

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.03.0319

• 短篇论著 •

丛生蛋白与草酸钙肾结石复发的相关性

王琦, 刘敏, 彭泳涵, 李凌, 芦超越, 周铁, 高小峰*
海军军医大学(第二军医大学)长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究草酸钙肾结石复发的影响因素。**方法** 采集2015年9月至12月于海军军医大学(第二军医大学)长海医院接受住院治疗的草酸钙肾结石患者的临床数据,根据患者发病史分为草酸钙肾结石初发组和复发组。采用酶联免疫吸附试验检测2组患者血液和尿液中丛生蛋白浓度以及血液中炎性指标白细胞介素(IL)-1 β 、IL-2、IL-6的浓度。采用单因素及多因素回归统计方法分析草酸钙肾结石复发的影响因素。**结果** 2组各纳入36例患者,单因素分析结果显示2组间年龄、性别、体质量指数(BMI)、肾小球滤过率估计值(eGFR)及结石最大径差异均无统计学意义(P 均 >0.05);2组间血液丛生蛋白、IL-1 β 、IL-2及IL-6浓度的差异也均无统计学意义(P 均 >0.05);复发组尿液丛生蛋白浓度低于初发组[(44.35 \pm 15.44)ng/mL vs (56.76 \pm 16.80)ng/mL, $t=-3.262$, $P<0.05$]。多因素 logistic 回归分析结果显示,尿液丛生蛋白浓度($OR=0.939$, 95% CI 0.900~0.979, $P<0.05$)是草酸钙肾结石复发的独立影响因素。**结论** 草酸钙肾结石复发患者尿液丛生蛋白浓度低于初发患者,提示尿液中丛生蛋白的分泌可能与结石复发有密切关系。

[关键词] 肾结石;草酸钙结石;丛生蛋白;氧化应激;炎症反应;复发

[中图分类号] R 692.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)03-0319-05

Correlation between clusterin expression and recurrence of calcium oxalate kidney stone

WANG Qi, LIU Min, PENG Yong-han, LI Ling, LU Chao-yue, ZHOU Tie, GAO Xiao-feng*

Department of Urology, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the risk factors influencing the recurrence of calcium oxalate kidney stone. **Methods** The clinical data of patients with calcium oxalate kidney stone were collected; they were hospitalized in Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University) from Sep. 2015 to Dec. 2015. The patients were divided into the first-time calcium oxalate stone group (first-time group) and the recurrent of calcium oxalate stone group (recurrent group) according to the stone histories. The concentrations of clusterin in serum and urine, and the concentrations of serum interleukin (IL)-1 β , IL-2 and IL-6 in the two groups were detected by ELISA. The independent risk factors influencing the recurrence of calcium oxalate kidney stones were analyzed by univariate and multivariate logistic regression analysis. **Results** Thirty-six patients were included in each group. Univariate analysis showed that there were no significant differences in age, gender, body mass index (BMI), estimated glomerular filtration rate (eGFR), maximum stone diameter or the concentrations of serum clusterin, IL-1 β , IL-2 and IL-6 between the two groups (all $P>0.05$). The concentration of urinary clusterin in the recurrent group was significantly lower than that in the first-time group [(44.35 \pm 15.44) ng/mL vs [56.76 \pm 16.80] ng/mL, $t=-3.262$, $P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that urinary clusterin concentration ($OR=0.939$, 95% CI 0.900-0.979, $P<0.05$) was an independent risk factor influencing the recurrent of calcium oxalate kidney stone. **Conclusion** The concentration of urinary clusterin is decreased in patients with recurrence of calcium oxalate stone compared the first-time stone patients, suggesting that the clusterin in urine may be closely related to the recurrence of stones.

[Key words] nephrolithiasis; calcium oxalate stone; clusterin; oxidative stress; inflammatory reaction; relapse

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(3): 319-323]

[收稿日期] 2017-09-08 [接受日期] 2017-12-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81370806). Supported by National Natural Science Foundation of China (81370806).

