

基质蛋白在泌尿系结石形成中的作用及其机制的研究进展*

李雄才¹ 钟芳灵¹ 吴伟宙¹ 张世科¹ 黄亚鹏¹ 曾国华¹ 吴文起^{1△}

[摘要] 泌尿系结石是世界范围内最常见的泌尿系统疾病之一,是由多种因素共同作用下的良性疾病,然而其发病机制尚不明确。本文旨在对泌尿系结石中的蛋白质成分的研究进展作一综述,通过对目前结石基质蛋白(SMP)在不同成分结石的发生发展中的作用及可能机制的研究进行总结归纳,为后续深入的研究泌尿系结石的发病机制提供理论基础和研究方向。

[关键词] 泌尿系结石;基质蛋白;蛋白组学

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2019.09.016

[中图分类号] R691.4 **[文献标志码]** A

Advances in the role of matrix proteins in the formation of urinary stones and its mechanism

LI Xiongcai ZHONG Fangling WU Weizhou ZHANG Shike
HUANG Yaping ZENG Guohua WU Wenqi

(Department of Urology, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong Key Laboratory of Urology, Guangzhou, 510230, China)

Corresponding author: WU Wenqi, E-mail: wwqwml@163.com

Abstract Urolithiasis is one of the most common urological diseases in the world. It is a benign disease caused by multiple factors. However, its pathogenesis is still unclear. This article is aimed at making a review on the research progress of protein in urinary calculi. Then we summarize the research on the role and possible mechanism of the stone matrix proteins in the occurrence and development of different components of stones in order to provide a theoretical basis and research direction for the subsequent in-depth study of the pathogenesis of urinary calculi.

Key words urinary calculi; matrix proteins; proteomics

泌尿系结石是世界范围内最常见的泌尿系统疾病之一^[1],且10年内的复发率可高达50%^[2]。最新的横断面调查结果显示我国成年人群泌尿系结石的患病率高达6.4%^[3]。然而目前泌尿系结石的发病机制尚不明确。目前按照主要成分可以将泌尿系结石分为草酸钙结石、磷酸钙结石、尿酸结石、胱氨酸结石、黄嘌呤结石、磷酸镁铵结石、碳酸磷灰石及尿酸铵结石等^[4]。随着对结石成分的深入研究发现,泌尿系结石的化学成分不仅包括上述晶体,还包括大量的非晶体或有机物质,如糖胺聚糖、脂质、碳水化合物和蛋白质等大分子组成^[5]。结石的形成并不仅仅是简单的物理化学过程,而是同时被众多有机大分子调控的过程。这些有机大分子在泌尿系结石的发生发展过程发挥了重要的作用^[6]。

初期的研究认为尿液中的蛋白质在结石形成

过程中主要通过堵塞集合系统、聚集晶体或者协助晶体黏附至肾小管上皮细胞从而发挥作用^[7]。自1990年Jones等^[8]首次利用二维聚丙烯酰胺凝胶电泳从24例肾结石中提取到了蛋白质成分,随着蛋白质质谱分析技术的发展,国际上不少研究人员开始陆续将此技术运用于分析结石中的蛋白质成分,即结石基质蛋白(stone matrix proteins, SMP)。目前已经从结石中分离鉴定出多种蛋白质,这些蛋白主要通过参与相关的生物过程,如炎症、免疫反应和急性期反应信号通路等在结石的发生发展中发挥作用^[9]。然而SMP参与结石形成的确切机制尚未完全阐明。

本文旨在对泌尿系结石中的蛋白质成分的研究进展作一综述,通过对目前SMP在不同成分结石发生发展中的作用及可能机制的研究进行总结归纳,为后续深入研究泌尿系结石的发病机制提供理论基础和研究方向。

1 基质蛋白与草酸钙结石的研究进展

含钙结石约占所有泌尿系结石的80%,其中50%为草酸钙(calcium oxalate, CaOx)结石^[10]。目前的研究显示CaOx结石中含有多种不同浓度

* 基金项目:国家自然科学基金(编号81570633);广州市科技局项目(编号201604020001)

