

# 原发性 IgA 肾病患者血清 miR-181b 水平表达与病情严重程度及预后的相关性分析

沈伟兴<sup>a</sup>, 汤佳瑾<sup>b</sup>, 傅 鹏<sup>a</sup> (上海市市东医院 a. 肾内科; b. 重症医学科, 上海 200438)

**摘要:** **目的** 分析原发性 IgA 肾病患者血清 miR-181b 水平表达及与病情严重程度、预后的相关性。**方法** 回顾性分析上海市市东医院 2015 年 6 月~2017 年 11 月收治的原发性 IgA 肾病患者 107 例的临床资料。根据患者肾脏病理学检查结果按病情严重程度分为轻度、中度、重度, 根据随访结果将预后分为预后良好和预后较差。比较不同病情严重程度和不同预后患者的血清 miR-181b 水平。采用 Spearman 相关分析 miR-181b 水平与 IgA 肾病病情严重程度及预后的相关性, 绘制 ROC 曲线分析血清 miR-181b 水平对 IgA 肾病疾病严重程度及预后的预测价值。**结果** 107 例原发性 IgA 肾病患者中轻度 35 例、中度 46 例、重度 26 例。轻度、中度和重度患者的血清 miR-181b 水平分别为  $(1.47 \pm 0.41) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $(1.89 \pm 0.58) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$  和  $(2.69 \pm 0.67) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 差异有统计学意义 ( $F=49.765$ ,  $P<0.001$ )。107 例原发性 IgA 肾病患者随访 2 年后, 预后良好 88 例、预后较差 19 例。预后良好、预后较差患者的血清 miR-181b 水平分别为  $(1.73 \pm 0.52) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$  和  $(2.95 \pm 0.74) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 差异有统计学意义 ( $t=5.193$ ,  $P<0.001$ )。经 Spearman 相关分析发现, 血清 miR-181b 水平与患者病情严重程度 ( $r=0.801$ ,  $P<0.001$ )、预后 ( $r=0.494$ ,  $P<0.001$ ) 呈显著相关性。血清 miR-181b 预测 IgA 肾病病情严重程度的 ROC 曲线下面积为 0.886 (95%CI: 0.717~0.966), 最佳临界值  $2.25 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 此时灵敏度和特异度分别为 0.892, 0.731。血清 miR-181b 预测 IgA 肾病预后的 ROC 曲线下面积为 0.848 (95%CI: 0.701~0.925), 最佳临界值  $2.48 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 此时灵敏度和特异度分别为 0.873 和 0.704。**结论** 血清 miR-181b 水平与 IgA 肾病病情严重程度及预后均呈显著相关性, 血清 miR-181b 越高, 病情越重, 预后越差。可通过检测 IgA 肾病患者血清 miR-181b 水平评估患者病情及预测预后。

**关键词:** IgA 肾病; 微小 RNA-181b; 严重程度

**中图分类号:** R692; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 06-051-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2021.06.010

## Analysis of the Correlation between the Expression of Serum miR-181b and the Severity and Prognosis of Patients with Primary IgA Nephropathy

SHEN Wei-xing<sup>a</sup>, TANG Jia-jin<sup>b</sup>, FU Peng<sup>a</sup> (a. Department of Nephrology; b. Department of Critical Care Medicine, Shidong Hospital of Shanghai, Shanghai 200438, China)

