

化学纯三聚氰胺膀胱结石大鼠模型的研究

陈嘉^{1†}, 邹移海^{1†}, 张薇², 陈苑¹, 张永斌¹, 金鹏飞³, 孙京臣³

(1 广州中医药大学实验动物中心, 广东 广州 510405; 2 中山大学实验动物中心, 广东 广州 510080; 3 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:为了探讨三聚氰胺形成泌尿系结石机理, 进行化学纯三聚氰胺膀胱结石大鼠模型的研究. SD大鼠(以下简称大鼠)分别给予0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 g/(kg·d)剂量的化学纯三聚氰胺灌胃. 溶媒对照组用10 g/L甲基纤维素溶液5 mL/(kg·d)灌胃, 无菌水对照组用无菌水5 mL/(kg·d)灌胃. 在灌胃20、30和40 d, 每组各取10只大鼠(雌雄各半)剖检. 结果表明, 三聚氰胺灌胃大鼠, 会影响其体质量的增长, 部分大鼠形成膀胱结石(膀胱结石形成率最高为40%, 雄性大鼠多见).

关键词:三聚氰胺; 膀胱结石; 模型; 动物

中图分类号: R33

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)03-0081-04

Studies on Rat Bladder Stone Model Caused by Chemical Pure Reagent of Melamine

CHEN Jia^{1†}, ZOU Yi-hai^{1†}, ZHANG Wei², CHEN Yuan¹,
ZHANG Yong-bin¹, JIN Peng-fei³, SUN Jing-chen³

(1 Laboratory Animal Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2 Laboratory Animal Center, Zhongshan University, Guangzhou 510080, China;

3 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To investigate the mechanism of melamine urinary stone, the rat bladder stone model caused by chemical pure reagent of melamine were researched. Rats were fed 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 g/(kg·d) chemical pure reagent of melamine. Vehicle control group was fed 10 g/L methyl cellulose solution 5 mL/(kg·d), sterile water control group was fed sterile water 5 mL/(kg·d). In the administration of 20, 30 and 40 d, ten rats from each group (half male and half female) were examined post-mortem. Melamine would affect the growth of rat body mass, some rats had formed bladder stones (bladder stone formation rate was up to 40%, male rats were more common).

Key words: melamine; bladder stones; model; animal

2008年9月我国爆发三鹿牌婴幼儿奶粉事件^[1-4], 数以万计的婴幼儿食用了含有三聚氰胺的毒奶粉而患上泌尿系结石. 毒奶粉对婴幼儿的危害有多大及后遗症如何, 三聚氰胺形成泌尿系结石机理等相关的研究亟待开展. 设计和建立尿结石模型是

尿结石基础与临床研究的重要一环, 传统的尿结石动物模型主要有肾草酸钙结石模型、肾磷酸钙结石模型、尿酸及尿酸盐结石模型、磷酸镁铵结石模型等^[5]. 为了阐明三聚氰胺泌尿系结石的机理、临床治疗、药物筛选, 需进行三聚氰胺泌尿系结石动物模型

收稿日期: 2010-01-04

作者简介: 陈嘉(1975—), 女, 助理研究员, 博士; 邹移海(1950—), 男, 教授; †对本文贡献相同; 通信作者: 孙京臣(1971—), 男, 副教授, 博士, E-mail: cyfz@scau.edu.cn

基金项目: 国家973计划(2005CB523502); 广东省科技计划项目(2009B060300003); 广州市科技计划项目(2009J1-C461)

的研究. 我们此前研究发现^[6-7], 以 0.5 ~ 2.5 g/kg 剂量的工业原料三聚氰胺连续灌胃大鼠 20 d, 有部分大鼠出现膀胱结石, 但工业原料三聚氰胺杂质较多, 不利于结石成分的分析, 也不利于确定规范化造模方法, 我们拟进行化学纯三聚氰胺大鼠膀胱结石模型的研究, 筛选出给药剂量较小、给药时间较短、成模率高、对肾脏损害小的三聚氰胺膀胱结石模型造模方法. 该模型既可用于三聚氰胺尿结石的机理研究, 为临床治疗提供基础条件; 又可作为尿结石模型的补充.

