

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00019

## 草酸钙肾结石患者肾乳头钙盐沉积特点及其形成机制

陈书尚<sup>1</sup>, 高小峰<sup>1</sup>, 丁德英<sup>2</sup>, 周 铁<sup>1</sup>, 王林辉<sup>1</sup>, 许传亮<sup>1</sup>, 孙颖浩<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

2. 第二军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433

**[摘要]** **目的:**分析草酸钙肾结石患者肾乳头钙盐沉积特点及其在肾结石形成中的作用,并探讨肾钙盐沉积的机制。**方法:**选择21例行经皮肾取石术(PCNL)的草酸钙肾结石(采用傅立叶转换红外光谱法检测结石成分)患者,术中观察肾乳头钙斑情况;获取肾组织标本,行茜素红染色,显微镜下观察钙盐沉积特点;免疫组化检测骨桥蛋白、骨形成蛋白-2(BMP-2)和Ⅱ型胶原在肾结石患者肾组织的表达情况。另选7例非结石肾切除标本作为正常对照。**结果:**21例草酸钙肾结石患者均可见肾乳头钙斑;活检标本可见钙盐沉积于肾小管基底膜附近肾间质,并可向肾乳头黏膜延伸;当钙盐突破尿路上皮进入集合系统后,其上可见小结石生长。肾结石患者肾组织和正常肾组织均可见骨桥蛋白表达,未见BMP-2和Ⅱ型胶原明显表达。**结论:**肾乳头钙盐沉积是草酸钙肾结石形成的起始病灶之一;钙盐的形成可能并不是一种类似于动脉钙化的成骨性反应。

**[关键词]** 肾结石;钙盐沉积;草酸钙;成骨性反应;骨桥蛋白

**[中图分类号]** R 692.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)01-0019-05

### Renal papillary calcareous deposits in patients with calcium oxalate kidney stones: characteristics and formation mechanism

CHEN Shu-shang<sup>1</sup>, GAO Xiao-feng<sup>1</sup>, DING De-ying<sup>2</sup>, ZHOU Tie<sup>1</sup>, WANG Lin-hui<sup>1</sup>, XU Chuan-liang<sup>1</sup>, SUN Ying-hao<sup>1\*</sup>

1. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Center of Drug Analysis and Testing, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the characteristics of renal papillary calcareous deposits and their role in the formation of calcium oxalate kidney stone, and to explore the formation mechanism of renal calcareous deposits. **Methods:** A total of 21 patients with calcium oxalate kidney stones were included in the present study. The components of the calculi were detected by Fourier-transform infrared spectroscopy. The calcific plaques were observed and the renal papilla biopsy specimens were obtained during PCNL. The specimens were then subjected to alizarin bordeaux staining and light microscopic examination. The expression of osteopontin, BMP-2, and type II collagen in the kidneys was examined by immunohistochemistry. Seven resected renal specimens from patients with non-urolithiasis served as control. **Results:** Renal papillary calcific plaques were found in all the 21 patients with renal calculi. Local calcareous deposits were found in the renal interstitium around tubular basement membrane and extended toward the mucous membrane in the renal papillas. Microscopically, once the calcareous deposits pierced into the collection system, tiny stones could be seen growing on the deposits. Immunohistochemistry showed the renal tissues of renal stone patients and normal renal tissues both expressed osteopontin, but not BMP-2 or type II collagen. **Conclusion:** Renal papillary calcareous deposits may be one of the initiating nidi for kidney stone formation and they may not be an osteoblastic reaction resembling arteriosclerosis.

