

二水草酸钙的热力学转化及海藻多糖的稳定作用

许小晶 柳一鸣 于海燕 欧阳健明*

(暨南大学生物矿化与结石病防治研究所, 广州 510632)

摘要: 草酸钙结石的形成与尿液中草酸钙的存在形式密切相关, 一水草酸钙(COM)促进尿石症形成, 而二水草酸钙(COD)易随尿液排出体外。本文采用体外模拟方法, 比较研究了 COD 晶体在水溶液、正常人尿液和结石患者尿液 3 个不同体系中的稳定性及海藻龙须菜多糖(SPS)对 COD 的稳定作用。在水溶液和患者尿液中, 不但 COD 转化率高, 而且得到的转化产物 COM 晶体聚集程度大; 而在正常人尿液中, COD 转化率低, 转化产物聚集程度较小。COD 在不同体系中转化的速度依次为: 水溶液 > 患者尿液 > 正常人尿液。从海藻龙须菜中提取的硫酸多糖可以稳定 COD 的存在并减小 COM 的聚集, 这有利于阻止草酸钙结石的形成, 因此, 海藻龙须菜多糖有可能用于防止草酸钙结石形成。

关键词: 一水草酸钙; 二水草酸钙; 硫酸多糖; 晶种; 结晶

中图分类号: O614.23*1; O623.621 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2007)04-0640-05

Thermodynamical Transformation of Calcium Oxalate Dihydrate and Its Stabilization by Algal Sulfated Polysaccharide

XU Xiao-Jing LIU Yi-Ming YU Hai-Yan OUYANG Jian-Ming*

(Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract: The formation of calcium oxalate (CaOxa) stones is closely related to its forms existing in urines. Calcium oxalate monohydrate (COM) can promote the formation of urolithiasis, while calcium oxalate dihydrate (COD) is easily expelled from the body. In this article, the stability of COD crystals was investigated *in vitro* in three different systems: water, urine from healthy people and urine from lithogenic patient. The effect of sulfated polysaccharide extracted from algal *Gracilaria lemaneiformis* on stability of COD crystals was also investigated. In aqueous solution and in lithogenic urine, not only the transformation rate of COD into COM was higher, but also was higher the aggregation degree of the transformed product COM crystals. The transformation rate of COD in different systems followed the order: aqueous solution > lithogenic urine > healthy urine. The sulfated polysaccharide extracted from algal *Gracilaria lemaneiformis* can stabilize COD and reduce the aggregation of COM, thus beneficial to preventing from the occurrence of CaOxa stone. Hence, *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide is probably used in the prevention of CaOxa stone formation.

Key words: calcium oxalate monohydrate; calcium oxalate dihydrate; algal sulfated polysaccharide; seed crystals; crystallization

泌尿系结石(简称尿石症)是一种常见疾病,不同地区的结石发病率在 3%~14%之间,尤其在我国南方诸省,如深圳市仅肾结石的患病率就高达 4.87%^[1]。尿石症手术治疗后的复发率高达 80%^[2]。但

至今为止,对其形成机理并不完全清楚^[3]。

研究表明,草酸钙(CaOxa)是泌尿系结石的主要成分^[4],86%的结石中含有 CaOxa。从化学的角度,当尿液中 CaOxa 浓度超过其溶解度时就会产生沉淀,

收稿日期:2006-11-27。收修改稿日期:2007-01-04。

广东省科技攻关项目(No.2006B36501001)和国家自然科学基金(No.20471024,30672103)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: toyjm@jnu.edu.cn; Tel: 020-85223353

第一作者: 许小晶, 女, 23 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

进而形成结石。然而,在绝大多数人的尿液中,即使CaOxa的浓度超过其溶解度的4~8倍仍不发生沉淀现象,只有少数人形成草酸钙结石。这表明,草酸钙结石的形成不但与尿液中CaOxa的过饱和度有关,而且与CaOxa的存在形式、尿液中抑制剂的浓度和活性等有关。草酸钙有3种水合物形式,分别为一水草酸钙(COM)、二水草酸钙(COD)和三水草酸钙(COT)。由于COM是热力学稳定状态,因此,COM是结石中最普遍的晶型^[4],COM结石的发生率比COD结石高出2倍左右^[5]。

