DOI:10.16016/j.1000-5404.201409047

论著

MicroRNA-30a 在评估慢性肾衰竭血液透析效果中的作用

唐建英,雷湫宇,张 莹,王沂芹,王代红,赵景宏 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科)

[摘要] **目的** 分析 microRNA-30a (miR-30a)在慢性肾衰竭患者透析前后血清中的表达差异,评价其在评估慢性肾衰竭血液透析效果中的作用。**方法** 选取2012年10月至2013年12月本科收治的慢性肾衰竭患者40例,分别在患者透析前后采血并获得血清样本,采用 mirVana PARIS Kit 提取血清样本中总 RNA,利用 qRT-PCR 法检测 miR-30a 的表达,临床生化检测患者透析前后血清中肌酐(Cr)、尿素氮(Ur)及 β2 微球蛋白(β2-MG)的含量,表达值行曼-惠特尼 U 检验,工作特征曲线(ROC curve)评估 miR-30a 在慢性肾衰竭患者透析效果中的价值。**结果** miR-30a、Ur 和 β2-MG 在慢性肾衰竭患者透析后的表达显著低于透析前($P<0.05$,$P<0.01$),ROC curve 显示在患者透析后 miR-30a 的表达低于透析前0.25倍以上时患者可获得较好的透析效果。**结论** miR-30a 可作为一种潜在的评估慢性肾衰竭血液透析效果的生物标志物。

[关键词] MiR-30a;慢性肾衰竭;透析
[中图法分类号] Q522; R446.112; R459.5 [文献标志码] A

Role of miR-30a in evaluation of dialysis effect in chronic renal failure patients

Tang Jianying, Lei Qiuyu, Zhang Ying, Wang Yiqin, Wang Daihong, Zhao Jinghong (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To analyze the expression level of miR-30a in the serum of patients with chronic renal failure before and after dialysis, and assess its role of miR-30a in the evaluation of dialysis effect for the patients. **Methods** Forty patients with chronic renal failure admitted in our department from October 2012 to December 2013 were recruited in this study. Their blood samples were obtained before or after dialysis. The total RNAs were extracted from the serum samples by mirVana PARIS Kit, and the expression of miR-30a was detected by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). The serum levels of urea nitrogen (Ur) and β2-microglobulin (β2-MG) were measured by biochemical assay. Mann-Whitney U test were used to analyze serum miR-30a expression before or after dialysis with the levels of Ur and β2-MG. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the value of miR-30a in distinguishing the patients before dialysis from those after dialysis. **Results** The levels of miR-30a, Ur and β2-MG were significantly lower in the serum of patients after dialysis than the values before dialysis ($P<0.05$, $P<0.01$). ROC curve revealed that the cutoff value was 0.25 (after dialysis/before dialysis) for the serum level of miR-30a, indicating a better dialysis effect. **Conclusion** miR-30a is a novel biomarker in the evaluation of dialysis effect in the patients with chronic renal failure.

[**Key words**] miR-30a; chronic renal failure; dialysis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800528). Corresponding author: Zhao Jinghong, E-mail:zhaojh@tmmu.edu.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30800528)
[通信作者] 赵景宏,E-mail:zhaojh@tmmu.edu.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141217.1324.001.html(2014-12-17)

慢性肾衰是临床常见病、多发病,是多种原因引起的缓慢进行性肾脏功能不可逆性损害,最终导致终末期肾功能衰竭,并引起临床的一系列症状和生化、内分泌改变的综合征[1]。血液透析目前是终末期肾功能

衰竭患者的主要替代治疗方法之一,其治疗目标是提高慢性肾衰人群的长期存活率、改善患者生存质量、提高社会回归率,而影响慢性肾衰透析患者生存质量的主要因素是透析充分性。目前主要通过检测透析前后尿素氮对透析充分性进行量化,由于尿素氮是小分子物质,因而不能作为中大分子毒素清除效果的评估。而中大分子的清除效果通过β微球蛋白下降率评估。由于慢性肾衰竭患者个体的异质性,所以这些标志物的值存在较大差异。

