

尿酸结石患者尿液中的微晶组分及其与结石形成的关系

黄志杰, 谈金, 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(FTIR)光谱、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10例尿酸结石患者尿微晶的组分、Zeta电位、形貌及其与尿酸结石形成的关系。结果表明,尿酸结石患者的尿pH值较低,大都在4.8~5.7之间;尿微晶的主要成分为尿酸,其粒度分布很不均匀,从几纳米到几十微米不等,并有聚集现象。相比健康对照者尿纳米微晶的Zeta电位(-10.1 mV),尿酸结石患者的Zeta电位负值更小(-6.02 mV)。对这些患者进行药物治疗(服用柠檬酸钾)后,尿pH可上升到6.5左右,此时尿液中的大部分尿酸转变为溶解度显著增加的尿酸盐,因此,尿酸结石形成的危险性显著降低。本文结果表明,尿石组分、尿微晶组分及尿pH三者之间存在密切的联系。

关键词 纳米微晶; Zeta电位; FTIR; XRD; 纳米粒度仪; 尿酸结石

中图分类号: O434; O622.5; R69 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)09-2350-05

引言

根据尿石组分的化学性质差异,尿石症可分为酸性结石(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、磷酸钙等)。目前,临床上不但不能在尿石形成前预测其发生,而且对已形成的尿石也都是采用相同的方法和相同的药物不加区别地治疗,因而,导致疗效不一,治愈率低。因此,分析尿液微晶组分与尿石形成的关系,将有助于在尿石形成前预测其发生,或更进一步在排石前判断尿石的类型,从而为临床医学预防尿石形成和对症下药提供依据,具有重要的科学意义和临床价值。

作为最常见的酸性结石,尿酸结石常见于肾和输尿管,其发病率随国家与地区的不同而不同,占泌尿系结石的5%~40%^[1],仅次于草酸钙结石,如美国的尿酸结石占5%~10%,国内为14%~24%。

尿酸结石比例近年来迅速增加。这归因于社会发展,生活水平普遍提高后,人类对肉食尤其是海鲜摄入量的显著增加,肥胖者比例增加,从而导致高尿酸尿和酸性尿,使得尿酸结石发生率增加。例如在中国广东省,尿酸结石在人体结石中所占比例由20年前的13%,迅速增加到目前的20%~30%^[2,3]。

尿晶体从尿液中析出是尿石症形成的第一步,因此,尿液中的晶体状况与尿石症形成密切相关^[4]。本文对10例尿

酸结石患者的结石组分、尿pH值和尿液微晶组分进行了研究,并与健康对照者进行了对比,期望为临床医学上有效预防和治理尿酸结石提供启示。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

所有试剂均为分析纯,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)和 PHILIPS TECNAI 型透射电子显微镜(TEM)。

1.2 临床资料

10例尿酸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,然后研成粉末,进行XRD和FTIR分析。

尿酸结石患者的尿液来自上述患者的新鲜晨尿; 比较研究其刚入院时和住院一周后尿pH、尿微晶的变化情况,患者住院期间主要服用柠檬酸钾,服用量为 $2.538 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$; 无结石病史的健康对照者(10例)的空腹晨尿来自暨南大学师生。

收稿日期: 2009-11-08, 修订日期: 2010-02-12

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: 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 * 通讯联系人 e-mail: toyjm@jnu.edu.cn

1.3 尿液处理方法和检测

新鲜晨尿收集、防腐、蛋白质去除及尿液中微晶的 XRD、FTIR、Zeta 电位、TEM、SEM 和粒度分布检测均参照前文^[5]进行。

2 结果与讨论

2.1 尿酸结石的组分分析

对 10 例手术取出的尿酸结石进行了 XRD 和 FTIR 分析, 结果表明, 其中 6 例以单一的尿酸形式出现, 代表性的 XRD 和 FTIR 谱如图 1 所示; 另 4 例尿石样本除了检测到尿酸以外, 还检测到少量的一水草酸钙(COM)存在, 其代表性光谱如图 2 所示。

