

论著 · 临床研究

糖尿病肾病患者尿液中 miR-30、miR-125 变化的临床意义及其与足细胞损伤的关系

宋丽影, 单新平, 李 玲

(国家电网公司北京电力医院内分泌科, 北京 100073)

摘要:**目的** 探讨糖尿病肾病(DKD)患者尿液中 miR-30、miR-125 变化的临床意义及其与足细胞损伤的关系。**方法** 2017 年 3 月至 2019 年 3 月间在该院确诊为糖尿病肾病的患者 88 例作为 DKD 组,同期在该院首诊为 2 型糖尿病且肾功能正常的单纯糖尿病患者 50 例作为单纯糖尿病组;在该院进行体检并明确各个组织脏器功能均基本正常的志愿者 50 例作为健康对照组。对比 3 组研究对象尿液 miR-30、miR-125 表达水平,外周血肾功能指标[血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、 β_2 微球蛋白(β_2 -M)]水平,尿足细胞损伤标志物(podocalyxin、nephrin、podocin)的差异,采用 Pearson 检验评估 DKD 患者尿液中 miR-30、miR-125 表达水平与病情严重程度的相关关系。**结果** DKD 组患者尿液中 miR-30、miR-125 的表达量均低于单纯糖尿病组、健康对照组;外周血中 Scr、BUN、 β_2 -M 的水平均高于单纯糖尿病组、健康对照组;尿 podocalyxin、nephrin、podocin 的水平均高于单纯糖尿病组、健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),单纯糖尿病组、健康对照组间上述指标水平的差异无统计学意义($P>0.05$)。相关性分析发现,DKD 患者尿 miR-30、miR-125 表达量与肾功能指标、尿足细胞损伤标志物水平呈负相关性($P<0.05$)。**结论** DKD 患者尿 miR-30、miR-125 表达量异常降低,可间接反映肾功能及足细胞损伤程度。

关键词:糖尿病肾病; miR-30; miR-125; 肾功能; 足细胞损伤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.20.017 **中图法分类号:**R587.2;R692.9

文章编号:1673-4130(2019)20-2504-04 **文献标识码:**A

Clinical significance of miR-30, miR-125 changes in urine of diabetic nephropathy patients and their relationship with podocyte injury

SONG Liying, SHAN Xinping, LI Ling

(Department of Endocrinology, Beijing Electric Power Hospital of State Grid Corporation, Beijing 100073, China)

Abstract:**Objective** To investigate the clinical significance of miR-30, miR-125 changes in urine of diabetic nephropathy (DKD) patients and their relationship with podocyte injury. **Methods** A total of 88 cases of DKD patients diagnosed in our hospital from March 2017 to March 2019 were chosen as DKD group, 50 cases of type 2 diabetes patients with normal renal function were chosen as simple diabetes group, 50 cases of healthy volunteers were chosen as healthy control group. The expression levels of urinary miR-30, miR-125, peripheral blood kidney indexes[serum creatinine(Scr), urea nitrogen(BUN), β_2 microglobulin(β_2 -M)], urinary podocyte damage markers(podocalyxin, nephrin and podocin) were compared between three groups. The levels of miR-30 and miR-125 in urine of DKD patients was evaluated by Pearson test. The expression level was correlated with the severity of the disease. **Results** The expression levels of miR-30 and miR-125 in urine of DKD group were lower than those in simple diabetes group and healthy control group; the levels of Scr, BUN and β_2 -M in peripheral blood were all higher than those in simple diabetes group and healthy control group; the levels of urinary podocalyxin, nephrin and podocin were all higher than those of simple diabetes group and healthy control group ($P<0.05$), there were no statistically significant difference between simple diabetes group and normal control group($P>0.05$). The correlation analysis showed that the expression levels of urinary miR-30 and miR-125 in DKD patients were negatively correlated with renal function and the level of urinary podocyte damage markers($P<0.05$). **Conclusion** The abnormal abnormal decrease of urinary

作者简介:宋丽影,女,主治医师,主要从事内分泌与代谢病方面的研究。

本文引用格式:宋丽影,单新平,李玲.糖尿病肾病患者尿液中 miR-30、miR-125 变化的临床意义及其与足细胞损伤的关系[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(20):2504-2507.

miR-30 and miR-125 in DKD patients can indirectly reflect the degree of renal function and podocyte injury.