¹ 广州医科大学附属第一医院泌尿外科 广东省泌尿外科重点实验室(广州,510230)

△ 审校者

通信作者:吴文起, E-mail: wwqwml@163.com

的蛋白质^[9,11]。Merchant 鉴定出 CaOx 结石中存在 158 种蛋白质,其中 28 种蛋白质存在于所有被检测的 CaOx 结石中^[9]。进一步的研究显示 Tamm-Horsfall 蛋白 (THP) 和血清白蛋白等对 CaOx 晶体聚集具有刺激和抑制双重作用^[5]。骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)^[12]、凝血酶原片段 1 (urinary prothrombin fragment 1, UPTF1)^[13]、防御素^[14]、钙粒蛋白^[5] 和尿胰蛋白酶抑制剂 (alpha-1-microglobulin bikunin precursor, AMBP)^[15] 等可以抑制 CaOx 晶体的聚集。而纤连蛋白^[16]、角蛋白^[17] 和髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)^[18] 对结石形成有促进作用。此外 SMP 中还鉴定出膜相关蛋白^[19,20]。虽然仍无法解释这些膜相关蛋白是来自于不同的细胞过程还是泌尿系统本身的组成部分,但这提示细胞膜和膜相关蛋白与结石形成存在一定联系。

根据蛋白来源可以将 CaOx 中的 SMP 分为肾细胞来源的蛋白、细胞外 SMP 及血液来源的蛋白三组。骨桥蛋白和 THP 主要表达于肾小管上皮细胞,而玻连蛋白、纤连蛋白和蛋白聚糖是细胞外基质的组要成分。血液来源的蛋白质,包括血清白蛋白、免疫球蛋白 γ 及各种血液凝固蛋白如凝血酶原、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、凝血因子 X、纤维蛋白原及纤溶酶原等。其中一些蛋白质如凝血酶原,同时也在肾脏表达^[21]。有研究报道凝血酶原、蛋白 S、蛋白 Z 和骨桥蛋白存在于草酸钙结石,但不存在于尿酸结石,表明这些蛋白可能具有促进草酸钙结石形成的作用^[22]。

通过研究蛋白功能发现 CaOx 中的 SMP 多为结合功能蛋白,与晶体结合可增加粘接力使之聚集并黏附于肾小管上皮细胞。刘伟^[17] 的研究显示 CaOx 结石中的 SMP 45.8% 为结合功能蛋白,19.08% 为催化活性蛋白,10.69% 为结构分子活性蛋白,8.4% 为酶活性调节蛋白。

有学者提出高草酸尿和草酸钙结晶可作用于肾小管上皮细胞造成过氧化损伤,活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及其产生的氧化应激 (oxidative stress, OS) 参与了结石形成的调控^[23], 晶体颗粒导致 ROS 产生后,出现 OS,可能会启动 P38 MAPK/JNK 信号通路,产生各种转录及生长因子 (如 NF κ B、AP-1、TGF β 等),并通过级联反应产生结晶调控分子如 OPN、AMBP、 α 1 微球蛋白、间 α 胰蛋白酶抑制物 (I α I) 和 UPTF1 等。细胞过氧化损伤死亡后暴露的基底膜有利于结晶的黏附与停留,结晶黏附于肾小管上皮形成 Randall's 斑;同时,ROS 诱导的炎症反应导致胶原蛋白沉积并形成纤维化;这些蛋白参与激活的 P38 MAPK/JNK 信号通路考虑为结石形成的重要机制^[17,24],并在结

石形成过程中可能起主要作用。

此外,Witzmann 等^[25] 分析了 2 种不同形态的草酸钙结石标本的 SMP,从结石标本中鉴定出超过 1 000 种蛋白。该研究鉴定的蛋白结果与先前所报道的许多蛋白相一致,结石内蛋白质组成成分大部分重叠,其蛋白含量存在一定差异。