在单一组分的尿酸尿石样本中, 检测到晶面间距 $d=6.54, 5.63, 4.91, 3.86, 3.19, 3.10, 2.87, 2.80, 2.57$ 和 2.24 \AA 处的衍射峰[图 1(a)], 分别归属于尿酸的(200), ($\bar{1}01$), (210), ($\bar{2}11$), (021), ($\bar{1}21$), ($\bar{2}21$), (112), (321) 和 ($\bar{2}22$) 晶面^[6]; 在 FTIR 谱图中, 检测到 $3014, 2826, 1675, 1591, 1313, 1124, 992, 876, 783, 745, 619$ 和 477 cm^{-1} 等尿酸的吸收峰^[7, 8][见图 1(b)]。

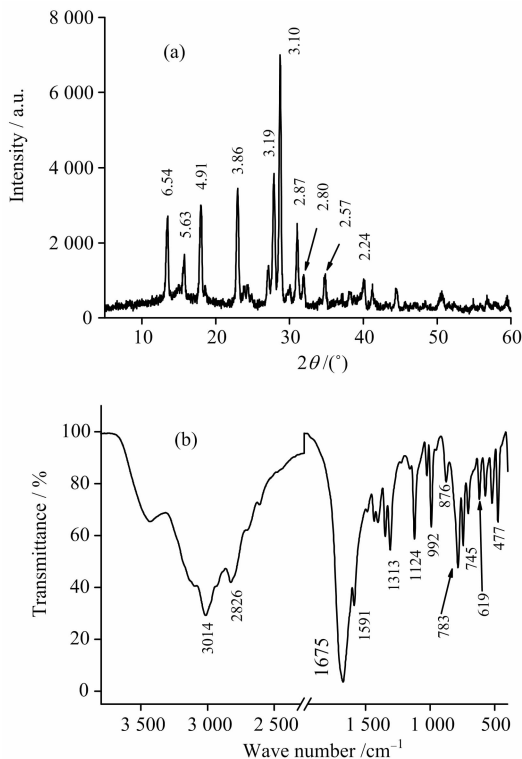


Fig. 1 XRD pattern (a) and FTIR spectrum (b) of uric acid calculi

在含草酸钙组分的尿酸结石样本中[图 2(a)], 除检测到上述图 1(a)归属于尿酸的各衍射峰外, 同时还检测到 $d=5.93, 3.65$ 和 2.35 \AA 处分别归属于 COM 的($\bar{1}01$), (020) 和 (130) 晶面的衍射峰^[6]。在图 2(b)所示 FTIR 谱图中, 除检测到上述图 1(b)中尿酸各吸收峰外, 同时也检测到了 1317 和 782 cm^{-1} 处归属于 COM 的特征吸收峰^[7, 8], 说明这些尿酸

结石中同时含有 COM。但从 XRD 衍射峰强度[图 2(a)]可以看出, 结石中尿酸的含量远高于草酸钙含量。

尿酸结石一般形成于酸性尿中, 常见的有纯尿酸结石、尿酸-尿酸盐混合结石和含钙的尿酸结石。由于尿酸不但可通过干扰尿液中酸性粘多糖(GAGs)的抑制活性引起草酸钙晶体沉积^[9], 而且尿酸晶体及尿酸结石碎片可以通过异相成核过程诱导草酸钙形成和生长^[10], 因此, 尿酸晶体常会与草酸钙晶体互为附生长。