COM表面带正电荷,而COD表面呈电中性,因此,COM晶体与细胞膜表面的粘附能力大约比COD大1.5~2倍^[6]。在体外振荡碎石(目前最常用的尿石症治疗手段)中,COD结石比COM结石更容易碎裂^[7],因此,抑制COM形成、诱导或稳定COD在尿液中的存在,有利于防止草酸钙结石的发生。

海藻龙须菜多糖(SPS)是海藻龙须菜中提取的富含硫酸基的多糖,与尿液中存在的大分子物质葡氨聚糖(GAGs)相似^[8],因而具有潜在的防石作用。本文采用体外模拟方法,比较研究了COD晶体在水溶液、正常人尿液和结石患者尿液3个不同体系中的稳定性及其影响因素,研究了SPS在上述3个体系中对COD的稳定作用,从化学的角度讨论了影响草酸钙结石形成的原因。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

草酸钠(Na_2Oxa)、二水氯化钙和氯化钠均为分析纯试剂,购自广州化学试剂厂。实验用水均为从石英亚沸蒸馏器制得的二次蒸馏水。海藻龙须菜产于汕头南澳岛,由暨南大学化学系岑颖洲教授提供,用水提法提取后降解,最终产物为由 β -D-半乳糖和3,6-内醚- α -L-半乳糖交替相连接的琼二糖构成的线性聚合物,多糖的分子量20000。

XL-30型环境扫描电子显微镜(Philips公司);XD2-粉末X射线衍射仪(北京大学);PHS500A生化培养箱(重庆试验设备厂)。

1.2 方法

1.2.1 标准COD和标准COM的制备

按文献^[9]制备标准COD晶体和标准COM晶体,其SEM和XRD图均与文献^[9]一致。COD晶体的粒径较小,约2~3 μm ,四方锥形,其XRD主衍射峰 d 值为0.618、0.442、0.278、0.241和0.224 nm,分别归属于

COD晶体的(200)、(211)、(411)、(103)和(213)晶面。COM晶体为5~10 μm 的拉长六边形或叉生长方形,其主要衍射峰 d 值为0.593、0.365、0.297和0.236 nm,分别归属于COM晶体的($\bar{1}$ 01)、(020)、($\bar{2}$ 02)和(130)晶面。

1.2.2 尿液处理

分别取3位正常人和3位草酸钙尿石患者(男性)的新鲜晨尿,加入2%(质量分数)的叠氮化钠溶液(加入量为每升尿液10 mL)防腐,摇匀后离心15 min,取上层清液稀释4倍(含20%尿液)后备用。

1.2.3 COD转化实验

由于纯COD晶体在水溶液中放置7 d仍不会转化为COM晶体,因此,COD的转化实验是在有10%的COM种晶存在下进行,即将标准COD晶体22.5 mg和标准COM晶体2.5 mg置入100 mL烧杯中,然后加入50.0 mL水或尿液,磁力搅拌1 min后倒入预先放置有玻璃基片的培养皿中,用封口膜覆盖后静置于37℃恒温培养箱中,分别在1 d和2 d后取出晶体,在真空干燥器中干燥1 d,进行晶相和形貌观察。

海藻龙须菜多糖对COD转化的稳定作用:在上述实验的基础上,溶液中加入浓度分别为0.02和0.05 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的海藻龙须菜多糖。

1.2.4 XRD和SEM测定

用SEM进行形貌观察时,测试条件为:样品喷金处理,测量电压15 kV。用XRD进行晶相分析时,测试条件为:Cu靶 $K\alpha$ 射线,石墨单色器,40 kV,30 mA,扫描范围 $5^\circ\sim 55^\circ$,扫描速度 $0.02^\circ\cdot\text{s}^{-1}$ 。定量分析按照文献^[9]方法计算COD的质量百分含量。