2 基质蛋白与尿酸结石的研究进展

尿酸结石占有泌尿系结石的 10% ~ 15%^[26]。Jou 等^[27] 在尿酸结石标本中鉴定出 242 种蛋白质,其中在所有鉴定的尿酸结石标本中都存在的蛋白质有 19 种,且尿酸结石中的 SMP 与 CaOx 中的 SMP 在种类上存在部分重叠,比如玻连蛋白、角蛋白 7 及 8、载脂蛋白 A1 及 D 等。进一步分析提示,炎症和补体系统最有可能参与尿酸结石的形成,这与上述 SMP 在 CaOx 中的作用研究是一致的,其次是 IL-6 信号通路、细胞骨架和中间丝通路、免疫应答吞噬反应等。进一步应用 KEGG 数据库分析发现尿酸结石中的 SMP 主要参与 1-酰基-甘油-3-磷酸乙醇胺通路等脂质代谢。这意味着脂质代谢与尿酸结石的形成存在一定关系。进一步对尿酸结石中的 SMP 的功能进行分析显示,结合功能蛋白占 44.34%,催化活性蛋白占 22.46%,结构分子活性蛋白占 9.57%,酶活性调节蛋白占 6.25%,转运活性蛋白占 5.27%。其中多为结合功能蛋白,与上述的 CaOx SMP 相似^[17,24]。

3 基质蛋白与磷酸镁铵结石的研究进展

磷酸镁铵 (magnesium ammonium phosphate, MAP) 占有泌尿系结石的 10% ~ 15%^[5]。Boonla 等^[28] 分别在 CaOx、尿酸、MAP 结石基质中分别发现 54 种、53 种和 32 种蛋白质。各种类型结石的 SMP 中普遍存在 29 种蛋白质。CaOx SMP 和尿酸 SMP 分别有 7 种特异性蛋白,而在 MAP SMP 中没有发现特异性蛋白。这提示在 CaOx 结石和尿酸结石的形成中存在特异蛋白参与了特定的生化过程。在 MAP SMP 中鉴定出炎症和纤维化相关蛋白。炎症和纤维化的代表钙粒蛋白 A 和纤连蛋白在肾结石肾组织中表达上调。钙粒蛋白 A 在浸润的白细胞中表达强烈。纤连蛋白在肾小管细胞中过度表达。MAP 结石患者的尿和结石基质中检测出钙粒蛋白 A 和纤连蛋白,但在健康尿中检测不到。这提示炎症和纤维化可能与 MAP 结石的形成有关^[28]。目前很少有文献报道感染性结石的 SMP 研究,需要更多的试验做进一步探究。

4 基质蛋白与基质结石的研究进展

基质结石又称软结石,是罕见的泌尿系结石,主要由有机质组成,矿物成分少或无。蛋白质基质干重在肾结石占 2.5%,而基质结石干重可达 84%^[29]。基质结石的发病率极低,目前在基质结

石的蛋白组学研究甚少。Martelli^[30]从基质结石标本中鉴定出142种蛋白。这些蛋白质中含有大量的炎症相关蛋白,如中性粒细胞防御素I、钙粒蛋白A、胸腺素 β -4、颗粒体蛋白(granulin)和泛素(ubiquitin)等,这些蛋白所参与的炎症反应可能在某种程度上参与了基质结石的形成。

5 基质蛋白与胱氨酸结石的研究进展

胱氨酸(cystine,CYS)结石病是一种先天性疾病,是由于CYS代谢异常,导致CYS结石的形成^[31]。CYS结石占成人所有泌尿系结石的1%~2%,占儿童结石的6%~8%。Kovacevic等^[32]在CYS结石患者的尿液标本中鉴定出623种蛋白质,对比于健康人,其中铜蓝蛋白、中性粒细胞明胶酶载脂蛋白、维生素D结合蛋白的蛋白表达量至少增加2倍,OPN和THP的蛋白表达量至少降低2倍。在鉴定的SMP中已知有6种蛋白与纤维化途径相关,包括肌动蛋白、波形蛋白、热休克70 kDa蛋白、胰蛋白酶抑制剂重链前体(inter-alpha-trypsin inhibitor, ITIH)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)和血清对氧磷酶。相比于健康人,CYS结石患者的尿液标本中,相对表达量至少增加2倍的180种蛋白质,其中39种参与应激反应,26种参与创伤,21种参与炎症反应,18种参与免疫反应,4种参与细胞对氧化应激的反应。这些蛋白提示胱氨酸结石的形成与氧化损伤、炎症、伤口愈合和纤维化有关。有研究对比了CYS结石患者和健康人尿液外泌体蛋白组学的差异,研究鉴定出165种蛋白质,其中38种被上调。这些蛋白质包括肾损伤标记物、循环蛋白质和中性粒细胞标记物。在CYS结石患者中,1/3过表达的蛋白是中性粒细胞来源的。白细胞的存在可能是由炎症或泌尿系统感染引起的^[33]。目前并没有文献报道CYS SMP的研究,需要更多的试验进一步探究。以上观点仅仅是从CYS结石患者的尿液中提供CYS结石的蛋白质组学信息。另外,ITIH和MMP9是胱氨酸尿潜在的诊断生物标志物新的治疗靶点^[32],这些蛋白值得进一步研究。

