

论著·临床研究

nephrin、podocin 和 podocalyxin mRNA 在肾脏损伤患儿尿液中的表达情况分析*

肖伟伟¹, 谢媛媛², 杨 军³, 罗书立³, 马东礼^{1△}

(1. 深圳市儿童医院检验科, 广东深圳 518038; 2. 深圳市人民医院检验科, 广东深圳 518001; 3. 深圳市儿童医院肾脏免疫科, 广东深圳 518038)

摘要:目的 探究足细胞相关分子在尿液中的表达在临床诊断患儿肾脏损伤中的研究价值及意义。方法 选择 2016 年 1—3 月深圳市儿童医院肾脏免疫科住院患儿 85 例作为试验组, 选择同期于该院门诊体检且尿常规结果均排除血尿及蛋白尿的 18 例健康儿童作为健康对照组, 用反转录实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测试验组和健康对照组尿沉渣中 nephrin, podocin 及 podocalyxin(PCX)的表达。根据尿常规结果将试验组分为血尿组、蛋白尿组及混合组(血尿合并蛋白尿组), 并观察试验组中血清胱抑素 C(CysC)和血肌酐(Scr)水平与 PCX 的相关性。结果 (1)试验组 nephrin, podocin 及 PCX 表达阳性率显著高于健康对照组, 差异有统计学意义($\chi^2=13.849, 6.271, 9.650, P<0.05$)。 (2)混合组与蛋白尿组和血尿组间 podocin 阳性率比较, 差异有统计学意义($\chi^2=8.965, 6.115, P<0.05$)。 (3)PCX 阳性组血清 CysC 水平显著高于 PCX 阴性组, 血清 Scr 在 PCX 阳性组与阴性组中水平差异无统计学意义($t=1.299, P>0.05$)。结论 肾脏受损时足细胞相关分子 nephrin、podocin 和 PCX mRNA 水平表达异常增加, 这可能是血尿发生的分子机制, 联合检测血 CysC 有助于早期发现肾损伤。

关键词:尿液; nephrin; podocin; podocalyxin; 实时荧光定量 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.14.006

中图法分类号:R446.12

文章编号:1673-4130(2018)14-1683-04

文献标识码:A

Analysis of nephrin, podocin and podocalyxin mRNA in urine of children with kidney injury*

XIAO Weiwei¹, XIE Yuanyuan², YANG Jun³, LUO Shuli³, MA Dongli^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518038, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 524000, China; 3. Department of Nephrology and Immunology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518038, China)

Abstract: Objective To investigate the value and significance of podocyte related molecules in urine in clinical diagnosis of renal injury in children. **Methods** 85 children hospitalized in Department of Nephrology and Immunology in Shenzhen Children's Hospital from January to March in 2016 were selected as the experimental group, and 18 healthy children who underwent health assessment and did not have hematuria and proteinuria in routine urinalysis results were selected as the healthy control group. The expression levels of nephrin, podocin and podocalyxin(PCX) in experimental group and control group were detected by reverse transcription qPCR(RT-qPCR). According to the routine urinalysis, the experimental group was divided into hematuria group, proteinuria group and mixed group(hematuria and proteinuria group). The correlation between serum cystatin C(CysC) and serum creatinine(Scr) levels and PCX in the experimental group was also observed. **Results** (1) In urine, the expressions of nephrin, podocin and podocalyxin in experimental group were significantly higher than those of control group, and the differences were statistically significant ($\chi^2=13.849, 6.271, 9.650, P<0.05$). (2) The expression of podocin in mixed group was significantly higher than that in hematuria group and proteinuria group, and the difference was statistically significant ($\chi^2=8.965, 6.115, P<0.05$). (3) The levels of CysC in the group which expressed podocalyxin was significantly higher than the group without podocalyxin expression. There was no significant difference in Scr between them($t=1.299, P>$

* 基金项目: 深圳市病原体高通量基因测序技术工程实验室项目(深发改[2014]1712号文); 深圳市科技计划资助项目(JCYJ20160429181145972)。

作者简介: 肖伟伟, 女, 主管技师, 主要从事分子诊断及遗传性疾病的研究。 △ 通信作者, E-mail: mdl1234@126.com。

本文引用格式: 肖伟伟, 谢媛媛, 杨军, 等. nephrin、podocin 和 podocalyxin mRNA 在肾脏损伤患儿尿液中的表达情况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(14): 1683-1686.

