

AGXT2 基因多态性与草酸钙肾结石复发的相关性分析

陆鹏¹ 周德琪¹

[摘要] 目的:分析丙氨酸乙醛酸转氨酶 2(AGXT2)基因多态性与草酸钙肾结石复发的相关性。方法:选择 2017 年 1 月~2019 年 12 月本院随访的草酸钙肾结石复发患者 136 例为研究对象(复发组),另匹配同期初发草酸钙肾结石患者 140 例为对照(初发组)。提取血液基因组 DNA,采用 DNA PCR 测序技术检测 AGXT2 基因 rs37369 位点基因多态性,采用 Logistic 回归分析 AGXT2 rs37369 位点多态性与草酸钙肾结石患者复发的关系。结果:复发组与初发组草酸钙肾结石患者性别、年龄、BMI、高血压、糖尿病比例、AG 基因型频率比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。与初发组比较,复发组血清 SCr、BUN 水平、AGXT2 基因 rs37369 位点 A 等位基因、AA 基因型频率增加($P<0.05$),GFR、AGXT2 基因 rs37369 位点 G 等位基因、GG 基因型频率显著降低($P<0.05$)。与携带 GG 基因型患者比较,携带 AA 基因型患者 SCr、BUN 水平显著升高($P<0.05$),GFR 显著降低($P<0.05$)。Logistic 回归分析结果显示,携带 AA 基因型是草酸钙肾结石复发的独立危险因素($P<0.05$)。结论:AGXT2 基因 rs37369 位点多态性可能与草酸钙肾结石复发有一定相关性,携带 AA 基因型是其独立危险因素。

[关键词] 草酸钙肾结石;复发;丙氨酸乙醛酸转氨酶 2 基因;基因多态性

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2020.12.005

[中图分类号] R692.4 **[文献标志码]** A

Correlation between AGXT2 gene polymorphism and recurrence of calcium oxalate nephrolithiasis

LU Peng ZHOU Deqi

(Department of Urology, Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu, 214000, China)

Corresponding author: ZHOU Deqi, E-mail: zdqwx555@sina.com

Abstract Objective: To analyze the correlation between the polymorphism of alanine glyoxylate transaminase 2 (AGXT2) gene and the recurrence of calcium oxalate nephrolithiasis. **Method:** From January 2017 to December 2019, 136 patients with recurrence of calcium oxalate nephrolithiasis followed up in our hospital were selected as the study objects (recurrence group), while 140 patients with primary calcium oxalate nephrolithiasis in the same period were matched as the control (primary group). The genomic DNA of blood was extracted, the rs37369 polymorphism of AGXT2 gene was detected by DNA PCR sequencing technology, and the relationship between AGXT2 rs37369 polymorphism and recurrence of calcium oxalate nephrolithiasis was analyzed by Logistic regression. **Result:** There was no significant difference in sex, age, BMI, hypertension, diabetes ratio or AG genotype frequency between recurrence group and primary group ($P>0.05$). Compared with the primary group, the level of serum SCr, BUN, the frequencies of A allele and AA genotype at rs37369 of AGXT2 gene in the recurrence group increased ($P<0.05$), but the GFR, the frequencies of G allele and GG genotype at rs37369 of AGXT2 gene significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the patients with GG genotype, the levels of SCr and BUN in patients with AA genotype were significantly higher ($P<0.05$), but GFR was significantly lower ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that AA genotype was an independent risk factor for the recurrence of calcium oxalate nephrolithiasis ($P<0.05$). **Conclusion:** The rs37369 polymorphism of AGXT2 gene may be related to the recurrence of calcium oxalate nephrolithiasis, and AA genotype is an independent risk factor.

Key words calcium oxalate nephrolithiasis; recurrence; alanine glyoxylate transaminase 2 gene; gene polymorphism

泌尿系统结石是泌尿外科的主要病种之一,其中草酸钙肾结石较为常见,约占 70%~84%,随着

近来科技发展,肾结石的诊断及治疗手段有很大提高,但肾结石的高复发率仍是目前医学界的难题^[1-2]。肾结石发生原因及具体机制尚不清楚,研究报道,可能与生活习惯、遗传因素、地域环境等密切相关。近来有研究报道,肾结石的多发及复发与

¹南京医科大学附属无锡人民医院泌尿外科(江苏无锡, 214000)

