

分类号_____

论文编号_____

密 级_____

海军军医大学

硕士学位论文

SIRT3 调节坏死性凋亡在草酸钙肾结石形成中的作用及聚乙二醇的干预研究

The role of SIRT3 in regulating necrotic apoptosis in calcium oxalate kidney stone formation and the intervention of polyethylene glycol

研究生姓名： 万 洋 学 号： 20191194

指导教师： 高小峰 教授 海军军医大学第一附属医院

学科、专业： 外科学（泌尿外）

学位类型： 专业学位

答辩日期： 2022 年 5 月

二〇二三年五月

海军军医大学

硕士学位论文

SIRT3 调节坏死性凋亡在草酸钙肾结石形成中的作用及聚乙二醇的干预
研究

The role of SIRT3 in regulating necrotic apoptosis in calcium oxalate
kidney stone formation and the intervention of polyethylene glycol

研究生姓名： 万洋 学号： 20191194

指导教师： 高小峰 教授

学科、专业： 外科学（泌外）

学位类型： 专业学位

答辩委员会主席： 郑军华 上海交通大学医学院附属仁济医院

委员： 叶定伟 复旦大学附属肿瘤医院

傅强 上海交通大学附属第六人民医院

姚旭东 同济大学附属第十人民医院

王林辉 海军军医大学第一附属医院

任善成 海军军医大学第二附属医院

杨成华 海军军医大学第一附属医院

答辩日期： 2022年5月24日

二〇二二年五月

目 录

前言.....	1
第一部分 探究 SIRT3 过表达/敲除对乙醛酸诱导的草酸钙肾结石小鼠的肾组织坏死性凋亡、肾脏损伤以及肾脏晶体沉积的影响.....	3
前言.....	3
一、材料与方法.....	4
二、结果.....	9
三、讨论.....	10
第二部分 体外探究抑制细胞坏死性凋亡对肾小管上皮细胞表面晶体黏附的影响.....	12
引言.....	12
一、材料与方法.....	13
二、结果.....	18
三、讨论.....	24
第三部分 体外探究使用聚合物聚乙二醇对肾小管上皮细胞表面晶体黏附的影响.....	26
引言.....	26
一、材料与方法.....	26
二、结果.....	28
三、讨论.....	32
小结.....	34
参考文献.....	35
综述 泌尿系结石动物模型的现状.....	38
参考文献.....	44

摘 要

目的: 晶体在肾小管上皮细胞的黏附聚集是肾结石形成的重要步骤, 细胞损伤和晶体聚集可能是影响晶体在细胞表面黏附沉积的关键。SIRT3 在清除组织活性氧和减弱氧化应激损伤中起重要作用, 调节细胞坏死性凋亡可能是 SIRT3 发挥作用的重要途径, 而聚乙二醇具有分散剂的特性以及修复细胞的作用, 对晶体聚集可能有抑制作用。因此本课题拟探究 SIRT3 调节坏死性凋亡在草酸钙肾结石形成中的作用及探索聚乙二醇对晶体黏附聚集的干预研究。

方法: 第一部分采用 SIRT3 过表达、SIRT3 敲除及野生型 C57BL/6 雄性小鼠, 通过乙醛酸腹腔注射构建小鼠草酸钙肾结晶模型, 肾脏标本 HE 染色, SIRT3 免疫组化, Von Kossa 染色以及蛋白免疫电泳检测 SIRT3、p-MLKL 表达水平。

第二部分以小鼠肾小管上皮细胞 TCMK-1 为研究对象, 构建一水草酸钙刺激细胞为模型组, 预使用 RIPK3 抑制剂 GSK872 后加入一水草酸钙刺激作为抑制剂组, 以及加入等量 PBS 的对照组。观察表面晶体黏附情况, 检测细胞活力、细胞毒性、氧化应激水平, 以及蛋白质免疫印迹检测 RIPK1, RIPK3, p-MLKL 表达水平。

第三部分以活性氧刺激剂、PEG4000 及一水草酸钙多种组合刺激 TCMK-1, 检测细胞活力、细胞毒性及活性氧水平, 观测细胞状态及晶体黏附情况。

结果:

(1) 小鼠肾草酸钙晶体沉积诱发肾小管上皮细胞坏死性凋亡明显增加, SIRT3 过表达可以调节坏死性凋亡, 减轻晶体性肾损伤, 并减少肾脏晶体沉积。

(2) 体外研究表明, 当一水草酸钙晶体浓度在低水平 (6cm 培养皿 400ug/ml 以下) 时, 抑制细胞坏死性凋亡可以一定程度地减轻细胞损伤并减少细胞表面晶体黏附沉积。当一水草酸钙晶体浓度超过 800ug/ml 时, 细胞表面晶体聚集形成不定型沉淀, 减轻细胞坏死性凋亡细胞损伤不能减少晶体黏附沉积总量。

(3) 预使用聚合物 PEG4000 能够使悬液体系中晶体颗粒保持悬浮稳定状态, 并能够减轻细胞氧化应激损伤, 显著减少细胞表面晶体黏附沉积。

结论:

肾脏草酸钙晶体沉积涉及 RIPK3-MLKL 介导的坏死性凋亡, SIRT3 通过调节坏死性凋亡能够减轻晶体性肾损伤。体外研究表明减轻肾小管上皮细胞坏死性凋亡可以一定程度减少晶体黏附, 但较高的晶体负荷可在细胞表面黏附聚集形成不定型沉淀, 预使用聚合物 PEG4000 能够保持晶体颗粒悬浮稳定, 减轻细胞氧化应激损伤, 减少细胞晶体黏附。

关键词: 草酸钙结石, SIRT3, 坏死性凋亡, 聚乙二醇

Abstract

Objective:

The adhesion and aggregation of crystal in renal tubule epithelial cells is an important step in the formation of renal calculi, cell injury and crystal aggregation may be the key factors affecting the adhesion and deposition of crystal on cell surface. SIRT3 plays an important role in scavenging reactive oxygen species and attenuating oxidative stress injury in tissues, and regulating cell necrotic apoptosis may be an important way for SIRT3 to play its role, while polyethylene glycol has the properties of dispersant and repair cells, and may inhibit crystal aggregation. Therefore, this study intends to explore the role of SIRT3 in regulating necrotizing apoptosis in the formation of calcium oxalate kidney stones and explore the intervention of polyethylene glycol on crystal adhesion and aggregation.

Methods:

In the first part, SIRT3 overexpression, SIRT3 knockout and wild-type C57BL/6 male mice were used to construct mouse calcium oxalate renal crystal model by intraperitoneal injection of glyoxalic acid. The expression levels of SIRT3 and P-MLKL were detected by HE staining, SIRT3 immunohistochemistry, Von Kossa staining and protein immunoelectrophoresis in kidney samples.

In the second part, mouse renal tubular epithelial cells TCMK-1 were used as the research object to construct calcium oxalate monohydrate stimulated cells as the model group. RIPK3 inhibitor GSK872 was pre-treated with calcium oxalate monohydrate stimulated cells as the inhibitor group, and the control group was added with the same amount of PBS. The crystal adhesion on the surface was observed, cell viability, cytotoxicity and oxidative stress levels were detected, and the expression levels of RIPK1, RIPK3 and P-MLKL were detected by western blot.

In the third part, TCMK-1 was stimulated with a variety of combinations of reactive oxygen stimulant, PEG4000 and calcium oxalate monohydrate. Cell viability, cytotoxicity and reactive oxygen levels were detected, and cell status and crystal adhesion were observed.

Results:

(1) Mouse renal calcium oxalate crystal deposition induces significantly increased necrotic apoptosis of renal tubular epithelial cells. Overexpression of SIRT3 can regulate necrotic apoptosis, alleviate renal crystal injury, and reduce renal crystal deposition.

(2) In vitro studies showed that when the concentration of calcium oxalate monohydrate crystal was at a low level (below 400ug/ mL in a 6cm petri dish), inhibition of cell necrotic apoptosis could reduce cell damage and crystal adhesion deposition to a certain extent. When the concentration of calcium oxalate monohydrate crystals exceeded 800ug/ mL, the crystals on the cell surface gathered and formed amorphous precipitates, and the reduction of cell necrotic apoptotic cell damage could not reduce the total amount of crystal adhesion deposition.

(3) The pre-use of polymer PEG4000 can keep the crystal particles suspended in the suspension system in a stable state, and can reduce cell oxidative stress damage, significantly reduce the crystal adhesion deposition on the cell surface.

Conclusion:

Kidney calcium oxalate crystal deposition is involved in ripK3-MLKL-mediated necrotic apoptosis, and SIRT3 can alleviate crystalline kidney injury by regulating necrotic apoptosis. In vitro studies have shown that reducing the necrotic apoptosis of renal tubular epithelial cells can reduce crystal adhesion to a certain extent, but higher crystal load can adhere to the cell surface and aggregate to form amorphous precipitation. Pre-use of polymer PEG4000 can maintain the suspension stability of crystal particles, reduce cell oxidative stress damage, and reduce cell crystal adhesion.

Keywords: Calcium oxalate stone, SIRT3, necrotic apoptosis, polyethylene glycol

缩略词表

Abbreviations

缩写	英文全称	中文全称
SIRT3	sirtuin-3	去乙酰化酶 3
RIPK1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1	受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1
RIPK3	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3	受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein	混合谱系激酶结构域样蛋白
TCMK-1	Transformed C3H Mouse Kidney-1	小鼠近端小管细胞系-1
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
DAMPs	Damage-associated molecular pattern	损伤相关分子模式
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
OPN	Osteopontin	骨桥蛋白
HA	Hyaluronic acid	透明质酸
AKI	Acute kidney injury	急性肾损伤
IFN	Interferon	干扰素
TLR	Toll-like receptors	Toll 样受体
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
CIRF	Clinically Insignificant Residual Fragment	临床无意义残余结石碎片

前 言

肾结石是泌尿系统常见病，复发率高。在全球范围内，约 12% 的人在一生中会患肾结石，且患病率仍在逐年上升；在中国，肾结石的总体患病率高达 6.4%^[1]。肾结石可导致反复的尿路感染、血尿、尿路梗阻，甚至尿脓毒症和尿毒症，对患者的健康造成极大危害。由于肾结石的发病机制尚不清楚，主要的治疗方法仍然是微创手术^[2-3]。由于缺乏良好的预防措施，肾结石的复发率可在 5-10 年内高达 50%^[4]。许多患者需要接受多次手术治疗，这给国家带来了巨大的医疗费用和无法估量的经济损失。因此，迫切需要研究肾结石的发病机制，为其防治提供新的理论依据。草酸钙结石是最常见的结石成分，约占肾结石的 80%。

肾结石的病因复杂，影响因素很多。其形成机制是一个多步骤的过程，包括一系列物理和化学变化的过程：尿结石成分的过饱和和沉淀、结晶成核、生长和聚集，以及在肾小管上皮细胞表面的粘附和滞留，穿透肾乳头上皮，在集合系统中逐渐形成结石^[5]。肾小管上皮细胞表面晶体的粘附和聚集可能是肾结石形成的关键步骤^[6]。晶体沉积诱导肾组织局部炎症和氧化应激损伤。受损肾小管上皮细胞的细胞膜结构和蛋白分子表达发生变化，为晶体粘附提供了有利场所，使草酸钙等晶体倾向于停留并粘附于上皮细胞，形成正反馈，并继续加剧草酸钙等晶体对细胞的损伤^[7]。

Sirtuin (SIRT) 家族是一种在肾脏高度表达的 NAD 依赖性脱乙酰酶。它在细胞能量代谢、凋亡和自噬中起重要作用。SIRT3 是线粒体中最重要的脱乙酰酶。它在肾脏中高度表达。它能维持活性氧 (ROS) 的内环境稳定，抵抗氧化应激的损伤^[8-9]。ROS 介导的氧化应激可促进大量线粒体蛋白乙酰化，导致线粒体功能紊乱；SIRT3 可以通过脱乙酰化重塑线粒体功能的稳态，并以多种方式抵抗氧化应激的损伤^[9]。一些研究发现 SIRT3 缺乏会加重高血糖诱导的线粒体损伤，增加 ROS 积累，促进坏死细胞凋亡，提示 SIRT3 可能被用作相关疾病的靶点^[10]，SIRT3 在肾结石形成中的机制仍在研究中。

坏死性凋亡 (Necroptosis) 是近年来被广泛研究的一种程序性细胞死亡。越来越多的实验证据表明，它与炎症相关疾病的发生发展密切相关^[11-12]。坏死性细胞凋亡又称程序性坏死，它与细胞凋亡有以下不同之处：1. 在向细胞发出死亡指令时，不依赖 caspases 信号通路；2. 凋亡的特征是凋亡过程会产生核固缩和凋亡小体，其细胞膜是完整的。坏死性细胞凋亡涉及细胞膜的破裂和损伤相关分子模式 (DAMP) 的释放，从而导致免疫反应。坏死性凋亡可由肿瘤坏死因子 (TNF) 和死亡受体 (FAS) 引起。坏死体的两个核心蛋白 RIPK1 和 RIPK3 之间的相互作用导致 RIPK3-RIPK3 同源相互作用和 RIPK3 自身磷酸化。磷酸化 RIPK3 招募并磷酸化一系列混合的蛋白激酶样

结构域蛋白 (MLKL), 这些蛋白被转移到细胞膜上, 与磷脂酰肌醇相互作用, 诱导膜通透和细胞破坏^[12]。最近的研究表明, 坏死性凋亡在急性肾损伤的发病机制中起着重要作用。Mulay 等通过动物实验发现: 草酸钙晶体作用于肾小管上皮细胞后, 可激活 RIPK3 并磷酸化下游 MLKL, 从而诱导肾小管上皮细胞坏死性凋亡; 抑制或下调 RIPK3 或 MLKL 的表达可以减少晶体对细胞的损伤^[12]。然而, 目前尚不清楚坏死性凋亡的调节是否参与 SIRT3 对抗氧化应激损伤的保护机制, 从而减少草酸钙晶体在肾脏中的粘附和沉积。

聚乙二醇 (PEG) 是一种无毒聚合物, 具有良好的水溶性、优异的润滑性、保湿性、分散性等特点。聚乙二醇可以吸附在固体颗粒表面, 在固体颗粒表面形成具有双分子层结构的吸附层, 从而提高固体颗粒之间的空间阻力。外层的极性端与水有很强的亲和力, 这增加了水对固体颗粒的润湿程度, 增加了固体颗粒的表面电荷, 并由于静电排斥而相互远离。其分散剂的特性使体系均匀, 固体颗粒保持悬浮稳定, 无沉淀, 整个体系的理化性质一致^[13]。此外, 有研究发现 PEG 可以修复破损的生物膜, 抑制细胞器线粒体膜的通透性转化, 减少氧化性急性损伤, 从而修复受损脊髓, 并应用于神经损伤后的修复^[14]。因此, 以聚乙二醇为代表的聚合物相关特性值得进一步研究, 并有望应用于肾结石的预防和治疗。

肾结石的形成过程是多步骤的, 肾小管上皮细胞表面晶体的粘附和聚集是肾结石形成的重要步骤。细胞损伤和晶体聚集可能是影响晶体在细胞表面粘附和沉积的关键因素。因此, 本实验旨在探索和比较 SIRT3 在调节坏死性凋亡和以聚乙二醇为代表的聚合物在草酸钙肾结石形成中的作用, 并进一步解释肾结石形成的机制。

第一部分 探究 SIRT3 过表达/敲除对乙醛酸诱导的草酸钙肾结石小鼠的肾组织坏死性凋亡、肾脏损伤以及肾脏晶体沉积的影响

前言

肾结石的形成涉及矿物成核、晶体生长、晶体与肾上皮细胞之间的聚集和粘附。晶体在管腔中的滞留是肾结石形成的先决条件。计算结果表明，人体内形成的晶体通过肾脏的时间为 5~10min，晶体通过的管道内径为 15~60 μm 。因为尿液中晶体的生长速度为 1~2 $\mu\text{m}/\text{min}$ ^[15]。因此，在 5~10min 的时间内，晶体不能长到足以堵塞管道，这些晶体很容易被小管液冲洗。也就是说，未结合的晶体对肾结石的形成没有危险。

晶体与肾上皮细胞之间的粘附是晶体保留的重要基础。只有当晶体粘附到肾上皮细胞后，它才能在细胞表面生长或与其他晶体聚集形成大尺寸晶体，最终导致肾结石的形成。细胞损伤是粘附的主要条件^[16]。