Key words: diabetic nephropathy; miR-30; miR-125; renal function; podocyte injury

糖尿病是临床发病率最高的内分泌疾病,目前我国是糖尿病发病率最大的国家,血糖控制不佳者相关并发症的发生率也将大幅提升。糖尿病肾病(DKD)是糖尿病最重要的致死性并发症^[1-2],其具体发病机制至今未明,寻找并明确在 DKD 发生发展过程中扮演关键角色的因子并进行针对性干预是当下该病治疗的新思路及研究热点。miRNA 是一种内源性非编码小分子 RNA,可在转录水平与靶基因 mRNA 的 3'端非编码区进行完全互补/不完全互补结合,从而调控基因表达并影响一系列疾病转归。JOGLEKAR 等^[3]的研究指出 miR-30 是胰腺上皮细胞间充质转化过程中细胞反应调控信号事件的一部分;NOREN 等^[4]的研究指出,miR-125 与衰老相关且二甲双胍可调节其表达,推测 miR-30、miR-125 可能参与糖尿病胰岛细胞衰老及功能异常,但国内相关研究尚未涉及。文中检测 DKD 患者的尿 miR-30、miR-125 表达水平,进一步分析其与病情严重程度的内在联系,以期明确 miR-30、miR-125 在 DKD 发生发展中扮演的角色及日后作为疾病治疗靶点的可能性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 3 月至 2019 年 3 月间在本院确诊为糖尿病肾病的患者 88 例作为 DKD 组,其中,男 46 例,女 42 例,平均(51.62±7.85)岁,体质指数(23.04±2.87)kg/m²,符合中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组制定的《糖尿病肾病防治专家共识(2014 年版)》^[5]中对该病的定义:尿清蛋白/肌酐比值>30 mg/g,或者肾小球滤过率<60 mL/min/1.73m²、持续时间>3 月。纳入标准:(1)首次确诊 DKD、既往未经相关治疗;(2)规律服用降糖药≥6 月;(3)年龄 18~79 岁;(4)本人签署知情同意书。排除标准:(1)合并其他病因所致肾功能损伤;(2)既往急性肾炎、外伤性肾损伤等肾脏损害性疾病病史;(3)合并狼疮性肾炎;(4)妊娠或哺乳期女性。同期在本院首诊为 2 型糖尿病且肾功能正常的单纯糖尿病患者 50 例作为单纯糖尿病组,其中男 26 例,女 24 例,平均(52.04±6.94)岁,体质指数(23.10±2.69)kg/m²,在本院进行体检并明确各个组织脏器功能均基本正常的志愿者 50 例作为健康对照组,其中男 27 例,女 23 例,平均(51.83±7.11)岁,体质指数(22.96±3.14 kg/m²)。3 组研究对象的性别、年龄、体质指数分布差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 尿液中 miR-30、miR-125 表达量检测 所有入组患者取晨起中段尿 3 mL,1 h 内送至检验科离心,1 000 r/min 离心 10 min 并收集上清,吸取 400 μ L 尿上清液至无 RNA 酶离心管中,经 miRNA 提取试剂

盒(购自上海恪敏生物科技有限公司)说明提取尿总 RNA,加入 400 μ L 变性液后涡旋混匀并低温静置 5 min,加入 5 μ L 标准品工作液,即刻震荡。经逆转录试剂盒(购自美国 Roche 公司)说明合成 miRNA-茎环引物 cDNA,与 TaqMan 探针进行 TaqMan q-PCR 反应,反应体系包括: TaqMan 通用混合试剂 10 μ L、miRNA 特异性引物 1 μ L、miRNA 反转录产物 9 μ L,共 20 μ L;反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10min→95 $^{\circ}$ C 15 s,40 个循环→62 $^{\circ}$ C 1 min。最后收集荧光信号并进行熔解曲线分析,设置正常对照组的 miRNA 表达量为标准值 100,计算 DKD 组、单纯糖尿病组尿液标本中 miR-30、miR-125 的相对表达量。

