

本文引文格式:崖文童,孟冬冬,黄群.血清 S100A8/A9 水平与上尿路草酸钙结石的关系[J].

右江民族医学院学报,2022,44(4):535-539.

【论著与临床报道】

血清 S100A8/A9 水平与上尿路草酸钙结石的关系

崖文童,孟冬冬,黄群

(右江民族医学院附属医院泌尿外科,广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨血清钙卫蛋白(calprotectin,S100A8/A9)表达水平与上尿路草酸钙(calcium oxalate,CaOx)结石的关系。方法 选取50例通过结石红外光谱分析仪进行结石成分分析证实为草酸钙结石的上尿路结石患者作为结石组,同时选取同期来院的正常健康人群50例作为对照组,采用酶联免疫吸附测定两组血清中S100A8/A9浓度,并比较其差异。结果 结石组血清中S100A8/A9浓度显著高于对照组($P < 0.01$);结石组中男性与女性血清中S100A8/A9浓度比较无明显差别($P > 0.05$);对照组中男性血清中S100A8/A9浓度与女性血清中S100A8/A9浓度比较无明显差别($P > 0.05$);结石组男性血清中S100A8/A9浓度高于对照组男性血清中S100A8/A9浓度($P < 0.05$);结石组女性血清中S100A8/A9浓度高于对照组女性血清中S100A8/A9浓度($P < 0.05$);纯CaOx组血清中S100A8/A9浓度高于对照组($P < 0.05$);含CaOx的混合结石组血清中S100A8/A9浓度显著高于对照组($P < 0.05$);纯CaOx组血清中S100A8/A9浓度与含CaOx的混合结石组无明显差别($P > 0.05$)。结论 S100A8/A9可能作为结石促进物参与上尿路CaOx结石形成过程。

关键词:钙卫蛋白;尿路结石;草酸钙结石;酶联免疫吸附测定

中图分类号:R691.4

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)04-0535-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.04.012

Relation between serum S100A8/A9 level and calcium oxalate urolithiasis in upper urinary tract

Ya Wengtong, Meng Dongdong, Huang Qun

(Department of Urinary Surgery, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the relation between the expression of serum S100A8/A9 and calcium oxalate (CaOx) urolithiasis in upper urinary tract. **Methods** This study selected fifty patients with upper urinary calculi which were confirmed to be calcium oxalate calculi by stone composition analysis using stone infrared spectrum analyzer. These patients were set as the stone group, and 50 normal healthy people who came to the hospital during the same period were selected as the control group. The concentration of S100A8/A9 in the serum of two groups was detected by ELISA and the differences were compared. **Results** The concentration of serum S100A8/A9 in the stone group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). There was no significant difference in serum S100A8/A9 concentration between male and female in stone group ($P > 0.05$). There was no significant difference in serum S100A8/A9 concentration between male and female in the control group ($P > 0.05$). The serum S100A8/A9 concentration in male of the stone group was higher than that in male of the control group ($P < 0.05$). The serum S100A8/A9 concentration in female of the stone group was higher than that in female of the control group ($P < 0.05$). The concentration of serum S100A8/A9 in the pure CaOx group was higher than that in the control group ($P < 0.05$); the concentration of serum S100A8/A9 in the group with mixed stones containing CaOx was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the concentration of serum S100A8/A9 between the pure CaOx group and the group with mixed stones containing CaOx ($P > 0.05$). **Conclusion**

第一作者简介:崖文童(1996-),男,硕士,住院医师,研究方向:泌尿系结石,E-mail:ywt0776@163.com

通讯作者简介:黄群(1966-),男,本科,教授,硕士研究生导师,研究方向:泌尿系统疾病,E-mail:huangqundao@163.com

S100A8/A9 may be a stone promoter involved in the formation of upper urinary tract CaOx stones.