1 材料与方法

1.1 材料

三聚氰胺(上海国药集团化学试剂有限公司, 化学纯, 批号 20081016, 纯度 ≥ 99.0%). 甲基纤维素(广州器化医疗设备有限公司进口分装). SPF 级 SD 大鼠(以下简称大鼠)360 只, 雌雄各半, 体质量 180 ~ 220 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供(许可证号: SCXK(粤)2008-0020). 动物试验在广州中医药大学实验动物中心屏障环境动物实验设施中进行(许可证号: SYXK(粤)2008-0001).

1.2 方法

1.2.1 分组与造模 随机将大鼠分成 12 组, 每组 30 只, 雌雄各半. 其中, 10 个组每组大鼠分别给予 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 g/(kg · d) 剂量的三聚氰胺灌胃. 溶媒对照组用 10 g/L 甲基纤维素溶液 5 mL/(kg · d) 灌胃, 无菌水对照组用无菌水 5 mL/(kg · d) 灌胃. 在灌胃 20、30 和 40 d, 每组取 10 只大鼠(雌雄各半)剖检.

1.2.2 观察指标 在连续灌胃 20、30 和 40 d, 每组取 10 只大鼠(雌雄各半), 禁食 12 h, 称量动物体质量, 麻醉处死, 解剖肾脏、输尿管和膀胱, 称量肾脏和膀胱质量, 计算脏器指数. 剖开膀胱, 使用日本 Olympus 体视显微镜系统进行镜下观察, 拍摄照片直接在电脑中显示和储存.

1.2.3 数据处理与统计分析 试验数据采用 SPSS11.0 软件进行统计分析, 检验试验数据的正态分布性, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 并进行 Duncan's 多重比较, 试验结果以平均值 ± 标准误差表示.

2 结果与分析

2.1 试验动物体质量变化

由表 1 可见, 灌胃 20 d 时, 灌胃三聚氰胺的 10

个组的动物体质量增加均减慢, 其中 0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、0.9、1.0 g/(kg · d) 剂量组体质量增加显著减慢, 可见灌胃三聚氰胺对大鼠体质量造成一定的影响, 表现为体质量增加减慢. 灌胃 30 d 时, 各组动物体质量增加无显著性差异, 可能是动物机体自身调节平衡作用. 灌胃 40 d 时, 主要表现为高剂量组(0.5 ~ 1.0 g/(kg · d))动物体质量增加减慢, 提示随着时间的增加, 较大剂量三聚氰胺在体内积聚, 超出了动物的排泄能力, 对动物机体造成了影响. 而在试验过程中, 高剂量组(0.8 ~ 1.0 g/(kg · d))分别有 1 只、1 只、3 只动物死亡, 经解剖动物排除了由于灌胃不当造成的死亡, 可能是三聚氰胺在体内积聚, 导致泌尿系统及其他系统功能异常, 进而导致动物死亡.

表 1 不同剂量三聚氰胺灌胃后大鼠体质量增加情况¹⁾
Tab. 1 Increasing body mass of rats by different doses of melamine g

三聚氰胺剂量/ (g · kg ⁻¹ · d ⁻¹)	20 d	30 d	40 d
0.1	63.0 ± 1.0a	96.7 ± 9.7 a	105.9 ± 9.3a
0.2	42.2 ± 8.0b	94.7 ± 7.3a	155.1 ± 3.6b
0.3	35.7 ± 6.2b	86.1 ± 9.2a	114.9 ± 9.7ab
0.4	40.4 ± 2.7b	91.1 ± 9.7a	114.8 ± 9.0ab
0.5	52.8 ± 7.0a	86.3 ± 9.1a	67.8 ± 1.1a
0.6	50.0 ± 5.1ab	84.3 ± 5.7a	24.9 ± 1.3b
0.7	61.7 ± 8.3a	81.6 ± 6.9a	21.8 ± 5.2b
0.8	30.0 ± 5.6b	77.7 ± 8.3a	58.4 ± 3.6a
0.9	45.7 ± 1.8ab	97.1 ± 1.5a	59.3 ± 3.1a
1.0	36.9 ± 1.3b	97.2 ± 9.6a	48.5 ± 2.5ab
10 g/L 甲基纤维素溶液 ²⁾	71.7 ± 1.8a	95.2 ± 8.4a	90.0 ± 3.30 a
无菌水 ²⁾	74.3 ± 3.4a	90.7 ± 1.1 a	83.3 ± 4.24 a