微小RNAs(microRNAs,miRNAs)是一类长度约22 nt的内源性非编码小RNA分子,通过降解mRNA分子或抑制其翻译实现对基因的表达调控[2-7]。miRNAs在多种肾脏疾病中表达异常,并与疾病的进程密切相关[8-12]。近年研究表明miRNA在人体体液(血液、尿液等)中的表达十分稳定,因此,可将其作为一种新的非侵袭性的生物标志物检测疾病的发生或进行预后判断[13-16]。研究[17]发现,miR-30a在肾病综合征患者血浆中有特异的表达谱,提示miR-30a可作为检测肾病综合征的独立的生物标志物。我们推测与肾病密切相关的miR-30a在肾病患者透析前后呈现显著的表达差异,进而可作为评估肾病患者透析效果的一种有效的生物标志。本研究检测miR-30a在慢性肾衰竭患者透析前后的表达变化,并与尿素氮和β2微球蛋白标志进行比较,分析miR-30a在评价慢性肾衰竭患者透析效果中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本 选择我中心2012年10月至2013年12月慢性肾衰竭患者血清样本,共40例,包括慢性肾小球肾炎17例,糖尿病肾病13例,高血压肾病10例。包括男性22例,女性18例,年龄32~77(57.5±25.5)岁。透析频率为3次/周。血液样本采集标准:透析前,即透析开始前从静脉端内瘘穿刺针处留取患者血液样本;透析后,即透析将结束时,设定超滤速度为0,然后减慢血流速度至100 mL/min,15~30 s后从动脉端留取患者血液样本。检测透析前、后尿素氮、β2微球蛋白的含量,以评估慢性肾衰竭患者透析效果。本研究获本院伦理委员会批准。

1.1.2 试剂及仪器 mirVana PARIS kit购于美国Ambion公司,C. elegans miR-39(cel-miR-39)标准品购于上海吉玛公司,*Taq*Man MicroRNA Reverse Transcription Kit、*Taq*Man MicroRNA Assays购于美国ABI公司,Premix *ExTaq*™(Perfect Real Time)购于大连TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取 取400 μL血清样本,采用mirVana PARIS kit按操作步骤提取血清样本中总RNA,用90 μL预热至95 ℃的无核酸酶水对提取的RNA进行溶解。在血清样本用denature试剂处理后加入10 μL浓度为0.05 nmol/L的cel-miR-39。

1.2.2 qRT-PCR 按照*Taq*Man MicroRNA Reverse Transcription Kit试剂说明加入逆转录反应试剂,miR-30a逆转录引物、总RNA等。逆转录条件:16 ℃,30 min;42 ℃,30 min;85 ℃,4 min。合成的cDNA作为模版进行qPCR扩增,根据Premix *ExTaq*试剂盒说明加入Premix、miR-30a扩增引物/探针等。qPCR条件:95 ℃,2 min;40次循环于95 ℃,15 s;60 ℃,30 s,采集荧光。20 μL体系,外源cel-miR-39作为内参。

1.2.3 计算公式 根据《血液净化标准操作规程(2010版)》提供的尿素清除指数(Kt/V)计算公式:-ln[透后血尿素/透前血尿素-0.008×治疗时间]+[4-3.5×透后血尿素/透前血尿素]×(透后体质量-透前体质量)/透后体质量;尿素下降率(URR)计算公式:[(透前血尿素-透析后尿素)/透前血尿素]×100%;β2微球蛋白下降率计算公式:[(透前β2微球蛋白-透后β2微球蛋白)/透前β2微球蛋白]×100%。

1.3 统计学处理

采用SPSS 15.0统计软件,计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,采用曼-惠特尼U检验分析miR-30a在慢性肾衰竭患者血清中的表达、尿素氮及β2微球蛋白含量。采用工作特征曲线分析miR-30a作为生物标志评估透析效果的价值。

2 结果

2.1 Kt/V、URR和β2微球蛋白下降率评价慢性肾衰患者透析效果

检测透析前、后尿素氮,β2微球蛋白的含量:Kt/V为(1.23±0.11),URR为(66.72+8.79)%,β2微球蛋白下降率为(37.63±18.71)%,提示患者透析充分。见表1。

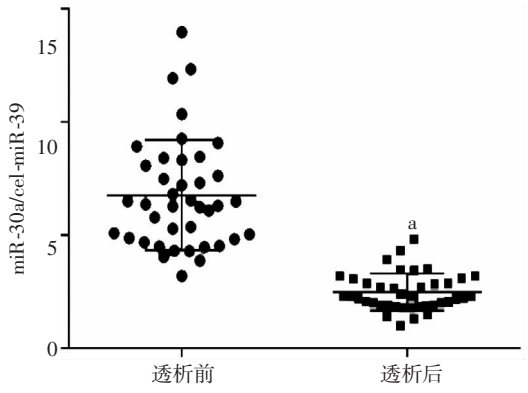
表1 慢性肾衰竭患者透析前后血清中Cr、β2-MG的表达变化($\bar{x}\pm s$)