**Abstract: Objective** To analyze the expression of serum miR-181b level in patients with primary IgA nephropathy and its correlation with the severity and prognosis of the disease. **Methods** The clinical data of 107 patients with primary IgA nephropathy admitted to Shanghai Shidong Hospital from June 2015 to November 2017 were retrospectively analyzed. According to the renal pathological examination results of the patients, the severity of the disease was divided into mild, moderate and severe. According to the follow-up results, the prognosis was divided into good prognosis and poor prognosis. The serum miR-181b levels of patients with different disease severity and different prognosis were compared. Spearman correlation analysis was used to analyze the correlation between miR-181b level and the severity and prognosis of IgA nephropathy. ROC curve was drawn to analyze the predictive value of serum miR-181b level on the severity and prognosis of IgA nephropathy. **Results** Among 107 patients with primary IgA nephropathy, 35 were mild, 46 were moderate, and 26 were severe. Serum miR-181b levels in mild, moderate and severe patients were  $(1.47 \pm 0.41) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $(1.89 \pm 0.58) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$  and  $(2.69 \pm 0.67) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , and the difference was statistically significant ( $F=49.765$ ,  $P<0.001$ ). After 107 patients with primary IgA nephropathy were followed up for 2 years, 88 had a good prognosis and 19 had a poor prognosis. Serum miR-181b levels of patients with good prognosis and poor prognosis were  $(1.73 \pm 0.52) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$  and  $(2.95 \pm 0.74) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , the difference was statistically significant ( $t=5.193$ ,  $P<0.001$ ). According to Spearman correlation analysis, there was a significant correlation between serum miR-181b level and the severity of the patient's condition ( $r=0.801$ ,  $P<0.001$ ), prognosis ( $r=0.494$ ,  $P<0.001$ ). The area under the ROC curve of serum miR-181b to predict the severity of IgA nephropathy was 0.886 (95% CI: 0.717~0.966), the optimal cut-off value was  $2.25 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , the sensitivity and the specificity were 0.892 and 0.731, respectively; The miR-181b predicts the area under the ROC curve of IgA nephropathy prognosis

**作者简介:** 沈伟兴 (1982-), 男, 本科, 主治医师, 研究方向: IgA 肾病临床发病机制。

**通讯作者:** 傅鹏, 主任医师, 研究方向: 重症医学。

0.848 (95% CI: 0.701~0.925), the optimal cut-off value was  $2.48 \times 2^{-\Delta\Delta C_t}$ , the sensitivity and the specificity were 0.873 and 0.704.

**Conclusion** The level of serum miR-181b was significantly correlated with the severity and prognosis of IgA nephropathy. The higher the serum miR-181b, the more serious the disease and the worse prognosis. The condition and prognosis of patients with IgA nephropathy can be evaluated by detecting the levels of serum miR-181b.

**Keywords:** IgA nephropathy; microRNA-181b; severity

原发性免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 肾病是因肾小球系膜区 IgA 沉积肾小球引起的病理改变, 患者主要表现为血尿、蛋白尿及肾功能损害, 病情严重程度不一<sup>[1]</sup>。资料显示<sup>[2]</sup>, 原发性 IgA 肾病占原发性肾小球疾病患者的 45%~50%, 是引发终末期肾脏病的主要原因之一。目前, 原发性 IgA 肾病的诊断和病情评估主要依靠肾活检组织病理学及免疫病理分析, 而肾活检具有较大的创伤性, 易引发出血并发症<sup>[3]</sup>。目前国内、国际上对原发性 IgA 肾病病情严重程度、预后的评价缺少简单、有效的指标, 寻找到无需肾穿、简单易得的生物标志物评估 IgA 肾病的严重程度及预后成为当前研究热点。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类广泛参与机体生理、病理调控的非编码蛋白质小分子 RNA。有研究发现<sup>[4-5]</sup>, 微小 RNA 181b (microRNA-181b, miR-181b) 参与慢性肾脏疾病的病理生理过程, 可作为 IgA 肾病患者病情及预后评估的标志物之一, 但有关 IgA 肾病患者 miR-181b 表达与其病情严重程度及预后的相关性分析仍较为缺乏。本研究回顾性分析了 107 例原发性 IgA 肾患者的临床资料, 分析血清 miR-181b 水平表达及与病情严重程度、预后的相关性, 现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 回顾性分析上海市市东医院 2015 年 6 月~2017 年 11 月收治的原发性 IgA 肾病患者 107 例的临床资料, 其中男性 72 例、女性 35 例; 年龄 27~63 岁, 平均年龄  $41.26 \pm 6.94$  岁。

