

## 参考文献

- [1] 雷永兰. 脓毒血症患者 CRP、PCT 及 PLT 水平检测及其预后诊断分析[J]. 医学理论与实践, 2017, 30(24): 3709-3710.
- [2] 李银平, 贾强, 付文静, 等. 降钙素原和白细胞介素-6 动态变化对老年脓毒性休克患者预后的评估价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(12): 1192-1194.
- [3] 中华医学会急诊医学分会危重病专家委员会. 脓毒症的定义、诊断标准、中医症候诊断要点及说明(草案) [J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(8): 797-798.
- [4] 许宏霞. 血降钙素原、C 反应蛋白对脓毒血症患者预后的临床意义[J]. 医学理论与实践, 2016, 29(4): 517-518.
- [5] 万绪波, 李超群, 郑微, 等. 脓毒血症患者体内乳酸清除及

正常化对延缓器官衰竭的作用[J]. 广东医学, 2017, 38(16): 2517-2518.

- [6] 陈凯. 严重烧伤脓毒症患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、PLA2 的变化及器官功能损害状况分析[J]. 重庆医学, 2014, 43(8): 937-940.
- [7] CABRAL L, AFREIXO V, SANTOS F, et al. Procalcitonin for the early diagnosis of sepsis in burn patients: A retrospective study[J]. Burns, 2017, 43(7): 1427-1434.
- [8] PALMIERE C, BARDY D, MANGIN P, et al. Value of sTREM-1, procalcitonin and CRP as laboratory parameters for postmortem diagnosis of sepsis [J]. J Infect, 2013, 67(6): 545-555.

(收稿日期: 2019-01-05 修回日期: 2019-04-10)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 15. 030

# 慢性肾脏疾病患者尿沉渣中 CCN2 和 CCN3 mRNA 检测水平及其在监测肾脏损伤中的意义

薄 蔚

新疆维吾尔自治区阿勒泰市地区人民医院检验科, 新疆阿勒泰 836599

**摘 要:**目的 探讨慢性肾脏疾病(CKD)患者尿沉渣中 CCN2 和 CCN3 mRNA 检测水平及其在监测肾脏损伤中的意义。方法 选取 2016 年 12 月至 2018 年 11 月该院收治的 CKD 患者 66 例(CKD 组), 选取同期来该院健康门诊行健康检查的健康者 45 例(健康组)。比较 CKD 组与健康组尿沉渣中的 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 水平, CKD 组不同蛋白尿分级的 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 水平, CKD 组不同病理分级与 CCN2 mRNA、CCN3 mRNA 水平之间的相关性。结果 CKD 组尿沉渣中 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 水平明显高于健康组( $P < 0.05$ ); 轻度组与中重度组尿沉渣 CCN2 mRNA、CCN3 mRNA 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); CKD 患者尿沉渣中的 CCN2 mRNA 水平与系膜细胞外的基质增生之间没有相关性( $P > 0.05$ ), 而尿沉渣中的 CCN3 mRNA 水平与系膜细胞外的基质增生之间表现为负相关( $r = -0.609, P < 0.05$ )。除此之外, 尿沉渣中 CCN2 mRNA 与 CCN3 mRNA 之间的比值与系膜细胞外的基质增生之间表现为正相关( $r = 0.672, P < 0.05$ )。结论 CKD 患者尿沉渣中的 CCN3 mRNA 水平及 CCN2 mRNA 与 CCN3 mRNA 的比值与肾小球硬化之间存在相关性, 提示可将检测 CCN2 mRNA、CCN3 mRNA 水平作为评估非创伤性 CKD 患者肾脏病变情况的参考指标。

**关键词:**慢性肾脏疾病; 尿沉渣; CCN2 mRNA; CCN3 mRNA; 蛋白尿

**中图法分类号:**R446.12

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-9455(2019)15-2207-03

慢性肾脏疾病(CKD)患者的病情进展主要表现为患者的肾功能进行性下降及肾单位受损<sup>[1]</sup>。通常来说, 肾功能水平降低主要发生在 CKD 患者的肾脏开始出实现质性的损伤之后<sup>[2]</sup>。目前临床中确认 CKD 患者肾脏损伤及病理变化的有效检测方式就是进行肾活检, 但是其属于有创检查, 存在一定并发症风险, 具有一定的应用局限性<sup>[3]</sup>。近年来, 尿沉渣中的基因 mRNA 水平已逐渐成为临床监测不同的肾脏疾病发展情况的一项有效参考指标<sup>[4]</sup>。最新相关研究指出, 基因 mRNA 水平检测也能够作为临床评估肾小管间质瘢痕硬化及肾小球足细胞损伤情况的参考指标<sup>[5]</sup>。本次选取 66 例 CKD 患者及 45 例健康者, 观察比较两组研究对象尿沉渣中的 CCN2 mRNA、CCN3 mRNA 水平, 并探讨其与 CKD 患者病理