通信作者:周德琪, E-mail: zdqwx555@sina.com

多种基因多态性有关^[3-4],丙氨酸乙醛酸转氨酶(alanine-glyoxylate aminotransferase,AGXT)是一种依赖磷酸吡哆醛的氨基转移酶,存在 AGXT1 和 AGXT2 两种亚型,其中 AGXT2 主要表达于肾脏,是心血管系统及泌尿系统中重要氨基转移酶,研究报道,AGXT2 基因在 ADMA 代谢中起重要作用,rs37369 位点基因多态性与冠心病、心肌梗死、肾结石术后肾组织损伤肾等多种肾疾病有关^[5-9],但 AGXT2 基因多态性是否可能与肾结石复发有关尚鲜有研究。因此本研究拟探究 AGXT2 rs37369 位点基因多态性与草酸钙肾结石复发的关系,以期从基因遗传性角度揭示草酸钙肾结石复发机制,为临床治疗及研究提供一定参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2017 年 1 月~2019 年 12 月本院随访的草酸钙肾结石复发患者 136 例为研究对象(复发组),其中男 89 例,女 47 例,年龄 20~58 岁,平均(41.94±9.65)岁,平均 BMI 为(24.29±2.58)kg/m²。另匹配同期初发草酸钙肾结石患者 140 例为对照(初发组),其中男 81 例,女 59 例,年龄 20~57 岁,平均(40.17±9.92)岁,平均 BMI 为(23.82±2.37)kg/m²。纳入标准:①均经腹部 CT 确诊为肾结石者,并进行结石成分分析;②年龄≥18 岁;③初发组为随访 3 年内无肾结石发病史、且单发肾结石者;④复发组为结石完全清除后随访 3 年内再复发者;⑤临床资料完整者,且无亲缘关系。排除标准:①其他成分结石类型者;②合并肾组织异常或输尿管梗阻者;③合并恶性肿瘤或感染性疾病者;④有结石家族史者;⑤合并慢性肾病者。收集所有受试者临床资料,所有样品采集及资料调查均取得患者及其家属知情同意并签字确认。本研究经过本院道德伦理委员会批准通过,符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》。

1.2 方法

1.2.1 临床资料 收集通过病历及调查问卷方式收集所有受试者临床资料,主要包括年龄、性别、BMI、高血压、糖尿病、血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)水平。并基于 SCr 水平采用肾脏病饮食改良简化公式估算肾小球滤过率(GFR), $GFR[mL/(min \cdot 1.73m^2)] = 186 \times (SCr/88.41) - 1.154 \times \text{年龄} - 0.203 \times (0.742 \text{ 女性})^{[10]}$ 。

1.2.2 标本 采集患者入院后当前晚上 10:00 前禁食禁水,采集次日清晨(6:00~8:00)血液标本,一部分于 30 min 内送去实验室离心并收集上清液,另一部分血以全血形式保存,均置于-80℃冰箱保存待检。

1.2.3 基因组 DNA 提取及测序 采用全基因组

DNA 提取试剂盒提取所有受试者血液 DNA,置于-20℃冰箱保存备用。PCR 扩增 AGXT2 rs37369 位点片段,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。上游引物序列(5'→3'):TAGGGACGCTC-CCCTAGAAT,下游引物序列(5'→3'):TCTA-AGCCCAAACCTTCCTCCT。采用 25 μL 反应体系:10×PCR Buffer 5.0 μL,上下游引物(10 mol/L)各 1 μL,dNTP 4.0 μL,DNA(10 mol/L)10 μL,Taq DNA 聚合酶 0.25 μL,ddH₂O 3.75 μL。反应条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,61℃退火 1 min,72℃延伸 30 s,35 个循环;72℃终延伸 10 min。PCR 产物置于 4℃保存,并用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。采用 DNA 纯化回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司)纯化回收后送上海生工生物工程股份有限公司进行测序,Chroms 1.62 软件读取测序峰图,采用 DNAMAN 软件进行序列比对分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学处理。计数资料以例(%)表示,采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据比较采用 *t* 检验,多组数据比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。Logistic 回归分析 AGXT2 rs37369 位点多态性与草酸钙肾结石患者复发的关系。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复发组与初发组草酸钙肾结石患者临床资料比较

