

循环 microRNAs 在糖尿病肾脏疾病诊断中的潜在价值*

韩 霜¹, 臧素纲¹, 陈 鑫¹, 陈 曦¹综述; 周玉贵^{1△}, 汪晓莺²审校 (1. 南通大学附属东台医院检验科, 江苏盐城 224200; 2. 南通大学医学院免疫学教研室, 江苏南通 226001)

【关键词】 循环 microRNAs; 糖尿病肾脏疾病; 生物学标志物

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 10. 058 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)10-1464-02

糖尿病肾脏疾病(DKD)为糖尿病常见的慢性微血管并发症之一,早期以肾小球系膜区增宽、细胞外基质集聚,微量蛋白尿为临床特点,是糖尿病患者的重要死亡原因。目前肾活检是肾脏疾病诊断金标准,但存在风险。非侵入性的诊断指标,以尿微量蛋白定量检测为主,但其对 DKD 的诊断仍有一定局限性。众多研究已证实,microRNAs 不仅参与细胞生长、发育、分化、增殖、代谢、凋亡等一系列生理活动的调控,而且在 DKD 等多种疾病的病理过程中发挥着重要作用。近来,有研究发现 microRNAs 不仅存在于细胞内,也稳定地存在于血清、血浆、尿液、组织液等各类体液中,统称为循环 microRNAs^[1]。本文就循环 microRNAs 在 DKD 诊断中的潜在价值作一综述。

1 循环 microRNAs 概述

2008 年, Mitchell 等^[2]、Chen 等^[3]、Gilad 等^[4]学者几乎同时报道了人血清、血浆中可检出 microRNAs。随后,人的尿液、唾液、羊水、胸水、脑脊液及乳汁等其他体液中相继被检测到一定数量的 microRNAs^[5-6]。研究提示,循环 microRNAs 是以外泌体(exosome)或微囊泡(microvesicles)的形式包裹在磷脂双分子膜内,通过细胞主动分泌释放到血液中^[7-8]。而组织损伤过程中释放出来的循环 microRNAs^[9],可能来自于坏死细胞的裂解和主动释放等。与 mRNA 不同的是,循环 microRNAs 可以耐受环境中 RNase 的降解、极端 pH、温度、反复冻融、甲醛 浸泡等条件的影响^[2-3,9-10]。

目前循环 microRNAs 检测方法主要有基因芯片技术、Northern blot、高通量测序技术和实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)。最常用的方法是 qRT-PCR,此法特异性和灵敏度高,并且操作相对简单。qRT-PCR 主要是基于茎-环的 RT-PCR 方法(stem-loop RT-PCR)和基于 poly(A)加尾的 RT-PCR 方法。这两种方法均可以采用 Taqman 探针或者 SYBR 荧光染料,前者特异性更高,但成本高,后者通用性好,适合推广应用。近来,Lusi 等^[11]发现用电化学基因传感器能够更加简便、快速地检测循环 microRNAs,灵敏度可达 0.1 pmol/L。microRNAs 检测方法的发展进一步为循环 microRNAs 成为生物标志物提供了可能。

2 microRNAs 与 DKD

2.1 miR-192 Kato 等^[12]发现链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠模型肾小球中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)和 miR-192 表达水平均增高,体外实验以 TGF- β 刺激系膜细胞亦可出现

