

·论著·

Claudin-14 在两种肾结石模型肾组织中表达的对比研究

杨 恒^{1,2}, 钱 彪^{1,2}, 王勤章¹, 郝志强^{1,2}, 王敬坤^{1,2}, 汪 渊^{1,2}, 李永乐^{1,2}, 谭明辉^{1,2}, 郑丽英²

(1.石河子大学医学院第一附属医院泌尿外科,新疆 石河子 832008

2.赣南医学院第一附属医院泌尿外科,江西 赣州 341000)

摘要:目的 通过观察 Claudin-14 在两种实验性大鼠肾结石模型中表达的差异,探究纳米细菌在结石形成过程中的作用。方法 选取 90 只 Wistar 雄性大鼠,随机分为纳米细菌组(NB 组,大鼠尾静脉注射 NB+生理盐水灌胃)、乙二醇组(EG 组,大鼠 1%乙二醇饮水和 2%氯化铵 AC 2 ml 灌胃 2 周)、空白对照组(NC 组,大鼠尾静脉注射生理盐水+生理盐水灌胃),人工采集大鼠血、尿进行钙浓度检测,取大鼠肾脏组织行结石成分分析及免疫组化检测 Claudin-14 改变。结果 NB 组、EG 组含草酸钙结石分别占总结石数的 61.54%、78.95%;NB 组与 EG 组 1~10 周内血钙、尿钙含量分别比较,差异无统计学意义($P>0.05$);EG 组第 3 周后 Claudin-14 蛋白的表达显著增强,NB 组第 4 周后 Claudin-14 蛋白的表达开始增强,EG 组 Claudin-14 蛋白的表达显著强于 NB 组,但 NC 组 Claudin-14 蛋白的表达未见明显改变。结论 纳米细菌是形成结石的原因之一,草酸钙结晶的形成不仅有纳米细菌的参与,同时 Claudin-14 所参与的细胞通路也起到了相应的作用,导致尿钙升高,最终形成结石。

关键词:肾结石;纳米细菌;乙二醇;大鼠肾结石模型;Claudin-14

中图分类号:R692.4

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.09.022

文章编号:1006-1959(2022)09-0087-04

Comparative Study of Claudin-14 Expression in Renal Tissues of Two Renal Calculi Models

YANG Heng^{1,2}, QIAN Biao^{1,2}, WANG Qin-zhang¹, HAO Zhi-qiang^{1,2}, WANG Jing-shen^{1,2}, WANG Yuan^{1,2},

LI Yong-le^{1,2}, TAN Ming-hui^{1,2}, ZHENG Li-ying²

(1.Department of Urology,the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University,Shihezi 832008,Xinjiang,China;

2.Department of Urology,the First Affiliated Hospital of Gannan Medical College,Ganzhou 341000,Jiangxi,China)

Abstract: Objective To investigate the role of nanobacteria in the formation of renal calculi by observing the difference of Claudin-14 expression in two experimental rat renal calculi models. Methods A total of 90 male Wistar rats were randomly divided into nanobacteria group (NB group, rats were intragastrically administrated with NB +normal saline via tail vein), ethylene glycol group (EG group, rats were intragastrically administrated with 1% ethylene glycol drinking water and 2% ammonium chloride AC 2 ml for 2 weeks), and blank control group (NC group, rats were intragastrically administrated with normal saline via tail vein+normal saline). The blood and urine of rats were collected artificially for calcium concentration detection. The kidney tissues of rats were taken for stone composition analysis and immunohistochemical detection of Claudin-14 changes. Results Calcium oxalate stones in NB group and EG group accounted for 61.54% and 78.95% of the total stones, respectively. There was no significant difference in blood calcium and urine calcium between NB group and EG group within 1-10 weeks ($P>0.05$). The expression of Claudin-14 protein in EG group was significantly increased after 3 weeks, and the expression of Claudin-14 protein in NB group began to increase after 4 weeks; the expression of Claudin-14 protein in EG group was significantly stronger than that in NB group, but there was no significant change in NC group. Conclusion Nanobacteria are one of the reasons for the formation of stones. The formation of calcium oxalate crystals is not only involved in nanobacteria, but also in the cell pathway involved in Claudin-14, leading to the increase of urinary calcium and the formation of stones.

