介: 李君君,女,1973年生,暨南大学生物矿化与结石病防治研究所博士研究生 e-mail: anshuljj@163.com

* 通讯联系人 e-mail: toyjm@jnu.edu.cn

进行了分析, 图 1 为 2 例代表性的图谱。XRD[图 1(a)]中检测到晶面间距 $d=5.93, 3.65, 2.96, 2.49, 2.35$ 和 $1.98 \text{ \AA}$

的衍射峰, 分别属于一水草酸钙(COM)的($\bar{1}01$), (020), ($\bar{2}02$), (112), (130)和($\bar{3}03$)晶面^[4, 5]。

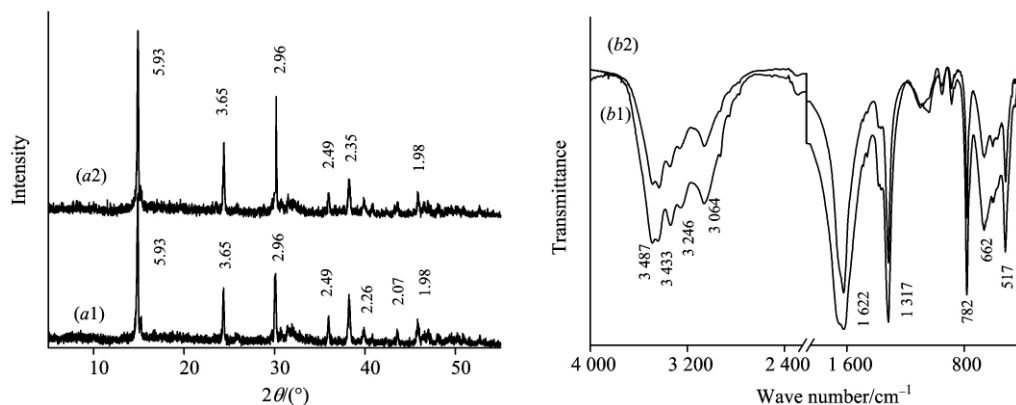


Fig 1 XRD patterns (a) and FTIR spectra (b) of two cases of calcium oxalate stones

FTIR 检测到波数为 $3487\sim 3064 \text{ cm}^{-1}$ 处的五个宽的吸收峰为 COM 分子中结晶水的吸收峰; 1622 和 1317 cm^{-1} 的峰分别对应 COM 羧基的不对称伸缩振动 $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ 和对称伸缩振动 $\nu_s(\text{COO}^-)$; 782 cm^{-1} 处的尖峰和 662 和 517 cm^{-1} 的峰进一步证实 COM 的存在^[5]。

2.2 服药前后尿 pH 变化

对六例草酸钙结石患者服药前后的尿液 pH 值进行了检测, 其结果见表 1。服药前, 其尿 pH 值在 5.2 到 6.7 之间,

平均值为 5.87 ± 0.51 ; 服用一周的 K_3cit 颗粒 ($4.38 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$)、适量的利尿药物及尿石通之后, 其尿 pH 值总体呈高趋势, 平均值为 6.23 ± 0.74 。

根据何慧婵等^[6]的研究结果: 20 例结石患者服用一周的 K_3cit 片 ($5.52 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$) 后, 尿液中的 K_3cit 排泄量从 (296 ± 112) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 增加到 (432 ± 168) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。因此患者服用 K_3cit 后, 增加了尿液中的 K_3cit 排泄量, K_3cit 是一种碱, 可碱化尿液^[7], 导致尿液的 pH 上升。

Table 1 Urine pH, zeta potential (ξ), PDI, and particle size ($\bar{d}$) of calcium oxalate stone formers before and after taking medicine

No.	Urine pH	ξ/mV	PDI	$\bar{d}/\text{nm}$	size distribution(%) / nm
Before taking medicine					
A1	5.92	-8.22	0.615	293	688(52), 106(48)
A2	6.71	-2.18	0.729	407	799(88), 70(12)
A3	5.48	-4.40	0.659	649	791(71), 27(17), 6(12)
A4	5.86	-4.05	0.886	886	1764(91), 80(9)
A5	6.04	-1.06	0.577	220	519(48), 146(45), 17(7)
A6	5.21	-5.78	0.973	1016	692(79), 80(21)
Average	5.87 ± 0.51	-4.28 ± 2.55	0.740 ± 0.158	579 ± 326	
After taking medicine					
B1	6.31	-9.13	0.551	146	394(43), 98(47), 19(9)
B2	6.02	-3.83	0.652	358	911(53), 131(34), 18(13)
B3	5.61	-1.42	0.492	445	356(82), 97(18)
B4	6.73	-6.84	0.613	108	495(47), 123(37), 30(16)
B5	7.59	-12.7	0.496	324	219(100)
B6	5.69	-9.83	0.828	1041	300(84), 12(16)
Average	6.23 ± 0.74	-7.29 ± 4.16	0.605 ± 0.126	404 ± 338	