纳入标准: ①符合《原发性 IgA 肾病诊治循证指南 (2016)》<sup>[6]</sup> 中诊断标准: 肾脏病理光镜下可见弥漫性系膜增生或局灶节段增生性肾小球肾炎, 免疫荧光可见系膜区 IgA 或以 IgA 为主的免疫复合物沉积。②年龄 > 18 岁。③临床资料完善。④完成至少 2 年随访。

排除标准: ①既往有肾活检史、免疫抑制剂应用史者。②非肾脏因素如肿瘤、肝病、系统性红斑狼疮等引起的非原发性 IgA 肾病者。

1.2 仪器与试剂 10g/dl 福尔马林; 德国 Leica DM3000 显微镜; 离心机; TRIzol@LS 试剂盒 (上海索宝生物); 紫外分光光度计 (北京纽比特科技); 反转录试剂盒 (上海康朗生物)。

## 1.3 方法

1.3.1 分组: ①病情评估: 根据患者肾脏病理学检

查结果进行判定和分组: 用 10g/dl 福尔马林固定肾活检组织标本, 石蜡包埋, 制成厚度  $2 \mu\text{m}$  的切片, 常规进行 HE 染色, 观察光镜 ( $\times 200$ ) 下肾组织病理变化。根据肾小管间质损害程度将患者分为轻度、中度和重度, 其中肾小管间质损害包括肾小管萎缩 (肾小管基底膜不规则增厚伴管径减小)、间质炎症 (皮质间质内间质炎症细胞增多)、间质纤维化 (皮质区细胞外基质增多造成肾小管分离), 分别计 0 分 (无)、1 分 (局灶, <50% 病理区域受累)、2 分 (弥漫, 累及  $\geq 50\%$  病理区域), 3 项的评分之和为肾小管间质损害评分, 在 0~6 分。总分 0 分或 1 分者纳入轻度组, 2 分者纳入中度组,  $\geq 3$  分者纳入重度组。②预后评估: 患者均通过电话联合门诊复查的形式进行随访, 随访 2 年后进行血肌酐和肾小球滤过率检测。随访终点为复合终点, 患者血肌酐水平较基础值升高至少 50% 或发展为终末期肾病 (接受维持性血液透析治疗或肾小球滤过率 <  $15 \text{ ml}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$ ) 或死亡, 为预后较差; 未出现上述 3 项中任一项, 为预后良好。

1.3.2 血清 miR-181b 水平检测: 采用定量逆转录 PCR 法测定。抽取肘静脉血 10 ml,  $3\ 500 \text{ r}/\text{min}$ , 离心 15 min 后留取上层血清。加入到 TRIzol@LS 试剂盒中提取总 RNA, 用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度及纯度。将  $2 \mu\text{g}$  总 RNA 加至反转录试剂盒中进行反转录反应。所得产物进行 PCR 扩增, 条件为  $95^\circ\text{C}$  30 s,  $60^\circ\text{C}$  20 s,  $72^\circ\text{C}$  20 s, 循环 40 次。miR-181b 上游引物序列: 5'GCGGATCATTCATTGCTGTCG3', 下游引物序列: 5'GTGCAGGGTCCGAGGT3'。以 U6 作为内参, 内参上游引物序列: 5'CTCGCTTCGGCAGCACATA3', 下游引物序列: 5'GTGCAGGGTCCGAGGT3'。受试者血清 miR-181b 检测结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示。

1.4 统计学分析 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较采取独立样本 *t* 检验或单因素的方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。相关性采用 Spearman 相关法。绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic curve, ROC) 曲线分析血清 miR-181b 水平对原发性 IgA 肾病疾病严重程度及预后的预测价值。

## 2 结果

2.1 病情严重程度与血清 miR-181b 的相关性 107

例原发性IgA肾病患者中轻度35例、中度46例、重度26例。轻度、中度和重度患者的血清miR-181b水平分别为 $(1.47 \pm 0.41) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 、 $(1.89 \pm 0.58) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 和 $(2.69 \pm 0.67) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，经单因素的方差分析差异有统计学意义( $F=49.765$ ,  $P<0.05$ )。经Spearman相关分析，病情严重程度与血清miR-181b呈正相关( $r=0.801$ ,  $P=0.000$ )，病情越严重，血清miR-181b水平越高。