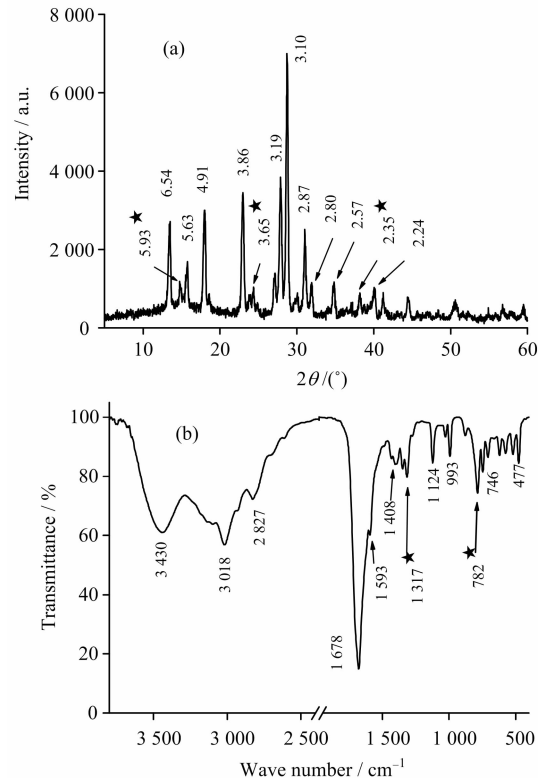


Fig. 2 XRD pattern (a) and FTIR spectrum (b) of uric acid calculi containing small amount of calcium oxalate. The peaks with ★ show CaOxa and those without ★ show uric acid

2.2 尿酸结石患者尿微晶的形貌

采用 SEM 和 TEM 分别对刚入院尿酸结石患者尿液中的微米级晶体和纳米级晶体进行了观察, 可以看到多种不同形状的尿酸结晶, 主要有四方形、长方形和菱形等; 晶体棱角尖锐, 粒度分布很不均匀, 从几纳米到几十微米不等, 部分尿微晶存在聚集现象。

2.3 尿酸结石患者刚入院时和治疗一周后的尿 pH 变化

对 10 例刚入院(治疗前)尿酸结石患者的尿液 pH 值进行了检测, 其结果如表 1 所示。可见, 刚入院的尿酸结石患者, 其尿 pH 值均较低, 在 $4.98 \sim 5.63$ 之间, 平均值为 5.27 ± 0.50 。

这些尿酸结石患者住院后, 每天服用柠檬酸钾药物碱化尿液, 平均服用量为 $2.538 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$; 并且适量服用利尿药物, 增大排尿量; 同时对其饮食进行调节, 减少动物蛋白等酸性食物的摄入量。一周后再次对其尿液进行分析, 结果发现,

其尿 pH 值升高到 6.5 左右, 平均值为 6.50 ± 0.50 (表 1)。

尿酸在 37 °C 时 $pK_a = 5.35$, 其溶解度与 pH 值和温度密切相关^[11]。当 $pH < 5.5$ 时, 所有健康对照者尿中的尿酸都呈过饱和状态, 此时会有部分尿酸从尿液中析出; 当尿液 $pH < 5.0$ 时, 尿酸的溶解度显著减小, 可析出大量纯尿酸;

而在生理 pH 7.3 时, 绝大多数尿酸以尿酸钠的形式存在于血液、组织间液及肾间质中。当尿液 pH 由 5.0 增加到 7.0 时, 尿酸的溶解度可以增加 10 倍^[11, 12]。而当 $pH > 7.4$ 时, 尿液中钙盐易形成结石沉淀, 并有促进磷酸盐结石形成的危险。

Table 1 Comparison of properties of nanocrystallites in healthy urines and lithogenic urines

