

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.18.008

糖尿病肾病患者尿液 miR-192 的表达及临床意义

陈月英¹, 罗晓星², 谢咏梅¹, 李金一¹, 刘 敏¹

(中国人民解放军第四五八医院:1. 内分泌科;2. 干部病房, 广州 510062)

摘要:目的 探讨 miR-192 在糖尿病肾病(DN)患者尿液中的表达及其临床意义。方法 选择 140 例 2 型糖尿病患者(T2DM)作为研究对象,按照 24 h 尿清蛋白定量(24 h-UAE)将其分为正常蛋白尿组($n=55$)、微量蛋白尿组($n=48$)、大量蛋白尿组($n=37$)。另选择 30 例健康体检者作为对照组。采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测尿液 miR-192 的表达水平。分析其与患者各临床指标的相关性。结果 正常蛋白尿组、微量蛋白尿组、大量蛋白尿组患者尿液 miR-192 表达相对值分别为(0.63 ± 0.12 , 0.97 ± 0.20 和 1.12 ± 0.18),明显高于对照组(0.47 ± 0.08);且表现为随 DN 的发展而逐渐增加的趋势($P < 0.05$)。相关性分析结果显示尿液 miR-192 水平与血肌酐、尿素氮、24 h 尿蛋白和胱抑素 C 呈正相关($P < 0.05$);而与糖尿病病程、空腹血糖和糖化血红蛋白无明显相关性($P > 0.05$)。线性回归分析结果显示尿液 miR-192 水平与 DN 有相关性($OR = 1.037, 1.094, P < 0.05$),是 T2DM 患者发生 DN 的独立预测因子。结论 miR-192 水平在 DN 患者尿液中表达显著升高,其水平反映 DN 患者肾功能损伤,并与肾功能损伤的程度相关。

关键词:糖尿病; 糖尿病肾病; miR-192; 尿液

中图法分类号:R541.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)18-2711-04

Expression and clinical significance of miR-192 in the urine of patients with diabetic nephropathyCHEN Yueying¹, LUO Xiaoxing², XIE Yongmei¹, LI Jinyi¹, LIU Min¹

(1. Department of Endocrinology; 2. Cadre Ward of the 458th Hospital of PLA, Guangzhou, Guangdong 510062, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-192 in the urine of patients with diabetic nephropathy, and study its clinical significance. **Methods** A total of 140 patients with type 2 diabetes mellitus who were treated at PLA 458th Hospital, were recruited in this study. All these patients were divided into 3 groups according to 24 h urinary albumin. The normoalbuminuria group (urinary albumin < 30 mg/24 h, $n = 55$), microalbuminuria group ($30 \leq$ urinary albumin < 300 mg/24 h, $n = 48$), and microalbuminuria group (urinary albumin ≥ 300 mg/24 h, $n = 37$), and 30 healthy volunteers were selected as control group. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the level of miR-192 in urine. The relationship between urine miR-192 and clinical index in patients with DN was analyzed. **Results** The relative values of urinary miR-192 expression in normoalbuminuria group, microalbuminuria group and microalbuminuria group were (0.63 ± 0.12 , 0.97 ± 0.20 and 1.12 ± 0.18), which were higher than control group (0.47 ± 0.08) ($P < 0.05$). And it showed the trend of increasing gradually with the development of DN. Correlation analysis showed that the expression of urinary miR-192 had a positive correlation with serum creatinine, blood urea nitrogen, 24 h urinary albumin and cystatin c ($P < 0.05$). While there was no correlation with the pathogenesis of diabetes, fasting blood glucose and glycosylated hemoglobin ($P > 0.05$). Linear regression analysis showed that urine miR-192 levels were correlated with DN, which was an independent predictor of DN in patients with T2DM. **Conclusion** The expression of miR-192 in urine of patients with DN increased significantly, which reflected the impairment of renal function and the extent of renal injury in patients with DN.