6 总结

综上所述,相同结石成分,SMP在蛋白种类上大部分重叠,但在蛋白表达量上存在一定差异。虽然多种类型结石的SMP中都含有凝血酶原、钙颗粒蛋白A、钙颗粒蛋白B等蛋白质,但不同结石成分中SMP组成及含量具有差异性。CaOx结石中SMP的量很少,而尿酸结石、MAP结石的SMP明显多于CaOx结石。从蛋白种类数量上来说,CaOx SMP和尿酸SMP所含有的蛋白种类多于MAP SMP,且CaOx SMP和尿酸SMP含有各自的特异性蛋白。值得注意的是SMP中存在大量的

炎性蛋白,这些蛋白所参与的免疫反应、炎症、损伤和组织修复等过程可能与结石形成有一定关系。然而迄今为止,所有文献报道的研究均存在一定的局限性,主要是随机获得的结石样本例数太少,而且结石样本在储存、研磨及蛋白的提取过程中受到环境的影响,这也可能造成有效蛋白成分的丢失,直接影响了蛋白电泳结果与质谱分析结果。虽然国内外许多研究已证实SMP可通过多种机制参与泌尿系结石的形成,但可以肯定的是目前尚无任何一种机制能够完全解释结石的形成,其具体的机制仍需要进一步研究和探讨。

[参考文献]

- 1 Moe O W. Kidney stones: pathophysiology and medical management[J]. *Lancet*, 2006, 367(9507): 333-444.
- 2 Wilkinson H. Clinical investigation and management of patients with renal stones[J]. *Ann Clin Biochem*, 2001, 38(Pt 3): 180-187.
- 3 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.
- 4 Türk C, Petřik A, Sarica K, et al. EAU Guidelines on Interventional Treatment for Urolithiasis[J]. *Eur Urol*, 2016, 69(3): 475-482.
- 5 Alelign T, Petros B. Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts [J]. *Adv Urol*, 2018, 2018: 3068365.
- 6 Aggarwal K P, Narula S, Kakkar M, et al. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 292953.
- 7 Finlayson B, Reid F. The expection of free and fixed particles in urinary stone disease[J]. *Invest Urol*, 1978, 15(6): 442-448.
- 8 Jones W T, Resnick M I. The characterization of soluble matrix proteins in selected human renal calculi using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *J Urol*, 1990, 144(4): 1010-1014.
- 9 Merchant M L, Cummins T D, Wilkey D W, et al. Proteomic analysis of renal calculi indicates an important role for inflammatory processes in calcium stone formation[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 95(4): F1254-F1258.
- 10 Chaudhary A, Singla S K, Tandon C. In vitro Evaluation of Terminalia arjuna on Calcium Phosphate and Calcium Oxalate Crystallization[J]. *Indian J Pharm Sci*, 2010, 72(3): 340-345.
- 11 Okumura N, Tsujihata M, Momohara C, et al. Diversity in protein profiles of individual calcium oxalate kidney stones[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68624.
- 12 Kohri K, Yasui T, Okada A, et al. Biomolecular mechanism of urinary stone formation involving osteopontin [J]. *Urol Res*, 2012, 40(6): 623-637.