miR-192 水平增高。进一步研究发现,TGF- β 能抑制 Smad 作用蛋白-1(SIP1)和 E-box 抑制因子(δ EF1)的表达,使得 I 型胶原(Col I)合成增加。而 SIP1 基因的 3'UTR 是 miR-192 的作用靶点,miR-192 可抑制 SIP1 的表达,敲除 SIP1 基因能阻断 TGF- $\beta 1$ 介导的钙黏蛋白(cadherin)下调。以上研究证实,TGF- β 可通过 miR-192 下调 SIP1 和 δ EF1,从而增加 I 型胶原 $\alpha 2$ 链(Coll $\alpha 2$)的表达,介导肾脏纤维化的发生。Krupa 等^[13]研究表明,肾小管上皮细胞中 miR-192 的降低或缺失能够促进肾脏纤维化的发展。通过对不同分期 DKD 患者肾活检组织 microRNAs 的检测,发现晚期 DKD 肾小管上皮细胞中 miR-192 显著降低,miR-192 的低表达与肾小管间质纤维化和肾小球滤过率相关。体外实验也证实,经 TGF- β 处理过的肾小管上皮细胞中 miR-192 呈低表达水平。因此,肾小管上皮细胞中 miR-192 的缺乏和丢失是导致肾纤维化一个重要的因素。近来,李洁等^[14]应用 qRT-PCR 法,发现 DKD 患者血清 miR-192 表达降低。生物信息分析法预测靶基因分析发现,TGF- β 信号通路下游基因抗锌指 E 盒结合蛋白 1(ZEB-1)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)和 Col I 可被 miR-192 调节。体外实验证实,不同浓度 TGF- β 刺激均导致系膜细胞及培养上清 miR-192 水平显著下降。

2.2 miR-21 Zhang 等^[15]的研究首次提供证据表明,miR-21 与早期 DKD 的潜在作用。体内和体外实验均显示在早期 miR-21 是下调的。在糖尿病 db/db 小鼠模型中,miR-21 的过度表达抑制了系膜细胞的增殖、降低了 24 h 尿蛋白排泄率。此研究还证实,人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN 10)为 miR-21 的靶基因,在 miR-21 处理过的肾小球系膜细胞和糖尿病 db/db 小鼠体内,磷酸酰肌醇 3-激酶(PI3K)和磷酸化蛋白激酶(p-AKT)的水平是增加的。研究表明 miR-21 通过特异性靶向调控 PTEN/PI3K 信号传导途径,以抑制肾小球系膜增生,提示 miR-21 可能是一个新的 DKD 保护因子,可成为早期 DKD 中一个新的防治靶标。Dey 等^[16]发现在 OVE26 1 型糖尿病小鼠的肾皮质中 miR-21 显著上升,PTEN 编码的肿瘤抑制蛋白减少,纤维连接蛋白(Fn)水平增加。过表达的 miR-21 还可增加 AKT 磷酸化。相反,miR-21 海绵体的表达则抑制上述过程的发生。此外,miR-21 还抑制 PRAS40(Proline-rich-Akt Substrate,40 kDa)活性使得 TOR 复合体 1(TORC1)活性增强,导致肾细胞肥大和 Fn 增多。曾健

* 基金项目:江苏省盐城市医学科技发展计划项目(YK20130103)。

△ 通讯作者,E-mail:yugui_z@163.com。

英等^[17]应用 qRT-PCR 方法检测 2 型 DKD 患者血浆 miR-21, 并作 ROC 曲线分析, 发现 2 型 DKD 患者血浆中 miR-21 较对照组显著增高, ROC 曲线下面积达 0.822, 提示检测血浆中 miR-21 的水平将为 DKD 的早期肾小管功能受损的诊断和临床肾功能受损情况的评估提供更敏感、可靠的指标, 有利于 DKD 的早期诊断和早期干预治疗。

2.3 miR-377 Wang 等^[18]研究表明, 在自发性和 STZ 诱导糖尿病肾病小鼠模型的肾皮质组织以及高糖刺激的人系膜细胞和原代小鼠系膜细胞中, miR-377 表达明显升高。实验证实, 系膜细胞 miR-377 的过度表达可抑制与 DKD 相关基因表达进而增加 Fn 的合成。发生 DKD 时, 过表达的 miR-377 通过抑制 p21 依赖性激酶 (PAK1) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的表达, 间接促使 Fn 产生, 导致细胞外基质蛋白过度积累, 进而引起 DKD 的发生、发展。