No.	住院前 pH	住院前 Zeta 电位/mV	PDI	结石组分	住院前粒径(<i>d</i>)分布/nm	平均粒径 \bar{d} /nm
L1	5.23	-6.80	0.621	尿酸	553(47), 165(45), 44(8)	215
L2	5.38	-6.25	0.836	尿酸+COM	514(38), 155(56), 38(6)	136
L3	5.12	-3.40	0.510	尿酸	575(37), 142(51), 29(12)	143
L4	5.13	-3.01	0.400	尿酸	140(92), 41(8)	132
L5	5.63	-6.70	0.716	尿酸	1 024(56), 115(39), 23(5)	246
L6	4.98	-6.55	0.382	尿酸+COM	183(88), 42(12)	155
L7	5.15	-7.26	0.548	尿酸+COM	244(75), 57(20), 18(5)	190
L8	5.45	-6.68	0.757	尿酸	643(39), 79(50), 13(11)	181
L9	5.34	-5.49	0.535	尿酸	510(42), 92(47), 18(11)	100
L10	5.24	-8.04	0.772	尿酸+COM	299(83), 63(17)	184
L 平均值	5.27		0.608			168
H1	6.34	-10.6	0.356		485(44), 129(56)	273
H1	6.34	-10.6	0.356		485(44), 129(56)	273
H2	5.73	-13.4	0.394		392(44), 123(56)	162
H3	5.89	-9.89	0.311		155.0(100)	194
H4	6.29	-12.4	0.270		118(92), 10(8)	185
H5	5.53	-11.0	0.351		234(76), 70(24)	195
H6	6.33	-8.39	0.370		454(70), 122(30)	270
H7	5.55	-9.70	0.448		430(63), 105(37)	266
H8	5.93	-9.01	0.427		972(20), 189(80)	224
H9	5.28	-8.19	0.462		361(58), 99(42)	172
H10	6.04	-7.92	0.461		241(74), 84(26)	172
H 平均值	5.89		0.385			211

正常人的尿 pH 在一天内变化范围大, 在 4.8~7 之间; 一般情况下, 清晨时尿 pH 较低 ($pH < 5.5$), 而下午和傍晚时较高 ($pH > 6.0$), 尿液的这种周期性碱化可以充分抑制体内尿酸的析出^[13]。但是, 尿酸结石患者的尿 pH 全天保持在较低的水平 (4.8~5.6), 致使尿酸沉积而形成尿酸结石。住院的尿酸结石病人在服用柠檬酸钾等药物和调节饮食后, 由于其尿 pH 值上升到 6.5 左右, 因而尿液中的尿酸晶体含量大大降低。

2.4 尿酸结石患者刚入院时和治疗一周后的尿微晶组分变化

2.4.1 刚入院尿酸结石患者的尿微晶组分

对 10 例刚入院尿酸结石患者尿微晶组分进行了 XRD 和 FTIR 分析, 在这些尿微晶中均检测到大量的尿酸晶体, 代表性尿微晶 XRD 谱如图 3(a) 所示。可以看出, XRD 检测到归属于尿酸 ($\bar{2}11$), (021), ($\bar{1}21$), (112) 和 (130) 晶面的 $d = 3.91, 3.23, 3.22, 2.80$ 和 2.42 \AA 处的衍射峰^[6]。

尿酸结石患者尿微晶的代表性 FTIR 光谱如图 4a 所示, 在 3 017, 2 821, 1 665, 1 313, 1 124, 991, 783, 619 和 477 cm^{-1} 等处检测到归属于尿酸的特征吸收峰^[7, 8]。

这些光谱中没有检索到明显的 COM 吸收峰, 这可能是

其含量低, 其吸收峰被掩盖所致。综合 XRD 和 FTIR 分析, 可以得出: 治疗前尿酸结石患者尿液微晶的主要成分为尿酸, 这表明, 尿酸结石患者的尿微晶组分与结石的组分相近。

2.4.2 治疗一周后尿酸结石患者的尿微晶组分

尿酸结石患者住院治疗并服用柠檬酸钾一周后, 再次对其尿液进行分析, 结果如下。

(1) XRD 表明, 尿晶体的衍射峰数目明显减少, 衍射峰强度亦比住院前显著减弱, 说明尿液中微晶数量显著减少。图 3b 是与图 3a 对应的同一患者在住院一周后尿微晶的检测结果。可以看出, 其 XRD 衍射峰强度亦比住院前 (图 3b) 降低了 50%。

