

多指标正交试验优选体外模拟草酸钙 结石模型最佳条件^{*}

曾春晖, 杨柯^{**}, 李先梅, 谭娥玉, 蔡妮娜, 徐明光

(广西中医药大学药学院 南宁 530001)

摘要:目的:选取晶体生长速率和(COM和聚集体量)/总晶体量比例为评价指标,优化体外模拟草酸钙结石模型条件。方法:采用琼脂凝胶双向扩散法,选取琼脂凝胶浓度、培养温度、培养时间、氯化钙和草酸钠配比4个因素进行正交试验,通过光学显微镜定时观察对草酸钙晶体晶型的生成,优选出最佳体外草酸钙结晶形成的条件。结果:随着培养时间的延长,不同浓度琼脂凝胶均呈现一定比例的一水草酸钙(COM)、二水草酸钙(COD)、三水草酸钙(COT)及聚集体,其中以1%琼脂浓度下的聚集速率最快且易形成COM;培养温度在37℃时最利于COM的成核、生长以及聚集;0.1/0.2 mol·L⁻¹氯化钙/草酸钠,在37℃下培养3天,生成的COM及聚集体比例最大,达总晶体量90%以上。结论:pH7.4、1%琼脂及0.1/0.2 mol·L⁻¹氯化钙/草酸钠的琼脂凝胶研究系统在37℃下培养3天,为复制以COM为主的体外草酸钙结石模型最佳条件。

关键词:草酸钙结石 体外模型 影响因素 最佳条件

doi: 10.11842/wst.2013.09.014 中图分类号:R691.4 文献标识码:A

尿石症是指在泌尿系统中形成足够大的固体结晶,以至造成阻塞、感染等症状的病理矿化过程,是泌尿外科最常见的一种疾病^[1]。近年来,随着生活方式及饮食习惯的改变,其发病率有增高趋势。在亚洲,其患病率在1%~5%,欧洲为5%~10%,北美为13%。其中以草酸钙型结石为主的上尿路结石(即肾和输尿管结石)约占95%,已取代膀胱结石成为了尿石症的主要类型^[2,3]。尿结石的形成是一个缓慢的生物体内的生长过程,由于人体内环境非常复杂,对其形成这一动态过程的影响因素很多,所以很难在原位进行观测。因此,体外模拟则成为研究其形成机理的重要手段,可为筛选中草药活性组分

或有效成分提供有效工具。本文在一维琼脂凝胶体系中,选取晶体生长速率和(COM和聚集体量)/总晶体量比例为评价指标,采用L₉(3⁴)正交试验,探讨琼脂浓度、钙离子与草酸根离子配比、培养温度和培养时间等4个因素对草酸钙(CaOxa)晶体形成的影响,可为中草药体外抗草酸钙结石研究提供可靠的实验平台。

1 材料与仪器

琼脂粉(批号:001213,北京路桥商检新技术公司);无水氯化钙(CaCl₂,批号:20100712,广州化学试剂厂);草酸钠(Na₂C₂O₄,批号:20040101,广州化工试剂厂);三羟甲基氨基甲烷(Tris,批号:991009,北京化学试剂公司)。EL204型电子天平(梅特勒-

收稿日期:2012-10-24

修回日期:2013-04-07

^{*} 广西科学技术厅自然科学基金面上项目(2011GXNSFA018204):五眼果抗上尿路结石的活性部位及其作用机制研究,负责人:杨柯;广西科学技术厅创新研究团队项目(2011GXNSFF018006):中药新药基础研究,负责人:朱华;广西卫生厅中医药科技专项课题(GZKZ10-050):五眼果对草酸钙尿石症作用的活性部位及其作用机制研究,负责人:杨柯。

^{**} 通讯作者:杨柯,副教授,硕士生导师,主要研究方向:中草药药理学研究。

托利多仪器有限公司);BX60 型显微镜(OLYMPUS, 日本)。

2 方法与结果

2.1 一维琼脂凝胶体系

不同浓度 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 琼脂溶液趁热注入玻璃试管 (10 cm×2 cm)中,10 mL/管,作为体系 1 区;待其冷却凝固后再注入琼脂溶液,10 mL/管,形成空白凝胶 2 区;冷却凝固后加入含不同浓度 CaCl_2 的琼脂溶液,10 mL/管,作为体系 3 区。上述 1、2、3 区的琼脂溶液均用 $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 溶液调节 pH 至 7.4。试管垂直放置于不同温度培养箱中培养。

2.2 正交试验

2.2.1 试验设计

选取对体外构建草酸钙结石模型的主要因素琼脂浓度(A)、培养温度(B)、培养时间(C)和 $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 比例(D)进行正交试验,以晶体生长速率和形成晶体晶型比例为评价指标,因素与水平安排见表 1。

