

·专题·肾积水·

维生素 D 及其受体与肾盂输尿管连接部狭窄相关性的初步研究



全文二维码 开放科学码

邢晓宇 陈思平 钟 量 吴少峰 孙 杰

【摘要】 目的 初步分析维生素 D 及其受体与肾盂输尿管连接部狭窄(ureteropelvic junction obstruction, UPJO)发生的相关性。**方法** 选择2016年3月1日至2016年10月31日上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心小儿泌尿外科收治的因 UPJO 行离断式肾盂输尿管成形术的患儿为 UPJO 组($n=10$),因肾脏肿瘤行肾与输尿管切除术的患儿为对照组($n=8$)。收集两组术前血标本检测维生素 D 三项(25-羟维生素 D₂、25-羟维生素 D₃ 及总 25-羟维生素 D 的含量)。取两组术中标本采用 ELISA 法,检测维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)、转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)及钙黏蛋白 E 的含量。**结果** 两组术前血标本中 25-羟维生素 D₂、25-羟维生素 D₃ 及体内总 25-羟维生素 D 的含量均无统计学差异($P>0.05$)。UPJO 组 VDR、TGF- β 、钙黏蛋白 E 的平均值分别为(771.6 ± 70.57) ng/每克总蛋白, (131.0 ± 10.33) ng/每克总蛋白及 (125.5 ± 10.98) ng/每克总蛋白;对照组分别为(2128 ± 251.8) ng/每克总蛋白, (82.3 ± 6.834) ng/每克总蛋白及 (386.6 ± 78.71) ng/每克总蛋白。两组 UPJ 标本中 VDR、TGF- β 、钙黏蛋白 E 水平的差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** UPJO 组 VDR 表达量显著低于对照组,提示 VDR 可能与 UPJO 发生相关,初步推测其机制可能是肾盂输尿管连接部 VDR 表达量减少引起 TGF- β 表达量明显升高,使得肾盂输尿管连接部的组织纤维化加重,进而导致或加重 UPJO。

【关键词】 维生素 D; 肾盂输尿管连接处狭窄; 纤维化

【中图分类号】 R726.9 R692.7 R977.2⁺4

A preliminary study on the relationship between vitamin D and its receptor and ureteropelvic junction obstruction. Xing Xiaoyu, Chen Siping, Zhong Liang, WuShaofeng, Sun Jie. Department of Pediatric Urological Surgery, Affiliated Shanghai Children's Medical Center, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China. Corresponding author: Sun Jie, Email: sunjie@scmc.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the correlation between UPJO and vitamin D and its receptor. **Methods** 10 cases of children who underwent UPJO disconnection pyeloplasty were divided into UPJO group. 8 children who underwent renal and ureterectomy for renal tumors were enrolled in the control group. The preoperative contents of 25 hydroxyvitamin D₂, 25 hydroxyvitamin D₃ and total 25 hydroxyvitamin D were detected. VDR, TGF- β and cadherin E content were detected by ELISA staining. The results of the test were used t test for statistical analysis, compare the differences between two groups, and analyze the correlation between vitamin D and its receptor and UPJO. **Results** there was no significant difference between the two groups in the detection of vitamin D three items before operation. The mean values of VDR, TGF- β and cadherin E in UPJO group were 771.6 ± 70.57 ng/g, 131.0 ± 10.33 ng/g and 125.5 ± 10.98 ng/g respectively. The corresponding mean values in tumor control group were 2128 ± 251.8 , 82.3 ± 6.834 and 386.6 ± 78.71 ng/g respectively. The data of two groups were tested by t-test ($P<0.05$). The expression of VDR and cadherin E in UPJO group was significantly lower than that in control group. TGF- β was significantly higher than that of the control group. **Conclusion** The expression of VDR receptor in UPJO group was significantly lower than that in control group, sugges-

DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2020.03.004

基金项目:国家自然科学基金(编号:81871149),国家自然科学基金(编号:81601267)

作者单位:上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心小儿泌尿外科(上海市, 200127)

通信作者:孙杰, Email: sunjie@scmc.com.cn

ting that VDR may be related to UPJO. The initial mechanism may be the decrease in the expression of VDR at UPJ, causing a significant increase in the expression of TGF- β , which aggravates the tissue fibrosis at the UPJ, resulting in or aggravating UPJO.