0.05)。**Conclusion** When the kidney is injured, the expression of podocyte related molecules nephrin, podocin and PCX mRNA increases abnormally, this may be the molecular mechanism of hematuria too. Combined detection of serum CysC is beneficial for early kidney injury diagnosis.

Key words:urine; nephrin; podocin; podocalyxin; quantitative real-time PCR

儿童肾脏疾病发病率高,但是早期诊断指标匮乏,寻找快速的诊断及合适的分子标志物来检测早期肾脏病变是科研及临床工作者一致努力的目标,因此作为肾小球滤过屏障主要功能细胞的足细胞受到了普遍的关注^[1],其表面分子 nephrin 及 podocin 均为裂孔隔膜蛋白,两者可相互作用形成 nephrin 复合体,对裂孔隔膜的正常滤过功能发挥关键性作用^[2],podocalyxin(PCX)则是足细胞上重要的表面顶区蛋白,感染、免疫、缺血等均可导致肾小球滤过屏障功能受损及蛋白尿的产生。足细胞损伤导致其与肾小球基膜脱离并随尿液排泄至体外,因此通过检测尿中足细胞相关蛋白分子的表达情况可以判断肾脏损伤情况。本研究运用反转录实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测 nephrin、podocin 和 PCX mRNA 在肾脏疾病患儿及健康儿童尿液中的表达情况,以探讨尿足细胞相关分子检测在临床上的研究价值及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 1—3 月深圳市儿童医院肾内科住院患儿 85 例为研究对象纳入试验组,患儿年龄为 1~14 岁,平均(6.04±3.75)岁;其中男 64 例,女 21 例;男女比例为 3.05:1;肾病综合征患儿 52 例,急性肾炎 13 例,紫癜性肾炎 6 例,IgA 肾病 5 例,单纯性血尿 3 例,过敏性紫癜 3 例,狼疮性肾炎 1 例,蛋白尿查因 1 例,血尿查因 1 例。根据尿液分析全套检测结果显示潜血及蛋白质 2 项指标将试验组分为 3 个亚组:血尿组 17 例,蛋白尿组 23 例,混合组(血尿合并蛋白尿组)45 例。同时,选择同期于本院门诊体检且尿常规结果均排除血尿及蛋白尿的 18 例健康儿童作为健康对照组,年龄为 1~11 岁,平均(4.94±2.86)岁;其中男 14 例,女 4 例,男女比例为 3.50:1。两组儿童年龄和性别比较,差异无统计学意义($\chi^2=-0.856,0.000,P=0.392,1.000$),具有可比性。

1.2 仪器与试剂 NanoDrop1000 分光光度计检测每个标本总 RNA 浓度和纯度,浓度过低或纯度不好时重新提取总 RNA,标本量不足时剔除该标本。应用 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)提供的逆转录反应试剂及 EasyCycler 常规 PCR 仪(德国耶拿公司)进行尿液标本总 RNA 的逆转录,应用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)提供的 SYBR 法 PCR 扩增体系及 LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士罗氏公司)进行目标分子的 PCR 扩增;所检测 3 个目标分子各自的扩增引物均由上海英潍捷基公司合成。UF1000i&AX-4030 全自动尿液分析仪(日本 Sysmex

公司及 Arkray 公司)进行尿液常规检测。CysC 检测使用 CysC 测定试剂盒(免疫比浊法)(北京利德曼生化有限公司),Scr 检测采用 Scr 测定试剂盒(肌氨酸氧化酶法)(美国 BECKMAN COULTER 公司),均在 AU5810 全自动生化分析仪(美国 BECKMAN COULTER 公司)上进行检测。

