



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113616632 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 09

(21) 申请号 202111037110.1

(22) 申请日 2021.09.06

(71) 申请人 天津医科大学第二医院

地址 300211 天津市河西区平江道23号天津医科大学第二医院

(72) 发明人 齐士勇 杨雄 陈岳 刘春雨

(74) 专利代理机构 天津创信方达专利代理事务所(普通合伙) 12247

代理人 段小丽

(51) Int. Cl.

A61K 31/155 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 13/04 (2006.01)

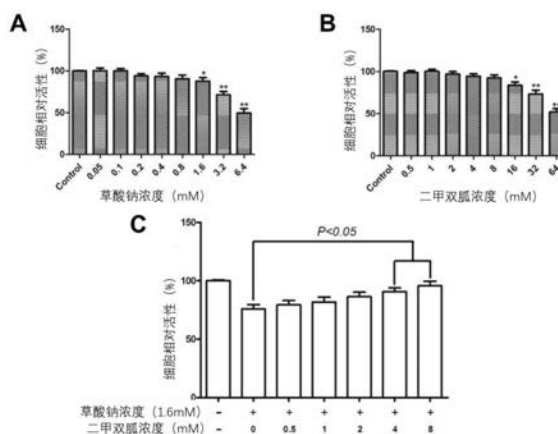
权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

二甲双胍在治疗草酸钙肾结石中的用途

(57) 摘要

本发明提供了二甲双胍在治疗草酸钙肾结石中的用途,本发明的研究证明二甲双胍可以减轻草酸诱导的肾小管上皮细胞氧化应激损伤,增加肾小管上皮细胞抗氧化能力,能抑制肾脏晶型形成。本发明的研究成果为临床提供了一种治疗肾结石的新的方法和候选药物。



1. 二甲双胍在制备治疗肾结石的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述肾结石是草酸钙肾结石。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物还包括药学上可接受的载体。
4. 二甲双胍在制备治疗肾小管上皮细胞损伤的药物中的应用。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在於,所述损伤是氧化应激损伤。
6. 根据权利要求4所述的应用,其特征在於,所述肾小管上皮细胞损伤由草酸诱导。
7. 二甲双胍在制备增加肾小管上皮细胞抗氧化能力的药物中的应用。
8. 一种治疗肾结石的药物,所述药物包括二甲双胍。
9. 根据权利要求8所述的药物,其特征在於,所述药物还包括药学上可接受的载体。
10. 一种治疗肾结石的方法,所述方法包括给有需要者施用有效量的二甲双胍。

二甲双胍在治疗草酸钙肾结石中的用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及二甲双胍在治疗草酸钙肾结石中的用途。

背景技术

[0002] 草酸钙肾结石是泌尿外科的常见病、多发病,在我国草酸钙肾结石的发病率高达5.8%,严重影响着人们的生活健康。草酸钙结石属于代谢性疾病,复发率高,消耗着大量的医疗资源。

[0003] 目前尚缺乏预防草酸钙肾结石形成的药物,其中较为常用的药物是枸橼酸氢钾钠。其存在如下缺陷:(1)效果不确切,该药物作用机理为改变尿液的酸碱度进而抑制草酸钙肾结石的形成,而非在肾脏水平抑制结石的形成,因此容易受尿液成分及酸碱度的影响导致预防草酸钙结石形成的效果较差;(2)适应证有限,枸橼酸氢钾钠主要由于酸性结石的治疗,而草酸钙肾结石的形成受尿液酸碱度影响较小,因此该用于草酸钙结石的预防较为勉强;另外,枸橼酸氢钾钠碱化尿液后溶液导致泌尿系感染的发生,因此不适用于结石合并泌尿系感染的患者;(3)价格昂贵,且服用起来程序繁琐,缺乏友好性。

[0004] 二甲双胍是一经典的降糖药物,目前该药物生产工业成熟、毒副作用明确且价格低廉,基于其以上特性本申请开拓其的新用途用于草酸钙肾结石的预防。

发明内容

[0005] 本发明提供了二甲双胍在制备治疗肾结石的药物中的应用。

[0006] 进一步,所述肾结石是草酸钙肾结石。

[0007] 进一步,所述药物还包括药学上可接受的载体。

[0008] 本发明提供了二甲双胍在制备治疗肾小管上皮细胞损伤的药物中的应用。

[0009] 进一步,所述损伤是氧化应激损伤。

[0010] 进一步,所述肾小管上皮细胞损伤由草酸诱导。

[0011] 本发明提供了二甲双胍在制备增加肾小管上皮细胞抗氧化能力的药物中的应用。

[0012] 本发明提供了一种治疗肾结石的药物,所述药物包括二甲双胍。

[0013] 进一步,所述药物还包括药学上可接受的载体。

[0014] 本发明提供了一种治疗肾结石的方法,所述方法包括给有需要者施用有效量的二甲双胍。

附图说明

[0015] 图1显示利用MTT检测MDCK细胞的细胞活性的统计图,其中,A:草酸钙处理,B:二甲双胍处理,C:草酸钙联合二甲双胍处理;

[0016] 图2显示利用MTT检测HK-2细胞的细胞活性的统计图,其中,A:草酸钙处理,B:二甲双胍处理,C:草酸钙联合二甲双胍处理;

[0017] 图3显示检测MDCK细胞中SOD活性和MDA含量的统计图,其中,A:MDA含量,B:SOD活

性;

[0018] 图4显示检测HK-2细胞中SOD活性和MDA含量的统计图,其中,A:MDA 含量,B:SOD活性;

[0019] 图5显示检测大鼠肾脏组织中的MDA和SOD水平的统计图,其中,A:MDA 含量,B:SOD活性;

[0020] 图6显示肾组织中草酸钙晶体的分布和定量分析的结果图,A:放大倍率 $\times 100$ 下的对照组,B:放大倍率 $\times 100$ 下的EG处理组;C:放大倍率 $\times 100$ 下的EG +metformin治疗组;D:放大倍率 $\times 400$ 下的对照组,E:放大倍率 $\times 400$ 下的 EG处理组;F:放大倍率 $\times 400$ 下的EG+metformin治疗组;G:低倍镜下肾脏晶体沉积面积比;H:高倍镜下肾脏晶体沉积等级。

