

· 论 著 ·

体外震波碎石术治疗肾结石后氧化应激与急性肾损伤的关系

杜昌国¹, 叶明宝¹, 燕群峰¹, 贺利锋¹, 李鹏²

1. 咸阳市第一人民医院泌尿外一科, 陕西 咸阳 712000;

2. 咸阳市第一人民医院内分泌科, 陕西 咸阳 712000

摘要: **目的** 探讨体外震波碎石术(ESWL)治疗肾结石后氧化应激与急性肾损伤的关系。**方法** 回顾性分析 2015 年 3 月至 2016 年 3 月 70 例行 ESWL 治疗的肾结石患者的临床资料,根据急性肾损伤诊断标准,分为急性肾损伤组(6 例)和非急性肾损伤组(64 例)。检测两组氧化应激指标:丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)血清含量以及 NADPH 氧化酶亚基(NOX)2、NOX4、双功能氧化酶 1(DUOX1)血清中的蛋白表达水平,并进行比较。采用 Spearman 相关分析探讨氧化应激指标与急性肾损伤的关系,绘制氧化应激指标预测急性肾损伤的 ROC 曲线。**结果** 急性肾损伤组血清 MDA 含量及 NOX2、NOX4、DUOX1 蛋白相对表达量低于非急性肾损伤组(P 均 < 0.01), SOD 含量高于非急性肾损伤组($P < 0.01$)。Spearman 相关分析结果显示, SOD 与 48 h 血肌酐水平呈负相关($r = -0.581, P < 0.05$),与 6 h 尿量呈正相关($r = 0.510, P < 0.05$); MDA、NOX2、NOX4、DUOX1 与 48 h 血肌酐水平呈正相关($P < 0.05$),与 6 h 尿量呈负相关($P < 0.05$)。ROC 曲线分析结果显示, SOD、MDA、NOX2、DUOX1 可预测急性肾损伤($P < 0.05$)。**结论** ESWL 治疗肾结石后氧化应激指标水平升高,可能与急性肾损伤有关,且 SOD、MDA、NOX2、DUOX1 对急性肾损伤有一定预测价值。

关键词: 体外震波碎石术; 肾结石; 氧化应激; 急性肾损伤; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R 692.4 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2018)03-0343-04

Relationship between oxidative stress and acute kidney injury after ESWL treatment of renal calculi

DU Chang-guo*, YE Ming-bao, YAN Qun-feng, HE Li-feng, LI Peng

* Department of Urological, The First People's Hospital of Xianyang, Xianyang, Shanxi 712000, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between oxidative stress and acute kidney injury after extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) for the treatment of renal calculi. **Methods** The clinical data of 70 patients with renal calculi treated with ESWL was analyzed retrospectively. According to the diagnostic criteria of acute kidney injury, 6 patients with acute kidney injury were designed as acute kidney injury group, and 64 patients without acute kidney injury were designed as non-acute kidney injury group. The changes in the indices of oxidative stress such as serum malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), NADPH oxidase subunit 2 (NOX2), NADPH oxidase subunit 4 (NOX4) and bifunctional oxidase 1 (DUOX1) were compared between two groups. Spearman correlation analysis was used to investigate the relationship between oxidative stress index and acute kidney injury. Drawing receiver operating characteristic curve (ROC) predicting acute renal injury by oxidative stress index. **Results** The levels of MDA, NOX2, NOX4 and DUOX1 in acute kidney injury group were significantly lower than those in non-acute kidney injury group, and the level of SOD was higher than that in non-acute kidney injury group (all $P < 0.01$). Spearman correlation analysis showed that SOD was negatively correlated with the blood creatinine level at 48 h ($P < 0.05$) and positively correlated with urine 6-hour volume ($P < 0.05$). The levels of MDA, NOX2, NOX4 and DUOX1 were positively correlated with the level of serum creatinine at 48 h ($P < 0.05$) and negatively correlated with urine 6-hour volume ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that SOD, MDA, NOX2 and DUOX1 could predict acute kidney injury ($P < 0.05$). **Conclusion** The increase of oxidative stress indices after treatment of renal calculi by ESWL may be related to acute kidney injury, and SOD, MDA, NOX2, DUOX1 have certain predictive value for acute kidney injury.

