

• 论著-临床研究 •

肾结石患者肾乳头密度和抑制钙化相关 基因表达研究^{*}

胡恒龙¹ 朱云鹏¹ 李聪¹ 崔磊¹ 卢宇超¹ 张加桥¹ 秦保龙¹ 王庆¹ 王少刚¹ 郭小林¹

[摘要] 目的:Randall 钙斑是位于肾乳头间质的异位钙化,被认为是草酸钙结石的起始病变。这些钙盐沉积可能源于异位钙化相关基因表达失调,并在宏观上导致肾乳头密度增加。本研究拟探究肾结石患者和非结石对照者肾乳头 CT 值和钙化抑制相关基因表达的差异。方法:纳入 60 例具有腹部 CT 平扫影像的肾结石患者作为结石组。选取 60 例具有腹部 CT 影像,且与结石患者年龄性别相匹配非结石患者作为对照组。每组均各纳入男 40 例,女 20 例。两组平均年龄分别为(48.67±11.14)岁和(48.40±10.73)岁。在平扫 CT 上测量其肾脏上盏、中盏和下盏肾乳头密度并比较。检索和下载 Gene Expression Omnibus 数据库 Randall 钙斑芯片 GSE73680 数据文件。分析比较 5 种钙化抑制相关基因包括基质 Gla 蛋白(MGP)、骨桥蛋白(OPN)、骨钙素(OCN)、骨保护素(OPG)和富 Gla 蛋白(GRP)在结石组和对照组患者肾乳头组织的表达情况。结果:结石组患者肾乳头密度均值显著高于对照组[(49.19±7.26) HU vs. (41.11±5.55) HU]。与对照组相比,结石组肾乳头 OPN、OPG、OCN 和 GRP 表达分别是对照组 1.93 倍、1.16 倍、1.57 倍和 2.04 倍,*P* 值分别为 0.52、0.58、0.06 和 0.08。MGP 在结石患者肾乳头表达下调 3.15 倍(*P*=0.05)。结论:结石患者肾乳头密度显著增高,抑制钙化相关基因 MGP 表达降低。

[关键词] 肾结石;Randall 钙斑;肾乳头密度;基质 Gla 蛋白;异位钙化

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2020.05.001

[中图分类号] R692.4 **[文献标志码]** A

Papillary density and expression of ectopic calcification inhibitors in renal stone formers

HU Henglong ZHU Yupeng LI Cong CUI Lei LU Yuchao ZHANG Jiaqiao
QIN Baolong WANG Qing WANG Shaogang GUO Xiaolin

(Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China)

Corresponding author: GUO Xiaolin, E-mail: guoxiaolin@tjh. tmmu. edu. cn

Abstract objective: Randall's plaque is a kind of interstitial calcification in the renal papillary and is considered as the nidus for renal stone. The ectopic calcification may result from the dysregulation of calcification inhibitors and increase the papillary density. The aim of this study is to compare the renal papillary density and expressions of calcification inhibitors between stone formers and non-stone formers. **Method:** Sixty upper urinary tract stone formers and 60 age and sex matched non-stone formers were included. Both the stone formers and non-stone formers group included 40 males and 20 females. The mean age of the two groups were (48.67±11.14) years and (48.40±10.73) years, respectively. All the included subjects had non-contrast abdominal CT images. The renal papillary density of upper calyx, middle calyx and lower calyx were measured and compared. The Gene Expression Omnibus (GEO) database was retrieved. The Randall's plaque chip (GSE73680) data file was downloaded and analyzed. The papillary expression of calcification inhibitors including Matrix Gla protein (MGP), osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN), osteoprotegerin (OPG) and Gla-rich protein (GRP) were evaluated and compared between stone and non-stone formers. **Result:** The mean renal papillary density of the stone formers was significantly higher than that of non-stone formers [(49.19±7.26) HU vs. (41.11±5.55) HU]. Compared with non-stone formers, the expression levels of OPN, OPG, OCN and GRP in stone formers increased 1.93, 1.16, 1.57 and 2.04 times, with *P* values of 0.52, 0.58, 0.06 and 0.08, respectively. And the expression of MGP in stone formers was down-regulated by 3.15 times (*P*=0.05). **Conclusion:** The papillary density was significantly increased

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(No:81570631,81800626)

¹华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科(武汉,430030)

通信作者:郭小林, E-mail: guoxiaolin@tjh. tmmu. edu. cn

and MGP expression is decreased in stone formers.