1.3 方法 收集所有对象尿液标本 40~50 mL,4 000 r/min 4℃离心 8 min,去上清,留沉淀,经生理盐水洗涤 1 次,离心时间及转速同前,沉淀中加入 600 μL Trizol,-80℃保存。采用经典 Trizol 法提取尿液中总 RNA,NanoDrop2000 测定核酸浓度和纯度,应用 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒对总 RNA 进行逆转录,每个反应体系加入 5×PrimeScript RT Master Mix 4 μL,300 ng 总 RNA(根据各标本总 RNA 的浓度计算加入总 RNA 的量),以 ddH₂O 补充至总体积 20 μL,于 EasyCycler PCR 仪上进行逆转录反应,反应条件为 37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃ 5 s。应用 LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增,3 个目标分子及内参基因按照以下条件进行扩增:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环;95℃ 5 s,65℃ 60 s,95℃ 5 s,40 个循环。每个样本重复 3 次,cDNA 1 μL/孔。所有标本内参照 GAPDH 扩增均为阳性。所有结果由系统自动分析,得到各个目的基因 Ct 值,以对照组平均 Ct 值建立正常表达量,结合荧光扩增曲线及特定溶解曲线,判断阴阳性表达,判断标准:以出现典型 S 型扩增曲线同时溶解曲线成单峰判断为阳性,否则为阴性。引物设计见表 1。干燥管抽取 3~5 mL 静脉血,3 000 r/min 离心 10 min,取上清进行 CysC 及 Scr 的检测。

表 1 目的基因及内参基因引物序列及长度

基因	序列(5'~3')	引物长度 (bp)
podocin-F	CCT GCC TGG ATA CCT ACC ACA	21
podocin-R	GCA CAG CTT TAG ATA CAT GAG CA	23
PCX-F	TCC CAG AAT GCA ACC CAG AC	19
PCX-R	GGT GAG TCA CTG GAT ACA CCA A	21
nephrin-F	AGC TCG TGT CTC CCA GAG T	20
nephrin-R	CGT TCA CGT TTG CAG AGA TGT	22
GAPDH-F	ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC	22
GAPDH-R	TTG ACG GTG CCA TGG AAT TTG	22

1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件进行。试验组和对照组性别比较采用 χ^2 检验,由于试验组年龄为非正态分布,因此两组年龄比较采用两独立样本

的秩和检验。试验组足细胞相关分子目的基因表达阳性率的比较采用 χ^2 检验。试验组 3 个亚组间 CysC 及 Scr 均符合方差齐,比较采用单因素方差分析;PCX 阳性组和阴性组 CysC 和 Scr 的比较采用两独立样本的 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 nephrin、podocin 和 PCX 表达情况比较
试验组 85 例肾病患者中,尿足细胞分子 nephrin 总体阳性率为 16.5% (14/85), podocin 为 47.1% (40/85), PCX 为 71.8% (61/85)。健康对照组 18 例健康体检儿童中,尿足细胞分子 nephrin 阳性率为 0.0% (0/18), podocin 为 0.0% (0/18), PCX 为 33.3% (6/18), PCX 虽出现扩增曲线但是 Ct 值均较高,平均为 31.9 ± 2.0 。试验组 nephrin、podocin 和 PCX 表达显著高于健康对照组,差异有统计学意义($\chi^2=13.849$ 、

6.271、9.650, $P<0.05$)。
2.2 试验组 3 个亚组间 nephrin、podocin 及 PCX 表达情况比较
在血尿组、蛋白尿组和混合组中, PCX 和 nephrin 的表达情况差异无统计学意义($\chi^2=4.155, 3.248, P>0.05$),但是 PCX 均表现为高表达,在 3 组中的阳性率分别为 70.6%、56.5%、80.0%; podocin 在血尿组及蛋白尿组中的阳性表达率虽然不高,但是在混合组中的比例明显增高(64.4%),3 组间 podocin 的表达差异有统计学意义($\chi^2=11.645, P<0.05$),见表 2。podocin 组间两两比较,混合组 podocin 阳性率高于蛋白尿组和血尿组,差异均有统计学意义($\chi^2=8.965, 6.115, P<0.05$)。血尿组与蛋白尿组间比较, podocin 的表达差异无统计学意义($\chi^2=0.054, P>0.05$)。

表 2 实验亚组 3 种足细胞相关分子表达情况比较[n(%)]

分组	n	PCX		nephrin		podocin	
		—	+	—	+	—	+
血尿组	15	5(29.4)	12(70.6)	11(64.7)	6(35.3)	12(70.6)	5(29.4)*
蛋白尿组	23	10(43.5)	13(56.5)	20(87.0)	3(13.0)	17(73.9)	6(26.1)*#
混合组	43	9(20.0)	36(80.0)	31(32.8)	14(12.2)	16(35.6)	29(64.4)
χ^2		4.155		3.248		11.645	
P		0.125		0.197		0.003	