Key words: Extracorporeal shock wave lithotripsy; Renal calculi; Oxidative stress; Acute kidney injury;

Malondialdehyde; Superoxide dismutase

肾结石是泌尿外科常见疾病,其发病与遗传、饮食习惯、职业等因素有关^[1]。体外震波碎石术(ESWL)治疗肾结石具有创伤小、恢复快、并发症少等优势,临床应用广泛。但有研究显示,ESWL 易对肾脏造成不同程度损害,其具体机制尚未完全了解^[2-3]。据文献报道,氧化应激可在多种慢性疾病中起作用,且均可造成一定程度肾损害^[4]。而目前临床对 ESWL 治疗肾结石后氧化应激与急性肾损伤的关系研究较少,故本研究回顾性分析本院 70 例行 ESWL 治疗的肾结石患者的临床资料,以探讨氧化应激与急性肾损伤的关系。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析本院 2015 年 3 月至 2016 年 3 月 70 例行 ESWL 治疗的肾结石患者的临床资料,本研究经医院伦理委员会批准通过。纳入标准:(1)均经肾-输尿管-膀胱摄影(KUB)确诊为一侧单发的肾结石;(2)首次行 ESWL;(3)ESWL 适应证:结石直径 10~15 mm,结石个数 < 3 枚;(4)临床资料完整。排除标准:(1)心、肝、肺、肾等严重内脏功能障碍;(2)出血性疾病;(3)合并有肾小球肾炎、肾功能异常、急慢性肾盂肾炎等其他肾脏疾病;(4)合并有尿路感染;(5)有输尿管手术史;(6)参与本研究 1 个月内使用过肾毒性药物;(7)妊娠。两组性别、年龄、结石部位、结石大小等比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。

1.2 诊断标准 采用全球肾脏病预后组织 2012 年提出的急性肾损伤诊断标准^[5]:48 h 血肌酐水平升高 $\geq 26.5 \mu\text{mol/L}$ 或 1 周内血肌酐水平升高程度 ≥ 1.5 倍基线水平;6 h 尿量 $< 0.5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

1.3 方法

1.3.1 手术方法 所有患者均行 ESWL 术治疗,采用电磁式碎石机。术前 1 d 口服缓泻剂进行肠道准备,术晨禁食,术前 30 min 肌内注射止痛剂哌替啶 50 mg。取俯卧位,采用 X 线定位装置对焦肾结石,碎石频率 60 次/min,平均结石冲击次数为 2 400 次,能级

为 7 级。医生指导患者术后采取俯卧体位并同时轻拍其腰部,以协助排石,开始 5 min/次,1 次/d,逐渐增加至 20 min/次,3 次/d。

1.3.2 检测方法 收集所有患者术后 2 d 的尿液标本 15 ml,标本收集后 15 min 内送入中心实验室离心,离心 10 min,转速 2 000 rpm,尽量避免晃动离心后的尿液标本,使用微量加样器取标本上清液于 EP 管中,在放入 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻待检。采用酶联免疫法检测血清丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平变化。在 EP 管中吸取 2 ml 上清液,对照加 2 ml 蒸馏水,之后加入 2 ml TBA 溶液(0.6%),将混合物于沸水浴中反应 15 min,冷却离心后测定吸光度。酶联免疫试剂盒均购自上海研吉生物科技有限公司;严格按照仪器、实验室技术操作规程进行检测。采用 Western blot 法分析血清中 NADPH 氧化酶亚基(NOX)2、NOX4 及双功能氧化酶(DUOX)1 表达变化,采用考马斯亮蓝法蛋白定量,转至 PVDF 膜上,在室温下,将蛋白以 0.1% 的 BSA 封闭 2 h,与一抗温孵 2 h,在室温下与二抗反应 1 h;PBS 漂洗后使用 ECL 混合液进行显色、曝光等,采用凝胶成像分析系统进行蛋白条带的光密度值测定,内参照物为 β -actin,以各目标蛋白光密度值与 β -actin 条带光密度值的比值,作为其蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法 选用统计学软件 SPSS 19.0 对研究数据进行分析和处理。计数资料采用百分率(%)表示,组间对比进行校正 χ^2 检验;计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间对比进行 t 检验;采用 Spearman 相关分析探讨氧化应激指标与急性肾损伤的关系;氧化应激指标预测急性肾损伤采取 ROC 曲线分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组氧化应激指标比较 急性肾损伤组血清 MDA 含量及 NOX2、NOX4、DUOX1 蛋白相对表达量低于非急性肾损伤组(P 均 < 0.01),SOD 水平高于非急性肾损伤组($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 两组基本资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	性别 (男/女,例)	年龄(岁)	左肾/右肾结石 (例)	结石部位(例)			结石直径 (cm)
					肾盂	上盏	中盏	
非急性肾损伤组	64	37/27	38.69 \pm 7.93	36/28	16	23	7	1.25 \pm 0.11
急性肾损伤组	6	4/2	39.13 \pm 8.62	3/3	2	3	1	1.20 \pm 0.13
χ^2/t 值		0.000*	0.129	0.009*		0.011		1.049
P 值		0.990	0.898	0.925		0.995		0.298