检测时间	尿素氮(mmol/L)	miR-30a	β2微球蛋白(mg/L)
治疗前	24.15±4.33	6.77±2.40	22±4
治疗后	11.33±3.33[a]	2.48±0.82[a]	12±3[a]

a:$P<0.05$,与治疗前比较

2.2 慢性肾衰竭患者透析前后血清中 miR-30a 的表达

分析 miR-30a 在慢性肾衰竭患者透析前后血清中的表达,提取血清中的总 RNA,对 miR-30a 进行扩增,以外源的 cel-miR-39 作为内参,患者透析后血清中 miR-30a 的表达显著低于透析前($P<0.01$,图 1),提示 miR-30a 的表达在患者透析后降低。



a:$P<0.01$,与透析前比较

图 1 miR-30a 在慢性肾衰竭患者透析前后血清中的表达

2.3 ROC 评价 miR-30a

为了分析 miR-30a 在评价慢性肾衰竭患者透析效果中的作用,我们采用 ROC 方法对 miR-30a 的检测价值进行评估,ROC 曲线下面积显示 miR-30a 为 0.987 5,当 miR-30a 在患者透析后的表达为透析前的 0.25 倍时,敏感性为 95%,特异性为 95%(图 2),提示 miR-30a 可作为一种有效的生物标志评价慢性肾衰竭患者透析效果。

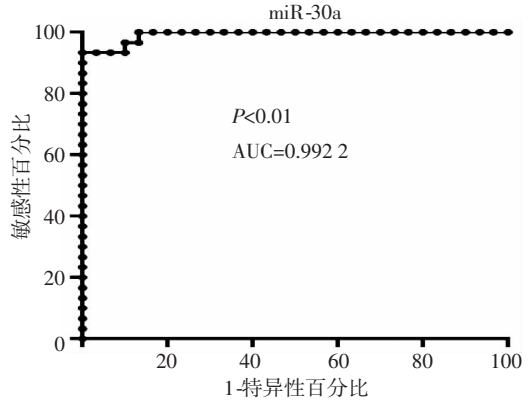


图 2 工作特征曲线分析 miR-30a 评估慢性肾衰竭患者透析效果的价值

3 讨论

血液透析是慢性肾衰患者主要替代治疗方式,能调整慢性肾衰患者水、电解质、酸碱平衡,清除各种尿毒症毒素。实现透析充分性是透析患者的治疗目标。目前用于评价透析充分性量化指标有 Kt/V 和 URR,因仅仅反映小分子的水溶性毒素清除效果,在临床中的应用受到质疑。MicroRNAs 在细胞外和人体体液中能被稳定检测,并作为一种非侵袭性的生物标志用于检测各种疾病的发生发展或预后判断。本研究对慢性肾衰竭患者透析前后血清中 miR-30a 的表达,血肌酐、尿素氮及 β2 微球蛋白的含量进行了分析,发现患者透析后 miR-30a 的表达显著降低,工作特征曲线显示出 miR-30a 具有与 Kt/V、URR 和 β 微球蛋白较好的相关性,为临床分析透析效果提供了新的思路。

文献证实 miRs 主要通过病灶组织细胞异常分泌至血液中,并反复作用于病灶组织细胞,加快病理进程。因此,对血液中 miRs 的清除可有效地减弱血液中 miRs 对病灶组织细胞的刺激作用,进而减缓疾病进程。既往研究[17-19]发现 miR-30a 在儿童肾病综合征、急性移植物肾病、糖尿病儿童患者血清和尿液中的表达显著上调,而在临床治疗后又恢复至正常水平,提示 miR-30a 在一定程度上反映了慢性肾病的病理进程。本研究检测慢性肾病患者透析前后血清中 miR-30a 的表达谱,发现 miR-30a 的表达透析前后存在显著差异,相比临床常用的检测指标 Kt/V、URR,我们推测检测慢性肾病患者透析前后血清中 miR-30a 的表达不仅可以从一定程度上反映透析效果,还可能减少 miR-30a 对机体的反复刺激作用,进而可能减缓维持性血液透析患者并发症的发生。但这一推测还需要进一步研究证实。