2.2.2 结果评价

用游标卡尺测量,并在光学显微镜下观察 2 区

形成晶体的变化,以晶体生长速率(晶体层厚度/mm)和(COM 和聚集体量)/总晶体量比例为评价指标,每个实验条件重复 3 管,取平均值,优选出最佳条件。

2.2.3 正交试验结果与分析

用 $\text{L}_9(3^4)$ 正交表进行试验设计优选,结果见表 2、表 3。通过表 3 可知,以晶体生长速率(晶体层厚度/mm)COM 和聚集体生成量为指标,影响顺序依次是培养温度>培养时间> $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 比例>琼脂浓度,由于琼脂浓度过稀或过稠都不利于晶体观察和检测,另外,培养 3 天和培养 7 天差异不大,最终确定最佳造模条件为 $\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_2\text{D}_1$,即构建体系中琼脂浓度为 1%, $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 比例为 $0.1/0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,在 37°C 培养 3 天。

2.3 验证试验

为进一步考察最佳条件的可靠性和稳定性,按上述试验得到的最佳条件进行独立的 3 次重复实验,结果见表 4,表明该模型复制条件可靠且稳定。

3 讨论

尿结石通常是在糖蛋白组成尿道黏膜层的凝

表 1 因素水平

水平	A	B	C	D
1	0.5	4	1	0.1/0.2
2	1.0	25	3	0.05/0.1
3	1.5	37	7	0.2/0.1

表 2 正交试验结果

序号	晶体层厚度/mm				(COM 和聚集体量)/总晶体量比例/%			
	X1	X2	X3	X	Y1	Y2	Y3	Y
1	0.51	0.46	0.37	0.45	9.78	11.31	10.02	10.37
2	3.52	3.01	2.88	3.14	55.62	53.48	50.06	53.05
3	6.41	5.89	6.13	6.14	74.16	70.93	71.85	72.31
4	1.05	0.93	1.11	1.03	28.46	24.13	28.52	27.04
5	6.52	6.37	6.19	6.36	80.16	81.55	78.61	80.11
6	3.66	4.08	3.53	3.76	51.96	54.28	59.42	55.22
7	1.34	1.08	1.14	1.19	30.03	27.19	28.82	28.68
8	2.69	2.47	2.63	2.60	46.29	44.16	44.65	45.03
9	7.01	6.38	6.53	6.64	85.21	80.46	82.19	82.62

表 3 结果分析

晶体层厚度/mm					(COM 和聚集体量)/总晶体量比例(%)				
影响因素	A	B	C	D	影响因素	A	B	C	D
Σ I	9.73	2.66	6.80	13.45	Σ I	135.74	66.09	110.62	173.10
Σ II	11.15	12.09	10.81	8.08	Σ II	162.36	178.19	162.71	136.95
Σ III	10.42	16.54	13.69	9.77	Σ III	156.33	210.15	181.10	144.38
R=M-L	1.42	13.88	6.89	5.37	R=M-L	26.63	144.07	70.48	36.14

表 4 验证试验结果

序号	晶体层厚度/mm	(COM 和聚集体量)/ 总晶体量/%
1	7.31	96.81
2	7.68	96.33
3	7.74	95.65

胶体中形成的,糖本身是基质的组成部分,钙-糖相互作用对钙的运送和矿化起着重要作用。因此琼脂凝胶是体外研究生物分子结晶和生物矿化的理想中性介质,在此介质中模拟 CaOxa 晶体的形成更接近人体尿结石产生的环境。琼脂为 CaOxa 晶体的生长提供了确定的成核位点,由于其中存在的羟基氧、醚氧和醛氧^[4],对 Ca^{2+} 产生静电吸引和较强的配位作用,使得界面处的 Ca^{2+} 离子浓度较高,诱导局部的晶体 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 浓度增大,为了满足电荷要求,从而又进一步吸引更多的 Ca^{2+} 离子,导致局部的过饱和度增加,降低成核的能垒,有利于 CaOxa 晶体成核。琼脂中的羟基与 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 离子形成氢键,从而使晶体既容易沿着富集 Ca^{2+} 的面生长,也可能会沿着富集 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 的面生长。本实验中,3 个浓度下的琼脂凝胶中均得到一水草酸钙(COM, Calcium Oxalate Monohydrate)、二水草酸钙(COD, Calcium Oxalate Dihydrate)、三水草酸钙(COT, Calcium Oxalate Trihydrate)三种晶型的 CaOxa 晶体,且随着琼脂浓度的增大,生成的高能晶体 COT 增多,这与溶质分子结晶过程时生成晶体的吉布斯自由能变化公式相符合^[5,6]。但考虑到 0.5% 的琼脂是半固体,不方便提取晶体,因此选择 1.0% 琼脂作为后续试验的基质。

