

糖尿病肾病患者血清 miR-135b 水平检测与疾病预后的相关性研究*

吴忠璟, 陈亚凤, 高芳虹 (海口市妇幼保健院检验科, 海口 570102)

摘要:目的 探讨血清 miR-135b 水平与糖尿病肾病(DN)患者预后的关系。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 158 例 DN 患者(DN 组)和 60 例健康体检者(对照组)血清 miR-135b 水平,分析 miR-135b 与 DN 患者不同临床指标的关系。采用肾小球分级、间质性纤维化和小管萎缩评分(IFTA)及间质炎症来评价肾脏损伤情况,并应用 ROC 曲线分析血清 miR-135b 水平预测 DN 患者发生终末期肾病(ESRD)的价值。结果 DN 组血清 miR-135b 水平为 3.94 ± 0.75 ,明显高于对照组 0.64 ± 0.13 ,差异有统计学意义($t=9.317, P<0.01$)。血清 miR-135b 水平与蛋白尿定量、Cr、BUN 及 eGFR 水平相关($P<0.05$)。DN 患者血清 miR-135b 水平与肾小球分级、IFTA 及间质炎症均有关,且随着肾脏病理损伤程度的增加,血清 miR-135b 水平明显升高($P<0.05$)。终末期肾病(ESRD)患者血清 miR-135b 水平(5.39 ± 1.26)明显高于非 ESRD 患者(3.46 ± 0.68),差异有统计学意义($t=4.157, P=0.025$)。ROC 曲线显示,血清 miR-135b 水平预测 DN 患者发生 ESRD 的最佳截值取 4.96 时,其 AUC[0.912(95%CI:0.850~0.973)]最大,敏感度(91.3%)和特异度(87.5%)较好。Spearman 相关分析显示,DN 患者血清 miR-135b 水平与蛋白尿定量、Cr、BUN、肾小球分级、IFTA 及间质炎症呈正相关($r=0.504, 0.396, 0.438, 0.475, 0.351$ 和 0.559 , 均 $P<0.01$),与 eGFR 呈负相关($r=-0.637, P<0.01$)。结论 血清 miR-135b 水平在 DN 患者中明显上调,且与 DN 患者肾脏损伤及预后不良有关。

关键词:糖尿病肾病;微小核糖核酸-135b(miR-135b);预后评估

中图分类号:R587.2;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)03-088-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.022

Correlation between Serum miR-135b Level and Prognosis in Patients with Diabetic Nephropathy

WU Zhong-jing, CHEN Ya-feng, GAO Fang-hong (Department of Clinical Laboratory,
Haikou Maternal and Child Health Care Hospital, Haikou 570102, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the level of serum miR-135b and the prognosis of diabetic nephropathy (DN). **Methods** Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect serum miR-135b level in 158 patients with DN (group DN) and 60 healthy controls (control group). The relationship between miR-135b and different clinical indicators in patients with DN was analyzed. Renal injury was evaluated by glomerular grading, interstitial fibrosis and tubular atrophy score (IFTA) and interstitial inflammation. ROC curve was used to analyze serum miR-135b level to predict the value of end-stage renal disease (ESRD) in DN patients. **Results** The level of serum miR-135b in DN group was significantly higher than that in the control group (3.94 ± 0.75 vs $0.64 \pm 0.13, t=9.317, P<0.01$). Serum miR-135b level were associated with proteinuria, Cr, BUN, and eGFR levels ($P<0.05$). Serum miR-135b level in elderly patients with DN was related to glomerular grading, IFTA and interstitial inflammation. With the increase of renal pathological damage, serum miR-135b level was significantly increased ($P<0.05$). The level of serum miR-135b (5.39 ± 1.26 vs 3.46 ± 0.68) in patients with end-stage renal disease (ESRD) was significantly higher than that of non ESRD patients ($t=4.157, P=0.025$). The ROC curve showed that the serum miR-135b level predicted the best cut-off value of ESRD in DN patients when it was 4.96, and its AUC [0.912 (95%CI:0.850-0.973)] was the largest, and its sensitivity (91.3%) and specificity (87.5%) were the best. Spearman correlation analysis showed that the DN the level of serum miR-135b and proteinuria, Cr, BUN, glomerular classification, IFTA, interstitial inflammation were positively correlated ($r=0.504, 0.396, 0.438, 0.475, 0.351$ and 0.559 , all $P<0.01$), and negatively correlated with eGFR ($r=-0.637, P<0.01$). **Conclusion** Serum miR-135b levels were significantly up-regulated in patients with DN, and are associated with renal injury and poor prognosis in DN patients.