具体实施方式

[0021] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0022] 溶液配制

[0023] (1) 氨苄霉素:首先用移液器精确量取10ml的去离子水,取氨苄霉素 500mg (用电子天平精确称量)加入去离子水中,用Vortex进行震荡处理,直到两者充分地混匀。将混匀后的溶液放到细胞超净台里,取0.22 μm 孔径的过滤器进行过滤除菌,过滤后的溶液用无菌的EP管进行保存,保存温度为 -20°C 。

[0024] (2) 细胞完全培养基(10%)配制方法:取500ml的无血清DMEM培养基一瓶,分装出一瓶50ml的无血清培养基,然后向剩余培养基中加入50ml的胎牛血清,和5ml的青链霉素,将上述三者充分混匀后,再用50ml无菌的离心管进行分装保存,保存温度 4°C 。

[0025] (3) 细胞完全培养基(1%)配制方法:取500ml的无血清DMEM培养基一瓶,分装出一瓶5ml的无血清培养基,然后向剩余培养基中加入5ml的胎牛血清,和5ml的青链霉素,将上述三者充分混匀后,再用50ml无菌的离心管进行分装保存,保存温度 4°C 。

[0026] (4) 细胞冻存液的配制方法:从 -20°C 冰箱中取出胎牛血清提前进行溶解,将溶解好的9.5ml胎牛血清与0.5ml DMSO进行充分混合,混合以后将其进行分装,按照1-1.5ml每冻存管分装,现配现用。

[0027] (5) 0.75%乙二醇溶液:量取乙二醇(分析纯)7.5ml并置入1000ml量筒中,用灭菌蒸馏水将体积定容至1000ml,调节PH值7.2-7.4范围内,现配现用。

[0028] (6) 不同浓度的草酸钠溶液:电子天平准确称量草酸钠67mg加入10ml 细胞完全培养基中,配制成50mM的草酸钠溶液,然后根据实验需要用细胞完全培养基稀释成不同浓度的草酸钠溶液(0.05,0.1,0.2,0.4,0.8,1.6,3.2和 6.4mM),将混匀后的溶液放到细胞超净台里,取0.22 μm 孔径的过滤器进行过滤除菌,过滤后的溶液用无菌的EP管进行保存,现配现用。

[0029] (7) 不同浓度的二甲双胍溶液:电子天平准确称量二甲双胍166mg加入 10ml细胞完全培养基中,配制成100mM的草酸钠溶液,然后根据实验需要用细胞完全培养基稀释成不同浓度的二甲双胍溶液(0.5,1,2,4,8,16,32 和64mM),将混匀后的溶液放到细胞超净台

里,取0.22 μ m孔径的过滤器进行过滤除菌,过滤后的溶液用无菌的EP管进行保存,现配现用。

[0030] 实施例1体外实验研究二甲双胍对草酸诱导的肾小管上皮细胞损伤的影响

[0031] 一、步骤

[0032] 1、细胞培养

[0033] MDCK细胞,犬肾远端肾小管上皮细胞系,获自中国医学科学院(中国上海)。HK-2细胞,人肾近端肾小管上皮细胞系,获自中国医学科学院(中国北京)。细胞培养基为含10%胎牛血清的完全DMEM培养基,其中含有1%的青链霉素。

[0034] 2、MTT法检测细胞毒性实验

[0035] (1) MTT配制利用超微天平精确取MTT粉末0.1g,将称取的粉末溶解于20ml PBS溶液中,使其达到终浓度为5mg/ml,配置完成后,再用0.22 μ m滤膜过滤,以达到除菌的目的,密封避光保存于4 $^{\circ}$ C备用。

[0036] (2) 为了评估不同浓度的草酸钠和二甲双胍对MDCK细胞和HK-2细胞的细胞毒性,我们将MDCK细胞和HK-2细胞计数后稀释为 2×10^4 /ml,分别接种在96孔板,每孔加入100 μ l细胞稀释液,约 2×10^3 细胞/孔,每组实验设置6个重复孔以减少实验误差,当细胞生长至融合程度达70%至80%。随后,将细胞分别暴露于不同浓度的草酸钠溶液(0,0.05,0.1,0.2,0.4,0.8,1.6,3.2和6.4mM)和二甲双胍(0,0.5,1,2,4,8,16,32和64mM),置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养箱中培养处理2天。

[0037] (3) 小心吸去细胞培养液,然后向待测孔中,每孔加入100 μ l 1 \times MTT溶液,加液后,将其置入37 $^{\circ}$ C培养箱孵育4小时,使MTT充分还原为甲月赞。

[0038] (4) 在孵育期结束时,弃除含有MTT的培养基,注意要小心吸出上清液,千万不要破坏蓝紫色的甲月赞结晶,然后向检测孔中加入150 μ l DMSO,使得甲月赞溶解,并用平板摇床充分摇匀,将待检验的溶液再置于酶标仪中,在490nm波长进一步检测OD值。记录各测试孔的OD值后,细胞活性以实验组测量的OD值与对照组测量的OD值的百分比值表示。

[0039] (5) 为了进一步评估二甲双胍是否对草酸钠处理后的MDCK细胞和HK-2细胞的具有保护作用,我们根据上面实验的结果,选取1.6mM草酸钠作为处理两种细胞的实验浓度(无论是MDCK细胞还是HK-2细胞,当草酸钠浓度 ≥ 1.6 mM时,开始表现出显著的细胞毒性作用)。同时,我们根据上面实验的结果,选择对细胞不具有细胞毒性的二甲双胍药物浓度(MDCK细胞选取0.5,1,2,4,8mM;HK-2细胞选取0.5,1mM)来同时处理两种细胞1天,并用MTT测定法评估细胞活力。