1.3 肾功能指标 留取 3 组研究对象的空腹外周静脉血标本,采用德国利霸 XL300 全自动生化分析仪检测肾功能指标水平,包括血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、 β_2 微球蛋白(β_2 -M)。

1.4 尿足细胞损伤标志物 留取 3 组研究对象的晨起中段尿 3 mL,采用酶联免疫吸附法检测其中足细胞损伤标志物的水平,包括 podocalyxin、nephrin、podocin。酶联免疫试剂盒均购自上海西唐生物科技公司。

1.5 统计学处理 软件 SPSS20.0 对文中数据进行计算。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,3 组间比较采用方差分析、组间两两比较采用 LSD 法;计数资料以率(%)表示,3 组间比较采用 χ^2 检验。两种数据间的相关性分析采用 Pearson 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 尿液中 miR-30、miR-125 表达量 3 组研究对象尿液中 miR-30、miR-125 表达量的差异有统计学意义($P<0.05$)。DKD 组患者尿液中 miR-30、miR-125 的表达量均低于单纯糖尿病组、健康对照组($P<0.05$),单纯糖尿病组、健康对照组间尿液中 miR-30、miR-125 表达量的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 3 组研究对象尿液中 miR-30、miR-125 表达量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	miR-30	miR-125
DKD 组	88	60.85±8.19	72.16±8.33
单纯糖尿病组	50	101.36±13.47	99.72±11.28
健康对照组	50	100	100
F/P		466.730/0.000	270.739/0.000
t/P _{DKD组 vs. 健康对照组}		33.748/0.000	23.595/0.000
t/P _{单纯糖尿病组 vs. 健康对照组}		0.714/0.238	0.176/0.431
t/P _{DKD组 vs. 单纯糖尿病组}		21.982/0.000	16.383/0.000

2.2 肾功能指标 3 组研究对象外周血 Scr、BUN、 β_2 -M 水平的差异有统计学意义($P<0.05$)。DKD 组患者外周血中 Scr、BUN、 β_2 -M 的水平均高于单纯糖尿病组、健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),单纯糖尿病组、健康对照组间 Scr、BUN、 β_2 -M 水平的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.3 尿足细胞损伤标志物 3 组研究对象尿足细胞

损伤标志物(podocalyxin、nephrin、podocin)水平的差异有统计学意义($P<0.05$)。DKD 组患者尿 podocalyxin、nephrin、podocin 的水平均高于单纯糖尿病组、健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),单纯糖尿病组、健康对照组间尿 podocalyxin、nephrin、podocin 水平的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2 3 组研究对象静脉血肾功能指标水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Scr(μ mol/L)	BUN(μ mol/L)	β_2 -M(mg/L)
DKD 组	88	162.40 $\pm$ 21.75	12.37 $\pm$ 1.92	3.18 $\pm$ 0.45
单纯糖尿病组	50	90.63 $\pm$ 11.84	6.01 $\pm$ 0.74	1.50 $\pm$ 0.17
健康对照组	50	89.32 $\pm$ 10.17	5.87 $\pm$ 0.82	1.47 $\pm$ 0.20
<i>F/P</i>		427.836/0.000	470.595/0.000	607.147/0.000
<i>t/P</i> _{DKD组 vs. 健康对照组}		22.383/0.000	22.760/0.000	26.044/0.000
<i>t/P</i> _{单纯糖尿病组 vs. 健康对照组}		0.593/0.277	0.896/0.186	0.808/0.210
<i>t/P</i> _{DKD组 vs. 单纯糖尿病组}		21.566/0.000	22.760/0.000	25.357/0.000