**[KEY WORDS]** renal calculi; calcareous deposit; calcium oxalate; osteoblastic reaction; osteopontin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(1):19-23]

肾结石的形成机制至今未明。Randall学说认为,在肾结石形成之前肾乳头已经存在着钙盐沉积(即Randall斑),后者是草酸钙和磷酸钙生长形成结石的理想位点<sup>[1]</sup>。但肾钙斑形成的机制至今仍不清

楚。近年来的研究<sup>[2]</sup>表明,血管钙化是一种类似于成骨反应的生物矿化过程;炎症刺激可导致动脉壁平滑肌细胞向成骨样细胞转化,并合成成骨性蛋白;肾小管基底膜和乳头间质钙化斑的成分为羟基磷灰

**[收稿日期]** 2008-06-04 **[接受日期]** 2008-09-26

**[作者简介]** 陈书尚,博士,主治医师。

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81872077, E-mail:sunyinghao@medmail.com.cn

石,类似于骨骼成分。因此我们猜想:草酸钙肾结石患者肾组织钙盐沉积的形成可能也是一种成骨性反应。本研究分析了草酸钙肾结石患者肾脏局部钙盐沉积的形成部位和分布特点,探讨其与肾结石形成的可能关系;并通过检测3种成骨性蛋白,即骨桥蛋白(OPN)、骨形成蛋白-2(BMP-2)和Ⅱ型胶原在肾结石患者肾组织的表达,初步探讨肾乳头钙盐沉积和有机矿化的形成是否为成骨性反应。

## 1 资料和方法

1.1 临床资料 选择自2007年2月至2008年1月于第二军医大学长海医院行经皮肾取石术(PCNL)治疗的肾结石患者,术中取出的结石以傅立叶变换红外光谱(FTIR)作成分分析,结石成分主要为一水草酸钙和(或)二水草酸钙(>50%)者纳入本研究。共有21例肾结石患者入选并签署知情同意书,其中男14例,女7例,年龄15~61岁,平均(43±6.7)岁。另选择7例行肾切除的非结石患者作为对照。

1.2 FTIR 结石成分分析 所有肾结石患者均于PCNL术后收集结石,以Vector 22傅立叶变换红外光谱仪(德国Bruker公司)作结石成分分析,每位患者至少分析2块结石。方法:结石用蒸馏水洗净,烘干后研碎。将1 mg样品粉末与充分干燥的200 mg纯溴化钾粉末混合,在玛瑙乳钵内充分研细。用压片机加压20 MPa后停3 min制成半透明片,迅速置入红外光谱槽中扫描,设置光谱范围为4 000~400 cm<sup>-1</sup>,分辨率为4 cm<sup>-1</sup>。根据事先用纯物质按不同配比建立起的一个模拟各种尿结石成分的谱库,通过与样品标准红外光谱图比对进行定性分析。定量分析根据郎伯特-比尔定律,采用积分法: $C_{\text{样}} \cdot C_{\text{对}}^{-1} = D_{\text{样}} \cdot D_{\text{对}}^{-1}$ (C为浓度,D为光密度),计算样品中各成分的含量;或通过Bruker公司的尿路结石红外光谱分析软件进行分析。

1.3 肾泌尿小管黏膜观察和肾组织标本获取 肾结石患者在PCNL术中碎石结束后,肾镜下观察肾盂、肾盏黏膜及肾乳头情况,拍摄并记录钙盐沉积或结晶颗粒黏附情况。于有钙盐沉积或小结晶黏附的部位分别夹取组织2~3块送检。仔细检查所有活检部位,均未见有明显术中出血。非结石肾切除标本取相应肾乳头部位组织2~3块送检。

1.4 肾组织茜素红钙盐染色检查 获取的肾组织标本立即置于4%多聚甲醛固定24 h,常规脱水、石蜡包埋、4 μm连续切片,分别行H-E染色作常规组织学检查和茜素红染色观察钙盐沉积情况。茜素红

染色步骤:石蜡切片常规脱蜡至水,蒸馏水冲洗3次,加入0.1%茜素红-Tris-HCl染液(pH 8.3),37℃下染色30 min,蒸馏水冲洗,干燥,封片,显微镜下观察钙盐沉积情况。