2.3 服药前后尿微晶的组分变化

采用 XRD 和 FTIR 同时检测了六例草酸钙结石患者的尿微晶在服药前后的组分变化。

2.3.1 服药前后草酸钙结石患者尿微晶的 FTIR 分析

服药前, 患者尿微晶的代表性 FTIR 谱如图 2a 所示。 $3448\sim 3223 \text{ cm}^{-1}$ 处的宽吸收峰为结晶水的吸收峰; $1622, 884$ 和 782 cm^{-1} 是 COM 的吸收峰^[8]; $1670, 1456, 620$ 和 523 cm^{-1} 为尿酸的吸收峰; $2941, 1161$ 和 1080 cm^{-1} 为

HPO_4^{2-} 的吸收峰^[9, 10]。

服药后, 在 $3448\sim 3223 \text{ cm}^{-1}$ 处仍然存在结晶水的吸收峰; 1622 和 782 cm^{-1} 为 COM 的吸收峰; $1670, 1456$ 和 523 cm^{-1} 为尿酸的吸收峰; 1161 cm^{-1} 是 HPO_4^{2-} 的吸收峰(图 2b)。

与服药前相比较, 服药后尿微晶的吸收峰数目有所减少, 吸收峰的强度也有所减弱。

2.3.2 服药前后草酸钙结石患者的尿微晶的 XRD 分析

在这六位患者尿微晶的 XRD 谱中, 均检测到尿酸、COM 和磷酸氢盐(HPO_4^{2-})。服药前后尿微晶的代表性 XRD 谱如图 3 所示。

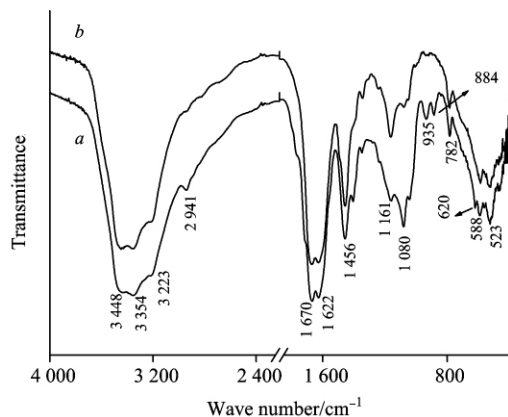


Fig 2 FTIR spectra of urinary nanocrystallites of calcium oxalate stone former

a: Before taking medicine; b: After taking medicine

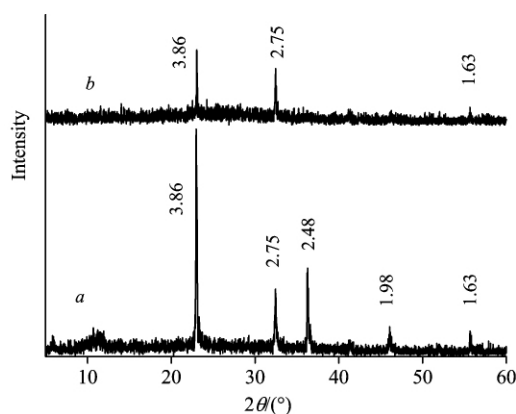


Fig 3 XRD patterns of urinary nanocrystallites of calcium oxalate stone former

a: Before taking medicine; b: After taking medicine

(1) 服药前(见图 3a), 谱峰 $d=3.86$ 和 $2.48 \text{ \AA}$ 分别对应尿酸的($\bar{2}11$)和(130)晶面; 2.75 和 $1.98 \text{ \AA}$ 分别对应 COM 的(420)和($\bar{3}03$)晶面; $1.63 \text{ \AA}$ 属于磷酸钙的(2218)晶面的衍射峰^[9]。