正常情况下，肾小管上皮细胞结构完整，能很好地抑制晶体的粘附^[17]。然而，如果细胞受损，大量带负电荷的分子，如透明质酸（HA）、骨桥蛋白（OPN）、CD44 等会转移到细胞表面，从而吸附表面的钙离子和带正电荷的晶体颗粒^[18]。此外，粘附的晶体通过信号传导在细胞中诱导产生自由基，并通过脂质过氧化进一步损害肾小管上皮细胞，从而增加肾结石形成的风险。

SIRT3 是生物体内最重要的脱乙酰酶。它可以通过多种途径维持活性氧的稳定性、对抗氧化应激及诱发的细胞损伤。SIRT3 在肾脏中高度表达。在实验性急性肾损伤（AKI）中，肾功能损伤与肾小管的损伤及其邻近肾小管中 SIRT3 的减少和线粒体功能障碍有关。SIRT3 敲除小鼠容易发生 AKI 和死亡^[19]，提示 SIRT3 在保护肾损伤中起重要作用。进一步发现 SIRT3 可以增强肾小管上皮细胞的自噬功能，抑制凋亡和坏死，保护肾小管上皮细胞，减少草酸钙晶体在肾脏中的沉积^[20]。SIRT3 是研究肾结石形成机制和干预的重要靶点，其机制仍在研究中。

坏死性凋亡是一种程序性死亡，由细胞因子（TNF- α 、IFN- α 、IFN- γ ）、Toll 样受体（TLR3、TLR4、TLR9）和核酸（DNA、RNA）受体介导。受体依赖性相互作用蛋白激酶 1（RIPK 1）、受体相互作用蛋白激酶 3（RIPK3）和底物混合谱系激酶样蛋白（MLKL）参与 MLKL 寡聚并释放损伤相关分子模式（DAMP），从而介导坏死性凋亡的发生^[21]。目前的研究发现，坏死性细胞凋亡与多种系统性疾病密切相关，包括传染病、神经系统疾病、炎症和癌症。肾小管上皮细胞坏死性凋亡在肾结石形成中的作

用有待进一步研究。目前尚不清楚 SIRT3 是否通过调节坏死细胞凋亡来抑制肾结石的形成。

鉴于以上研究现状,本研究采用课题组构建的肾小管上皮细胞 SIRT3 特异性过表达/敲除小鼠系,以及野生型 C57BL/6 小鼠构建草酸钙结石模型,分组采用腹腔注射乙醛酸溶液或生理盐水进行处理。在建模第 8 天,处死小鼠取两侧肾脏,进行相关实验检测,以探讨 SIRT3 过表达/敲除对肾组织细胞坏死性凋亡和晶体沉积的影响。

一、材料与方 法

(一) 主要实验材料及耗材

1、实验仪器、耗材

组织包埋机、组织切片摊片机、石蜡切片机(德国徕卡公司),高速低温离心机(Thermo Scientific 公司),蛋白电泳仪(Bio-Rad 公司),相差显微镜(德国徕卡公司),磁力搅拌器、组织匀浆器(Thermo 公司)、-80℃冰箱、百分之一精密电子天平(德国赛多利斯公司)、电子扫描仪、微波炉、超纯水系统、制冰机、移液器等设备、组化笔、移液枪、0.2/0.45μm PVDF 膜、1.5ml EP 管、15/50ml 离心管、冻存管。

2、主要试剂

50 wt. %乙醛酸	Sigma-Aldrich 公司
柠檬酸钠-EDTA 抗原修复液(40X)	碧云天
免疫组化通用试剂盒	博奥龙
二甲苯	国药化学试剂有限公司
无水乙醇	国药化学试剂有限公司
伊红染液	武汉塞维尔生物有限公司
中性树脂	国药化学试剂有限公司
PBS 缓冲液干粉	北京酷来搏科技有限公司
DAB 显色试剂盒	中杉金桥
RIPA	碧云天
PAGE 凝胶快速制备试剂盒(12.5%)	上海雅酶生物医药科技有限公司
Tween20	中国 BBI Life Sciences 公司
甲醇	国药化学试剂有限公司
20×TBS 缓冲液	生工生物工程有限公司
蛋白 marker	美国伯乐公司

兔源 SIRT3 单克隆一抗	Abcam 公司
兔源 GAPDH 一抗	碧云天
磷酸化 MLKL 单克隆抗体	Bioss 公司

3、主要试剂配制:

0.05%乙醛酸	乙醛酸 (50 wt. % in H ₂ O)	1ml
	消毒灭菌 dd H ₂ O	补齐至 2ml
10×电泳液	Tris 碱	30.284g
	甘氨酸	187.675g
	SDS	10g
	dd H ₂ O	补齐至 1L
1×电泳液	10×电泳液	100ml
	dd H ₂ O	900ml
10×转膜液	Tris 碱	76g
	甘氨酸	36g
	dd H ₂ O	补齐至 1L
1×转膜液	10×转膜液	100ml
	甲醇	200ml
1×TBST 缓冲液	dd H ₂ O	补齐至 1L
	20×TBS 缓冲液	250ml
	dd H ₂ O	补齐至 5L
	Tween20	2.5ml
5%BSA	BSA	2.5g
	1×TBST 缓冲液	50ml

(二) 实验动物

动物来源:本次课题所需的 C57BL/6 小鼠购于上海吉辉实验动物饲养有限公司。SIRT3 转基因小鼠系来自课题组:利用已经构建的 Sirt3 条件性基因敲除/过表达小鼠模型: Sirt3 fl/fl, Sirt3^{+/+}与肾小管上皮细胞特异表达 Cre 重组酶 (Cadh16-Cre) 小鼠杂交, 获得肾小管上皮细胞特异性敲除/过表达 Sirt3 基因小鼠: Sirt3fl/fl;Cadh16-Cre^{+/-}; Sirt3^{+/+};Cadh16-Cre^{+/-}。小鼠均被照常保存于海军军医大学动物实验中心的实验动物室中, 该实验室为无特定病原体 (SPF) 实验室。该动物实验操作得到了海军军医大学动物伦理委员会的批准。

(三) 实验方案及方法

1、分组建立小鼠草酸钙肾结石模型，制备肾组织标本

实验分组：6只8周龄雄性 SIRT3 特异性过表达小鼠作为过表达组，6只8周龄雄性肾小管上皮细胞 SIRT3 特异性敲除小鼠作为敲除组，6只8周龄野生型雄性小鼠作为模型组。给每只小鼠喂食普通饲料、自由饮水并在相同条件下饲养1周后，称重并贴上标签。

2、建模：准备带有4号针头的1ml注射器

每组小鼠随机分为乙醛酸处理和生理盐水对照处理各三只，乙醛酸处理的小鼠按照体重以80mg/kg/d的剂量，每日腹腔注射配置好的乙醛酸溶液，持续7天。其余小鼠按照体积比计算给予每日腹腔注射60ml/kg生理盐水，持续7天。各组小鼠于第8天用脊髓脱臼处死。取两侧肾脏分别用4%多聚甲醛固定用于制作切片及-80℃冰箱中保存用于蛋白检测。

3、石蜡标本制作和切片主要实验步骤如下

(1) 固定：收集小鼠肾组织标本，用4%多聚甲醛固定液固定。固定液的体积是肾组织的20倍以上，固定36小时。

(2) 脱水：将组织修剪冲洗，用流水反复，每次20分钟，冲洗3次，再将组织置于梯度酒精，各级乙醇放置1-2小时，置于75%乙醇过夜，逐步脱去水分。

(3) 透明：配置乙醇和二甲苯1:1的混合液，将组织放入2小时后取出，再依次放入2缸二甲苯溶液各10分钟。

(4) 浸蜡：透明后的组织放入软蜡中，2小时后置于硬蜡1小时。

(5) 包埋：准备模具组织放于内，将加热好的熔蜡浸没肾组织标本，在石蜡膜具中等待变硬。

(6) 切片：取石蜡包埋块用石蜡切片机切片，厚度约5 μ m，贴于防脱载玻片，烤片固定。

4、Von Kossa 染色

(1) 小鼠肾脏组织按照上述方法制备5 μ m厚组织防脱切片；

(2) 切片常规脱蜡入水，用双蒸水洗1min；

(3) 切片滴加5%海波溶液（硫代硫酸钠）入孵育箱中30min，蒸馏水冲洗；

(4) 滴加1%硝酸银溶液，在白炽灯下照射30min，用双蒸水冲洗掉浮于玻片表面的黑色物质；

(5) 载玻片滴加5%海波溶液（硫代硫酸钠），静置3min；

(6) 滴加伊红染液复染8min，双蒸水漂洗后显微镜下观察，扫片机扫描并保存。

5、HE 染色

- (1) 切片使用二甲苯脱蜡以及梯度乙醇水化，最后置于双蒸水 1 分钟
- (2) 苏木素染色：切片滴加苏木素滴并孵育 5 分钟，弃苏木素并滴加盐酸溶液分化 2 秒，再加入自来水返蓝，并用自来水清洗
- (3) 伊红染色：滴加伊红染液于切片上，孵育 5 分钟，结束后用自来水冲洗 1 分钟
- (4) 切片再次使用梯度乙醇进行脱水，二甲苯脱水透明 2 遍
- (5) 封片：滴加少许中性树脂封片，在荫凉处自然风干，显微镜下观察结果

6、免疫组化

实验步骤如下：

(1) 脱蜡和水化：将石蜡肾组织切片放入二甲苯中洗涤 5-10 分钟，更换二甲苯再浸泡 5 分钟，用梯度乙醇(顺序为无水乙醇 5 分钟，95%乙醇 5 分钟以及 75%乙醇 5 分钟)，再置入蒸馏水中洗涤 1 分钟。

(2) 内源性过氧化物酶灭活：将肾组织切片置于 3%的 H₂O₂ 溶液中，室温下孵育 10 分钟。再用蒸馏水冲洗（每次冲洗 3min，共 3 次）。

(3) 热修复抗原：免疫组化染色缸中加入并配置 1X 的柠檬酸钠-EDTA 抗原修复液，将切片放入并完全浸泡，染色缸用 PE 薄膜封口留数个通气孔，放置于微波炉中，加热并沸腾后即刻关闭电源，防治切片脱片，10 分钟后再次接通电源加热至沸腾，反复两次。等待缓冲液自然冷却后使用 PBS 液小心冲洗载玻片（每次冲 3 分钟，共 2 次）。

(4) 封闭：用组化笔圈定组织区域，滴加 5%的 BSA 封闭液，使组织区域被封闭液完全覆盖，然后将载玻片置于湿盒中，37℃电热恒温箱中孵育 60 分钟，然后甩掉多余液体。

(5) 一抗孵育：滴加兔源 SIRT3 或 p-MLKL 多克隆抗体（稀释浓度 1: 500），然后将载玻片放入湿盒中于 37℃电热恒温箱中孵育 90 分钟，然后用 PBS 液冲洗组织标本三次，每次 3 分钟。

(6) 二抗孵育：滴加生物素标记的二抗，再将载玻片放入湿盒中置于 37℃电热恒温箱中孵育 30 分钟。然后用 PBS 冲洗组织标本 3 次，每次 5 分钟。

(7) SABC 染色：组织区域滴加链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (SABC) 工作液，再将载玻片放入湿盒中，于电热恒温箱中孵育 20 分钟，组织标本先用含 0.1% TWEEN 20 的 PBS 液冲洗 4 次，每次 3 分钟，然后用单纯的 PBS 液冲洗两次，每次 3 分钟。

(8) DAB 染色：在 EP 管中配置二氨基联苯 (DAB) 显色工作液，充分震荡混匀，然后取适量混匀液滴加至载玻片组织区域，室温下显色并镜下观察，当观察到组

织出现棕黄色时迅速将切片放入水中浸泡 3 分钟，以终止染色。

(9) 细胞核复染: 苏木素液复染组织标本 5 分钟后放入自来水洗涤终止染色。

(10) 脱水和透明: 载玻片用吸水纸吸干组织区域的自来水, 然后将标本依次放入梯度乙醇 (放入 75%乙醇, 95% 乙醇及无水乙醇均为 5 分钟) 中使其脱水, 再将玻片依次放入二甲苯溶液中使组织切片透明。

(11) 封片: 轻轻甩干载玻片, 在组织区域滴加适量中性树胶, 从标本一侧开始轻轻地盖上盖玻片, 避免留下气泡。

(12) 显微镜下观察, 图像软件拍片保存

7、蛋白质免疫印迹 (Western blot)

采用 Western blot 检测肾组织中 SIRT3 及 p-MLKL 的蛋白水平

(1) 小鼠肾组织中的蛋白提取: 用 PBS 清洗小鼠肾脏, 纱布蘸干, 按照 1g 组织中加入 4mL 的 RIPA/蛋白酶抑制剂预混液后, 用匀浆器进行匀浆, 冰浴下裂解 30 分钟, 再用超速离心机离心并获取上清, -80°C 下保存。

(2) 根据 BCA 法蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

(3) SDS-PAGE 凝胶电泳: 准备好新鲜配置的 SDS-PAGE 胶, 各样品取 $30\mu\text{g}$ 总蛋白顺序上样, 按 1/4 体积加入 5X 蛋白上样缓冲液, 震荡混匀后水浴锅中煮沸 5 分钟。然后采用预配制厚度 1.5mm 的 12.5% SDS-PAGE 胶上样电泳。设置电泳仪电压 80V, 等蛋白样品跑过浓缩胶之后再设置为 120V, 跑 60 分钟。

(4) 转膜: 电泳结束后取出凝胶, 参照 Marker 指示带的位置, 根据目的蛋白分子量的大小切胶, 置于转膜液中, 然后用蒸馏水冲洗, 剪成与 PAGE 凝胶相同大小的 0.2umPVDF 膜和滤纸, 之后 PVDF 膜用甲醇浸泡数秒后, 与滤纸一同浸泡于电转缓冲液中。按照黑色板-纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-纤维垫-白色板的顺序依次放好, 用试管赶走气泡, 夹紧板后放入转膜仪内, 黑色板的一面对应黑色负极。转膜条件: 恒压 100V, 90 分钟。

(5) 封闭: 将 0.2umPVDF 膜浸泡于 5%BSA 封闭液, 室温下置于摇床封闭 2 小时。

(6) 一抗孵育: 用 TBST 按合适比例稀释 SIRT3 (1:500)、p-MLKL (1:500) 和 GAPDH(1:2,000) 抗体, 使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中, 4°C 孵育过夜。

(7) 二抗孵育: 用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 分钟。用 TBST 按 1:2000 稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔二抗, 将 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中, 摇床上室温孵育 2 小时。TBST 充分洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 分钟。

(8) 显影: 每张膜滴加适量的 ECL 超敏发光液显影, 上机曝光, 留取照片。

二、结果

（一）各组小鼠切片标本行 SIRT3 免疫组化检测结果。

乙醛酸处理后取各组小鼠切片标本行免疫组化结果表明，SIRT3 过表达小鼠其肾小管上皮细胞高表达 SIRT3，SIRT3 敲除小鼠不表达 SIRT3，野生型小鼠呈低水平表达（图 2-1）。

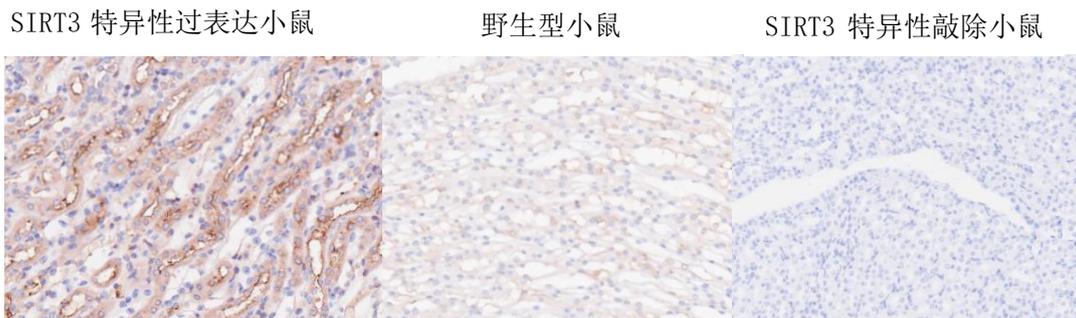


图 1-1 小鼠肾组织 SIRT3 免疫组化

（二）HE 染色观察各组小鼠肾脏情况

与野生型小鼠相比，SIRT3 过表达小鼠肾损伤表现较轻，肾小管上皮细胞形态及排列正常有序。而 SIRT3 敲除小鼠经乙醛酸处理出现更明显的肾损伤表现。SIRT3 敲除小鼠肾损伤主要表现为肾间质炎性细胞浸润，肾小管上皮细胞坏死、脱落形成细胞或颗粒管型，肾小管内红细胞淤积形成红细胞管型（如图 1-2）。