2.4 其他相关 microRNAs Kato 等^[19]证实高糖环境下培养人近端肾小管上皮细胞系 (HK-2) mi-29a 表达下调。Long 等^[20]在 db/db 小鼠活体肾小球及体外高浓度葡萄糖处理的肾脏微血管内皮细胞和足细胞中, 发现 miR-29c 可介导细胞外基质蛋白的积累。国内杨阳等^[21]人通过实时定量 PCR 技术发现, DKD 患者血清中 miR-93 下调, 可能通过调控其下游靶基因在 DKD 发生过程中起重要作用。Argyropoulos 等^[22]应用 qRT-PCR 法检测 40 例病程大于 20 年的 I 型 DKD 患者尿液中的 microRNAs, 发现 27 种 (miR-524, miR-429, miR-552, miR-433 等) 尿液 microRNAs 在 I 型 DKD 的不同阶段表达量不同。

3 小 结

目前, DKD 诊断主要是基于循环中一些蛋白质表达水平的改变, 但蛋白质组成的复杂性、转录后修饰引起的变异、标本的稳定性等在一定程度上限制了其诊断价值。循环 miRNAs 的发现, 弥补了蛋白质标志物的不足, 特异性强、稳定性好且样本易获取, 但其在 DKD 中的临床应用仍面临一定的挑战。首先, 目前初步研究表明有多种 miRNAs 在 DKD 的发生和发展中发挥重要调节作用, 然而循环 microRNAs 在 DKD 中的作用机制尚未完全阐明, 它们与其他基因表达调控因子组成的复杂调节网络及相互作用机制有待进一步研究, 仅采用一种或几种 microRNAs 作为诊断指标可能特异性不够。其次, DKD 相关 microRNAs 部分研究结果、结论不一致的原因尚不十分清楚, 但糖尿病的类型及发展阶段, 动物模型, 细胞类型, 标本类型, 小样本量, 实验方法, 实验条件等均有可能是重要因素。

现阶段 microRNAs 在 DKD 中的研究以动物模型和体外实验为主, 相信随着 microRNAs 在 DKD 中的作用机制及临床意义的进一步阐明, 循环 microRNAs 必将成为 DKD 诊断及预后判断的重要新型无创性生物学标志物, 也将为 DKD 的靶向治疗提供新的途径。

参考文献

[1] Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: association with disease and potential use as biomarkers[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2011, 80(2): 193-208.

[2] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513-10518.

[3] Chen X, Ba Y, Ma LJ, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006.

[4] Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum MicroRNAs are promising novel biomarkers[J]. PLOS One, 2008, 3(9): e3148.

[5] Cogswell J P, Ward J, Taylor IA, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways [J]. J Alzheimer's Dis, 2008, 14(1): 27.

[6] Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, et al. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation [J]. Int J Legal Med, 2010, 124(3): 217-226.

[7] Hunter MP, Ismail N, Zhang XL, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles [J]. PLOS One, 2008, 3(11): e3694.

[8] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease[J]. Cir Cardiovasc Genet, 2010, 3(6): 499-506.

[9] Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) [J]. Methods (San Diego, Calif.), 2010, 50(4): 298-301.

[10] Ciesla AM, Skrzypek K, Kozakowska MA, et al. MicroRNAs as biomarkers of disease onset [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 401(7): 2051-2061.

[11] Lusi EA, Passamano M, Guarascio P, et al. Innovative electrochemical approach for an early detection of microRNAs[J]. Anal Chem, 2009, 81(7): 2819-2822.

[12] Kato M, Zhang J, Wang M, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(9): 3432-3437.

[13] Krupa A, Jenkins R, Luo DD, et al. Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(3): 438-447.

[14] 李洁, 周平, 胡秀梅, 等. 糖尿病肾病患者血清 miR-192 的表达及其对转化生长因子 β 信号通路的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 28(5): 388-391.

[15] Zhang Z, Peng HM, Chen JX, et al. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice[J]. FEBS(下转第 1468 页)

dies at 11-13 weeks' gestation[J]. Fetal Diagn Ther, 2012,31(4):221-229.

[12] Tsuchiya M, Kikuchi A, Takakuwa K, et al. Increased pulsatility of the ductus venosus blood velocity in the first trimester is associated with the delivery of small for gestational age or low birth weight infants[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2010,36(6):1151-1160.

