

草酸钙结石患者尿液中纳米级和微米级晶体研究

黄志杰, 李君君, 何节玉, 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 尿液中存在的微晶与尿石症的形成密切相关。采用 X 射线粉末衍射(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 20 位草酸钙结石患者尿液中纳米级和微米级晶体的组分、形貌和 Zeta 电位, 并与结石组分进行了比较。结果表明, 草酸钙结石中常常含有少量共生的尿酸、磷酸钙和磷酸铵镁; 而草酸钙结石患者的尿微晶组分主要为尿酸、磷酸盐和草酸钙等, 晶体棱角尖锐, 尺寸不一, 从几十纳米到几十微米不等, 并且有明显的团聚现象。20 位草酸钙结石患者的尿纳米晶体的 Zeta 电位平均值为 -5.92 mV, 明显高于 20 位健康对照者尿纳米晶体的 Zeta 电位(平均值 -12.9 mV); 相比之下, 结石患者尿液 pH 值(平均值为 6.03)则与健康对照者(平均值 5.92)没有明显差异。利用现代仪器分析方法分析尿液微晶与尿石组分的关系, 可为临床上对症下药, 制定预防与治疗措施提供重要的依据。

关键词 草酸钙; 结石; 组分; 纳米晶体; Zeta 电位
中图分类号: O433.5; O61; R3 **文献标识码**: A

DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)07-1913-05

引言

尿石症是一种世界范围的常见病和多发病, 每年的发病率为 $0.5\% \sim 5.3\%$, 并呈现上升趋势^[1]。目前对其预防还没有十分有效的方法, 结石形成的机理也尚未研究清楚^[2]。尿石症与地域、环境、生活条件、饮食习惯、全身性代谢紊乱及泌尿系统本身的疾患等有关^[3]。草酸钙是泌尿系结石中最常见的组分, 约占 $60\% \sim 80\%$, 因此对草酸钙结石的研究具有重要的科学意义和临床价值。

尿石症形成的第一步是尿晶体从尿液中析出。早在 20 世纪 70 年代, 一些学者^[4,5]把尿晶体作为尿石症形成的危险指数; 但另一方面, 由于健康对照者尿液中亦同样存在尿晶体, 因此, 也有学者^[6,7]认为, 尿结晶的出现并不能作为患有尿结石病的判断依据, 这使得尿晶体与尿石形成是否具有密切相关性仍然处于争论之中。

利用现代仪器分析方法定性、定量地分析尿石的组分和所含元素, 了解尿结石的理化性质、结构、结石类型形成的倾向性, 分析尿液微晶与尿石组分的关系, 可为临床上对症下药, 制定预防与治疗措施提供重要的依据。

本文对草酸钙结石患者尿液的 pH 值、纳米和微米级尿

微晶的组分、物相和 Zeta 电位进行了分析, 讨论了尿液 pH 值、尿微晶组分与结石组分之间的联系。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

无水乙醇、叠氮化钠等为分析纯, 溴化钾为光谱纯, 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)和 PHILIPS TECNAI 型透射电子显微镜(TEM)。

1.2 尿石和尿液的收集和处理

20 例泌尿系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 9 名, 女 11 名, 年龄 $22 \sim 69$ 岁, 平均年龄 51.6 岁。结石分别采用一次水和二次水清洗后, 低温 (50°C) 烘干, 然后在研钵内研成粉末。XRD 和 FTIR 分析表明, 这些结石的主要组分为 CaOxa。尿结石患者的尿液来自上述刚入院 CaOxa 结石患者的新鲜空腹晨尿, 无结石病史的健康对照者空腹晨尿来自暨南大学师生。

收稿日期: 2009-08-02, 修订日期: 2009-11-06

基金项目: 广东省科技攻关项目(2005B30701003)和国家自然科学基金项目(30672103)资助

作者简介: 黄志杰, 1983 年生, 暨南大学生物矿化与结石病防治研究所硕士研究生 e-mail: huangzhijie@126.com

* 通讯联系人 e-mail: toyjm@jnu.edu.cn

1.3 尿液处理方法

新鲜晨尿收集后,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;再加入无水乙醇,加入量为尿液与无水乙醇体积比为 3:2,搅拌均匀,静置 30 min,使尿液中的蛋白质变性、沉淀。将上层清液的一半尿液直接用于检测尿液中微米级晶体($>1000 \text{ nm}$),另一半用 $1.2 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤,用于检测尿液中的纳米级($<1000 \text{ nm}$)晶体。