[作者简介] 王琦, 硕士生. E-mail: thejournal@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161732, E-mail: gxfdoc@sina.com

肾结石具有高复发率,因此近年来肾结石的发病率居高不下^[1]。结石高危患者5~10年内复发率可达20%~50%,导致肾结石治疗相关医疗成本逐年增加^[2]。约80%的肾结石成分为草酸钙结石,包括一水草酸钙和二水草酸钙结石。草酸钙肾结石患者肾脏组织中可以检测到炎症相关分子的表达,如骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和胶原蛋白^[3]。此外研究还发现,草酸钙结石基质中含有大量丛生蛋白(clusterin),其在抗凋亡、抗氧化及炎症调节等过程中发挥重要作用^[4-5]。本课题组前期研究结果也显示相对于普通健康人群,肾结石患者血液中丛生蛋白和炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6浓度存在显著差异^[6]。那么,肾结石患者血液和尿液中的丛生蛋白以及IL-1 β 、IL-6和IL-2是否与结石复发相关呢?本研究通过检测草酸钙肾结石患者血液和尿液标本中相关分子的浓度,并纳入可能影响结石复发的临床指标,分析草酸钙肾结石复发的影响因素。

1 资料和方法

1.1 研究对象 2015年9月至12月于海军军医大学(第二军医大学)长海医院泌尿外科接受住院治疗的草酸钙肾结石成人患者,行输尿管镜碎石或经皮肾镜碎石术,根据病史、治疗史及结石成分分析结果将患者分为草酸钙肾结石初发组和复发组。纳入标准:(1)经腹部CT明确诊断为肾结石;(2)无肾结石发病史的单发肾结石;(3)既往肾结石排出或治疗清除后再发结石;(4)术中或术后留取结石标本;(5)年龄 \geq 18岁。排除标准:(1)年龄 $<$ 18岁或 $>$ 85岁;(2)以尿酸结石等其他结石类型为主;(3)海绵肾、多囊肾、马蹄肾、孤立肾、肾脏萎缩等肾脏解剖异常;(4)超声和CT检查提示肾盏或肾盂扩张积水、肾结石合并输尿管梗阻;(5)肾小球滤过率估计值(estimated glomerular filtration rate, eGFR) $<$ 60 mL/(min \cdot 1.73 m²);(6)泌尿系感染;(7)肾脏部分切除术史;(8)甲状旁腺功能亢进;(9)肿瘤患者。本研究通过海军军医大学(第二军医大学)长海医院医学伦理委员会审批(伦理批件编号:CHE2017-2017)。

1.2 资料收集

1.2.1 临床数据采集及计算 通过病史资料采

集患者的年龄、性别、体质量,记录患者血肌酐值。通过电子影像系统(picture archiving and communication system, PACS)测量患者结石最大径。基于血肌酐值(μ mol/L),采用肾脏病饮食改良(modification of diet in renal disease, MDRD)简化公式计算eGFR:eGFR [mL/(min \cdot 1.73 m²)] $=186\times(\text{血肌酐值}/88.41)-1.154\times\text{年龄}-0.203\times(0.742\text{女性})$ ^[7]。

1.2.2 血尿标本采集及储存 患者入院后,嘱其当晚10:00后禁饮食、禁饮水,次日早晨6:00留取血液和晨尿标本各15 mL。血液和尿液标本于30 min内送至实验室,高速离心(2 000 \times g)20 min,收集上清液并分装,储存于-80 $^{\circ}$ C冰箱内待检。

1.2.3 丛生蛋白及炎症因子浓度检测 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒由上海逸晗生物科技有限公司提供,IL-1 β 、IL-2、IL-6和丛生蛋白试剂盒货号分别为SU5623、SU5017、SU5016、SU6608。将标准品稀释成5个梯度样品,各梯度加样量为50 μ L/孔,另设空白孔。经加样、封板、37 $^{\circ}$ C细胞孵箱内温育、酶标、显色和终止等程序,最后将其置入酶标仪中,检测光密度值,获得血液中IL-1 β 、IL-2、IL-6的浓度,及血液和尿液中丛生蛋白的浓度值。

1.2.4 结石成分分析 将术中或术后取得的适量结石标本清洗干净,自然晾干后置入烘箱内烘干。将结石研磨成粉状,取出约100 mg样本与纯溴化钾混合、研磨,制片后迅速将其置入LIR-20型结石红外光谱自动分析仪(天津蓝莫德科学仪器有限公司)中,获取结石成分报告。