[0040] 3、统计分析

[0041] 所有数据均采用IBM SPSS,20.0进行统计分析。图和表中的数据表示为平均数 \pm 标准差(SD)的形式表示,两组计量数据之间比较采用独立样本t检验或单因素ANOVA分析,以P<0.05表示差异有统计学意义。

[0042] 二、结果

[0043] 在用不同浓度的草酸钠或二甲双胍作用于肾小管上皮细胞2天后,使用MTT染色测定了MDCK细胞和HK-2细胞的细胞活力,结果如图1和2所示,两种细胞系的细胞活性随着草酸钠浓度的增加而不断减少。当草酸钠的浓度大于0.8mM,无论是MDCK细胞还是HK-2细胞,通过MTT检测的细胞活性均出现显著下降,且这种下降与对照组的活性相比,差异有统

计学意义,见图1A和2A。然而,当二甲双胍的浓度小于等于8mM时,对MDCK细胞没有产生明显的毒性作用,当二甲双胍的浓度小于或等于1mM时,对HK-2细胞是没有毒性作用。同样,如图1B和2B所示,对于MDCK细胞,当二甲双胍的浓度大于8mM时,会显著的抑制细胞活性,而在HK-2细胞中,当二甲双胍的浓度大于1mM时,细胞活性就会受到显著抑制。为了进一步研究二甲双胍对草酸诱导的肾小管上皮细胞损伤的保护作用,我们用不同浓度的二甲双胍(对于MDCK细胞为0,0.5,1,2,4和8mM;对于HK-2细胞为0,0.5和1mM)预处理细胞2小时,然后再将细胞暴露于1.6mM草酸钠24小时,最后在通过MTT测定法检测细胞活性。如图1C和2C所示,二甲双胍在缓解草酸诱导的肾小管上皮细胞损伤时,具有显著的剂量-效应趋势。值得注意的是,在MDCK细胞中,当二甲双胍的浓度大于等于4mM会显著的缓解草酸钠诱导的细胞毒性,而在HK-2细胞中,当二甲双胍的浓度为1mM才能显著的缓解草酸钠诱导的细胞毒性。

[0044] 实施例2体外实验研究二甲双胍对草酸诱导的肾小管上皮细胞氧化应激损伤

[0045] 一、步骤

[0046] 1、根据上面细胞毒性实验的实验结果,最终选择1.6mM的草酸钠,8mM的二甲双胍(MDCK细胞)和1mM的二甲双胍(HK-2细胞)继续进行下面的实验。用1.6mM的草酸钠分别处理MDCK细胞和HK-2细胞,干预手段选择同时给予或者不给予二甲双胍处理,处理时间选择为1,2和3小时,在给予药物处理前,提前12小时饥饿细胞,以获得更加显著的效果。

[0047] 2、按上述时间和方法处理后,用胰酶将MDCK细胞和HK-2细胞消化下来,将含有细胞的培养液在室温条件下以1000转/分的转速,离心10分钟,然后弃去上清液,并保留细胞沉淀以备后续分析。

[0048] 3、在细胞沉淀中,加入0.5-1ml上述配制好的PBS溶液,轻柔地颠倒并混匀,将培养液在室温条件下以1000转/分的转速,离心10分钟,弃去上清液,保留细胞沉淀。上述操作重复1~2次,以达到反复洗涤的目的。

[0049] 4、在上述的细胞沉淀中,加入适量的PBS溶液(加入的PBS体积根据所测指标会有所不同,一般加入0.5ml,细胞密度一般要大于一百万个/ml),充分混匀后,将细胞悬浮于PBS溶液中,在冰水浴的条件下,用超声粉碎机进行细胞粉碎,超声波发生器的振幅为14 μ m,通过超声处理30秒,使溶液中细胞充分破碎。

[0050] 5、在充分的粉碎细胞之后,在室温条件下,以1000转/分的转速,离心10分钟,离心后,收集所得的悬浮液,按照如下的步骤分别检测SOD和MDA的水平。

[0051] 6、SOD水平测定

[0052] (1) 操作步骤:

[0053] 按如表1所示进行加样。

[0054] 表1 SOD水平测定加样操作

试剂	对照管	测定管
试剂一 (ml)	1.0	1.0
双蒸水 (ml)	0.01	-
测试样品 (ml)	-	0.01
[0055] 试剂二 (ml)	0.1	0.1
试剂三 (ml)	0.1	0.1
试剂四 (ml)	0.1	0.1
充分混匀 30 秒, 37°C热水浴 40 分钟		
显色剂	2.0	2.0

[0056] (2) 各管充分混匀后, 静置15分钟, 用全自动酶标仪于532nm波长处进行测定, 以1cm为光径, 用蒸馏水调零, 比色测定OD值。

[0057] (3) SOD的计算公式为: $0.5 \times (\text{对照管OD} - \text{测定管OD}) / \text{对照管OD} \times \text{反应体系的稀释倍数} \times \text{样本测试前的稀释倍数}$ 。

[0058] 7、MDA水平测定

[0059] (1) 操作步骤:

[0060] 按如表2所示进行加样。

[0061] 表2 MDA水平测定加样操作

试剂	空白管	标准管	测定管	对照管
10nmol/l 标准液 (ml)	-	0.1	-	-
无水乙醇 (ml)	0.1	-	-	-
测试样品 (ml)	-	-	0.1	0.1
[0062] 试剂一 (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
摇动几下试管架将液体混匀				
试剂二 (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0
试剂三 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
50%冰醋酸 (ml)	-	-	-	1.0

[0063] (2) 将各样本通过涡轮混匀器进行充分的混匀, 注意试管口需要用保鲜膜扎紧, 扎紧以后用针头在保鲜膜上刺一小孔, 然后在95°C热水中孵育40min, 孵育完成后将样本取出, 并用流水冷却至室温。

[0064] (3) 以3500转/分钟的转速, 离心15min, 然后取上清液200 μ l, 加入96孔板, 每个样本取6个重复, 用全自动酶标仪于532nm波长处进行检测, 以1cm为光径, 并使用蒸馏水进行调零, 比色测定OD值。