尿微晶的 Zeta 电位测定:取上述待测尿样直接用纳米粒度仪检测。

尿微晶的 XRD, FTIR 测定:将上述待测尿样用微量进样器滴在洁净的 $12 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$ 载玻片上,置于无尘恒温烘箱内,温度控制在 $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$,让尿液挥发,然后对留下的尿液微晶分别进行 XRD 和 FTIR 表征。采用 XRD 鉴定尿石和尿微晶组分时参照文献[8]进行。

尿微晶的 SEM 测定:将上述待测尿样超声 3 min 后,用 $100 \mu\text{L}$ 微量进样器滴在洁净的 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ 载玻片上,滴样量为 $50 \mu\text{L}$, 50°C 烘干,然后放在干燥器中,干燥后做 SEM 检测。

尿微晶的 TEM 测定:经 $1.2 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤的尿样超

声 3 min 后,用 $100 \mu\text{L}$ 微量进样器将上述待测尿样 $50 \mu\text{L}$ 滴在铜网上,然后将铜网放在干燥器中干燥 24 h 后做 TEM 检测。

2 结果与讨论

2.1 草酸钙结石的组分分析

采用 XRD 和 FTIR 对 20 例草酸钙结石患者的结石组分进行分析,其为代表的 5 例草酸钙结石的 XRD 和 FTIR 谱图分别如图 1(a)和图 1(b)所示,均检测到归属于一水草酸钙(COM)的 $(\bar{1}01)$, (020) , $(\bar{2}02)$, (112) , (130) 和 $(\bar{3}03)$ 晶面的 $d=5.93, 3.65, 2.97, 2.49, 2.35$ 和 1.98 \AA 处峰值^[8]; FTIR 检测到波数为 $3437 \sim 3063, 1621, 1317, 782$ 和 517 cm^{-1} 的归属于 COM 的特征吸收峰^[3,9]。此外,结石中还含有少量磷酸钙(CaP)或尿酸, XRD 分别检测到归属于 CaP 的 (009) , (1010) 晶面($d=2.07, 1.73 \text{ \AA}$) [图 2(a)] 和尿酸的 (112) , $(\bar{2}22)$ 晶面($d=2.80, 2.24 \text{ \AA}$) [图 3(a)] 的衍射峰^[8]; FTIR 检测到分别归属于磷酸钙的特征吸收峰 $2924, 1037, 603$ 和 566 cm^{-1} [图 2(b)] 和归属于尿酸的特征吸收峰 $1124, 746$ 和 476 cm^{-1} [图 3(b)]^[10]。

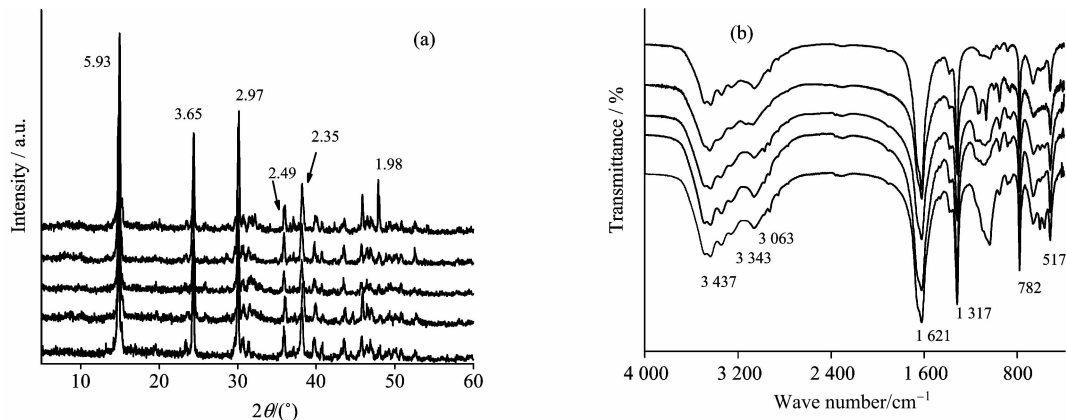


Fig. 1 XRD patterns (a) and FTIR spectra (b) of five typical calcium oxalate stones