Keywords: diabetic nephropathy; miR-135b; prognostic evaluation

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病重要的微血管病变之一,以持续性蛋白尿、渐进性肾功能损伤及血压升高为特征,可导致慢性肾衰竭及患者死亡^[1,2]。微小核糖核酸(microRNA,

* 作者简介:吴忠璟(1981—),男,本科,主管检验师,主要从事临床检验诊断学研究,E-mail:A522198993@163.com。

miRNA)是一类内源性约含有19~24个核苷酸的非编码小RNA,通过抑制或降解靶基因信使RNA在细胞增殖与分化、个体发育、激素分泌、肿瘤形成等过程中扮演重要角色^[3,4]。有研究发现,miR-135b参与了肾间质纤维化过程、肾小管上皮细胞的上皮间质转化等过程,亦可能参与了DN的发生发展^[5]。本研究通过观察DN患者血清miR-135b表达水平变化,并分析miR-135b与DN患者预后的关系,旨在为DN的早期治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2016年3月~2017年10月海口市妇幼保健院收治的2型糖尿病肾病患者158例作为研究对象(DN组),其中男性86例,女性72例,年龄35~82(50.15 ± 6.30)岁。纳入标准:①符合美国糖尿病协会(ADA)2型糖尿病诊断标准^[6];②经过肾活检诊断为DN或临床特点符合DN。排除标准:①急慢性肾小球肾炎、尿路感染及其他肾脏疾病者;②伴有恶性肿瘤、肝肾功能衰竭及自身免疫性疾病者。另选择同期来我院体检正常健康者60例作为对照组,其中男性32例,女性28例,年龄34~78(48.93 ± 6.25)岁。本研究经医院伦理委员会批准,并与患者或家属签署知情同意书。

1.2 试剂和仪器 RNA提取试剂盒购自美国Ambio公司,在ABI7500型荧光定量PCR仪(美国ABI公司)上进行实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain react, RT-PCR)。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR检测:空腹抽取静脉血3 ml置于未加抗凝剂的离心管中,于室温2 500 r/min离心15 min,分2层,吸取上层血清400 μ l转移至1个EP管中,−80℃保存。PCR总反应体系为15 μ l,反应条件:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min。扩增条件为:95℃ 10 min 1个循环,95℃ 15s,60℃ 60s进行45个循环,实验重复3次。每个反应体系中荧光信号达到所设定的阈值的经历的循环数即为Ct值,以U6为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算miR-135b的相对表达水平,其中 $\Delta C_t = C_{t_{\text{目标基因}}} - C_{t_{U6}}$ 。

1.3.2 观察指标:包括年龄、性别、糖尿病病程、体质指数(BMI)、空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、血肌酐(Cr)、血尿素氮(BUN)、24h尿蛋白定量及估算的肾小球滤过率(eGFR)。

1.3.3 肾脏损伤评价:采用肾小球分级,间质性纤维化和小管萎缩评分(IFTA)及间质炎症来评价肾脏损伤情况。终末期肾病(end-stage renal dis-

ease, ESRD)定义为eGFR<15 ml/(min·1.73 m²)或开始接受维持性肾脏替代治疗。对于未达到肾脏终点的患者,最后一次随访数据作为他们的最终数据。