2.2 预后与血清miR-181b的相关性 107例原发性IgA肾病患者随访2年后，预后良好88例、预后较差19例。预后良好组和预后较差患者的血清miR-181b水平分别为 $(1.73 \pm 0.52) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 、 $(2.95 \pm 0.74) \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，经独立样本 $t$ 检验差异有统计学意义( $t=5.193$ ,  $P<0.05$ )。经Spearman相关分

析，预后与血清miR-181b水平呈正相关( $r=0.494$ ,  $P=0.000$ )，预后越差，血清miR-181b水平越高。

2.3 血清miR-181b水平对病情严重程度、预后的预测价值 将轻度和中度患者赋值“0”、重度患者赋值“1”，预后良好患者赋值“0”、预后较差患者赋值“1”，血清miR-181b水平原始数据录入后分别绘制ROC曲线，结果显示血清miR-181b预测原发性IgA肾病病情严重程度的ROC曲线下面积为0.886(95%CI: 0.717~0.966,  $P=0.013$ )。最佳临界值 $2.25 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，此时灵敏度为0.892，特异度0.731，见图1。血清miR-181b预测IgA肾病预后的ROC曲线下面积为0.848(95%CI: 0.701~0.925,  $P=0.020$ )。最佳临界值 $2.48 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，此时灵敏度为0.873，特异度为0.704，见图2。

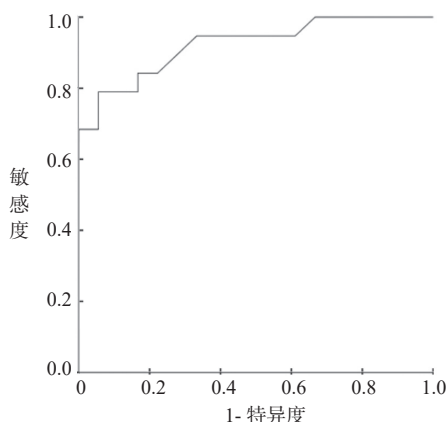


图1 血清miR-181b预测病情严重程度的ROC曲线

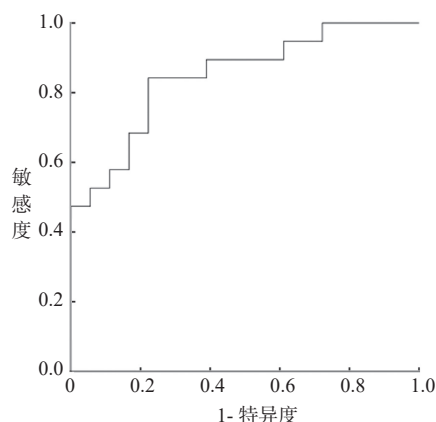


图2 血清miR-181b预测预后的ROC曲线

### 3 讨论

IgA肾病缺乏特异性症状，患者多表现为无症状血尿、蛋白尿，但也有部分患者无明显症状，直至发展为终末期肾病才被发现<sup>[7]</sup>。据报道<sup>[8]</sup>，30岁以上的IgA肾病患者中50%在确诊时已发生3~5期的慢性肾脏病，其中20%~40%会在后续进一步发展为终末期肾病。研究发现<sup>[9-10]</sup>，IgA肾病的发生与异常糖基化IgA1的形成、血循环免疫复合物沉积、肾小管基底膜增厚、间质炎症和纤维化、肾小管细胞凋亡等多种病理生理有关。

miRNA是内源非编码RNA，对基因表达具有调节作用，参与各种生物学过程，如代谢、免疫应答、细胞增殖和凋亡等<sup>[11]</sup>。专家发现<sup>[12]</sup>，疾病状态下的miRNA表达谱会发生变化，且可通过靶向途径影响多种疾病包括慢性肾脏疾病的发生和发展。张翠平等<sup>[13]</sup>的研究表明，儿童原发性肾病综合征患者的尿液外泌体中miR-23b-3p浓度明显高于健康对照组，且经治疗后降低，可作为儿童原发性肾病综合征辅助诊断和治疗效果监测的潜在指标。吴忠璟<sup>[14]</sup>的研究认为，糖尿病肾病患者的血清miR-135b异常升高，且与患者肾脏损伤及预后不良有关。