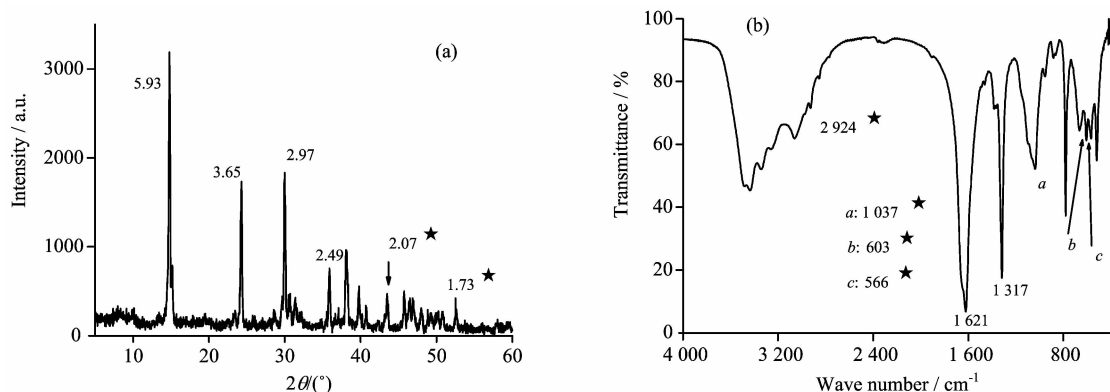


Fig. 2 XRD patterns (a) and FTIR spectra (b) of calcium oxalate stone containing small amount of calcium phosphate

The peaks with ★ show CaP and those without ★ show CaOxa

2.2 草酸钙结石患者的尿微晶组分分析

对草酸钙尿石患者的尿晶体进行 XRD 分析,部分检测

结果如图 4(a)所示。可以看出,在 5 位代表性草酸钙结石患者尿样中,在 L1 和 L2 样品均检测到 $d=8.78 \text{ \AA}$ 处归属于

$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的(010)晶面的衍射峰, $d=3.93 \text{ \AA}$ 处归属于尿酸的($\bar{2}11$)晶面的衍射峰, $d=2.88, 2.16$ 和 1.73 \AA 处归属于磷酸钙的(0210), (3012)和(2020)晶面的衍射峰^[8]; 而 L3~L5 样品均检测到 $d=3.93, 2.80 \text{ \AA}$ 处归属于

尿酸($\bar{2}11$)和(112)晶面的衍射峰, $d=2.52$ 和 1.63 \AA 处归属于磷酸钙(2110)和(2218)晶面的衍射峰, $d=1.98 \text{ \AA}$ 处归属于 COM 的($\bar{3}03$)晶面的衍射峰^[8], 即: 草酸钙结石患者的尿微晶组分主要为磷酸盐、尿酸和草酸钙。

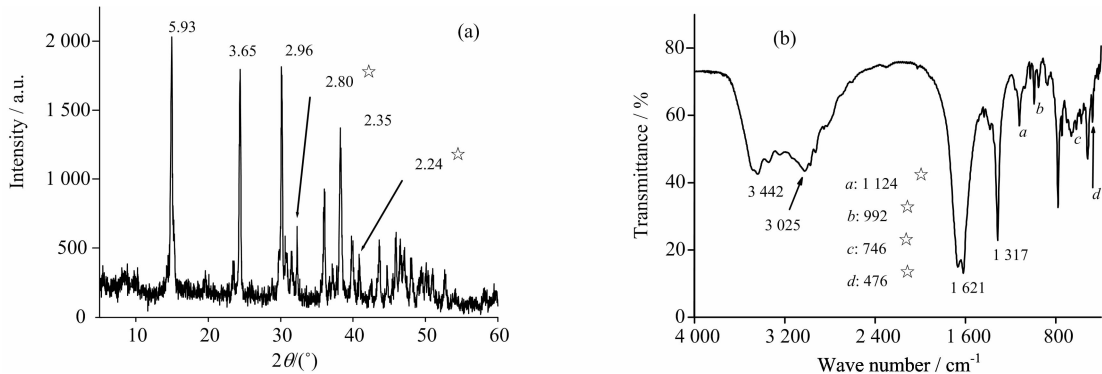


Fig. 3 XRD patterns (a) and FTIR spectra (b) of calcium oxalate stone containing small amount of uric acid