Key words: diabetes; diabetic nephropathy; miR-192; urine

糖尿病肾病(DN)是 2 型糖尿病(T2DM)严重的微血管并发症之一。随着近年来全球范围 T2DM 的发病率呈逐年上升趋势, DN 已成为导致终末期肾脏病(ESRD)的首要病因^[1]。DN 发病机制复杂, 目前尚

未完全阐明;且目前针对 DN 的早期检测手段还存在不足。因此,能够早期发现、预测 DN,对于及时治疗或延缓 DN 的进展,改善 DN 患者预后具有非常重要的意义。已有的研究证实,尿液中蕴藏丰富的与肾脏

疾病相关的生物学信息,因此长期以来尿液检测为临床肾脏疾病诊断和疗效监控的重要手段^[2]。微小 RNA(miRNA) 是一类内源性的、非编码的单链小分子 RNA。研究证实,miRNA 在血清、尿液、唾液,以及其他体液中稳定表达。通过调控多个上游基因表达和下游蛋白翻译,在人体多种生理病理过程起着非常重要的作用^[3]。有研究表明,miR-192 能调控系膜细胞的增殖、凋亡,促进肾纤维化,与 DN 的发生、发展有关^[4]。本研究旨在通过检测 T2DM 患者尿液 miR-192 水平,研究其与 T2DM 患者发生 DN 的相关性,探讨尿液 miR-192 对 DN 早期诊断和疗效判断的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 6 月至 2016 年 12 月在本院内分泌科接受治疗的 140 例 T2DM 患者作为研究对象,年龄 57~67 岁,平均(52.7±6.4)岁;其中男 86 例,女 54 例。所有纳入研究患者均符合 1999 年 WHO 制订的 T2DM 诊断标准。排除标准:1 型糖尿病、各种急慢性感染性疾病、恶性肿瘤、心脑血管意外,DM 以外其他肾脏疾病。根据 DM 防治专家共识(2014 年版)^[5],按照 24 h 尿清蛋白定量(24 h-UAE)将 140 例 T2DM 患者分为 3 组:正常蛋白尿组(24 h-UAE<30 mg) 55 例,微量蛋白尿组(24 h-UAE<300 mg) 48 例,大量蛋白尿组(24 h-UAE≥300 mg) 37 例。另选择 30 例健康体检者作为对照组。本研究经过医院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司;miRNA SYBR Green PCR Kit,miScript Reverse Transcription Kit,miR-192 引物和 U6 引物序购于天根生化科技(北京)有限公司;Nanodrop® ND-1000 微量紫外分光光度计购自美国 NanoDrop 公司;Prism® 7300 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司;-80 °C 低温冰箱购自日本三洋公司。

1.3 方法

1.3.1 尿液标本收集 每个研究对象收集新鲜晨尿 20 mL,4 °C 环境下,于离心机上 2 000 r/min 离心 20 min,取上清液置于-80 °C 冰箱保存待用。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(RT-PCR) (1)总 RNA 提取:采用 Trizol 试剂对尿液总 RNA 进行提取。每份尿液标本加入 1.5 mL 的 Trizol 进行裂解。经过 RNA 分相、沉淀、洗涤、溶解后。使用 Nanodrop 测定 RNA 在分光光度计 260、280 和 230 nm 的吸收值,对提取的 RNA 浓度和纯度进行评估。用甲醛电泳试剂进行变性琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 纯度及完整性。(2)逆转录(RT)反应:按照 miScript Reverse Transcription Kit[天根生化科技(北京)有限公司]操作步

骤构建 10 μL 反应体系:RNA 3 μL,1×mirVana RT Primer 1 μL,Array script Enzyme Mix 0.4 μL,mirVana RT Buffer(5×) 2 μL,加 RNase-free water 至总体积 10 μL。反应条件:37 °C 反应 60 min;85 °C 灭活 5 min。(3)RT-PCR 反应:按照 miRNA SYBR Green PCR Kit[天根生化科技(北京)有限公司]操作步骤进行 RT-PCR 反应。构建 20 μL 反应体系:5×Golden HS SYBR Green qPCR Mix 4 μL,PCR Forward Primer (20×) 1 μL,PCR Reverse Primer (20×) 1 μL,1×cDNA 模板 1~2.5 μL,50×ROX Reference Dye 0.4 μL,加入 ddH₂O 至总体积 20 μL。反应条件:95 °C 5 min;循环条件(95 °C,10 s;60 °C,20 s;72 °C,10 s) 40 个 PCR 循环。以 U6 snRNA 作为内参,实验重复 3 次。数据采用 2^{-ΔΔCT} 相对定量法进行分析。