(2) XRD 检测到归属于尿酸 ($\bar{2}11$), ($\bar{1}21$), (202), ($\bar{5}01$) 和 ($\bar{2}22$) 晶面的特征吸收峰 ($d = 3.91, 3.10, 2.80, 2.48$ 和 2.24 \AA)。

(3) FTIR (图 4b) 检测到 3 025, 2 814, 1 665, 1 313, 1 122, 990, 781, 619 和 477 cm^{-1} 波数处尿酸的特征吸收峰。

综合 XRD 和 FTIR 的分析结果, 表明尿酸结石患者住院并服用柠檬酸钾等药物一周后, 其尿微晶主要组分仍然是尿酸晶体, 但晶体数量显著减少。这归因于尿液 pH 上升后,

尿酸大部分转化成为了溶解度显著增加的尿酸盐,使得尿酸含量降低。

比较图 1(a),图 2(a),图 3a)和图 3b)的 XRD 谱可以发现,用 XRD 检测结石组分与尿液微晶组分时,相同组分所表达的衍射峰有时会有差异。这是因为尿液中的微晶在成核、生长过程中,受到尿液中各种抑制剂和促进剂的影响^[14],从而改变了晶体的生长位点及各晶面的生长速度,如带负电荷的抑制剂会优先与带正电荷的晶面结合。因此,同一组分(如尿酸)在结石和尿液中的晶型有所不同,导致在 XRD 检测时得到该组分(如尿酸)的不同晶面。

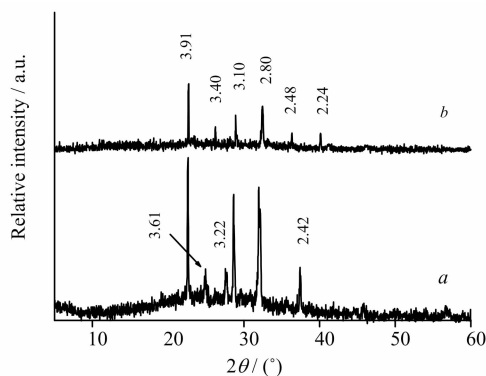


Fig. 3 XRD patterns of typical urinary crystallites of uric acid stone former just in hospital *a* and in hospital for a week *b*

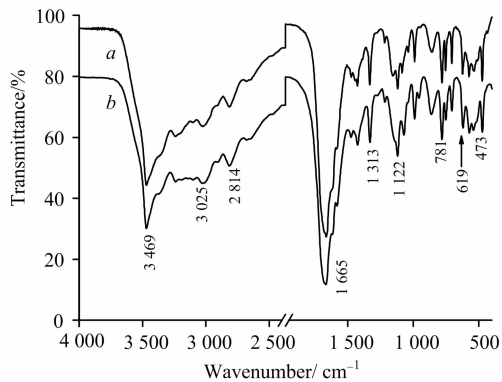


Fig. 4 FTIR spectra of typical urinary crystallites of uric acid stone former just in hospital *a* and in hospital for a week *b*

2.5 尿酸结石患者尿液中纳米微晶的粒径分布及其与健康对照者的差异

健康对照者尿液中的纳米微粒常常分布在 1 到 2 个区域(图 5a),平均粒径在 211 nm,所有的对照者尿液中纳米微粒的多分散系数(PDI)均小于 0.5,这说明健康对照者尿液中纳米微晶分布范围较窄,粒径比较均匀。而尿酸结石患者尿纳米微粒多分布在 2 个或 3 个区域(图 5b,平均粒径 168 nm,分布范围宽,粒径不均匀,多分散系数(PDI)基本上都大于 0.5,尿液体系不稳定。

前文^[15]报道了有关尿液中纳米微晶的初步研究结果,发现尿石症患者尿纳米微粒的粒度分布范围比健康对照者的

宽,患者尿样中纳米微晶的聚集程度高。然而有意思的是,我们研究的 10 例尿酸结石患者当中,虽然其尿纳米微粒的粒度分布、多分散系数(PDI)及 Zeta 电位等均与健康对照者存在明显的差异,但是,纳米微粒的平均粒径(168 nm)与健康对照者的(211 nm)差异不明显(表 1)。