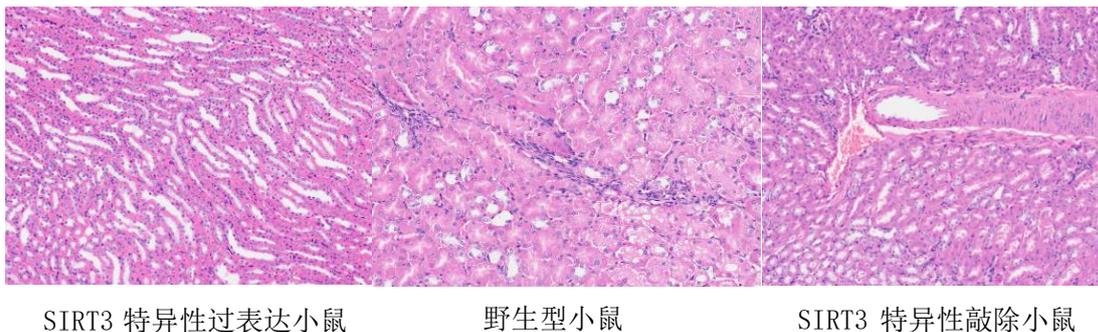


图 1-2 小鼠肾组织 HE 染色结果（放大倍数 10×6.49 ）

（三）Von-kossal 染色观察各组小鼠肾脏晶体沉积情况

光镜下观察各组小鼠肾脏晶体黏附情况，结果显示 SIRT3 敲除小鼠晶体沉积较野生型小鼠加重，SIRT3 过表达小鼠晶体沉积较野生型小鼠明显减轻（如图 1-3）。

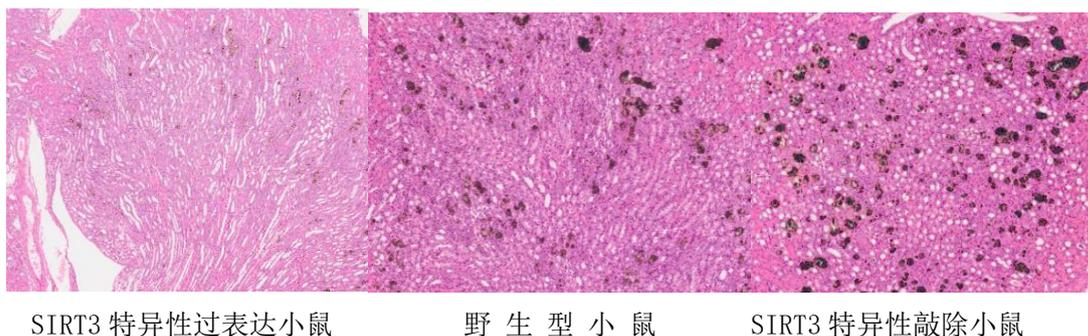


图 1-3 小鼠肾组织 Von-kossal 染色结果（放大倍数 10×3.25 ）

（四）蛋白免疫印迹实验结果

Western blot 条带显示，乙醛酸处理的小鼠其肾组织 p-MLKL 表达较同组生理盐水处理的小鼠明显升高。然而组间有所差异，其中乙醛酸处理的 SIRT3 过表达小鼠 p-MLKL 表达明显弱于乙醛酸处理的野生组和敲除组（图 1-4）。各组 SIRT3 蛋白条带强度符合小鼠分组；内参 GAPDH 显示一致。

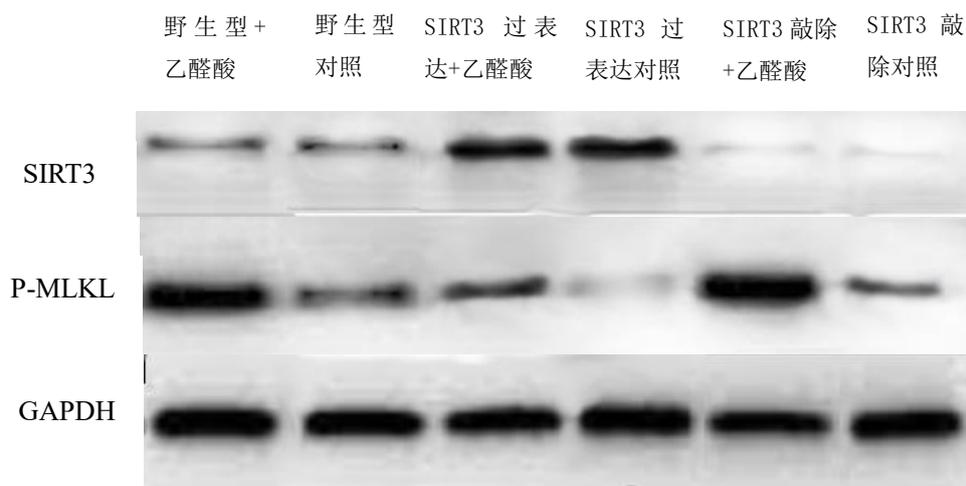


图 1-4 小鼠肾组织 SIRT3、p-MLKL 蛋白免疫电泳结果

三、讨论

SIRT3 是线粒体内最重要的去乙酰化酶，在肾脏内高表达，可能通过多途径保护肾脏。本部分实验结果表明 SIRT3 在肾脏特异性过表达可以减轻肾组织坏死性凋亡及相关损伤，减轻乙醛酸诱导的肾脏草酸钙晶体沉积，而 SIRT3 特异性敲除小鼠，得到的实验结果刚好相反。

坏死性凋亡是程序性死亡模式的一种，信号通路主要通过受体相互作用蛋白激酶

3 (RIPK3) 的激活进行调节。通过回顾文献, SIRT3 还可以通过增强肾小管上皮细胞的自噬功能, 抑制细胞凋亡和坏死, 从而保护肾小管上皮细胞, 因此坏死性凋亡也可能是 SIRT3 受控调节肾脏损伤的另一重要途径, 并猜想这一途径可能对肾结石的形成有调节作用。

SIRT3 过表达是否通过调节坏死性凋亡来抑制草酸钙晶体在肾脏的沉积, 目前证据不足但值得研究。回顾文献, Mulay 的体内实验构建了 Tnfr1 基因敲除和 Tnfr1/Tnfr2 基因双敲除小鼠的肾脏晶体沉积模型, 检验其肾损伤指标显著低于对照组, 然而其肾脏晶体沉积并无差异性。^[22]。这样的结果显然不符合预期。其可能的解释为: 1.通过该基因敲除的小鼠并不能完全阻止肾损伤的发生, 只能减少依赖该受体的损伤相关性表达; 2.肾脏损伤可能仅是晶体黏附沉积的启动因素, 晶体的聚集生长不依赖肾损伤反应, 和肾损伤严重程度无关。因此需要进一步实验探究坏死性凋亡与晶体黏附沉积的关系。

第二部分 体外探究抑制细胞坏死性凋亡对肾小管上皮细胞表面晶体黏附的影响

引言

肾结石的病因是多因素的，有研究认为：没有肾小管上皮细胞的病理性改变，单纯性的尿液过饱和很难促进结石的形成，肾小管上皮细胞损伤是肾结石形成的中心环节^[23]。也有实验表明，抑制组织细胞损伤反应并不能减轻结石的形成。因此有必要通过体外实验进一步验证和解释相关问题。

以上第一部分通过动物实验验证了 SIRT3 过表达能够抑制肾组织发生坏死性凋亡，改善晶体相关肾损伤，且草酸钙晶体在肾脏黏附沉积可能与肾组织细胞发生坏死性凋亡相关。另外有研究通过体外实验在人肾近曲小管上皮细胞 HK-2 细胞中转染 SIRT3 过表达载体以过表达 SIRT3，并采用一水草酸钙晶体处理。其结果表明 SIRT3 过表达显著抑制 HK-2 细胞中一水草酸钙晶体处理下的晶体-细胞粘附和细胞凋亡^[24]。因此 SIRT3 影响肾结石形成的机制值得研究。坏死性凋亡是 SIRT3 保护肾脏的调控途径，这一途径在肾结石中的作用仍有争议，那么无论通过坏死性凋亡能否抑制结石形成，其作用机制或者受影响的原因都值得研究。

调控细胞损伤有助于抑制肾结石的理论基础在于肾小管上皮细胞损伤促进晶体黏附的理论。有研究认为草酸钙晶体诱导的肾小管上皮细胞损伤，主要通过胞内活性氧（ROS）损伤细胞，并引起肾小管细胞表达炎症蛋白，募集单核细胞及巨核细胞产生大量炎症因子造成肾小管的损伤^[25-26]。肾小管细胞损伤后结构及蛋白表达发生相应变化，促进草酸钙晶体在肾小管上皮细胞上的黏附沉积^[27]。

草酸钙晶体通常有三种晶体水合物：一水草酸钙、二水草酸钙和三水草酸钙。其中，一水草酸钙热力学稳定，二水草酸钙次之，三水草酸钙最不稳定。有研究显示 1 μ m 颗粒的一水草酸钙晶体对细胞的损伤最为严重^[23]。

因此本研究拟使用特异性抑制剂减轻草酸钙晶体诱导的肾小管上皮细胞坏死性凋亡，减轻胞内活性氧（ROS）损伤，验证其干预细胞表面晶体黏附沉积的效果。相比于体内实验，体外实验的优点在于体外环境干扰因素较少且干预因素容易控制。为了区分不同浓度晶体刺激下的实验结果，本部分采用阶梯浓度的一水草酸钙晶体体外刺激小鼠肾小管上皮细胞（TCMK-1），并采用 GSK872（一种有效的选择性 RIP3 激酶抑制剂）抑制细胞坏死性凋亡，观察调控细胞坏死性凋亡对体外草酸钙晶体在肾小管上皮细胞黏附沉积的影响，并检测其细胞活力、细胞毒性及细胞内 ROS 水平，进一步探究细胞坏死性凋亡与细胞表面晶体黏附的关系和可能的机制。

一、材料与amp;方法

(一) 实验材料及amp;方法

1、实验相关仪器

仪器	生产厂家
超净操作台	Thermo Fisher Scientific 公司
细胞培养箱	上海博迅实业有限公司
相差显微镜	德国徕卡公司
低温超速离心机	Thermo Fisher Scientific 公司
电泳仪	美国伯乐公司
荧光酶标仪	Thermo Fisher Scientific 公司
-80°冰箱	Thermo Fisher Scientific 公司
电感耦合等离子体发射光谱仪	中国计量院

2、实验试剂、耗材

试剂名称	生产厂家
PBS 缓冲液	Adamas life
DMEM 高糖培养基	Adamas life
胎牛血清	Hyclone
青霉素/链霉素溶液	Gibco
0.25%胰蛋白酶（含 EDTA）	Gibco
一水草酸钙晶体	Adamas
GSK872	葛兰素史克
CCK-8 试剂盒	碧云天
乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	碧云天
无水乙醇	国药化学试剂有限公司
异丙醇	国药化学试剂有限公司
甲醇	国药化学试剂有限公司
二甲基亚砜	索莱宝
增强型 BCA 蛋白定量试剂盒	碧云天
PVDF 膜	美国伯乐公司
兔源 RIPK1 多克隆一抗	碧云天

兔源 RIPK3 多克隆一抗	碧云天
兔源 GAPDH 一抗	碧云天
磷酸化 MLKL 单克隆抗体	Bioss 公司
PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (12.5%)	上海雅酶生物医药科技有限公司
RIPA	碧云天
蛋白 marker	美国伯乐公司

试剂名称	组分	用量
含 10%胎牛血清的	DMEM	450ml
DMEM 高糖培养基溶液	胎牛血清	50ml
	青霉素-链霉素混合液 5ml	5ml
一水草酸钙混悬液	一水草酸钙晶体	400mg
8mg/ml	PBS 缓冲液	50ml

(二) 实验细胞

小鼠肾小管上皮细胞系 TCMK-1 购自美国 ATCC。

(三) 实验方法

1、细胞培养

1) 细胞的传代:

- (1) 超净台紫外线灯消毒 90 分钟, 准备好实验材料
- (2) 打开超净台, 75%乙醇再次对台面操作区域消毒
- (3) 取出细胞密度约 80%的培养皿, 吸弃培养液
- (4) 用无菌 PBS 轻轻震荡清洗 3 次, 弃上清, 加入含 0.25%EDTA 胰酶消化细胞放入培养箱 1min
- (5) 取出培养皿边旋转边轻轻拍打, 如果细胞呈流沙样下滑, 说明贴壁细胞消化成为悬液
- (6) 加入适量含 10%胎牛血清的完全培养基使胰酶失活, 收集悬液, 800RPM 离心 5min, 吸弃上清, 加入含 10%胎牛血清和 1%抗生素的 DMEM 完全培养基重悬;
- (7) 准备新的 3 个培养皿, 将悬液均等加入各皿中, 8 字法摇匀细胞, 放入培养箱
- (8) 细胞培养箱中每 24 小时查看细胞生长状况

2) 细胞冻存

- (1) 消化收集细胞及离心步骤同前
- (2) 丢弃上清，加入新赛美无血清冻存液重悬细胞，混匀后分装入冻存管
- (3) 放入-80°冰箱中保存

3) 细胞复苏

- (1) 紫外灯消毒超净台 90min，准备好实验材料，酒精消毒超净台桌面
- (2) 取出装有细胞的冻存管 37°水浴震荡 1 分钟，解冻细胞
- (3) 细胞冻存液转移至装有 5 倍体积培养基的离心管，500RPM 离心 5 分钟
- (4) 吸弃上清，加入 DMEM 完全培养基重悬细胞
- (5) 转移至 10cm 培养皿中补齐完全培养基至 10ml，按照 8 字法摇匀细胞，放入培养箱
- (6) 细胞培养箱中每 24 小时查看细胞生长状况

2、设计实验分组处理细胞，并观测各组一水草酸钙晶体在细胞表面的黏附情况

- (1) 使用 6cm 培养皿加入培养基 4ml，培养 TCMK-1 细胞至密度达到 80%
- (2) 每次取出细胞密度达到 80%的培养皿，随机分为抑制剂组、模型组、空白对照组并做好标记。

(3) 将一水草酸钙晶体加入不含钙镁的 PBS 缓冲液中重悬沉淀，配置成晶体终浓度为 8mg/ml 的混悬液

- (4) 一水草酸钙晶体与细胞作用及各组处理情况：

模型组（组 1）：向培养基中缓慢均匀加入配置好的一水草酸钙晶体混悬液，使培养基中一水草酸钙晶体浓度达到 200/400/600/800/1000ug/ml, 37°C 下摇床上以 80r/min 放置 15 分钟，使晶体与细胞充分作用，再放入培养箱孵育 12 小时。

抑制剂组（组 2）：培养基中预加入 GSK872（浓度依赖性 RIP3 抑制剂）至药物浓度 20uM，放入培养箱孵育 30min。取出培养皿加入和模型组等体积配置好的一水草酸钙混悬液，37°C 摇床上以 80r/min 放置 15 分钟，使晶体与细胞充分作用，再放入培养箱孵育 12 小时。

空白对照组：（组 3）：培养皿中加入与另外两组草酸钙混悬液相等体积的 PBS 缓冲液，37°C 摇床上以 80r/min 放置 15 分钟，再放入培养箱孵育 12 小时。

(5) 镜下观察晶体粘附情况：培养箱孵育 12 小时后取出各组培养皿，弃去晶体，用不含钙镁的 PBS 缓冲液洗涤细胞三次以除去未结合的晶体。再加入 PBS 缓冲液铺底，相差倒置显微镜下观察 TCMK-1 细胞表面的晶体粘附情况。

3、细胞活力检测实验（CCK-8 法）

- (1) 紫外灯消毒超净台 90min, 准备好实验材料, 酒精消毒超净台操作区域
- (2) 取出密度约 80%的细胞, 吸弃培养基
- (3) 用 PBS 缓冲液漂洗 3 次后加入含 0.25%EDTA 胰蛋白酶消化细胞并放入培养箱孵育 1min
- (4) 取出培养皿边旋转边轻轻拍打, 如果细胞呈流沙样下滑, 说明贴壁细胞消化成为悬液
- (5) 加入适量含 10%胎牛血清的完全培养基使胰酶失活, 收集悬液, 500RPM 离心 5min, 吸弃上清
- (6) 加入培养基重悬细胞, 抽取少量细胞混悬液测量其浓度
- (7) 按照设计分组情况, 进行 96 孔板细胞铺板, 放入细胞培养箱
- (8) 8 小时后细胞贴壁, 按照实验设计处理细胞
- (9) 避光条件每孔加入 10 μ l CCK-8 检测工作液, 培养箱孵育 2 小时
- (10) 设置酶标仪在 450nm 检测吸光度
- (11) 计算细胞活力(%)=[A (加药) -A (空白)]/[A (0 加药) -A (空白)] \times 100