Key words nephrolithiasis; Randall's plaque; papillary density; matrix gla protein; ectopic calcification

肾结石在我国是一种常见且容易复发的疾病。流行病学调查显示,我国约 10.34% 的男性和 6.62% 的女性罹患肾结石,并且其在全球的整体发病率随着气候和饮食习惯的改变呈上升趋势^[1-2]。除了高发病率,结石的 5 年复发率最高可达 50%, 10 年复发率甚至可达 80%~90%^[3-4]。结石可导致肾积水,损伤肾功能,甚至诱发出危及生命的情况如严重的泌尿系感染和终末期肾病。随着科学技术的发展,许多微创结石诊治方法如体外冲击波碎石术、经皮肾镜取石术、输尿管镜碎石术等得到应用^[5]。但是,目前结石的具体发病机制尚未完全阐明,极大阻碍了结石的病因预防和治疗。因此,进一步研究并阐明肾结石的发病机制,对于提高结石的预防和治疗效果具有十分重要的意义。

特发性草酸钙结石是最常见的结石类型,Randall 钙斑学说是阐述草酸钙结石形成的重要理论^[6]。目前研究认为,Randall 钙斑是位于肾乳头间质的磷酸钙盐沉积,其可能起源于 Henle 祥细段小管基底膜,可通过引起周围组织细胞损伤和坏死凋亡,突破尿路上皮,与尿液直接接触,成为结石晶体的附着和生长位点^[6-7]。

鉴于作为结石起始病变的 Randall 钙斑是位于肾乳头间质的钙盐沉积,故而我们推测结石患者由于钙斑的存在而导致其肾乳头密度增高,表现为 CT 值增大。而 Randall 钙斑本质是位于肾乳头的异位钙化,其有可能是肾乳头抑制钙化相关基因表达失衡引起。本研究拟对比中国结石患者和非结石对照者肾乳头密度,并基于基因芯片探究结石患者肾乳头抑制钙化相关基因的表达情况,从宏观和微观方面探究 Randall 钙斑与结石的相关性。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

纳入 60 例具有腹部 CT 平扫影像的肾结石患者作为结石组。选取 60 例具有腹部 CT 影像,且与结石患者年龄性别相匹配的非结石患者作为对照组。两组患者各有男 40 例,女 20 例,年龄分别为 (48.67 ± 11.14) 岁和 (48.40 ± 10.73) 岁,两组在年龄和性别方面比较差异无统计学意义。排除标准:未成年人;肾脏输尿管解剖异常;阴性结石;终末期肾病;明确的系统性代谢性疾病引起钙磷代谢异常者,如甲状旁腺机能亢进;不具备研究所要求的腹部 CT 平扫影像。

1.2 影像要求和测量方法

所有入组的腹部 CT 平扫图片需要满足图层

扫描厚度 ≤ 0.5 cm,所测量肾脏无中重度积水。如果仅有一侧结石,则选择结石侧肾脏;如两侧均有结石,则选择无积水侧肾脏;如两侧均有结石且均无积水,则选择左侧肾脏。无结石组如非孤立肾患者,则一律选择左侧肾脏。将目的影像图片放大 4 倍,在肾上组、中组、下组肾乳头各选一形态学特征最明显的肾乳头,同时避开结石、积水和囊肿等部位,如 CT 有三维重建冠状面重建图像或者该患者具有同期进行的增强扫描图片,可辅助定位肾乳头。采用 CT 图片阅读器所提供的工具,画一个约 0.1 cm^2 的椭圆形感兴趣区,其显示的 CT 值即为该肾乳头的密度值,上中下组 3 个肾乳头密度值均值即该肾脏的肾乳头密度值^[8-9]。