损伤之间的相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2016 年 12 月至 2018 年 11 月本院收治的 CKD 患者 66 例(CKD 组)。将 66 例 CKD 组患者依据不同蛋白尿水平分为两组: 蛋白尿水平  $\leq 1$  g/24 h 的 34 例 CKD 患者为轻度组; 蛋白尿水平  $> 1$  g/24 h 的 32 例 CKD 患者为中重度组。纳入标准: (1)符合临床中对 CKD 的诊断标准<sup>[6]</sup>; (2)未合并糖尿病的 CKD 患者; (3)年龄 25~55 岁; (4)患者及其家属均知情, 同时签署知情同意书。排除标准: (1)合并糖尿病者; (2)合并全身性感染者; (3)合并精神障碍者; (4)合并恶性肿瘤的患者; (5)合并血液系统障碍的患者。CKD 组中男 38 例、女 28 例, 年龄 35~55 岁、平均(49.8 $\pm$ 1.6)岁。选取同期来本院健

康门诊行健康检查的健康者 45 例(健康组)。健康组中男 29 例、女 16 例,年龄 35~55 岁、平均(46.9±1.7)岁。CKD 组和健康组研究对象的性别、年龄差异

无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1。本研究通过医院伦理委员会批准,所有研究对象均知情同意。

表 1 CKD 组与健康组研究对象的一般资料比较

| 项目                  | <i>n</i> | 平均年龄<br>( $\bar{x}\pm s$ ,岁) | 平均体质量<br>( $\bar{x}\pm s$ ,kg) | 性别[ <i>n</i> (%)] |          | eGFR<br>[ $\bar{x}\pm s$ ,mL·min <sup>-1</sup> ·(1.73 m) <sup>-2</sup> ] | 蛋白尿<br>( $\bar{x}\pm s$ ,g/24 h) |
|---------------------|----------|------------------------------|--------------------------------|-------------------|----------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
|                     |          |                              |                                | 男                 | 女        |                                                                          |                                  |
| 健康组                 | 45       | 41.7±5.2                     | 57.4±7.9                       | 26(57.8)          | 19(42.2) | 91.5±14.7                                                                | 0.05±0.02                        |
| CKD 组               | 66       | 42.1±6.3                     | 56.2±10.1                      | 38(57.6)          | 28(42.4) | 98.4±24.8                                                                | 2.30±0.50                        |
| <i>t</i> 或 $\chi^2$ |          | 1.954                        | 1.627                          | 1.406             | 1.027    | 1.203                                                                    | 15.945                           |
| <i>P</i>            |          | >0.05                        | >0.05                          | >0.05             | >0.05    | >0.05                                                                    | <0.05                            |

1.2 方法

1.2.1 采集尿液标本、提取 RNA 所有 CKD 患者入院后,在接受治疗的前 1 d 取晨尿标本;健康组在体检时取晨尿标本。常规冷藏离心(参数:3 500 r/min,30 min)收集离心后的沉渣,用 PBS 重新悬浮,再次冷藏离心(参数:3 000 r/min,5 min)。将部分沉淀的尿沉渣行病理细胞学检查,剩余部分的尿沉渣溶入 1 mL 的 RNAiso Plus (Total RNA 提取试剂)中,冷冻待检。RNA 的提取依照试剂中的说明书操作。用 RNA 电泳检测 RNA 的完整性;用 NanoDrop-2000C 检测 RNA 纯度及浓度;确保 RNA 标本的吸光度比值>1.8<sup>[7]</sup>。

1.2.2 反转录、实时荧光定量 PCR 依据试剂中的说明书进行严格操作,在进行反转录的过程当中,添加相同数量的 PrimeScript™ RT 酶及模板 RNA,然后将标本置于恒温试验箱中,37℃、15 min,85℃、5 s 分别进行反转录,再加入核糖核酸酶来减少标本中的 RNA 残留<sup>[8]</sup>。CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 的相对定量,用 ABIPrism7000 型序列检测系统进行检测;将人 GAPDH 当作持家基因,依据操作指南,实时荧光定量 PCR 中添加 SYBRGRYN master。每份标本分成 3 份,最少检测 2 次。PCR 反应包括两步:第一步,95℃、30 s;第二步,95℃、5 s,60℃、31 s(循环 40 次)<sup>[9]</sup>。记录解链温度 Tm 及解离曲线 DC,使用 Sequence Detection Softwareversion 1.4 进行分析并得出结果。