Key words: calprotectin; lithangiuria; enzyme-linked immunosorbent assay

泌尿系结石是泌尿系统疾病常见病之一,根据相关调查结果显示,我国泌尿系结石的发病率已经超过 6%,在我国南部各地区发病率则达到 11.6%^[1]。近年来,发病率呈上升趋势,并且超过一半的患者在经过有效治疗后 5 年内再次复发^[2]。钙卫蛋白(calprotectin, S100A8/A9)作为结石基质蛋白(stone matrix proteins, SMP),属于 S100 蛋白家族中的一类同源低分子量钙结合蛋白,通常是由钙粒蛋白 A 与钙粒蛋白 B 以钙离子依赖性方式形成的异源二聚体蛋白复合物,有研究显示, S100A8/A9 在炎症反应、肿瘤生长与转移、调节细胞循环等生理过程中扮演着重要角色^[3-4]。目前已有相关临床及基础研究提示草酸钙结石的形成可能是炎症反应所致,尿液中各类晶体等成分与肾小管上皮细胞发生相互作用,从而引起肾小管上皮损伤和炎症反应,而这些病理过程往往与草酸钙结石形成的关系密切^[5]。而 S100A8/A9 作为炎性细胞因子,在血管内皮细胞、成纤维细胞和巨噬细胞等各类细胞中广泛表达,不论是在细胞内还是细胞外,均具有生物学活性从而发挥生物学效应^[6-7]。目前国内外关于血清 S100A8/A9 水平与上尿路上尿路草酸钙(calcium oxalate, CaOx)结石之间的关系少见明确的定论。本实验通过对血清中 S100A8/A9 表达水平与上尿路草酸钙结石之间的相互关系进行研究,并对其出现的表达差异进行初步讨论,为往后更深入的研究草酸钙结石的生成机制提供相关数据成果及一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取右江民族医学院附属医院泌尿外科 2020 年 5 月—2020 年 12 月期间因上尿路结石而行手术治疗或保守治疗的患者作为结石组,运用红外光谱分析法对获取的患者结石标本进行成分鉴定。根据结石成分类型,选取 50 例 CaOx 占结石组成分 90% 以上的患者纳入结石组,其中男性 28 例,女性 22 例,平均年龄(45.60±9.91)岁。另外随机收集 50 例在同一时期在本院进行体检的健康人群作为对照组,其中男性 27 例,女性 23 例,平均年龄(44.86±9.77)岁,两组年龄、性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 结石组纳入与排除标准 ①纳入标准:2020 年 5 月~12 月在本院泌尿外科住院并通过手术或保守治疗而获取结石标本的上尿路结石患者;具有完整的病历记录以及泌尿系 CT、静脉泌尿系造影、彩超等影像学检查结果;符合《中国泌尿外科和男科疾病诊断治疗

指南 2019 版》^[8]中上尿路结石诊断标准;获取的结石标本中草酸钙含量 $>90\%$;同意作为研究对象参与本次研究者的患者。②排除标准:合并严重的泌尿系统感染、高尿酸血症、代谢综合征或患有先天性泌尿系统畸形;合并恶性肿瘤、动脉粥样硬化等心脑血管系统疾病、血液系统疾病以及其他重大疾病者;近期服用肾毒性药物以及合并严重肝肾功能不全者;不同意作为研究对象参与本次研究者。

1.3 实验仪器与试剂 结石红外光谱自动分析系统 LIIR-20(天津蓝莫德科学仪器有限公司)、Epoch 全波长酶标仪(美国 Biotek 股份有限公司)、高速冷冻离心机 FRESCO 21(美国 Thermo 股份有限公司)、微孔板恒温孵育器 MT70-2(中国米欧)、-80℃超低温冰箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司)、压片机(天津蓝莫德科学仪器有限公司)、温控红外烤箱(天津蓝莫德科学仪器有限公司)、各规格移液器(德国 Eppendorf 股份有限公司);钙卫蛋白 ELISA 试剂盒 96Tests(武汉华美生物工程有限公司,批号:X20014971)。

1.4 实验方法

1.4.1 结石成分分析 收集重量约为 1~5 g 的结石标本,并进行洗涤、晾干、烘干、研磨、制片后,使用结石红外光谱自动分析系统 LIIR-20 对其进行结石成分分析。

1.4.2 测定结石组与对照组血清中 S100A8/A9 浓度 采集静脉血 3~5 mL,离心后收集上层血清,按照 S100A8/A9 试剂盒说明书通过双抗体夹心酶联免疫吸附试验测定血清 S100A8/A9 浓度,测定时每个浓度样品设置 2 个复孔,取其平均值作为样本浓度。

1.5 统计学方法 所得数据运用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料符合正态分布的用($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用 t 检验;多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。计数资料用%表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结石成分分析 根据结石成分分析结果,结石组共 50 例,其中一水草酸钙(calcium oxalate monohydrate, COM)13 例,COM+二水草酸钙(calcium oxalate dihydrate, COD)28 例,COM+COD+碳酸磷灰石(carbonate apatite, CA. AP)9 例。根据结石成分将 COM、COM+COD 分为纯 CaOx 组,COM+COD+CA. AP 分为含 CaOx 的混合结石组,其中纯 CaOx 组共 41 例,含 CaOx 的混合结石组共 9 例。3 种结石成分分析图谱见图 1~图 3。

