

不同预处理方法对提取尿液脱落细胞 mRNA 质量的影响*

王洁敏, 向 芃, 顾乐怡 (上海交通大学医学院附属仁济医院肾脏科, 上海 200127)

摘要:目的 探索合适的处理尿标本的方法获得尿脱落细胞 mRNA。方法 比较尿液容量、尿液标本冻存时间、处理方式对提取尿液脱落细胞 RNA 的产量与质量的影响, 并进行 qPCR 的试验。结果 40 ml 尿液标本组及 10 ml 尿液标本组 RNA 总量均值分别为 886.94 ± 222.93 ng 及 211.22 ± 62.01 ng, 两组 A_{260nm}/A_{280nm} 比值分别为 1.80 ± 0.10 和 1.77 ± 0.09 ; 尿液标本量与 RNA 总量相关 ($t=3.604, P=0.002$), 不同尿液标本量 RNA 质量差异无统计学意义 ($t=0.708, P$ 值 >0.05)。实时离心提取及冰冻保存尿液 7 天后提取两种预处理方法 RNA 总量分别为 886.94 ± 945.84 ng 及 881.50 ± 829.02 ng, A_{260nm}/A_{280nm} 比值分别为 1.80 ± 0.10 及 1.80 ± 0.87 ; RNA 总量与 A_{260nm}/A_{280nm} 比值差异无统计学意义 ($t=-0.221 \sim 0.085, P$ 值均 >0.05)。直接冰冻尿液标本与 TRIzol 保存沉渣细胞两种预处理方法 RNA 总量分别为 637.81 ± 525.24 ng 及 639.86 ± 535.42 ng, A_{260nm}/A_{280nm} 比值分别为 1.84 ± 0.13 及 1.83 ± 0.96 ; RNA 总量与 A_{260nm}/A_{280nm} 比值差异无统计学意义 ($t=-0.47 \sim 0.293, P$ 值均 >0.05)。尿脱落细胞 mRNA 中可以检测到足细胞的标记蛋白 WT-1, podocin 和 synaptopodin 的基因表达。结论 尿液标本量是提取脱落细胞 RNA 量的关键因素, -80°C 低温冻存尿标本 7 天或 Trizol 预处理冻存均对提取尿液沉渣细胞 RNA 数量和质量无影响。

关键词:慢性肾脏病; 尿液脱落细胞; mRNA; 足细胞

中图分类号: R446.12 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)04-125-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.035

Effects of Different Pretreatment Methods on mRNA Quality and Quantity of Exfoliated Urinary Cells

WANG Jie-min, XIANG Peng, GU Le-yi (Renal Division,

Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

Abstract: **Objective** To explore a proper method to obtain exfoliated cells mRNA for detection in urine specimen. **Methods** Urine volume, different pretreating ways and frozen storage time on urinary sample were used to collect mRNA. A_{260nm}/A_{280nm} and A_{260nm}/A_{280nm} ratio, as well as qPCR were performed. **Results** Amount of mRNA was determined by urine volume, but neither A_{260nm}/A_{280nm} or A_{260nm}/A_{280nm} ratio was related with urine volume. Compared with real-time extraction process, freezing urine samples for 7 days showed no statistical difference ($P>0.05$) in total RNA and A_{260nm}/A_{280nm} or A_{260nm}/A_{280nm} ratio. There was no significant difference in total RNA and A_{260nm}/A_{280nm} or A_{260nm}/A_{280nm} ratio between direct freezing urine samples and Trizol-treated urine exfoliated cells. Podocyte marker including WT-1, podocin and synaptopodin mRNAs were detected in urine sediment cells. **Conclusion** Quantity of mRNA was determined by urine volume. Directly freezing urine samples at -80°C for 7 days or Trizol-treating urine sediment cells have no effect on lowering quality and quantity of urinary sediment mRNA.

Keywords: chronic kidney diseases; exfoliated urinary cells; mRNA; podocytes

肾脏损伤是临床常见的疾病, 大量生物学物质可以反映肾脏局部的损伤, 在各种肾脏疾病中, 肾脏固有细胞受损后脱落进入尿液, 这些脱落的肾脏固有细胞正是受损伤最严重的细胞, 其对损伤的应答可能可以更好地反映肾脏内部组织细胞的损害特点和程度^[1]。2001 年美国康奈尔大学的研究小组率先尝试在肾移植患者尿液中成功提取 mRNA, 并用于移植肾排斥的鉴别诊断获得成功^[2]。此后陆续有多项研究观察了尿脱落细胞提取 mRNA 后, 使用 RT-PCR 技术可以观察急性肾损伤, 糖尿病肾病的分期^[3~6], 也已经有一些学者运用该