1) 表中数据为平均值 ± 标准误, 同列数据后凡有一个相同字母者示差异不显著 ($P > 0.05$, Duncan's 法); 20 d, 1.0 g/(kg · d) 剂量组 $n = 9$; 40 d, 0.8 g/(kg · d) 剂量组 $n = 9$; 0.9 g/(kg · d) 剂量组 $n = 9$; 1.0 g/(kg · d) 剂量组 $n = 8$; 其余 $n = 10$; 2) 剂量为 5 mL/(kg · d).

2.2 大鼠膀胱结石的形成

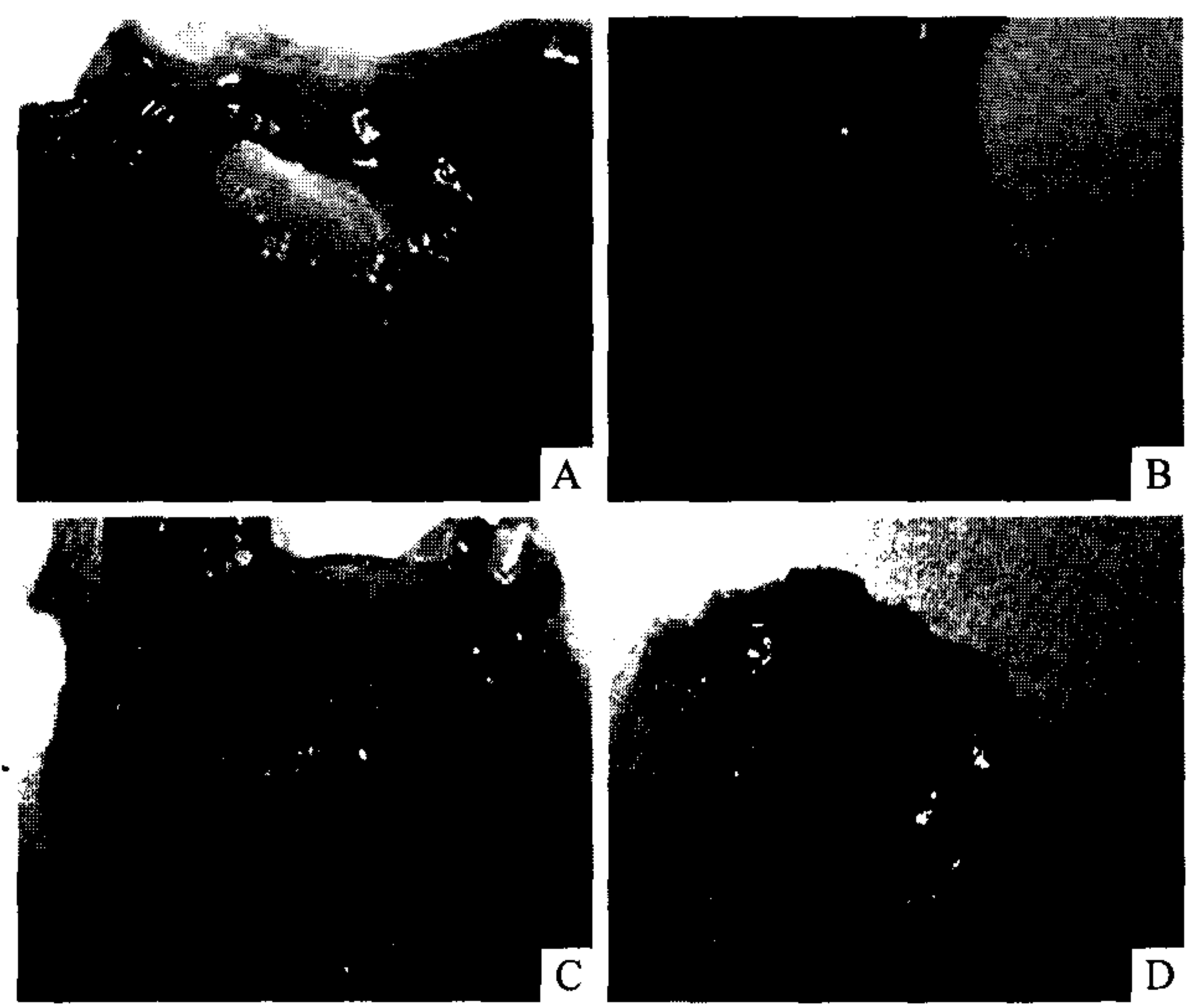
通过体视显微镜系统的观察, 有部分动物形成膀胱结石(如图 1-A、图 1-B), 从统计结果(表 2)看, 以 0.5 g/(kg · d) 剂量组(30 和 40 d)、0.7 g/(kg · d) 剂量组(30 d)和 0.9 g/(kg · d) 剂量组(30 d)形成膀胱结石比例最高(均为 4 例/10 例), 且均为雄性大鼠. 其他膀胱结石约 95% 在雄性大鼠体内, 这和临床泌尿系结石多发在男性病人身上的情况相符, 主要是男性尿道长而窄, 结石不易排出, 而女性尿道短而宽, 不易形成结石. 而无菌水对照组及溶媒对照组

