

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.01.03

❖ 论著 ❖

## 富马酸二甲酯和肾草酸钙结石模型大鼠氧化应激的关系

马志强, 左岩, 张翼

(石家庄第三医院泌尿外科, 河北 石家庄 050000)

**【摘要】目的:** 探讨富马酸二甲酯 (DMF) 和肾草酸钙结石模型大鼠氧化应激的关系。**方法:** 45 只雄性 SD 大鼠, 随机分为对照组, 模型组和 DMF 组, 每组 15 只。对照组和模型组大鼠每天给予双蒸水灌胃 1 次; 模型组大鼠每天一次性腹腔注射一水乙醛酸 80 mg/kg; DMF 组大鼠每天 DMF 25 mg/kg 灌胃处理, 连续 14 d。比较 3 组大鼠肾脏草酸钙晶体含量、氧化应激指标、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 和血红素氧化酶-1 (HO-1) 表达的差异; 比较 3 组大鼠尿钙、尿草酸含量、尿量、血肌酐和尿肌酐的差异。**结果:** 对照组大鼠肾脏组织未见明显草酸钙晶体, DMF 组比模型组草酸钙明显降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 模型组和 DMF 组血肌酐含量均明显升高, 且 DMF 组低于模型组 ( $P < 0.05$ )。3 组大鼠肾脏氧化应激指标比较, 组间差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 模型组大鼠 Nrf2 和 HO-1 明显降低, 且模型组低于 DMF 组 ( $P < 0.05$ )。**结论:** DMF 可以有效降低肾草酸钙结石模型大鼠的草酸钙晶体附着以及缓解大鼠的氧化应激损伤, 其机制可能与 DMF 诱导 Nrf2 和 HO-1 表达有关。

**【关键词】** 富马酸二甲酯; 肾草酸钙; 结石; 氧化应激; 核因子 E2 相关因子 2; 血红素氧化酶-1

**【中图分类号】** R743.35 **【文献标志码】** A

## Relationship between dimethyl fumarate and oxidative stress in renal calcium oxalate stone model rats

MA Zhi-qiang, ZUO Yan, ZHANG Yi

(Department of Urology Surgery, Shijiazhuang The Third Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

**【Abstract】Objective:** To investigate the relationship between dimethyl fumarate and oxidative stress in renal calcium oxalate stone model rats. **Methods:** This study selected 45 male SD rats, all rats were randomly divided into control group, model group and dimethyl fumarate group (DMF group), each group of 15 only, control group given only to give double steaming water (ddH<sub>2</sub>O) to fill the stomach, model group rats given double steaming water (ddH<sub>2</sub>O) to fill the stomach, and intraperitoneal injection of glyoxalic acid monohydrate 80 mg/kg, dimethyl fumarate group rats every day 25 mg/kg dimethyl fumarate, adopt the way of lavage for 14 days. The contents of calcium oxalate crystal, oxidative stress index, expression of Nrf2 and HO-1 in the kidney of the three groups were compared, and the contents of urine calcium, oxalate, urine volume, serum creatinine and urine creatinine were compared. **Results:** No obvious calcium oxalate crystals were found in the kidney tissue of the control observation group. Compared with the general model group, the calcium oxalate content in the DMF group was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with the control observation group, the serum creatinine content of the general model group and the DMF group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), compared with the general model group, the blood creatinine content of the DMF group was significantly higher. There was significant difference renal oxidative stress indexes between the three groups of rats ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, Nrf2 and HO-1 in the model group were significantly reduced, and the model group was lower than DMF group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Dimethyl fumarate can effectively reduce calcium oxalate crystal attachment in renal calcium oxalate stone model rats and alleviate oxidative stress injury in rats. The possible mechanism is related to DMF inducing Nrf2 and HO-1.