The peaks with ☆ show uric acid and those without ☆ show CaOxa

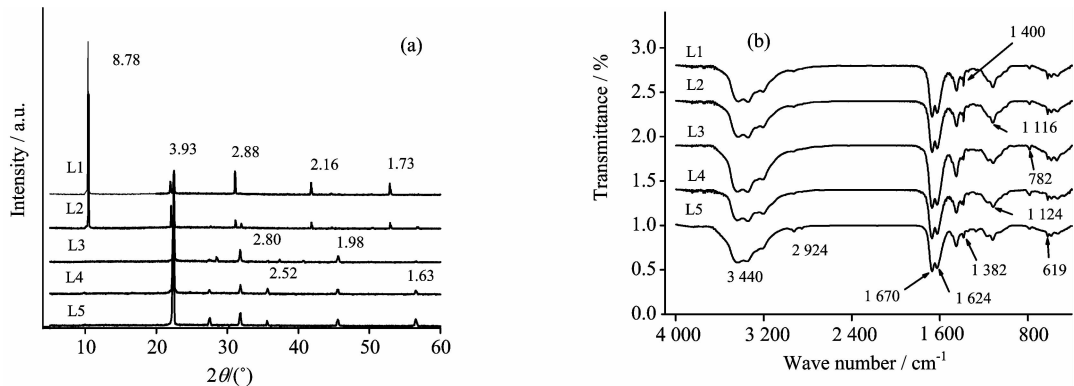


Fig. 4 XRD patterns (a) and FTIR spectra (b) of urine crystallites of calcium oxalate stone formers

草酸钙、磷酸三钙和磷酸八钙结石属于中性结石, 其中最常见的是草酸钙结石, 包括一水草酸钙(COM)和二水草酸钙(COD)。无论在酸性尿液还是碱性尿液或者中性尿液中, 都可生成草酸钙晶体, 其形成的主要原因不是尿液 pH 值的高低, 而是尿液中钙特别是草酸的浓度。Grases^[11,12]等通过研究表明, 尿酸晶体能够明显地通过异相成核过程诱导草酸钙晶体的生长; 而体外模拟研究^[13]也表明, CaP 也可以通过异相成核的过程诱导草酸钙晶体生长。因此, 草酸钙经常与尿酸或 CaP 等共同生成混合性结石(图 2 和图 3)。在酸性尿液中通常生成与尿酸共生的结石, 而在碱性尿液中则易与 CaP、羟磷灰石、磷酸铵镁等共生成结石。

采用 FTIR 对草酸钙结石患者的尿液微晶进行检测, 结果如图 4(b) 所示。5 位代表性患者尿液中都检测到 1624 cm^{-1} 处归属于 COM 和 COD 混合物的特征吸收峰, 1382 和 782 cm^{-1} 处 COM 的特征吸收峰^[3,9]; 此外, 还检测到尿酸 (1670 和 619 cm^{-1}), NH_4^+ (1400 cm^{-1}) 以及磷酸盐 ($2924, 1120\sim940 \text{ cm}^{-1}$)^[10] 等物质。

综合 XRD 和 FTIR 结果表明, 草酸钙结石患者的尿微晶组分主要为尿酸、磷酸盐和草酸钙, 与结石的组分较为接近。

在用 XRD 分析草酸钙结石患者的尿微晶组分时, 只有部分样品检测到 COM 的存在, 而另外一部分尿微晶的主要组分为磷酸盐和尿酸。这可能与这些难溶盐在水中的溶解度有关。COM 在 100 g 水中只能溶解 0.0006 g , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 可分别溶解 0.03 和 52 g ^[14,15], 而尿酸的溶解度随尿 pH 升高而增大, 当尿 pH 5.0 时, 尿酸溶解度为 0.006 g , pH 6.0 时增加到 0.02 g , pH 7.0 时则为 0.158 g ^[16]。由于磷酸盐和尿酸的溶解度比 COM 大得多, 因此尿液中含有较多的磷酸盐或尿酸, 故 XRD 和 FTIR 在草酸钙结石中检测到这些物质。

XRD 检测结石组分与尿液微晶组分时, 发现对同一个组分, 如 COM, 其表现的衍射峰值不完全相同, 这与它们在结石中和尿液中所表现的晶型不同有关, 因而检测到的是该组分的不同晶面。人体尿液中含有各种晶体生长抑制剂和促进剂, 尿液中的各种物质的组分和含量受每天饮食等因素的影响不断变化^[17], 进而影响尿液中各种晶体的生长速度和生长位点^[18,19], 同时结石的形成受到多种因素的影响^[20], 以致 XRD 检测时得到同一组分不同晶面的峰值。