4、LDH 释放法检测细胞毒性

- (1) 紫外灯消毒超净台 90min, 准备好实验材料, 酒精消毒超净台操作区域
- (2) 取出密度约 80%的细胞, 吸弃培养基
- (3) 用 PBS 缓冲液漂洗 3 次后加入含 0.25%EDTA 胰蛋白酶消化细胞并放入培养箱孵育 1min
- (4) 细胞完全消化成悬液后, 加入完全培养基, 收集悬液, 用 10%FBS 的完全培养基配置为单细胞悬液。
- (5) 细胞计数, 以每孔 2×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 细胞培养箱恒温孵育 24h
- (6) 将各培养孔按照以下分组进行处理: 包括无细胞的培养基孔(背景空白对照组), 没有 GSK872 处理的对照细胞孔(样品对照组), 未经 GSK872 处理的用于后续裂解的细胞孔(样品最大酶活性对照组), 以及 GSK872 (工作浓度 20 μ M) 预处理的细胞孔(药物处理样品组), 并做好标记。根据分组加入相应浓度的试剂或 PBS 对照液, 并用一水草酸钙混悬液刺激细胞, 继续孵育 12h;
- (7) 在到达相应检测时间前 1h, 取出 96 孔板, 加入 10 μ l LDH 释放试剂到最大酶活性对照组中, 吹打混匀, 置于培养箱中继续孵育; 按照用量配置 LDH 检测工作液;
- (8) 到达检测时间后, 多孔板离心机 400g 离心 5min, 将各孔上清液转移到新的 96 孔板中;
- (9) 各孔分别加入 50 μ l LDH 检测工作液, 充分混匀, 室温下摇床上避光孵育

30min, 然后在 490nm 处测定吸光度 OD 值。

(10) 按照 LDH 释放法计算每孔细胞 LDH 释放率。

5、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测实验

(1) 紫外灯消毒超净台 90min, 准备好实验材料, 酒精消毒超净台操作区域

(2) 取出密度约 80%的细胞, 吸弃培养基

(3) 用 PBS 缓冲液漂洗 3 次后加入含 0.25%EDTA 胰蛋白酶消化细胞并放入培养箱孵育 1min

(4) 取出培养皿边旋转边轻轻拍打, 如果细胞呈流沙样下滑, 说明贴壁细胞消化成为悬液

(5) 加入适量含 10%胎牛血清的完全培养基使胰酶失活, 收集悬液, 500RPM 离心 5min, 吸弃上清

(6) 加入培养基重悬细胞, 吹打混匀

(7) 按照设计分组情况, 按照每孔 100ul 培养基, 2×10^3 个细胞进行 96 孔黑底细胞培养板铺板, 每组重复 6 孔, 放入细胞培养箱 8 小时

(8) 用无血清培养液配置 DCFH-DA 工作液, 使终浓度为 10mmol/L

(9) 取出 96 孔黑底培养板, 吸弃培养液, 加入 50ul 稀释好的 DCFH-DA, 细胞培养箱内孵育 20 分钟

(10) 用无血清细胞培养液洗涤细胞三次, 充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA

(11) 按照实验分组对细胞进行相应处理

(12) 使用 488nm 激发波长, 525nm 发射波长, 荧光酶标仪检测荧光值

6、蛋白免疫印迹

TCMK-1 细胞中提取蛋白: 处理后的细胞, 采用胰酶消化后用 RIPA 裂解液进行裂解, 4°C 下离心收集上清, 得到细胞中的总蛋白.按照第一部分蛋白质免疫印迹方法检测蛋白水平。

7、晶体黏附量的测定

按照分组处理细胞后, 吸弃上层培养液, 并用 PBS 清洗细胞 3 次, 去除细胞外未黏附的晶体.然后将以上洗好的培养皿放置在小烧杯中, 加入 5mL 浓 HNO₃ 和 1.0mL HClO₄ 后, 在电磁炉上消化至溶液透明, 再加热至溶液即将蒸干时关闭电源, 利用余热将溶液烘干, 待自然冷却后加入 3mL 超纯水, 混合均匀, 同时准备空白组 (即 5mL 浓 HNO₃ 与 1.0 mL HClO₄ 的混合溶液), 利用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP)准确测定钙离子的浓度, 然后换算成草酸钙晶体的黏附量。

8、统计分析 实验数据采用平均值±标准差的形式表示, 用 t 检验比较两组数据之间的差异。本次实验采用 Graph Pad Prism 6.0 软件对实验数据进行统计学分析。

$P < 0.05$ 被认为有显著的统计学意义。

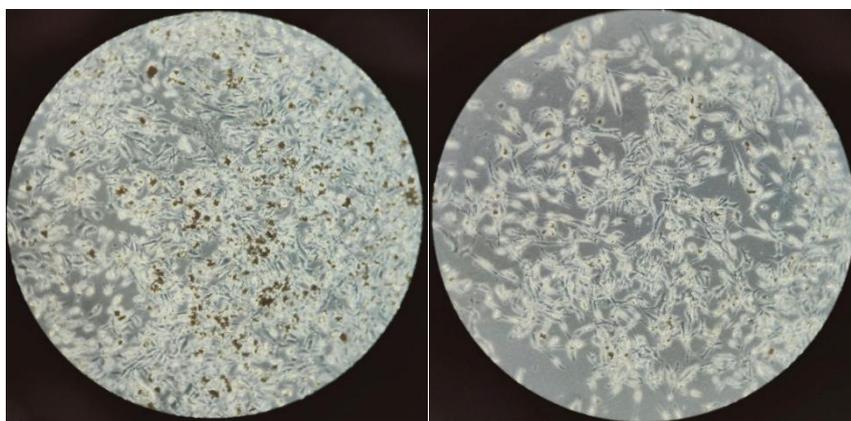
二、结果

(一) 镜下观察模型组 TCMK-1 在不同浓度一水草酸钙晶体刺激下细胞表面晶体黏附情况

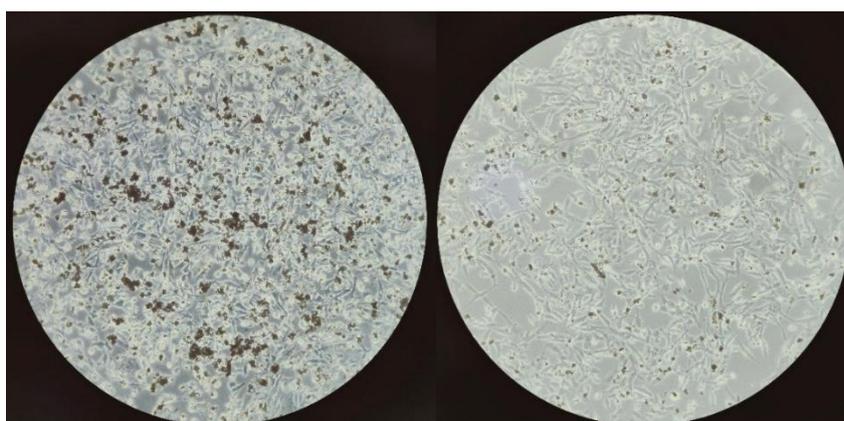
与空白对照组相比，模型组中一水草酸钙晶体刺激下的细胞，表面黏附的晶体数量随一水草酸钙浓度的增加而增多，黏附沉积的晶体随密度增加晶体间相互聚集融合。

(二) 预加入坏死性凋亡抑制剂 GSK872 后使用相应浓度一水草酸钙晶体刺激下细胞表面晶体黏附情况

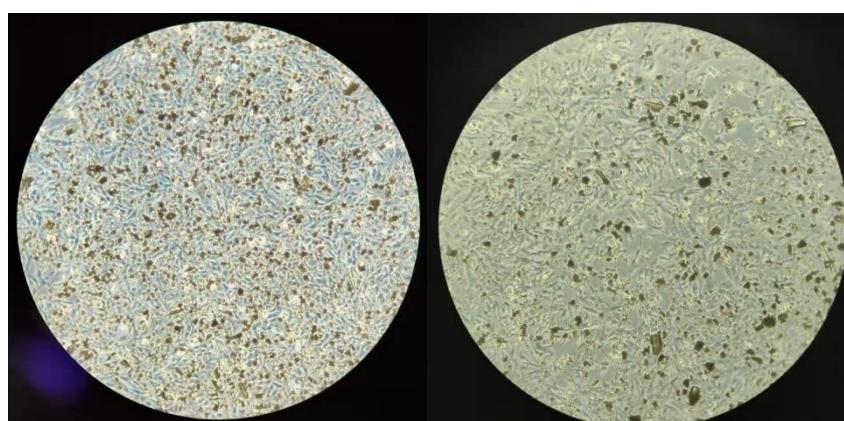
抑制剂组与模型组进行对照，发现使用一水草酸钙晶体浓度在 200 和 400 $\mu\text{g/ml}$ 时，抑制剂组的小鼠肾小管上皮细胞表面晶体黏附明显减少。当晶体浓度增大至 600 $\mu\text{g/ml}$ ，漂洗后的抑制剂组仍有部分晶体聚集形成不定型沉淀并滞留于细胞表面。当加入的一水草酸钙达到 800、1000 $\mu\text{g/mL}$ ，使用 GSK872 预处理的抑制剂组细胞其表面晶体聚集产生的沉淀与模型组相比未见明显差异，如图 (2-1)。



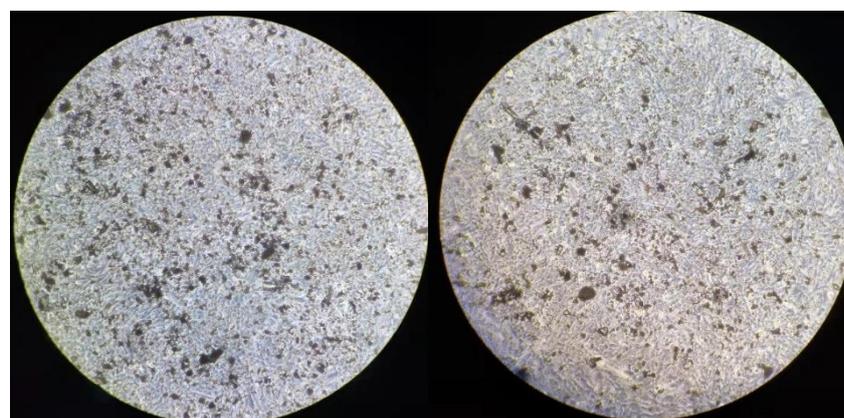
CaOx, 200 $\mu\text{g/mL}$ in DMSO



CaOx, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DMSO



CaOx, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DMSO



CaOx, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DMSO

图 2-1 抑制剂组与对照组一水草酸钙刺激细胞晶体黏附情况（左侧模型组，右侧抑制剂组，放大倍数 10×10 ）

（三）800 ug/ml 一水草酸钙刺激下的模型组、抑制剂组及空白对照组细胞坏死性凋亡特异性蛋白分子 RIPK1、RIPK3、p-MLKL 蛋白免疫印迹情况。

蛋白免疫印迹结果显示（图 3-2），与空白对照组比较，模型组细胞在 800ug/ml 一水草酸钙晶体刺激后，坏死性凋亡标志物 RIPK1，RIPK3，p-MLKL 表达增加，抑制剂组 RIPK1 表达与模型组无差异，RIPK3 及 p-MLKL 则表达显著减少。

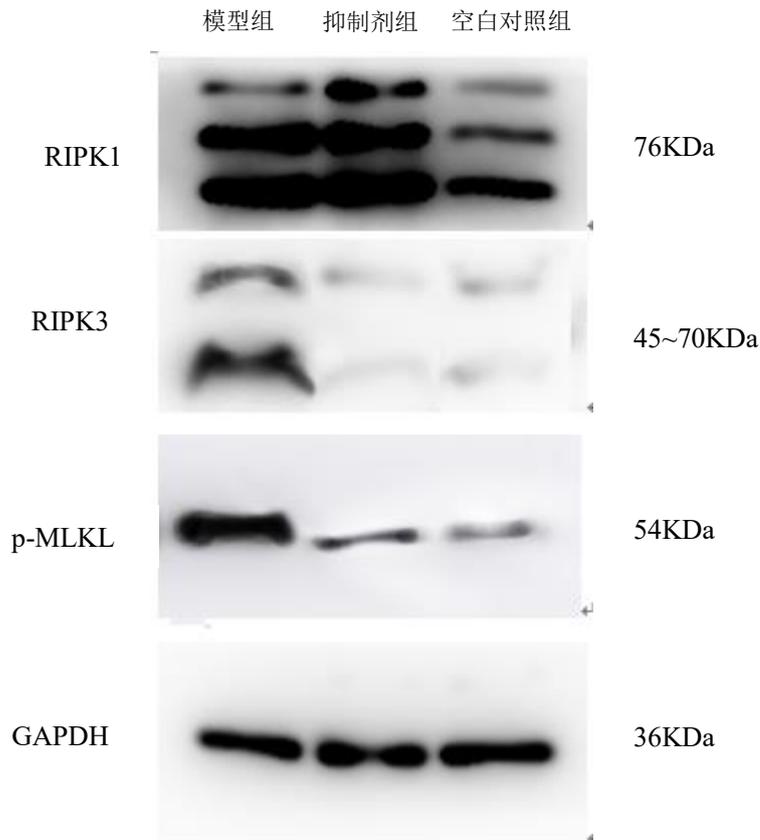


图 2-2 各组坏死性凋亡特异蛋白免疫电泳

(四) 400/800 ug/ml 一水草酸钙刺激下各组细胞活力实验结果 (图 2-3)

使用 CCK-8 法检测一水草酸钙及 GSK872 对细胞活力的影响。与空白对照组相比，模型组细胞一水草酸钙刺激下细胞活力降低($P<0.05$)；与模型组对比，抑制剂组使用 GSK872 预处理能部分减轻一水草酸钙刺激引起的 TCMK-1 细胞活力降低。使用晶体刺激浓度 800ug/ml 相比 400ug/ml，差异进一步放大。以上差异均有统计学意义。

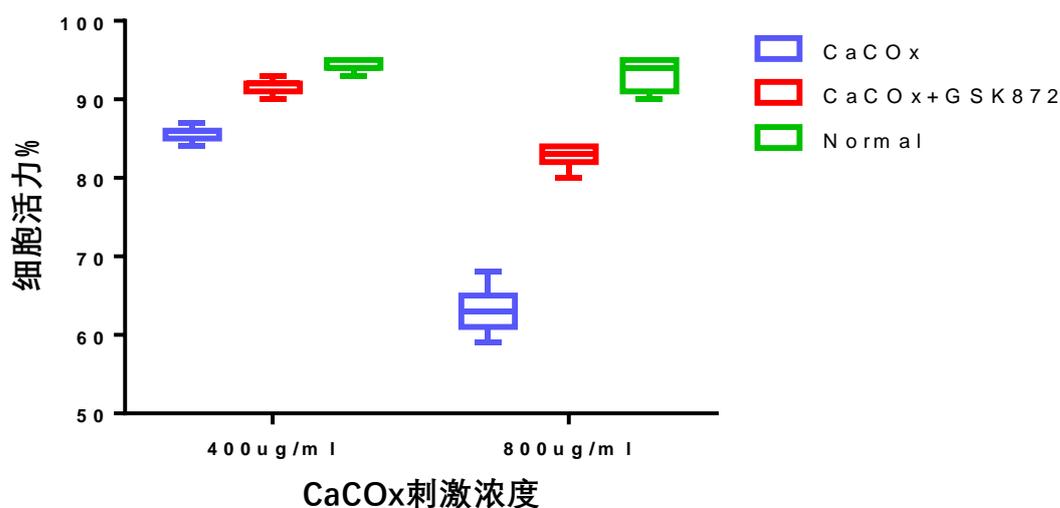


图 2-3 cck-8 法检测细胞活力结果

(五) 400/800 ug/ml 一水草酸钙刺激下各组细胞 LDH 释放率 实验结果 (图 2-4)