2) 该患者服用 K_3cit 一周后, 其尿微晶的 XRD 结果如图 3b 所示, 谱峰 $d=3.86 \text{ \AA}$ 属于尿酸的($\bar{2}11$)晶面的衍射峰; $2.75 \text{ \AA}$ 对应 COM 的(420)晶面。可以看出, 不但尿晶体的衍射峰数目明显减少, 而且衍射峰强度亦比服药前显著减弱, 约为服药前(图 3a)的 35%, 表明服药后, 尽管患者尿微晶的主要组分变化不大, 但数量显著减少^[11]。

特别是尿酸的 $d=3.86$ 和 $2.48 \text{ \AA}$ 衍射峰, 强度减弱最大, 说明草酸钙结石患者在服用 K_3cit 等药物一周后, 尿液中尿酸的量大幅度减少, 这归因于患者服用枸橼酸后, 尿液 pH 上升, 大部分尿酸转化为溶解度更大的尿酸盐, 从而使尿液中尿酸的溶解度增加, 尿酸含量降低。

COM 的 $d=2.75 \text{ \AA}$ 衍射峰略有减小, 表明服药前后草

酸钙微晶量亦有所减少^[11]。这是由于尿液中尿酸的减少, 引起草酸钙的异质成核结晶也减少; 此外, 枸橼酸盐还是一种络合剂, 可与尿液中的钙离子络合, 形成具有高度可溶性的枸橼酸钙, 从而降低尿液中钙离子的浓度和尿液中草酸钙的饱和度, 抑制草酸钙结晶的形成^[12]。因此, 服用 K_3cit 一周后, 患者尿微晶中的草酸钙微晶数量减少。

2.4 服药前后尿微晶的粒径、多分散性和 Zeta 电位变化

2.4.1 尿微晶的粒径变化

通过比较服药前后草酸钙结石患者尿晶体的粒径大小, 发现服用 K_3cit 一周后尿微晶的粒径明显减小。服药前 6 例患者尿微晶的平均粒径为 $(579 \pm 326) \text{ nm}$, 而服药后减小至 $(404 \pm 338) \text{ nm}$ (表 1)。代表性尿微晶粒径分布如图 4 所示(对应表 1 中第一例尿样)。

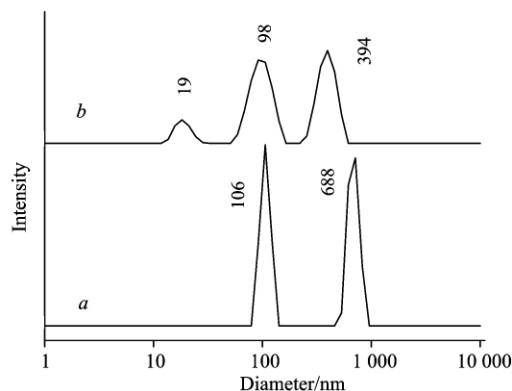


Fig 4 Particle size distribution of urinary nanocrystallites of calcium oxalate stone former

a: Before taking medicine; b: After taking medicine

服药前患者尿微晶的多分散系数(PDI)平均值为 0.740 ± 0.158 (表 1), 而服药后的 PDI 下降至 0.605 ± 0.126 。这是因为枸橼酸盐是结晶抑制因子, 可通过封闭草酸钙晶体生长位点, 改变草酸钙晶体表面电荷或晶体几何形态, 从而抑制草酸钙晶体的成核、生长和聚集过程, 减小尿微晶的粒径。此外, 刘超荣^[13]的研究表明, 长期服用 K_3cit 还可使尿钾量由 $(29.53 \pm 11.55) \text{ mmol} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$ 提高到 $(58.96 \pm 11.25) \text{ mmol} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$, 尿钾的升高可以降低尿液的过饱和度, 从而进一步抑制草酸钙晶体的成核、生长和聚集。

2.4.2 尿微晶的光强自相关曲线和多分散系数(PDI)变化

服药前结石患者尿微晶的光强自相关曲线基线比较粗糙(图 5a), 相关曲线衰减得比较慢, 说明尿液中纳米微晶的颗粒比较大, 结合其相对较大的 PDI(表 1), 说明体系中微晶颗粒较大或有聚合体存在, 这与粒径的检测结果相符。

服药后尿微晶的光强自相关曲线的基线比较平滑(图 5b), 相关曲线衰减比较快, 说明尿液中纳米微晶的颗粒比较小, 结合其中等程度的 PDI, 说明体系中大颗粒微晶和微晶聚集体有所减少。