Key words: Kidney stones; Nanobacteria; Ethylene glycol; Rat kidney stone model; Claudin-14

Claudin 蛋白是构成机体内最主要的紧密连接功能分子,对紧密连接细胞旁通透性发挥决定性作用^[1],主要存在于上皮细胞、内皮细胞间的连接复合体中,可使相邻细胞膜紧靠在一起,形成围绕细胞的物理屏障结构,防止可溶性物质从细胞一侧扩散到另一侧^[2]。研究发现 Claudin-14 基因与肾结石、骨质疏松的发病密切相关,是肾结石的主要易感基因^[3]。本实验通过构建纳米细菌与乙二醇两种肾结石动物

模型,对检测到的 Claudin-14 蛋白进行系统分析,旨在从蛋白水平为肾结石病因学的解释寻找新的突破点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 自新疆医科大学实验动物中心购得 SPF 级 [合格证号 SCXK (新)2013-0001],6 周龄左右,体重(200±20)g,Wistar 雄性大鼠 90 只,实验动物饲养于新疆地方与民族高发病教育部重点实验室,并通过福利伦理委员会审查。动物伦理审查证号:[2016]院伦审动实字(001)号(NO)A2016-001。

1.2 仪器及试剂 电子天平(LT1000B,江苏常熟市大量仪器有限责任公司)、全自动生化分析仪(Modual DPP,德国罗氏)、多功能光学显微镜及图像采集系统(BX40,日本 Olympus)、透射电镜(JEOL-1230 Electronics,日本 JEOL)、红外光谱自动分析仪

基金项目:1.国家自然科学基金项目(编号:82060135);2.赣南医学院重点课题项目(编号:ZD201909);3.石河子大学成果转化与技术推广项目(编号:CGZH201810)

作者简介:杨恒(1993.10-),男,湖北孝感人,硕士研究生,主要从事泌尿系结石研究

通讯作者:郑丽英(1982.8-),女,山东东营人,硕士,副主任医师,主要从事泌尿系结石研究

(LIIR-20,天津蓝莫德)。纳米细菌悬浊液^[4]、0.9%生理盐水、1.25%乙二醇饮水、1%氯化铵、兔抗Claudin-14抗体(Santa Cruz,美国)、山羊抗兔二抗IgG(Santa Cruz,美国)等。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立 90只大鼠按随机数表法,随机分为空白对照组(NC组,30只,大鼠尾静脉注射生理盐水+生理盐水灌胃2周)、纳米细菌组(NB组,30只,大鼠尾静脉注射NB+生理盐水灌胃2周)、乙二醇组(EG组,30只,大鼠尾静脉注射生理盐水+1.25%乙二醇饮水和2%氯化铵2 ml/d灌胃2周)。标准饲料饲养,饮用自来水。

1.3.2 标本采集及检测 处死大鼠前1 d用代谢笼收集大鼠24 h尿液,全自动生化分析仪检测尿钙。取材前将大鼠用10%水合氯醛腹腔内注射麻醉,剂量为4 ml/kg;待肌肉松弛后,取腹部正中切口,打开腹部暴露肾脏及下腔静脉,抽取静脉血3~4 ml,行血钙生化检测,切取双侧肾组织,冲洗后快速冰冻保存,用粗针头挑取肾脏冠状剖面附近组织约0.5 g,烘干后采用红外光谱自动分析仪进行结石成分分析。

1.3.3 免疫组化检测 Clanudin-14蛋白表达 取病理鉴定模型成功的另一部分肾脏用于做免疫组化。免疫组化采用SP法,石蜡包埋后切片4 μm ,常规脱蜡, H_2O_2 处理清除内源性过氧化物酶,枸橼酸缓冲液抗原修复,血清封闭。滴加Clanudin-14抗体(1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,滴加二抗,DAB显微镜下控制显色,苏木素复染,不同浓度酒精和二甲苯脱水,树胶封片,显微镜下观察1~10周三组Wistar雄性大鼠肾脏Clanudin-14免疫组织化学染色情况。

1.4 统计学分析 使用SPSS 22.0统计学软件进行分析,血、尿钙离子浓度用($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较使用两独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结石成分分析 红外光谱自动分析仪成分分析,NB组含草酸钙结石占总结石数的61.54%,EG组达到78.95%,表明两种肾结石动物模型主要成分均为草酸钙,见表1。