2 结果与讨论

2.1 不同体系中COD晶体的转化

图1为在人体生理温度(37℃)下,COD晶体在不同体系中转化1 d和2 d后的SEM图片,其XRD图如图2所示,可以看出:(1)在纯水溶液中(图1a,1b),COD在转化1 d后其含量从90%降低至48%(图2a),2 d后则全部转化为COM晶体(图1b),即:COD的转化率在转化1 d和2 d后分别为47%和100%,且COM的聚集程度高。(2)在稀释的草酸钙结石患者尿液中(图1c,1d),COD转化1 d后的含量为69%(图2b),转化2 d后COD含量下降到61%,即:COD的转化率在转化1 d和2 d后分别为23%和32%。(3)在稀释的正常人尿液中(图1e,1f),COD转化1 d后的含量仅由90%降低到86%(图2c),转化2 d后降低至71%,即:COD的转化率在转化1 d和2 d后分别为4%和21%。

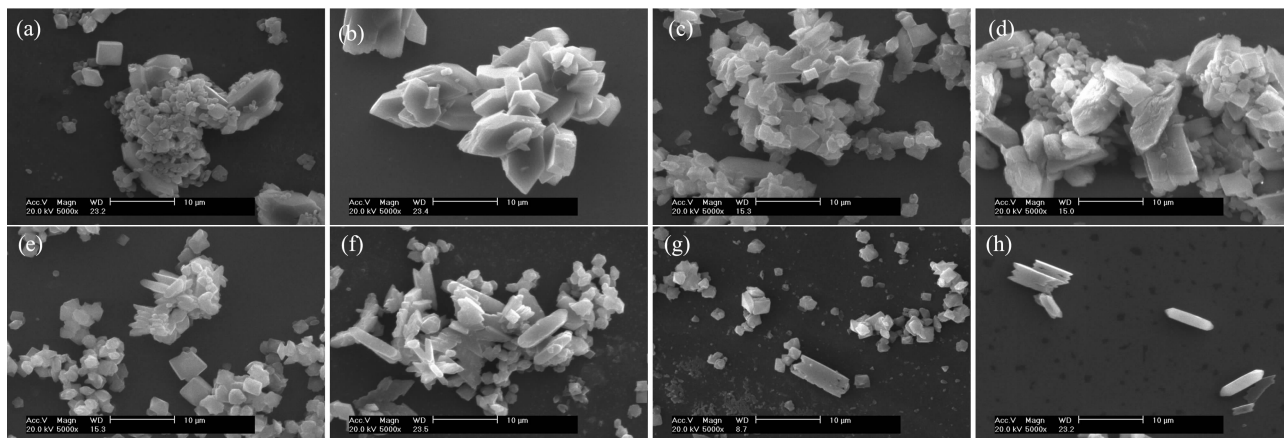
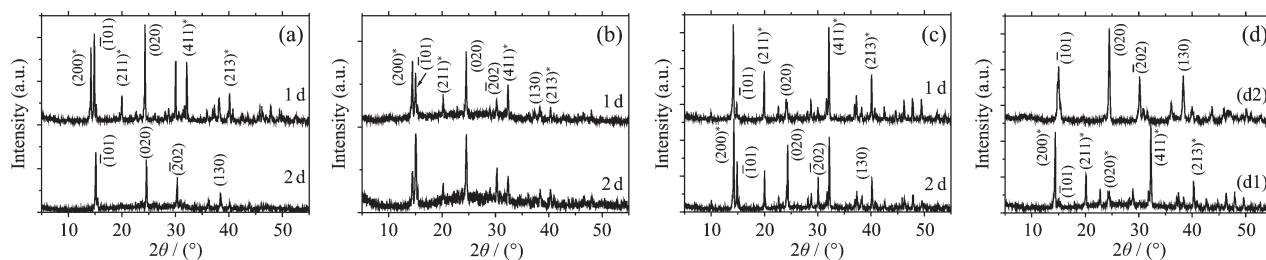


图 1 在不同体系中 COD 晶体转化后的 SEM

Fig.1 SEM images of calcium oxalate dihydrate (COD) crystals after transformation in various systems. Transformation of 1 d (a) and 2 d (b) in water; transformation of 1 d (c) and 2 d (d) in urine from lithogenic patients; transformation of 1 d (e) and 2 d (f) in urine from healthy people; the control test (new-prepared COD/COM suspension solution) (g) and COM crystals (h). Scale bar: 10 μm .