注:与混合组比较,* $P<0.05$;与血尿组比较,# $P>0.05$

2.3 试验组血清 CysC 和 Scr 的水平比较
单因素方差分析结果发现,三组间 CysC 和 Scr 血清水平差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 3。85 例试验组患儿中,PCX 阳性组 61 例,阴性组 24 例,阳性组血清 CysC 水平高于阴性组,差异有统计学意义($t=2.656, P<0.05$);阳性组血清 Scr 水平与阴性组比较,差异无统计学意义($t=1.299, P>0.05$),见表 4。

表 3 试验组血清 CysC 和 Scr 的水平

组别	n	CysC(mg/L)	Scr(μ mol/L)
血尿组	15	0.85 $\pm$ 0.06	49.03 $\pm$ 5.82
蛋白尿组	23	0.96 $\pm$ 0.09	51.39 $\pm$ 10.08
混合组	43	1.11 $\pm$ 0.66	54.20 $\pm$ 3.79
F		2.549	0.140
P		0.085	0.870

表 4 血清 Cysc 和 Scr 水平与 PCX 的关系

组别	n	CysC/(mg/L)	Scr/(μ mol/L)
PCX 阳性组	61	1.01 $\pm$ 0.45	52.92 $\pm$ 34.05
PCX 阴性组	24	0.87 $\pm$ 0.05	52.43 $\pm$ 35.89
t		2.656	1.299
P		0.010	0.197

3 讨 论

足细胞是肾小球滤过膜的重要组成,是维持肾脏滤过屏障的关键,尿液中检出损伤脱落的足细胞直接

反映肾脏损伤情况。VOGELMANN 等^[4]发现在成人对照组和儿童对照组尿液标本中,均有少量足细胞的存在且表达量并无统计学差异。本研究在对照组尿液标本中检出低表达的 PCX,也证实了健康儿童尿液中有足细胞存在,这也提示在判断肾脏损伤时,不仅应该观察足细胞是否存在,更应该观察其含量的高低。

有研究发现,尿中足细胞分子 mRNA 的增加是严重肥胖患者足细胞受损的标志^[5]。在子痫前期孕妇尿液中,随孕周增加,podocin 及 nephrin 的 mRNA 表达量也增加^[6-7]。与非增殖性肾病组和健康对照组相比,增殖性肾病组尿中足细胞分子 nephrin、podocin 和 PCX 水平及相关 mRNA 表达均增加^[8],对照组尿液中 podocin 和 PCX 表达量低于肾病组^[9]。动物实验和临床研究均已证实蛋白尿的发生与足细胞的丢失密切相关,并且足细胞尿的出现比蛋白尿发生更早^[3,10-12]。本研究依据临床表现分组(血尿组、蛋白尿组及混合组),结果表明,单纯出现血尿或蛋白尿时,3 种足细胞分子 nephrin、podocin、PCX mRNA 也均有升高,提示足细胞损伤不仅与蛋白尿的发生有关,而且与血尿的发生也存在一定关系,这与李莉等^[11]发现肾小球源性血尿组存在 PCX 高表达,而非肾小球源性血尿组及健康对照组均为低表达的结果存在部分一致性。

有研究发现,PCX 高表达可能是早期肾脏损伤的敏感指标^[12],本研究试验组中 PCX 差异虽无统计学意义但阳性率均较高,也提示了这一点。在肾小球疾病中,蛋白尿和尿足细胞检出率间存在明显相关性^[13],本研究发现在混合组中 podocin mRNA 阳性率较单纯血尿组和单纯蛋白尿组出现明显升高,而 nephrin 并没有明显升高,提示 podocin 与发生蛋白尿和血尿的关系较 nephrin 更紧密。在狼疮性肾炎患者肾脏组织包括 nephrin、podocin、PCX 等在内的多种足细胞分子相关 mRNAs 均低于健康对照组,而在尿液中均高于健康对照组,但 2 种标本中的表达量无明显相关性^[14],这提示临床不能仅根据尿中足细胞相关 mRNAs 的含量推断肾脏的损伤情况,还应结合其他临床表现等综合判断。