30 d 组各出现 2 例膀胱结石(如图 1-C),但结石大小明显比模型组小,提示大鼠也有自发膀胱结石的情况,其他并未见膀胱结石发生(如图 1-D).

表 2 不同剂量三聚氰胺灌胃后大鼠膀胱结石形成统计
Tab.2 The showing number of rat bladder stone cases by different doses of melamine

三聚氰胺剂量 (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	20 d		30 d		40 d	
	例数	结石例数	例数	结石例数	例数	结石例数
0.1	10	3	10	1	10	2
0.2	10	0	10	1	10	1
0.3	10	0	10	1	10	1
0.4	10	3	10	2	10	1
0.5	10	1	10	4	10	4
0.6	10	2	10	1	10	3
0.7	10	2	10	4	10	3
0.8	10	2	10	1	9	0
0.9	10	2	10	4	9	0
1.0	9	1	10	3	8	1
10 g/L 甲基纤维素溶液 ¹⁾	10	0	10	2	10	0
无菌水 ¹⁾	10	0	10	2	10	0

1) 剂量为 5 mL/(kg·d).



A:0.5 g/(kg·d) 剂量三聚氰胺灌胃 30 d 大鼠膀胱结石;B:0.5 g/(kg·d) 剂量三聚氰胺灌胃 40 d 大鼠膀胱结石;C:无菌水对照组 30 d 膀胱结石;D:无菌水对照组 30 d 膀胱.

图 1 体视显微镜下观察大鼠膀胱情况(×10)

Fig.1 Observation of rat bladder under the stereomicroscope

2.3 肾脏膀胱脏器系数

由表 3 可见,灌胃 20 d 时,0.7~1.0 g/(kg·d) 剂量组肾脏明显肿胀,肾脏脏器系数显著性增加.0.6、0.8~1.0 g/(kg·d) 剂量组膀胱脏器系数显著性增加.灌胃 30 d 时,0.7~1.0 g/(kg·d) 剂量组肾脏明显肿胀,肾脏脏器系数显著性增加.0.5~0.8、1.0 g/(kg·d) 剂量组膀胱脏器系数显著性增加.灌胃 40 d 时,0.9、1.0 g/(kg·d) 剂量组肾脏明显肿

胀,肾脏脏器系数显著性增加.结果提示较高剂量三聚氰胺[0.7~1.0 g/(kg·d)]灌胃大鼠,超出了大鼠的排泄能力,导致三聚氰胺在肾脏内积聚,引发肾脏肿胀,脏器系数增加.