1.5 肾组织切片免疫学检查 小鼠抗人OPN单克隆抗体、小鼠抗人BMP-2单克隆抗体和小鼠抗人Ⅱ型胶原单克隆抗体均为Santa Cruz公司产品。按ABC试剂盒(购自中山试剂公司)提供的方法操作,行肾组织OPN、BMP-2和Ⅱ型胶原的免疫组化检测。PBS代替一抗作阴性对照。BMP-2和Ⅱ型胶原的阳性对照采用脱钙包埋的人软骨组织。

1.6 统计学处理 采用SPSS 12.0统计软件分析,两组间比较采用独立样本t检验。检查结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 单纯草酸钙或常见混合性草酸钙结石的典型红外光谱图 (1)一水草酸钙:在红外光谱图中,一水草酸钙的吸收峰主要位于3 492~3 065、1 673~1 600、1 329、948、884、782、666、517 cm<sup>-1</sup>等处(图1A)。(2)一水草酸钙+蛋白质的混合性结石红外光谱图:可见3 492~3 057、1 313、946、781 cm<sup>-1</sup>等处的一水草酸钙特异吸收峰(图1B)。(3)一水草酸钙、二水草酸钙和尿酸盐混合性结石的红外光谱图:特异吸收峰位于3 492~3 044、1 314、991、781 cm<sup>-1</sup>等处(图1C)。(4)二水草酸钙、一水草酸钙和磷酸钙混合性结石的红外光谱图:特异吸收峰位于3 503~3 424、1 616、1 315、1 101~1 033、950、780、605、563 cm<sup>-1</sup>等处(图1D)。

2.2 PCNL术中肾乳头观察 21例草酸钙肾结石患者PCNL术中肾乳头可见钙斑,表现为黏膜下的暗黄色斑块;部分局部黏膜上可见小结石黏附、生长(图2)。

2.3 肾组织钙盐光镜检查 非结石肾组织未见钙盐沉积(图3A)。沉积的钙盐被染为红色,聚集在肾小管基底膜附近和肾间质组织;部分区域可见钙盐向肾乳头黏膜延伸,进而突破尿路上皮,脱落到集合系统,其上亦可见小结石黏附生长(图3B)。

2.4 肾组织免疫组织化学检查 免疫组织化学检查表明,肾结石患者和非结石患者肾脏组织均可见OPN的表达。镜下观察,OPN主要在肾小管的上皮细胞胞质内表达。肾结石患者和非结石患者肾组织的OPN表达分布基本一致(图4)。肾结石组肾组织OPN的表达强度为0.209 8±0.021 8,非肾结石组为0.198 8±0.008 1,两组差别无统计学意义。肾结