1.4 统计学分析 采用SPSS19.0统计学软件处理本次实验的数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用SNK-q检验;两组间比较采用成组t检验。绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)分析血清miR-135b水平预测DN患者发生ESRD的价值。相关分析采用Spearman相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清miR-135b水平比较 DN组血清miR-135b水平为 3.94 ± 0.75 ,明显高于对照组 0.64 ± 0.13 ,差异有统计学意义($t = 9.317, P < 0.01$)。

2.2 血清miR-135b水平与DN患者不同临床指标的关系 见表1。血清miR-135b表达水平在不同水平尿蛋白定量、Cr、BUN及eGFR中比较,差异均有统计学意义($t = 3.971, 5.105, 5.924, 7.409$,均 $P < 0.05$);而miR-135b在不同年龄、性别、糖尿病病程、BMI、FBG及HbA1c水平中比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.3 DN患者不同肾脏病理损伤程度血清miR-135b水平比较 见表2。DN患者血清miR-135b水平与肾小球分级、IFTA及间质炎症均有关,且随着肾脏病理损伤程度的增加,血清miR-135b水平升高,其中肾小球分级Ⅲ、Ⅳ的miR-135b水平高于Ⅰ、Ⅱ级,IFTA 2~3分的miR-135b水平高于0~1分,间质炎症1~2分的miR-135b水平亦高于0分,差异均有统计学意义($t = 5.207, 3.205, 4.116$,均 $P < 0.05$)。

2.4 血清miR-135b水平预测DN患者发生ESRD的价值 见图1。158例DN患者中有64例在随访期间进入ESRD,其血清miR-135b水平为 5.39 ± 1.26 明显高于未进入ESRD组(3.46 ± 0.68),差异有统计学意义($t = 4.157, P = 0.025$)。ROC曲线显示,血清miR-135b水平预测DN患者发生ESRD的最佳截值取4.96时,其曲线下面积(area under curve, AUC)[0.912(95%CI:0.850~0.973)]最大,敏感度和特异度较高,为91.3%和87.5%。

2.5 血清miR-135b与各临床指标的相关性分析 Spearman相关分析显示, DN患者血清miR-135b水平与尿蛋白定量、Cr、BUN、肾小球分级、

IFTA及间质炎症呈正相关($r=0.504, 0.396, 0.438, 0.475, 0.351, 0.559$, 均 $P<0.01$), 与 eGFR 呈负相关($r=-0.637, P<0.01$); 而与年龄、性别、糖尿病病程、BMI、FBG 及 HbA1c 无明显相关($P>0.05$)。

表 1 血清 miR-135b 水平与 DN 患者不同临床指标的关系

项 目		<i>n</i>	miR-135b($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	≤60	82	3.78±0.71	0.793	0.270
	>60	76	4.19±0.86		
性别	男	86	3.91±0.74	0.623	0.371
	女	72	4.06±0.83		
糖尿病病程(年)	<10	61	3.76±0.68	0.958	0.225
	≥10	97	4.14±0.85		
BMI(kg/m ²)	<25	54	3.82±0.70	0.750	0.294
	≥25	104	4.01±0.82		
尿蛋白定量(g/24 h)	<3.0	82	3.07±0.58	3.971	0.026
	≥3.0	76	4.80±1.05		
FBG(mmol/L)	<8.0	34	3.64±0.65	1.178	0.196
	≥8.0	124	4.16±0.97		
HbA1c(%)	<9.0	49	3.76±0.75	1.204	0.183
	≥9.0	109	4.20±1.02		
Cr(μmol/L)	<150	88	2.99±0.54	5.105	0.008
	≥150	70	5.06±1.27		
BUN(mmol/L)	<7.5	84	2.84±0.50	5.924	<0.001
	≥7.5	74	5.17±1.30		
eGFR[ml/(min·1.73m ²)]	<60	58	5.97±1.46	7.409	<0.001
	≥60	100	2.34±0.41		

