DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.016
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
782 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)09-0782-04

大鼠肾结石钠/二羧基转运蛋白-1的表达变化及碳酸氢钾的干预作用

何娅妮[1],陈香美[2],于志恒[2],吕 杨[2],师锁栋[2] ([1]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所肾科,重庆 400042;[2]解放军总医院全军肾脏中心暨重点实验室,北京 100853)

提 要:目的 研究肾组织钠/二羧基转运蛋白(SDCT1)与尿枸橼酸变化的关系及其在肾结石形成中的作用,并观察碳酸氢钾对SDCT1表达的影响,为制定肾结石防治措施提供新的思路。方法 雄性Wistar大鼠分为对照组、致石剂组及碳酸氢钾干预组。采用Northern blot检测大鼠肾组织SDCT1 mRNA水平的改变,免疫组化方法观察SDCT1在肾组织的分布及表达变化。常规病理观察肾结石形成情况。常规生化方法测定血、尿枸橼酸等生化指标。结果 致石剂组大鼠肾组织SDCT1 mRNA水平显著高于对照组;SDCT1分布于近端肾小管刷状缘,其表达量显著高于对照组,尤以扩张的近端肾小管为甚;尿枸橼酸水平及尿pH值显著低于对照组;肾结石形成率为100%。碳酸氢钾SDCT1 mRNA水平显著高于致石组;SDCT1表达也显著上调;尿枸橼酸水平及尿pH值显著高于致石剂组;肾小管间质等病变明显减轻;肾结石形成率为30%,显著低于致石剂组。结论 肾组织SDCT1表达上调可能是低枸橼酸尿的重要原因,与肾结石的形成有密切关系。碳酸氢钾可下调肾结石大鼠肾组织SDCT1的表达,对肾结石的形成具有明显的抑制作用。

关键词:钠/二羧基转运蛋白-1;低枸橼酸尿;肾结石;碳酸氢钾;大鼠
中图法分类号:R341;R692.402;R977.7 文献标识码:A

Change of Na^+/dicarboxylate co-transporter expression in rat nephrolithiasis induced by lithogenic agent and the preventive effect of potassium bicarbonate

HE Ya-ni, CHEN Xiang-mei, YU Zhi-heng, LU Yang, SHI Suo-zhu (Department of Nephrology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the change of Na^+/dicarboxylate co-transporter expression in rat nephrolithiasis induced by lithogenic agent and the preventive effect of potassium bicarbonate. **Methods** Twenty-eight male Wistar rats were divided into 3 groups: control, lithogenic agent group and potassium bicarbonate group. The expression of SDCT1 mRNA in the kidney was determined by Northern blot analysis. The change of SDCT1 protein abundance was measured by immunohistochemical staining with anti-hNaDC-1 antibody. The plasma and urinary biochemical parameters, such as citrate, oxalate, uric acid and calcium were analyzed by routine biochemical method. The stone formation in renal tissue was examined and the pathological change of kidney was observed using routine pathological technique. **Results** SDCT1 mRNA was expressed in the normal renal tissue and SDCT1 was found in apical membrane of renal proximal tubule. Compared with control group, lithogenic agent group had a higher expression of SDCT1 mRNA and protein abundance in the kidney, but a lower level of citrate in the urine. However, the citrate administration group showed a higher level of SDCT1 mRNA and protein abundance. The urinary citrate levels increased and the pathologic changes such as tubular dilation and inflammatory cells infiltration were alleviated. **Conclusion** The upregulation of hNaDC-1 mRNA and protein abundance in the kidney has a close relationship with hypocitraturia, which may play an important role in pathogenesis of nephroliathisis. Potassium bicarbonate treatment has a beneficial effect on rat with nephrolithiasis induced by lithogenic agent.