2.2 血钙、尿钙检测 1~10周内,NB组与EG组血钙、尿钙浓度较NC组涨幅明显,NB组与EG组血钙、尿钙含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表2、表3。

表1 三组大鼠结石成分分析占比[n(%)]

组别	n	草酸钙结石	磷酸镁铵结石	草酸钙+磷酸钙结石	草酸钙+磷酸镁铵结石	磷酸钙结石	尿酸结石	检出率
NC组	30	1(3.30)	1(3.30)	/	/	/	/	2(6.60)
NB组	30	3(10.00)	3(10.00)	3(10.00)	2(6.70)	1(3.30)	1(3.30)	13(43.30)
EG组	30	7(23.30)	1(3.30)	5(16.70)	3(10.00)	3(10.00)	/	19(63.30)

表2 三组大鼠血钙对比($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	n	时间(周)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NC	30	2.34 \pm 0.16	2.39 \pm 0.11	2.54 \pm 0.13	2.49 \pm 0.10	2.47 \pm 0.16	2.10 \pm 0.05	2.20 \pm 0.09	2.35 \pm 0.03	2.32 \pm 0.04	2.42 \pm 0.27
NB	30	2.39 \pm 0.09	2.36 \pm 0.21	2.52 \pm 0.07	2.44 \pm 0.22	2.41 \pm 0.18	2.41 \pm 0.09	2.43 \pm 0.07	2.35 \pm 0.13	2.37 \pm 0.08	2.45 \pm 0.10
EG	30	2.46 \pm 0.11 [#]	2.52 \pm 0.09 [#]	2.56 \pm 0.05 [#]	2.63 \pm 0.04 [#]	2.81 \pm 0.14 [#]	2.68 \pm 0.08 [#]	2.67 \pm 0.11 [#]	2.66 \pm 0.12 [#]	2.53 \pm 0.11 [#]	2.87 \pm 0.03 [#]
t		0.199	1.273	0.586	0.881	0.401	0.038	1.908	0.569	0.152	0.280
P		0.852	0.272	0.589	0.427	0.708	0.971	0.129	0.600	0.886	0.793

注:与NB组比较,[#] $P>0.05$

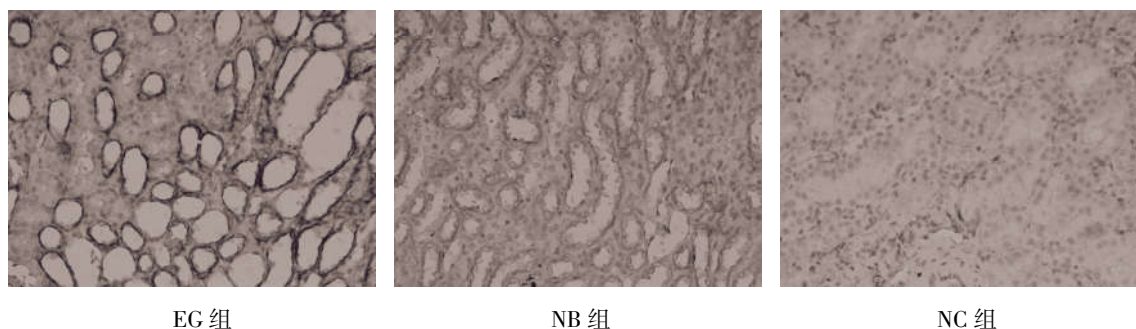
表3 三组大鼠尿钙比较($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	n	时间(周)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NC	30	1.11 \pm 0.16	1.00 \pm 0.05	1.59 \pm 0.27	2.22 \pm 0.16	2.15 \pm 0.30	2.04 \pm 0.37	2.22 \pm 0.34	2.19 \pm 0.44	1.92 \pm 0.20	2.01 \pm 0.21
NB	30	1.23 \pm 0.30	1.60 \pm 0.58	2.24 \pm 0.52	2.64 \pm 1.34	3.07 \pm 0.66	3.09 \pm 1.12	3.14 \pm 0.82	2.67 \pm 0.47	2.29 \pm 0.41	2.14 \pm 0.26
EG	30	1.09 \pm 0.07 [*]	1.13 \pm 0.09 [*]	1.60 \pm 0.25 [*]	2.00 \pm 0.78 [*]	2.35 \pm 0.52 [*]	2.35 \pm 0.18 [*]	2.20 \pm 0.28 [*]	1.98 \pm 0.26 [*]	1.88 \pm 0.04 [*]	2.08 \pm 0.15 [*]
t		0.811	1.396	1.909	0.710	1.497	1.130	1.880	2.260	1.740	0.369
p		0.463	0.235	0.129	0.517	0.209	0.322	0.133	0.087	0.157	0.731