注:*取校正 χ^2 值。

2.2 氧化应激指标对急性肾损伤的预测价值

SOD、MDA、NOX2、DUOX1 均可预测急性肾损伤 ($P < 0.01$)。SOD 曲线下面积最大,对急性肾损伤的预测价值最大。而 NOX4 对急性肾损伤无预测价值 ($P > 0.05$)。见表 3 及图 1。

2.3 氧化应激指标与急性肾损伤相关性分析

表 2 两组氧化应激指标变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SOD(U/L)	MDA(mmol/L)	NOX2*	NOX4*	DUOX1*
非急性肾损伤组	64	459.35 ± 27.18	22.13 ± 3.62	0.31 ± 0.08	0.36 ± 0.11	0.27 ± 0.09
急性肾损伤组	6	421.26 ± 23.16	30.34 ± 3.75	0.42 ± 0.09	0.49 ± 0.13	0.39 ± 0.12
<i>t</i> 值		3.316	5.298	3.189	2.729	3.037
<i>P</i> 值		0.001	0.000	0.002	0.008	0.003

注: * 表示为蛋白相对表达量。

表 3 氧化应激指标对急性肾损伤的预测价值

指标	曲线下面积	标准误	95% CI	<i>P</i> 值	最佳截断值	敏感度	特异度
SOD	0.965	0.024	0.918 - 1.000	0.000	410.50U/L	0.844	1.000
MDA	0.867	0.059	0.752 - 0.982	0.003	30.125mmol/L	0.833	0.750
NOX2	0.854	0.048	0.759 - 0.949	0.004	0.475	1.000	0.547
NOX4	0.728	0.072	0.586 - 0.869	0.066	0.555	0.667	0.672
DUOX1	0.775	0.080	0.618 - 0.932	0.027	0.365	0.833	0.437

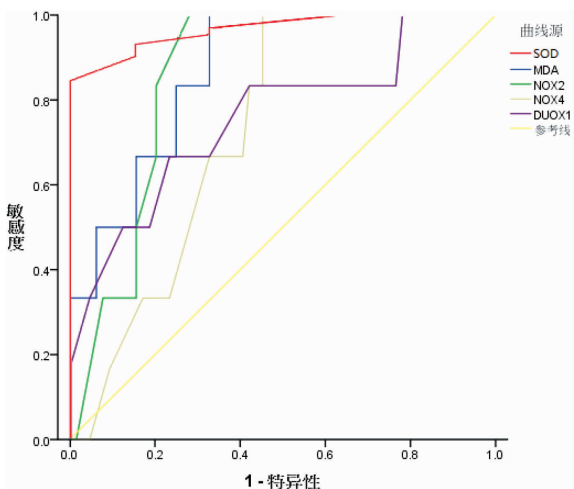


图 1 SOD、MDA、NOX2、NOX4、DUOX1 预测急性肾损伤的 ROC 曲线

表 4 氧化应激指标与急性肾损伤相关性分析

指标	48 h 血肌酐水平 ($\mu\text{mol/L}$)		6 h 尿量 ($\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	相关系数(<i>r</i>)	<i>P</i> 值	相关系数(<i>r</i>)	<i>P</i> 值
SOD(U/L)	-0.581	0.010	0.510	0.019
MDA(mmol/L)	0.678	0.000	-0.623	0.000
NOX2	0.476	0.016	-0.425	0.026
NOX4	0.402	0.034	-0.395	0.030
DUOX1	0.431	0.023	-0.376	0.033

3 讨论

ESWL 术是治疗非复杂性肾结石的重要治疗方法,但 ESWL 后多数患者会出现血尿等症状,且表现出不同程度的肾脏损伤。刘敏等^[6] 研究显示,经皮

Spearman 相关性分析结果显示,SOD 与 48 h 血肌酐水平呈负相关 ($P < 0.05$),与 6 h 尿量呈正相关 ($P < 0.05$)。MDA、NOX2、NOX4、DUOX1 与 48 h 血肌酐水平呈正相关 (P 均 < 0.05),与 6 h 尿量呈负相关 (P 均 < 0.05)。见表 4。