(a) in water; (b) in urine from lithogenic patients; (c) in urine from healthy people; (d) the control test (new-prepared COD/COM suspension solution) (d1) and COM crystals (d2). The crystal faces with asterisk show COD and those without asterisk show COM

图 2 在不同体系中转化 1 d 和 2 d 后 COD 晶体的 XRD 图

Fig.2 XRD patterns of COD crystals after transformation of 1 d and 2 d in various systems

这表明,在固定转化时间后,COD 在水溶液中最容易转化,其次是草酸钙结石患者尿液,在正常人尿液中转化最慢;转化产物 COM 的聚集程度则依次减小,即:不同体系对 COD 的稳定性依次为:正常人尿液>患者尿液>水溶液,转化产物 COM 的聚集程度大小顺序依次为:水溶液>患者尿液>正常人尿液。

2.2 转化时间的影响

从图 1 和图 2 可以看出,随着转化时间从 1 d 延长到 2 d,(1)无论是在水溶液、正常人尿液,还是

尿石症患者尿液中,COD 晶体的转化率均增加(表 1);(2)转化产物 COM 晶体的尺寸增大;(3)COM 的聚集程度显著增加。

上述结果归于如下原因:首先,正常人尿液和患者尿液中存在各种抑制剂,且在正常人尿液中的浓度高于患者尿液。例如,正常人尿液中柠檬酸和葡胺聚糖(GAGs)的浓度分别为 0.53 和 8.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,均明显高于草酸钙尿石患者尿液中(分别为 0.28 和 2.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的浓度^[10,11],而这两类尿液又都高于纯

表 1 COD 晶体在不同体系中的转化率及转化时间对其的影响

Table 1 Transformation rate of COD crystals in various systems and the effect of transformation time on the rate(mass percentage, %)*

Time	water	in diluted urine from lithogenic patients	in diluted urine from healthy people
1 d	58	23	4
2 d	100	32	21
2 d (in presence of SPS)	28	19	7

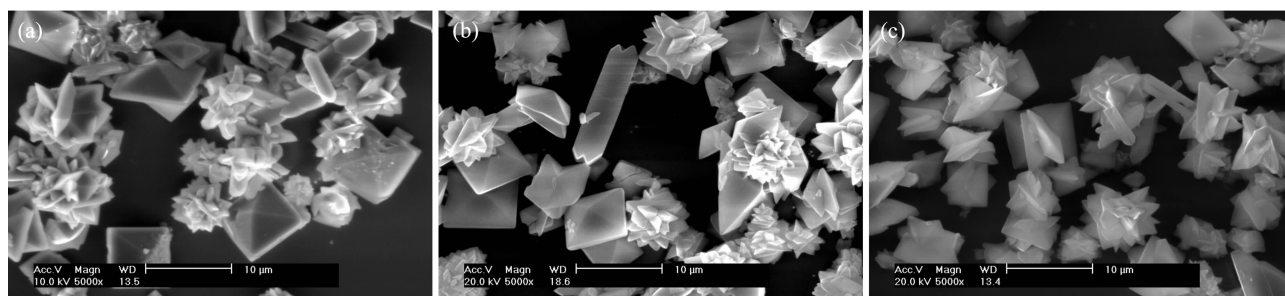
* average value.