Key words: Na^+/dicarboxylate co-transporter; hypocitraturia; potassium bicarbonate; nephrolithiasis; rat

肾结石是中青年人群常见疾病之一,而且治疗后如果没有预防,7年内有60%的复发率[1,2]。因此肾结石发生机制及其防治的研究,一直是泌尿内外科医师共同关注的课题。在70年代初期,国外流行病学研究就已证实大约50%的结石患者尿枸橼酸排泄减少,并且低枸橼酸尿是肾结石发病和复发的独立危险因素[2,3]。研究表明,枸橼酸在肾小球自由滤过后,约

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870323)
作者简介:何娅妮(1966-),女,重庆市人,博士,副主任医师,副教授 主要从事肾小管转运蛋白方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68757446
收稿日期:2002-04-03;修回日期:2002-09-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

90%被近端肾小管上皮细胞主动重吸收。在近端小管上皮细胞的刷状缘和基底侧分别有两种枸橼酸转运蛋白(SDCT1、SDCT2)负责枸橼酸的转运[4,5],其中位于刷状缘侧的 SDCT1 是决定尿液枸橼酸水平的首要环节。因此肾结石形成过程中 SDCT1 的变化及其调控机制,引起肾脏病领域的极大兴趣。本研究首次报道了肾结石大鼠模型钠/二羧基转运蛋白 mRNA 表达及蛋白质水平的变化以及碳酸氢钾的干预作用,旨在进一步解析肾结石发生机制,为临床防治肾结石提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　动物模型

雄性 Wistar 大鼠 28 只,体质量 260～320 g(解放军总医院实验动物所)。实验动物按完全随机化方法分为对照组(n=8)、致石剂组(n=10)及碳酸氢钾组(n=10)。对照组:常规饮用水;致石剂组:饮用 1%乙二醇;碳酸氢钾组:饮用致石剂,同时予以 25%碳酸氢钾 2 ml/kg 灌胃 1 次/d。14 d 后收集 24 h 尿,次日以 10%水合氯醛 0.4 ml/100 g 麻醉动物,心脏采血,切取右肾组织,分为 2 份,分别置入液氮或 4%甲醛固定;左肾按冠状位纵行剖开,与解剖镜下观察成石情况。

1.2　实验方法

1.2.1　肾组织 RNA 提取及 SDCT1 Northern 杂交　按 RNAzolB^{TM}(美国 Tel Test Inc 产品)试剂盒说明书提取肾组织总 RNA。1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,每泳道上样 30 mg,24 h 虹吸转膜(尼龙膜),紫外交联 6 min。42 ℃预杂交 3 h,SDCT1 为该基因 cDNA 全长序列(由本实验室构建),以^{32}P-dCTP 随机引物法进行标记(随机引物标记试剂盒为宝灵曼产品);60 ℃杂交 12 h,洗膜,－70 ℃放射自显影 72 h;采用 GDS8000 凝胶图像分析系统进行灰度扫描分析,以 18srRNA 为参照校正取样量。

1.2.2　SDCT1 在肾组织的分布及表达　采用常规 ABC 方法。石蜡切片脱蜡至水,0.75%胰酶,37 ℃,15 min 抗原修复。一抗为抗人钠/二羧基转运蛋白 1(由本室制备),37 ℃孵育 1 min。设立不加一抗和不加二抗的切片作为阴性对照。根据近端肾小管上皮细胞刷状缘阳性着色程度将 hNaDC-1 表达分为 1＋、2＋、3＋ 3 个等级。

1.2.3　生化指标测定　血、尿钾、尿酸和血 CO_2CP 采用 Beckmen-7X 自动生化分析仪(美国)及其生化试剂盒检测。血、尿枸橼酸和草酸采用酶法测定。尿 pH 值以 pH 计测定。

1.2.4　大鼠肾成石情况及病理变化　根据解剖镜下所见肾脏剖面钙化颗粒或微小结石形成及并发症的情况进行评分[5]:0 分:无结石,解剖镜下未见到钙化颗粒;1 分:少量结石,肾脏髓质部可见散在钙化颗粒;2 分:中等量结石,肾脏髓质部和乳头部钙化颗粒较多;3 分:大量结石,肾皮质、髓质、乳头部和肾盂内钙化颗粒密集,呈斑块状;4 分:大量结石并发肾积水/囊腔或肾脓肿形成。PBS 染色观察肾间质小管及炎细胞浸润的病理改变。按病变程度分为－、1＋、2＋、3＋ 4 个等级。