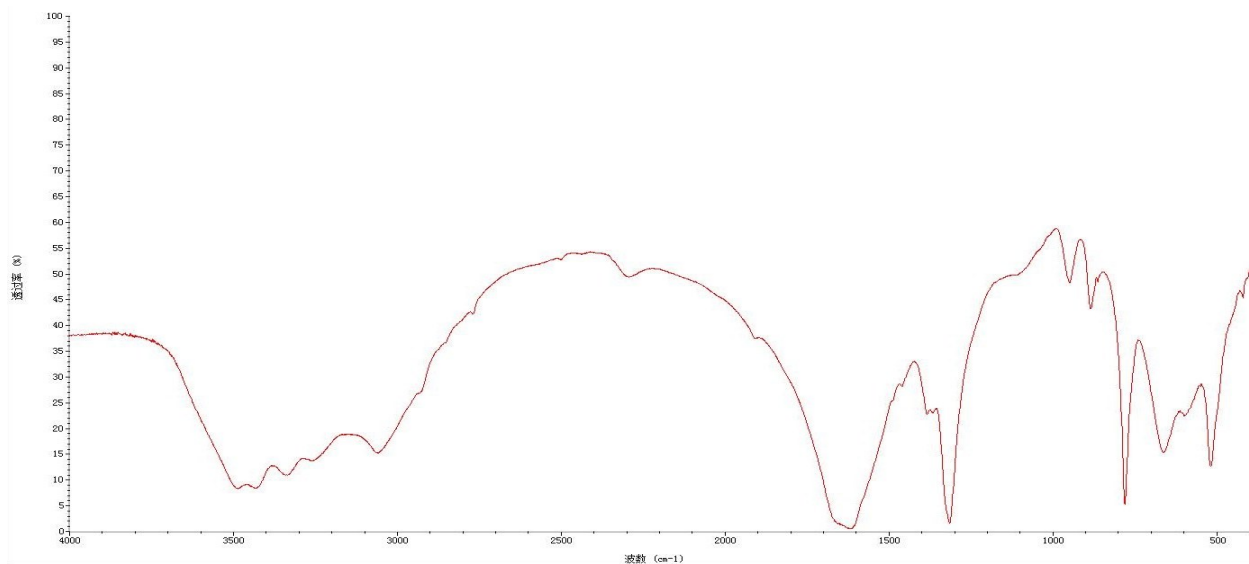


图 1 COM 结石红外光谱图

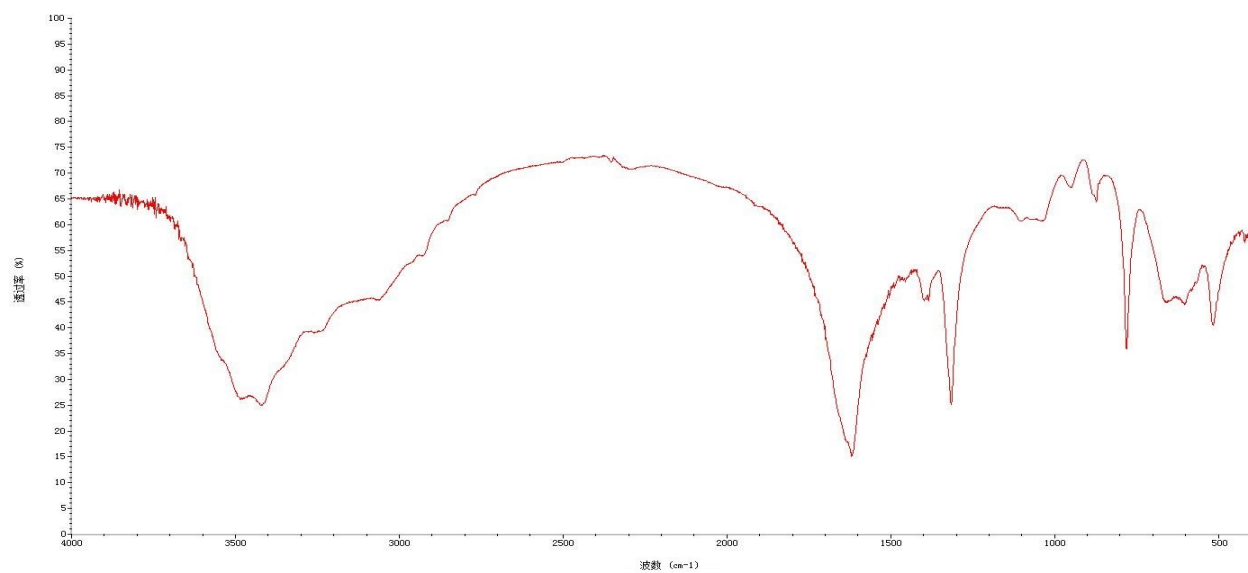


图 2 COM+COD 结石红外光谱图

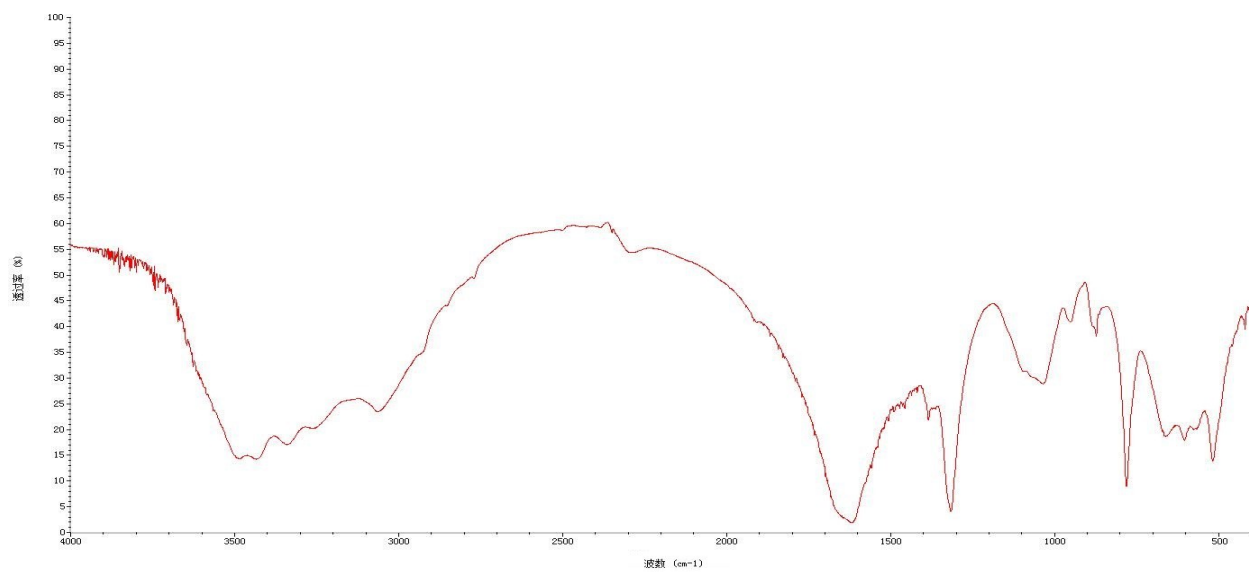


图 3 含 CaOx 的混合结石红外光谱图

2.2 血清 S100A8/A9 浓度的测定与比较 按照 ELISA 实验步骤进行操作,并使用波长设置在 450 nm 的全波长酶标仪检测出每个待测血清样品的 OD 值,按照标准品浓度与其对应 OD 值制作出标准曲线,并根据标准曲线计算样品中 S100A8/A9 浓度。结石组血清中 S100A8/A9 浓度显著高于对照组 ($P < 0.01$);结石组中男性与女性血清中 S100A8/A9 浓度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);对照组中男性血清中 S100A8/A9 浓度与女性血清中 S100A8/A9 浓度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);结石组男性血清中 S100A8/A9 浓度高于对照组男性血清中 S100A8/A9 浓度 ($P < 0.05$);结石组女性血清中 S100A8/A9 浓度高于对照组女性血清中 S100A8/A9 浓度 ($P < 0.05$);纯 CaOx 组血清中 S100A8/A9 浓度高于对照组 ($P < 0.05$);含 CaOx 的混合结石组血清中 S100A8/A9 浓度显著高于对照组 ($P < 0.05$);纯 CaOx 组血清中 S100A8/A9 浓度与含 CaOx 的混合结石组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1~表 3。

表 1 结石组与对照组血清 S100A8/A9 浓度比较

组别	<i>n</i>	血清 S100A8/A9 浓度/(ng·mL ⁻¹)	<i>t</i>	<i>P</i>
结石组	50	13.70±8.04	-3.287	0.002
对照组	50	9.98±2.98		