技术观察治疗反应的监测。但由于 mRNA 极容易被降解, 目前尿液中脱落细胞 mRNA 均为实时处理。本研究旨在研究对不同容量尿液、不同尿液标本预处理方法对尿脱落细胞 RNA 产量与质量的影响, 探索适用于临床应用的尿液标本预处理方法。

1 材料与方法

1.1 实验样本 选取 2014 年 11 月~12 月期间于仁济医院经肾穿病理活检确诊为慢性肾脏病的患者 39 例, 男性 25 例, 女性 14 例, 年龄 18~70 岁。以 50 ml 及 10 ml 无菌离心管作容器, 留取患

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (NO. 81270781)。

作者简介: 王洁敏 (1989—), 女, 在读研究生, 研究方向: 慢性肾脏病。

通讯作者: 顾乐怡 (1973—), 男, 肾脏内科医师, E-mail: guleyi@aliyun.com。

者晨起第一次中段尿液。收集 40 ml 尿液两管,部分患者同时留取 10 ml 尿液一管。每位患者尿标本留取分装 1 ml 尿液至 1.5 ml EP 管用于尿液细胞数、尿蛋白及清蛋白测定。

1.2 试剂和仪器 美国 Ambion 公司 TRIzol 试剂,美国 Thermo Fisher Scientific 公司 Nanodrop 分光光度计;细胞计数板目测尿蛋白试纸、考马斯亮蓝试剂、美国 Bio-rad 公司普通 PCR 仪。

1.3 实验方法

1.3.1 标本分组预处理:①尿液标本量对实验结果的影响:由同一患者同时留取的 10 ml 尿液一管及 40 ml 尿液一管,以尿液容量分为两组,共 18 例;标本均于收集后尽快同时进行尿液离心后沉渣细胞 RNA 提取。②尿液冰冻 7 天对实验结果的影响:由同一患者同时留取 40 ml 尿液两管,以低温冰冻或即刻处理方法分为两组,共 21 例;一组尿液标本收集后尽快进行尿液离心后沉渣细胞 RNA 提取;另一组置于 -80°C 冰箱保存,7 天后取出冻融进行尿液离心、沉渣细胞 RNA 提取。③尿液冰冻方法对实验结果的影响:同一患者同时留取 40 ml 尿液两管,以两种不同低温冰冻方法分为两组,共 18 例;一组标本收集后尽快置于 -80°C 冰箱保存,7 天后取出冻融进行尿液离心、沉渣细胞 RNA 提取;另一组收集后尽快进行尿液离心,沉渣细胞 RNA 于 TRIzol 试剂中 -80°C 保存,7 天后冻融进行 RNA 提取。

1.3.2 尿液标本处理:离心条件为 4°C , 3 000 r/min, 20 min。离心后留取尿液沉渣 0.1~0.2 ml。TRIzol 法提取尿液沉渣细胞 RNA。Nanodrop 分光光度计记录沉渣细胞 RNA 样品浓度和纯度:包括 $A_{260\text{nm}}$ 和 $A_{280\text{nm}}$ 时的值 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值,记录总 RNA 量。细胞计数板收集尿液标本细胞数、目测尿蛋白试纸记录尿蛋白结果、考马斯亮蓝试剂检测尿清蛋白。PCR 反应检测尿液中足细胞标记蛋白的 mRNA 表达。

1.4 统计学分析 SPSS 20.0 软件包进行统计分析。正态分布计量资料以标数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组的两组间比较均采用配对样本 t 检验。等级资料比较采用 Mann-Whitney U 秩和检验。正态分布资料 person 检验相关性,非正态分布资料 spearman 检验相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同尿量对提取的 mRNA 量和质的影响

见表 1。配对 t 检验将两组 RNA 总量及质量进行比较。两组 RNA 总量比较差异有统计学意义($P = 0.002$);尿液标本组 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值及

$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ 比值比较差异无统计学意义。

表 1 不同容量尿液对 RNA 量和质的影响 ($n=18$)

项 目	40 ml 尿标本组	10 ml 尿标本组	t	P
RNA 总量(ng)	886.94 \pm 222.93	211.22 \pm 62.01	3.604	0.002
$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	1.80 \pm 0.10	1.77 \pm 0.09	0.708	0.489
$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	2.11 \pm 0.61	2.13 \pm 0.58	-0.363	0.721