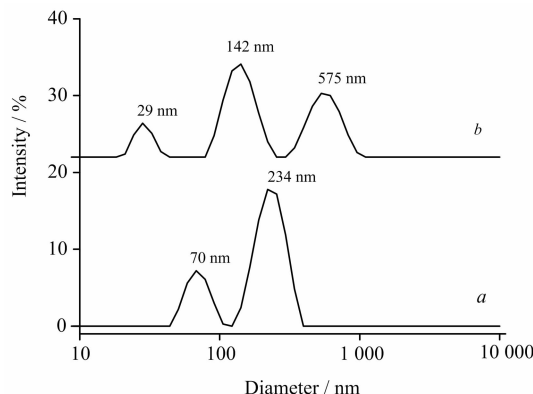


Fig. 5 Size distribution by intensity of nanocrystallites in urines of healthy person *a* and uric acid stone former *b*

2.6 尿酸结石治疗前后患者尿微晶的 Zeta 电位及其与健康对照者的差异

颗粒表面的 Zeta 电位可表征其带电特性。尿晶体的 Zeta 电位与其自身理化性质和尿液组分相关。尿晶体表面的 Zeta 电位负值越高,表明它们相互接近时需要越过更高的能量屏障,因此颗粒之间越不易碰撞而发生聚集和粘附,形成结石的危险性也降低。

pH 值的变化影响颗粒表面的荷电状态,从而影响 Zeta 电位。

采用纳米粒度仪研究了治疗前后尿酸结石患者尿液中纳米微粒的 Zeta 电位变化(表 1),并与健康对照者进行了比较。

在治疗前,尿酸结石病人的尿 pH 值均比较低(4.98~5.63),尿液中纳米微粒的 Zeta 电位负值亦比较小(平均值为 -6.02 mV)。而服药治疗 1 周后,其尿 pH 升高到 6.5 左右,尿酸晶体部分地转化成尿酸盐,Zeta 电位亦随着 pH 升高而下降,平均值减小至为 -11.6 mV。这是因为患者服药后,尿 pH 值增高,尿酸转化成尿酸盐,尿液中含有大量的尿酸根负离子,导致尿微晶的 Zeta 电位下降。这与文献^[16]报道的在 pH 5~7 范围内,尿酸晶体在水、合成尿和自然尿 3 种不同体系中,Zeta 电位均随着 pH 的逐渐升高而下降的结果相一致。尿微晶表面的 Zeta 电位下降后,微晶表面负电荷密度增加,微晶之间静电排斥力增加,有利于防止尿微晶的聚集和抑制尿石形成。

相比之下,健康对照者尿纳米晶体的 Zeta 电位平均值为 -10.1 mV(表 1),小于尿酸结石患者(-6.02 mV)。这可能是由于健康对照者尿液中比结石病人尿液中含有更多的抑制剂。尿液中含有多种小分子和大分子抑制剂,如柠檬酸盐、磷酸盐、酸性黏多糖(GAGs)、Tamm-Horsfall 蛋白(THP)、骨钙素(Osteocalcin, OC)等。这些阴离子抑制剂吸附在尿晶体表面后,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微晶的生长和聚集。

3 结 论

通过 XRD、FTIR、纳米粒度仪、SEM 和 TEM 等多种方法表明,尿酸结石患者尿 pH 值、尿液微晶的组分均与结石组分密切相关。患者尿液的 pH 值比较低,通常 $\text{pH} < 5.7$;

尿微晶组分与结石组分较为相似,其主要组分均为尿酸,但有时会混合有少量 COM 晶体。尿酸结石患者在服用柠檬酸钾治疗后,其尿液 pH 升高到 6.5 左右,尿微晶组分转变为尿酸盐和尿酸。本文提示,不但通过对患者尿液的分析,有助于预测患者结石的类型;而且,通过药物治疗和饮食调节,在增加患者的尿 pH、从而增加尿酸溶解度后,可以达到预防尿酸结石形成和复发的目的。