1.3.3 生化指标检测 C 肽、24 h-UAE 检测采用放射免疫分析法(RIA 法),血糖、血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、胱抑素 C 用全自动生化分析仪测定。肾小球滤过率(eGFR) = 186 × [SCr(mg/dL)]^{-1.54} × [年龄(岁)]^{-0.203} × (0.742 × 女性)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料用以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。采用 Spearman 相关分析 miR-192 与 DN 的之间相关性,尿液 miR-192 水平对 DN 的预测价值采用回归分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组间临床资料比较 对照组和 T2DM 3 组间年龄、性别构成差异无统计学意义($P > 0.05$);正常蛋白尿组、微量蛋白尿组、大量蛋白尿组 3 组间糖尿病病程、SCr、胱抑素 C、eGFR 比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);而空腹血糖、糖化血红蛋白在 T2DM 3 组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);大量蛋白尿组 24 h-UAE、BUN 要高于微量蛋白尿组($P < 0.05$),而在正常蛋白尿组和微量蛋白尿组之间,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 各组尿液 miR-192 的表达水平比较 通过 RT-PCR 检测各组患者尿液中 miR-192 表达的 CT 值。以 U6 为内参基因,经 2^{-ΔΔCT} 法计算,结果显示:正常蛋白尿组、微量蛋白尿组、大量蛋白尿组患者尿液 miR-192 表达明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。正常蛋白尿组、微量蛋白尿组、大量蛋白尿组间尿液 miR-192 表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1、表 2。

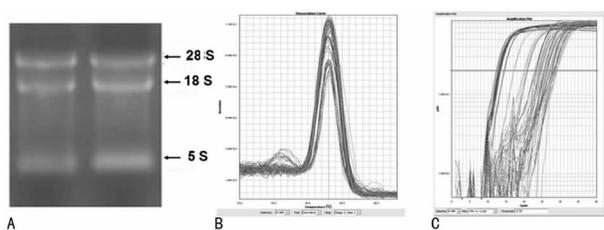
2.3 尿液 miR-192 水平与 DN 临床指标间的相关性分析 相关性分析结果显示,DN 患者尿液 miR-192 水平与 SCr、BUN、24 h 尿蛋白和胱抑素 C 呈正相关($P < 0.05$)。而与糖尿病病程、空腹血糖和糖化血红

蛋白无相关性($P>0.05$),见表 3。

表 1 各组临床资料比较

项目	对照组($n=30$)	正常蛋白尿组($n=55$)	微量蛋白尿组($n=48$)	大量蛋白尿组($n=37$)
性别(男/女, n/n)	17/13	34/21	29/19	23/14
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	51.82 \pm 7.26	52.44 \pm 8.40	53.37 \pm 7.15	52.91 \pm 7.42
糖尿病病程($\bar{x}\pm s$,年)	—	5.47 \pm 2.82	6.25 \pm 2.08▲	7.46 \pm 2.45*
空腹血糖($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	4.84 \pm 0.92	9.59 \pm 2.87	10.80 \pm 3.18	10.27 \pm 3.52
糖化血红蛋白($\bar{x}\pm s$,%)	5.07 \pm 0.73	8.45 \pm 2.37	8.94 \pm 2.85	8.57 \pm 2.63
SCr($\bar{x}\pm s$, μ mol/L)	64.55 \pm 10.92	77.54 \pm 12.40	84.72 \pm 13.55▲	205.86 \pm 49.73*
BUN($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	4.27 \pm 1.14	5.58 \pm 1.43	5.85 \pm 1.52	10.77 \pm 2.73*
尿蛋白($\bar{x}\pm s$,g/24 h)	—	—	0.22 \pm 0.07	1.72 \pm 0.43*
胱抑素 C($\bar{x}\pm s$,mg/L)	—	0.97 \pm 0.21	1.24 \pm 0.36▲	2.57 \pm 0.67*
eGFR($\bar{x}\pm s$,mL \cdot min ⁻¹ \cdot 1.72 m ⁻²)	104.25 \pm 19.57	98.45 \pm 23.06	82.53 \pm 28.49▲	44.28 \pm 25.18*