表 2 DN 患者不同肾脏病理损伤程度血清 miR-135b 水平比较

项 目		<i>n</i>	miR-135b($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
肾小球分级	I	35	2.70±0.47	5.207	0.011
	II	40	3.43±0.62		
	III	37	4.08±0.93		
	IV	46	5.82±1.41		
IFTA(分)	0	22	2.61±0.45	3.205	0.032
	1	38	3.27±0.60		
	2	52	4.20±1.03		
	3	46	4.94±1.23		
间质炎症(分)	0	36	3.44±0.61	4.116	0.020
	1	58	4.43±1.08		
	2	64	5.29±1.33		

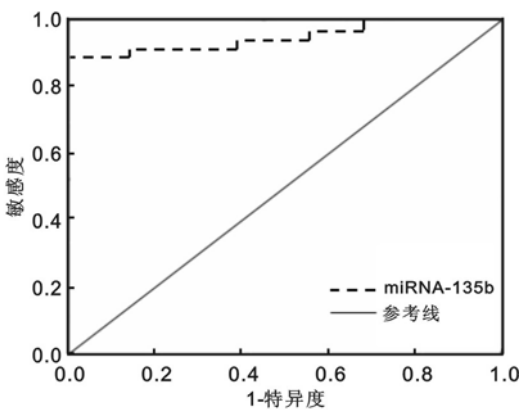


图 1 血清 miR-135b 水平预测 DN 患者发生 ESRD 的 ROC 曲线

3 讨论 microRNA 是一种内源性的非编码微小 RNA,广泛存在于真核生物中,作为基因调控网络中的核心成分,通过参与细胞基因表达的调节而影响生物体的各项生理活动^[7,8]。已有研究证实,miR-135b 具有促进癌症的侵袭和转移作用,在肝癌、胃癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌等多种肿瘤中呈高表达^[9,10]。近年来的研究表明,microRNA 检测对于 DN 的早期诊断及疗效评估等方面具有重要的价值,未来以 microRNA 为靶点开发的药物将有望应用于 DN 的治疗^[11,12]。McClelland 等^[13]研究发现,血清 microRNA 水平在 DN 患者中异常表

达,miRNA 不仅有助于我们了解 DN 复杂的发病机制,还在 DN 的诊断及预后预测上有一定的指导价值。另有研究表明,microRNA 与 DN 发生发展密切相关,其在 DN 中的靶向调控作用有望作为 DN 的新型标志物及治疗靶点^[14]。本研究中 DN 组血清 miR-135b 水平明显高于对照组,血清 miR-135b 水平与蛋白尿定量、Cr, BUN 及 eGFR 水平相关。提示血清 miR-135b 水平与 DN 患者的病情严重程度相关,可能参与 DN 的发生发展。

在 DN 的发生和发展过程中,改善肾脏损伤及早期干预是 DN 救治的关键。本研究采用肾小球分级、IFTA 及间质炎症共 3 个指标来评价肾脏损伤程度,结果显示 DN 患者血清 miR-135b 水平与肾小球分级,IFTA 及间质炎症均有关,且随着肾脏病理损伤程度的增加,血清 miR-135b 水平明显升高。应用 ROC 曲线分析,发现血清 miR-135b 水平预测 DN 患者发生 ESRD 的敏感度和特异度较好。提示血清 miR-135b 水平与肾功能进展及严重程度密切相关,可作为预测 DN 进展的生物学标志物。肾小球间质性损伤可影响管球反馈平衡,加重肾小球滤过压,继而使肾小球上皮受损,最终导致疾病进展及发生 ESRD。本研究中 ESRD 患者血清 miR-135b 水平明显高于非 ESRD 患者。推测高水平的 miR-135b 可产生细胞毒性,导致间质纤维化、小管萎缩和间质炎症。Spearman 相关分析显示, DN 患者血清 miR-135b 水平与蛋白尿定量、Cr, BUN, 肾小球分级, IFTA 及间质炎症呈正相关,与 eGFR 水平呈负相关。这进一步提示血清 miR-135b 水平与肾脏病理损伤程度及 DN 预后不良有关。既往研究显示,血清 microRNA 水平在肾小管间质损伤中明显升高,而肾小管间质损伤与 DN 患者肾脏预后不良显著相关,由此推测 microRNA 可能参与 DN 患者的病情进展^[15]。