1.3 分析方法

检索 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),找到 Randall 钙斑芯片 GSE73680。下载数据库的数据文件 GSE73680_Normalized_signals.txt.gz。登陆在线分析 GEO 数据库数据的工具系统 GEO2R, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>),输入“GSE73680”,打开目的芯片数据。按照 GSE73680 的样本描述,将样本分为对照组和结石组。其中对照组样本共计 6 例:GSM1900673、GSM1900674、GSM1900684、GSM1900685、GSM1900702 和 GSM1900732。结石组样本有 26 例:GSM1900677、GSM1900678、GSM1900679、GSM1900680、GSM1900682、GSM1900683、GSM1900686、GSM1900687、GSM1900688、GSM1900689、GSM1900690、GSM1900691、GSM1900692、GSM1900693、GSM1900694、GSM1900695、GSM1900696、GSM1900697、GSM1900700、GSM1900701、GSM1900707、GSM1900708、GSM1900716、GSM1900717、GSM1900722 和 GSM1900723。将目前研究较多,且已有多方研究证实与抑制异位钙化相关的 5 个蛋白即基质 Gla 蛋白(matrix gla protein, MGP),骨桥蛋白(osteopontin, OPN),骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和富 Gla 蛋白(gla-rich protein, GRP)作为本研究的目的蛋白。在芯片数据中检索上述 5 个目的蛋白的基因,计算结石组和对照组上述蛋白基因表达的几何均数、表达差异倍数和 P 值。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对于两组之间连续变量的均数比较,如方差齐性,则采用两独立样本 t 检验;方差不相等,则采用校正 t 检验或非参数检验。本

研究均采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

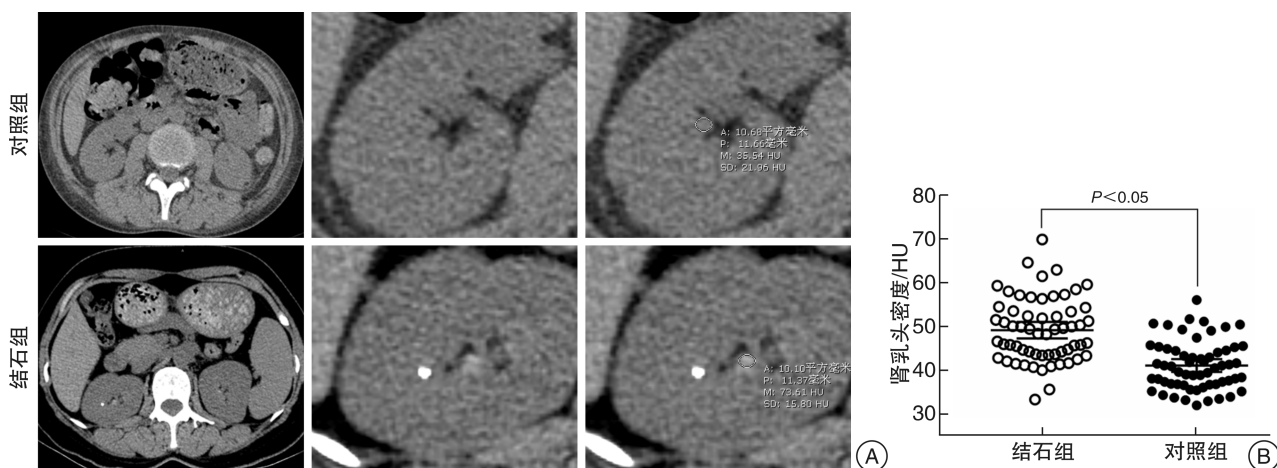
2.1 结石组和对照组患者肾乳头密度差异比较

结石组患者肾乳头密度均值显著高于对照组 $[(49.19 \pm 7.26) \text{ HU vs. } (41.11 \pm 5.55) \text{ HU}, P < 0.05]$ 。见图 1。