水。由于柠檬酸和 GAGs 均可以与 Ca^{2+} 离子配位,减小 CaOxa 的过饱和度^[12],因此,有利于抑制草酸钙沉淀。其次,当尿液中存在的 GAGs 吸附在 COM 晶体表面时,COM 表面的 ζ 电位降低,尿液中晶体颗粒之间的排斥作用增加,从而使得 COM 晶体的聚集得以抑制^[13]。辛殿旗等^[14]用晶体粒度分布实验证实了这一点,通过测定健康人和结石患者尿中 GAGs 对 COM 晶体聚集的影响,发现 COM 晶体的聚集抑制指数(I_a)与 GAGs 的含量成正比,在一定的浓度范围内,GAGs 含量越高,抑制聚集的能力越大。当我们把尿液浓度由稀释 4 倍(含 20% 尿液)增加到稀释 1.5 倍(含 40% 尿液)并转化 2 d 后,在正常人尿液中和患者尿液中的 COD 晶体质量分数分别剩下 78% 和 67%,即:COD 的转化率分别从稀释 4 倍尿液中的 21% 和 32% 减少至稀释 1.5 倍尿液中的 13% 和 26%,减少了约 6~8 个百分点。第三,正常人尿液中的蛋白质总量明显低于尿石患者。如文献^[15]报道正常人尿液中和尿石患者尿液中蛋白质总量分别为 $(28.09 \pm 2.47) \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $(56.89 \pm 14.46) \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$;北京大学泌尿外科研究所的冯陶等测定的正常人和结石病人 24 h 尿 TH 蛋白的分泌量分别为 (36.86 ± 7.08) 和 $(100.45 \pm 7.09) \text{ mg}$,且正常

人尿 TH 蛋白比结石病人的含有较多的糖类(主要是唾液酸),聚合度比尿石患者的低^[16,17]。由于糖基可与 Ca 离子配位,而聚合度高的蛋白质可促进晶体聚集,因此,正常人尿液中的蛋白质有利于抑制 COM 的聚集。第四,正常人尿 TH 蛋白更能使 COM 晶体表面的 ζ 电位向负值移动, ζ 电位变负后,COM 晶体之间的排斥力增加,可抑制 COM 晶体的聚集^[18]。

2.3 海藻龙须菜多糖对 COD 晶体的稳定作用

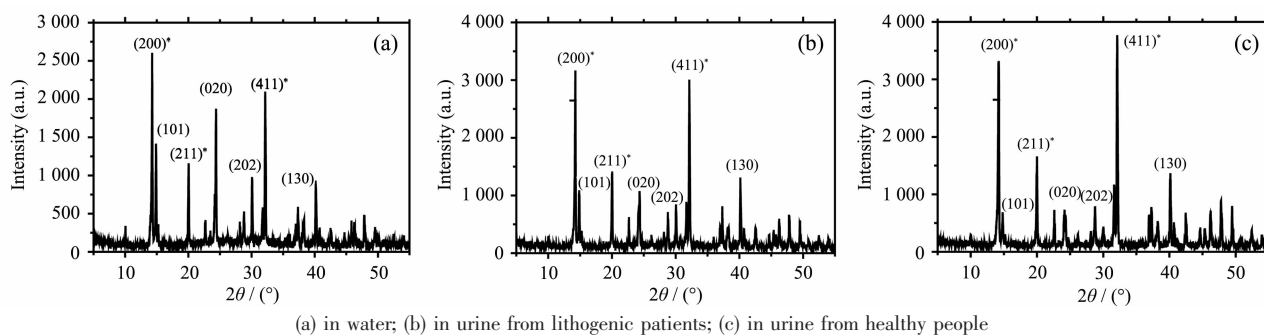
海藻龙须菜多糖可以稳定 COD 在上述 3 种体系中的存在。图 3 为加入浓度为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SPS 后,COD 晶体转化 2 d 后的 SEM 图片。XRD(图 4)表明,在纯水、尿石患者尿液和正常人尿液中,剩余的 COD 晶体的质量百分比分别为 65%、73% 和 84%,即添加 SPS 后,COD 的转化率分别为 28%、19% 和 7%,而相同条件下没有添加 SPS 时,COD 的转化率分别为 100%、32% 和 21%(表 1)。可见,SPS 可以稳定 COD 在上述 3 种体系中的存在。随着 SPS 浓度的增加,其对 COD 的稳定作用增强。当加入浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SPS 并转化 2 d 后,在纯水、尿石患者尿液和正常人尿液中剩余的 COD 晶体的质量百分比分别增加至 78%、82% 和 88%。



(a) in water; (b) in urine from lithogenic patients; (c) in urine from healthy people Scale bar: 10 μm