注:与微量蛋白尿组相比,* $P<0.05$;与正常蛋白尿组相比,▲ $P<0.05$;—表示无数据



注:A为尿液总RNA;B为溶解曲线;C为扩增曲线

图 1 miR-192PCR 反应图

表 2 各组尿液 miR-192 表达相对值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	miR-192 表达相对值
对照组	30	0.47 \pm 0.08
正常蛋白尿组	55	0.63 \pm 0.12*
微量蛋白尿组	48	0.97 \pm 0.20*▲
大量蛋白尿组	37	1.12 \pm 0.18*▲#

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与正常蛋白尿组比较,▲ $P<0.05$;与微量蛋白尿组比较,# $P<0.05$

表 3 尿液 miR-192 水平与 DN 患者临床指标的相关性分析结果

指标	尿液 miR-192 水平	
	r	P
糖尿病病程	0.039	>0.05
空腹血糖	0.076	>0.05
糖化血红蛋白	0.082	>0.05
SCr	0.318	<0.05
BUN	0.294	<0.05
尿蛋白	0.287	<0.05
胱抑素 C	0.280	<0.05
eGFR	0.337	<0.05

2.4 尿液 miR-192 水平对 DN 的预测价值 以 24 h-UAE 和 eGFR 反应肾损伤标准的数值为因变量,尿液 miR-192 水平值作为自变量进行线性回归分析。

结果显示尿液 miR-192 水平与 DN 有相关性,是 T2DM 患者发生 DN 的独立预测因子($P<0.05$),见表 4。

表 4 尿液 miR-192 与 24 h-UAE 和 eGFR 的回归分析

项目	B	P	OR	95%CI	P
24 h-UAE	0.351	0.014	1.037	1.095~1.752	0.014
eGFR	0.408	0.012	1.094	1.103~1.816	0.012

3 讨论

在人体细胞中,miRNA 能通过碱基互补配对的形式与靶基因的 3' UTR 部分或完全互补,剪切靶基因的转录产物或者直接抑制转录产物的翻译,最终在转录后水平调控靶基因的表达。miRNA 的发现揭示了一种新的基因表达调控方式,即不同 miRNA 和靶基因之间能够形成复杂的调控网络,发挥精细调控功能基因表达的作用^[6]。目前针对 miRNA 的生物功能学研究证实,miRNA 参与包括细胞发育、生长、增殖、分化、凋亡、免疫、肿瘤发生等一系列生理病理过程,并且在肾脏生理功能调控和肾脏相关疾病如 DM 发生、发展中发挥重要调控作用^[7]。由于 miRN 具有生物遗传和种属表达保守性的特点,在生物发育的不同阶段和不同组织中均表达不同种类 miRNA 分子。尤为值得关注的是,在各种疾病病变细胞、组织,以及患者本身各种体液中均能够发现与所患疾病相关的 miRNAs 异常表达^[8]。目前研究显示在肾脏疾病患者尿液中均存在稳定和特定表达的 miRNA,对肾病的诊断和预后评估均显示出潜在的临床价值,有望成为肾病理理想的无创检测生物标志物^[9]。

miR-192 是在肾脏组织中,尤其在系膜细胞中特异性表达的 miRNA。有研究表明 miR-192 与缺血再灌注肾损伤、肾脏纤维化与 DN 过程密切相关。KA-

TO等^[10]发现 miR-192 在 DN 大鼠肾小球内呈过量表达,进一步研究发现 miR-192 通过下调 E-box 阻抑蛋白来控制肿瘤坏死因子(TGF)- β 1 诱导的 Col1 α 2 表达,进而参与 DN 的细胞外基质蛋白蓄积进程。PUTTA等^[11]研究发现,通过 LNA-anti-miR-192 抑制 DN 小鼠 miR-192 的表达能促进 Zeb1/2 表达,抑制胶原、TGF- β 、纤维连接蛋白的表达。而且 LNA-anti-miR-192 能够明显降低糖尿病小鼠蛋白尿水平。CHIEN等^[12]研究发现,伴有明显蛋白尿的 DN 患者血清 miR-192 要高于正常蛋白尿 DN 患者。且这种高表达与 DN 疾病的进程有关。本研究采用 RT-PCR 检测不同病程 DN 患者尿液 miR-192 的表达水平。结果显示 DN 患者尿液 miR-192 表达显著高于健康人。且随着 DN 患者尿液中蛋白水平的增加,其尿液 miR-192 表达也明显增加(即大量蛋白尿组>微量蛋白尿组>正常蛋白尿组)。以上研究同国内外多个相关研究结论是一致的,即 DN 患者尿液 miR-192 表达在一定程度上反映 DN 的病理进展。然而,也有与上述研究相反的结论。如 KRUPA等^[4]报道在 DN 患者肾小管上皮细胞中 miR-192 表达明显下降,且这种低表达与低肾小球滤过率和肾小管间质纤维化相关。造成 DN 相关 miR-192 研究结果不一致的原因目前尚不清楚,尚待进一步研究论证。本实验中相关分析结果显示 DN 患者尿液 miR-192 水平与 SCr、BUN、24 h 尿蛋白和胱抑素 C 呈正相关。而 SCr、BUN、24 h 尿蛋白和胱抑素 C 均是目前公认的反映肾小球滤过率变化的指标。此外,本研究应用线性回归分析建立了基于 DN 临床指标间的综合诊断预测模型,结果进一步提示尿液 miR-192 水平与 DN 具有相关性,是 T2DM 患者发生 DN 的独立预测因子。即 T2DM 患者尿液 miR-192 水平值越高,发生 DN 的可能性也越大。