注:表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。

表 2 结石组内不同成分与对照组血清 S100A8/A9 浓度比较

组别	<i>n</i>	血清 S100A8/A9 浓度/(ng·mL ⁻¹)	<i>F</i>	<i>P</i>
纯 CaOx	41	13.36±7.83 ^a		
COM+COD+CA. AP	9	16.75±8.88 ^a		
对照组	50	9.98±2.98		
<i>F</i>			6.645	
<i>P</i>				0.002

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②与对照组比较,^a: $P < 0.05$ 。

表 3 两组中男性与女性血清 S100A8/A9 浓度比较

组别	男/女	单位:ng/mL		<i>t</i>	<i>P</i>
		男性	女性		
结石组	28/22	13.60±7.35	14.44±9.00	0.363	0.718
对照组	27/23	9.89±3.38	10.08±2.50	0.223	0.825
<i>t</i>		2.414	2.190		
<i>P</i>		0.021	0.038		

注:表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。

3 讨论

矿物质和有机化学成分是构成泌尿系结石的主要

部分,其中草酸钙占据近 80%,而结石基质蛋白是所有泌尿系结石的共有成分,虽然在结石中占比不多,但却不可或缺的一部分。就目前各学者从结石患者的尿液、结石标本中分离并获取的一些结石大分子抑制物,例如:骨桥蛋白、基质 Gla 蛋白、Tamm-Horsfall 蛋白等^[9-11]。也有不少关于结石促进物的研究,S100A8 蛋白作为 SMP 中的一种,这提示 S100A8 有可能在结石形成、生长的过程中起促进作用^[12]。BOONLA C 等^[13]从泌尿系结石患者的结石样品和尿液中鉴定出了各种蛋白质成分,并发现 S100A8 蛋白质在草酸钙结石患者的肾脏组织及尿液中均有表达,但在正常健康人的尿液中却未能检测到。而 S100A8 与 S100A9 通常以异源二聚体 S100A8/A9 蛋白复合物的形式存在^[3-4]。就目前各项研究表明尿液、肾脏组织中的 S100A8/A9 与草酸钙结石的形成有着密切的联系,但血清中 S100A8/A9 是否参与了草酸钙结石的形成过程还尚未明确。目前国内外研究中有关血清中 S100A8/A9 表达水平与草酸钙结石之间的关系研究还较少。本研究通过酶联免疫吸附测定上尿路草酸钙结石患者与健康体检者血清中 S100A8/A9 浓度水平,发现上尿路草酸钙结石组患者血清中 S100A8/A9 蛋白质浓度水平明显高于健康对照组,说明血清高 S100A8/A9 水平可能更易患有 CaOx 结石。另外,由于男性与女性的泌尿系统结构以及激素水平之间存在较大差异,男性体内高水平的雄激素导致血清及尿液中的草酸浓度升高,并加快草酸通过尿液排出的速度,草酸浓度的不断升高加快 CaOx 晶体的沉积速度,再综合多方面因素之间的相互作用从而导致男性与女性结石发病率不相同^[14]。

研究还发现纯 CaOx 组血清中 S100A8/A9 浓度高于健康人群对照组血清中 S100A8/A9 浓度;含 CaOx 的混合结石组血清中 S100A8/A9 浓度显著高于健康人群对照组血清中 S100A8/A9 浓度;而纯 CaOx 组血清中 S100A8/A9 浓度与含 CaOx 的混合结石组血清中 S100A8/A9 浓度,差异无统计学意义。根据 ZHANG H 等^[15]研究显示含 CaOx 的混合性结石形成的原因可能是由于 CA. AP 的异质成核作用,后逐渐发展成为病理性结石,但是两者的血清 S100A8/A9 水平无明显差异,故血清 S100A8/A9 浓度水平还不能用于区别纯 CaOx 结石与含 CaOx 的混合性结石,结石红外光谱分析仍然是鉴别结石成分较为准确的技术手段。

关于 S100A8/A9 蛋白质是通过何种作用机制参与泌尿系草酸钙结石的形成过程尚未能明确,推测 S100A8/A9 是通过以下几点来促进草酸钙结石的形成。首先,据研究发现,S100A8/A9 蛋白质之所以具