结石成分分析结果显示,草酸钙肾结石呈不规则棘突状,以一水草酸钙和二水草酸钙形式存在,约占结石所有成分的 83.26%。复发组与初发组草酸钙肾结石患者性别、年龄、BMI、高血压病、糖尿病比例比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与初发组比较,复发组血清 SCr、BUN 水平增加,GFR 降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 复发组与初发组草酸钙肾结石患者 AGXT2 rs37369 位点等位基因频率、基因型分布

复发组与初发组草酸钙肾结石患者 AGXT2 rs37369 位点存在 G、A 两种等位基因,GG、GA、AA 3 种基因型,且各基因型分布符合哈代-温伯格(Hardy-Weinberg)平衡定律($\chi^2 = 4.617, P = 0.100$),具有群体代表性。与初发组比较,复发组 rs37369 位点 G 等位基因、GG 基因型频率显著降低($P < 0.05$),A 等位基因、AA 基因型频率显著升高($P < 0.05$),复发组与初发组 rs37369 位点 GA 基因型频率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.3 复发组 AGXT2 rs37369 位点多态性与 SCr、BUN 水平、GFR 的关系

与携带 GG 基因型患者比较,携带 AA 基因型

患者 SCr、BUN 水平显著升高($P<0.05$),GFR 显著降低($P<0.05$),见表 3。

表 1 复发组与初发组草酸钙肾结石患者临床资料比较

$\bar{x} \pm s$

组别	例数	男/女	年龄/岁	BMI/kg·m ⁻²	高血压/例(%)
初发组	140	81/59	40.17±9.92	23.82±2.37	22(16.92)
复发组	136	89/47	41.94±9.65	24.29±2.58	26(19.12)
t/χ^2	—	1.677	1.502	1.577	0.216
P	—	0.195	0.134	0.116	0.642
组别	例数	糖尿病/例(%)	SCr /(mmol·L ⁻¹)	BUN /(mmol·L ⁻¹)	GFR/ (mL·min ⁻¹ ·1.73 m ⁻²)
初发组	140	14(10.00)	84.52±13.69	4.14±0.83	35.48±4.06
复发组	136	18(13.24)	115.31±21.46	5.36±1.02	18.37±2.94
t/χ^2	—	0.704	14.252	10.913	40.002
P	—	0.401	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 AGXT2 rs37369 位点等位基因频率、基因型分布

例(%)

组别	例数	rs37369 位点				
		A	G	GG	GA	AA
初发组	140	90(32.14)	190(67.86)	46(32.86)	68(48.57)	26(18.57)
复发组	136	113(41.54)	159(58.46)	61(44.85)	66(48.53)	9(6.62)
χ^2	—	5.245		4.182	0.000	8.902
P	—	0.022		0.041	0.994	0.003

表 3 复发组 AGXT2 rs37369 位点多态性与 SCr、BUN 水平、GFR 的关系

$\bar{x} \pm s$

rs37369 多态性	例数	SCr/(mmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	GFR/(mL·min ⁻¹ ·1.73m ⁻²)
GG	61	115.71±9.23	5.84±0.61	19.15±2.03
GA	66	118.08±8.57	6.02±0.59	18.62±2.05
AA	9	123.47±9.62 ¹⁾	6.37±0.65 ¹⁾	17.39±2.01 ¹⁾
F	—	3.356	3.616	3.300
P	—	0.038	0.030	0.040

与 GG 基因型比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

2.4 Logistic 回归分析 AGXT2 rs37369 位点多态性与草酸钙肾结石复发的关系

单因素分析结果显示,AGXT2 rs37369 位点多态性是影响草酸钙肾结石复发的危险因素($P<$

0.05),见表 4。Logistic 多因素回归分析结果发现,携带 AA 基因型是草酸钙肾结石复发的独立危险因素($P<0.05$)。见表 5。

表 4 Logistic 单因素回归分析影响草酸钙肾结石复发的危险因素

自变量	β	χ^2/wald	SE	OR	95%CI	P
性别	0.296	0.674	0.361	1.345	0.663~2.729	0.412
年龄	0.372	0.991	0.374	1.451	0.697~3.020	0.320
BMI	0.261	1.966	0.186	1.298	0.901~1.869	0.161
高血压病	0.305	2.476	0.194	1.357	0.928~1.985	0.116
糖尿病	0.393	2.456	0.251	1.482	0.906~2.424	0.117
AGXT2 rs37369	1.307	8.704	0.443	3.695	1.551~8.804	0.003