目前临床上常用的反映 DN 患者肾功能损伤的指标尚存在不足。如 SCr、内生肌酐清除率、BUN 和 24 h 尿蛋白对于诊断 DN,尤其是早期 DN 的特异性有局限性,且受较多肾外因素影响^[13]。而 miR-192 以往和本研究中表现出现的肾脏组织特异性,与目前常用的 DN 尿液生物学标记物存在密切的相关性,以及 DN 的独立预测能力。表明尿液 miR-192 有潜力成为 DN 的早期检测诊断标志物,有望为 DN 提供更敏感和可靠的指标。尤为值得关注的是,有研究通过特异性抑制肾脏细胞中 miR-192 的表达能够缓解肾脏纤维化,改善蛋白尿水平。这也为未来靶向治疗 DN 提供了新的思路和手段。

参考文献

[1] PASKO N, TOTI F, STRAKOSHA A, et al. Prevalence

of microalbuminuria and risk factor analysis in type 2 diabetes patients in Albania: the need for accurate and early diagnosis of diabetic nephropathy[J]. Hippokratia, 2013, 17(4):337-341.

[2] ROYO F, DIWAN I, TACKETT M R, et al. Comparative miRNA analysis of urine extracellular vesicles isolated through five different methods[J]. Cancers (Basel), 2016, 8(12):112.

[3] BHAYANI M K, CALIN G A, LAI S Y. Functional relevance of miRNA sequences in human disease[J]. Mutat Res, 2012, 731(1/2):14-19.

[4] KRUPA A, JENKINS R, LUO D D, et al. Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(3):438-447.

[5] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组. 糖尿病肾病防治专家共识(2014年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(11):792-801.

[6] KEHL T, BACKES C, KERN F, et al. About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways[J]. Oncotarget, 2017, 8(63):107167-107175.

[7] BHATT K, KATO M, NATARAJAN R. Mini-review: emerging roles of microRNAs in the pathophysiology of renal diseases[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 310(2):F109-F118.

[8] SRINIVASAN S, SELVAN S T, ARCHUNAN G, et al. MicroRNAs -the next generation therapeutic targets in human diseases[J]. Theranostics, 2013, 3(12):930-942.

[9] SILVA S S, LOPES C, TEIXEIRA A L, et al. Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? [J]. Forensic Sci Int Genet, 2015(14):1-10.

[10] KATO M, DANG V, WANG M, et al. TGF-beta induces acetylation of chromatin and of Ets-1 to alleviate repression of miR-192 in diabetic nephropathy[J]. Sci Signal, 2013, 6(278):a43.

[11] PUTTA S, LANTING L, SUN G, et al. Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(3):458-469.

[12] CHIEN H Y, CHEN C Y, CHIU Y H, et al. Differential microRNA profiles predict diabetic nephropathy progression in Taiwan[J]. Int J Med Sci, 2016, 13(6):457-465.

[13] SUZUKI Y, MATSUSHITA K, SEIMIYA M, et al. Serum cystatin C as a marker for early detection of chronic kidney disease and grade 2 nephropathy in Japanese patients with type 2 diabetes[J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(10):1833-1839.

(收稿日期:2018-01-20 修回日期:2018-04-06)