尿液中的纳米微晶不停地进行无规则的布朗运动。布朗运动是一种随机涨落运动, 光强涨落的变化速率与颗粒的大小有关。粒子的粒径愈大, 其布朗运动愈慢, 散射光的强度变化愈慢, 信号的相关性愈好, 相关曲线衰减愈慢; 相反,

粒子的粒径较小时,其布朗运动较激烈,光强变化快、相关性差,相关曲线衰减就较快。

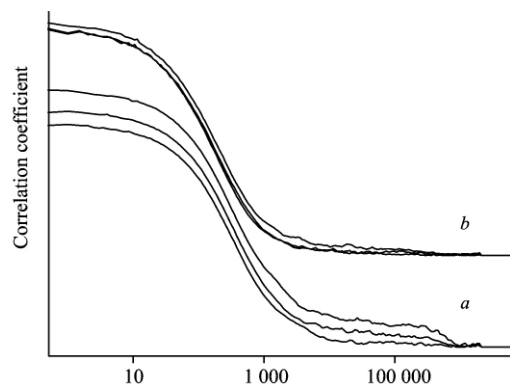


Fig 5 Intensity-autocorrelation curves of nanocrystallites of calcium oxalate stone formers

a: Before taking medicine; b: After taking medicine

2.4.3 尿微晶的 Zeta 电位变化

服药前上述六例结石患者尿微晶的 Zeta 电位平均值为 (-4.28 ± 2.55) mV(表 1),而服用 K_3cit 一周后为 (-7.29 ± 4.16) mV。

Zeta 电位又叫电动电位(ζ -电位),是指胶粒剪切面的电位,是表征胶体分散体系稳定性的重要指标。由于固体表面带有电荷而吸引周围的反号离子,这些反号离子在固-液界面呈扩散状态分布而形成扩散双电层。

Zeta 电位受分散体系中以下因素的影响: pH 值、溶液电导率、某些添加剂及其浓度(如表面活性剂、高分子等),其中, pH 是影响 Zeta 电位的最重要因素。结石患者服用 K_3cit 后,不但可以封闭晶体表面的生长位点,使尿液中微晶表面的 Zeta 电位变负,而且 K_3cit 可以增加尿液中 TH 蛋白的排泄量和活性^[14],而 TH 蛋白是阴离子蛋白,可以使草酸钙晶体的 Zeta 电位向负值移动。尿微晶的 Zeta 电位绝对值越高,它们之间的排斥力就越大,微粒就越不容易聚集,从而增加整个体系的稳定性;反之,则整个体系不稳定。从服药后,尿微晶的 Zeta 电位绝对值增大,说明尿液变得稳定,晶体聚集程度降低,晶体容易排出,形成结石的隐患减小。

2.5 服药前后尿微晶的形貌

采用 SEM 和 TEM 分别对服药前和服 K_3cit 一周后的草

酸钙结石患者尿液中的纳米级微晶进行了观察,如图 6 所示。可以看到:服药前结石患者尿液中的微晶棱角尖锐,尺寸差异较大,并且有明显的团聚现象;服药后的尿微晶的形状是圆钝的,尺寸不一,从几十纳米到几百纳米不等,没有团聚现象。

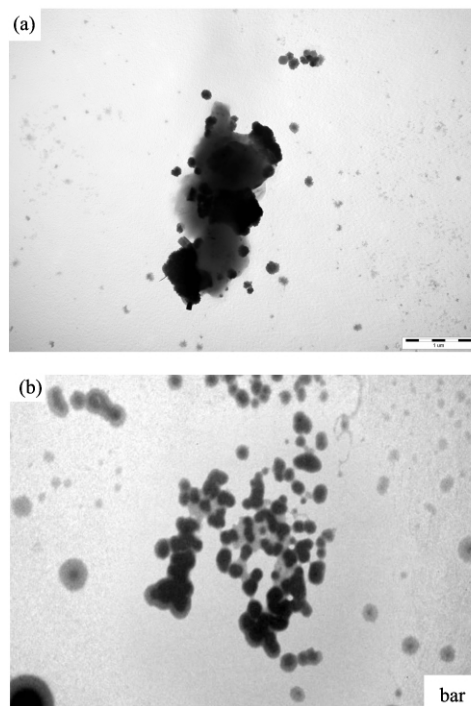


Fig 6 SEM images of urine crystallites in stone formers

a: Before taking medicine; b: After taking medicine

The bar: 2 μm

3 结 论

通过 XRD、FTIR、纳米粒度仪和 TEM 等方法研究表明,服用 K_3cit 一周后的草酸钙结石患者尿液 pH 升高,尿微晶粒径减小, Zeta 电位升高,尿微晶聚集程度明显降低,这有利于防止草酸钙微晶的增加和最终结石的形成,理论上解释了草酸钙结石病人口服 K_3cit 的有效性。