miR-181b是miRNA中的其中之一，动物实验发现<sup>[15-16]</sup>，特异敲除小鼠的miRNA酶基因可减缓小鼠肾脏肾小球硬化、蛋白尿和慢性肾衰竭进展，表明miRNA对肾脏疾病的病理生理过程有重要调节作用。miR-181b是miR-181家族成员，参与肾组织损伤过程。国外研究表明<sup>[17]</sup>，miR-181b可调控细胞凋亡，从而影响肾脏疾病严重程度。LÜ等<sup>[18]</sup>的研究也发现，封闭人近端肾小管上皮细胞内的miR-181b后，肾小管上皮细胞对药物中毒性肾损伤的抵抗力增强。上述几项研究均表明，miR-181b在肾脏疾病发病过程中起到重要调控作用。王琳琳等<sup>[19]</sup>的研究发现，糖尿病肾病患者的血清miR-181b显著高于2型糖尿病患者，提示miR-181b可能参与2型糖尿病患者进展为糖尿病肾病的过程。该研究还进行了相关性分析，发现血清miR-181b与糖尿病肾病严重程度呈显著相关性，且采用血清miR-181b预测糖尿病肾病的ROC曲线下面积达0.911，具有较高的诊断效能，提示血清miR-181b在糖尿病肾病的诊断和病情评估中具有较大价值。

本研究中不同病情严重程度及不同预后患者血清miR-181b的差异有统计学意义，经Spearman



相关分析证实, IgA 肾病严重程度及预后均与血清 miR-181b 水平呈显著相关性, 病情越严重, 预后越差, 血清 miR-181b 越高。miR-181b 在 IgA 肾病发生和进展中的参与和调控机制尚不明确, 但有研究指出<sup>[20]</sup>, miR-181b 可能是通过间接或直接作用对收缩压和尿微量清蛋白/肌酐比值进行调控从而对 IgA 肾病的严重程度与预后, 但具体机制仍不明确。基质金属蛋白酶是一组参与细胞外基质降解的肽酶, 其中组织金属蛋白酶抑制因子 3(tissue inhibitors of metalloproteinases-3, TIMP3) 的 3'-UTR 具有两个 miR-181b 高度保守的同源位点(位点 1, 2)<sup>[21-22]</sup>。有动物实验发现<sup>[23]</sup>, 在表达 miR-181b 的肝细胞中观察到 TIMP3 蛋白水平下降 50% 左右, 而耗尽 miR-181b 细胞后, TIMP3 蛋白和 RNA 表达水平分别提高约 50% 和 60%。这一结果说明, TIMP3 是 miR-181b 的靶标, miR-181b 在 mRNA 和/或蛋白质水平上对 TIMP3 表达进行干扰, 这也是 miR-181b 影响 IgA 肾病病情的主要机制, 血清 miR-181b 水平越高, 对 TIMP3 的抑制作用越强, 对肾脏的损害越重<sup>[24]</sup>。绘制 ROC 曲线发现, 当血清 miR-181b 分别  $> 2.25 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$  和  $2.48 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$  时对重度 IgA 肾病、较差预后的预测价值最高。另外, 其与活体肾组织病理检查相比创伤性大幅减轻, 操作简便, 临床适用性较高, 可通过血清检测为病情和预后评估提供参考。

本研究局限性: ①为单中心回顾性研究, 且集中在横断面, 缺乏队列研究, 未能全面考虑随访结果的影响因素, 可能造成预后的有关结论存在偏倚。②随访时间相对较短, 而 IgA 肾病属于慢性肾脏疾病, 部分患者到达研究终点的时间可能较长, 因此到达终点事件的人数较少, 可能造成结果偏倚, 有待后续进一步延长随访时间对结论进行验证。