2.2 结石患者肾乳头与抑制异位钙化相关基因的表达分析

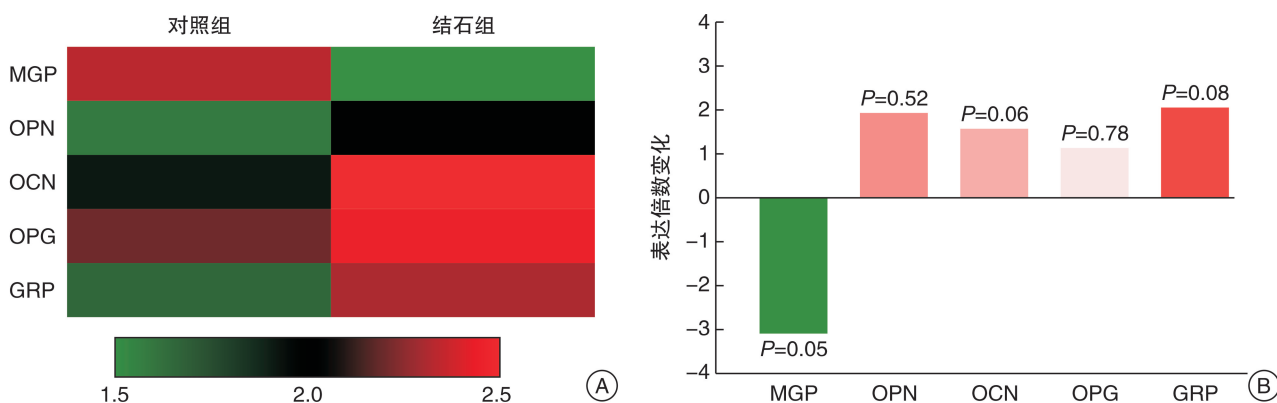
GEO 数据库 GSE73680 芯片有 26 例草酸钙

结石患者和 6 例非结石患者肾乳头基因芯片数据。靶向分析目前与抑制异位钙化相关的 5 个主要基因即 MGP、OPN、OCN、OPG 和 GRP 在两组患者肾乳头的表达情况。与对照组相比,结石组患者肾乳头 OPN 和 OPG 表达分别是对照组的 1.93 倍和 1.16 倍,但差异无统计学意义 ($P = 0.52$ 和 $P = 0.58$);OCN 和 GRP 表达分别是对照组 1.57 倍和 2.04 倍, ($P = 0.06$ 和 $P = 0.08$)。MGP 在结石组患者肾乳头表达下调 3.15 倍 ($P = 0.05$)。见图 2。



A:对照组和结石组患者肾乳头 CT 影像及各组密度值代表性影像图片,其中左列为整体观,中列为细节观,右列展示了肾乳头测量区域及其密度值;B:结石组患者肾乳头密度显著高于对照组。

图 1 结石组和对照组患者肾乳头 CT 密度比较



A:5 种抑制钙化基因 MGP、OPN、OCN、OPG 和 GRP 在结石组和对照组患者肾乳头组织的表达情况;B:相较于对照组,5 种抑制钙化基因 MGP、OPN、OCN、OPG 和 GRP 在结石组患者肾乳头表达变化倍数。

图 2 结石组和对照组患者肾乳头组织芯片数据分析

3 讨论

通过对结石组和对照组患者肾乳头密度的观察,我们基于中国人群样本证实了结石患者肾乳头密度显著高于与其年龄、性别相匹配的对照组。这些结果与国外的相关研究一致^[8-9]。其原因可能是结石患者存在钙斑即间质钙化,导致肾乳头密度增

高,CT 值衰减增加,表现为 CT 值的增大。这些结果间接证明肾乳头钙化与结石密切相关,进一步夯实了 Randall 钙斑理论基础。此外,目前研究表明多饮水可以降低结石复发风险,这也体现在患者保持长期每日饮水 2 L 以上后,肾乳头密度降低^[10]。由此可见,基于非增强 CT 的肾乳头密度值将来是

有可能用来评估和监测罹患肾草酸钙结石的风险。

由于肾乳头 Randall 钙斑其本质是位于肾乳头间质的异位钙化,故而我们推测其产生可能与肾乳头抑制钙化相关基因表达异常相关。MGP 是一种细胞外基质蛋白。MGP 高表达于骨骼、肾脏等组织,具有强大的抑制组织钙化的功能,目前被认为是抑制异位钙化的核心分子^[11]。OPN 是一种非胶原性骨基质糖蛋白,广泛的分布于多种组织和细胞,其可与钙离子结合,抑制晶体形成和沉积,并且已有研究证实 OPN 与结石密切相关,敲除 OPN 后,肾脏易于形成间质钙化^[12-13]。OCN 也是一种含有 Gla 基团的蛋白,参与抑制骨矿质沉积和钙稳态调节^[14]。OPG 是一种细胞因子受体,属于肿瘤坏死因子受体超家族成员,与血管钙化密切相关^[15]。与 MGP 和 OCN 类似,GRP 富含 Gla 基团,因 Gla 基团可以与钙离子结合从而抑制钙化,故而推测其在多种钙化中发挥了重要作用。通过分析上述 5 种蛋白基因在结石组和对照患者肾乳头组织表达差异,发现 MGP 表达下调,其余 4 种基因表达上调,且 MGP 倍数变化最大,*P* 值最小,故 MGP 可能是与肾乳头 Randall 钙斑产生相关的重要分子,在结石的发生发展中发挥了重要作用。我们课题组目前进行的研究也逐步证实了这一点^[16]。