注:与NB组比较,^{*} $P>0.05$

2.3 各组大鼠肾组织 Claudin-14 蛋白免疫组化检查结果 Claudin-14 在 EG 组和 NB 组大鼠肾组织中有持续表达,而在 NC 组大鼠肾组织中未见显著表达;第3周后,EG 组 Claudin-14 蛋白的表达较 NC

组增强;第4周后,NB 组 Claudin-14 蛋白的表达也开始增强,且弥漫分布在肾小管上皮细胞的细胞膜上,呈棕褐色;EG 组不同时间 Claudin-14 蛋白的表达较 NB 组强,且随时间增加而增强,见图1。



EG 组

NB 组

NC 组

图1 三组 Wistar 雄性大鼠肾脏组织 Claudin-14 的阳性表达(免疫组化×200)

3 讨论

泌尿系结石是泌尿外科的常见病,其中以肾结石和输尿管结石最为普遍^[5,6],结石成分分析显示其中草酸钙结石占泌尿系含钙结石的绝大多数^[7,8]。本研究利用两种手段构造 Wistar 大鼠肾结石模型,其中乙二醇与氯化铵^[9]这一经典造模方式已得到广泛认可;另外,本课题组前期利用纳米细菌已成功构造肾结石动物疾病模型^[4]。红外光谱自动分析仪成分分析显示,NB 组含草酸钙结石占总结石数的 61.54%,EG 组达到 78.95%,表明两种肾结石动物模型主要成分均为草酸钙。

研究表明^[10,11],肾结石的发生与炎症反应有关。草酸钙结晶与肾小管上皮结合位点结合^[12]的同时伴随着巨噬细胞的大量聚集、中性粒细胞“氧化爆发”、氧自由基以及炎症因子释放增加等,提示草酸钙晶体的形成与肾小管上皮细胞炎症反应有关。同时肾小管上皮细胞的损伤又为晶体的粘附提供场所,如此恶性循环,进而加剧形成结石的可能性^[13]。氧自由基和中性粒细胞介导局部炎症反应不仅导致肾小管上皮细胞损伤,还可致肾小球及肾小管周围毛细血管损伤,使肾小管上皮细胞缺乏氧气及营养,进而细胞发生变形坏死^[14]。

肾小管上皮细胞的损伤最终导致钙离子调节失衡,尿液中过饱和钙离子是形成结石的重要危险因素。本研究对大鼠血液、尿液中钙离子进行定量分析,结果显示 1~10 周内,NB 组与 EG 组血钙、尿钙浓度较 NC 组涨幅明显,NB 组与 EG 组血钙、尿钙含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),即 NB 在升高体液钙离子含量方面与国际上公认的乙二醇、氯化铵诱导肾结石形成方面相比差异不明显,从而进一步肯定纳米细菌的成石效能。

尿钙水平升高,激活近曲小管钙感受器^[15],进而机体调钙蛋白代偿性表达增加。紧密连接蛋白

(Claudins)是相邻连接复合体的成分之一,属于不通透连接,可限制旁细胞通路转运和相邻细胞间跨上皮细胞溶质与物质的运动^[16]。在肾脏中,Claudins 决定沿着肾小管的不同肾单位片段的渗透性和选择性。在髓袢升支粗段,Claudins 对钙的重吸收是非常重要的,并受到钙敏感受体的严格调控^[17,18]。Claudin-14 作为紧密连接蛋白家族的一员,是构成 TAL 细胞旁途径的重要组成蛋白^[19]。有研究显示^[20],在给予 Claudin-11/Claudin-14 双基因敲除小鼠高钙饮食时,小鼠出现了高镁血症、低镁尿症,尿钙未出现增高反而降低,这提示 Claudin-14 可能在肾脏钙离子的排泄过程中发挥重要作用。本研究对 3 组大鼠肾脏进一步进行免疫组化检测,发现 EG 组大鼠肾组织的 Claudin-14 从第 3 周开始表达强度逐渐增强;NB 组大鼠肾组织的 Claudin-14 从第 4 周开始表达强度增强;NC 组各周肾组织中 Claudin-14 未见明显表达。