使用 LDH 释放法检测一水草酸钙及 GSK872 对细胞毒性影响。与空白对照组相比，模型组细胞一水草酸钙刺激产生明显细胞毒性 ($P<0.05$)；与模型组对比，抑制剂组使用 GSK872 能减轻一水草酸钙对 TCMK-1 的细胞毒性 ($P<0.05$)。使用晶体刺激浓度 800ug/ml 相比 400ug/ml，以上差异更加明显。

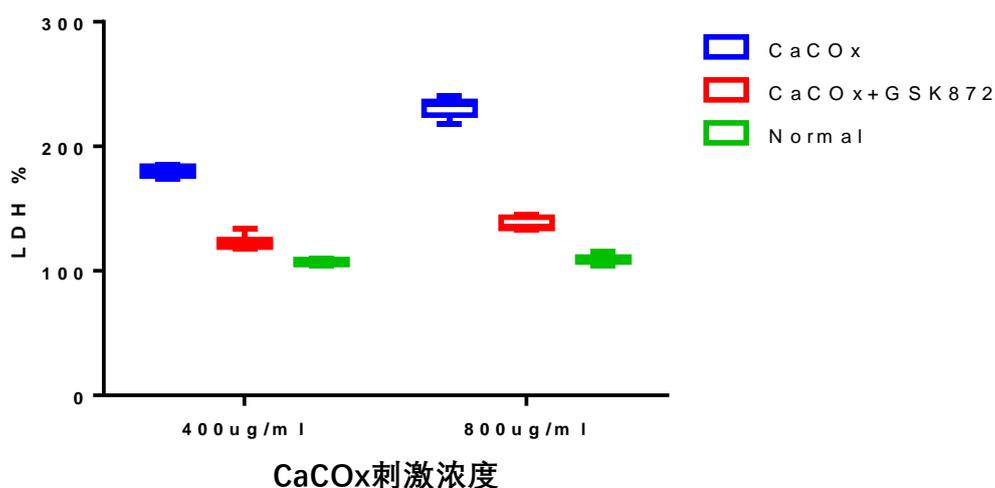


图 2-4 LDH 释放率检测细胞毒性结果

(六) 400/800 ug/ml 一水草酸钙刺激下各组细胞活性氧表达情况 (图 2-5)

在一水草酸钙刺激前原位加载探针，然后按实验分组刺激细胞，通过荧光酶标仪检测细胞活性氧水平，结果提示与空白对照组相比，一水草酸钙刺激细胞后小鼠肾小管上皮细胞活性氧表达增加 ($P < 0.05$)；与模型组相比，GSK872 的预加入可减少一水草酸钙诱导产生的活性氧 ($P < 0.05$)。晶体刺激浓度 800ug/ml 相比 400ug/ml，以上差异同样更加明显。

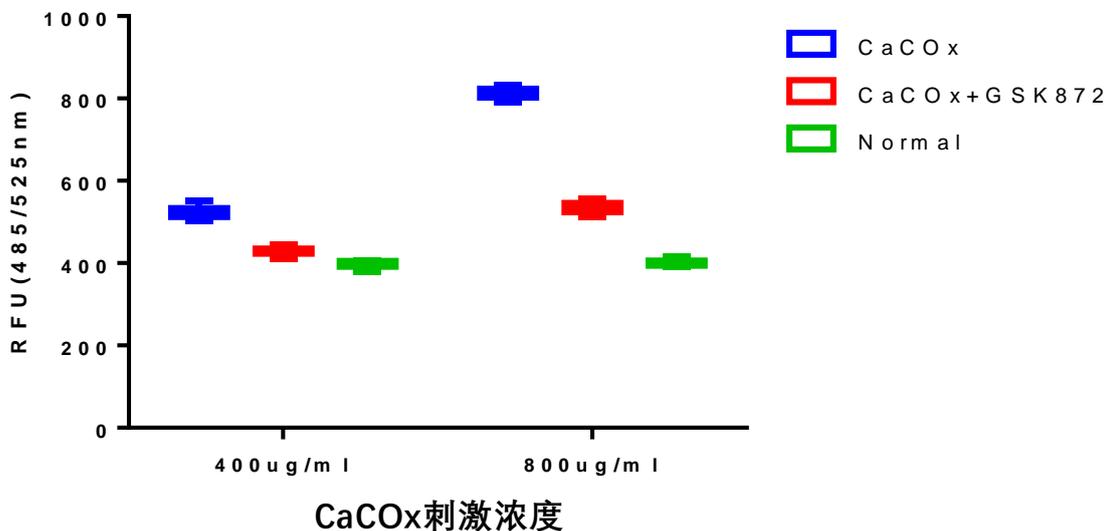


图 2-5 荧光酶标仪检测活性氧水平结果

(七) 400/800ug/ml 一水草酸钙刺激下各组晶体黏附量结果(图 2-6)

400ug/ml: 抑制剂组较模型组黏附量明显减少，差异有统计学意义

800ug/ml: 抑制剂组较模型组黏附量相仿，差异无统计学意义

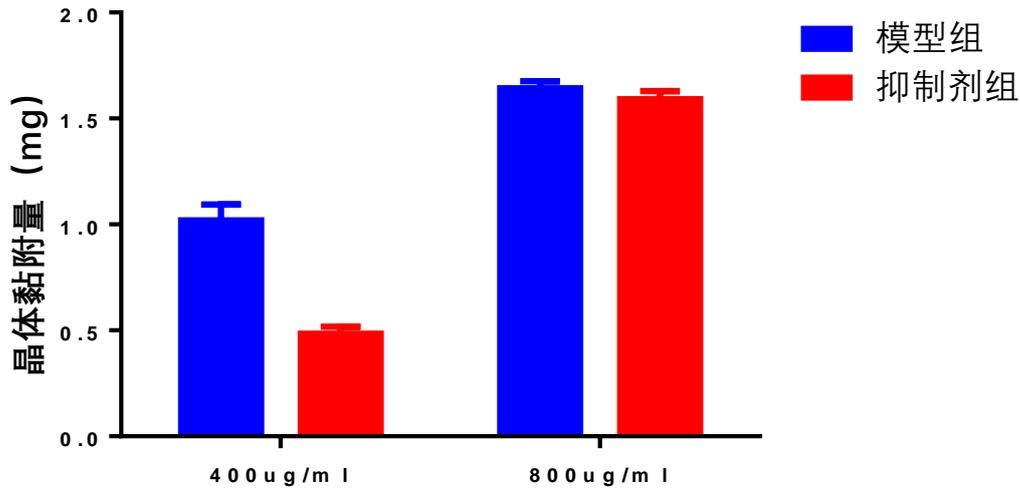


图 2-6 晶体黏附量检测结果

三、讨论

本研究以小鼠肾小管上皮细胞 TCMK-1 为研究对象,探究体外环境下细胞表面一水草酸钙晶体黏附与坏死性凋亡的关系。实验结果表明,随着一水草酸钙晶体投入浓度的增大,细胞坏死性凋亡水平和细胞表面晶体黏附程度随之加重。通过抑制剂组和模型组相比较表明,预加入 GSK872 后可以在低浓度(200、400ug/ml)的晶体刺激条件下明显减少细胞表面的晶体黏附,并且细胞活力及活性氧表达水平可以明显逆转,坏死性凋亡特异性蛋白表达明显降低。这首先说明了 RIPK3 选择性抑制剂对于坏死性凋亡途径的开关作用非常明显。同时这也验证了 Mulay 发现的坏死性凋亡是作为草酸钙晶体刺激下主要的细胞损伤方式的观点。并且通过该实验发现在较低浓度晶体刺激下减轻细胞坏死性凋亡能够逆转细胞表面对晶体的黏附作用。但是通过显微镜及晶体黏附量测定可以发现,调节坏死性凋亡只能减轻却不能消除晶体-细胞黏附,这可能和细胞损伤、程序性死亡的模式及生化途径众多有关,导致少数位点的抑制几乎不可能消除细胞损伤,比如 GSK872 选择性抑制了细胞坏死性凋亡,但也启动了细胞凋亡的死亡模式。尤其在一水草酸钙晶体浓度达到 800ug/ml 以上时这一保护作用不再有效。镜下可见,当晶体密度达到一定程度,晶体颗粒间依靠静电作用相互吸引,聚集形成不定型沉淀。由于这些滞留下来的不定型沉淀吸引了大量微晶颗粒并且占据空间远大于单晶颗粒,因此抑制剂组和对照组相比,即使使用坏死性凋亡抑制剂减轻了细胞损伤,也没有改变晶体黏附量的差异。通过检测细胞活力、细胞毒性、活性氧水平以及坏死性凋亡靶蛋白表明,晶体浓度达到 800ug/ml 以上时,预使用 GSK872 仍旧能够减轻晶体性细胞损伤,减少活性氧产生的水平,但是细胞表面晶体黏附总量

没有显示出差异。另外从坏死性凋亡的体外实验可以发现坏死性凋亡途径确实在肾结石形成过程有部分调控作用，但不是主导作用。因此可以说 SIRT3 调节肾结石的形成可能是通过包括调节坏死性凋亡在内的多种途径，坏死性凋亡的减轻只能起到部分作用。在体外环境下，较高浓度的晶体颗粒通过黏附聚集形成不定型颗粒，因此阻断晶体颗粒聚集可能更有助于抑制肾结石的形成。

综上所述，低浓度（200、400ug/ml）一水草酸钙晶体刺激细胞时，减轻肾小管上皮细胞坏死性凋亡可以部分恢复细胞活力，减少细胞毒性，减少活性氧产生，使细胞表面晶体黏附沉淀减少。当浓度超过 800ug/ml，一水草酸钙晶体颗粒倾向于相互聚集形成不定型沉淀黏附滞留于细胞表面，调节坏死性凋亡减轻细胞损伤并不能使细胞表面沉淀滞留减少。

第三部分 体外探究使用聚合物聚乙二醇对肾小管上皮细胞表面晶体黏附的影响

引言

肾结石的形成过程包括一系列物理和化学事件：尿结石成分的过饱和沉淀、结晶成核、生长和聚集，以及在肾小管上皮细胞表面的粘附和滞留，穿透肾乳头上皮，在集合系统中逐渐形成结石^[5]。肾小管上皮细胞内晶体的粘附和聚集是肾结石形成的关键步骤。晶体聚集既发生在晶体与细胞表面，也同样发生在晶体颗粒之间。

第二部分验证了细胞损伤能增强细胞表面晶体黏附，在低负荷晶体条件下减少细胞损伤可以减轻晶体黏附。但是高负荷晶体条件下，由于晶体之间聚合形成不定型沉淀并黏附于细胞，减轻细胞损伤并不能改变晶体黏附量。因此有望通过使用试剂阻碍晶体的聚集，达到抑制结石形成的目的。

聚乙二醇（PEG）是一种无毒的高分子聚合物，具有良好的水溶性，同时具有优良的润滑性、保湿性、分散性、粘接性等特性。PEG 可吸附于固体颗粒的表面，使固体粒子表面形成双分子层结构的吸附层，提高了固体颗粒间的空间位阻。其外层极性端与水有较强亲合力，增加了固体粒子被水润湿的程度，并使固体颗粒表面电荷增加，相互间因静电斥力而远离。其分散剂的特性使体系均匀，固体颗粒保持悬浮稳定不沉淀，使整个体系物化性质一致^[13]。另外有研究发现 PEG 能修复破裂的生物膜，抑制细胞器线粒体膜的通透性转换和减少氧化应急损伤从而修复损伤的脊髓，并将它应用于神经损伤后的修复^[14]。因此聚乙二醇为代表的聚合物有希望应用于肾结石的防治，对肾结石的形成过程的干预作用值得研究。

因此本部分通过体外细胞实验探究使用 PEG4000 减少细胞表面晶体黏附以及对抗氧化应激的作用，并通过观察细胞晶体黏附情况，检测细胞活力、细胞毒性、活性氧水平，验证其作用机制。

一、材料与方法

（一）实验材料与方法

1、实验仪器

仪器

生产厂家

超净操作台

Thermo Fisher Scientific 公司

细胞培养箱	上海博迅实业有限公司
相差显微镜	德国徕卡公司
低温超速离心机	Thermo Fisher Scientific 公司
电泳仪	美国伯乐公司
荧光酶标仪	Thermo Fisher Scientific 公司
-80°冰箱	Thermo Fisher Scientific 公司

2、实验试剂及耗材

试剂名称	生产厂家
活性氧阳性对照(Rosup, 50mg/ml)	碧云天
PBS 缓冲液	Adamas life
DMEM 高糖培养基	Adamas life
胎牛血清	Hyclone
青霉素/链霉素溶液	Gibco
0.25%胰蛋白酶 (含 EDTA)	Gibco
一水草酸钙晶体	Adamas
GSK872	葛兰素史克
CCK-8 试剂盒	碧云天
乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	碧云天

(二) 实验细胞

小鼠肾小管上皮细胞系 TCMK-1 购自美国 ATCC。

(三) 实验方法

1、建模与分组

将建模与 TCMK-1 细胞培养至密度约 90%，并将培养皿随机分组：

a 组：培养基中加入配置好的一水草酸钙混悬液至 800ug/ml，摇床上以 80r/min 放置 15 分钟，使晶体与细胞充分作用，放入培养箱孵育 12 小时

b 组：培养基中加入活性氧刺激剂 Rosup (原试剂按 1: 3000 稀释)，放入培养箱孵育 30min，取出培养皿后加入配置的一水草酸钙混悬液至 800ug/ml，摇床上以 80r/min 放置 15 分钟，使晶体与细胞充分作用，再放入培养箱孵育 12 小时

c 组：培养基中加入活性氧刺激剂 Rosup (浓度按 1: 3000 稀释)，放入培养箱孵育 30min，取出培养皿后加入 10%培养基体积的 PEG4000 充分混匀，再加入配置的

一水草酸钙混悬液至 800ug/ml, 摇床上以 80r/min 放置 15 分钟, 使晶体与细胞充分作用, 再放入培养箱孵育 12 小时

d 组: 培养基中加入 10%培养基体积的 PEG4000 充分混匀, 再加入配置的一水草酸钙混悬液至 800ug/ml, 摇床上以 80r/min 放置 15 分钟, 使晶体与细胞充分作用, 再放入培养箱孵育 12 小时

e 组: 培养基中加入配置好的一水草酸钙混悬液至 800ug/ml, 摇床上以 80r/min 放置 15 分钟, 使晶体与细胞充分作用, 再向培养基中加入 10%培养基体积的 PEG4000 充分混匀, 放入培养箱孵育 12 小时

2、观察粘附情况: 从培养箱取出培养皿, 弃去晶体, 用不含钙镁的 PBS 缓冲液洗涤细胞三次以除去未结合的晶体。再加入 PBS 缓冲液铺底, 相差倒置显微镜下观察 TCMK-1 细胞增殖情况及细胞表面的晶体粘附情况。

3、细胞毒性检测实验 (CCK-8 法) 操作同第二部分 1.3.3

4、LDH 释放法检测细胞毒性 操作同第二部分 1.3.4

5、活性氧水平检测实验 操作同第二部分 1.3.5

6、统计分析 实验数据采用平均值±标准差的形式表示, 用 t 检验比较两组数据之间的差异。本次实验采用 Graph Pad Prism 6.0 软件对实验数据进行统计学分析。P<0.05 被认为有显著的统计学意义。

二、结果

(一) 各分组细胞增殖情况及一水草酸钙晶体-细胞黏附情况

(图 3-1)

一水草酸钙浓度为 800ug/ml 条件下, a 组细胞表面晶体黏附明显, 与 a 组对照比较, b 组贴壁细胞密度轻度减少, 形态肿胀, 晶体黏附沉积更明显, c 组表现出贴壁细胞密度轻度减少, 部分细胞形态肿胀, 部分细胞表面晶体黏附, 较 a 组减少, d 组细胞形态及密度基本正常, 细胞表面晶体黏附明显减轻, e 组细胞形态密度基本正常, 细胞表面晶体黏附与 a 组相仿。