表 5 Logistic 回归分析影响草酸钙肾结石复发的危险因素

rs37369	β	$\chi^2/wald$	SE	OR	95% CI	P
GG	—	—	—	1.000	—	—
GA	0.521	0.296	0.307	1.684	0.943~3.008	0.078
AA	1.148	10.052	0.362	3.151	1.550~6.406	0.002

3 讨论

检测结石成分是明确其理化性质的重要方法,草酸钙是肾结石中的主要成分,约占结石成分 80%~84%,其形态与所含结晶水数量有关①水草酸钙呈颗粒状,切面色泽均匀,②水草酸钙呈放射状或棱角状,本研究结果显示草酸钙结石约占结石成分 83.26%,多数草酸钙肾结石患者未发现并发其他系统疾病,亦称为特发性草酸钙肾结石。虽然近来微创冲击波碎石及内窥镜技术使广大患者受益,但肾结石复发率仍居高不下,且初发性肾结石患者呈上升趋势,严重影响患者身心健康及生活质量,因此阐明其形成机制对疾病预防及降低复发率至关重要^[11-12]。目前,肾结石的遗传性因素已得到广大学者认可,多种基因突变均与草酸钙肾结石发生、复发等有关。Mittra 等^[13]研究发现,降钙素受体(CALCR)基因 rs1801197 位点与印度西孟加拉邦人群肾结石易感性密切相关。AGXT2 是一种与心血管系统及泌尿系统密切相关的氨基酸转移酶,在内源性活性物质非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)和 β -氨基异丁酸(β -aminoisobutyric acid, BIBA)等代谢作用中发挥重要作用,而 ADMA、BIBA 与进行性慢性肾脏疾病发生发展密切相关^[14]。Hu 等^[15]研究报道,AGXT2 rs37369 多态性与慢性心力衰竭患者肾功能有关。Jens 等^[16]研究报道,AGXT2 可作为慢性肾脏疾病临床状态和预后的评估指标。随着肾结石发生发展,可对肾脏造成直接损伤,而肾上皮细胞损伤又可促进结石的形成,影响肾功能^[17-18]。因此本研究提出假说,AGXT2 基因 rs37369 多态性可能与肾结石复发、肾损伤有关,但目前关于 AGXT2 rs37369 多态性与肾结石复发的相关性尚鲜有研究。为了验证本研究假说,进行样本 DNA 测序,结果发现,与初发组比较,复发组 rs37369 位点 G 等位基因、GG 基因型频率显著降低, A 等位基因、AA 基因型频率显著升高,提示 AGXT2 基因 rs37369 位点多态性可能与草酸钙肾结石复发有关。

SCr、BUN 可反映肾脏功能及肾小球滤过率水平,本研究发现,与初发组比较,复发组草酸钙肾结石患者血清 SCr、BUN 水平增加, GFR 降低;与携带 GG 基因型患者比较,携带 AA 基因型患者 SCr、BUN 水平显著升高, GFR 显著升高,提示草

酸钙肾结石复发患者肾功能损伤可能更加严重,且 AGXT2 基因 rs37369 位点多态性可能与草酸钙肾结石复发患者肾功能下降有关。因此本研究进一步采用 Logistic 回归分析 AGXT2 基因 rs37369 位点多态性与草酸钙肾结石复发的关系,结果发现,携带 AA 基因型是草酸钙肾结石复发的独立危险因素,提示 AGXT2 rs37369 位点基因多态性可能对草酸钙肾结石复发有一定预测价值。

综上所述,AGXT2 基因 rs37369 位点多态性与草酸钙肾结石复发有一定相关性,携带 AA 基因型是其独立危险因素。但由于本研究样本量少,选择范围小及存在种族差别,可能结果存在局限性,且前期筛选基因较少,有待进一步加大样本量、扩大选择范围、加大随访及尽心多基因研究。

[参考文献]