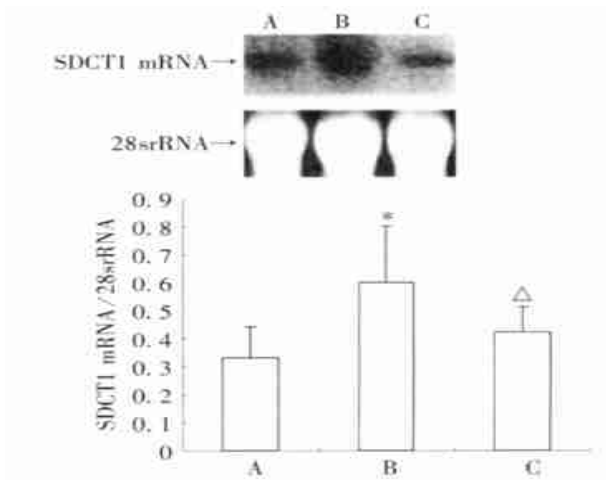
1.3　统计学处理

连续变量采用单因素方差分析。等级资料采用 χ^2 检验和 Ridit 分析。

2　结果

2.1　肾组织 SDCT1 mRNA 表达的变化

SDCT1 mRNA 在正常肾组织中即有表达,致石剂组 SDCT1 mRNA 表达显著高于对照组,碳酸氢钾组 SDCT1 mRNA 显著低于肾结石组,而与正常对照组无显著差异,见图 1。



A: Control; B: Lithogenic agent group; C: Potassium bicarbonate treated group; *: $P<0.05$ *vs* control group; △: $P<0.05$ *vs* lithogenic agent group

图 1　大鼠肾 **SDCT1 mRNA** 的表达

Fig 1 The changes of SDCT1 mRNA expression in renal tissue

2.2　肾组织 SDCT1 表达的变化

在正常肾组织中,SDCT1 分布于近端肾小管刷状缘侧。致石剂组,SDCT1 表达显著上调,以扩张的肾小管为甚。碳酸氢钾组,SDCT1 表达较致石剂组明显下调,与对照组无显著差异,见表 1,图 2。

表 1　肾组织 **SDCT1** 表达的变化

Tab 1　The changes of SDCT1 expression in renal tissue

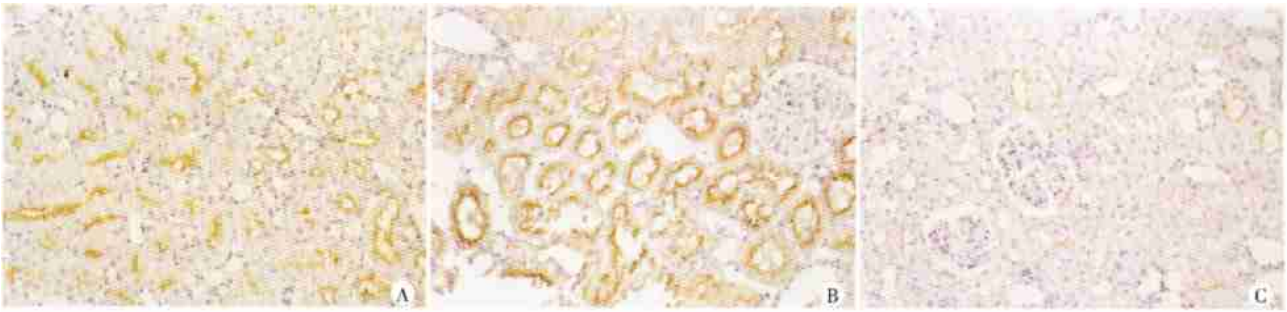
Group	n	SDCT1 expression		
		1＋	2＋	3＋
Control	8	8	0	0
Lithogenic agent group	10	0	3	7*
Potassium bicarbonate treated group	10	7	2	1#