石患者和非结石患者肾脏组织均未见 BMP-2 和 II 型胶原的明显表达。

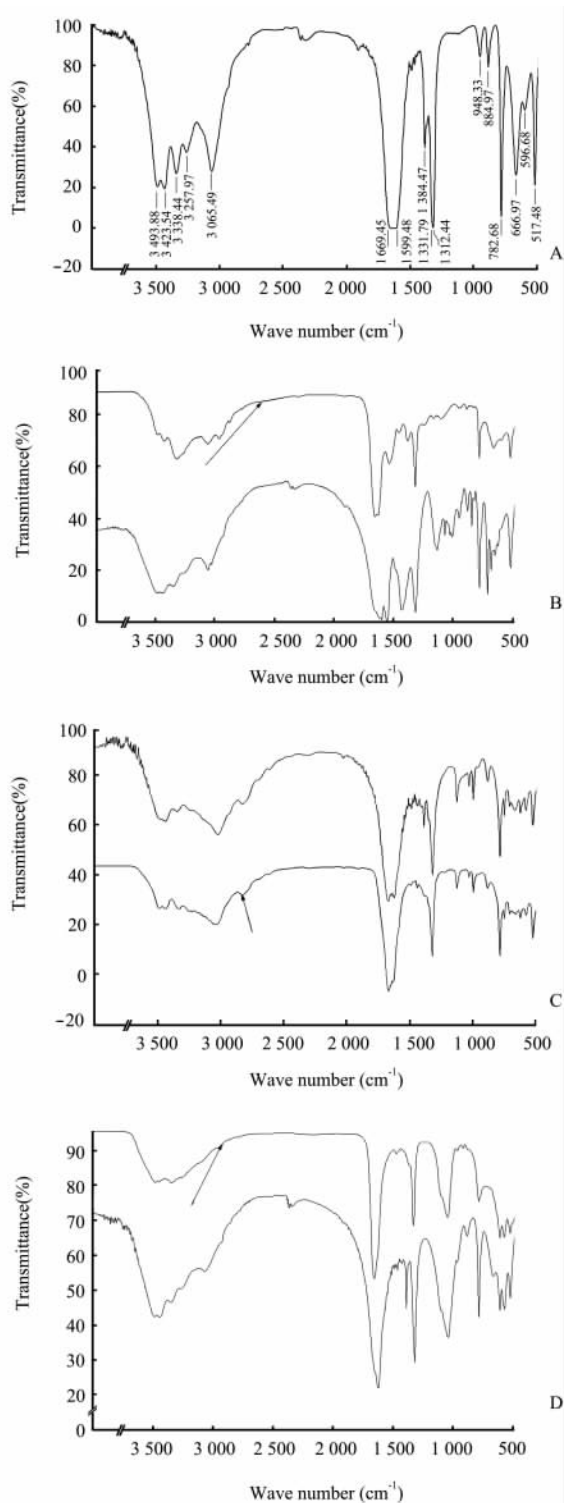


图1 各种草酸钙的红外光谱图

Fig 1 Infrared spectrogram of calcium oxalate monohydrate and compounds

A: Calcium oxalate monohydrate; B: Compound of 70% calcium oxalate monohydrate plus 30% proteins; C: Compound of 80% calcium oxalate monohydrate plus 10% calcium oxalate dehydrate and 10% urates; D: Compound of 70% calcium oxalate dehydrate plus 20% calcium oxalate monohydrate and 10% calcium phosphate

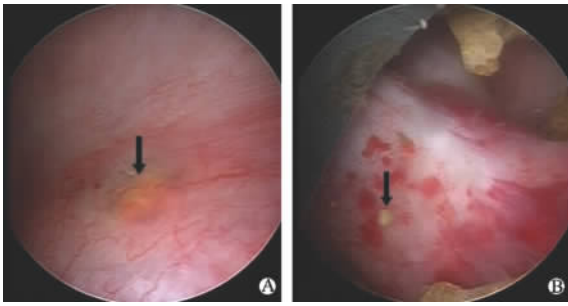
### 3 讨论

3.1 Randall斑与肾结石的形成 1937年, Randall经过大量的临床及尸检研究后,提出了在肾结石形成之前肾乳头已经存在着钙盐沉积的观点,即 Randall学说。他认为这些钙化斑出现在肾乳头上本身对肾脏并无造成明显的损害,并称之为 Randall斑。现已证实,这实际上是肾乳头尖部或其周围的间质组织中出现钙盐结晶沉淀的现象。

肾乳头尖部或其周围间质组织的 Randall斑可见于几乎 100% 草酸钙结石患者和 43% 非草酸钙结石患者<sup>[1]</sup>,被认为是草酸钙和磷酸钙生长形成结石的理想位点<sup>[2]</sup>。Evan 等<sup>[1]</sup>发现,在伴高钙尿症草酸钙结石患者中,钙盐结晶的起始部位是髓襻细支的上皮基底膜表面,渐延伸至直小管和终末集合小管周围的间质组织,最后出现在肾乳头。结石的形成一般要经历成核、生长、聚集等阶段。在结石的形成过程中,需要局部存在有起始病灶 (initiating nidus),后者作为平台,供尿液中的结晶颗粒黏附、滞留进而发展成临床结石<sup>[3-4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>发现,48% 的草酸钙结石患者在内镜下可观察到小结石黏附于肾钙斑,这是钙斑作为草酸钙结石形成起始部位的有力证据。