表 3 3 组研究对象尿足细胞损伤标志物水平的比较(pg/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	podocalyxin	nephrin	podocin
DKD 组	88	74.29 $\pm$ 9.18	60.53 $\pm$ 8.42	102.17 $\pm$ 14.59
单纯糖尿病组	50	40.64 $\pm$ 5.83	29.77 $\pm$ 4.50	40.66 $\pm$ 5.81
健康对照组	50	39.04 $\pm$ 5.21	29.35 $\pm$ 4.31	41.04 $\pm$ 5.97
<i>F/P</i>		498.152/0.000	514.628/0.000	742.745/0.000
<i>t/P</i> _{DKD组 vs. 健康对照组}		24.941/0.000	24.405/0.000	28.277/0.000
<i>t/P</i> _{单纯糖尿病组 vs. 健康对照组}		1.447/0.076	0.477/0.317	0.323/0.374
<i>t/P</i> _{DKD组 vs. 单纯糖尿病组}		23.361/0.000	23.938/0.000	28.517/0.000

2.4 相关性分析 Pearson 检验发现,DKD 患者尿液中 miR-30、miR-125 的表达水平与肾功能指标 Scr、BUN、 β_2 -M 的水平呈负相关性;与尿足细胞损伤标志物 podocalyxin、nephrin、podocin 的水平呈负相关性($P>0.05$)。见表 4。

表 4 DKD 患者尿液中 miR-30、miR-125 的表达水平与病情的相关性分析

组别	miR-30		miR-125	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Scr	-0.680	0.006	0.643	0.011
BUN	-0.703	0.000	0.699	0.000
β_2 -M	-0.715	0.000	0.720	0.000
podocalyxin	-0.576	0.021	0.641	0.013
nephrin	-0.597	0.018	0.625	0.015
podocin	-0.663	0.009	0.703	0.000

3 讨 论

有研究发现在葡萄糖刺激下胰岛 β 细胞中的

miR-30 可促进胰岛素基因表达,并恢复部分炎症细胞因子导致的胰岛素分泌受阻,是机体血糖稳定的保护因子之一^[6]。miR-125 被发现通过调节 P38/MAPK 信号通路与肿瘤进展密切相关,高糖状态下其表达下调并导致细胞凋亡^[7]。鉴于 miR-30、miR-125 对血糖水平的敏感反应,推测其在糖尿病及相关并发症发生发展中也扮演关键角色。文中 DKD 患者尿 miR-30、miR-125 表达量均较低,而其在单纯糖尿病患者尿液中的表达量尚处于稳定状态,可能糖尿病初期阶段尚不会引起 miR-30、miR-125 的明显改变,从以上结果推测 miR-30、miR-125 的异常低表达参与 DKD 的病情演进过程。

DKD 患者随病情进展可表现出不同程度的肾功能损伤,Scr、BUN、 β_2 -M 是临床反映肾功能的最常见指标,当肾小球滤过功能下降时上述指标水平随之增高,具体水平与肾功能损害程度呈正相关性^[8-9]。文中 DKD 患者的 Scr、BUN、 β_2 -M 水平较高,而单纯糖尿病组患者上述肾功能指标水平基本处于正常范围,这与其肾脏损害现状吻合。相关性分析指出,DKD

患者尿 miR-30、miR-125 表达水平与以上肾功能指标水平呈负相关性,说明尿 miR-30、miR-125 水平可客观反映 DKD 患者的肾功能损伤程度、间接反映其病情。蛋白尿是 DKD 早期最突出的临床表现之一,而足细胞凋亡、数量减少等是公认的 DKD 蛋白尿出现及病情进展的重要始动因素^[10-11]。足细胞是终末分化的肾小球细胞,其与肾小球基底膜、内皮细胞等共同组成肾小球滤过屏障^[12-13],其间裂隙膜由 podocalyxin、nephrin、podocin 等蛋白组成,功能及数量正常是足细胞发挥精密滤过作用的重要基础,当足细胞损伤并脱落时尿液中 podocalyxin、nephrin、podocin 的表达量增加,且这一变化在肾脏损伤早期即可出现^[14-16]。文中 DKD 患者尿 podocalyxin、nephrin、podocin 的表达水平均呈上升趋势,而单纯糖尿病患者尿液中上述蛋白表达量尚无明显变化;相关性分析表明,DKD 患者尿 miR-30、miR-125 水平与上述足细胞损伤标志蛋白表达量呈负相关性,推测尿 miR-30、miR-125 水平可能参与 DKD 患者的足细胞损伤、其表达量可间接反映 DKD 患者的病情严重程度,这与上文 DKD 患者肾功能变化情况及其与 miR-30、miR-125 水平的相关性吻合。