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* lithogenic agent group

2.3　生化指标的改变

致石剂组血枸橼酸、磷、尿酸及钙与对照组比较无显著性差异,血草酸、肌酐及钾显著高于对照组,CO_2CP 显著低于对照组。碳酸氢钾组血草酸水平显著高于对照组,而与致石剂组无显著性差异,CO_2CP 显著高于对照组及致石剂组,血肌酐及枸橼酸等指标与对照组无显著性差异。致石剂组尿枸橼酸、pH 值及 24 h 尿量显著低于对照组,尿钙、草酸显著高于对照组,其它指标与对照组无显著性差异。碳酸氢钾组尿枸橼酸及 pH 值分别显著高于致石剂组及对照组;尿草酸、钙显著高于对照组,与致石剂组无显著差异;24 h 尿量与对照组无显著性差异,见表 2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: Control; B: Lithogenic agent group; C: Potassium bicarbonate treated group

图2 **SDCT1** 在肾组织表达的变化 (ABC×400)

Fig 2 The changes of SDCT1 expression in renal tissue (ABC×400)

表2 大鼠血、尿生化指标变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The changes of plasma and urinary biochemical parameters ($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	Plasma parameters					Urinary parameters			
		Oxalate(μmol/L)	Citrate(mmol/L)	Scr(μmol/L)	K^+(mmol/L)	CO_2CP	Oxalate(μmol/L)	Citrate(mmol/L)	K^+(mmol/24 h)	pH value
Control	8	20.30±6.60	0.38±0.09	38.30±11.60	5.63±1.15	22.60±2.71	196.00±36.00	7.36±1.42	61.50±19.30	6.91±0.09
Lithogenic agent	8	63.40±21.70**	0.40±0.12	50.60±17.20*	6.18±2.11	2.80±2.80**	337.00±101.00*	3.64±0.84**	52.30±18.40	5.65±0.14**
Potassium bicarbonate treated	8	54.80±17.70**	0.53±0.14	40.50±12.60	5.85±2.14	26.40±3.10**##	311.00±97.00*	10.20±3.53*##	81.70±26.30*#	7.73±0.29*##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* lithogenic agent group

2.4 大鼠肾组织结石形成情况及病理改变

解剖镜下观察,对照组未见明显异常;致石剂组肾髓质有中等量-大量结石形成,成石率为100%(10/10);2/10大鼠并发肾积水;1/10大鼠并发肾脓肿。碳酸氢钾干预组仅少数动物有少量-中等量结石形成,成石率降低至30%(3/10)。χ^2检验显示,致石剂组结石形成率显著高于碳酸氢钾组。Ridit分析进一步表明,致石剂组肾结石(结石评分)明显重于碳酸氢钾干预组,见表3。

表3 大鼠肾结石形成情况

Tab 3 Evaluation of crystal deposition in kidney

Group	*n*	Rate of nephrolithiasis(%)	Score				
			0	1	2	3	4
Control	8	0	8	0	0	0	0
Lithogenic agent group	10	100**	0	0	1	6	3**
Potassium bicarbonate treated group	10	30*##	7	2	1	0	0*#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control;
#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* lithogenic agent group

PAS染色显示,对照组未见异常;致石剂组可见有透明状晶体物质在肾小管腔中沉积;肾小管明显扩张,小管上皮细胞坏死、脱落;间质可见炎细胞浸润,甚至有脓肿形成。碳酸氢钾干预组肾小管间质病变较致石剂组明显减轻。