**【Key words】** Dimethyl fumarate; Calcium oxalate; Stone; Oxidative stress; Nrf2; HO-1

肾结石属于一种常见病和多发病, 且具有地域性差异。美国人群中约 2% 的男性以及 5% 的女性在其一生中会罹患该病, 其中绝大部分患者为草酸钙结石<sup>[1-2]</sup>。氧化应激被公认为是肾草酸钙结石发

生和发展中的一个重要环节, 但是氧化应激的产生和发展具有多种途径和方式<sup>[3]</sup>, 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 属于调节胞内氧化还原状态的一种因子, 与多种抗

基金项目: 河北省卫计委基金项目 (20170992)

作者简介: 马志强 (1973 -), 男, 硕士, 副主任医师。E-mail: mzdqoc@sohu.com

氧化应激酶的表达存在密切联系,在维持机体内氧化还原状态具有至关重要的作用。研究报道<sup>[4-5]</sup>,富马酸二甲酯(dimethyl fumarate, DMF)可以有效影响 Nrf2 的表达,本研究探讨 DMF 和肾草酸钙结石模型大鼠氧化应激的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 一般材料

45 只雄性 SD 大鼠,体质量( $200 \pm 20$ )g,购自湖北省实验动物中心。将所有大鼠按数表法随机分为对照组,模型组和 DMF 组,每组 15 只。对照组和模型组大鼠每天给予双蒸水灌胃 1 次;模型组大鼠每天一次性腹腔注射一水乙醛酸 80 mg/kg;DMF 组大鼠每天 DMF 25 mg/kg 灌胃处理,连续 14 d。超氧化物歧化酶(SOD)含量测定试剂盒,血清肌酐含量测定试剂盒,丙二醛(MDA)含量测定试剂盒,均由南京建成生物有限公司提供。DMF 以及一水乙醛酸均由 Sigma(美国)公司提供。兔抗 Nrf2 多克隆抗体,兔抗 HO-1 多克隆抗体,鼠抗肌动蛋白单克隆抗体均由 ABCam 公司提供。山羊抗兔 IgG 二抗,山羊抗大鼠 IgG 二抗均由 Boster 生物有限公司(美国)提供。

### 1.2 大鼠尿液的分析

在研究的第 13 天将大鼠放置于代谢笼中收集每只大鼠 24 h 尿液,并记录尿量。将收集的尿液通过离心(3 000 rpm, 25 °C, 10 min),采用相应试剂盒测定上清液中的草酸、尿钙以及血肌酐含量。

### 1.3 大鼠血肌酐检测与肾脏标本准备

在研究的第 14 天将大鼠采用乌拉坦麻醉后,腹部纵行切口,收集大鼠下腔静脉血不少于 5 mL,离心(3 000 rpm, 25 °C, 10 min),采用相应试剂盒测定上清液中血肌酐含量。实验大鼠采血后,立即取肾,其中左侧肾脏置于 -80 °C 保存待用,右侧肾脏采用甲醛固定 24 h,脱水,石蜡包埋后待用。

### 1.4 大鼠肾脏草酸钙晶体含量的检测

对肾脏石蜡块进行切片,脱蜡,1.0% 的硝酸银溶液孵育 45 min,并在阳光下直射 30 min,水洗,核固红复染 5 min,封片,固定,用偏光显微镜选取 5 个视野进行拍照,并计算和统计每个视野草酸钙晶体数量。

### 1.5 大鼠肾脏氧化应激指标的检测

氧化应激指标包括 SOD、MDA 以及活性氧(ROS)。将冻存的肾脏标本剪碎,加入生理盐水后,采用超声的方式破碎组织。收集组织,离心(8 000 g, 25 °C, 10 min),采用相应的试剂盒测定上清液中 SOD 活性,MDA 含量。ROS 的检测方法采用荧光探

针 DHE 法进行测定,具体方法为:制备大鼠肾脏冷冻切片,稀释探针溶液,并在 37 °C 孵育 30 min 后,采用磷酸盐缓冲液冲洗,并将切片淬灭封片,在荧光显微镜下观察拍照,采用 Image-pro 软件进行统计分析。

### 1.6 蛋白含量的检测方法

蛋白相对含量的测定采用蛋白质印迹法(Western blotting)。取适量大鼠肾组织在裂解液中裂解,提取组织中的总蛋白,并测定其总蛋白含量。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,对电泳转膜后封闭,4 °C 孵育过夜,Nrf2 和 HO-1 稀释后,洗膜,对二抗进行孵育,然后曝光显影,对显影图形进行扫描,采用 Image J 进行统计处理。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行统计分析。计量数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两多重比较为 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 三组大鼠肾脏草酸钙晶体含量比较

