·临床研究·

血清微小核糖核酸-133b水平与老年糖尿病肾病患者肾脏损伤及预后的相关性

韩辉,林书典,陈道军,武伟*
(海南省人民医院肾病风湿科,海口 570000)

【摘 要】 **目的** 探讨血清微小核糖核酸-133b(miR-133b)水平与老年糖尿病肾病(DN)患者肾脏损伤及预后的关系。**方法** 入选2016年1月至2017年12月海南省人民医院肾病风湿科收治的182例老年DN患者(DN组)及同期来本院进行体检的80名健康人群(对照组),比较2组miR-133b水平及其水平与老年DN患者不同临床指标的关系。采用肾病分级、间质性纤维化和小管萎缩(IFTA)评分、间质炎症来评价肾脏损伤情况,分析不同肾脏损伤程度和miR-133b水平的相关性。根据DN组miR-133b水平平均值将182例患者分为低表达组与高表达组,分析2组miR-133b水平与患者预后的关系。利用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算miR-133b的相对表达水平。采用SPSS 19.0统计软件对数据进行分析,根据数据类型,组间比较采用单因素方差分析、成组t检验或χ^2检验。相关性分析采用Pearson法。**结果** DN组血清miR-133b水平显著高于对照组,差异有统计学意义[(5.38±1.28) *vs* (1.06±0.25),$P<0.01$]。不同的糖尿病病程、24 h尿蛋白定量、血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)及估算肾小球滤过率(eGFR)间血清miR-133b水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。不同肾病分级、IFTA评分及间质炎症分级间血清miR-133b水平比较,差异亦有统计学意义($P<0.05$),且随着肾脏病理损伤程度的增加,血清miR-133b水平显著升高($P<0.05$)。Pearson相关分析显示,患者血清miR-133b水平与24 h尿蛋白定量、SCr、BUN、肾病分级、IFTA及间质炎症呈正相关(r分别为0.492、0.382、0.415、0.463、0.338、0.547,$P<0.01$),与eGFR水平呈负相关($r=-0.625$,$P<0.01$)。182例老年DN患者最终有76例发展为终末期肾病(ESRD),其中miR-133b高表达组(65.9%,58/88)相对于低表达组(19.1%,18/94)发展为ESRD的比例显著增加($\chi^2=6.175$,$P=0.006$)。**结论** 血清miR-133b水平在老年DN患者中明显增高,且与老年DN患者肾脏损伤及预后不良有关,miR-133b水平较高的患者肾脏损伤程度较严重且预后较差。

【关键词】 老年人;糖尿病肾病;微小核糖核酸-133b;肾脏损伤;预后判断
【中图分类号】 R592; R781.6+4 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.06.094

Correlation between serum miR-133b level and renal injury and prognosis in the elderly with diabetic nephropathy

HAN Hui, LIN Shu-Dian, CHEN Dao-Jun, WU Wei*
(Department of Nephropathy and Rheumatology, Hainan General Hospital, Haikou 570000, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the relationship of serum miR-133b level with renal injury and prognosis in the elderly with diabetic nephropathy (DN). **Methods** A total of 182 elderly DN patients (DN group) admitted to our hospital from January 2016 to December 2017 were enrolled in this study, and another 80 matched healthy individuals taking physical examination during the same period served as control group. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect serum miR-133b level, and the results were analyzed for the relationship with clinical indices in the elderly DN patients. Renal injury was evaluated by nephrotic grade, interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) score and interstitial inflammation, and the diversity of miR-133b level in different severity grades was analyzed. After the DN patients were divided into low- and high-expressed miR-133b groups, and the relationship of miR-133b level with pronostic in the two groups was also analyzed. SPSS statistics 19.0 was used to perform the statistical analysis. One-way analysis of variance, group t test, or Chi-square test was employed for intergroup comparison based on different data types. Pearson correlation analysis was performed for the correlations. **Results** The serum miR-133b level was significantly higher in the DN group than in the control group [(5.38±1.28) *vs* (1.06±0.25), $P<0.01$]. Significant differences were also seen in its serum level among the patients with different course of diabetes, proteinuria, serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN) and estimated glomerular

