

磷酸铵镁结石患者尿微晶组分分析及其与结石形成的关系

杨 锦, 黄志杰, 侯善华, 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、扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)研究了磷酸铵镁结石患者尿液中微晶的组分、形貌、粒径和Zeta电位,并对其进行结石进行了组分分析。结果表明,结石类型、尿微晶组分和尿液pH三者之间存在密切的联系:磷酸铵镁结石病人的尿液pH值较高,通常在6.5以上;尿微晶的主要组分是含不同结晶水(如一水和六水)的磷酸铵镁晶体;磷酸铵镁晶体主要为花瓣形、十字花形,微晶的粒度分布不均匀,分布范围宽,并且发生明显聚集。磷酸铵镁结石患者的Zeta电位负值[平均值 (-9.83 ± 0.66) mV]与健康对照者的[平均值 (-10.74 ± 0.25) mV]没有明显差异。此研究有助于预测尿石症的发生,并为预测尿石的类型提供启示。

关键词 磷酸铵镁; 结石; 尿微晶; Zeta电位

中图分类号: O434; O611.6 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)01-0168-05

引 言

泌尿系结石可以分为感染性结石和非感染性结石^[1]。一般非感染性结石以草酸钙、尿酸、尿酸盐为主;感染性结石则以磷酸铵镁、磷酸钙、碳酸磷灰石为主^[2];其中,感染性结石的发病率大约占泌尿系结石的15%^[3]。

近年来,由于体外震波碎石(ESWL)和皮肾镜取石技术的广泛应用,使感染性结石的治疗取得了较满意的效果。但由于手术时结石碎屑难以彻底清除,这些残留结石的存在,使得感染不能根除,术后结石常迅速生长并导致肾功能的进一步损害。因此,对感染性结石病人必须紧密随访,继续治疗感染并预防其复发^[3]。

磷酸铵镁也叫鸟粪石(struvite),是泌尿系结石一种常见的组分,约占10%^[4]。由于这种结石是尿路感染所致,故亦称为感染石或感染性结石。磷酸铵镁结石的形成与尿路中能产生脲酶的细菌密切相关,这些细菌主要包括变形杆菌、绿脓杆菌、克雷伯氏菌属、普罗威登斯菌属、沙雷氏菌属和葡萄球菌属等^[5],它们所产生的脲酶可催化尿素分解为氨和二氧化碳,氨再与水结合形成氢氧化铵;氢氧化铵是一种碱性物质,可使尿中的pH值显著升高;当尿pH值达到7.2时,铵离子可与尿中的镁离子和磷酸根结合,形成磷酸铵镁。当尿中的磷酸铵镁达到过饱和水平时,便会析出晶体,从而形

成磷酸铵镁结石^[3,6]。

尿晶体从尿液中析出是尿结石形成的第一步^[7],因此,尿液中的晶体状况与尿石症形成密切相关。本文对磷酸铵镁结石患者尿液的pH值、尿微晶组分进行了分析,并与结石组分进行了比较,讨论了尿液pH值、尿微晶和结石组分之间的联系,期望为临床医学上预防和治疗磷酸铵镁结石提供依据和启示。

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,荷兰飞利浦公司XL-30环境扫描电子显微镜(ESEM),荷兰飞利浦公司PHILIPS TECNAI型透射电子显微镜(TEM)。

1.2 尿液的收集、处理和检测

磷酸铵镁结石患者的尿液均来自刚入院病人的新鲜晨尿。无结石病史的健康对照者的空腹晨尿来自暨南大学师生。

1.3 尿石的收集和处理

收稿日期: 2010-02-26, 修订日期: 2010-05-28

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

作者简介: 杨 锦,女,1984年生,暨南大学生物矿化与结石病防治研究所硕士研究生

*通讯联系人 e-mail: toyjm@jnu.edu.cn

磷酸铵镁结石均为暨南大学第一附属医院泌尿外科手术取石所得。结石标本经 75%酒精消毒后,分别采用一次水和二次水清洗,低温(40℃)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。

2 结果与讨论

2.1 磷酸铵镁结石的组分分析

手术取出的磷酸铵镁结石,形状不规则,成片块状或岩层状镶嵌排列。结石表面不光滑,无光泽、质软易碎。对上述磷酸铵镁结石进行 XRD 和 FTIR 分析,代表性 XRD 谱和 FTIR 谱如图 1 所示。