对照组大鼠肾脏组织未见明显的草酸钙晶体。与模型组相比,DMF 组草酸钙含量明显降低( $t = 15.729, P < 0.001$ )。见表 1。

表 1 两组大鼠肾脏草酸钙晶体含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	草酸钙晶体含量(个)
模型组	15	68.22 ± 5.15
DMF 组	15	34.24 ± 4.08*

\*  $P < 0.001$ ,与模型组比较。

### 2.2 三组大鼠尿液分析结果的比较

各组大鼠的尿钙、尿量的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),模型组以及 DMF 组大鼠的尿草酸含量高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。见表 2。

表 2 三组大鼠尿液分析结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	尿钙(mg)	尿草酸(mg)	尿量(mL)
对照组	15	0.93 ± 0.17	3.01 ± 0.72	13.58 ± 3.78
模型组	15	0.80 ± 0.17	14.81 ± 3.88*	11.50 ± 3.06
DMF 组	15	0.87 ± 0.20	14.36 ± 3.85*	12.56 ± 3.00

\*  $P < 0.001$ ,与对照组比较。

### 2.3 三组大鼠血肌酐、尿肌酐含量的比较

与对照组相比,模型组和 DMF 组血肌酐、尿肌酐含量均明显升高( $P < 0.05$ ),且模型组高于 DMF 组( $P < 0.001$ )。见表 3。

### 2.4 三组大鼠肾脏组织内氧化应激指标的比较

与对照组相比,模型组和 DMF 组大鼠的 MDA,

ROS 均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 且模型组高于 DMF 组 ( $P < 0.05$ ); 与对照组相比, 模型组和 DMF 组大鼠的 SOD 活性均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 且 DMF 组大鼠的 SOD 活性高于模型组 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 3 三组大鼠血肌酐和尿肌酐含量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{mol/L}$ )

组别	n	血肌酐	尿肌酐
对照组	15	30.39 $\pm$ 2.15	14.62 $\pm$ 1.88
模型组	15	75.75 $\pm$ 8.25*	36.14 $\pm$ 5.81*
DMF 组	15	40.19 $\pm$ 6.96*#	24.60 $\pm$ 4.28*#

\*  $P < 0.001$ , 与对照组比较; #  $P < 0.001$ , 与模型组比较。

表 4 三组大鼠肾脏组织内氧化应激指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)	ROS
对照组	15	676.69 $\pm$ 89.02	3.93 $\pm$ 0.25	1.06 $\pm$ 0.15
模型组	15	356.51 $\pm$ 78.76*	8.17 $\pm$ 0.66*	3.80 $\pm$ 0.37*
DMF 组	15	506.99 $\pm$ 83.51*#	4.84 $\pm$ 0.40*#	1.53 $\pm$ 0.18*#

\*  $P < 0.001$ , 与对照组比较; #  $P < 0.001$ , 与模型组比较。

## 2.5 三组大鼠蛋白表达变化的比较

与对照组相比, 模型组大鼠 Nrf2 和 HO-1 明显降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, DMF 组大鼠的 Nrf2 和 HO-1 明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 5。Western blotting 蛋白印迹测定条带图见图 1。

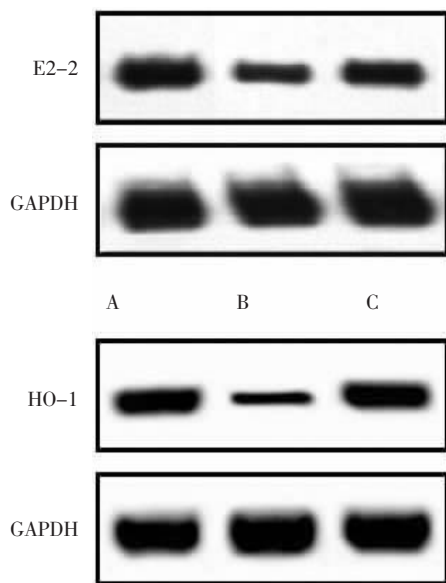


图 1 三组大鼠肾脏组织内蛋白表达 (Western blotting)