表 3 不同剂量三聚氰胺灌胃后大鼠脏器系数¹⁾
Tab.3 Organ coefficient of rats by different doses of melamine

三聚氰胺剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	% 20 d		
	左肾	右肾	膀胱
0.1	0.333±0.015a	0.342±0.018a	0.045±0.011a
0.2	0.318±0.048a	0.335±0.052a	0.038±0.007a
0.3	0.334±0.047a	0.343±0.047a	0.035±0.005a
0.4	0.343±0.050a	0.359±0.060a	0.043±0.007a
0.5	0.325±0.002a	0.343±0.008a	0.043±0.013a
0.6	0.401±0.080a	0.431±0.071a	0.050±0.016ab
0.7	0.486±0.101b	0.468±0.104b	0.046±0.013a
0.8	0.418±0.103ab	0.448±0.103ab	0.048±0.008ab
0.9	0.526±0.071b	0.515±0.101b	0.064±0.017b
1.0	0.509±0.024b	0.521±0.043b	0.067±0.014b
10 g/L 甲基纤维素溶液 ²⁾	0.345±0.025a	0.358±0.027a	0.043±0.009a
无菌水 ²⁾	0.336±0.021a	0.355±0.018a	0.038±0.009a

三聚氰胺剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	% 30 d		
	左肾	右肾	膀胱
0.1	0.333±0.026a	0.345±0.028a	0.035±0.006a
0.2	0.319±0.025a	0.331±0.032a	0.036±0.007a
0.3	0.336±0.023a	0.350±0.022a	0.036±0.006a
0.4	0.349±0.021a	0.357±0.072a	0.042±0.015a
0.5	0.349±0.048a	0.373±0.050a	0.048±0.011b
0.6	0.367±0.055a	0.390±0.063a	0.048±0.013ab
0.7	0.391±0.057ab	0.401±0.071ab	0.052±0.018b
0.8	0.436±0.096b	0.443±0.081b	0.047±0.010ab
0.9	0.454±0.025b	0.437±0.092b	0.041±0.006a
1.0	0.414±0.053b	0.442±0.065b	0.057±0.013b
10 g/L 甲基纤维素溶液 ²⁾	0.330±0.024a	0.340±0.023a	0.032±0.007a
无菌水 ²⁾	0.324±0.040a	0.330±0.097a	0.036±0.007a

三聚氰胺剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	% 40 d		
	左肾	右肾	膀胱
0.1	0.311±0.026a	0.314±0.023a	0.037±0.009a
0.2	0.328±0.027a	0.334±0.020a	0.036±0.006a
0.3	0.312±0.018a	0.259±0.045a	0.073±0.009a
0.4	0.322±0.028a	0.331±0.021a	0.039±0.001a
0.5	0.352±0.051a	0.372±0.063a	0.055±0.011a
0.6	0.344±0.066a	0.339±0.034a	0.048±0.015a
0.7	0.368±0.049a	0.379±0.037a	0.052±0.016a
0.8	0.369±0.085a	0.374±0.093a	0.056±0.018a
0.9	0.416±0.089b	0.440±0.021b	0.065±0.023a
1.0	0.431±0.085b	0.423±0.076b	0.055±0.008a
10 g/L 甲基纤维素溶液 ²⁾	0.335±0.039a	0.337±0.032a	0.035±0.004a
无菌水 ²⁾	0.321±0.014a	0.326±0.021a	0.034±0.007a

1) 脏器系数=脏器质量/体质量×100%,表中数据为平均值±标准误,同列数据后凡有一个相同字母者示差异不显著(P>0.05,Duncan's 法);20 d,1.0 g/(kg·d) 剂量组 n=9;40 d,0.8 g/(kg·d) 剂量组 n=9,0.9 g/(kg·d) 剂量组 n=9,1.0 g/(kg·d) 剂量组 n=8;其余 n=10;2) 剂量为 5 mL/(kg·d).