在 XRD 谱中,检测到晶面间距 $d=5.91, 5.60, 5.38, 4.26, 4.14, 3.47, 3.29, 2.96, 2.92, 2.80, 2.69, 2.66, 2.35$ 和 $1.96 \text{ \AA}$ 处的衍射峰[图 1(a)],分别归属于六水磷酸铵镁的(110), (020), (011), (111), (021), (200), (130), (012), (211), (040), (022), (221), (231)和(103)晶面^[8]。

在 FTIR 谱中,分别检测到 $1\,650, 1\,434, 1\,007, 769$ 和 571 cm^{-1} 等处六水磷酸铵镁的吸收峰^[9-11][图 1(b)]。

2.2 磷酸铵镁结石患者的尿液微晶分析

根据尿石的化学性质,尿路结石可分为酸性结石(如尿酸、胱氨酸)、碱性结石(如磷酸铵镁等)和中性结石(如草酸钙等)。碱性结石主要有羟磷灰石、磷酸铵镁结石和镁磷石等,其中最常见的是磷酸铵镁结石。研究表明,大多数磷酸铵镁结石患者的尿液 pH 值在 6.5 以上,高的达到 7.45

(表 1),平均 pH 值为 6.98 ± 0.37 。

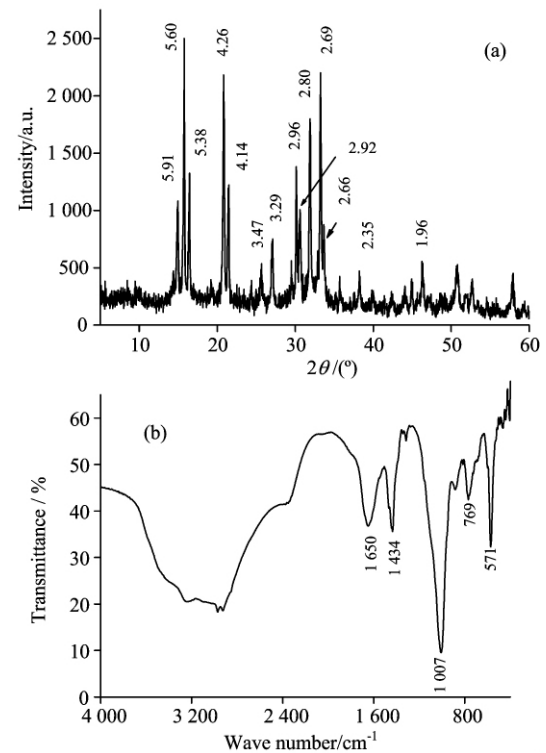


Fig 1 Representative spectra of magnesium ammonium phosphate calculi

(a): XRD pattern; (b): FTIR spectrum

Table 1 Decay time of intensity-autocorrelation curve, mean size, PDI, Zeta potential and urine pH value of nanocrystallites in lithogenic (L) and healthy (H) urines

No.	尿 pH	衰减时间/ms	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
健康对照者					
H1	5.61	164	206	0.441	-10.70
H2	5.89	131	149	0.368	-9.32
H3	6.29	147	154	0.307	-11.90
H4	5.53	131	187	0.431	-10.40
H5	5.73	123	153	0.363	-12.50
H6	6.10	147	235	0.394	-9.64
平均值	5.86 ± 0.29	141 ± 15	181 ± 35	0.384 ± 0.049	-10.74 ± 0.25
磷酸铵镁结石患者					
L1	7.45	295	352	0.561	-10.07
L2	7.05	721	1\,056	0.865	-9.53
L3	6.56	590	849	0.958	-9.09
L4	6.86	524	919	0.826	-10.60
平均值	6.98 ± 0.37	533 ± 178	794 ± 307	0.803 ± 0.170	-9.83 ± 0.66

采用 XRD 对磷酸铵镁结石患者尿微晶成分进行检测,结果如图 2(a)所示。在这些尿样中均检测到磷酸铵镁晶体的存在,主要有归属于六水磷酸铵镁(021), (211)晶面的 d 值为 $4.13, 2.92 \text{ \AA}$ 处的衍射峰^[8], 归属于一水磷酸铵镁(010)晶面的 d 值为 $8.77 \text{ \AA}$ 处的衍射峰^[8]。此外,还检测到存在少量的其他晶体,如 d 值为 2.84 和 $1.98 \text{ \AA}$ 归属于 COM 晶体(121)和(303)晶面的衍射峰^[8],但这些衍射峰的强度均比