目前认为 MGP 抑制异位钙化的机制主要是包括 2 个方面:①MGP 分子中 Gla 基团可以直接与钙离子结合,阻止钙离子与酸根结合,从而阻止了晶体的形成和沉积;②异位钙化被认为与成骨过程类似,细胞介导的生物矿化在其中起着不可或缺的作用,而 MGP 可调控与成骨矿化最为密切的通路之一是骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) 通路。MGP 可能通过直接与 BMP2 结合,下调 BMP2 通路活性,进而抑制软组织的矿化成骨过程,发挥抑制异位钙化的功能^[16-18]。

综上所述,基于结石患者和非结石患者 CT 影像结果和肾乳头芯片数据,我们在中国人群中探究了 Randall 钙斑与肾结石相关性,同时发掘出与钙斑形成密切相关的异位钙化抑制因子 MGP。本研究存在一些不足:首先,样本量较小,选择性偏倚难以避免,因而还需其他课题组的研究进行进一步验证;其次,基于基因芯片的研究无法进行蛋白水平的验证研究,这也是我们后续的研究方向之一。

[参考文献]

- 1 Wang W, Fan J, Huang G, et al. Prevalence of Kidney Stones in Mainland China: A Systematic Review[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41630–41630.
- 2 Sorokin I, Mamoulakis C, Miyazawa K, et al. Epidemiology of Stone Disease across the World[J]. *World J Urol*, 2017, 35(9): 1301–1320.
- 3 Skolarikos A, Straub M, Knoll T, et al. Metabolic Evalua-

- tion and Recurrence Prevention for Urinary Stone Patients: Eau Guidelines[J]. *Eur Urol*, 2015, 67(4): 750–763.
- 4 D'Costa MR, Haley WE, Mara KC, et al. Symptomatic and Radiographic Manifestations of Kidney Stone Recurrence and Their Prediction by Risk Factors: A Prospective Cohort Study[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(7): 1251–1260.
- 5 Rodgers A, Trinchieri A, Ather MH, et al. Vision for the future on urolithiasis: research, management, education and training—some personal views[J]. *Urolithiasis*, 2019, 47(5): 401–413.
- 6 Coe FL, Worcester EM, Evan AP. Idiopathic Hypercalciuria and Formation of Calcium Renal Stones[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(9): 519–533.
- 7 Pearle MS, Antonelli JA, Lotan Y. Urinary Lithiasis: Etiology, Epidemiology, and Pathogenesis [M]//Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW, et al. *Campbell-Walsh Urology*, 11th ed. Philadelphia: Elsevier, 2016: 1170–1199.
- 8 Shavit L, Girfoglio D, Kirkham A, et al. Increased renal papillary density in kidney stone formers detectable by CT scan is a potential marker of stone risk, but is unrelated to underlying hypercalciuria [J]. *Urolithiasis*, 2016, 44(5): 471–475.
- 9 Ciudin A, Galvez MPL, Izquierdo RS, et al. Validation of Randall's Plaque Theory Using Unenhanced Abdominal Computed Tomography[J]. *Urology*, 2013, 81(2): 246–249.
- 10 Ferraro PM, Vittori M, Macis G, et al. Changes in Renal Papillary Density after Hydration Therapy in Calcium Stone Formers[J]. *BMC Urol*, 2018, 18(1): 101.
- 11 Schurgers LJ, Uitto J, Reutelingsperger CP. Vitamin K-Dependent Carboxylation of Matrix Gla-Protein: A Crucial Switch to Control Ectopic Mineralization [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(4): 217–226.
- 12 Caballero D, Li Y, Ponsetto J, et al. Impaired Urinary Osteopontin Excretion in Npt2a-/- Mice[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 312(1): F77–F83.
- 13 Icer MA, Gezmen-Karadag M. The Multiple Functions and Mechanisms of Osteopontin [J]. *Clin Biochem*, 2018, 59: 17–24.
- 14 Moser SC, van der Eerden BCJ. Osteocalcin—a Versatile Bone-Derived Hormone [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 794.
- 15 Rochette L, Meloux A, Rigal E, et al. The Role of Osteoprotegerin in Vascular Calcification and Bone Metabolism: The Basis for Developing New Therapeutics[J]. *Calcif Tissue Int*, 2019, 105(3): 239–251.
- 16 Wang Q, Hu H, Dirie NI, et al. High Concentration of Calcium Promotes Mineralization in Nr4-52e Cells Via Inhibiting the Expression of Matrix Gla Protein[J]. *Urology*, 2018, 119: 161 e161–161 e167.