2.2 标本冰冻一定时间对 RNA 量和质的影响

见表 2。比较实时离心提取(A1 组)及冰冻保存尿液 7 天后提取(A2 组)。两组 RNA 总量、 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值及 $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ 比值比较差异均无统计学意义。

表 2 标本冰冻一定时间对 RNA 量和质的影响 ($n=18$)

项 目	实时实验组(A1)	保存 7 天后实验组(A2)	t	P
RNA 总量(ng)	886.94 \pm 945.84	881.50 \pm 829.02	0.085	0.933
$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	1.80 \pm 0.10	1.80 \pm 0.87	-0.221	0.828
$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	2.11 \pm 0.61	2.03 \pm 0.47	0.823	0.422

2.3 标本冰冻方法对 RNA 量和质的影响

见表 3。比较直接冰冻尿液 7 天后和先添加 TRIzol(B1 组)与冰冻尿液 7 天后两种标本冻存方法(B2 组)。两组 RNA 总量、 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值及 $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ 比值比较差异无统计学意义。

表 3 标本冰冻方法对 RNA 量和质的影响 ($n=21$)

项 目	直接冰冻 7 天(B1)	Trizol 冰冻 7 天(B2)	t	P
RNA 总量(ng)	637.81 \pm 525.24	639.86 \pm 535.42	-0.47	0.963
$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	1.84 \pm 0.13	1.83 \pm 0.96	0.293	0.773
$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	2.32 \pm 0.53	2.50 \pm 0.61	-1.134	0.273

2.4 mRNA 的量和尿蛋白浓度、尿清蛋白浓度、尿细胞总数的关系

39 例标本中经目测尿蛋白试纸检测尿液标本,结果“—”者 2 例、“±”2 例、“+”13 例、“++”12 例、“+++”5 例、“++++~+++++”5 例。尿液细胞数:3 445.4 \pm 6 263.3 \times 10⁴ 个/L。经考马斯亮蓝测定尿液清蛋白浓度 1 612.1 \pm 2 101.2 $\mu\text{g/ml}$ 。Speraman 相关分析示 RNA 总量与细胞总数相关, $P=0.002$ (图 1);与尿蛋白浓度、尿清蛋白浓度无明显相关;RNA 质量 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值、尿清蛋白浓度、尿细胞总数均无明显相关,见表 4。

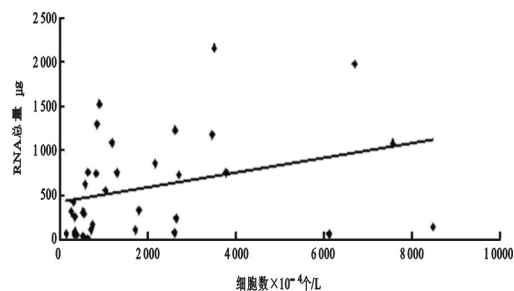


图 1 RNA 总量与脱落细胞数相关性

表4 RNA总量及质量与尿蛋白、尿清蛋白、尿细胞数相关分析

相关系数	尿蛋白	尿清蛋白	细胞总数
RNA总量	0.118	-0.007	0.475*
A_{260nm}/A_{280nm}	-0.177	0.272	0.250

注: * $P < 0.01$ 。

编号	浓度 (ng/μl)	A260/280	Ct 值
7	29	1.83	24.16
8	77	1.87	22.98
9	44	1.87	23.77
15	29	1.86	20.23
27	1826	2.02	27.26

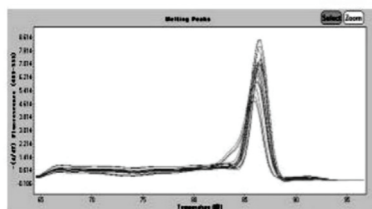


图2 RT-PCR 试验显示尿脱落细胞 mRNA 中表达足细胞标记蛋白的基因

3 讨论 慢性肾脏病和急性肾损伤提倡尽早发现和及时治疗。大量实验显示尿液中含有的大量生物学物质可以敏感且特异地反映肾脏局部的损伤,特别是急性肾损伤的研究发现尿液 KIM-1, NGAL^[1], NAG^[7]等,较传统的血清肌酐能更早地检测到急性肾损伤(AKI)的发生。肾脏局部损伤时,各种固有细胞出现细胞生物学特性改变,表达特异性的基因和蛋白。损伤加重后这些受损的细胞出现凋亡/坏死,脱落入尿液中。检测这些脱落的细胞出现的基因表达变化可能反映了损伤的类型和程度。Szeto 等^[8]在狼疮性肾炎的研究中探讨了运用尿液沉渣细胞的 mRNA 检测作为治疗反应监测的价值,发现尿白介素 17(IL-17)、转录因子 GATA-3 表达量与狼疮活动度评分(SLEDAI)显著相关。由于 mRNA 极易被降解,为了获得高质量的 mRNA,目前研究均采取了实时提取 mRNA 的方法。将该项技术转向临床实用则需要解决标本预处理的困难,使得标本以适当方式进行保存以便批量进行实验减少批内误差。