早期发现肾脏损伤在肾病诊治中非常重要,目前大量研究认为由于 CysC 能够经过肾脏完全排除,当肾小球出现轻微损伤时血中 CysC 的浓度即可出现升高,因此其对早期肾损害有明确的诊断价值^[15],临床应用价值优于 Scr。高娟梅^[16]发现妊娠糖尿病组血清 CysC 和尿 PCX 水平呈正相关,认为两者是可以反映妊娠糖尿病早期肾损伤的实验室指标。本研究纳入了 CysC 和 Scr 进行研究。经统计分析发现,CysC 在 PCX mRNA 阳性组中的血清水平高于阴性组,差异有统计学意义($t=2.656, P<0.05$),这说明尿中 PCX 和血 CysC 可能存在某种相关性,PCX 的表达可能提示早期肾脏功能损害,进一步影响了 CysC 的排泄,导致其在血清中的水平增加。

4 结 论

本研究运用 RT-qPCR 的方法发现足细胞相关分子 nephrin、podocin、PCX 在试验组中的表达阳性率均高于对照组,血尿的发生可能也和足细胞损伤密切相关,PCX 高表达可能是肾脏损伤的敏感指标,因此 RT-qPCR 检测尿足细胞相关分子的表达在临床上极具研究价值及意义,本研究进一步丰富了足细胞在诊断肾脏损伤中的应用价值,而严格筛选病人,加大标本留取量,同时研究 CysC 与 PCX 的关系将成为笔者下一步的研究重点。

参考文献

- [1] PETERMANN A, FLOEGE J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity[J]. *Nephron Clin Pract*, 2007, 106(2): 61-66.
- [2] PATRAKKA J, TRYGGVASON K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(1): 164-169.
- [3] MA D, ZHONG S, LIU X, et al. CD3D and PRKCQ work

- together to discriminate between B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Comput Biol Med*, 2016, 77: 16-22.
- [4] VOGELMANN S U, NELSON W J, MYERS B D, et al. Urinary excretion of viable Podocytes in health and renal disease[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 285(1): 40-48.
 - [5] PEREIRA S V, DOS SANTOS M, RODRIGUES P G, et al. Increased urine podocyte-associated messenger RNAs in severe obesity are evidence of podocyte injury[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2015, 23(8): 1643-1649.
 - [6] FURUTA I, ZHAI T, ISHIKAWA S, et al. Association between nephrinuria, podocyturia, and proteinuria in women with preeclampsia[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2017, 43(1): 34-41.
 - [7] ZHAI T, FURUTA I, AKAISHI R, et al. Alteration of podocyte phenotype in the urine of women with preeclampsia[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24258.
 - [8] RODRIGUES P G, BRINGHENTI R N, NASCIMENTO J F, et al. Expression patterns of podocyte-associated mRNAs in patients with proliferative or non-proliferative glomerulopathies[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(5): 2185-2198.
 - [9] 林宜, 朱斌, 朱晓玲, 等. 肾小球疾病患者尿沉渣足细胞分子 podocin 和 podocalyxin 分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2011, 12(8): 690-694.
 - [10] ARMELLONI S, CORBELLINI A, GIARDINO L, et al. Podocytes: recent biomolecular developments[J]. *Biomol Concepts*, 2014, 5(4): 319-330.
 - [11] 李莉, 张碧丽. 尿 Podocalyxin 鉴别儿童血尿来源的价值[J]. *实用中国儿科临床杂志*, 2011, 26(5): 357-359.
 - [12] SHOJI M, KOBAYASHI K, TAKEMOTO M, et al. Urinary podocalyxin levels were associated with urinary albumin levels among patients with diabetes[J]. *Biomarkers*, 2016, 21(2): 164-167.
 - [13] WICKMAN L, AFSHINIA F, WANG S Q, et al. Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24: 2081-2095.
 - [14] DOS SANTOS M, BRINGHENTI R N, RODRIGUES P G, et al. Podocyte-associated mRNA profiles in kidney tissue and in urine of patients with active lupus nephritis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4600-4613.
 - [15] 罗琳. 血清 β_2 -微球蛋白、尿微量清蛋白、血清胱抑素 C 在高血压病早期肾损害诊断的意义[J]. *长江大学学报(自科版)*, 2016, 13(36): 11-13.
 - [16] 高娟梅. 血清 CysC 和尿 PCX 在妊娠糖尿病早期肾损害诊断中的应用价值[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(5): 70-71.