- Movahhedian N, Haghnegahdar A, Owji F. How the prevalence of pulp stone in a population predicts the risk for kidney stone[J]. Iran Endod J, 2018, 13(2):246—250.
- Tasian GE, Kabarriti AE, Kalmus A, et al. Kidney stone recurrence among children and adolescents[J]. J Urol, 2017, 197(1):246—252.
- 李守国, 李九智, 王晨宇, 等. 维吾尔族人群 TRPV5 基因多态性与肾结石数量及复发的关系[J]. 山东医药, 2016, 56(30):60—61.
- Nissinen MJ, Pitkanen N, Simonen P, et al. Genetic polymorphism of sterol transporters in children with future gallstones[J]. Dig Liver Dis, 2018, 50(9):954—960.
- 呼晓雷, 周继朋, 陈小平. AGXT2 与 ADMA 代谢及心脑血管疾病的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(5):601—605.
- Seppala I, Kleber M E, Bevan S, et al. Associations of functional alanine-glyoxylate aminotransferase 2 gene variants with atrial fibrillation and ischemic stroke[J]. Sci Rep, 2016, 6(1):1—10.
- Hu XL, Li MP, Song PY, et al. AGXT2: An unnegligible aminotransferase in cardiovascular and urinary systems[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 113(1):33—38.
- Gao Y, Lee C, Song J, et al. Digenic mutations on SCAP and AGXT2 predispose to premature myocardial infarction[J]. Oncotarget, 2017, 8(59):100141—100149.
- 相聪坤. 八正散加味结合甲磺酸左氧氟沙星对肾结石体外冲击波碎石术后肾组织损伤的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2016, 38(3):216—219.

- 10 王琦,刘敏,彭泳涵,等. 丛生蛋白与草酸钙肾结石复发的相关性[J]. 第二军医大学学报,2018,39(3):319—323.
- 11 木拉提·马合木提,杜恒,迪力亚尔·吐尔洪,等. Klotho 蛋白对草酸钙肾结石大鼠肾脏氧化应激的影响[J]. 中华泌尿外科杂志,2017,38(12):941—945.
- 12 甘琼枝,孙新园,姚秀琼,等. 肾上皮细胞损伤使草酸钙晶体黏附增强的分子机制[J]. 高等学校化学学报,2016,37(6):1050—1058.
- 13 Mitra P,Guha M,Ghosh S,et al. Association of calcitonin receptor gene(CALCR)polymorphism with kidney stone disease in the population of West Bengal, India [J]. Gene,2017,622(1):23—28.
- 14 Marcin K,Katarzyna K,Mariusz G,et al. Asymmetric dimethylarginine as a useful risk marker of radial artery calcification in patients with advanced kidney disease [J]. Pol Arch Intern Med,2018,128(3):157—165.
- 15 Hu XL,Zeng WJ,Li MP,et al. AGXT2 rs37369 polymorphism predicts the renal function in patients with chronic heart failure[J]. Gene,2017,637(1):145—151.
- 16 Jens M L,Insa E E,Adam M Z,et al. L-Homoarginine and its AGXT2-metabolite GOCA in chronic kidney disease as markers for clinical status and prognosis[J]. Amino Acids,2018,50(10):1347—1356.
- 17 蔡蕾,许海波,颜毅,等. 灯盏花素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[J]. 国际泌尿系统杂志,2018,38(4):578—581.
- 18 金蓓玲,蒋一鸣. 肾结石患者体外冲击波碎石治疗与高血浆同型半胱氨酸水平的相关性研究[J]. 实用临床医药杂志,2018,22(21):55—57.
- (收稿日期:2020-04-24)

(上接第 957 页)

- 10 陈宇珂,虞巍,杨洋,等. 经阴道修补不同位置膀胱阴道瘘的疗效观察[J]. 中华泌尿外科杂志,2016,37(12):892—895.
- 11 Angioli R,Penalver M,Muzii L,et al. Guidelines of how to manage vesicovaginal fistula[J]. Crit Rev Oncol Hematol,2003,48(3):295—304.
- 12 Kieserman-Shmokler C,Sammarco AG,English EM,et al. The Latzko:A high-value,versatile vesicovaginal fistula repair[J]. Am J Obstet Gynecol,2019,221(2):160, e1—160, e4.
- 13 Sims JM. On the treatment of vesico-vaginal fistula. 1852[J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct,1998,9(4):236—248.
- 14 Luo DY,Shen H. Transvaginal Repair of Apical Vesico-vaginal Fistula: A Modified Latzko Technique-Outcomes at a High-volume Referral Center[J]. Eur Urol,2019,76(1):84—88.
- (收稿日期:2020-04-06)