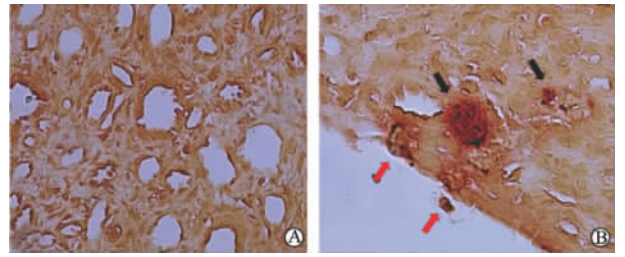
本组 21 例草酸钙肾结石患者 PCNL 术中肾乳头均可见钙斑,表现为黏膜下的暗黄色斑块;在部分病例可见钙盐突破集合系统,其上有小结石附着、生长,或脱落到集合系统。结合我们的研究发现,我们认为,草酸钙肾结石患者肾乳头钙盐沉积在结石形成过程中至少起到了三方面作用:(1)钙盐沉积在肾乳头或其附近形成肾钙斑,后者作为结石形成和生长的基础,当病变穿透尿路上皮进入集合系统后局部可作为结晶黏附、生长形成结石的平台<sup>[6]</sup>;(2)脱落到集合系统的钙斑可作为肾结石形成的核心;(3)沉积的钙盐还可能与周围局部组织和细胞相互作用,通过诱发炎症反应等机制影响肾结石的形成。

3.2 钙盐沉积机制探讨 Randall学说并没有阐明钙盐沉积的具体机制及局部的诱发和促进因素。为了揭示含钙物质在局部沉积和结石形成的机制,国外学者进行了深入的思考和大胆的猜想。Gambaro 等<sup>[7]</sup>将肾乳头的钙化与动脉硬化及慢性炎症引起的软组织钙化进行了比较,发现它们之间存在一些相似之处,如其成分都是羟基磷灰石,类似于骨的成分。研究发现,动脉粥样硬化是一种类成骨性反应,



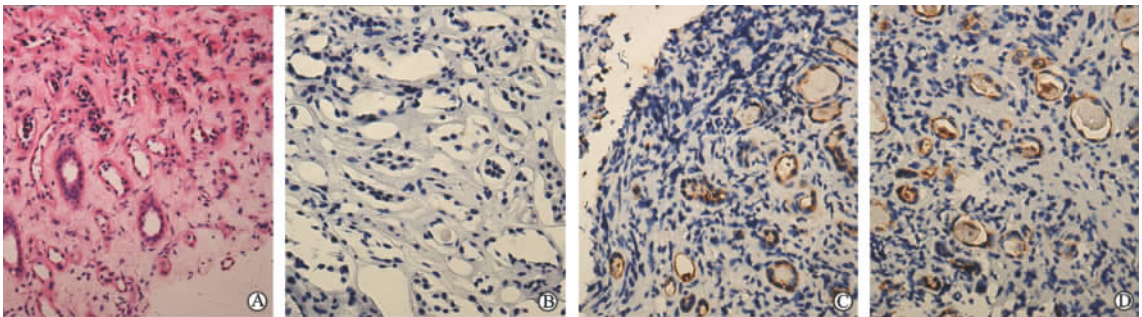
**图 2 PCNL 术中所见钙斑**  
**Fig 2 Renal papilla calcification**  
**observed during PCNL**

A: Luteotestaceous calcific plaque (arrow) under the mucous membrane of the caruncula papillaris; B: Microlith (arrow) adhered to the mucous membrane of the caruncula papillaris, with synathrosis around



**图 3 肾组织茜素红染色检查**  
**Fig 3 Renal tissue examined by alizarin red staining**

A: Renal tissue from patients without renal calculi. No calcium salt deposit was observed. B: Renal tissue from patients with renal oxalate calculi. Calcium salt deposits were observed around the renal tubular basement membrane and the interstitium (black arrows). Calcium salts broken through the uroepithelium and entered the collecting system (red arrows). Original magnification:  $\times 400$