磷酸铵镁的弱得多,说明尿微晶主要为磷酸铵镁晶体。

对患者尿液微晶进行 FTIR 检测[图 2(b)],检测到波数为 $1\,114 \text{ cm}^{-1}$ 归属于 PO_4^{3-} 的特征吸收峰, $1\,448 \text{ cm}^{-1}$ 处归属于 NH_4^+ 的特征吸收峰^[9-11],及归属于草酸钙的波数为 $1\,382$ 和 780 cm^{-1} 的特征吸收峰^[9-11]。 $3\,000 \text{ cm}^{-1}$ 以上的宽峰是配位水的对称和非对称伸缩振动峰。

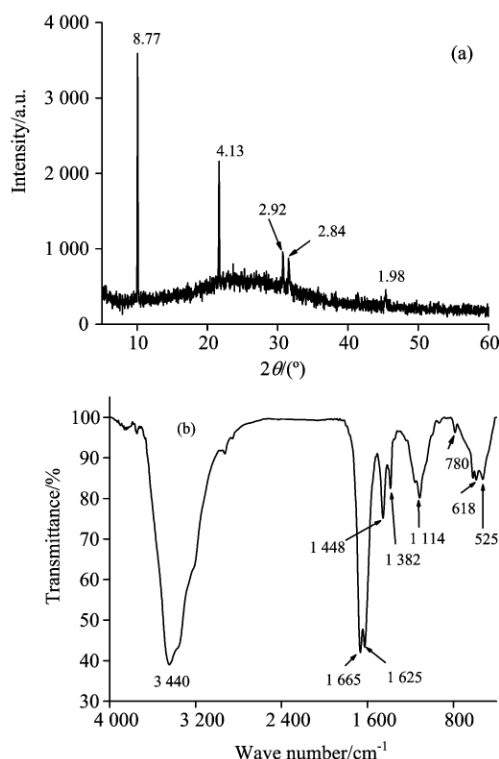


Fig 2 XRD patterns (a) and FTIR spectrum (b) of urinary crystallites of magnesium ammonium phosphate stone formers

2.3 磷酸铵镁结石患者尿微晶的形貌

采用 SEM 和 TEM 分别对磷酸铵镁结石患者尿液中的微米级晶体和纳米级晶体(图 3)进行了观察, 可以看到多种

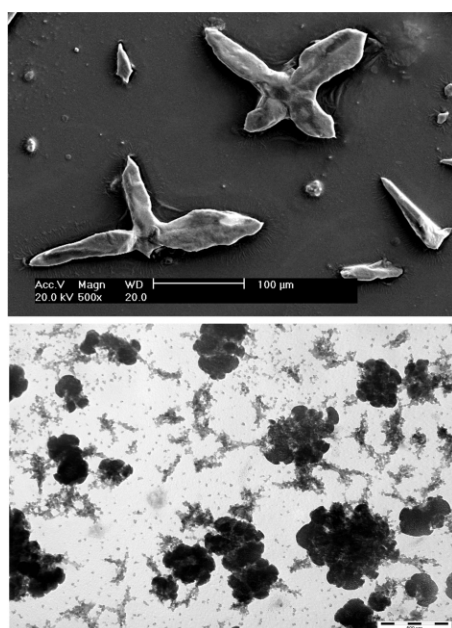


Fig 3 SEM (a) and TEM (b) images of typical urinary crystallites in magnesium ammonium phosphate stone formers

The bar: (a): 100 μm ; (b): 500 nm

不同形状的磷酸铵镁结晶, 主要有花瓣形、变形十字花形等, 晶体棱角尖锐, 粒度分布很不均匀, 部分尿微晶还存在聚集现象。

2.4 磷酸铵镁结石患者尿液中纳米微晶的粒径分布、Zeta 电位及其与健康对照者的差异

采用纳米粒度仪研究了 6 位对照者和 4 位磷酸铵镁结石患者尿液中纳米微晶的光强自相关曲线、平均粒径、粒度分布、多分散系数(PDI)、Zeta 电位和尿液 pH 值, 其结果如表 1 所示。