1.3 统计学处理 采用SPSS 21.0软件,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2组间比较采用Student *t* 检验。计数资料(男性)比较采用 χ^2 检验,再将各因素纳入多因素logistic回归分析。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 患者基本情况 本研究初始纳入病例116例,排除其他类型结石或混合结石患者31例、肾功能不全患者7例、标本不合格者6例,最终草酸钙肾结石复发组纳入36例,其中男性29例、女性7例,平均年龄(51.75 \pm 15.13)岁;草酸钙肾

结石初发组纳入 36 例, 其中男性 25 例、女性 11 例, 平均年龄 (49.50 ± 13.01) 岁。

2.2 2 组间资料单因素分析 草酸钙肾结石初发患者与复发患者的年龄、性别、体质量指数 (body mass index, BMI)、eGFR 及结石最大径差异均无

统计学意义 (P 均 > 0.05), 复发组尿液丛生蛋白浓度低于初发组 ($t = -3.262$, $P < 0.05$), 2 组间血液丛生蛋白及 IL-1 β 、IL-2 和 IL-6 浓度差异均无统计学意义。见表 1。

表 1 草酸钙肾结石初发组和复发组相关变量的单因素分析

变量	初发组	复发组	t/χ^2 值	P 值
年龄 (岁), $\bar{x} \pm s$	49.50 ± 13.01	51.75 ± 15.13	0.676	0.501
男性 n (%)	25 (69.44)	29 (80.56)	1.185	0.276
BMI ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$), $\bar{x} \pm s$	24.75 ± 3.92	24.74 ± 3.41	-0.003	0.998
结石最大径 d/mm , $\bar{x} \pm s$	21.38 ± 4.27	22.76 ± 5.32	1.209	0.231
eGFR [$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (1.73 \text{ m}^2)^{-1}$], $\bar{x} \pm s$	125.43 ± 26.57	116.87 ± 30.11	-1.279	0.205
血 IL-1 β $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$, $\bar{x} \pm s$	17.81 ± 2.50	17.62 ± 2.45	-0.336	0.738
血 IL-2 $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$, $\bar{x} \pm s$	865.80 ± 210.37	904.31 ± 199.27	0.797	0.428
血 IL-6 $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$, $\bar{x} \pm s$	59.70 ± 16.84	55.81 ± 13.71	-1.073	0.287
血丛生蛋白 $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$, $\bar{x} \pm s$	155.99 ± 15.86	160.86 ± 18.60	1.195	0.236
尿丛生蛋白 $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$, $\bar{x} \pm s$	56.76 ± 16.80	44.35 ± 15.44	-3.262	0.002

$N=36$

BMI: 体质量指数; eGFR: 肾小球滤过率估计值; IL: 白细胞介素

2.3 草酸钙肾结石复发的多因素分析 变量筛选方法为 enter 法, 自由度为 1 时, Wald 值对应 $P=0.05$ 的界值是 3.84; 如果 $\text{Wald } \chi^2 > 3.84$, 则

$P < 0.05$ 。多因素分析结果显示尿丛生蛋白浓度为草酸钙肾结石复发的独立影响因素 ($OR=0.939$, 95% CI 0.900~0.979, $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 草酸钙肾结石复发多因素 logistic 回归分析

变量	回归系数	标准误	Wald	P 值	OR (95% CI)
性别	-0.250	0.678	0.136	0.712	0.778 (0.206, 2.940)
年龄	0.016	0.022	0.529	0.467	1.016 (0.973, 1.061)
BMI	-0.083	0.079	1.106	0.293	0.920 (0.788, 1.075)
结石最大径	0.121	0.065	3.458	0.063	1.129 (0.993, 1.282)
eGFR	-0.011	0.011	1.059	0.303	0.989 (0.967, 1.010)
血 IL-1 β	-0.103	0.116	0.792	0.374	0.902 (0.719, 1.132)
血 IL-2	0.001	0.001	0.669	0.413	1.001 (0.998, 1.004)
血 IL-6	-0.037	0.020	3.567	0.059	0.963 (0.927, 1.001)
血丛生蛋白	-0.004	0.018	0.060	0.806	0.996 (0.962, 1.031)
尿丛生蛋白	-0.063	0.022	8.511	0.004	0.939 (0.900, 0.979)
常数项	6.809	5.120	1.768	0.184	