有在含钙组织中调节钙离子的生物学功能,是因为其含有对 Ca^{2+} 具有较强黏附、亲和作用的 C-末端结合位点的结合域,而这个结合位点的作用大大的增强了草酸钙晶体的表面吸附能力,促使草酸钙晶体的黏附^[16-17]。S100A8/A9 通过与草酸钙晶体结合,增加晶体间的粘附力,使其更为牢固的吸附在肾小管上皮细胞上,从而形成结石核心。另外,聚集和黏附在肾小管上皮细胞的草酸钙晶体会引起细胞损伤,改变细胞膜正常结构,从而产生更多的晶体可附着点。肾小管上皮细胞表面吸附的草酸钙晶体还会诱发炎症反应,而炎症反应恰恰为结石形成的重要机制,晶体的聚集与吸附以及炎症反应的发生将直接或间接地促使结石形成。构建体外草酸钙晶体结石模型的研究^[7]中也提示,草酸和草酸钙晶体均能引起肾小管上皮细胞产生炎症反应,使细胞损伤,并增加炎症细胞因子(如 IL-6、IL-10、TNF- α)的表达,而 S100A8/A9 在特定条件下可刺激炎症细胞释放炎症介质及炎症蛋白直接参与炎症疾病发生过程,同时促炎物质如肿瘤坏死因子、白细胞介素等也可使 S100A8/A9 在巨噬细胞、内皮细胞等炎性细胞中过表达。

总之,血清 S100A8/A9 在上尿路草酸钙结石患者与健康人群之间确实存在表达差异,由此认为血清 S100A8/A9 高表达提示患有草酸钙结石可能性大。综上,本研究推测 S100A8/A9 作为结石促进物,促进上尿路草酸结石形成,其可能是通过增加晶体的聚集与吸附以及改变炎性蛋白或炎性细胞因子的表达来促进草酸钙结石的形成,但具体调控机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] YANG Y J, DENG Y M, WANG Y X. Major geogenic factors controlling geographical clustering of urolithiasis in China[J]. *Sci Total Environ*, 2016, 571: 1164-1171.

[2] ZENG G H, MAI Z L, XIA S J, et al. Prevalence of kidney stones in China: an ultrasonography based cross-sectional study[J]. *BJU Int*, 2017, 120 (1): 109-116.

[3] BRESNICK A R, WEBER D J, ZIMMER D B. S100 proteins in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(2): 96-109.

[4] Wang Y Q, Dai X D, Ran Y, et al. Circulating S100A8/A9 levels reflect intraocular inflammation in uveitis patients [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2020, 28(1): 133-141.

[5] KHAN S R. Reactive oxygen species, inflammation and calcium oxalate nephrolithiasis[J]. *Transl Androl Urol*,

2014, 3(3): 256-276.

[6] TAN X X, ZHENG X H, HUANG Z, et al. Involvement of S100A8/A9-TLR4-NLRP3 inflammasome pathway in contrast-induced acute kidney injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(1): 209-222.

[7] LYLLOFF L, BATHUM L, MADSBAD S, et al. S100A8/A9 (Calprotectin), interleukin-6, and c-reactive protein in obesity and diabetes before and after roux-en-y gastric bypass surgery[J]. *Obes Facts*, 2017, 10(4): 386-395.

[8] 黄健. 中国泌尿外科与男科疾病诊断治疗指南[M]. 北京: 科学出版社, 2020.

[9] CHIEN Y C, MANSOURI A, JIANG W, et al. Modulation of calcium oxalate dihydrate growth by phosphorylated osteopontin peptides[J]. *J Struct Biol*, 2018, 204(2): 131-144.

[10] GARIMELLA P S, BARTZ T M, IX J H, et al. Urinary uromodulin and risk of urinary tract infections: the cardiovascular health study[J]. *Am J Kidney Dis*, 2017, 69(6): 744-751.

[11] LI Y, LU X L, YANG B Y, et al. Vitamin K1 inhibition of renal crystal formation through matrix gla protein in the kidney[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2019, 44(6): 1392-1403.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 叶章群, 邓耀良, 董诚. 泌尿系结石[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 127-129.

[15] ZHANG H, ZHANG J, ZHENG J C, et al. Compositional analysis of various layers of upper urinary tract stones by infrared spectroscopy[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4): 3165-3169.

[16] 王静, 张学梅, 李征, 等. 亲和纯化技术联合质谱鉴定与 S100A8 和 S100A9 相互作用的蛋白[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2017, 42(4): 365-373.

[17] TAN X X, ZHENG X H, HUANG Z N, et al. Involvement of S100A8/A9-TLR4-NLRP3 inflammasome pathway in contrast-induced acute kidney injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(1): 209-222.

收稿日期: 2022-03-06; 修回日期: 2022-03-26