光强自相关曲线是关于相关时间 T 的平滑的指数衰减曲线^[12]。光强自相关曲线的衰减时间是指曲线衰减到最低点时的时间。图 4 是代表性的 4 位健康对照者和 4 位磷酸铵镁结石患者尿微晶的光强自相关函数曲线。患者尿微晶的自相关曲线都是不平滑的衰减曲线, 表明体系中纳米粒子的粒径在发生变化, 尿液体系不稳定。而对照者尿样的自相关曲线均比患者的平滑得多, 表明体系粒子粒径变化小, 尿液体系比较稳定。

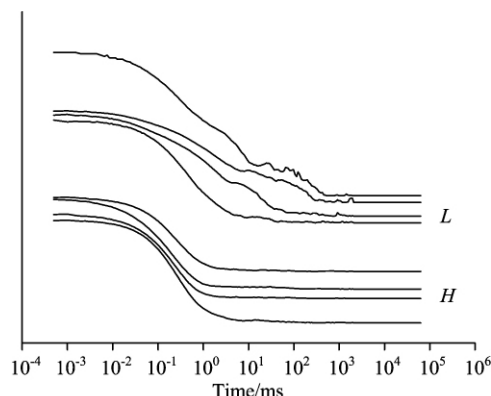


Fig 4 Intensity-autocorrelation curves of urinary crystallites

H: Healthy urines; L: Lithogenic urines

对尿液中的纳米微晶进行检测, 表明磷酸铵镁结石患者尿微晶的平均粒径为 (794 ± 307) nm, 明显大于健康对照者的 (181 ± 35) nm。这是因为尿液中微晶的粒径(D)越小时, 其自相关曲线衰减时间(T)就越短; 反之, 微晶粒径越大, 衰减时间越长^[13,14]。由表 1 可知, 磷酸铵镁患者尿微晶的衰减时间 $T = (533 \pm 178)$ ms, 明显大于健康对照者的 (141 ± 15) ms。这也表明, 磷酸铵镁结石患者尿微晶的平均粒径比对照者的要大。

粒径分布结果显示, 磷酸铵镁结石患者尿液中纳米微粒的粒径分布显示两个或者三个的分布峰[图 5c,d], 多分散系数(PDI)平均值为 0.803 ± 0.170 (表 1), 即: 结石患者尿纳米微粒的分布范围宽, 粒径分布很不均匀。相比之下, 健康对照者尿液中的纳米微粒分布在 1~2 个区域[图 5a,b], PDI 均小于 0.5, 平均值 0.384 ± 0.049 (表 1), 这表明健康对照者尿液中纳米微粒分布范围较窄, 粒径分布比较均匀。

Zeta 电位是对颗粒之间相互排斥或吸引力的强度的度量, 是表征胶体分散系稳定性的重要指标。如果颗粒带有负电荷, 也就是说 Zeta 电位的绝对值很高, 它们

会相互排斥,从而增加整个体系的稳定性;反之,则整个体系不稳定。Zeta 电位受分散体系中以下因素的影响: pH 值,溶液电导率,某些特殊添加剂及其浓度(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。

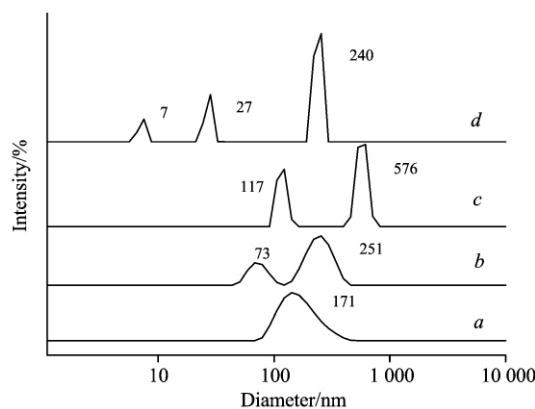


Fig 5 Size distribution by intensity of urinary nanocrystallites

a, b: Healthy urines; c, d: Lithogenic urines

文献[8]报道了有关尿液中纳米微晶的初步研究结果,发现健康对照者尿纳米微晶的 Zeta 电位明显比尿石症患者的更负。而有趣的是,磷酸铵镁结石患者尿纳米晶体的 Zeta 电位平均值为 (-9.83 ± 0.661) mV,与健康对照者的 (-10.74 ± 0.25) mV 相接近, Zeta 电位绝对值略小,差异不明显(表 1)。其原因有待进一步研究。