1.3 观察指标 观察比较 CKD 组与健康组尿沉渣中的 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 水平;观察 CKD 组不同蛋白尿分级的 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 水平。观察 CKD 组不同病理分级与 CCN2 mRNA、CCN3 mRNA 水平之间的相关性。

1.4 统计学处理 数据使用 SPSS20.0 进行分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验;以  $P<0.05$  为差异有统计学意义;相关性使用 Spearman 秩相关进行分析。

2 结 果

2.1 CKD 组与健康组尿沉渣中的 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 水平 CKD 组患者尿沉渣中的 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 水平明显高于健康组( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 CKD 组与健康组尿沉渣中的 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 水平( $\bar{x}\pm s$ )

| 项目       | <i>n</i> | CCN2 mRNA | CCN3 mRNA  |
|----------|----------|-----------|------------|
| 健康组      | 45       | 0.94±0.03 | 8.46±1.52  |
| CKD 组    | 66       | 2.12±0.14 | 46.19±8.91 |
| <i>t</i> |          | 15.269    | 14.027     |
| <i>P</i> |          | <0.05     | <0.05      |

2.2 CKD 组不同蛋白尿分级的 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 表达水平 研究结果提示,轻度组与中重度组患者尿沉渣 CCN2 mRNA、CCN3 mRNA 水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 3。

表 3 CKD 组不同蛋白尿分级的 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 表达水平( $\bar{x}\pm s$ )

| 项目       | <i>n</i> | CCN2 mRNA | CCN3 mRNA  |
|----------|----------|-----------|------------|
| 轻度组      | 34       | 2.37±0.41 | 45.51±3.29 |
| 中重度组     | 32       | 2.09±0.28 | 47.97±4.62 |
| <i>t</i> |          | 1.814     | 1.907      |
| <i>P</i> |          | >0.05     | >0.05      |

2.3 CKD 组不同病理分级与 CCN2 mRNA、CCN3 mRNA 水平之间的相关性 所有 CKD 患者当中共有 32 例进行了肾活检检查,其中,IgA 肾炎 13 例,局灶性节段性肾小球硬化 10 例,狼疮性肾炎 5 例,特发性膜性肾病 4 例。对进行肾活检患者的肾小球系膜细外基质增生情况与 CCN2 mRNA、CCN3 mRNA 水平之间的相关性分析得知,CKD 患者尿沉渣中的 CCN2 mRNA 水平与系膜细胞外的基质增生之间无相关性( $P>0.05$ ),而尿沉渣中 CCN3 mRNA 水平与系膜细胞外的基质增生之间表现为负相关( $r=$

-0.609,  $P < 0.05$ )。除此之外,尿沉渣中的 CCN2 mRNA 与 CCN3 mRNA 之间的比值与系膜细胞外的基质增生之间表现为正相关( $r = 0.672, P < 0.05$ )。

### 3 讨论

研究指出,CCN2 mRNA 在肾病病变的过程中呈现高水平表达,且在患者的体液中,如尿液及血液中可以检测到<sup>[10]</sup>。本次研究结果提示,CKD 组患者尿沉渣中的 CCN2 mRNA 水平明显高于健康组( $P < 0.05$ )。研究结果充分提示,CCN2 在 CKD 患者肾脏纤维化的形成及发病过程中具有重要作用。近期相关研究提出,糖尿病患者及肾小球肾炎患者受损的肾小球中 CCN3 表达显著升高<sup>[11]</sup>。这与本研究结果一致,CKD 组患者尿沉渣中 CCN3 mRNA 水平明显高于健康组( $P < 0.05$ )。

本次研究结果提示,不同蛋白尿分级 CKD 患者的尿沉渣 CCN2 mRNA 及 CCN3 mRNA 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),提示 CKD 患者尿沉渣的 CCN2 mRNA、CCN3 mRNA 水平不会随着 CKD 患者蛋白尿的严重程度变化。这与先前的有关研究的结论并不一致,先前的相关动物研究及人体肾脏相关研究提出,肾组织和(或)患者尿沉渣当中的 CCN2 蛋白表达水平与患者肾脏的纤维化情况之间具有相关性<sup>[12]</sup>。所以,本次研究提示:(1)某种特定分子当中尿 mRNA 的表达水平,与其尿液当中的蛋白表达水平之间并不存在着相关性。尿 mRNA 的来源主要包括两方面,一是尿沉渣当中的外染色体结构,二是脱落的细胞;而人体尿液中的蛋白水平表达程度,主要取决于机体肾小球小管重吸收及肾小球过滤之间的共同结果<sup>[13]</sup>。(2)目前临床检测尿 mRNA 的技术当中,标准化主要是持家基因,可以排除其他相关影响因素的干扰作用。而机体中蛋白尿水平是总体评价水平,很难将清蛋白尿与蛋白尿区分进行检测,这与国外相关研究结果基本一致<sup>[14]</sup>。研究指出,尿转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) mRNA 与患者肾小管的间质纤维化变化程度关系十分密切<sup>[14]</sup>。