- Prostatic Obstruction: An Update[J]. *Eur Urol*, 2015, 67(6):1066—1096.
- 5 Elzayat E, Habib E, Elhilali M. Holmium laser enucleation of the prostate (HoLEP): a size independent new gold standard[J]. *Urology*, 2005, 66(3):20—20.
- 6 Kampantais S, Dimopoulos P, Tasleem A, et al. Assessing the Learning Curve of Holmium Laser Enucleation of Prostate (HoLEP). A Systematic Review[J]. *Urology*, 2018, 120:9—22.
- 7 Kim KH, Kim KT, Oh JK, et al. Enucleated Weight/Enucleation Time, Is It Appropriate for Estimating Enucleation Skills for Holmium Laser Enucleation of the Prostate? A Consideration of Energy Consumption[J]. *World J Mens Health*, 2018, 36(1):79—86.
- 8 Jeong CW, Oh JK, Cho MC, et al. Enucleation ratio efficacy might be a better predictor to assess learning curve of holmium laser enucleation of the prostate[J]. *Int Braz J Urol*, 2012, 38(3):362—372.
- 9 Baron M, Nouhaud FX, Delcourt C, et al. Apprentissage de l'HoLEP: vers une formation standardisée et une stratégie d'équipe[J]. *Progrès En Urologie*, 2015, 25(13):779—779.
- 10 Kuntz RM. Laser treatment of benign prostatic hyperplasia[J]. *World J Urol*, 2007, 25(3):241—247.
- 11 Elmansy HM, Kotb A, Elhilali MM. Is there a way to predict stress urinary incontinence after holmium laser enucleation of the prostate? [J]. *J Urol*, 2011, 186(5):1977—1981.
- 12 施安, 孙杰, 童臻, 等. 经尿道前列腺钬激光剜除术后压力性尿失禁危险因素分析[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2018, 33(4):269—272.
- 13 Shigemura K, Yamamichi F, Kitagawa K, et al. Does surgeon experience affect operative time, adverse events and continence outcomes in holmium laser enucleation of the prostate? A review of more than 1,000 cases[J]. *J Urol*, 2017, 198(3):663—670.
- 14 Elmansy HM, Kotb A, Elhilali MM. Is There a Way to Predict Stress Urinary Incontinence After Holmium Laser Enucleation of the Prostate? [J]. *J Urol*, 2011, 186(5):1977—1981.
- 15 Endo F, Shiga Y, Minagawa S, et al. Anteroposterior dissection HoLEP: a modification to prevent transient stress urinary incontinence[J]. *Urology*, 2010, 76(6):1451—1455.
- (收稿日期:2019-06-25)

(上接第338页)

- 17 Khan A, Wang W, Khan SR. Calcium Oxalate Nephrolithiasis and Expression of Matrix Gla Protein in the Kidneys[J]. *World J Urol*, 2014, 32(1):123—130.
- 18 Jia Z, Wang S, Tang J, et al. Does Crystal Deposition in Genetic Hypercalciuric Rat Kidney Tissue Share Similarities with Bone Formation? [J]. *Urology*, 2014, 83(2):509.
- (收稿日期:2019-10-16)