BMI: 体质量指数; eGFR: 肾小球滤过率估计值; IL: 白细胞介素; OR: 比值比; CI: 置信区间

3 讨论

草酸钙肾结石发病过程中, 肾脏间质斑块内可检测到炎症相关分子的表达, 提示局部炎症反应在结石形成初期发挥了重要作用^[3]。类似于痛风、动脉粥样硬化及石棉肺等晶体沉积疾病, 草酸钙晶体可通过分泌炎症因子触发肾脏炎症反应

及组织重构。Mulay 等^[8]研究发现, 草酸钙晶体可激活肾脏内单核巨噬细胞中 NOD 样受体家族 3 (NOD-like receptor 3, NLRP3) 炎症小体介导的炎症反应通路, 诱导天然免疫分泌 IL-1 β 进而加重炎症反应及肾小管的损伤。最新研究证明, 肾结石患者肾乳头和尿液中趋化因子配体 (chemokine ligand, CCL) -2、CCL-5、CCL-7 以及集落刺激

因子1 (colony stimulating factor 1, CSF1) 等炎症因子的表达明显增多^[9]。相较于草酸钙肾结石初发患者, 结石晶体的长期刺激使得复发患者可能更易发生肾脏慢性炎症, 可伴发慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD)^[10]。目前, 尚无研究探索草酸钙肾结石复发患者与初发者机体炎症反应的差异。本研究中, 草酸钙肾结石初发患者和复发患者血液中 IL-1 β 、IL-2 和 IL-6 的浓度差异无统计学意义, 初步提示 2 组患者的系统性炎症反应变化无明显差异。因此, 仍需研究复发患者肾结石诱导的肾脏慢性炎症反应水平如何得以控制, 探索可能参与调控的因子, 有助于减少复发结石伴发的肾功能损害。

丛生蛋白为一种糖蛋白, 几乎在人体所有组织中表达, 发挥分子伴侣功能, 其与人体内的氧化应激和炎症反应密切相关。研究显示, 电离辐射导致的活性氧积聚可诱导丛生蛋白的表达, 使其发挥抗氧化应激、调节炎症反应和细胞凋亡等作用^[11]。在输尿管梗阻、肾脏缺血再灌注及肾毒性等肾脏疾病的发病过程中, 丛生蛋白被证实发挥了重要的肾脏保护作用^[12]。丛生蛋白与肾结石发病的研究目前相对较少, 蛋白组学研究显示一水草酸钙结石基质中含有大量丛生蛋白, 提示丛生蛋白与草酸钙肾结石发病相关^[4]。Joshil 等^[13]通过对草酸钙结晶大鼠模型的研究发现, 随着高草酸尿、肾结晶的长时间刺激, 大鼠肾脏组织中丛生蛋白、OPN 和 CD44 等基因的表达水平上调。Li 等^[14]研究发现, 草酸钙肾结石患者肾脏组织中丛生蛋白表达增加, 草酸钙晶体刺激肾小管上皮细胞可诱导细胞内丛生蛋白表达增加。

丛生蛋白表达降低会导致机体保护作用的减弱, 如在小鼠缺血-再灌注损伤模型中, 丛生蛋白表达缺陷的小鼠表现出肾脏炎症反应、肾小管细胞损伤和组织纤维化程度加重, CD8⁺ T 细胞和 Mac3⁺ 巨噬细胞浸润增加, 提示丛生蛋白在缓解肾脏炎症损伤中发挥了重要作用^[12,15]。Williams 等^[16]对比了健康志愿者和草酸钙肾结石患者血液中单核细胞、淋巴细胞、血小板及 IL-6 的表达水平, 结果显示草酸钙肾结石患者中单核细胞的线粒体功能下降, 而 IL-6 表达升高, 提示草酸钙肾结石患者体内炎症反应增加。本课题组前期研究结果显示, 草酸钙肾结石患者血液中丛生蛋白浓度较健康对照者偏低,

而 IL-1 β 和 IL-6 浓度偏高, 提示丛生蛋白可能在草酸钙晶体诱导的机体炎症反应中发挥抑制作用^[6]。丛生蛋白在肾结石复发中的作用研究尚无报道, 其在肾结石发病中的调控机制仍不明确。本研究中, 2 组患者血液中丛生蛋白浓度及炎症指标浓度差异均无统计学意义, 而复发组尿液丛生蛋白浓度低于初发组。据此可以推测, 虽然草酸钙肾结石复发患者和初发患者系统性炎症水平无明显差异, 但复发组患者肾脏局部丛生蛋白分泌水平降低, 削弱了其肾脏局部炎症反应的抑制作用, 增加了肾结晶在肾小管上皮细胞沉积的风险, 最终导致草酸钙结石复发风险增加。由于本研究未对患者实施肾脏组织的炎症检测, 将来还需通过进一步的动物实验和临床研究予以证实。