4 结 论

DKD 患者存在尿液 miR-30、miR-125 异常低表达,具体表达量与肾功能指标水平、尿足细胞损伤标志物水平均呈负相关性,可能是 DKD 发生发展过程中的重要因子。关于 miR-30、miR-125 表达下调参与 DKD 病情进展的具体途径文中未涉及,且纳入病例数量有限,可能对数据产生一定偏倚,有待后续基础及大样本临床研究进一步展开并夯实研究结论。

参考文献

- [1] MOU X,ZHOU D Y,LIU Y H,et al. Identification of potential therapeutic target genes in mouse mesangial cells associated with diabetic nephropathy using bioinformatics analysis[J]. Exp Ther Med,2019,17(6):4617-4627.
- [2] GE C,XU M,QIN Y,et al. Fisetin supplementation prevents high fat diet-induced diabetic nephropathy by repressing insulin resistance and RIP3-regulated inflammation[J]. Food Funct,2019,10(5):2970-2985.
- [3] JOGLEKAR M V,PATIL D,JOGLEKAR V M,et al. The miR-30 family microRNAs confer epithelial phenotype to human pancreatic cells[J]. Islets,2009,1(2):137-147.

- [4] NOREN HOOTEN N, MARTIN-MONTALVO A, DLUZEN DF, et al. Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence[J]. Aging Cell,2016,15(3):572-581.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组. 糖尿病肾病防治专家共识(2014 年版)[J]. 中华糖尿病杂志,2014,6(11):792-801.
- [6] MIRANDA K,YANG X,BAM M,et al. MicroRNA-30 modulates metabolic inflammation by regulating Notch signaling in adipose tissue macrophages[J]. Int J Obes (Lond),2018,42(6):1140-1150.
- [7] 夏世国,张泽锦,岑玉蓉,等. MiR-125 通过调控 P38-Sirt1-P53 信号通路参与高糖诱导的足细胞损伤[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2018,19(5):382-387.
- [8] 周焰. 低剂量白细胞介素 17A 对糖尿病肾病大鼠肾功能保护作用的研究[J]. 标记免疫分析与临床,2017,24(3):282-285.
- [9] SATO E,AMAHA M,NOMURA M,et al. LDL-apheresis contributes to survival extension and renal function maintenance of severe diabetic nephropathy patients: a retrospective analysis[J]. Diabetes Res Clin Pract,2014,106(2):241-246.
- [10] 林兵英,罗晓燕,方周宾,等. 尿液中的足细胞标志蛋白定量检测应用于糖尿病和糖尿病肾病诊断中的价值比较[J]. 标记免疫分析与临床,2019,26(4):604-607.
- [11] 严瑞红,卢宏柱. 微小病变蛋白尿产生的机制研究进展[J]. 实用医学杂志,2018,34(22):3824-3827.
- [12] 程金波,熊加川. 肾脏足细胞 B7-1 抗原呈递与 CTLA4-Ig 研究进展[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2019,28(1):68-72.
- [13] 颜平,张蕊. 糖尿病肾病足细胞病理生理机制研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2019,20(1):90-92.
- [14] REN X,LIU G,WANG Y,et al. Influence of dipeptidyl peptidase-IV inhibitor sitagliptin on extracellular signal-regulated kinases 1/2 signaling in rats with diabetic nephropathy[J]. Pharmacology,2017,100(1/2):1-13.
- [15] LIU L,YANG L,CHANG B,et al. The protective effects of rapamycin on cell autophagy in the renal tissues of rats with diabetic nephropathy via mTOR-S6K1-LC3II signaling pathway[J]. Ren Fail,2018,40(1):492-497.
- [16] TRASINO S E,TANG X H,SHEVCHUK M M,et al. Amelioration of diabetic nephropathy using a retinoic acid receptor β 2 agonist[J]. J Pharmacol Exp Ther,2018,367(1):82-94.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-05-02)