3 结 论

本文采用 XRD、FTIR、纳米粒度仪、SEM 和 TEM 等现代仪器分析研究了磷酸铵镁结石患者的尿液微晶组分及其与尿石类型的关系。磷酸铵镁结石患者尿 pH 值、尿液微晶的组分和结石组分三者具有密切联系。磷酸铵镁结石患者的尿液 pH 比较高,通常在 6.5 以上;尿液微晶的组分中含有不同结晶水(常见的为 1 个和 6 个)的磷酸铵镁晶体,还含有少量草酸钙等物质;尿液中微晶的主要组分与结石组分较为接近。本研究表明,通过对尿液的分析,有可能预测尿石发生的倾向,甚至有可能在排石治疗之前预测尿石的类型,进而为临床上对症下药、进行个性化治疗提供依据和启示。

References

- [1] Prywer J, Torzewska A. Cryst. Growth Des., 2009, 9(8): 3538.
- [2] Pak C Y. Lancet, 1998, 51: 1797.
- [3] Bichler K H, Eipper E, Naber K, et al. Int. J. Antimicrob. Ag., 2002, 19: 488.
- [4] Coe F L, Evan A, Worcester E. J. Clin. Invest., 2005, 115(10): 2598.
- [5] Griffith D P. Urol. Res., 1979, 7: 215.
- [6] Jacobs D, Heimbach D, Hesse A. Scand. J. Urol. Nephrol., 2001, 35: 345.
- [7] Daudon M, Jungers P. Nephron Physiol., 2004, 98(2): 31.
- [8] King M, McClure W F, Andrews L C, et al. Powder Diffraction File Alphabetical Index, Inorganic Phases/Organic Phases. International Center for Diffraction Data; 1601 Park Lane, Pennsylvania, USA, 1992, 19081.
- [9] Bhatt P T, Paul P. J. Chem. Sci., 2008, 120(2): 267.
- [10] Benramdane L, Bouatia M, Idrissi M O B, et al. Spectros. Lett., 2008, 41(2): 72.
- [11] CHEN Yun-kui(陈允魁). Infrared Spectra and Its Application(红外吸收光谱法及其应用). Shanghai: Shanghai Jiaotong University Press(上海: 上海交通大学出版社), 1993. 122.
- [12] Schnablegger H, Glatter O. Appl. Opt., 1991, 30(33): 4889.
- [13] ZHU Yong-fa(朱永法). Characterization and Testing Technology of Nanomaterials(纳米材料的表征与测试技术). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2006. 11.
- [14] YUE Cheng-feng, YANG Guan-ling, HE Zhen-jiang(岳成凤, 杨冠玲, 何振江). Optoelectronic Technology & Information(光电子技术与信息), 2004, 17(1): 10.
- [15] Deng F, Ouyang J M. Mater. Sci. Eng. C, 2006, 26: 688.

Composition Analyses of Urinary Microcrystalline in Urine of Magnesium Ammonium Phosphate Stones Formers and Its Relationship with the Stones Formation

YANG Jin, HUANG Zhi-jie, HOU Shan-hua, OUYANG Jian-ming*

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

Abstract By means of X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), nano-particle size analyzer, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), the composition, morphology, particle size and zeta potential of urinary microcrystalline in urine of magnesium ammonium phosphate stone formers were investigated. The components of stones were also analyzed. The results showed that there was a close relationship among stone components, urinary microcrystalline composition and urine pH. A high pH value of 6.5 or more usually appeared in the urine of magnesium ammonium phosphate stone formers. The main component of urine microcrystalline was magnesium ammonium phosphate crystals with different crystal water such as monohydrate or hexahydrate. Magnesium ammonium phosphate crystals are mainly petal-shaped, crosswise shape. These microcrystalline have an uneven particle size distribution, a wider distribution range, and apparent aggregation. There is no significant difference in the zeta potential between the magnesium ammonium phosphate stone formers (mean (-9.83 ± 0.66) mV) and healthy control subjects (mean (-10.74 ± 0.25) mV). This study can help predict the occurrence of urolithiasis, and provide inspiration to the prediction of the type of urinary stones.

Keywords Magnesium ammonium phosphate; Stone; Urine microcrystalline; Zeta potential

(Received Feb. 26, 2010; accepted May 28, 2010)

* Corresponding author