【Key words】 Vitamin D; Ureteropelvic Junction Obstruction; Fibrosis

活性维生素 D 一直被认为是体内钙磷代谢的重要调节因子,近年研究发现,活性维生素 D 与特定的维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)结合后可以影响基因转录、调节靶蛋白合成、诱导细胞分化^[1]。研究表明,肾盂输尿管连接部狭窄(ureteropelvic junction obstruction, UPJO)的发生发展和肾盂输尿管连接部(ureteropelvic junction, UPJ)组织纤维化加重息息相关,而体内纤维化活动又与活性维生素 D 及受体密切相关,维生素 D 能抑制转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)的表达,也可延缓或阻止上皮细胞向成纤维细胞分化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)^[2-4]。本实验通过研究维生素 D 及其受体与 UPJO 的相关性,初步探讨 UPJO 发生发展机制,为 UPJO 的预防及诊治提供新的思路和途径。

材料与方法

一、一般资料

收集2016年3月1日至2016年10月31日上海儿童医学中心因UPJO行开放或腹腔镜下离断式肾盂输尿管成形术的10例患儿作为UPJO组,年龄2个月至10岁,其中男7例,女3例。患儿均为单侧肾积水,其中左肾积水9例,右肾积水1例。纳入标准:术前B超、CT、MRI、ECT等辅助检查中的一项或多项结果提示UPJO阳性,且术后病理明确肾盂输尿管连接部狭窄的肾积水患儿入UPJO组。排除标准:下尿路梗阻、异位血管压迫输尿管肾盂交界处、重复肾等原因引起肾积水的患儿(本组术中亦发现1例因肾下极动脉分支压迫致肾积水的患儿,将其剔除)。

收集同期因肾脏肿瘤行肾盂输尿管切除术的8例患儿作为对照组,年龄1~5岁,其中男5例,女3例,左肾肿瘤6例。纳入标准:术前影像学检查及术后病理明确为肾母细胞瘤I~II级患儿,如术中发现输尿管近端明显肿瘤浸润或梗阻则排除。

二、标本采集

在获得本单位伦理审批的基础上,入组的18例患儿术前均留取外周静脉血,血标本均在当天送

检。18例均于术中留取UPJ标本,UPJ标本离体后均在2h内留取本研究所需部分(标本留取时要求近端至部分肾盂组织,远端至UPJ远端约1cm)。UPJO组所取标本均完整(包括明显狭窄段)。标本收集后存放于-80℃冰箱,标本收集完成后采用酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法测定25-羟维生素D₂、25-羟维生素D₃、总25-羟维生素D、VDR、TGF- β 以及钙黏蛋白E含量。

三、检测方法

术前外周静脉血标本采用双抗夹心法检测维生素D三项(即25-羟维生素D₂、25-羟维生素D₃及总25-羟维生素D)的含量。具体步骤如下:于酶标板上包被维生素D单抗,将标本和标准品中的维生素D与单抗结合后,洗去游离成分,再加入酶标抗体形成免疫复合物。然后加入显色底物,若反应孔中有维生素D,则辣根过氧化物酶会使无色的显色剂显蓝色,加入终止液后混合液变黄。在450nm处测OD值,维生素D浓度与OD⁴⁵⁰值之间成正比,可通过绘制标准曲线求出标本中的维生素D浓度。

术中收集的18例UPJ标本,同样采用双抗夹心法,在450nm处检测VDR、TGF- β 及钙黏蛋白E的含量。所有项目由同一检测员完成,各检测项目均复查2遍以尽量减少误差。

四、统计学处理

采用SPSS22.0软件进行统计学分析,对于25-羟维生素D₂、25-羟维生素D₃、总25-羟维生素D、VDR、TGF- β 、钙黏蛋白E等计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