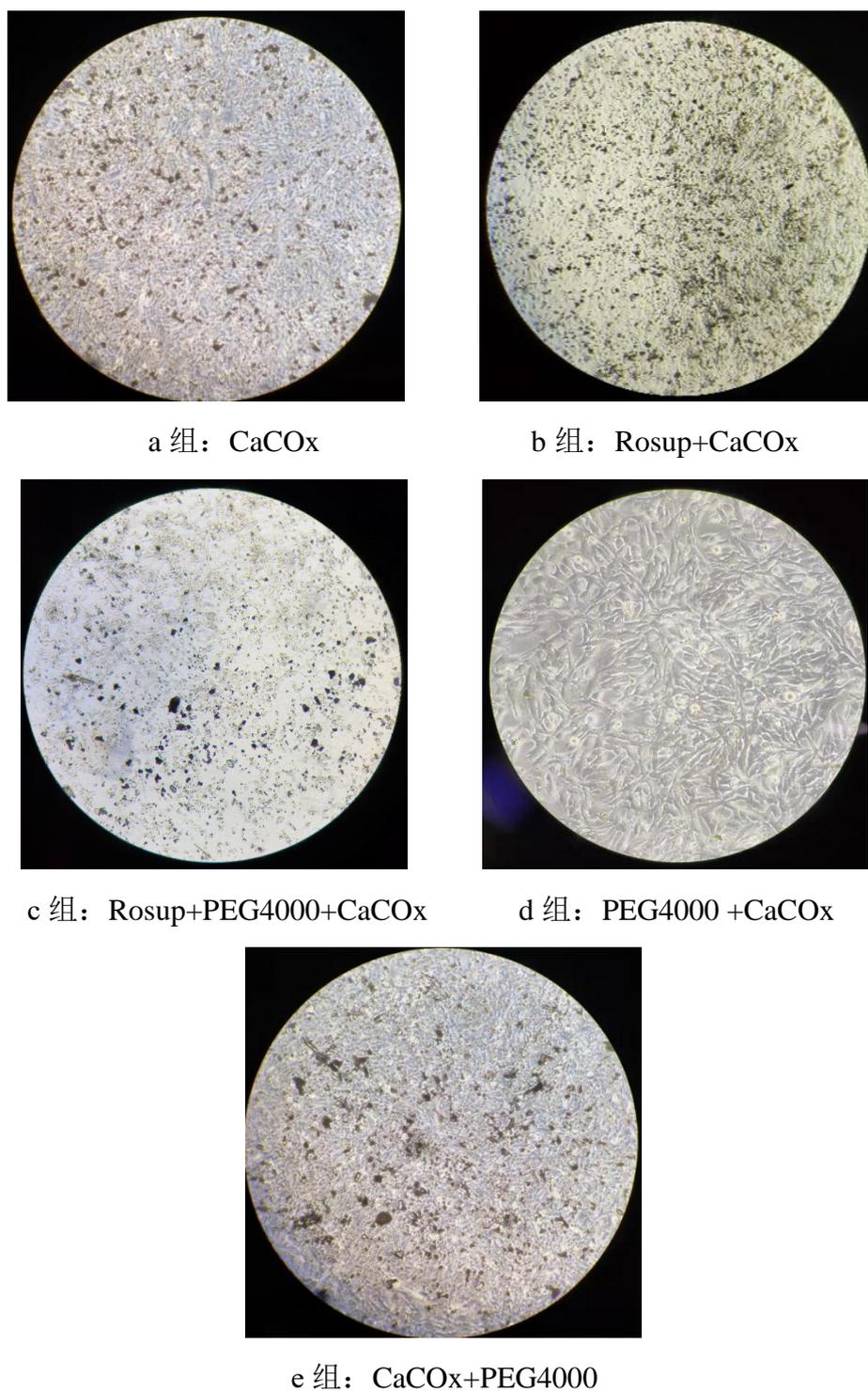


图 3-1 各组镜下细胞晶体黏附情况（放大倍数：d 组 10×20，其余 10×10）

（二）CCK-8 法检测细胞活力结果（图 3-2）

在 96 孔细胞培养板中按照实验分组处理细胞，使用 CCK-8 法检测细胞活力。与 a 组对照比较，b 组细胞活力降低，c 组细胞活力降低，比 b 组程度轻，d 组细胞活力

受影响程度最低，细胞活力较 a 组明显升高。以上差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。e 组细胞活力与 a 组相比无统计学意义 ($P > 0.05$)

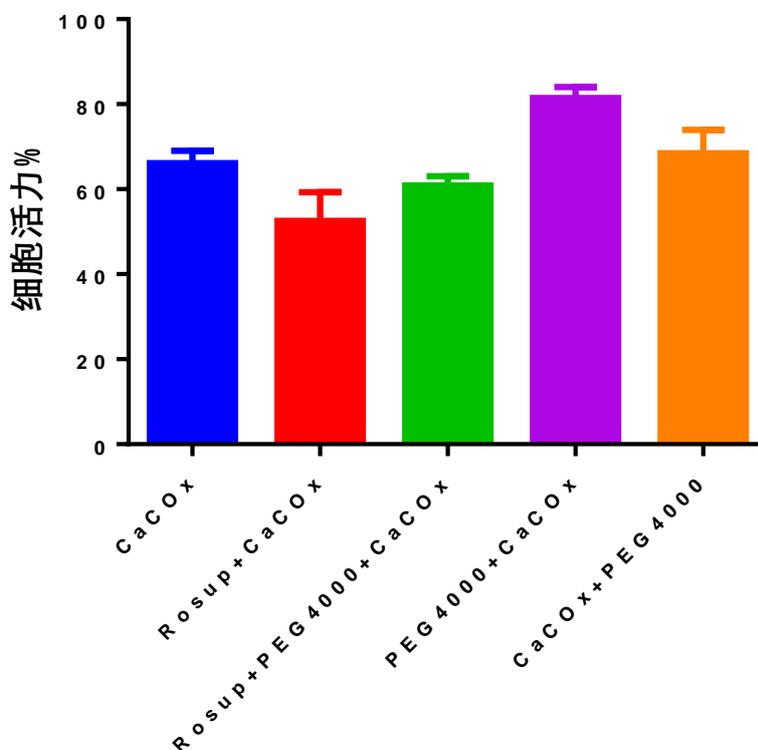


图 3-2 各组细胞 cck-8 法检测细胞活力

(三) LDH 释放法检测细胞毒性实验结果 (图 3-3)

在 96 孔细胞培养板中按照实验分组处理细胞，使用 LDH 释放法检测细胞受损程度。与 a 组对照比较，b 组细胞毒性损伤明显增加，c 组细胞毒性损伤较 a 组增加，程度较 b 组减低，d 组细胞受影响最小，毒性损伤较 a 组明显减低，以上差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，e 组细胞毒性损伤与 a 组相比无统计学意义。

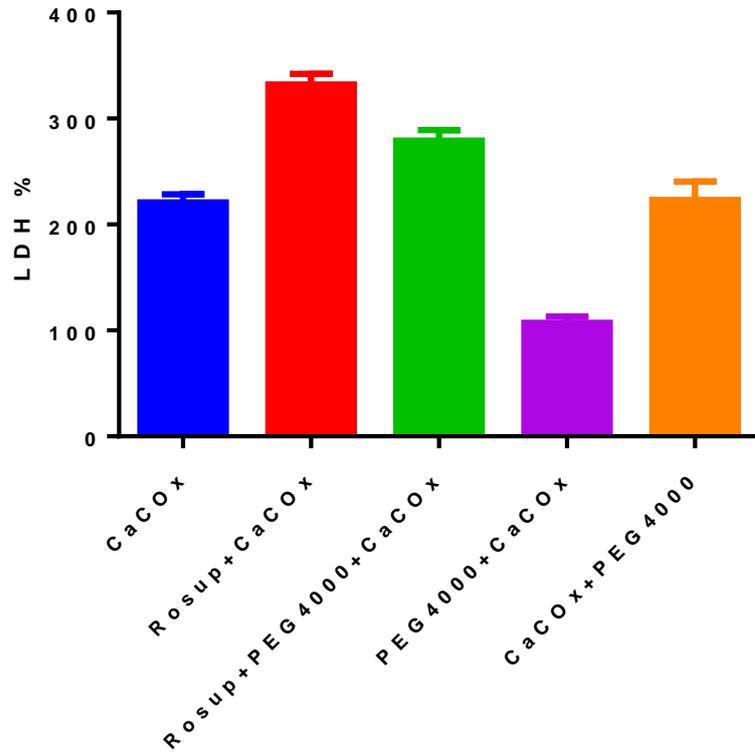


图 3-3 各组细胞 LDH 法检测细胞毒性

(四) 活性氧检测实验结果 (图 3-4)

在 96 孔黑色底细胞培养板中按照实验分组处理细胞, 使用荧光酶标仪设置激发波长 485 nm, 发射波长 525 nm 检测细胞荧光水平。与 a 组对照比较, b 组细胞 ROS 水平明显增加, c 组细胞 ROS 水平较 a 组增加, 程度较 b 组减低, d 组细胞 ROS 水平最低, 较 a 组明显减低, 以上差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), e 组细胞 ROS 水平与 a 组相比无统计学意义。

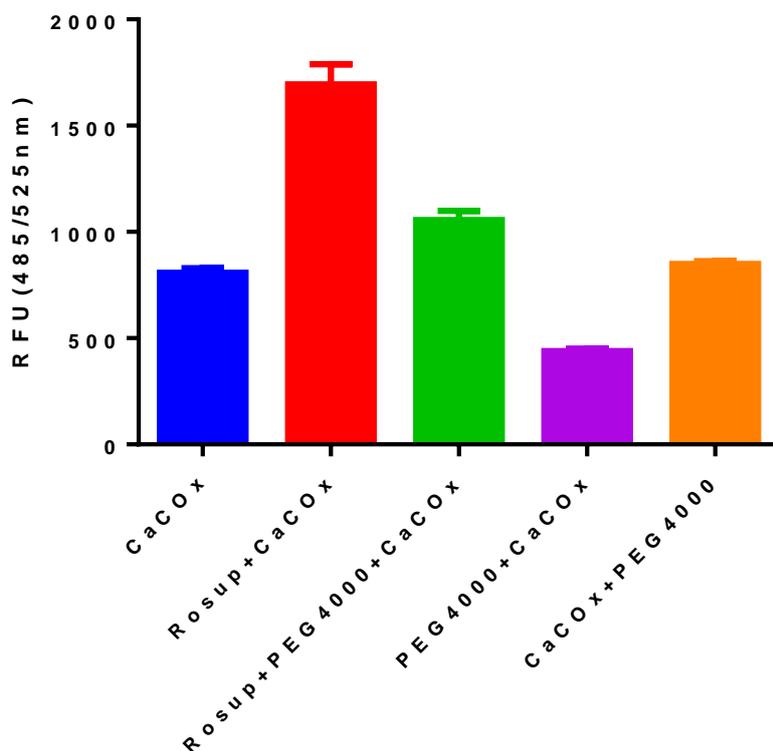


图 3-4 荧光酶标仪检测各组细胞 ROS 水平

三、讨论

本研究仍以小鼠肾小管上皮细胞为 TCMK-1 为研究对象,探究在较高一水草酸钙晶体浓度环境下使用 PEG4000 降低细胞表面一水草酸钙晶体黏附滞留的作用和机制。实验结果显示,与 a 组相比, b 组使用活性氧刺激剂作用的细胞活力减低,细胞损伤加重, ROS 水平升高,细胞表面晶体黏附加重。但 c 组和 b 组相比,使用 PEG4000 可部分逆转受活性氧刺激剂影响的受损细胞的活力,减轻细胞损伤,减低 ROS 水平,再加入高浓度一水草酸钙晶体后细胞表面晶体黏附也明显减轻,说明使用 PEG 不仅可以对小鼠肾小管上皮细胞起到减少氧化应激损伤的作用,并能够减少一水草酸钙晶体聚集沉淀,在细胞受损后仍能够明显减轻细胞表面晶体黏附。d 组在加入一水草酸钙晶体之前加入 PEG 4000,不仅能够使晶体保持悬浮稳定,也同样避免了细胞的晶体性损伤,使细胞表面晶体黏附沉积显著减少。e 组在加入一水草酸钙之后加入 PEG4000,细胞表面晶体黏附相比 a 组没有减少,细胞损伤和 a 组无差异,说明 PEG4000 是在晶体与细胞接触作用之前起到分散作用,而没有逆转已经形成的晶体-细胞黏附的作用。

肾结石形成的机制是一个极其复杂的过程,晶体的生长、聚集、粘附和滞留在肾

小管上皮细胞都是重要环节，并且肾小管上皮细胞损伤促进晶体的黏附和滞留。第二部分验证了坏死性凋亡是草酸钙晶体损伤细胞的主要模式，但通过使用 RIPK3 抑制剂成功抑制了细胞发生坏死性凋亡后只能在一定晶体浓度范围内减轻细胞表面的晶体黏附。实验发现当晶体浓度达到 800ug/ml 以上时，晶体相互聚集并沉淀滞留于细胞表面，因此有理由相信抑制草酸钙微晶体间相互聚集以及让溶液中聚集形成的草酸钙保持悬浮稳定性是抑制肾结石形成的另一重要机制。第三部分实验验证了聚乙二醇(PEG)作为无毒的亲水性高分子聚合物，可以在与细胞接触作用之前起到分散剂的作用，并能够减轻细胞的氧化应激反应，部分逆转细胞的毒性损伤。PEG4000 吸附于固体颗粒的表面，使凝聚的固体颗粒表面易于湿润，其氧醚基也易与含氧的胶粒表面产生同名离子亲和作用使得聚乙二醇较容易地吸附于胶粒表面形成一层高分子保护膜包围粒子，而其分子链呈蛇形伸向水溶液中使得具有一定的厚度，故当带同性电荷的质点互相接近时，静电斥力加上高分子的空间位阻效应，起到分散作用，使一水草酸钙晶体悬浮性能增加，保持物理化学性质均匀稳定不沉淀^[13]。

展望肾结石的治疗手段，目前仍以外科手术为主，对于成石过程还没有专用药物能做到有效干预。而对于术后残留碎片的管理也是泌尿外科实践中常见且有争议的问题。尽管使用输尿管软镜在内的微创手术旨在实现无结石状态，但是考虑手术时间，手术并发症等情况容易造成结石残留。另外对于临床无意义结石残留（CIRF）的不同定义的原因，使临床医生过于乐观地预测他们的患者在手术或输尿管镜检后没有结石残留的状态^[28]。尽管临床上统计结石清除率时将 4 毫米或更小的残留结石排除在外，但有研究指出结石微创手术后，临床上无意义的残余碎片与梗阻、感染性疾病和复发性结石形成有关^[29]，并提出术前结石负荷与残留结石出现症状之间存在显著关系^[30-32]。随着大石头的破碎，更多的小碎屑出现并分散在肾乳头附近和集合系统中。这些晶体小碎片损伤肾乳头周围上皮细胞并充当结石生长聚集的晶核。以草酸钙结石为例，有研究指出细小的草酸钙晶体同肾小管上皮细胞相互作用导致细胞损伤，促进细胞晶体黏附沉积，导致肾结石的形成^[33]。体外实验上这一点尤为明显。因此我认为本课题对细胞表明晶体黏附滞留的机制研究可能对肾结石复发的预防有参考意义。对于术后临床上无意义的残余碎片有必要重新评估其对于肾结石复发的作用^[34]，并通过手术过程预防性用药，减少微小残余碎片的黏附和聚集。

小 结

(1) 肾脏草酸钙晶体沉积涉及 RIPK3-MLKL 介导的坏死性凋亡，小鼠肾草酸钙晶体沉积诱发肾小管上皮细胞坏死性凋亡明显增加，SIRT3 过表达可以调节坏死性凋亡，减轻晶体性肾损伤，并减少肾脏晶体沉积。

(2) 体外研究表明，当一水草酸钙晶体浓度在低水平（6cm 培养皿 400ug/ml 以下）时，抑制细胞坏死性凋亡可以一定程度地减轻细胞损伤并减少细胞表面晶体黏附沉积。当一水草酸钙晶体浓度超过 800ug/ml 时，细胞表面晶体聚集形成不定型沉淀，减轻细胞坏死性凋亡细胞损伤不能减少晶体黏附沉积总量。