3 讨论

通过本次试验证实三聚氰胺灌胃大鼠能造成膀胱结石,推断三聚氰胺尿结石形成机制符合尿结石形成学说中的过饱和结晶学说^[5]、游离颗粒和固定颗粒成石学说^[5]。连续给药导致大量三聚氰胺进入肾脏后,超出了肾脏的排泄能力,三聚氰胺形成难溶结晶体,成为尿结石核心。根据三聚氰胺尿结石成分主要是三聚氰胺和尿酸的检测结果^[8-9]推断,三聚氰胺结晶体继而与尿酸结合,形成三聚氰胺尿酸结石。

虽然国内外学者发现三聚氰胺可诱发大鼠和小鼠膀胱结石,但对结石模型进行规范化造模方法研究较少,且存在造模时间过长(36周),饲料喂饲造成给药剂量不均一等问题^[8,10-12]。本试验分别以0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 g/(kg·d)剂量的化学纯三聚氰胺灌胃大鼠20、30、40 d,通过动物体重变化、膀胱结石形成情况、肾脏脏器系数等指标来初步筛选化学纯三聚氰胺大鼠膀胱结石造模的最佳途径。结果显示三聚氰胺灌胃大鼠能造成膀胱结石,但结石发生率并不高(约40%),而且结石的比例亦无剂量反应关系,估计是动物样本例数不够所致(结石多发生在雄性动物,而每组只有5只雄性动物)。三聚氰胺灌胃大鼠影响体质量的增加,但随着时间的推移(30 d)大鼠体质量增加水平与对照组持平,但较高剂量三聚氰胺灌胃会导致大鼠死亡,而且肾脏脏器指数增加。脏器系数(脏器指数)的变化常可较好地反映化学毒物对该脏器的毒性综合情况,可旁证病理组织学改变的可能性,也是寻找毒物作用靶器官的重要线索^[13];脏器指数下降表示萎缩、退行性变化;脏器指数加大,可能是充血、水肿、增生肥大性变化等病变。通过本试验,我们推断,以0.5 g/(kg·d)剂量的化学纯三聚氰胺灌胃雄性大鼠30 d,是一种比较理想的三聚氰胺膀胱结石大鼠模型造模方法。三聚氰胺泌尿系结石的机理还有待进一步试验研究。

参考文献:

- [1] DING Jie. Childhood urinary stones induced by melamine-contaminated formula: How much we know, how much we don't know[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(8): 780-782.
- [2] 陈植, 张桂菊. 三聚氰胺致婴幼儿尿结石的诊断及鉴别诊断[J]. *中国社区医师*, 2008, 24(20): 11-17.
- [3] 蒋也平, 樊剑锋, 周楠, 等. 三聚氰胺致婴幼儿尿结石的治疗与预后[J]. *中国社区医师*, 2008, 24(20): 12.
- [4] GUAN N, FAN Q, DING J, et al. Melamine-contaminated powdered formula and urolithiasis in young children[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360: 1067-1074.
- [5] 叶章群, 邓耀良, 董诚. 泌尿系结石[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 7-109.
- [6] 邹移海, 张薇, 张钟广, 等. 三聚氰胺诱发SD大鼠尿结石初步观察[J]. *广州中医药大学学报*, 2009, 26(1): 95-101.
- [7] 邹移海, 张薇, 徐志伟, 等. 三聚氰胺泌尿系统结石大鼠模型的研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(7): 5-10.
- [8] OGASAWARA H, IMAIDA K, ISHIWATA H, et al. Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats: correlation between carcinogenicity and urolith formation[J]. *Carcinogenesis*, 1995, 16(11): 2773-2777.
- [9] BALAJI K C, MENON M. Mechanism of stone formation[J]. *Urol Clin North Am*, 1997(24): 1.
- [10] OKUMURA M, HASEGAWA R, SHIRAI T, et al. Relationship between calculus formation and carcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the non-genotoxic agents thymine or melamine[J]. *Carcinogenesis*, 1992, 13(6): 1043-1045.
- [11] MELNICK R L, BOORMAN G A, HASEMAN J K, et al. Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1984, 72(2): 292-303.
- [12] 崔雯, 朱珊珊, 张中文. 三聚氰胺对小鼠肾脏的影响及中药治疗试验[J]. *动物医学进展*, 2008, 29(12): 31-33.
- [13] 黄雅卿, 张文昌, 李煌元. 镉对雌性大鼠体重变化和卵巢脏器系数的影响[J]. *职业与健康*, 2003, 19(7): 6-9.

【责任编辑 柴 焰】