本次研究还发现,接受肾活检检查的 CKD 患者中,尿沉渣中 CCN3 mRNA 与系膜细胞外的基质增生之间表现为负相关( $r = -0.609, P < 0.05$ ),如果用 CCN2 与 CCN3 mRNA 之间的比值来代替 CCN3 mRNA,则二者之间的相关性更加密切。与既往相关研究相结合可得知,CCN2 能够当作肾小球损伤的一项启动因子,但 CCN3 不具有充分的拮抗能力,二者间比例失衡,导致患者发生肾小球硬化<sup>[15]</sup>。

综上所述,CKD 患者尿沉渣中的 CCN3 mRNA 水平及 CCN2 mRNA 与 CCN3 mRNA 的比值与肾小球硬化之间存在相关性,提示可将检测 CCN2 mRNA、CCN3 mRNA 水平作为评估非创伤性 CKD 患者肾脏病变情况的参考指标。

### 参考文献

- [1] 林泽西,傅西安,钱苏荣,等. CCN3 在胶质瘤细胞中的表达及对肿瘤侵袭作用影响的初步研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2017,16(1):6-10.
- [2] 李派,秦瑞玲,刘剑波,等. 特发性肺纤维化患者血清 CC16 和  $\gamma$  干扰素水平的变化及意义[J]. 广东医学,2016,37(4):562-563.
- [3] 王堃,刘炼华,吴琼,等. 临床常见检测指标在糖尿病慢性肾脏疾病中的应用价值分析[J]. 中国糖尿病杂志,2016,24(7):601-605.
- [4] VASSALOTTI J A, CENTOR R, TURNER B J, et al. Practical approach to detection and management of chronic kidney disease for the primary care clinician[J]. Am J Med, 2016, 129(2):153-162.
- [5] 刘翔哈,李国生,李欣宇,等. 应用动态血糖监测系统评估糖尿病合并不同阶段的慢性肾脏疾病患者糖化血红蛋白及糖化白蛋白准确性的研究[J]. 中国糖尿病杂志,2016,24(2):118-122.
- [6] 姚永杰,朱炳印,郑玉荣,等. DWI、BOLD、DTI 技术原理及在糖尿病肾脏疾病诊断中的研究进展[J]. 中国医学影像技术,2016,32(5):803-806.
- [7] 张明超,张明超,刘帅妹,等. 应用改良的方法检测常染色体显性遗传多囊肾基因突变[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2016,25(4):347-351.
- [8] 张琳,唐平易,周俊,等. 糖尿病肾脏疾病患者血清 miR-16-5p 水平变化及其意义[J]. 山东医药,2017,57(31):55-58.
- [9] 黄远洁,孟春梅,莫肖敏,等. 肾穿刺活检电镜检查组织标本肾小球定位技术的应用与体会[J]. 临床与实验病理学杂志,2016,32(6):708-709.
- [10] 李彬先,王伟,李钰,等. 尿流式细胞检测技术对肾出血性疾病诊断价值的研究[J]. 中国地方病防治杂志,2016,28(10):1144-1146.
- [11] 梁丹丹,曾彩虹. Gitelman 综合征肾脏损害[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2016,25(3):291-295.
- [12] 陈子芳,劳海黎,李秀华,等. 全自动医用 PCR 分析系统在肺外结核诊断及利福平耐药检测中的应用价值[J]. 中华结核和呼吸杂志,2016,39(7):529-533.
- [13] 李丽娜,赵洪雯,申兵冰,等. 他克莫司与吗替麦考酚酯治疗紫癜性肾炎的回顾性对照研究[J]. 第三军医大学学报,2016,38(10):1173-1177.
- [14] SINGH S, GRABNER A, YANUCIL C, et al. Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease[J]. Kidney Int, 2016, 90(5):985-996.
- [15] 李翠,周敏林,梁丹丹,等. 血清抗中性粒细胞胞质抗体阳性狼疮性肾炎患者的临床病理特征及预后[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2017,26(1):31-36.