2.3 草酸钙结石患者的尿微晶形貌

采用 SEM 和 TEM 对尿液微晶进行观察, 患者尿液中的

微晶棱角尖锐,尺寸不一,从几十纳米到几十微米不等,并且有明显的团聚现象,分别如图 5 所示。

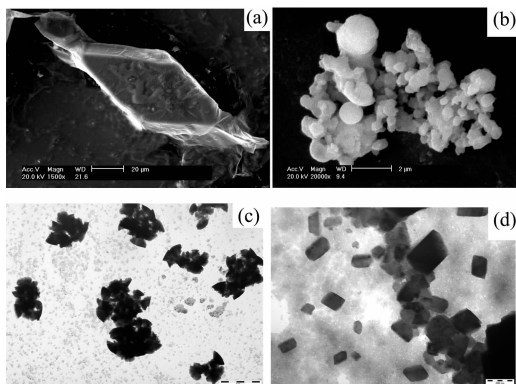


Fig. 5 SEM (a,b) and TEM (c,d) images of typical urine crystallites in calcium oxalate stone formers

(a): 20 μm ; (b): 2 μm ; (c): 500 nm; (d): 200 nm

2.4 草酸钙结石患者尿液中纳米级微晶的 Zeta 电位及其与健康对照者的差异

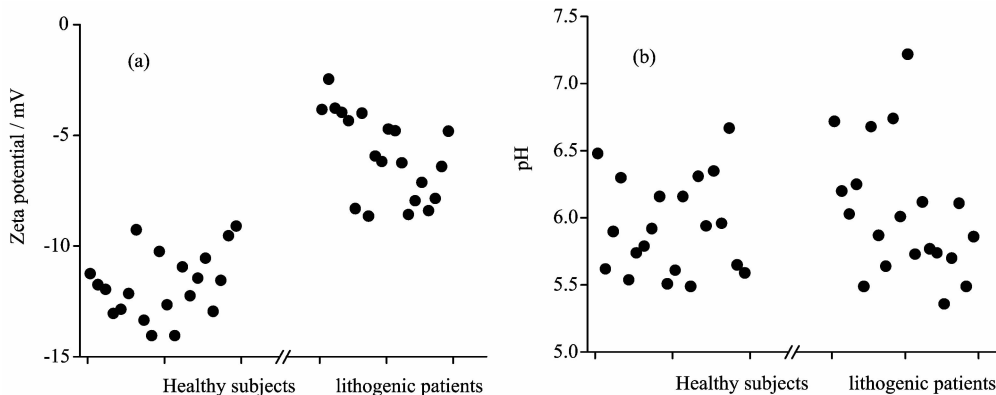


Fig. 6 Comparison of Zeta potential of urine crystallites (a) and pH value of urines (b)

between twenty stone formers and twenty healthy subjects

3 结论

采用 X 射线粉末衍射(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)研究了草酸钙结石患者尿液中纳米级和微米级晶体的组分、形貌和 Zeta 电位,并与结石组分进行了比较。

健康对照者和草酸钙结石症患者尿晶体的 Zeta 电位存在明显的差异[图 6(a)]。对照者尿晶体的 Zeta 电位平均值 -12.6 mV , 而草酸钙结石症患者尿晶体的 Zeta 电位平均值 -5.92 mV 。相比之下,健康对照者和草酸钙结石症患者的尿液 pH 值(平均值为 6.03)与健康对照者(平均值 5.92)没有明显差异[图 6(b)]。

在对照者尿液中,草酸钙晶体也经常是过饱和的,但是结石的形成往往受到尿液中抑制剂诸如柠檬酸盐、镁离子、骨钙素、Tamm-Horsfall 蛋白等的抑制作用^[21]。这些阴离子抑制剂可以吸附在尿液中带正电荷晶体的表面,不但使得尿液中微晶表面的 Zeta 电位变负,排斥力增强,而且可以封闭晶体表面的生长位点,从而抑制尿液中纳米级微晶的生长和聚集。而结石患者尿液中存在的这些抑制剂的浓度较小,活性较低,使得大多数的微晶没有被抑制剂吸附,仍然游离于尿液中,游离的微晶彼此之间的静电作用力、范德华作用力以及粘合力均比健康对照者的大,使得这些纳米级微晶比对照者的更容易发生聚集。因此,相比健康对照者,草酸钙结石患者尿液中纳米级微晶的 Zeta 电位负值更小。

尿石症患者的尿微晶组分与结石的组分相近。尿微晶的主要组分为尿酸、磷酸盐和草酸钙等,尿液微晶包括六边形、菱形和片状等,微晶棱角尖锐,尺寸不一,从几十纳米到几个微米不等,并且有明显的团聚现象。患者尿液中纳米级微晶的 Zeta 电位比健康对照者的负值更小,而尿液 pH 值(平均值为 6.03)则与健康对照者(平均值 5.92)没有明显差异。