综上所述,纳米细菌作为形成肾结石的原因之一,参与了草酸钙晶体的形成,肾小管上皮细胞受损,诱导炎症反应。钙离子调节失衡导致 Claudin-14 表达增加,尿钙升高,最终导致结石的发生。

参考文献:

- [1] Claesson-Welsh L, Dejana E, McDonald DM. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies[J]. Trends in Molecular Medicine, 2021, 27(4): 314-331.
- [2] Nagpal R, Yadav H. Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview [J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2017, 71(1): 11-16.
- [3] Arcidiacono T, Simonini M, Lanzani C, et al. Claudin-14 Gene Polymorphisms and Urine Calcium Excretion [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2018, 13(10): 1542-1549.
- [4] 褚浩,王勤章,吴双,等. 纳米细菌大鼠肾结石模型肾脏结石形成时间的动态研究 [J]. 中国全科医学, 2017, 20 (21): 2613-2618.

(下转第 115 页)

(上接第 89 页)

- [5]江帆,闫亮.河南地区 345 例泌尿系结石临床分析[J].河南外科学杂志,2019,25(2):42-44.
- [6]杨军.间苯三酚治疗急诊泌尿系结石致肾绞痛的效果[J].中国药物经济学,2018,13(5):44-46.
- [7]Ye Z,Zeng G,Yang H,et al.The status and characteristics of urinary stone composition in China[J].BJU Int,2020,125(6):801-809.
- [8]Grant C,Guzman G,Stainback RP,et al.Variation in Kidney Stone Composition Within the United States [J].Journal of endourology,2018,32(10):973-977.
- [9]杨博.52-Hz 小分子团水对乙二醇诱导的大鼠肾结石的预防作用及其机制的研究[D].重庆:第三军医大学,2016.
- [10]刘兆飞,黄永斌,张海涛,等.低压灌注超声碎石清石治疗感染性肾结石 42 例疗效观察[J].中国微创外科杂志,2017,17(6):568-570.
- [11]李天,孙祥宙,盛明,等.输尿管软镜负压鞘在输尿管软镜治疗感染性肾结石术中的应用[J].实用医学杂志,2018,34(1):79-82.
- [12]余骏川,邓耀良,黎承杨,等.羟基磷灰石对人肾小管上皮细胞骨桥蛋白表达的影响及机制探讨[J].山东医药,2017,57(14):6-9.
- [13]曾春晖,李先梅,蔡妮娜,等.草酸钙型肾结石小鼠模型的研究[J].世界中医药,2016,11(11):2213-2215.
- [14]王敬坤,郝志强,杨恒,等.氧自由基在纳米细菌致肾结石形成过程中的作用[J].吉林医学 2020,41(9),2053-2057.
- [15]崔庆鹏,刘孝东,范世成,等.沉默钙感受体对大鼠尿钙排泄影响及对紧密连接蛋白 14 的作用 [J]. 实用医学杂志 2020,36(14):1882-1885,1891.
- [16]吴昆旻,李泽卿,朱春晖,等.紧密连接蛋白在声带白斑伴咽喉反流患者声带黏膜中的表达[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2017,23(6):541-545.
- [17]Nasim F,Sabath BF,Eapen GA.Lung cancer [J].Med Clin North Am,2019,103(3):463-473.
- [18]Liu S,Zhao Z,Wang D,et al.Decreased FOXF1 promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis, invasion, and stemness and is associated with poor clinical outcome [J].Oncotargets&Therapy,2016,9(1):1743-1752.
- [19]Argyrou A,Legaki E,Koutserimpas C,et al.Risk factors for gastroesophageal reflux disease and analysis of genetic contributors[J].World J Clin Cases,2018,6(8):176-182.
- [20]Elkouby NL,Abassi Z,Lagziel A,et al.Double gene deletion reveals lack of cooperation between claudin 11 and claudin 14 tight junction proteins [J].Cell and tissue research,2008,333(3):427-438.

收稿日期:2021-07-16;修回日期:2021-08-25

编辑/肖婷婷