肾镜钬激光治疗急性肾损害发生率约为 6.70%。目前学者认为 ESWL 对肾脏造成损伤主要由于冲击波本身损害肾脏组织、空化效应等原因^[7]。ESWL 碎石过程中,冲击波在结石表面会发生阻抗变化,脉冲式高压会释放热量,灼伤肾组织细胞,造成毛细血管、微血管出血^[8],造成肾脏缺血、缺氧,进而发生肾功能损害,这也是大部分肾损伤患者会出现血尿的原因^[9]。空化效应可产生极大的拉伸作用力及压力,进而破碎结石,但同时声波的热效应也会解离出水分子自由基,造成肾功能损害^[10]。

在正常生理状况下,肾脏抗氧化能力可与机体氧自由基氧化能力保持平衡,不会损伤组织细胞;若发生肾脏疾病或机体氧自由基显著增加可降低抗氧化能力,引起肾损伤^[11]。目前临床测定氧化应激水平主要通过检测体内氧化应激产物及氧化应激蛋白水平。MDA 主要由细胞下多不饱和脂肪酸与自由基反应生成,是一种脂质过氧化终产物^[12]。SOD 是一种酶类清除剂,底物为超氧阴离子,可完全灭活氧自由基,阻断肾脏组织细胞的氧化损伤反应;合并肾损伤的患者体内 SOD 明显降低,从而使氧自由基大量增加,造成组织器官损伤^[13]。有文献报道,氧化应激在肾脏疾病中表现尤为明显,且多数氧化应激多由 NOX 介导^[14]。苏雁峰等^[15] 与 Tsuji 等^[16] 研究均显示,机体 NOX2、NOX4 蛋白表达显著升高,机体处于氧化应激状态。杜亚琴等^[17] 研究发现,肾脏功能减

退与体内氧化应激反应加重有关。本研究也显示,急性肾损伤组氧化应激反应明显加重,与上述观点相符。

易晔等^[18]研究显示,氧化应激介导了多种疾病中的肾损伤过程,可能与肾损伤密切相关。本研究还发现,SOD 与 48 h 血肌酐水平呈负相关,与 6 h 尿量呈正相关;MDA、NOX2、NOX4、DUOX1 与 48 h 血肌酐水平呈正相关,与 6 h 尿量呈负相关。48 h 血肌酐水平与 6 h 尿量均为急性肾损伤的评价标准,提示氧化应激反应可能是造成急性肾损伤的重要环节。杨静等^[19]研究认为,机体大量消耗抗氧化物质、产生氧自由基是急性肾损伤患者氧化应激反应的主要表现,可影响 SOD、MDA 水平。徐婷婷等^[20]研究发现,肾损伤大鼠体内 SOD 水平降低,MDA 水平升高,其损伤机制与氧化应激反应有关。有研究报道,NOX 与肾脏疾病尤其是肾结石发生密切相关。大量研究显示,NOX2、NOX4、DUOX1 可能参与肾结石氧化损伤的发展^[21-24]。石丽等^[25]研究也发现,肾脏 NOX4 蛋白表达水平增强,在早期肾脏损伤起重要作用,也提示氧化应激与肾损伤有关。

既往未见氧化应激指标预测急性肾损伤的研究。本研究显示,SOD、MDA、NOX2、DUOX1 均可预测急性肾损伤,其中 SOD 预测价值最大。而 NOX4 对急性肾损伤无预测价值,可能原因为本研究选取样本量过小,未能体现出差异性,但本研究只是初步研究,还需扩大样本量进一步深入探讨。

综上所述,ESWL 治疗肾结石后患者血清 SOD 水平降低,MDA 水平升高,NOX2、NOX4、DUOX1 蛋白表达增强,其可能与急性肾损伤有关,且 SOD、MDA、NOX2、DUOX1 等氧化应激指标对急性肾损伤有一定预测价值。

参考文献

[1] 汤宗源,江顺建,李江,等. 广西瑶族成年人肾结石流行病学调查[J]. 中国全科医学,2015,18(14):1691-1694.

[2] 林云侨,叶晶晶,陈从其,等. ESWL 术后肾脏及尿路上皮损害程度的临床研究[J]. 中外医学研究,2016,14(29):15-16.