(3) 预使用聚合物 PEG4000 能够使悬液体系中晶体颗粒保持悬浮稳定状态，并能够减轻细胞氧化应激损伤，显著减少细胞表面晶体黏附沉积。

参考文献

1. ZENG G, MAI Z, XIA S, et al. Prevalence of kidney stones in china: An ultrasonography based cross-sectional study[J]. *BJU Int*, 2017. **120**(1): 109-116.
2. SHI X L, PENG Y H, LI X, et al. Propensity score-matched analysis comparing retrograde intrarenal surgery with percutaneous nephrolithotomy for large stones in patients with a solitary kidney[J]. *Journal of Endourology*, 2018. **32**(3): 198-204.
3. SHI X L, PENG Y H, LI L, et al. Renal function changes after percutaneous nephrolithotomy in patients with renal calculi with a solitary kidney compared to bilateral kidneys[J]. *Bju International*, 2018. **122**(4): 633-638.
4. MOE O W. Kidney stones: Pathophysiology and medical management[J]. *Lancet*, 2006. **367**(9507): 333-344.
5. ASSIMOS D G. Re: Hyperoxaluria requires tnf receptors to initiate crystal adhesion and kidney stone disease[J]. *Journal of Urology*, 2017. **197**(3): 736-+.
6. MANDAL T, WARD M D. Determination of specific binding interactions at l-cystine crystal surfaces with chemical force microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013. **135**(15): 5525-5528.
7. KHAN S R. Calcium oxalate crystal interaction with renal tubular epithelium, mechanism of crystal adhesion and its impact on stone development[J]. *Urol Res*, 1995. **23**(2): 71-79.
8. SOMEYA S, YU W, HALLOWS W C, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction[J]. *Cell*, 2010. **143**(5): 802-812.
9. YANG W, NAGASAWA K, MUNCH C, et al. Mitochondrial sirtuin network reveals dynamic sirt3-dependent deacetylation in response to membrane depolarization[J]. *Cell*, 2016. **167**(4): 985-+.
10. SONG S, DING Y, DAI G L, et al. Sirtuin 3 deficiency exacerbates diabetic cardiomyopathy via necroptosis enhancement and nlrp3 activation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021. **42**(2): 230-241.
11. WEINLICH R, OBERST A, BEERE H M, et al. Necroptosis in development, inflammation and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. **18**(2): 127-136.
12. YANG Z T, WANG Y, ZHANG Y Y, et al. Rip3 targets pyruvate dehydrogenase complex to increase aerobic respiration in tnf-induced necroptosis[J]. *Nature Cell Biology*, 2018. **20**(2): 186-+.
13. NALAM P C, CLASOHN J N, MASHAGHI A, et al. Macrotribological studies of poly(l-lysine)-graft-poly(ethylene glycol) in aqueous glycerol mixtures[J]. *Tribology Letters*, 2010. **37**(3): 541-552.
14. PASKAL A M, PASKAL W, PIETRUSKI P, et al. Polyethylene glycol: The future of posttraumatic nerve repair? Systemic review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. **20**(6).
15. ATMANI F, SADKI C, AZIZ M, et al. Cynodon dactylon extract as a preventive and curative agent in experimentally induced nephrolithiasis[J]. *Urological Research*, 2009. **37**(2): 75-82.
16. WILLIAMS J C, WORCESTER E, LINGEMAN J E. What can the microstructure of stones tell us?[J]. *Urolithiasis*, 2017. **45**(1): 19-25.
17. XI Q, OUYANG J, PU J, et al. High concentration of calcium stimulates calcium oxalate crystal attachment to rat tubular epithelial nrk cells through osteopontin[J]. *Urology*, 2015. **86**(4): 844

- e841-845.
18. SUN X Y, GAN Q Z, OUYANG J M. Calcium oxalate toxicity in renal epithelial cells: The mediation of crystal size on cell death mode[J]. *Cell Death Discov*, 2015. **1**: 15055.
 19. MORIGI M, PERICO L, ROTA C, et al. Sirtuin 3-dependent mitochondrial dynamic improvements protect against acute kidney injury[J]. *J Clin Invest*, 2015. **125**(2): 715-726.
 20. PENG Y, YANG C, SHI X, et al. Sirt3 suppresses calcium oxalate-induced renal tubular epithelial cell injury via modification of foxo3a-mediated autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(2): 34.
 21. WILSON N S, DIXIT V, ASHKENAZI A. Death receptor signal transducers: Nodes of coordination in immune signaling networks[J]. *Nat Immunol*, 2009. **10**(4): 348-355.
 22. MULAY S R, DESAI J, KUMAR S V, et al. Cytotoxicity of crystals involves ripk3-mlkl-mediated necroptosis[J]. *Nature Communications*, 2016. **7**.
 23. SUN X Y, OUYANG J M, GAN Q Z, et al. Renal epithelial cell injury induced by calcium oxalate monohydrate depends on their structural features: Size, surface, and crystalline structure[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2016. **12**(11): 2001-2014.
 24. XI J H, JING J F, ZHANG Y B, et al. Sirt3 inhibited the formation of calcium oxalate-induced kidney stones through regulating nrf2/ho-1 signaling pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019. **120**(5): 8259-8271.
 25. UMEKAWA T, HATANAKA Y, KURITA T, et al. Effect of angiotensin ii receptor blockage on osteopontin expression and calcium oxalate crystal deposition in rat kidneys[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(3): 635-644.
 26. KUSMARTSEV S, DOMINGUEZ-GUTIERREZ P R, CANALES B K, et al. Calcium oxalate stone fragment and crystal phagocytosis by human macrophages[J]. *J Urol*, 2016. **195**(4 Pt 1): 1143-1151.
 27. CHIANGJONG W, THONGBOONKERD V. Calcium oxalate crystals increased enolase-1 secretion from renal tubular cells that subsequently enhanced crystal and monocyte invasion through renal interstitium[J]. *Scientific Reports*, 2016. **6**.
 28. ULVIK O, HARNESHAUG J R, GJENGSTO P. What do we mean by "stone free," and how accurate are urologists in predicting stone-free status following ureteroscopy?[J]. *J Endourol*, 2021. **35**(7): 961-966.
 29. EMMOTT A S, BROTHERHOOD H L, PATERSON R F, et al. Complications, re-intervention rates, and natural history of residual stone fragments after percutaneous nephrolithotomy[J]. *J Endourol*, 2018. **32**(1): 28-32.
 30. OZGOR F, SIMSEK A, BINBAY M, et al. Clinically insignificant residual fragments after flexible ureterorenoscopy: Medium-term follow-up results[J]. *Urolithiasis*, 2014. **42**(6): 533-538.
 31. LI X, HE L, LI J Z, et al. Medium-term follow-up of clinically insignificant residual fragments after minimal invasive percutaneous nephrolithotomy: Prognostic features and risk factors[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015. **8**(11): 21664-21668.
 32. YAMASHITA S, KOHJIMOTO Y, IBA A, et al. Stone size is a predictor for residual stone and multiple procedures of endoscopic combined intrarenal surgery[J]. *Scand J Urol*, 2017. **51**(2): 159-164.
 33. MATLAGA B R, WILLIAMS J C, JR., KIM S C, et al. Endoscopic evidence of calculus attachment to randall's plaque[J]. *J Urol*, 2006. **175**(5): 1720-1724; discussion 1724.
 34. STREPER N M, GALIDA M, BOLTZ S, et al. Is stone-free status after surgical intervention for

kidney stones associated with better health-related quality of life? - a multicenter study from the north american stone quality of life consortium[J]. Urology, 2021. **148**: 77-82.

综述

泌尿系结石动物模型的现状

泌尿系结石是一种非常常见的疾病,然而病因并不明确。为研究人类泌尿系结石,研究人员不断开发新的动物模型,获取对这一疾病的新认识,尤其近年来各种技术的快速发展,相关动物模型有了更多进展。为了更好地研究肾结石的病因和干预措施,需要从众多动物模型中选择更贴合人类肾结石的模型类型。按照 Randall 理论,肾乳头钙质沉着符合结石前病变的特点,因此本文将产生于肾乳头集合管或间质的晶体沉着也作为结石疾病的动物模型一并介绍。本文结合既往研究成果,来浅谈泌尿系结石的实验研究中动物模型现状及选择。

1、杂交育种

2002 年 David A. Bushinsky 等研究人员通过对高钙尿大鼠的筛选和近交,重复经过 54 代,培育出一种稳定遗传高钙尿特征的 Sprague-Dawley 大鼠系,并予以添加 1%、3% 或 5% 羟脯氨酸的饮食总共 18 周,通过收集尿液化学测定,处死大鼠取石行 X 射线衍射分析,并保存剩余肾脏用于制作切片行钙氧化物染色及组织化学分析^[1-2]。结果显示钙氧化物晶体在肾盂中过饱和析出使多数大鼠(30/31)形成了位于集合系统的草酸钙晶体沉积,成为经典的高钙尿相关肾结石模型(GHS)。其中晶体沉积的成分在正常饮食组主要为磷酸钙,3%羟脯氨酸饮食组则是磷酸钙草酸钙混合晶体,而5%羟脯氨酸饮食组只有草酸钙晶体^[3]。

GHS 模型自开发以来沿用至今,被近百项核心期刊文献研究所采用,为全面了解钙氧化物代谢障碍相关的肾钙化疾病及治疗方法做出重要贡献,但它在推广到临床实践中也存在局限性。从晶体成分上看,添加3%羟脯氨酸饮食组形成的晶体沉积为磷酸钙草酸钙混合成分,符合人类肾结石中混合性结石占多数的情况。从病理生理上看,该模型可作为高钙尿相关的肾结石模型,而高钙尿症是钙质肾结石患者中最普遍的代谢障碍,可以在30-60%的成人患者中检测到^[4]。但上述模型不能解释人类高钙尿症不能全部形成肾结石的异质性表现,也不能代表人类高钙尿症病理类型的多样性。从形态学看,该模型肾脏切片展现的结晶沉积物仅限位于集合系统,而人类肾结石往往在肾乳头区域会有结石前病变的病理表现^[5]。

2、成石试剂诱导

2.1 草酸钙肾结石大鼠模型

复习文献发现,多种试剂可用于诱导形成草酸钙肾结石的大鼠模型。方法有给予雄性大鼠 10mg/kg 草酸钠或者 2.5 kg/kg 羟基-L-脯氨酸(HLP)腹腔注射,饮水添加

3%乙醇酸, 以及饮食中添加 5%草酸钾、0.75%乙二醇 (EG) 或 5%HLP 的食物, 还有皮下植入渗透性微型泵持续释放草酸盐。通过以上试剂可诱导大鼠形成急性或慢性高草酸尿相关的草酸钙(CaOx)肾结石模型。其中以乙二醇法最为常用, 通过给予雄性大鼠 0.75%乙二醇饮食 8 周, 再进行尿液收集化学测定及肾脏切片组化分析, 其结果发现大鼠 3 天内可出现高草酸尿, 2 周内可出现草酸钙结晶尿, 3 周在大鼠肾小管上皮细胞胞内、胞间以及间质均可见草酸钙晶体沉积物, 4-6 周内肾盂腔形成草酸钙晶体沉积。但使用乙二醇会造成大鼠多器官损伤^[6]。草酸钙晶体首先在肾小管中沉积, 随着上皮细胞损伤和再生, 晶体移动到上皮细胞胞间和胞内, 部分晶体在炎症作用下进入间质被清除^[7]。最终草酸钙晶体最易沉积于肾皮髓交界部及肾乳头尖部, 在损伤上皮细胞后晶体沉积物暴露于肾盂腔, 并能够继续生长为肾结石^[8]。如果使用乙二醇法的同时, 饮食中添加维生素 D (1 万 U/d) 或 2%氯化铵, 可加速获得大鼠肾草酸钙晶体沉着^[9-11]。乙二醇和氯化铵组合给药可以将出现结晶尿时间从 2 周减少到 3 天, 肾草酸钙晶体沉着形成时间从 3 周减少到 1 周, 但同样具有毒性^[12]。饮食添加 5% HLP 的方法毒性相对乙二醇小, 在建立 GHS 大鼠模型中得到使用。而普通大鼠通过饮食添加 5%HLP 诱导 4 周, 可形成肾脏各部位草酸钙晶体的广泛沉积, 诱导 9 周, 晶体沉积物向肾乳头上皮下的集合管集中^[8]。另外有研究模拟自然饮食条件, 使用天然富含草酸盐的菠菜提取物 250mg/天持续 4 周也成功诱导形成了大鼠草酸钙, 且肾毒性小^[13]。

草酸钙结石是人类最常见的肾结石类型, 上述建模方法也最常用。从结石成分来看, 该模型通过高草酸盐摄入或增加草酸合成, 所产生的肾脏晶体沉积成分为草酸钙且不含磷酸钙, 而人类肾结石在肾乳头间质上皮沉积的晶体主要由磷酸钙和碳酸钙组成。从病理生理来看, 高草酸尿是草酸钙结石患者的常见代谢障碍, 人体多种诱因可形成高草酸尿。外源性草酸增加的原因可以是高草酸盐膳食, 肠道中钙和草酸盐含量不平衡导致草酸盐过度吸收, 以及肠道菌群紊乱等。内源性草酸增加的原因可以是生理性草酸合成增加或者原发性高草酸尿症。上述成石试剂诱导形成通过成石试剂建立的高草酸尿相关的草酸钙结石模型。通过草酸摄入或草酸合成增加构建的动物模型, 诱因区别于膳食低钙、菌群紊乱或原发性高草酸尿症诱导形成的草酸钙肾结石。从形态学来看, 该模型可在肾小管各节段形成钙氧化物晶体沉积, 并随后转移集中至肾乳头。而在人类特发性肾结石患者中, 肾脏的晶体沉积可位于肾髓质和肾乳头, 但没有肾脏广泛晶体沉积。只有在原发性高草酸尿症合并肾结石的患者中, 才会在肾脏的所有部位(包括皮质)以及肾单位的所有节段(包括近端肾小管)出现晶体沉积。

2.2 高磷负荷相关的大鼠肾磷酸钙晶体沉着模型

磷酸钙(磷灰石)也是钙质肾结石疾病中的常见成分。Satoshi Takasugi 等人采用

日本 Wistar 大鼠, 分组给予 10 周龄该雌性鼠高磷饮食(1.2% 磷)和正常磷饮食(0.3% 磷)持续 12 周, 经定量分析(样本在微量元素级浓硝酸中矿化并通过离子体光谱仪分析钙磷)和组织病理学分析显示, 和正常磷饮食组对照, 高磷饮食组均可获得肾脏磷酸钙晶体沉着^[14]。

该研究显示高磷饮食显著增加 Wistar 大鼠血清 1,25(OH)₂D 水平及肾钙浓度, 并且雌激素通过增加磷稳态调节因子 FGF23 水平协同作用于骨骼, 可诱导产生肾磷酸钙晶体沉着症及肾损伤, 而去卵巢治疗可缓解高磷摄入引起的肾钙质沉着症。该模型可用于研究高磷负荷导致的肾脏磷酸钙晶体沉积的病理表现, 但该模型对于临床上常见的磷酸钙肾结石的发病机制研究存在较大局限性。

2.2 草酸钙肾结石小鼠模型

尽管草酸钙肾结石的大鼠模型相对成功, 但生成可靠的小鼠模型似乎难度增加。与大鼠类似, 研究人员已经尝试通过施用乙二醇(EG), 羟基-L-脯氨酸和乙醛酸盐等试剂来诱导小鼠的草酸钙晶体沉着, 最常用方法为每日给小鼠腹腔内注射 80 mg/kg 乙醛酸盐溶液^[15]。通过以上药物诱导, 小鼠的肾小管液出现钙氧化物过饱和, 观察发现其肾晶体沉着在第一周增加, 短暂数日的平台期后肾脏晶体沉着开始减少, 2 周后晶体从肾脏消失。因此在正常条件下小鼠肾脏中难以维持草酸钙晶体沉积物^[16-17], 于是研究人员将外源性药物诱导与基因工程相结合来诱导肾结石小鼠模型。

3、基因敲除

3.1 结晶抑制因子缺失相关小鼠肾钙沉着症模型

有研究认为骨桥蛋白(OPN)和 Tamm-Horsfall 蛋白(THP)是钙氧化物晶体聚集的有效抑制剂以及晶体性肾病的重要防御因子, 可能是造成小鼠肾钙沉积难以稳定形成的原因^[18-19]。Neil J Paloian 等人通过胚胎干细胞中的靶向诱变产生 OPN 敲除小鼠并将其分组, 分别给与正常磷酸盐(0.5%磷)饮食和高磷酸盐饮食(1.5% 磷)11 周^[20]。与对照组比, 其高磷饮食组可导致小鼠肾钙沉着及尿毒症, 其特征是大量肾小管和间质磷酸钙沉积, 合并有显着的血管钙化。另一项研究使用同源重组方法来敲除小鼠胚胎干细胞中的 THP 基因, 给予均为 2 至 4 个月大的雄性 THP 敲除小鼠及野生型小鼠 1%乙二醇及 4 IU/mL 维生素 D3 饮食持续 1 个月, 通过肾脏 Von Kossal 组织化学染色及生化分析评估其结果, 76%THP 敲除小鼠的肾脏中出现钙氧化物晶体沉积, 而在野生型小鼠的肾脏中未检测到晶体沉积^[18]。另有研究显示, 10% 的骨桥蛋白(OPN)敲除小鼠和 14.3%Tamm-Horsfall 蛋白(THP)敲除小鼠自发地在肾乳头内形成磷酸钙的间质沉积物, 这在野生型小鼠中从未见过。而 OPN、THP 双敲除小鼠自发发生肾乳头钙沉积的比例(39%)更高^[21]。