图 3 在 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 龙须菜存在下不同体系中 COD 晶体转化 2 d 后的 SEM

Fig.3 SEM of COD crystals after transformation of 2 d in presence of $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ of SPS in various systems



(a) in water; (b) in urine from lithogenic patients; (c) in urine from healthy people

图 4 在 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 龙须菜存在下不同体系中 COD 晶体转化 2 d 后的 XRD 图

Fig.4 XRD patterns of COD crystals after transformation of 2 d in presence of $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ of SPS in various systems

分别比较图 3a 与图 1b,图 3b 与图 1d,图 3c 与图 1f,可以看出,加入 SPS 并转化 2 d 后,COM 聚集程度明显减小,表明 SPS 可以抑制 COM 晶体的聚集。

由于草酸钙晶体的存在形式、晶体的尺寸和聚集程度均是影响草酸钙结石形成的重要因素,增加 COD 的质量百分比或稳定 COD 的存在、减小 COM 晶体的尺寸、减小 COM 和 COD 的聚集程度均有利于阻止草酸钙结石的形成,因此,海藻龙须菜多糖有可能用于防止草酸钙结石形成。

参考文献:

- [1] XU Si-Hu(许四虎), CHENG Jin-Qun(程锦泉), ZHOU Hua(周 华), et al. *Zhonghua Miniao Waike Zazhi(Chin. J. Urol. Surg)*, **1999**,**20**(11):655~657
- [2] YE Zhang-Qun(叶章群), DENG Yao-Liang(邓耀良), DONG Cheng(董 诚). *Urolithiasis(泌尿系结石)*, Beijing: Renmin Weisheng Press, **2003**.
- [3] JU Zheng-Hua(居正华), ZHANG Xu(张 旭), WANG Shao-Gang(王少刚), et al. *Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi(China Journal of Modern Medicine)*, **2005**,**15**(10):1496~1499
- [4] ZHENG Hui(郑 辉), LI Xiang-Ping(李祥平), OUYANG Jian-Ming(欧阳健明), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2005**,**21**(9):1375~1378
- [5] Ochmanski W, Kmiecik J, Sulowicz W. *Int. Urol. Nephrol.*, **1999**,**31**(6):743~750
- [6] Ouyang J-M, Duan L, Tieke B. *Langmuir*, **2003**,**19** (21): 8980~8985
- [7] Yuzawa M, Tozuka K, Tokue A. *Urol. Res.*, **1998**,**26**:83~88
- [8] DENG Sui-Ping(邓穗平), OUYANG Jian-Ming(欧阳健明), WU Xiu-Mei(吴秀梅), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **2006**,**64**(7):589~592
- [9] Tunik L, Fueredi-Milhofer H, Garti N. *Langmuir*, **1998**,**14**: 3351~3355
- [10] DENG Yao-Liang(邓耀良), XUN Guang-Xi(覃光熙). *Zhonghua Shiyan Waike Zazhi(Chin. J. Exp. Surg.)*, **1994**,**11** (4):205~206
- [11] Yara M. *Kidney Int.*, **1989**,**36**:1022~1028
- [12] Deng S P, Ouyang J M. *Coll. Surf. A*, **2005**,**257**~**258**:47~50
- [13] LI Heng, XIONG Xu-Lin. *Zhonghua Miniao Waike Zazhi(Chin. J. Urol. Surg.)*, **1995**,**16**(10):590~591
- [14] XIN Dian-Qi(辛殿旗), HUA Dao-You(华道宥), JIANG Li(姜 丽). *Zhonghua Miniao Waike Zazhi(Chin. J. Urol. Surg.)*, **1997**,**18**(8):493~494
- [15] Khan S R, Glenton P A, Backov R, et al. *Kidney Int.*, **2002**, **62**:2062~2072
- [16] Romero M C, Nocera S, Nesse A B. *Clin. Biochem.*, **1997**, **30**(1):63~67
- [17] Boeve E R, Cao L C, De Bruijn W C, et al. *J. Urol.*, **1994**, **152**:531~536
- [18] Olezak T, Olezak M, Kubicz A, et al. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, **1999**,**29**:68~74