综上所述, 血清 miR-181b 水平与 IgA 肾病病情严重程度及预后均呈显著相关性, 血清 miR-181b 越高, 病情越重, 预后越差。积极检测 IgA 肾病患者血清 miR-181b 水平可为患者的病情及预后评估提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 施映枫, 徐柳青, 庄守纲, 等. IgA 肾病患者病理与临床指标的相关性分析[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(10):1362-1367.  
SHI Yingfeng, XU Liuqing, ZHUANG Shougang, et al. Correlation between pathology and clinical indexes in IgA nephropathy patients [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University(Medical Science), 2017, 37(10):1362-1367.
- [2] 李卅立, 范秋灵, 赵洁, 等. IgA 肾病牛津分型与临床指标的相关性及危险因素分析[J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(1):1-6.

- LI Sali, FAN Qiuling, ZHAO Jie, et al. Risk factors and correlation analysis between the oxford classification and clinical indicators of IgA nephropathy [J]. Journal of China Medical University, 2017, 46(1):1-6.
- [3] 周飞, 李春国, 商明, 等. 肾脏疾病患者 262 例肾活检病理类型及流行病学特点[J]. 中国社区医师, 2018, 34(2):126, 128.  
ZHOU Fei, LI Chunguo, SHANG Ming, et al. Pathological type and epidemiological characteristics of renal biopsy in 262 patients with renal biopsy [J]. Chinese Community Doctors, 2018, 34(2):126, 128.
- [4] 文冬梅, 唐怡, 谭丽, 等. IgA 肾病预后预测标志物研究进展[J]. 山东医药, 2019, 59(24):102-105.  
WEN Dongmei, TANG Yi, TAN Li, et al. Research progress on prognostic markers of IgA nephropathy[J]. Shandong Medical Journal, 2019, 59(24):102-105.
- [5] IRAVANI SAADI M, ARANDI N, YAGHOBI R, et al. Aberrant expression of the miR-181b/miR-222 after hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia[J]. Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion, 2019, 35(3): 446-450.
- [6] 中华医学会儿科学分会肾脏学组. 原发性 IgA 肾病诊治循证指南(2016)[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(9):643-646.  
The Subspecialty Group of Renal Diseases, the Society of Pediatrics, Chinese Medical Association. Evidence-based guidelines for diagnosis and treatment of primary IgA nephropathy (2016) [J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2017, 55(9):643-646.
- [7] 张铮, 狄鼎新, 杨悦, 等. 老年 IgA 肾病患者临床病理特点及预后分析[J]. 中日友好医院学报, 2018, 32(6):330-333.  
ZHANG Zheng, DI Dingxin, YANG Yue, et al. Clinicopathological features and prognosis of elderly patients with IgA nephropathy [J]. Journal of China-Japan Friendship Hospital, 2018, 32(6):330-333.
- [8] GUO Feng, TANG Chengchun, LI Yawei, et al. The interplay of LncRNA ANRIL and miR-181b on the inflammation-relevant coronary artery disease through mediating NF- $\kappa$ B signalling pathway[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018, 22(10): 5062-5075.
- [9] 孙红旭, 卢嫣. IgA1 异常糖基化致 IgA 肾病肾系膜细胞增殖[J]. 国际泌尿系统杂志, 2017, 37(5):783-786.  
SUN Hongxu, LU Yan. Galactose - deficient IgA1 of mesangial cell proliferation in IgA nephropathy [J]. International Journal of Urology and Nephrology, 2017, 37(5):783-786.
- [10] 田秀娟, 黄晨. IgA 肾病免疫炎症发病机制研究进展[J]. 中华肾脏病杂志, 2020, 36(5):400-405.  
TIAN Xiujuan, HUANG Chen. Research progress on pathogenesis of immune inflammation in IgA nephropathy [J]. Chinese Journal of Nephrology, 2020, 36(5):400-405.
- [11] 潘旭鸣, 陈丹垒, 马红珍. miRNA 在肾脏缺血再灌注损伤中的作用研究进展[J]. 浙江医学, 2019, 41(10):1091-1095.