结果

UPJO组25-羟维生素D₂的平均值为(2.185 ± 1.221)ng/mL,25-羟维生素D₃的平均值为(28.364 ± 6.650)ng/mL,总25-羟维生素D的平均值为(30.549 ± 6.908)ng/mL;8例肿瘤对照组患儿25-羟维生素D₂平均值为(2.926 ± 1.863)ng/mL,25-羟维生素D₃的平均值为(33.745 ± 10.523)ng/mL,总25-羟维生素D的平均值为(36.675 ± 10.507)

ng/mL,上述指标差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 两组术前血标本中维生素D值(ng/mL)

Table 1 Preoperative value of vitamin D in two groups(ng/mL)

组别	例数	25-羟 维生素 D ₂	25-羟 维生素 D ₃	总 25-羟 维生素 D
UPJO 组	10	2.185 ± 1.221	28.364 ± 6.650	30.549 ± 6.908
对照组	8	2.926 ± 1.863	33.745 ± 10.523	36.675 ± 10.507
<i>t</i> 值		1.018	1.326	1.490
<i>P</i> 值		0.324	0.204	0.156

UPJO 组 VDR 平均值为(771.60 ± 70.57) ng/每克总蛋白;对照组 VDR 平均值为(2 128.00 ± 251.80) ng/每克总蛋白,两组间比较差异有统计学意义($t = 5.720, P < 0.001$)。UPJO 组 TGF-β 平均值为(131.00 ± 10.33) ng/每克总蛋白;对照组 VDR 平均值为(82.30 ± 6.83) ng/每克总蛋白;两组间比较差异有统计学意义($t = 3.714, P = 0.019$),UPJO 组钙黏蛋白 E 平均值为(125.50 ± 10.98) ng/每克总蛋白;对照组 VDR 平均值为(386.60 ± 78.71) ng/每克总蛋白;两组间比较差异有统计学意义($t = 3.684, P = 0.020$),见表2。

表2 两组 UPJ 标本中 VDR、TGF-β、钙粘蛋白 E 值(ng/每克总蛋白)

Table 2 Values of VDR, TGF-β and cadherin E (ng/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VDR	TGF-β	钙黏蛋白 E
UPJO 组	10	771.60 ± 70.57	131.00 ± 10.33	125.50 ± 10.98
对照组	8	2128.00 ± 251.80	82.30 ± 6.83	386.60 ± 78.71
<i>t</i> 值		5.720	3.714	3.684
<i>P</i> 值		<0.001	0.019	0.020

讨 论

UPJO 是婴幼儿期肾积水常见原因之一,是一种先天性的泌尿系统发育畸形^[5]。引起 UPJO 的原因包括 UPJ 狭窄、瓣膜、高位输尿管以及异位血管压迫等,其中 UPJ 狭窄大多起源于胚胎时期泌尿系统原基发育缺陷。不同原因引起的 UPJO 病理改变相似,均与肾盂输尿管连接段纤维化加重有关,多表现为纤维组织增生、肌层发育不良等^[2,6,7]。目前有研究发现先天性肾盂输尿管连接部梗阻段输尿管平滑肌出现病理性改变是导致 UPJO 的直接原因,但其具体机制尚不清楚。研究 UPJO 的发病机制将对 UPJO 的诊断、治疗及预后评估起重要作用。

本研究发现 UPJO 组和对照组外周血中维生素

含量无明显差异,UPJO 组的 VDR、钙黏蛋白 E 表达量显著低于对照组,而 TGF-β 则显著高于对照组。其中钙黏蛋白 E 是上皮细胞的标记物,代表了组织的上皮化程度。我们推测 VDR 参与纤维化机制表现为:组织中 VDR 含量下降,引起 TGF-β 表达上升,继而诱发细胞的 ETM 过程,最终导致组织纤维化加重,从而引起 UPJO 的发生、发展。