[3] 王志新,徐高磊,王延芬,等. 氧化应激和抗氧化剂在糖尿病并发症发生发展中可能的作用[J]. 医学研究杂志,2013,42(4):12-15.

[4] 毛志敏,孟宪杰. 生物学标志物在糖尿病肾病中的研究进展[J]. 医学研究杂志,2014,43(11):180-182.

[5] 郭锦洲. 改善全球肾脏病预后组织(KDIGO)临床实践指南:急性肾损伤[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2013,22(1):57-60.

[6] 刘敏,董浩,彭泳涵,等. 经皮肾镜钬激光碎石术后急性肾损伤高危因素分析[J]. 临床泌尿外科杂志,2016,31(6):543-546,549.

[7] 黄震,林升汉. 依达拉奉辅助治疗对体外冲击波治疗肾结石所致肾损伤的保护作用研究[J]. 临床药物治疗杂志,2015,13(6):34-37.

[8] 刘勇,果佳,王涛. 输尿管软镜联合体外冲击波碎石在肾结石治疗中的应用研究[J]. 中国医学装备,2015,12(10):100-103.

[9] 刘建民,李振,汪盛,等. 重复体外冲击波碎石对兔肾脏损害累积性的研究[J]. 中华全科医学,2016,14(9):1470-1472,1494.

[10] Kreider W, Maxwell AD, Cunitz BW, et al. In vivo cavitation thresholds and injury observations related to burst wave lithotripsy[J]. J Acousti Soc Am, 2015, 138(3):1846.

[11] 丁文娟,潘玲,黎培培,等. 慢性肾脏病血清血红素氧合酶-1 与氧化应激的相关性及影响因素[J]. 现代预防医学,2015,42(6):1070-1073.

[12] 陶广华,张文龙,高华萍,等. 脂质过氧化反应在内毒素致大鼠肺损伤中的作用[J]. 四川医学,2016,38(8):840-844.

[13] 袁牧,王昌留,王一斐,等. 超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2016,25(6):550-558.

[14] 王燕,窦占军,曹莉,等. 氧化应激在 OSAHS 所致肾损害中的作用机制及抗氧化干预的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2016,36(6):461-464.

[15] 苏雁峰. 体外冲击波碎石术损伤肾脏的氧化应激机制研究及牛磺酸的改善作用[J]. 海南医学院学报,2015,21(5):654-656.

[16] Tsuji H, Wang W, Sunil J, et al. Involvement of renin-angiotensin-aldosterone system in calcium oxalate crystal induced activation of NADPH oxidase and renal cell injury[J]. World J Urol, 2016, 34(1):89-95.

[17] 杜亚琴,李怡,王莉. 炎症、氧化应激与终末期肾病血管钙化[J]. 实用医院临床杂志,2016,13(5):218-221.

[18] 易晔,卢远航,冀倩倩. 高通量血液透析对糖尿病肾病透析患者氧化应激及微炎症状态的影响[J]. 重庆医学,2015,44(19):2667-2669.

[19] 杨静,蒋文勇,于黔,等. 高通量血液透析对糖尿病肾病维持性血液透析患者氧化应激和微炎症状态的影响[J]. 广东医学,2016,37(18):2784-2786.

[20] 徐婷婷,李一飞,金若敏,等. 商陆水煎液致大鼠肾损伤的初步研究[J]. 中国药理学杂志,2015,50(5):403-407.

[21] Féraille E, Dizin E, Roth I, et al. NADPH oxidase 4 deficiency reduces aquaporin-2 mRNA expression in cultured renal collecting duct principal cells via increased PDE3 and PDE4 activity[J]. PLoS One, 2014, 9(1):e87239.

[22] 李笑然,岳中瑾. NADPH 氧化酶与肾结石相关性研究进展[J]. 临床泌尿外科杂志,2015,30(10):954-958.

[23] Cha JJ, Min HS, Kim KT, et al. APX-115, a first-in-class pan-NADPH oxidase (Nox) inhibitor, protects db/db mice from renal injury[J]. Lab Invest, 2017, 97(4):419-431.

[24] 季武,杨秀书,李荣富,等. 肾结石患者经皮肾镜取石术后重症感染病原菌与对肾功能影响机制研究[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(20):4621-4623.

[25] 石丽,王颖超,罗朋力. 模拟海拔 5000 米高原低氧环境对大鼠肾脏氧化应激和 NADPH 氧化酶的影响[J]. 医学研究杂志,2014,43(3):71-73.