参 考 文 献

- [1] Rez S S P. Urol. Res., 2007, 35: 287.
- [2] Tsujihata M. Int. J. Urol., 2008, 15: 115.
- [3] TAN Yan-hua, OUYANG Jian-ming, MA Jie, et al(谭燕华, 欧阳健明, 马洁, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(4): 700.
- [4] Robertson W G, Peacock M, Nordin B E C. Lancet, 1969, 2: 21.
- [5] Hallson P C, Rose G A. Brit. J. Urol., 1978, 50: 442.
- [6] Robert M, Boularan A M, Delbos O, et al. Urol. Int., 1998, 60: 41.

- [7] Robert M, Boularan A M, Delbos O, et al. *Eur. Urol.*, 1996, 29(4): 456.
- [8] King M, McClure W F, Andrews L C. Powder Diffraction File Alphanumeric Index, Inorganic Phases/Organic Phases, International Center for Diffraction Data; Newtown Square, PA, 1992.
- [9] Moawad M M. *J. Coord. Chem.*, 2002, 50(1): 61.
- [10] CHEN Yun-kui(陈允魁). *Infrared Absorption 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.
- [11] Grases F, Sanchis P, Perelló J, et al. *Int. J. Urol.*, 2006, 13: 252.
- [12] Grases F, Sanchis P, Isern B, et al. *Urol. Nephrol.*, 2007, 41: 26.
- [13] Hojgaard I, Tiselius H G. *Urol. Res.*, 1999, 27: 397.
- [14] Dean J A. *Lange's Handbook of Chemistry(兰氏化学手册)*. Beijing: McGraw-Hill Book Co. (北京: 世界图书出版公司), 1999. 3. 22.
- [15] LIU Guang-qi, MA Lian-xiang, LIU jie(刘光启, 马连湘, 刘杰). *Handbook of Physical Properties of Chemistry & Chemical Engineering(化学化工物性数据手册)*. Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2002. 371.
- [16] ZHOU Shui-gen, SUN Xi-zhao, YE Zhang-qun(周水根, 孙西钊, 叶章群). *Journal of Clinical Urology(临床泌尿外科杂志)*, 2001, 16(4): 147.
- [17] Murayama T, Sakai N, Yamada T, et al. *Int. J. Urol.*, 2001, 8: 525.
- [18] Shen Y H, Li S K, Xie A J, et al. *Colloids Surf., B*, 2007, 58: 298.
- [19] Chandra A K, Zeegers-Huyskens T. *J. Mol. Struct-Theochem.*, 2007, 811: 215.
- [20] Grases F, Villacampa A I, Costa-Bauzá A, et al. *Clin. Chim. Acta*, 2000, 302: 89.
- [21] Qiu S R, Wierzbicki A, Salter E A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 9036.

Study on Nano- and Microcrystallites in the Urines of Calcium Oxalate Stone Formers

HUANG Zhi-jie, LI Jun-jun, HE Jie-yu, OUYANG Jian-ming*

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

Abstract The crystallites in urine are related closely with the formation of urolithiasis. In the present paper the composition, morphology and Zeta potential of crystallites of twenty calcium oxalate stone formers were comparatively studied using X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, nanoparticle size analyzer, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The results showed that calcium oxalate calculi usually coexisted with a little of uric acid, calcium phosphate, and magnesium ammonium phosphate. By contrast, the compositions of urine crystallites of the patients with calcium oxalate calculi were mainly uric acid, phosphate, calcium oxalate and so on. Most of them had sharp angularity with a particle size distribution ranging from tens of nanometers to tens of microns; and obvious aggregation was observed. The negative value of Zeta potential of urine crystallites in the twenty stone formers (average value -5.92 mV) was less than that in the twenty normal subjects (-12.9 mV). However, there was no obvious difference in the urine pH between stone formers (average pH 6.03) and normal subjects (average pH 5.92). The study on the relationship between urine crystallites and urinary calculi components will be helpful for finding out the causes of urolithiasis and providing an important basis for the scientific prevention methods and reasonable treatments in clinic.

Keywords Calcium oxalate; Calculi; Composition; Nanocrystallite; Zeta potential

(Received Aug. 2, 2009; accepted Nov. 6, 2009)

* Corresponding author