[0065] (5) MDA的计算公式为: $(\text{测定管OD} - \text{测定空白管OD}) / (\text{标准管OD} - \text{标准空白管OD}) \times \text{标准品浓度}$ 。

[0066] 8、统计分析

[0067] 所有数据均采用IBM SPSS,20.0进行统计分析。图和表中的数据表示为平均数±标准差(SD)的形式表示,两组计量数据之间比较采用独立样本t检验或单因素ANOVA分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

[0068] 二、结果

[0069] 为了进一步评估二甲双胍是否具有缓解草酸钠诱导的MDCK细胞和HK-2细胞的氧化应激损伤,检测了在提前给予或不给予二甲双胍干预,然后用1.6mM草酸钠分别处理两种肾小管上皮细胞系1,2和3小时,最后检测两种细胞系的SOD活性和MDA含量。如图3和4,在草酸钠作用于MDCK细胞和HK-2细胞后,它们的MDA水平随着处理时间的延长而不断增高,而SOD活性则随着处理时间的延长而不断降低。当用二甲双胍提前预处理两种细胞后,在MDCK细胞中,草酸钠诱导的MDA含量在2小时和3小时出现显著降低,而在HK-2细胞中,草酸钠诱导的MDA含量在1,2和3小时均出现显著降低, $(P<0.05)$,如图3A和4A所示。此外,当用二甲双胍提前预处理两种细胞后,在MDCK细胞中,草酸钠诱导的SOD活性降低在2小时和3小时出现显著缓解,而在HK-2细胞中,草酸钠诱导的SOD活性降低也在2和3小时出现显著缓解, $(P<0.05)$,如图3B和4B所示。这些实验结果表明二甲双胍能够显著减轻草酸诱导的肾小管上皮细胞氧化应激损伤,并增加MDCK细胞和HK-2细胞抗氧化能力。

[0070] 实施例3体内实验研究

[0071] 1、动物模型和实验设计

[0072] 本研究所有动物实验操作和流程均经天津医科大学伦理委员会批准,并符合“赫尔辛基宣言”(1964)和《实验动物管理条例》的相关规定。

[0073] 健康的雄性SD大鼠(180-220g)从中国医学科学院医学实验动物研究所获得,所有大鼠的饲养环境为清洁级,采用分笼饲养的方式,每6只大鼠为一笼,在天津医科大学第二医院实验动物中心进行饲养,并保持实验室温度($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$),恒定湿度 $55 \pm 5\%$,保持12小时昼/夜交替的光照规律,所有的大鼠均喂食标准的实验动物饲料,垫料每4-5天更换。我们将雄性SD大鼠随机分为三组,具体实验动物分组如下:

[0074] (1) 正常对照组(Control组),SD大鼠6只,食用标准实验动物饲料,饮用高压灭菌蒸馏水8周;

[0075] (2) 乙二醇(ethylene glycol,EG)诱导草酸钙肾结石组(EG组),SD大鼠6只,食用标准实验动物饲料,饮用0.75%乙二醇溶液8周;

[0076] (3) EG诱导草酸钙肾结石+二甲双胍治疗组(EG+二甲双胍组),SD大鼠6只,食用标准实验动物饲料,饮用0.75%乙二醇溶液8周,将二甲双胍溶解于灭菌蒸馏水,通过经口灌胃的给药方式,予每只大鼠200mg/kg/天的二甲双胍,持续8周,此药物剂量和给药方式是参考既往评估二甲双胍的药物毒理研究[57,58]。

[0077] 需要特别说明的是在整个8周的研究期间,只有(1)组的SD大鼠饮用的是高压灭菌蒸馏水,(2)组和(3)组的SD大鼠饮用的都是0.75%乙二醇溶液,以诱导大鼠形成草酸钙肾结石。(1)组和(2)组在整个造模期间接受与(3)组等体积的灭菌蒸馏水(对照)经口灌胃处理。此外,在8周的实验即将结束前,即在处死前SD大鼠前24小时,将各种大鼠转移到代谢笼中,并收集24小时尿液标本。在完成尿液标本采集后,通过腹膜内注射戊巴比妥钠(40mg/kg体重)诱导麻醉,处理各实验组的大鼠,收集各组大鼠的血液和肾脏组织标本。对于肾脏组织标本,我们将右侧单侧肾组织标本储存在 -80°C 冰箱以备进一步的分析,并将对侧肾组

织标本用10%甲醛固定并用石蜡包埋。

[0078] 2、体内SOD和MDA水平的测量

[0079] 将动物实验中收集的肾组织进行检测,已明确在不同实验组肾组织的SOD 活性和MDA含量。

[0080] (1)称取肾组织样本0.1-0.2g,注意需要将每个实验组的每只大鼠的肾脏取3个重复,然后在冰冷的生理盐水中反复进行漂洗,除去肾组织上面的血液,然后用滤纸拭干,接着准确称量重量,并保证各样本重量的一致性,然后将处理好的组织样本放入5ml的匀浆管中备用。

[0081] (2)按照重量(g):体积(ml)=1:9的比例在匀浆管中加入相应的9倍体积的0.9%的生理盐水,接着在冰水浴的条件下,用眼科的小剪刀尽快剪碎组织块。

[0082] (3)将已经剪碎的组织块用超声粉碎机进行进一步的粉碎,注意超声波发生器的振幅选择14 μ m,超声处理30秒,使组织和细胞充分破碎。

[0083] (4)显微镜检观察:取少量的组织匀浆进行涂片,然后在显微镜下观察组织和细胞是否充分破碎,若没有,则可进一步延长匀浆处理时间。

[0084] (5)将已经制备好的10%的组织细胞匀浆液,用常规的离心机或低温低速离心机以2500转/分的速度,离心10~15分钟,然后取上清液进行后续的测定。

[0085] (6)制备好的组织细胞匀浆液建议不要冻存,而且最好是现用现制,因为如放置时间过长,相关酶的活性会下降,这样会影响测量的准确性,当然,在不影响整体趋势的前提下,SOD在4 $^{\circ}$ C要可以存放2~3天,而MDA在4 $^{\circ}$ C可存放3~5天。