A. 对照组; B. 模型组; C. DMF 组。

表 5 三组大鼠肾脏组织内蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Nrf2	HO-1
对照组	15	0.89 $\pm$ 0.13	0.71 $\pm$ 0.12
模型组	15	0.47 $\pm$ 0.14*	0.30 $\pm$ 0.11*
DMF 组	15	0.67 $\pm$ 0.12*#	0.60 $\pm$ 0.17*#

\*  $P < 0.001$ , 与对照组比较; #  $P < 0.001$ , 与模型组比较。

## 3 讨论

肾结石属于中国目前最常见的泌尿外科疾病之一, 草酸钙结石发生率最高, 其发生机制尚不完全明确, 经过临床长期探索和研究提出了多种假说, 如: 尿液过饱和结晶假说、肾乳头钙化斑假说等<sup>[6-7]</sup>。然而这些假说均不能完整的解释肾结石的发病机制。所以, 为了进一步揭示肾草酸钙结石的确切发病机制, 并为临床寻找新的有效干预靶点具有重要的科研和临床价值<sup>[8-9]</sup>。本研究探讨富马酸二酯对肾草酸钙结石模型大鼠氧化应激的影响。

本研究对造模大鼠采用给予草酸的一种前体物质一水乙醛酸对大鼠进行诱导形成草酸尿, 再进一步合成肾草酸钙结石。研究结果提示, 与对照组相比, 模型组大鼠肾脏组织的尿钙含量明显的升高, 提示本研究的造模成功。而且肾脏组织的 MDA 含量升高以及 SOD 活性降低, 进一步提示氧化应激损伤在肾草酸钙模型大鼠中具有至关重要的作用。其中 SOD 属于机体内的抗氧化的关键酶, 该酶通过诱导超氧化物阴离子, 对细胞内的氧化应激损伤起到抑制的作用<sup>[10]</sup>。MDA 属于脂质过氧化的一种产物, 其含量越高说明机体内的氧化应激越严重<sup>[11]</sup>。

研究结果亦指出<sup>[12]</sup>, 模型组大鼠机体内的 ROS 也明显提升, 亦从另一个方面证实肾草酸钙模型大鼠内的氧化应激损伤的提升。传统理论中认为活性氧在机体内是有害的, 临床上具有多种抗氧化剂被用于清除活性氧或者抑制活性氧, 但是越来越多的研究正式<sup>[13]</sup>, 活性氧并非仅仅是有害的, 它还在细胞的生理活动中起到重要的介质作用, 调节多种细胞的生理功能。因此, 仅仅只是清除活性氧并非最佳治疗措施。本研究认为特异性激活自身的防御系统对缓解氧化应激显得尤为重要。有研究<sup>[14]</sup>指出, Nrf2 通路在维持胞内氧化还原稳态中具有至关重要的作用。在氧化应激产生的情况下, Nrf2 的一个负调节因子 Keap1 通过氧化过程被活性氧簇所灭活, Nrf2 被转移至细胞核上, 进一步诱导 HO-1 等一系列抗氧化酶的表达, 对机体内的氧化应激起到抑制和拮抗作用, 从而对机体起到平衡保护的作用。

实验采用 DMF 拮抗肾草酸钙结石模型的氧化应激, 起到了理想的结果, 不仅可以有效的降低草酸钙晶体含量, 而且可以有效的降低机体内的氧化应激指标含量。可能的原因是肾小管上皮细胞的氧化损伤亦为草酸钙晶体的吸附提供了有利的环境, DMF 会通过 Nrf2 通路诱导产生 HO-1 的表达, 也进一步抑制了草酸钙诱发的氧化应激, 缓解了草酸钙

晶体的生长、附着,从而降低了大鼠体内肾草酸钙晶体的沉积<sup>[15]</sup>。

综上所述,DMF 可以有效的降低肾草酸钙结石模型大鼠的草酸钙晶体附着以及缓解大鼠的氧化应激损伤,其可能的机制与 DMF 可以诱导 Nrf2 产生 HO-1 有关。