3 讨论

枸橼酸是三羧酸循环重要中间产物,与机体能量代谢和酸碱平衡有密切关系,尿液中的枸橼酸是重要的肾结石内源性抑制物,与肾结石形成与复发有密切关系。尽管人们很早就注意到,机体在代谢性酸中毒、低钾、远端肾小管酸中毒以及肾结石等疾病状态下,尿枸橼酸排泄减少,但肾脏对枸橼酸转运异常的分子机制并不十分清楚。1998年以来大鼠近端肾小管上皮细胞刷状缘和基底侧的SDCT1基因克隆成功,使肾脏对枸橼酸的转运机制的研究深入到基因水平[7]。现已知SDCT1编码基因是由600个氨基酸组成的跨膜有机阴离子转运蛋白,主要分布于小肠、肾脏及肝脏等组织,负责转运枸橼酸、琥珀酸及a-酮酸等有机阴离子。将SDCT1基因注射至非洲蟾卵细胞,观察到SDCT1转运活性对pH值的变化非常敏感[4,5]。Aruga等[8]研究表明,代谢性酸中毒可使大鼠肾组织SDCT1 mRNA水平显著上调,进一步分离刷状缘膜进行Western杂交,发现SDCT1蛋白表达显著增加,尿枸橼酸排泄减少。吴镝等[9]也发现,代谢性酸中毒时大鼠肾组织SDCT2 mRNA表达也明显增加,其表达量与酸中毒程度成正比关系。但钠/二羧基转运蛋白的异常变化是否与肾结石患者低枸橼酸尿有关,目前尚未见文献报道。由于尿枸橼酸可络合钙离子形成可溶性钙复合物,并可协同Tamm-Horsful螯合钙离子,使草酸钙晶体形成受到抑制;枸橼酸还可直接抑制尿液中晶体的成核和聚集;此外,还可通过纠正尿液过度酸化,降低离子饱和度,从而抑制肾结石形成。因此探明低枸橼酸尿发生的分子机制,对阐明肾结石发病机制及寻找防治措施具有重要意义。本研究采用1%的乙二醇作为致石剂复制大鼠肾结石模型,结果表明,致石剂组在饮用乙二醇14 d后出现尿枸橼酸水平及尿pH值显著降低,尿

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

钙、草酸水平增加(乙二醇是草酸的前体物质,可在肝脏代谢形成草酸后从肾脏排除体外)等一系列尿生化指标的异常,并且所有大鼠均有不同程度的肾结石形成,与文献[6]报道一致。这些变化与人类肾结石患者的临床表现也极为相似,所以是研究肾结石发生机制的理想模型。进一步研究发现,致石剂组尿枸橼酸水平显著降低的同时,肾组织 SDCT1 mRNA 水平非常显著地高于对照组,近端肾小管上皮细胞 SDCT1 蛋白表达也显著增加,提示 SDCT1 表达上调可能与肾结石大鼠低枸橼酸尿的发生有密切关系。

本实验进一步发现,碳酸氢钾干预组肾组织 SDCT1 mRNA 表达显著低于致石剂组,SDCT1 蛋白表达也显著减少;尽管碳酸氢钾干预组尿草酸、尿钙水平也显著升高,但尿枸橼酸水平及尿 pH 值显著高于致石剂组,肾结石形成率较致石剂组显著降低、成石量明显减少。提示 SDCT1 的表达下调可能与尿枸橼酸排泄增加有关,并在一定程度上减少了肾结石的形成,这从另一个侧面说明 SDCT1 可能与肾结石形成有密切关系。我们还发现,碳酸氢钾干预组血二氧化碳结合力、尿 pH 值显著高于致石剂组,这是否与肾组织 SDCT1 表达下调有某种内在关系,尚有待进一步证实。此外,碳酸氢钾干预组大鼠肾组织的病理改变较致石剂组明显减轻,表明碳酸氢钾可能对肾结石导致的肾损伤具有一定的保护作用,这对临床制定肾结石的防治措施具有一定的参考价值。

参考文献:

[1] Pak C Y. Kidney stones[J]. Lancet, 1998, 351(9118): 1797—801.
[2] Serio A, Fraioli A. Epidemiology of nephrolithiasis[J]. Nephron, 1999, 81(S1): 26—30.
[3] Takashi Y, Paramjit S C. Metabolic risk factors in patients with first-time and recurrent stone formations as determined by comprehensive metabolic evaluation[J]. Urology, 1998, 52(5): 750—755.
[4] Chen X Z, Shayakul C. Characterization of a rat Na^+/dicarboxylate transporter[J]. J Biol Chem, 1998, 273(33): 20972—20981.
[5] Chen X M, Tsukaguchi H. Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel sodium-dependent dicarboxylate transporter[J]. J Clin Invest, 1999, 103(8): 1159—1168.
[6] Khan S R. Animal models of kidney stone formation: an analysis[J]. World J Urol, 1997, 15(4): 236—243.
[7] Pajor M A. Citrate transport by the kidney and intestine[J]. Semin nephrol, 1999, 19(2): 195—200.
[8] Argua S, Preisig P A. Chronic metabolic acidosis increase renal cortical NaDC-1 mRNA and protein abundance in rats[J]. J Am Soc Nephrol, 1997, 8: 2A.
[9] 吴 镝, 陈香美. 钠/二羧基转运蛋白 mRNA 在代谢性酸中毒大鼠肾组织的表达[J]. 生理学报, 2000, 52(1): 55—57.

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2003)09-0785-01

个案与短篇

胸壁巨大隆突性皮肤纤维肉瘤 1 例

A case report of tremendous dermatofibrosarcoma protuberans in thoracic wall

余祖滨, 闵家新, 向明章, 张国强, 姚 珂, 周人杰 (第三军医大学附属新桥医院胸外科, 重庆 400037)

患者, 男, 35 岁。因前胸腹壁包块切除后, 反复复发 15 年入院。患者于 1985 年发现上腹部剑突下出现一小包块, 并逐渐长大, 至 1986 年包块长至直径约 3 cm, 突起于皮肤表面, 质硬、不活动, 随包块长大, 压痛逐渐明显。于 1986 年 5 月到当地医院就诊, 行包块局部切除, 术后病理示"恶性纤维组织细胞瘤"。术后未作放、化疗。因包块在同一部位反复复发, 渐向胸部生长。分别于 1986、1988、1992 年三次在当地医院行包块切除。术后病理结果与第一次相同。1996 年, 前胸壁包块再次复发, 逐渐长大, 近一年来包块增长迅速, 呈两个直径约 5 cm 大小球形包块。入院查体见: 前下胸壁可见两个直径约 5 cm 大小球形包块, 紧密相连, 表面皮肤变薄呈紫红色, 质韧, 触痛明显。左侧包块活动度好, 右侧包块不易推动。行 CT 检查, 测得包块 CT 值约 20 Hu, 前后径约 6.0 cm, 部分向腹腔生长, 压迫左肝。腹腔脏器及心肺无异常。术中发现包块位于腹膜外, 从肋弓下向胸骨后生长。距肿瘤 5 cm 处彻底切除包块及周围软组织及部分胸骨、肋骨, 胸腹壁组织缺损予植皮。术后病理报告为: 隆突性皮肤纤维肉瘤(Dermatofibrosarcoma protuberans, DFSP), 普通型。免疫组化检测: S-100(—), MBP(—), Actin(—), CD34(+), CD68(—), EMA(—)。经 2 年随访, 包块未再复发。

讨论

隆突性皮肤纤维肉瘤(DFSP)是一种生长缓慢、很少转移, 但易复发的低度恶性肿瘤。可发生于任何年龄, 但发病高峰为青壮年(20~40 岁)。主要发生在躯干, 尤以胸腹部居多。肿瘤浸润真皮及皮下脂肪组织, 与周围组织界限不清, 于正常皮肤移行处可形成毛细血管网, 很少向深筋膜浸润。起病的早期, 通常表现为皮肤增厚的结节状硬斑, 无痛, 与皮肤固定, 底部可移动, 表面皮肤变薄, 肿瘤生长缓慢, 经数年或数十年后可突然

(下转 788 页)

作者简介: 余祖滨(1974—), 男, 重庆市人, 硕士研究生, 医师, 主要从事胸外科临床诊断及治疗方面的研究。电话: (023)68755000-74616

收稿日期: 2003-01-27; 修回日期: 2003-04-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net