根据经典晶体成核理论,随着温度的升高,形

成晶核的所需要的自由能变小,有利于能量较低的 COM 生成;相反,如果温度降低,则有利于热力学不稳定的高能态 COD 和 COT 生成^[7,8]。本实验中,在相同培养时间下,37℃ 下培养主要生成 COM,而在 25℃ 下主要生成 COT、COD。37℃ 培养生成的聚集体比 25℃ 培养的大。由于 CaOxa 晶体的生长是一个扩散控制过程^[9],生长速率方程 $dr/dt = DV_m(C-S)/r$ (D 是扩散系数, V_m 是 CaOxa 晶体的摩尔体积, C 与 S 分别为其晶体的浓度和溶解度, r 是微粒半径), D 是一个与温度有关的量,其它条件不变时, D 值随着温度增加而变大,即 Ca^{2+} 离子和 Oxa^{2-} 离子扩散到晶体生长位点的速率加快,使晶体生长速率变大。由于非均匀分散沉淀体系在热力学上不稳定,小颗粒有较大的溶解度,而大颗粒进一步生长,导致高温时得到的 CaOxa 晶体较低温的大。由此可见,在 37℃ 培养较 25℃ 更利于系统生成 COM,且符合人体内环境温度。

在以 1% 琼脂为介质,不同比例 $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}]$, 37℃ 培养生成的 CaOxa 晶体随着培养时间的延长,都呈现一定比例的 COM、COD、COT 及聚集体。以 $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}]$ 为 0.1/0.2 mol·L⁻¹ 时呈现较好的 COM 成核、生长速率以及聚集速率,能更好地促进 COM 的成核、生长及聚集,且生成的 COM 及聚集体合并占 90% 以上。前期研究表明,五眼果水提取物对小鼠泌尿系统结石有良好作用^[10],但需要进一步明确其有效组分,本实验成功构建的体外模型,将为后续药物组分的抗草酸钙尿结石活性筛选提供良好的体外研究体系。

参考文献

- 1 吴阶平,顾方六,孙昌惕.中国的尿石症.中华泌尿外科杂志,1980(1):1~3.

- 2 Breslau N A, Brinkley L, Hill K D, *et al.* Relationship of animal protein-rich diet to kidney stone formation and calcium metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988, 66(1):140~146.
- 3 苏泽轩.21 世纪尿石症的流行病学特点及其治疗展望.广东医学, 2007,28(9):1379~1380.
- 4 Falshaw R, Furneaux R H, Stevenson D E. Agars from nine species of red seaweed in the genus *Curdia* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Carbohydr Res*, 1998, 308(2):107~115.
- 5 姚连增.晶体生长基础.合肥:中国科技大学出版社,1994.
- 6 Chen Y K, Lin H C, Chen C S, *et al.* Seasonal variations in urinary calculi attacks and their association with climate: a population based study. *J Urol*, 2008, 179(2):564~569.
- 7 Campbell A A. Interfacial regulation of crystallization in aqueous environments. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 1999, 4(1):40~45.
- 8 Atan L, Andreoni C, Ortiz V, *et al.* High kidney stone risk in men working in steel industry at hot temperatures. *Urology*, 2005, 65 (5): 858~861.
- 9 欧阳健明,姚秀琼,苏泽轩,等.草酸钙结石的体外模拟.中国科学(B 辑),2003,33(1):14~20.
- 10 杨柯,曾春晖,黎文智,等.五眼果对小鼠泌尿系统结石的作用研究.中成药,2010,32(5):719~722.

Optimization Study on Influential Factors for Simulation Calcium Oxalate Calculus Models *in Vitro* by Orthogonal Design with Multi-Targets

Zeng Chunhui, Yang Ke, Li Xianmei, Tan Eyu, Cai Nina, Xu Mingguang

(College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract: This study was aimed to optimize the influential factors on simulation calcium oxalate calculus model *in vitro* with the targets of the CaOxa crystal growth rate and the ratio of CaOxa crystals. The model of calcium oxalate stone agar gel system was established in order to evaluate four influential factors which include the concentration of agar gel, incubation temperature, incubation time, calcium chloride / sodium oxalate for the orthogonal test. The formation of calcium oxalate stone was observed under the microscope. Then, the formation conditions of calcium oxalate stone *in vitro* were optimized. The results showed that as the extension of incubation time, different concentrations of agar gel were rendered in a certain percentage of COM, COD, COT as well as aggregates. Among them, the gathered rate was the quickest and easy to form COM under 1% agar concentration. When the cultivation condition was 37℃, it was the most suitable condition for COM nucleation, growth, and gather. With concentration of calcium chloride / sodium oxalate as 0.1/0.2 mol/L, incubating in 37℃ for 3 days, COM and aggregate accounted for more 90% of all crystals. It was concluded that the optimal conditions for the model of calcium oxalate stone formation *in vitro* were incubated in 37℃ for 3 days with 1% agar gel, calcium chloride / sodium oxalate as 0.1/0.2 mol/L at pH 7.4.

Keywords: Calcium oxalate stone, simulation model *in vitro*, influential factor, optimal condition

(责任编辑 叶丽萍 张志华,责任译审 王 晶)