综上所述,血清 miR-135b 水平在 DN 患者中呈高表达,且与 DN 患者肾脏损伤及预后有关,miR-135b 对预测 DN 发生 ESRD 具有一定价值,有望为 DN 的靶向治疗提供新的思路。但本研究为单中心的回顾性研究,今后尚需动物实验模型进一步验证。

参考文献:

- [1] Huang YQ, Gou R, Diao YS, et al. Charlson comorbidity index helps predict the risk of mortality for patients with type 2 diabetic nephropathy[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2014, 15(1): 58-66.
- [2] Morikawa S, Ito H, Watanabe K. Diabetic nephropathy[J]. Der Nephrologe, 2012, 53(10): 1195-1206.
- [3] Yao ZY, Chen WB, Shao SS, et al. Role of exosome-associated microRNA in diagnostic and therapeutic applications to metabolic disorders[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2018, 19(3): 183-198.
- [4] Pratap P, Raza ST, Abbas S, et al. MicroRNA-associated carcinogenesis in lung carcinomas[J]. J Cancer Res Ther, 2018, 14(2): 249-254.
- [5] 何凤, 周姗姗, 关昌杰, 等. 微小 RNA-135b 调控 Smad5 在糖尿病肾病发病中的作用研究[J]. 新医学, 2017, 48(5): 317-322.
He F, Zhou SS, Guan CJ, et al. Effect of micro RNA-135b on the pathogenesis of diabetic nephropathy by regulating Smad5[J]. New Medicine, 2017, 48(5): 317-322.
- [6] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2012, 35(Suppl 1): S64-71.
- [7] Moridikia A, Mirzaei H, Sahebkar A, et al. MicroRNAs: Potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(2): 901-913.
- [8] Hershkovitz-Rokah H, Geva P, Salmon-Divon M, et al. Network analysis of microRNAs, genes and their regulation in diffuse and follicular B-cell lymphomas[J]. Oncotarget, 2018, 9(8): 7928-7941.
- [9] Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y, et al. MiR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma[J]. Oncogene, 2016, 35(48): 6177-6188.
- [10] Hua K, Jin J, Zhao J, et al. MiR-135b, upregulated in breast cancer, promotes cell growth and disrupts the cell cycle by regulating LATS2[J]. Int J Oncol, 2016, 48(5): 1997-2006.
- [11] Simpson K, Wonnacott A, Fraser DJ, et al. MicroRNAs in diabetic nephropathy: from biomarkers to therapy[J]. Curr Diab Rep, 2016, 16(3): 35.
- [12] Nassirpour R, Raj D, Townsend R, et al. MicroRNA biomarkers in clinical renal disease: from diabetic nephropathy renal transplantation and beyond[J]. Food Chem Toxicol, 2016, 98(Pt A): 73-88.
- [13] McClelland A, Hagiwara S, Kantharidis P. Where are we in diabetic nephropathy: microRNAs and biomarkers[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014, 23(1): 80-86.
- [14] Figueira MF, Monnerat-Cahli G, Medei E, et al. MicroRNAs: potential therapeutic targets in diabetic complications of the cardiovascular and renal systems[J]. Acta Physiol(Oxf), 2014, 211(3): 491-500.
- [15] Bhatt K, Kato M, Natarajan R, et al. Mini-review: emerging roles of microRNAs in the pathophysiology of renal diseases[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 310(2): F109-F118.

收稿日期:2018-01-07

修回日期:2018-04-14