3.2 原发性高草酸尿症相关小鼠肾草酸钙晶体沉着症模型

原发性高草酸尿症(PH)是先天性乙醛酸盐代谢病,其特征为难溶性草酸盐生成过多,以草酸钙的形式沉积于多个器官,病因是编码乙醛酸盐代谢酶的3种基因突变。草酸盐主要从尿中排泄,因此肾脏是其沉积的主要靶器官,许多病例进而发生终末期肾病。丙氨酸-乙醛酸氨基转移酶基因(AGXT)及乙醛酸还原酶/羟丙酮酸还原酶(GRHPR)的突变分别是导致1、2型原发性高草酸尿症的原因。Li Xingsheng等人通过在小鼠胚胎干细胞中对同源基因AGXT进行定向诱变,再将诱变小鼠同种杂交筛选出纯合AGXT敲除小鼠,表现为1型原发性高草酸尿症(PH1)。PH2型则通过逆转录病毒载体(VICTR37)插入小鼠GRHPR基因的第二个内含子,再经同种杂交产生纯合GRHPR敲除小鼠^[22]。在给与4周的羟脯氨酸喂养后,AGXT敲除小鼠及GRHPR敲除小鼠都产生肾钙质沉着症,GRHPR敲除小鼠更为严重,其肾功能严重丧失。

3.3 肾小管上皮离子转运功能障碍相关小鼠肾钙沉着症模型

肾小管离子转运相关调控因子及转运蛋白参与调节肾小管上皮细胞内外各种溶质的转运平衡。有研究通过靶向敲除小鼠的钠氢交换调控因子1(NHERF1)编码基因,以及NHERF1结合肾小管Na⁺-磷酸盐协同转运蛋白2a(Npt2a)编码基因,给与基因敲除小鼠正常饮食饲养6周并收集血尿进行分析,von Kossa染色检测肾钙沉积,结果相比对照鼠均表现出高钙尿及高尿酸尿,肾小管间质钙氧化物晶体数量和沉积程度明显增加^[23]。

有研究靶向敲除近端小管中的氯-草酸盐转运体编码基因,获得Slc26a1和Slc26a6敲除小鼠较野生型小鼠尿液和血浆中的草酸盐浓度分别高出2-3.5倍和1.5-2倍^[23-24]。但只有那些尿钙排泄增加的小鼠才会出现草酸钙晶体沉积和膀胱结石,进一步说明实验性诱导高草酸尿不足以在小鼠中产生肾钙质沉着症,伴随的高钙尿症和雄性性别等其他因素可能是获得晶体沉积的关键因素。另外胱氨酸尿症作为一种常染色体隐性遗传病,通过小鼠的SLC3A1和Slc7a9基因敲除成功构建胱氨酸尿症模型并产生胱氨酸结石^[25-26]。

3.4 Dent病相关肾钙沉着症模型

Dent病是人类一种X连锁疾病,主要是由一种编码电压门控氯离子通道CLC-5的基因突变引起的,在近端小管细胞中表达最高。Guggino小组通过小鼠的Clcn5基因敲除使小鼠表现出除佝偻病外人类Dent病的所有特征,主要包括低分子量蛋白尿、氨基酸尿、高钙尿、糖尿、肾钙质沉着症和进行性肾功能衰竭^[27]。

4、基因编辑

近年来以CRISPR/Cas9系统为代表的新型基因编辑技术的研究和应用得到迅速拓展。有研究通过CRISPR/Cas9基因编辑技术生成了一种新的I型原发性高草酸

尿症大鼠模型^[28]，该模型在部分人源化的 *Agxt* 基因中携带 D205N 突变。该 *Agxt* D205N 突变大鼠表现为丙氨酸乙醛酸转氨酶蛋白表达缺失，在 1 个月大时出现高草酸尿症，并在添加乙二醇饮食后表现出严重的肾草酸钙沉积。相反的，Nerea Zabaleta 等人利用 CRISPR/Cas9 介导的非必需酶的底物减少疗法 (SRT)成功治疗了模型鼠的 1 型原发性高草酸尿症。在接受治疗的模型鼠中，肾草酸盐累积得到了抑制，并完全免受草酸盐前体乙二醇的试验性攻击，预防了高草酸尿相关的肾钙质沉着症及肾结石的形成。为人类治愈这一疾病提供了新方向^[29]。

5、化学诱变

有研究通过腹部 X 射线来识别 N-乙基-N-亚硝基脲 (ENU) 诱变小鼠的肾间质来确定具有肾钙化遗传为常染色体显性性状的小鼠，成为研究肾钙化疾病的新模型工具。通过这种方法发现了一系列与肾钙化相关的突变基因型小鼠。其一种模型与编码含溴域蛋白 4 (Brd4)的基因中的 Met149Thr 错义突变有关^[30]，代表了一种特发性肾钙化模型。和其他肾钙沉着模型不同的是，通过 von Kossa 染色检测表明，Brd4+/M149T 小鼠在骨桥蛋白 (OPN) 和 Tamm-Horsfall 蛋白 (THP)共定位的肾乳头间质具有钙沉积物，类似于兰德爾斑块的乳头状钙化 (Randall 斑块被认为是广泛存在于肾结石患肾中的病理改变)。因此，Brd4 突变小鼠可能是更贴近临床的特发性肾结石动物模型。相同方法还发现 DNA 聚合酶辅助亚基 Gamma 2 (Polg2) 的 Tyr265Stop 突变获得了小鼠肾钙化模型^[31]，以及小鼠 Trp589Arg Galnt3 突变获得了高磷酸盐血症家族性肿瘤钙质沉着症的模型^[32]。

6、手术诱导

流行病学研究表明，接受过 Roux-en-Y 胃旁路术、小肠切除术与人类肾结石风险增加有关。有研究建立肠切除术模型，方法是让大鼠接受 40-45 cm 远端回肠切除术，然后给予 1%草酸钠、0.02%含钙饮食。术后 4-7 个月大鼠产生肾结石和位于皮质 (83%)、髓质 (73%) 和乳头状尖端 (47%) 的肾钙质沉着^[33]。观察到由草酸钙、磷灰石和碳酸钙组成的晶体充满大鼠肾集合管腔，阻塞破坏肾小管，乳头间质的晶体引起炎症，引起进行性乳头侵蚀。以此可用以研究人类回肠切除术或旁路术导致的肾结石。

7、电解质失衡

使用袢利尿剂治疗的危重早产新生儿也会产生肾钙沉着症。为此，Shamir Tuchman 等人^[34]研究将三周大的雄性 Sprague-Dawley 大鼠，持续给予联合低钠低氯饮食 (钠 <0.02%、氯化物 <0.005%)，加或不加呋塞米，均成功诱导产生中度至重度肾钙质沉着症，表明慢性钠和氯消耗引起的严重细胞外液浓缩可能在新生儿肾钙沉着症的发病机制中起重要作用。

8、果蝇模型

有研究发现果蝇具有肾细胞及 Malpighian 小管组成的肾脏器官，其中肾细胞可类似肾小球的方式起滤过作用，Malpighian 小管行使肾小管的类似功能并转运排泄物进入后肠。在偏振光显微镜下 Malpighian 小管呈现双折射特征可提示草酸钙晶体沉积，利用扫描电子显微镜 (SEM) 和红外光谱等光谱分析法可识别多种晶体沉积成分。研究人员使用 EG 或 HLP 诱导成年果蝇可在 6 小时内诱导产生草酸钙结石，使用 GAL4 /UAS 转基因系统成功构建阴离子转运蛋白 dPrestin 基因敲除及黄嘌呤脱氢酶 (XDH)基因敲除果蝇，在 Malpighian 小管分别观察到草酸钙结石和尿酸结石^[35]。

果蝇代表了可靠、快速、具有成本效益的模型，可实现在马氏小管内晶体形成过程中进行实时跟踪干预，但在使用中也存在较多限制，比如内源性草酸、钙盐等体内代谢方式与人类存在很大差异，食物、药物及排泄物也很难被精准测量和收集。

总之，肾钙质沉着症动物模型的开发是一项艰巨的任务，除了鼠类模型，还开发出了包括果蝇、兔、猪等多种动物模型，这些模型在模拟人类肾钙化疾病特征的同时也有其各自局限性。果蝇的代谢与人类差异较大，猪的建模成本限制了该模型的使用。大鼠和小鼠的肾脏与人类存在相似的肾小球单位、肾小管结构和毛细血管网等这些皮质和髓质结构，但也存在较多差异，比如人类肾单位密度更大，其肾脏是多乳头状的，而大鼠及小鼠肾脏是单乳头状的。通过不同的动物模型一定程度上解释了遗传和代谢危险因素之间的复杂相互作用促进了肾钙化疾病的发生，比如有尿液中钙、磷、草酸盐的过饱和析出、结晶抑制剂因子的表达异常及肾小管上皮离子转运蛋白异常等。通过动物模型的开发研究有望进一步探索肾钙化疾病的发病机制并评估新的干预措施。

参考文献

1. BUSHINSKY D A, FAVUS M J. Mechanism of hypercalciuria in genetic hypercalciuric rats. Inherited defect in intestinal calcium transport[J]. J Clin Invest, 1988. **82**(5): 1585-1591.
2. FRICK K K, KRIEGER N S, BUSHINSKY D A. Modeling hypercalciuria in the genetic hypercalciuric stone-forming rat[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2015. **24**(4): 336-344.
3. BUSHINSKY D A, ASPLIN J R, GRYNPAS M D, et al. Calcium oxalate stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats[J]. Kidney Int, 2002. **61**(3): 975-987.
4. SAKHAE K, MAALOUF N M, SINNOTT B. Clinical review. Kidney stones 2012: Pathogenesis, diagnosis, and management[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(6): 1847-1860.
5. KHAN S R, CANALES B K. Unified theory on the pathogenesis of randall's plaques and plugs[J]. Urolithiasis, 2015. **43 Suppl 1**: 109-123.
6. KHAN S R. Animal models of kidney stone formation: An analysis[J]. World J Urol, 1997. **15**(4): 236-243.
7. KHAN S R, THAMILSELVAN S. Nephrolithiasis: A consequence of renal epithelial cell exposure to oxalate and calcium oxalate crystals[J]. Mol Urol, 2000. **4**(4): 305-312.
8. KHAN S R, GLENTON P A, BYER K J. Modeling of hyperoxaluric calcium oxalate nephrolithiasis: Experimental induction of hyperoxaluria by hydroxy-L-proline[J]. Kidney Int, 2006. **70**(5): 914-923.
9. MARENGO S R, CHEN D H, EVAN A P, et al. Continuous infusion of oxalate by minipumps induces calcium oxalate nephrocalcinosis[J]. Urol Res, 2006. **34**(3): 200-210.
10. MCMARTIN K. Are calcium oxalate crystals involved in the mechanism of acute renal failure in ethylene glycol poisoning?[J]. Clin Toxicol (Phila), 2009. **47**(9): 859-869.
11. TZOU D T, TAGUCHI K, CHI T, et al. Animal models of urinary stone disease[J]. Int J Surg, 2016. **36**(Pt D): 596-606.
12. KHAN S R, SHEVOCK P N, HACKETT R L. Acute hyperoxaluria, renal injury and calcium oxalate urolithiasis[J]. J Urol, 1992. **147**(1): 226-230.
13. ALBERT A, TIWARI V, PAUL E, et al. Oral administration of oxalate-enriched spinach extract as an improved methodology for the induction of dietary hyperoxaluric nephrocalcinosis in experimental rats[J]. Toxicology Mechanisms and Methods, 2018. **28**(3): 195-204.
14. TAKASUGI S, SHIOYAMA M, KITADE M, et al. Involvement of estrogen in phosphorus-induced nephrocalcinosis through fibroblast growth factor 23[J]. Scientific Reports, 2020. **10**(1).
15. OKADA A, NOMURA S, HIGASHIBATA Y, et al. Successful formation of calcium oxalate crystal deposition in mouse kidney by intraabdominal glyoxylate injection[J]. Urological Research, 2007. **35**(2): 89-99.
16. KHAN S R, GLENTON P A. Experimental induction of calcium oxalate nephrolithiasis in mice[J]. J Urol, 2010. **184**(3): 1189-1196.
17. OKADA A, NOMURA S, HIGASHIBATA Y, et al. Successful formation of calcium oxalate crystal deposition in mouse kidney by intraabdominal glyoxylate injection[J]. Urol Res, 2007. **35**(2): 89-99.
18. MO L, HUANG H Y, ZHU X H, et al. Tamm-horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation[J]. Kidney Int, 2004. **66**(3): 1159-1166.
19. WESSON J A, JOHNSON R J, MAZZALI M, et al. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium

- oxalate crystal formation and retention in renal tubules[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(1): 139-147.
20. PALOIAN N J, LEAF E M, GIACHELLI C M. Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification[J]. *Kidney International*, 2016. **89**(5): 1027-1036.
21. MO L, LIAW L, EVAN A P, et al. Renal calcinosis and stone formation in mice lacking osteopontin, tamm-horsfall protein, or both[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **293**(6): F1935-1943.
22. LI X, KNIGHT J, FARGUE S, et al. Metabolism of (13)c5-hydroxyproline in mouse models of primary hyperoxaluria and its inhibition by rnai therapeutics targeting liver glycolate oxidase and hydroxyproline dehydrogenase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1862**(2): 233-239.
23. BECK L, KARAPLIS A C, AMIZUKA N, et al. Targeted inactivation of npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(9): 5372-5377.
24. DAWSON P A, RUSSELL C S, LEE S, et al. Urolithiasis and hepatotoxicity are linked to the anion transporter sat1 in mice[J]. *J Clin Invest*, 2010. **120**(3): 706-712.
25. TRAXER O, LECHEVALLIER E, SAUSSINE C. [cystinuria: Diagnosis and management][J]. *Prog Urol*, 2008. **18**(12): 832-836.
26. FELIUBADALO L, ARBONES M L, MANAS S, et al. Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-i and cystine urolithiasis[J]. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(17): 2097-2108.
27. GUGGINO S E. Mechanisms of disease: What can mouse models tell us about the molecular processes underlying dent disease?[J]. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 2007. **3**(8): 449-455.
28. ZHENG R, LI Y, WANG L, et al. Crispr/cas9-mediated metabolic pathway reprogramming in a novel humanized rat model ameliorates primary hyperoxaluria type 1[J]. *Kidney Int*, 2020. **98**(4): 947-957.
29. ZABALETA N, BARBERIA M, MARTIN-HIGUERAS C, et al. Crispr/cas9-mediated glycolate oxidase disruption is an efficacious and safe treatment for primary hyperoxaluria type i[J]. *Nature Communications*, 2018. **9**.
30. GORVIN C M, LOH N Y, STECHMAN M J, et al. Mice with a brd4 mutation represent a new model of nephrocalcinosis[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2019. **34**(7): 1324-1335.
31. GORVIN C M, AHMAD B N, STECHMAN M J, et al. An n-ethyl-n-nitrosourea (enu)-induced tyr265stop mutation of the DNA polymerase accessory subunit gamma 2 (polg2) is associated with renal calcification in mice[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2019. **34**(3): 497-507.
32. ESAPA C T, HEAD R A, JEYABALAN J, et al. A mouse with an n-ethyl-n-nitrosourea (enu) induced trp589arg galnt3 mutation represents a model for hyperphosphataemic familial tumoural calcinosis[J]. *PLoS One*, 2012. **7**(8): e43205.
33. O'CONNOR R C, WORCESTER E M, EVAN A P, et al. Nephrolithiasis and nephrocalcinosis in rats with small bowel resection[J]. *Urol Res*, 2005. **33**(2): 105-115.
34. TUCHMAN S, ASICO L D, ESCANO C, et al. Development of an animal model of nephrocalcinosis via selective dietary sodium and chloride depletion[J]. *Pediatr Res*, 2013. **73**(2): 194-200.
35. HIRATA T, CABRERO P, BERKHOLZ D S, et al. In vivo drosophila genetic model for calcium oxalate nephrolithiasis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012. **303**(11): F1555-1562.