尿素氮是目前临床常用的检测透析充分性指标,可以通过检测透前、透后尿素氮的检测来进行 Kt/V 自然对数公式、URR 等计算,从而判断透析效果。然而,miRNA 作为有效生物标志物还具有一重要特点就是在体液中具有很高的稳定性,不会轻易受到周围物质的干扰,如 RNA 酶等。Mitchell 等[20]对 miRNA 在血浆中的稳定性做了详细的探查,发现无论是在室温孵育 24 h,还是经过反复冻融 8 次以上,亦或是在 RNA 酶存在或不存在的环境中,miRNA 的含量始终没有显著差异,提示其能够稳定地存在于人体血液中,因此,miRNA 作为有效生物标志物具有高稳定性和高特异性的特点。

由于本研究探讨的样本数量有限,加上没有对不同阶段透析前后血清中 miRNA 的表达值进行比较。

因此,不能明确其在患者整个透析过程中的优势,需要进一步研究。

综上所述,本研究分析慢性肾衰竭患者透析前后miR-30a的表达,提出miR-30a可作为评估慢性肾衰竭患者透析效果的生物标志,为临床上对肾衰竭患者透析提供新思路。

参考文献:

[1] Vasconcelos P, Luz-Rodrigues H, Santos C, *et al*. Desferrioxamine treatment of porphyria cutanea tarda in a patient with HIV and chronic renal failure [J]. Dermatol Ther, 2014, 27(1): 16-18.

[2] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.

[3] Lujambio A, Lowe S W. The microcosmos of cancer[J]. Nature, 2012, 482(7385): 347-355.

[4] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, *et al*. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'[J]. Nature, 2005, 438(7068): 685-689.

[5] Tay Y, Rinn J, Pandolfi P P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. Nature, 2014, 505(7483): 344-352.

[6] Geng L, Chaudhuri A, Talmon G, *et al*. MicroRNA-192 suppresses liver metastasis of colon cancer [J]. Oncogene, 2014, 33(46): 5332-5340.

[7] Kao C J, Martiniez A, Shi X B, *et al*. miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT[J]. Oncogene, 2014, 33(19): 2495-2503.

[8] Szeto C C, Ching-Ha K B, Ka-Bik L, *et al*. Micro-RNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases[J]. Dis Markers, 2012, 33(3): 137-144.

[9] Chen J, Kam-Tao P, Kwan B C, *et al*. Relation between microRNA expression in peritoneal dialysis effluent and peritoneal transport characteristics [J]. Dis Markers, 2012, 33(1): 35-42.

[10] Neal C S, Michael M Z, Pimlott L K, *et al*. Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(11): 3794-3802.

[11] Wang H, Peng W, Ouyang X, *et al*. Reduced circulating miR-15b is correlated with phosphate metabolism in patients with end-stage renal disease on maintenance hemodialysis [J]. Renal Fail, 2012, 34(6): 685-690.

[12] Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, *et al*. MicroRNAs in the kidney: novel biomarkers of acute kidney injury [J]. Nefrologia, 2013, 33(6): 826-834.

[13] Li B S, Zhao Y L, Guo G, *et al*. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41629.

[14] Brase J C, Wuttig D, Kuner R, *et al*. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer [J]. Mol Cancer, 2010, 9: 306.

[15] Li L M, Hu Z B, Zhou Z X, *et al*. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma [J]. Cancer Res, 2010, 70(23): 9798-9807.

[16] Kroh E M, Parkin R K, Mitchell P S, *et al*. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) [J]. Methods, 2010, 50(4): 298-301.

[17] Luo Y, Wang C, Chen X, *et al*. Increased serum and urinary microRNAs in children with idiopathic nephrotic syndrome [J]. Clin Chem, 2013, 59(4): 658-666.

[18] Xiao B, Wang Y, Li W, *et al*. Plasma microRNA signature as a noninvasive biomarker for acute graft-versus-host disease [J]. Blood, 2013, 122(19): 3365-3375.

[19] Nielsen L B, Wang C, Sorensen K, *et al*. Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression [J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 896362.

[20] Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M, *et al*. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513-10518.

(**收稿**:2014-09-06;**修回**:2014-10-20)

(编辑 龙 亮)