我们尝试了研究尿标本的总量是否对 mRNA 产量和质量有影响,结果显示留取更多的尿标本量可以获得更多的 mRNA 量。10 ml 尿液所提取沉渣细胞 RNA 理论上可为后续实验提供样本,但鉴于逆转录、RT-PCR 对于 RNA 总量的要求,推测至少 30 ml 尿液标本的产量将获得足以完成逆转录实验的 mRNA 量。我们也检测了不同尿液标本和提取的 mRNA 质量的影响,两组标本我们没有发现在 A_{260nm}/A_{280nm} 吸光值的差异。虽然 40 ml 和 10 ml 尿液标本组的 A_{260nm}/A_{280nm} 吸光值差异无统计学意义,但是 10 ml 尿液标本组获得的 mRNA 其 A_{260nm}/A_{280nm} 吸光度平均值已低于 1.8,提示可能受 DNA 污染,即过于少量的尿液标本可能对于提取高质量的 mRNA 有一定的影响。

我们比较了实时提取 mRNA 和冻存尿液标本

2.5 RT-PCR 检测尿液中足细胞标记蛋白的 mRNA 表达 随机选取 5 例患者的尿液 mRNA 标本进行 RT-PCR 试验,结果示这些尿液脱落细胞表达足细胞的标记蛋白 WT-1, podocin 和 synaptopodin(图 2)。

后提取 mRNA 对 mRNA 产量和质量的影响。虽然没有观察到两种方法对 mRNA 产量和质量有影响,但是两组 A_{260nm}/A_{280nm} 吸光值的标准差差异较大,提示对于 mRNA 质量来说实时提取 mRNA 的质量更为稳定。在比较直接使用冻存的尿液标本与先添加 TRIzol 然后冻存的尿液标本对 RNA 质量的影响的实验中也发现了相似的结果。

尽管尿液细胞镜检中存在一定量的红细胞影响,但我们的研究结果仍提示 mRNA 产量与尿液细胞数的相关性,提示脱落的肾脏固有细胞数量对结果 RNA 产量的影响。我们没有观察到尿液中蛋白量、镜检细胞数与 mRNA 的产量和质量存在相关性。尿蛋白通常是肾小球滤过屏障损伤所导致,可能与脱落的肾脏固有细胞相关性并不密切,而尿液镜检的细胞多为红细胞,仅少量的白细胞可能对 mRNA 产量影响较小。但如果尿液中白细胞数量大量增加,例如存在泌尿系统感染时可能会对 mRNA 的产量和质量有影响。

尿脱落细胞提取的 mRNA 主要用于逆转录后进行 PCR 试验,我们尝试使用之前预处理方法获取的尿脱落细胞 mRNA,检测足细胞标记蛋白 WT-1, podocin 和 synaptopodin 的基因表达,均可以发现尿脱落细胞可以表达这些基因,因此从尿液脱落细胞中提取 mRNA,检测肾脏固有细胞的基因变化是可行的。

本研究仍存在一定缺陷:①样本数量较少,病种未覆盖到肾小球疾病、肾小管疾病、急性肾损伤的患者。因此针对不同病种,尿脱落细胞提取 mRNA 的可行性需要进一步研究。②本研究未界定哪些情况下不适合采用本项技术,例如尿白细胞数的限定等。因此值得进行更大规模的研究,以明确这些问题。

参考文献:

[1] Fukuda A, Wickman LT, Venkatarreddy MP, et al.