**图 4 肾组织 OPN 免疫组织化学检查**  
**Fig 4 Immunohistochemistry examination of renal OPN**

A: H-E staining of the renal tissue (Original magnification:  $\times 200$ ); B: Immunohistochemistry staining of OPN (Negative control, original magnification:  $\times 400$ ); C: Immunohistochemistry staining of OPN in the renal tissue examination from patients without kidney stones (Original magnification:  $\times 400$ ); D: Immunohistochemistry staining of OPN in the renal tissue from patients with kidney stones (Original magnification:  $\times 400$ )

一些动脉细胞可分化为成骨性细胞,硬化的动脉壁内可见到各种骨细胞和调控骨形成的蛋白。Gambaro 等<sup>[7]</sup>因此猜测肾钙斑的形成有可能是肾乳头上皮细胞在局部缺氧和炎症的刺激下,分化为成骨性细胞,引起局部的成骨性反应。Stoller 等<sup>[8]</sup>则猜测肾结石的形成有可能是由于肾乳头的脉管系统受损伤后,在其修复过程中发生了类似于动脉粥样硬化的反应,导致动脉壁钙化,后者逐渐延伸至肾乳头间质,最后进入肾乳头管,作为结石形成的原始病灶。这两个猜想的共同之处在于均认为肾乳头钙化的有机矿化是一种类似于动脉粥样硬化的成骨性反应,但又均缺乏客观实验证据。事实上, Fernandez-Conde 等<sup>[9]</sup>在先前的研究中已发现肾结石中的组织碎片内含有类似于空骨细胞陷窝的结构,并提出可能是局部尿路上皮黏膜向骨组织转化为结石的形成提供了聚集成核位点。可惜他未能通过实验进一步证实自己的观点。Evan 等<sup>[1-2,10]</sup>最近发现肾小管基

底膜和乳头间质的钙化斑,其成分为羟基磷灰石,与骨骼的成分类似;而且 OPN 在肾结石患者肾小管中表达。这些研究结果也支持这样一个假说,即肾乳头钙斑的形成可能是一个类似于成骨性反应的过程。

为了验证这一假说,本研究采用免疫组化方法对肾结石患者肾组织中 OPN、BMP-2 和 II 型胶原的表达进行了检测,并与非结石患者进行对比。在肾组织中,OPN 是一种具有成骨作用的蛋白<sup>[11]</sup>;而肾脏 OPN 由亨利襻、近曲小管和肾乳头表面上皮分泌至尿液中,可抑制草酸钙结晶的核化、生长、聚集<sup>[12]</sup>。因这些部位是与尿石形成有关矿物质的高浓缩区,OPN 于此高表达有肯定的意义。它是一种重要的生物矿化调节剂,可以抑制骨和肾脏的结晶沉淀<sup>[13]</sup>。但是,在肾结石模型中,草酸钙结晶可诱发肾小管上皮细胞的损伤,扰乱细胞的极性,使整合素取向到小管腔内表面<sup>[14]</sup>,这为蛋白质的固定奠定

了基础。受损伤的上皮细胞上有与 OPN 黏附的草酸钙晶体;而草酸钙结石中 OPN 的含量很高,这一点非常支持富含天冬氨酸的 OPN 与草酸钙晶体之间的特异性相互作用,及其在草酸钙晶体结石形成中起重要作用。结石中的 OPN 能够抑制草酸钙晶体生长,但同时也可被极度过饱和的草酸钙晶体包裹进去,成为晶体潜在的成核位点,促进草酸钙结石的形成<sup>[15-16]</sup>。