参 考 文 献

- [1] Shekarriz B, Stoller M L. *J. Urol.*, 2002, 168: 1307.
- [2] Ouyang J M. *Spectros. Lett.*, 2004, 37(6): 633.
- [3] KUANG Li, TAN Yan-hua, OUYANG Jian-ming, et al(邝 荔, 谭燕华, 欧阳健明, 等). *Guangdong Medical Journal(广东医学)*, 2002, 23(10): 1029.
- [4] Daudon M, Hennequin C, Boujelben G, et al. *Kidney Int.*, 2005, 67: 1934.
- [5] HUANG Zhi-jie, LI Jun-jun, HE Jie-yu, et al(黄志杰, 李君君, 何节玉, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2010, 30(7): 1913.
- [6] King M, McClure W F, Andrews L C, et al. 1992 Powder Diffraction File Alphabetical Index, Inorganic Phases/Organic Phases. International Center for Diffraction Data: 1601 Park Lane, Pennsylvania, U. S. A., 1992. 19081.
- [7] Maurice-Esteva L, Levillain P, Lacour B, et al. *Clin. Chim. Acta*, 2000, 298: 1.
- [8] Benramdane L, Bouatia M, Idrissi M O B, et al. *Spectros. Lett.*, 2008, 41(2): 72.
- [9] MENG Yin, DAI Ke-sheng, LI Yu-yun, et al(孟 茵, 戴克胜, 李玉云, 等). *Shanghai Journal of Medical Laboratory Sciences(上海医学检验杂志)*, 2000, 15(2): 85.
- [10] Grases F, Sanchis P, Perello J, et al. *Int. J. Urol.*, 2006, 13: 252.
- [11] Königsberge E, Wang Z H. *Monatsh. Chem.*, 1999, 130: 1067.
- [12] Nicar M J, Hsu M C, Johnson T, et al. *Lab. Med.* 1987, 18: 382.
- [13] Maalouf N M, Cameron M A, Moe O W, et al. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2004, 13: 181.
- [14] Qiu S R, Wierzbicki A, Salter E A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 9036.
- [15] Deng F, Ouyang J M. *Mater. Sci. Eng. C*, 2006, 26: 688.
- [16] Ismail S I, Tawashi R, Ismail Z. *Int. Urol. Nephrol.*, 1985, 17(1): 3.

Components of Urinary Crystallites in Urine of Uric Acid Stone Formers and Its Relationship with Formation of Stones

HUANG Zhi-jie, TAN Jin, OUYANG Jian-ming*

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

Abstract The components, zeta potential, morphology of nanocrystallites in urines of 10 uric acid stone formers as well as their relationship with the formation of uric acid stones were comparatively studied using X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, nanoparticle size analyzer, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The urine pH of uric acid stone formers was relatively low within the range of 4.8 to 5.7. The main constituent of urinary crystallites was uric acid. Their particle size distribution was highly uneven, ranging from several nanometers to several tens of micrometers, and obvious aggregation was observed. The zeta potential of urinary crystallites in ten lithogenic patients was -6.02 mV, which was higher than that in ten normal subjects (-10.1 mV). After drug therapies (potassium citrate was taken), the urine pH value of the uric acid stone formers increased to 6.5 or so, and at this pH value most of the uric acid had changed to urate. Since the solubility of urate increased greatly than uric acid, the risk of the formation of uric acid stone reduced. The results in this paper showed that there was a close relationship among stone components, urinary crystallites composition and urine pH.

Keywords Nanocrystallite; Zeta potential; FTIR; XRD; Nanoparticle size analyzer; Uric acid stone

* Corresponding author

(Received Nov. 8, 2009; accepted Feb. 12, 2010)