References

- [1] Fazil M Y M, Salim A. Urol. Res., 2009, 37(5): 283.
- [2] Fuselier H A, Moore K, Lindberg J. Urology, 1998, 52(6): 988.
- [3] YANG Jin, HUANG Zhi-jie, HOU Shan-hua, et al(杨 锦, 黄志杰, 侯善华). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2011, 31(1): 169.
- [4] King M, McClure W F, Andrews L C. Powder Diffraction File Alphabetic Index, Inorganic Phases/Organic Phases, International Center for Diffraction Data, Newtown Square, PA, 1992.
- [5] Ali A M, Raj N A N, Kalainathan S. Mater. Lett., 2008, 62(15): 2351.
- [6] HE Hui-chan, ZHONG Wei-de, XIE Ke-ji, et al(何慧婵, 钟惟德, 谢克基, 等). Nat. Med. J. China(中华医学杂志), 2004, 84(21): 1825.
- [7] Allie S, Rodgers A. Clin. Chem. Lab. Med., 2003, 41(1): 39.

- [8] Benramdane L, Bouatia M, Idrissi M O B, et al. Spectros. Lett. , 2008, 41(2): 72.
- [9] Moawad M M. J. Coord. Chem. , 2002, 50(1): 61.
- [10] CHEN Yun-kui(陈允魁). Infrared Absorption Spectrometry and the Application(红外吸收光谱法及其应用). Shanghai: Shanghai Jiao-tong University Press(上海: 上海交通大学出版社), 1993. 122.
- [11] JIN Yong, SUN Xiao-song, XUE Qi(晋 勇, 孙小松, 薛 屹). X-Ray Diffraction Analysis Technique(X 射线衍射分析技术). Beijing: National Defence Industrial Press(北京: 国防工业出版社), 2008. 192.
- [12] Chow K, Dixon J, Gilpin S, et al. Kidney Int. , 2004, 65(5): 1724.
- [13] YI Yan-hua, BAI Xian-zhong, MO Zeng-nan, et al(易延华, 白先忠, 莫曾南, 等). Journal of Clinical Urology(临床泌尿外科杂志), 2008, 23(2): 100.
- [14] Hess B, Zipperle L, Jaeger P. Am. J. Physiol. , 1993, 265(6): 784.

The Property Changes of Urine Crystallites of Calcium Oxalate Stone Formers before and after Taking Medicine

LI Jun-jun, HOU Shan-hua, XIA Zhi-yue, OUYANG Jian-ming*

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

Abstract The property changes of urine crystallites of six cases of calcium oxalate stone formers before and after taking medicine were comparatively studied using X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, nanoparticle size analyzer, and transmission electron microscopy (TEM). The results showed that the urinary pH increases after taking medicine (before taking 5.87 ± 0.51 , after taking 6.23 ± 0.74 .) Before taking medicine the main components of urine crystallites were uric acid, calcium oxalate monohydrate (COM) and biphosphate. The types and quantities of urine crystallites after taking medicine were less than that of before. The average size of urine crystallite before taking medicine was (579 ± 326) nm, and it reduced to (404 ± 338) nm after taking medicine. After taking medicine the zeta potential was also decreased to (-7.29 ± 4.16) mV from (-4.28 ± 2.55) mV. The decrease in zeta potential is beneficial to preventing urinary crystallites deposition. The edges and corners of urine crystallite were sharp with significant aggregation before taking medicine, while they became blunt and less aggregation after taking medicine. The analysis of the property changes of urine crystallites of calcium oxalate stone patients before and after taking medicine by using modern equipments has important clinical significance to the clinical prevention and treatment of urinary stones.

Keywords Urine crystallites; Calcium oxalate; Zeta potential; Particle size distribution; XRD; FTIR

(Received Oct. 15, 2010; accepted Mar. 2, 2011)

* Corresponding author