维生素 D 是人体所需的重要维生素之一,可通过皮肤紫外线照射或食物等外源性途径补充获得。维生素 D 经过肝脏和肾脏中羟化酶作用下,转变为有活性的维生素 D(即 1,25-羟维生素 D,亦称活性维生素 D)。活性维生素 D 与组织细胞内的 VDR 结合,发挥着重要的生物学效应^[8]。有报道维生素 D 在系统性硬化病的发生发展中起关键作用,该研究发现系统性硬化症患者中维生素 D₃ 含量下降,同时成纤维细胞中 VDR 的表达量下降,引起 TGF-β 表达量升高,从而导致硬化症的发生^[3]。TGF-β 是一类具有广泛生物学作用的细胞因子,参与调节组织内间质纤维化的过程^[9]。TGF-β 促进成纤维细胞转分化、促进成纤维细胞合成和分泌胶原蛋白等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、抑制 ECM 降解、抑制上皮细胞生长等。此外,TGF-β 还可通过 SMAD 途径诱导正常上皮细胞逐步丧失钙黏蛋白 E,提高肌成纤维细胞标志物 α-SMA 的水平,进而使肌成纤维细胞分泌大量 ECM,这些证据都被认为是 TGF-β 通路促进纤维化的机制。既往研究发现,在 UPJ 纤维化的过程中,TGF-β 起到了最重要的作用^[10]。有研究者在单侧输尿管梗阻大鼠模型中发现,活性维生素 D 及其受体可显著抑制患肾炎大鼠肾组织中 TGF-β 以及 I 型和 IV 型胶原的表达,从而达到治疗目的^[11]。Tian 等^[12]在糖尿病肾病模型大鼠中发现,外源性补充维生素 D 后可减少胶原沉积、减少纤维连接蛋白含量和胶原 mRNA 的表达,抑制 TGF-β 及其 I 型受体的表达,从而直接阻断 EMT 的过程,显著减轻肾间质纤维化,达到保护模型大鼠肾脏功能的目的。本研究发现,UPJO 组患儿 VDR 含量较对照组低,TGF-β 较对照组增高,推测其原因可能是 UPJO 组患儿 VDR 缺少对 TGF-β 的抑制作用,阻断 EMT 过程能力减弱,从而引起 UPJ 标本处的纤维化,但两者间相互关系仍需要进一步研究。

在人体内有两种形式的维生素 D,分别是维生素 D₃(胆钙化醇)和维生素 D₂(麦角钙化醇)。本研究发现 UPJO 组和对照组患儿 25-羟维生素 D₂、25-羟维生素 D₃ 及体内 25-羟维生素 D 的总含量无统

计学差异,这表明单纯通过维生素D的血清学定量分析结果无法得出维生素D与UPJO之间的关系。同时本实验发现,UPJO组患儿血清总25-羟维生素D水平为 (30.54 ± 6.91) ng/mL,对照组患儿总25-羟维生素D均值 (36.68 ± 10.50) ng/mL,两组患儿总25-羟维生素D水平普遍在正常值下限甚至处于维生素D不足的状态。

综上,尽管UPJO组血维生素D含量无差异,但病变段平滑肌VDR缺乏可能抑制TGF- β 的表达,使病变段组织纤维化加重,进而导致或加重UPJO。尽管本实验基本达到了预期的研究目的,但仍存在诸多的局限性。首先,标本来源于单中心,样本量较小;此外,本研究没有对肾盂输尿管连接部的直径以及病变段中TGF- β 水平进行分级。因此,还需要更多深入的研究来全面阐明纤维化程度是否与TGF- β 含量存在关联,从而为临床治疗和预防UPJO提供良好的理论参考依据。