#### 参考文献

- [1] Assimos D, Krambeck A, Miller NL, *et al.* Surgical management of stones: american urological association/endourological society guideline, Part I[J]. *The Journal of urology*, 2016, 196(4): 1153 - 1160.
- [2] 李朋,高存祥,王勤章,等. 探讨钙敏感受体及紧密连接蛋白-14 在大鼠肾草酸钙结石形成中的作用[J]. *川北医学院学报*, 2018, 165(6): 811 - 814.
- [3] 朱建宁,唐森,张加桥,等. DMF 对大鼠肾草酸钙结石形成的影响及机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(8): 1433 - 1436.
- [4] 王刚,龚晋迁,张军卫,等. 微创经皮肾镜取石术与输尿管镜钬激光碎石术治疗输尿管上段嵌顿结石合并感染的疗效对比[J]. *川北医学院学报*, 2017, 156(3): 433 - 435.
- [5] 刘响,段小鹿,麦新,等. 陈醋对大鼠肾脏草酸钙结石形成的影响及作用机制研究[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2016, 37(4): 304 - 307.
- [6] 齐士勇,何振,姜行康,等. 核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 炎症小体在草酸钙结石肾组织中的表达及意义[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2016, 37(12): 940 - 944.
- [7] 段红杰,何延奇,陈晨,等. 严重烧伤大鼠膈肌蛋白氧化应激及抗

- 氧化酶表达的变化[J]. *中华烧伤杂志*, 2019, 35(7): 507 - 511.
- [8] 张小筱,车琳,张慧,等. 非布司他抑制慢性肾脏病 3 - 5 期伴高尿酸血症患者氧化应激反应[J]. *中华肾脏病杂志*, 2019, 35(9): 676 - 683.
- [9] Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, *et al.* Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells[J]. *Nature*, 2015, 527(7577): 186.
- [10] 周齐,王乔雨,王腾,等. 叶酸对砷诱导 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤及凋亡的保护作用研究[J]. *中华地方病学杂志*, 2019, 38(6): 453 - 457.
- [11] 王继武,陈小珍,徐志强,等. 核因子 E2 相关因子 2 信号通路对肺缺血再灌注损伤的保护机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(8): 1430 - 1432.
- [12] 靳倩倩,乔玉洁,王晓焕,等. 核因子 E2 相关因子 2 和 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 在结直肠癌中表达及临床意义[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2018, 32(10): 962 - 964.
- [13] Poprac P, Jomova K, Simunkova M, *et al.* Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases[J]. *Trends in pharmacological sciences*, 2017, 38(7): 592 - 607.
- [14] Bompreszi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview[J]. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 2015, 8(1): 20 - 30.
- [15] Kornberg MD, Bhargava P, Kim PM, *et al.* Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 449 - 453.

(收稿日期:2019-12-02

学术编辑:邓显忠)

#### (上接第 5 页)

- [7] 白亦光,韩小伟,张旭乾,等. 纤维环穿刺抽吸法和纤维环切开法建立兔椎间盘退变模型的比较[J]. *中国矫形外科杂志*, 2013, 21(7): 690 - 694.
- [8] Watanabe K, Mochida J, Nomura T, *et al.* Effect of reinsertion of activated nucleus pulposus on disc degeneration: an experimental study on various types of collagen in degenerative discs[J]. *Connect Tissue Res*, 2003, 44(2): 104 - 108.
- [9] Bai YG, Liu K, Xiao DQ, *et al.* Treatments for intervertebral discs degeneration by stem cells transplantation: a therapeutic potential comparison between bone marrow stem cells and adipose-derived stem cells[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2019, 12(3): 2468 - 2476.
- [10] 冯刚. 椎间盘退行性变的生物治疗研究专题[J]. *川北医学院学报*, 2013, 28(2): 89 - 90.
- [11] Sun Z, Liu ZH, Zhao XH, *et al.* Impact of direct cell co-cultures on human adipose-derived stromal cells and nucleus pulposus cells

[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(11): 1804 - 1813.

- [12] Xie X, Wang Y, Zhao C, *et al.* Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(29): 7008 - 7018.
- [13] Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, *et al.* Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype[J]. *Regen Med*, 2010, 5(5): 701 - 711.
- [14] Frith JE, Cameron AR, Menzies DJ, *et al.* An injectable hydrogel incorporating mesenchymal precursor cells and pentosan polysulphate for intervertebral disc regeneration[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(37): 9430 - 9440.

(收稿日期:2019-09-11

学术编辑:罗蕾)