本研究同时存在一定的局限性: (1) 影响草酸钙肾结石复发的其他因素可能还包括饮食习惯、生活环境、代谢异常和术后时间等, 本研究纳入病例数少, 纳入评估的变量指标有限; (2) 非 24 h 尿液收集以及未采用尿肌酐校正尿液指标浓度, 尿量及肾功能变化可能对尿液指标检测造成误差。

本研究结果显示草酸钙肾结石复发患者尿液丛生蛋白浓度明显低于初发组, 提示丛生蛋白可能通过作用于肾脏局部病灶影响肾结石的复发, 进一步的研究有望为探索肾结石复发机制提供新的研究基础。

[参考文献]

- [1] RULE A D, LIESKE J C, LI X, MELTON L R, KRAMBECK A E, BERGSTRLE H J. The ROKS nomogram for predicting a second symptomatic stone episode[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25: 2878-2886.
- [2] HEERS H, TURNEY B W. Trends in urological stone disease: a 5-year update of hospital episode statistics[J]. BJU Int, 2016, 118: 785-789.
- [3] KHAN S R. Reactive oxygen species, inflammation and calcium oxalate nephrolithiasis[J]. Transl Androl Urol, 2014, 3: 256-276.
- [4] CANALES B K, ANDERSON L, HIGGINS L, SLATON J, ROBERTS K P, LIU N, et al. Second prize: comprehensive proteomic analysis of human calcium oxalate monohydrate kidney stone matrix[J]. J Endourol, 2008, 22: 1161-1167.
- [5] TROUGAKOS I P, GONOS E S. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and

- age-related diseases[J]. *Free Radic Res*, 2006, 40: 1324-1334.
- [6] 彭泳涵,刘敏,施晓磊,陈锐,李凌,高小峰,等. 肾结石患者丛生蛋白和相关炎症指标的表达[J]. *中国临床医学*, 2016, 23: 470-472.
- [7] SALGADO J V, NEVES F A, BASTOS M G, FRANÇA A K, BRITO D J, SANTOS E M, et al. Monitoring renal function: measured and estimated glomerular filtration rates—a review[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2010, 43: 528-536.
- [8] MULAY S R, KULKARNI O P, RUPANAGUDI K V, MIGLIORINI A, DARISIPUDI M N, VILAYSANE A, et al. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1 β secretion[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123: 236-246.
- [9] SUN A Y, HINCK B, COHEN B R, KESLAR K, FAIRCHILD R L, MONGA M. Inflammatory cytokines in the papillary tips and urine of nephrolithiasis patients[J/OL]. *J Endourol*, 2018. doi: 10.1089/end.2017.0699.
- [10] KEDDIS M T, RULE A D. Nephrolithiasis and loss of kidney function[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013, 22: 390-396.
- [11] TROUGAKOS I P. The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches—a mini-review[J]. *Gerontology*, 2013, 59: 514-523.
- [12] NGUAN C Y, GUAN Q, GLEAVE M E, DU C. Promotion of cell proliferation by clusterin in the renal tissue repair phase after ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306: F724-F733.
- [13] JOSHIL S, WANG W, KHAN S R. Transcriptional study of hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis in male rats: inflammatory changes are mainly associated with crystal deposition[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12: e0185009. doi: 10.1371/journal.pone.0185009.
- [14] LI J Y, LIU J, JIANG J, PUMILL C, ELAIHO C, ZHANG Y, et al. Calcium oxalate calculi-induced clusterin expression in kidney[J]. *Urolithiasis*, 2015, 43: 411-418.
- [15] GUO J, GUAN Q, LIU X, WANG H, GLEAVE M E, NGUAN C Y, et al. Relationship of clusterin with renal inflammation and fibrosis after the recovery phase of ischemia-reperfusion injury[J]. *BMC Nephrol*, 2016, 17: 133.
- [16] WILLIAMS J, HOLMES R P, ASSIMOS D G, MITCHELL T. Monocyte mitochondrial function in calcium oxalate stone formers[J]. *Urology*, 2016, 93: 221-224.

[本文编辑] 何平