- 13 Rungroj N, Sudtachat N, Nettuwakul C, et al. Association between human prothrombin variant (T165M) and kidney stone disease[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45533.
- 14 Canales B K, Anderson L, Higgins L, et al. Proteome of Human Calcium Kidney Stones[J]. *Urology*, 2010, 76(4): 1017. e13-e20.
- 15 曹正国, 刘继红, 宋晓东, 等. 肾结石大鼠肾组织 bikunin mRNA 的表达[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2004, 19(11): 675-677.
- 16 Khamchun S, Sueksakit K, Chaiyarit S, et al. Modulatory effects of fibronectin on calcium oxalate crystallization, growth, aggregation, adhesion on renal tubular cells, and invasion through extracellular matrix[J]. *J Biol Inorg Chem*, 2019, 24(2): 235-246.
- 17 刘伟. 肾草酸钙及尿酸结石基质蛋白的质谱鉴定与分析[D]. 南昌大学, 2015.
- 18 Mushtaq S, Siddiqui A A, Naqvi Z A, et al. Identification of myeloperoxidase, α -defensin and calgranulin in calcium oxalate renal stones[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 384(1-2): 41-47.
- 19 Kumar V, Yu S, Farell G, et al. Renal epithelial cells constitutively produce a protein that blocks adhesion of crystals to their surface[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287(3): F373-F383.
- 20 Verkoelen C F, Verhulst A. Proposed mechanisms in renal tubular crystal retention[J]. *Kidney Int*, 2007, 72(1): 13-18.
- 21 Grover P K, Miyazawa K, Coleman M, et al. Renal prothrombin mRNA is significantly decreased in a hyperoxaluric rat model of nephrolithiasis[J]. *J Pathol*, 2010, 210(3): 273-281.
- 22 Kaneko K, Kobayashi R, Yasuda M, et al. Comparison of matrix proteins in different types of urinary stone by proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Int J Urol*, 2012, 19(8): 765-772.
- 23 Khan S R. Reactive oxygen species, inflammation and calcium oxalate nephrolithiasis[J]. *Transl Androl Urol*, 2014, 3(3): 256-276.
- 24 叶韬, 王义兵, 刘伟, 等. 泌尿系草酸钙结石蛋白分析[J]. *江西医药*, 2018, 53(3): 205-208.
- 25 Witzmann F A, Evan A P, Coe F L, et al. Label-free proteomic methodology for the analysis of human kidney stone matrix composition[J]. *Proteome Sci*, 2016, 14: 4-4.
- 26 Ma Q, Fang L, Su R, et al. Uric acid stones, clinical manifestations and therapeutic considerations[J]. *Postgrad Med J*, 2018, 94(1114): 458-462.
- 27 Jou Y C, Fang C Y, Chen S Y, et al. Proteomic Study of Renal Uric Acid Stone[J]. *Urology*, 2012, 80(2): 260-266.
- 28 Boonla C, Tosukhowong P, Spittau B, et al. Inflammatory and fibrotic proteins proteomically identified as key protein constituents in urine and stone matrix of patients with kidney calculi[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 429: 81-89.
- 29 Shah H N, Kharodawala S, Sodha H S, et al. The management of renal matrix calculi: a single-centre experience over 5 years[J]. *BJU Int*, 2009, 103(6): 810-814.
- 30 Martelli C, Marzano V, Iavarone F, et al. Characterization of the Protein Components of Matrix Stones Sheds Light on S100-A8 and S100-A9 Relevance in the Inflammatory Pathogenesis of These Rare Renal Calculi[J]. *J Urol*, 2016, 196(3): 911-918.
- 31 Eggermann T, Venghaus A, Zerres K. Cystinuria: an inborn cause of urolithiasis[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2012, 7: 19-19.
- 32 Kovacevic L, Lu H, Goldfarb D S, et al. Urine proteomic analysis in cystinuric children with renal stones[J]. *J Pediatr Urol*, 2015, 11(4): 217. e1-e6.
- 33 Bourderioux M, Nguyen-Khoa T, Chhuon C, et al. A new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes and assessment in cystinuria patients[J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(1): 567-577.

(收稿日期: 2019-05-03)