[0086] (7)将制备好的组织细胞匀浆液,按照细胞实验中检测SOD和MDA的方法检测组织中的SOD和MDA水平。

[0087] 3、血清和尿生物化学

[0088] 采用迈瑞BS-2000M模块化生化检测系统测定动物实验中收集的血清标本中的磷(phosphate,P),钙离子(calcium, Ca²⁺),镁离子(magnesium, Mg²⁺)和肌酐水平的浓度,以及尿液标本中Ca²⁺离子的浓度。此外,我们还手动测量了尿液的pH值和每只大鼠24小时的总尿量,并使用Trinity Biotech规范化的商品试剂盒依照其说明书中规定的操作步骤检测了尿液中的草酸含量。

[0089] 4、肾脏晶体形成的评估

[0090] 4.1按照常规方法进行大鼠肾脏组织的石蜡切片制作;

[0091] 4.2按照常规方法进行大鼠肾脏组织的HE(苏木精-伊红)染色;

[0092] 4.3通过偏光显微镜观察HE染色切片,分析确定各组大鼠肾组织中草酸钙晶体形成的数目和分布。具体来说,通过如下两种方法评估各组肾结石形成:

[0093] (1)肾组织草酸钙晶体数量的评估,在偏光显微镜的高倍镜视野下(\times 400倍),每张切片随机选取10个视野,计数每个视野下草酸钙晶体的数量,并进行量化分级评分,分级和评分的方法参考既往研究草酸钙肾结石大鼠模型的分级方法:

[0094] 0分-高倍镜视野内无结晶;

[0095] 1分-少量晶体(高倍镜视野内结晶数量为1至9);

[0096] 2分-中等数量的晶体(高倍镜视野内结晶数量为10-24);

[0097] 3分-中等数量以上的晶体(高倍镜视野内结晶数量为25-49);

[0098] 4分-大量晶体(高倍镜视野内结晶数量为50-99)；

[0099] 5分-非常大量的晶体(高倍镜视野内结晶数量为100-199)；

[0100] 6分-紧密的晶体堆积或晶体非常巨大。

[0101] 每个肾脏,制备两张有代表性的HE染色石蜡切片,由两个独立的检查者评估每张切片,并分别记录每张切片的分数。

[0102] (2)肾组织草酸钙晶体分布的评估,在偏光显微镜的高倍镜视野下($\times 100$ 倍),每张切片随机选取10个视野,通过Image Pro Plus(Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD)计算在10个随机视野中草酸钙晶体的沉积面积与整个低倍镜视野面积的比率(百分比),从而定量每个肾切片中的草酸钙晶体的沉积面积,该方法也是参考既往研究草酸钙肾结石动物模型的量化比较方法。

[0103] 每个肾脏,制备两张有代表性的HE染色石蜡切片,由两个独立的检查者评估每张切片,并分别记录每张切片的比值。

[0104] 5、统计分析

[0105] 所有数据均采用IBM SPSS, 20.0进行统计分析。图和表中的数据表示为平均数 \pm 标准差(SD)的形式表示,两组计量数据之间比较采用独立样本t检验或单因素ANOVA分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

[0106] 二、结果

[0107] 1、二甲双胍缓解草酸钙肾结石动物模型中EG诱导的氧化应激损伤

[0108] 为了进一步评估二甲双胍在EG诱导的草酸钙肾结石大鼠模型中对肾脏组织氧化应激的影响,检测了大鼠肾脏组织中的MDA和SOD水平。如图5A所示,与对照组相比,EG诱石组肾脏组织的MDA水平显著升高($P < 0.05$),而 EG+二甲双胍治疗组MDA的这一增高趋势被显著的缓解($P < 0.05$)。相比之下,EG诱石组的肾脏组织中的SOD活性与对照组相比显著降低($P < 0.05$),如图5B所示。尽管与对照组相比,EG+二甲双胍治疗组的SOD活性也略有降低,但是差异没有统计学意义。此外,虽然二甲双胍在一定程度上缓解了EG 诱导的肾脏组织的SOD活性的降低,但EG诱石组和EG+二甲双胍治疗组在 SOD活性水平上,差异没有统计学意义。

[0109] 2、大鼠血清和尿液生化检测结果

[0110] 如表3所示,3个实验组之间在血清 Ca^{2+} , Mg^{2+} 或肌酐中没有统计学差异。在EG处理组中,血清P明显高于对照组($P < 0.05$),但血清P在EG处理组和EG+二甲双胍治疗组之间没有统计学差异。在3个实验组之间,24小时尿量和尿液pH没有显著的差异。在EG处理组和EG+二甲双胍治疗组中,与对照组相比,尿液pH值略低,但这一差异没有统计学意义。EG+二甲双胍治疗组的尿 Ca^{2+} 明显低于对照组,但与EG处理组之间差异无统计学意义。在药物处理8周后,EG处理组和EG+二甲双胍治疗组的尿液排泄草酸浓度显著高于对照组($P < 0.05$)。此外,与EG处理组相比,EG+二甲双胍治疗组的尿液草酸排泄浓度显著降低($P < 0.05$)。

[0111] 表3血清和尿液生化检测结果

	Mean \pm SD			
	Control	EG	EG + Metformin	
Serum (mg/dl):				
	Creatinine	0.32 \pm 0.03	0.35 \pm 0.05	0.33 \pm 0.05
	Ca ²⁺	10.34 \pm 0.41	10.61 \pm 0.46	10.29 \pm 0.20
[0112]	P	6.69 \pm 0.46	7.40 \pm 0.46*	7.01 \pm 0.34
	Mg ²⁺	2.62 \pm 0.42	2.45 \pm 0.50	2.55 \pm 0.37
Urine:				
	Volume (ml)	22.07 \pm 3.31	25.02 \pm 5.18	24.47 \pm 4.05
	PH	7.57 \pm 0.46	7.40 \pm 0.26	7.30 \pm 0.30
	Ca ²⁺ (mg/day)	3.32 \pm 0.39	2.98 \pm 0.37	2.60 \pm 0.55*
	Ox (mg/day)	1.68 \pm 0.57	18.62 \pm 2.42*	14.95 \pm 1.49*#