本研究发现结石患者和非结石患者肾组织均高表达 OPN,两者无显著差别;且肾结石患者肾组织并不表达 BMP-2 和 II 型胶原,后两者也是成骨性细胞的标志性蛋白<sup>[11,17-18]</sup>。因此本研究的初步结果不支持肾乳头钙斑的形成是一种类似于成骨性反应过程的假说,其具体形成机制尚需要更多的实验研究进行探讨。此外,我们发现在有钙盐沉积和小结石黏附的位置,局部黏膜存在明显炎症反应,周围细胞受损,后者可能进一步促进了钙盐的沉积和结石生长,形成恶性循环。

## [参考文献]

- [1] Evan A P, Lingeman J E, Coe F L, Parks J H, Bledsoe S B, Shao Y, et al. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111: 607-616.
- [2] Coe F L, Evan A P, Worcester E. Kidney stone disease [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2598-2608.
- [3] Moe O W. Kidney stones: pathophysiology and medical management[J]. *Lancet*, 2006, 367: 333-344.
- [4] Matlaga B R, Coe F L, Evan A P, Lingeman J E. The role of Randall's plaques in the pathogenesis of calcium stones[J]. *J Urol*, 2007, 177: 31-38.
- [5] Matlaga B R, Williams J C Jr, Kim S C, Kuo R L, Evan A P, Bledsoe S B, et al. Endoscopic evidence of calculus attachment to Randall's plaque[J]. *J Urol*, 2006, 175: 1720-1724.
- [6] 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2004: 753-754.
- [7] Gambaro G, D'Angelo A, Fabris A, Tosetto E, Anglani F, Luppo A. Crystals, Randall's plaques and renal stones: Do bone and atherosclerosis teach us something[J]? *J Nephrol*, 2004, 17: 774-777.
- [8] Stoller M L, Meng M V, Abrahams H M, Kane J P. The primary stone event: a new hypothesis involving a vascular etiology [J]. *J Urol*, 2004, 171: 1920-1924.
- [9] Fernandez-Conde M, Serrano S, Alcover J, Aaron J E. Bone metaplasia of urothelial mucosa: an unusual biological phenomenon causing kidney stones[J]. *Bone*, 1996, 18: 289-291.
- [10] Evan A P, Coe F L, Rittling S R, Bledsoe S B, Shao Y, Worcester E M, et al. Apatite plaque particles in inner medulla of kidneys of calcium oxalate stone formers: osteopontin localization [J]. *Kidney Int*, 2005, 68: 145-154.
- [11] Peptan I A, Hong L, Evans C A. Multiple differentiation potentials of neonatal dura mater-derived cells[J]. *Neurosurgery*, 2007, 60: 346-352.
- [12] Wang L, Guan X, Tang R, Hoyer J R, Wierzbicki A, De Yoreo J J, et al. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of calcium oxalate crystallization[J]. *J Phys Chem B*, 2008, 112: 9151-9157.
- [13] Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson J A, Johnson R, Hughes J. Osteopontin-a molecule for all seasons[J]. *QJM*, 2002, 95: 3-13.
- [14] Sorokina E A, Wesson J A, Kleinman J G. An acidic peptide sequence of nucleolin-related protein can mediate the attachment of calcium oxalate to renal tubule cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 2057-2065.
- [15] Wesson J A, Johnson R J, Mazzali M, Beshensky A M, Stietz S, Giachelli C, et al. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 139-147.
- [16] Asselman M, Verhulst A, De Broe M E, Verkoelen C F. Calcium oxalate crystal adherence to hyaluronan-, osteopontin-, and CD44-expressing injured/regenerating tubular epithelial cells in rat kidneys[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 3155-3166.
- [17] Wan D C, Pomerantz J H, Brunet L J, Kim J B, Chou Y F, Wu B M, et al. Noggin suppression enhances *in vitro* osteogenesis and accelerates *in vivo* bone formation[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 26450-26459.
- [18] Honma T, Itagaki T, Nakamura M, Kamakura S, Takahashi I, Echigo S, et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair[J]. *Oral Dis*, 2008, 14: 457-464.

[本文编辑] 孙岩