参考文献

- 1 Bover J, Egido J, Fernández-Giráldez E, et al. Vitamin D, vitamin D receptor and the importance of its activation in patients with chronic kidney disease[J]. *Nefrologia*, 2015, 35(1): 28-41. DOI: 10.3265/Nefrologia. pre2014. Sep. 11796.
- 2 Ellerkamp V, Kurth RR, Schmid E, et al. Differences between intrinsic and extrinsic ureteropelvic junction obstruction related to crossing vessels: histology and functional analyses[J]. *World J Urol*, 2016, 34(4): 577-583. DOI: 10.1007/s00345-015-1645-x.
- 3 Zerr P, Vollath S, Palumbo-Zerr K, et al. Vitamin D receptor regulates TGF-beta signalling in systemic sclerosis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(3): e20. DOI: 10.1136/annrheumdis.2013-204378.
- 4 Lucisano S, Buemi M, Passantino A, et al. New insights on the role of vitamin D in the progression of renal damage[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2013, 37(6): 667-678. DOI: 10.1159/000355747.
- 5 孙劲松, 刘丹丹, 张刚, 等. 先天性肾盂输尿管连接部梗阻的临床病理学分析[J]. *临床小儿外科杂志*, 2018, 17(6): 429-432. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2018.06.007.
Sun JS, Liu DD, Zhang G, et al. Clinicopathological study of congenital ureteropelvic junction obstruction[J]. *J Clin Ped Sur*, 2018, 17(6): 429-432. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2018.06.007.
- 6 朱冬燕, 孙奕, 孙楠, 等. 活性维生素D3抑制UUO模型大鼠肾间质纤维化作用的实验研究[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2013, 14(3): 207-211. DOI: 10.3969/j.issn.1009-587X.2013.03.006.
Zhu DY, Sun Y, Sun N, et al. Study on effect of 1,25-(OH)2D3 on inhibiting the renal interstitial fibrosis in rats following unilateral ureteral obstruction[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology*, 2013, 14(3): 207-211. DOI: 10.3969/j.issn.1009-587X.2013.03.006.
- 7 张国锐, 林智峰, 杨晓萍, 等. 1,25-(OH)2D3对单侧输尿管梗阻模型大鼠Erbin表达的影响[J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(17): 2650-2651. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2016.17.010.
Zhang GR, Lin ZF, Yang XP, et al. Effect of 1,25-(OH)2D3 on Erbin expression in unilateral ureteral obstruction rat model[J]. *J Mod Med Health*, 2016, 32(17): 2650-2651. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2016.17.010.
- 8 Zittermann A, Ernst JB, Gummert JF, et al. Vitamin D supplementation, body weight and human serum 25-hydroxyvitamin D response: a systematic review[J]. *Eur J Nutr*, 2014, 53(2): 367-374. DOI: 10.1007/s00394-013-0634-3.
- 9 Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-beta: the master regulator of fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338. DOI: 10.1038/nrneph.2016.48.
- 10 Merrikhi A, Bahraminia E. Association of urinary transforming growth factor-beta1 with the ureteropelvic junction obstruction[J]. *Adv Biomed Res*, 2014, 33, 123. DOI: 10.4103/2277-9175.133196. eCollection 2014.
- 11 刘艳姝, 刘文思, 刘中柱, 等. 活性维生素D3抑制UUO模型大鼠肾间质纤维化作用的研究及其对TGF- β 1, α -SMA表达的影响[J]. *黑龙江医药科学*, 2013, 36(2): 72-73. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0104.2013.02.038.
Liu YS, Liu WS, Liu ZZ, et al. Suppression of active vitamin D3 on renal interstitial fibrosis in UUO model rats and its effect on expression of TGF-1 or α -SMA[J]. *Heilongjiang Medicine and Pharmacy*, 2013, 36(2): 72-73. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0104.2013.02.038.
- 12 Tian Y, Lv G, Yang Y, et al. Effects of vitamin D on renal fibrosis in diabetic nephropathy model rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6): 3028-3037.

(收稿日期: 2018-05-22)

本文引用格式: 邢晓宇, 陈思平, 钟量, 等. 维生素D及其受体与肾盂输尿管连接部狭窄相关性的初步研究[J]. *临床小儿外科杂志*, 2020, 19(3): 209-212. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2020.03.004.

Citing this article as: Xing XY, Chen SP, Zhong L, et al. A preliminary study on the relationship between vitamin D and its receptor and ureteropelvic junction obstruction[J]. *J Clin Ped Sur*, 2020, 19(3): 209-212. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2020.03.004.