[0113] *P<0.05, 对照组与EG处理组或EG+metformin处理组比较

[0114] #P<0.05, EG处理组与EG+metformin处理组比较

[0115] 3、二甲双胍显著改善EG诱导的大鼠草酸钙肾结石形成

[0116] 由于在显微镜视野中, 对照组没有在肾组织中发现任何晶体形成, 故图6G 和H没有给出对照组的数据。如图6所示, 通过偏光显微镜检查发现肾脏组织中的草酸钙晶体主要沉积在肾皮质和髓质交界处的肾小管内。如图6A-F, 采用前面所述的分级评分系统和定量方法评估肾脏组织中的草酸钙晶体沉积。在低倍视野下, 与EG+二甲双胍治疗组相比, EG处理组肾脏组织中草酸钙晶体沉积面积显著增加 (P<0.05) (图6G)。此外, 与EG处理组相比, 二甲双胍治疗能够显著降低高倍视野下肾组织中草酸钙结晶沉积的数量和等级 (P<0.05) (图6H)。

[0117] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出, 对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以对本发明进行若干改进和修饰, 这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

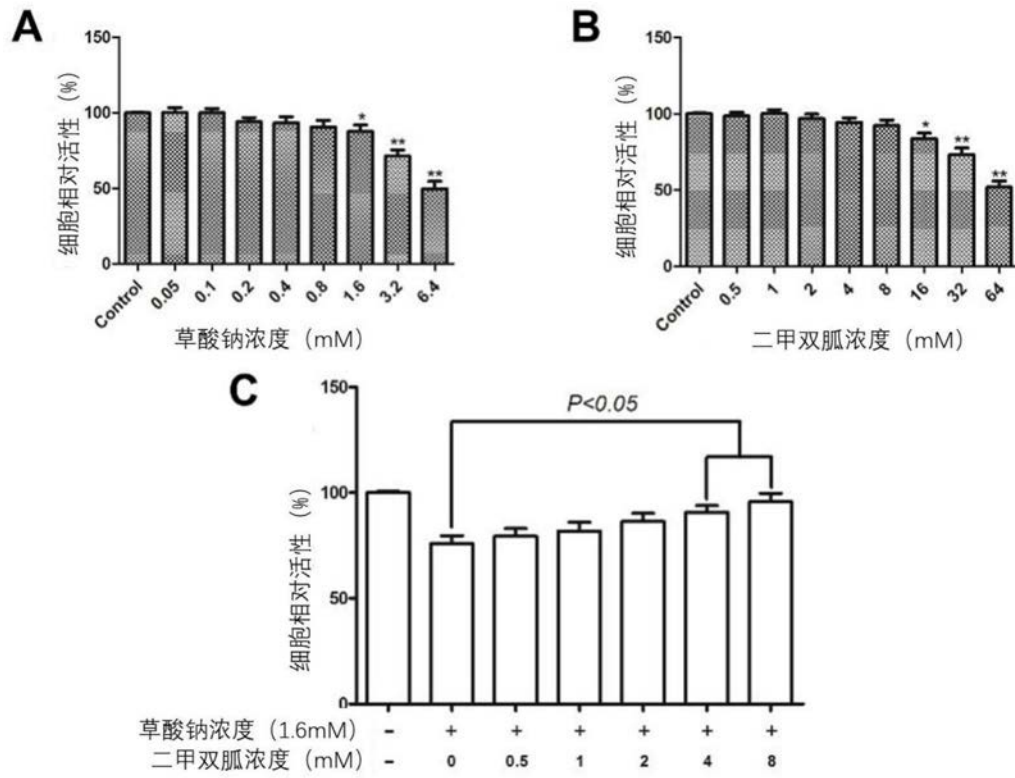


图1

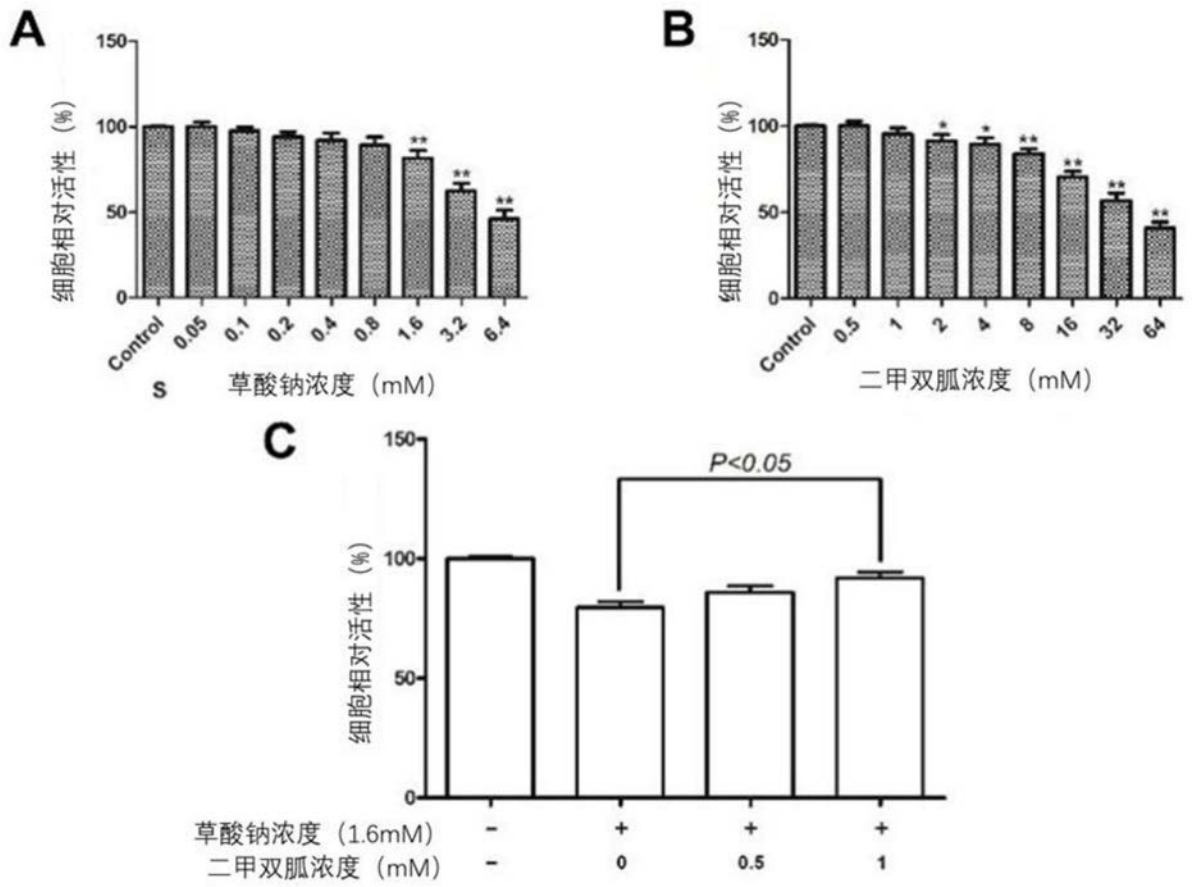


图2

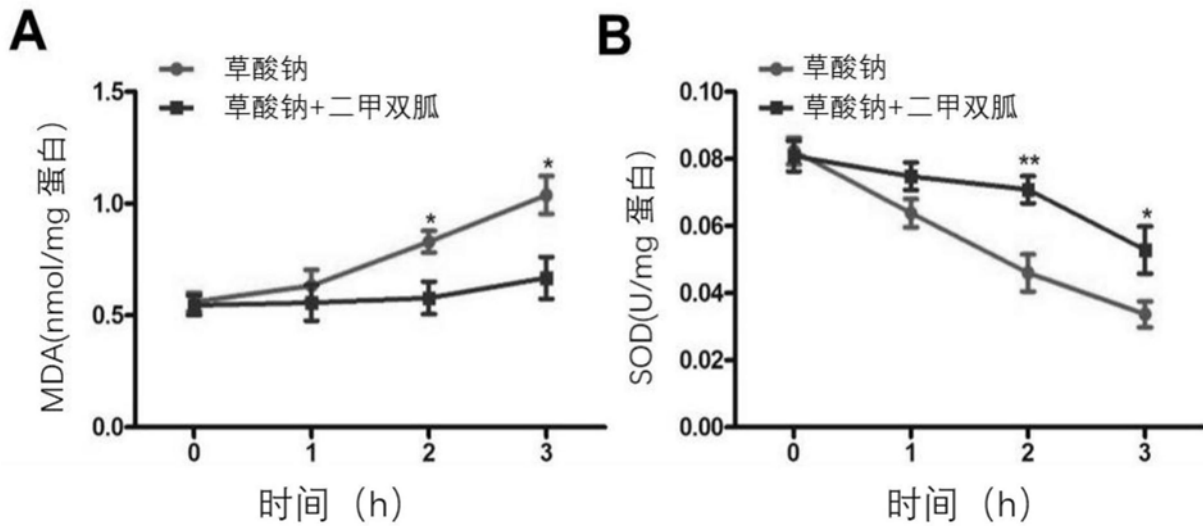


图3

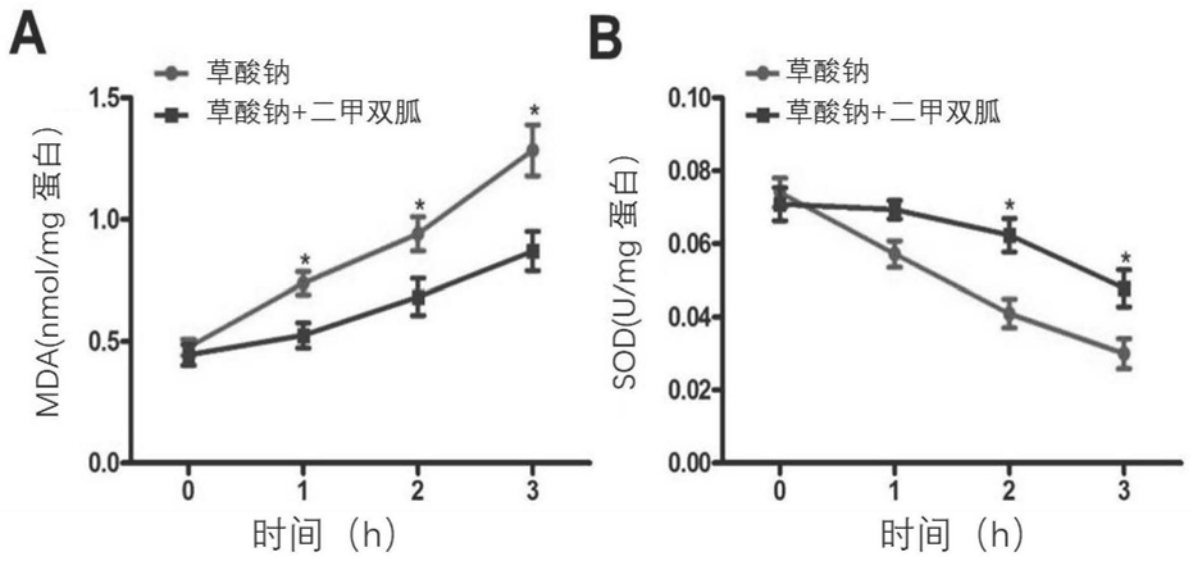


图4

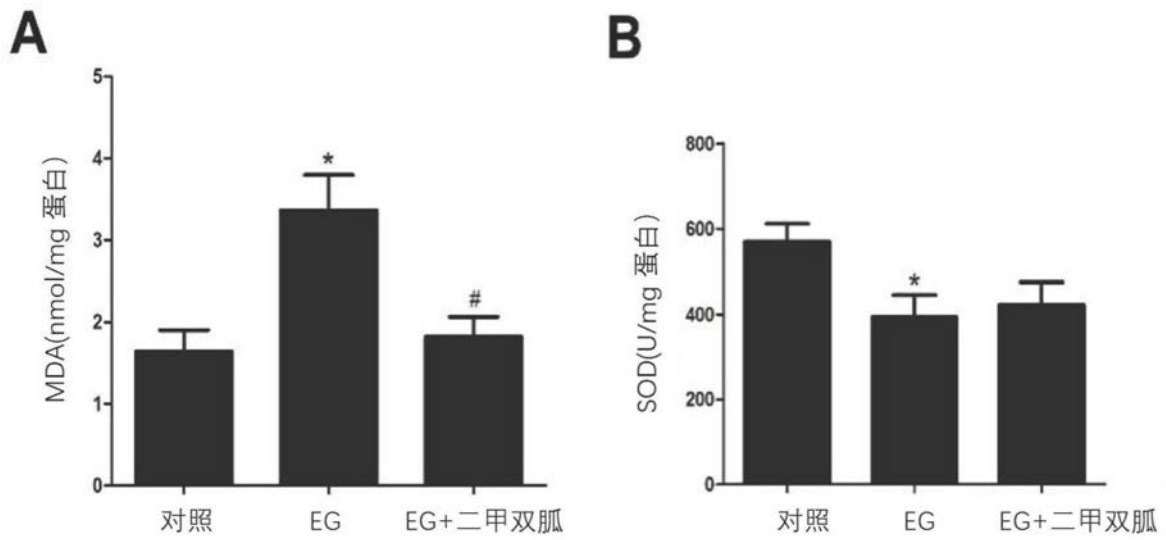


图5

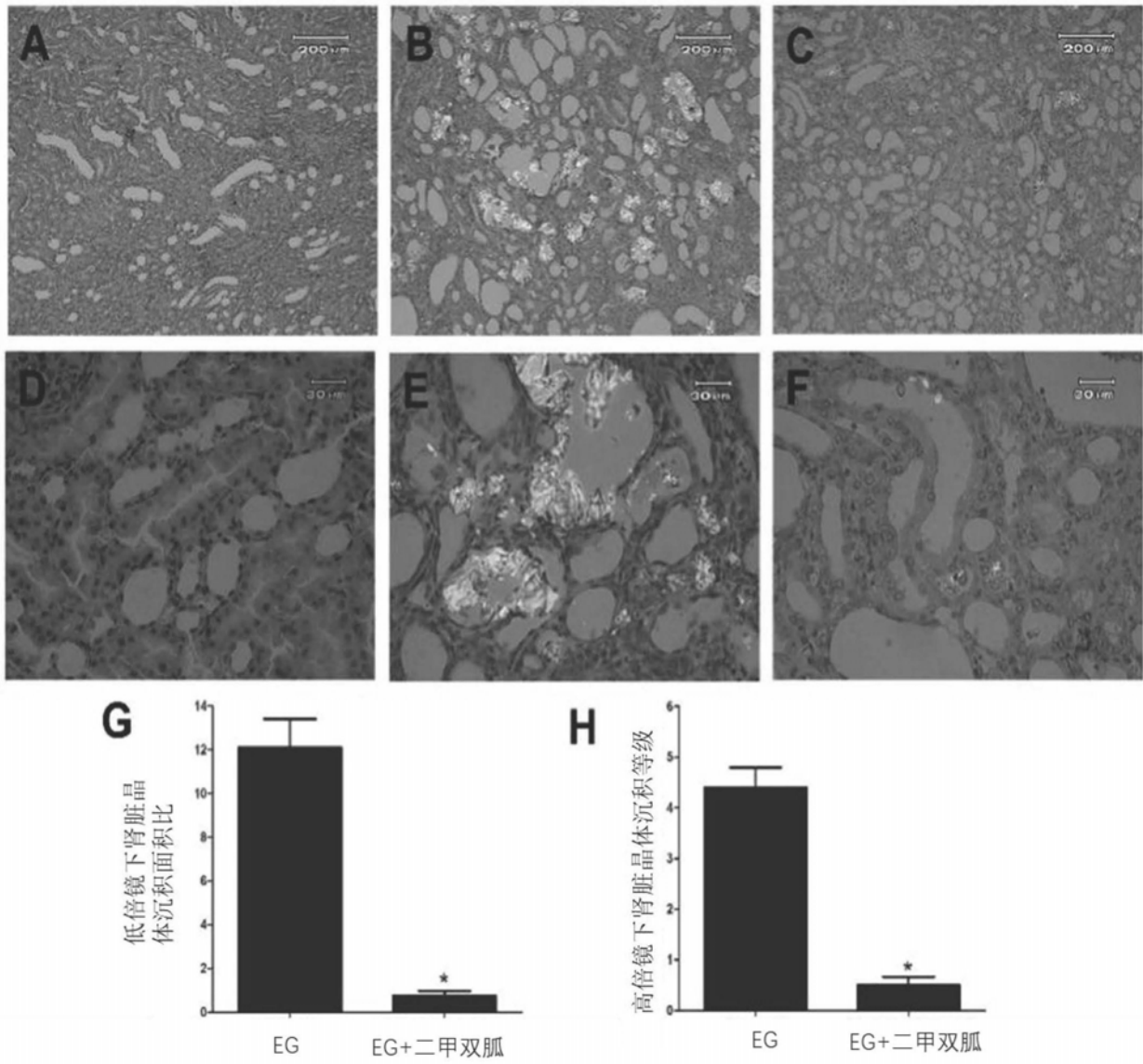


图6