(下转 130 页)

- microRNA targets[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(10):1169-1174.
- [8] Baltimore D. Our genome unveiled[J]. *Nature*, 2001, 409(6822):814-816.
- [9] ENCODE Project consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos J, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project [J]. *Nature*, 2007, 447(7146):799-816.
- [10] Steck E, Boeuf S, Gabler J, et al. Regulation of H19 and its encoded micro RNA-675 in osteoarthritis and under anabolic and catabolic in vitro conditions[J]. *J Mol Med (Eerl)*, 2012, 90(10):1185-1195.
- [11] Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long non-coding RNAs[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2012(81):145-166.
- [12] Karreth FA, Pandolfi PP. ceRNA cross-talk in cancer; when ce-bling rivalries go awry[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(10):1113-1121.
- [13] Kumar MS, Armenteros-Monterroso E, East P, et al. HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression[J]. *Nature*, 2014, 505(7482):212-217.
- [14] Liu K, Guo L, Guo Y, et al. AEG-1 3'-untranslated region functions as a ceRNA in inducing epithelial-mesenchymal transition of human non-small cell lung cancer by regulating miR-30a activity[J]. *Eur J Cell Biol*, 2015, 94(1):22-31.
- [15] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [16] Xia T, Chen SC, Zhen J, et al. Long noncoding RNA FER1L4 suppresses cancer cell growth by acting as a competing endogenous RNA and regulating PTEN expression[J]. *Sci Rep*, 2015(5):13445.
- [17] Peng WZ, Si S, Zhang Q, et al. Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate gastric cancer progression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34(1):79.
- [18] Wang L, Guo ZY, Zhang R, et al. Pseudogene OCT4-pg4 function as a natural microRNA sponge to regulate OCT4 expression by competing for miR-145 in hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(8):1773-1781.
- [19] Matouk IJ, Abbasi I, Hochberg A, et al. Highly up-regulated in liver cancer noncoding RNA is overexpressed in hepatic colorectal metastasis[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(6):688-692.
- [20] Wang J, Liu X, Wu H, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(16):5366-5383.
- [21] Kim J, Yu J. Interrogating genomic and epigenomic data to understand prostate cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825(2):186-196.
- [22] Poliseno L, Salmena L, Zhang J, et al. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumor biology [J]. *Nature*, 2010, 465(7301):1033-1038.
- [23] Dillon LM, Miller TW. Therapeutic targeting of cancers with loss of PTEN function[J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(1):65-79.
- [24] Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression[J]. *Cell*, 2008, 133(3):403-414.
- [25] Johnsson P, Ackley A, Vidarsdottir L, et al. A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(4):440-446.
- [26] Yang J, Li T, Gao C, et al. FOXO1 3'UTR functions as a ceRNA in repressing the metastases of breast cancer cells via regulating miRNA activity[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(17):3218-3224.
- [27] Lee DY, Jeyapalan Z, Fang L, et al. Expression of versican 3'-untranslated region modulates endogenous microRNA function [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10):e13599.
- [28] Jeyapalan Z, Deng Z, Shatseva T, et al. Expression of CD44 3'-untranslated region regulates endogenous microRNA functions in tumorigenesis and angiogenesis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(8):3026-3041.
- [29] Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. microRNA sponges; competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells[J]. *Nat Methods*, 2007, 4(9):721-726.
- [30] Brown BD, Cantore A, Annoni A, et al. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice[J]. *Blood*, 2007, 110(13):4144-4152.

收稿日期:2016-01-29

修回日期:2016-05-21

- (上接 127 页) Urine podocin: nephrin mRNA ratio (PNR) as a podocyte stress biomarker[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(11):4079-4087.
- [2] Li B, Hartono C, Ding R, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine [J]. *N Eng J Med*, 2001, 344(13):947-954.
- [3] Wang G, Lai FM, Lai KB, et al. Urinary messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in patients with diabetic nephropathy treated by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker[J]. *Eur J Endocrinol*, 2008, 158(3):317-322.
- [4] Maignon M, Ding R, Dadhania DM, et al. Urinary cell mRNA profiles and differential diagnosis of acute kidney graft dysfunction[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(7):1586-1597.
- [5] Jim B, Santos J, Spath F, et al. Biomarkers of diabetic nephropathy, the present and the future[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2012, 8(5):317-328.
- [6] Kufer P, Zippelius A, Lutterbuse R, et al. Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells; anovel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(1):251-261.
- [7] 王震炜, 徐晓萍, 徐磊, 等. 血 Cystatin C 与尿 NAG 在急性肾功能损伤中的诊断应用[J]. *现代检验医学杂志*, 2011, 26(2):125-126, 128.
- Wang ZW, Xu XP, Xu L, et al. Serum Cystatin C and urinary NAG measurements for diagnosis of acute kidney injury [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2011, 26(2):125-126, 128.
- [8] Szeto CC, Tam LS, Kwan BC, et al. Monitoring of urinary messenger RNA levels for the prediction of flare in systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Chim Acta*, 2012, 413(3/4):448-455.

收稿日期:2016-01-18

修回日期:2016-04-13