[13] Orlandi E, Rossi C, Perino A, et al. Simplified first-trimester fetal cardiac screening (four chamber view and ventricular outflow tracts) in a low-risk population[J]. Prenat Diagn, 2014,34(6):558-563.

[14] Moon-grady AJ, Ganesan S. The role of fetal echocardiography in the assessment of fetal aneuploidy[J]. Clin Obstet Gynecol, 2014,57(1):189-209.

[15] 李胜利. 胎儿先天性心脏病的筛查和诊断[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010(12):920-922.

[16] 王银. 11-13+6 周胎儿严重心脏畸形产前超声诊断研究[D]. 广州:南方医科大学, 2012.

[17] 王玲红, 吴钟瑜. 彩色多普勒超声对胎儿先天性心脏病的筛查现状[J]. 继续医学教育, 2014(4):65-68.

[18] Bulletin AP. Ultrasonography in pregnancy[J]. Obstet Gynecol, 2004,104(6):1449-1458.

[19] 王雷. 产前筛查诊断胎儿心脏畸形的现状[J]. 中国医学影像学杂志, 2014,22(5):398-400.

[20] 李胜利, 文华轩. 胎儿超声断层解剖模式图设计与应用: 胎儿四腔心切面异常表现[J/CD]. 中华医学超声杂志: 电子版, 2010,7(5):789-802.

[21] 郭宁. 彩色多普勒超声心动图诊断胎儿先天性心脏病的研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2012.

[22] 李胜利, 文华轩. 胎儿超声断层解剖模式图设计与应用: 胎儿三血管切面及三血管气管切面异常表现[J]. 中华医学超声杂志: 电子版, 2010,7(6):948-966.

[23] 时春艳, 赵瑞琳. 胎儿先天性心脏病的筛查与诊断[J]. 中华围产医学杂志, 2006,9(2):76-79.

[24] Volpe P, de Robertis V, Campobasso G, et al. Diagnosis of congenital heart disease by early and second-trimester fetal echocardiography[J]. J Ultrasound Med, 2012,31(4):563-568.

[25] 徐亚丽, 夏红梅, 谭开彬, 等. 超声节段分析法对复杂性先天性心脏病的诊断价值[J]. 临床超声医学杂志, 2013,15(9):653-655.

[26] Salomon LJ, Alfievis Z, Bilardo CM, et al. ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2013,41(1):102-113.

(收稿日期:2014-12-18 修回日期:2015-02-16)

(上接第 1465 页)

Letters, 2009,583(12):2009-2014.

[16] Dey N, Das F, Mariappan MM, et al. MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes[J]. J Biol Chem, 2011,286(29):25586-25603.

[17] 曾健英, 何凤, 童俊容, 等. 三种血清微小 RNA 的检测在糖尿病肾病诊断中的价值评估[J]. 新医学, 2012,43(8):531-533.

[18] Wang Q, Wang Y, Minto AW, et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic Nephropathy[J]. FASEB J, 2008,22(1):4126-4135.

[19] Kato M, Natarajan R. microRNA cascade in diabetic kidney disease: Big impact initiated by a small RNA[J]. Cell Cycle, 2009,8(22):3613-3614.

[20] Long JY, Wang Y, Wang WJ, et al. MicroRNA-29c is a signature MicroRNA under high glucose conditions that targets sprouty homolog 1, and its in vivo knockdown prevents progression of diabetic nephropathy[J]. J Biol Chem, 2011,286(13):11837-11848.

[21] 杨阳, 张运津, 谢安, 等. 糖尿病肾病患者血清 miRNA-93 的表达变化及意义[J]. 实验与检验医学, 2012,30(3):222-224.

[22] Argyropoulos C, Wang K, McClarty S, et al. Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes[J]. PLOS One, 2013,8(1):54662.

(收稿日期:2014-12-16 修回日期:2015-02-18)

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序, 可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键, 包括医学专业设计和统计学设计, 医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查, 要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析, 包括进行统计描述和统计推断。