收稿日期: 2018-01-07; **修回日期**: 2018-03-11
基金项目: 海南省医药卫生科研基金(15A200136)
通信作者: 武伟, E-mail: kendy66@126.com

filtration rate (eGFR) ($P<0.05$), and so were in those with different nephrotic grades, IFTA score and interstitial inflammation ($P<0.05$). What's more, with the severity of renal pathological damage, the serum level was elevated ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that the serum miR-133b level was positively correlated with proteinuria, SCr and BUN levels, nephrotic grade, IFTA score, and interstitial inflammation ($r=0.492$, 0.382, 0.415, 0.463, 0.338, 0.547, $P<0.01$), but negatively correlated with eGFR level ($r=-0.625$, $P<0.01$). Among the 182 elderly DN patients, 76 developed into end-stage renal disease (ESRD), with 65.9% (58/88) from the high miR-133b expression group while 19.1% (18/94) from the low expression group, indicating the former group having higher risk of ESRD ($\chi^2=6.175$, $P=0.006$). **Conclusion** Serum miR-133b level is significantly elevated, and associated with renal injury and poor prognosis in the elderly DN patients. The higher the level is, the severer the renal injury is and the poorer the prognosis is.

【Key words】 aged; diabetic nephropathy; miR-133b; kidney injury; prognosis judgment

This work was supported by the Foundation of Medical and Health Scientific Research of Hainan Province (15A200136).

Corresponding author: *WU Wei*, *E-mail*: *kendy66@126.com*

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是2型糖尿病患者的常见并发症,早期干预可逆转微量蛋白尿,如不及时治疗可导致慢性肾衰竭甚至死亡[1,2]。随着我国人口老龄化日趋严重,老年DN的患病率呈逐年上升趋势,给社会及家庭带来了沉重的经济负担。微小核糖核酸(microribonucleic acid, miRNA)是一类小的非编码RNA分子,广泛参与细胞增殖、凋亡及免疫炎症反应等多种机体生物学过程的调控[3,4]。近年来研究发现,miR-133b可能参与肾间质纤维化和肾小管上皮间质转化等过程,亦可能参与DN的发生和发展[5]。本研究通过检测老年DN患者血清miR-133b水平,分析miR-133b与老年DN患者肾脏损伤及远期预后的关系,旨在为老年DN的早期治疗提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2016年1月至2017年12月海南省人民医院肾病风湿科收治的老年2型DN患者182例作为研究对象(DN组)。纳入标准:(1)符合美国糖尿病协会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;(3)年龄≥60岁。排除标准:(1)急性或慢性肾小球肾炎、尿路感染及其他肾脏疾病;(2)合并酮症酸中毒、甲状腺疾病或其他代谢性疾病;(3)近期应用免疫抑制剂或服用肾毒性药物。另选择同期来我院体检的健康老年人80名作为对照组,均无心、脑、肝、肾病变,无糖尿病、高血压及其他代谢性疾病。本研究经本院伦理委员会批准(2016AB08035116),并获得患者或家属签署的知情同意书。

1.2 研究方法

收集182例患者肾活检或入院后次日的临床资料,包括年龄、性别、糖尿病病程、体质量指数(body mass index, BMI)、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin Alc, HbAlc)、血肌酐(serum creatinine, SCr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、24 h尿蛋白定量、估算肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR)、血清钙(calcium, Ca^{2+})等指标。采用肾病分级、间质性纤维化和小管萎缩(interstitial fibrosis and tubular atrophy, IFTA)评分及间质炎症来评价肾脏损伤情况,级别或评分越高,说明肾脏病理损伤越重。

再根据DN组患者miR-133b水平的平均值(5.38±1.28)将182例老年DN患者分为高表达组和低表达组,分析老年DN患者血清miR-133b水平与患者预后的关系。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应

抽取所有研究对象的空腹静脉血3 ml置于未加抗凝剂的离心管中,轻轻颠倒数次后静置10 min,于室温2500转/min离心15 min,分2层,吸取上层血清400 μl转移至EP管中,-70℃保存。严格按照试剂盒说明书提取血清总miRNA,通过反转录试剂盒将总miRNA逆转录为cDNA,U6为内参照,ABI 7500型实时荧光定量PCR仪(ABI公司,美国)进行扩增并对PCR结果进行定量分析。扩增条件:95℃预变性10 min、95℃变性15 s、60℃退火60 s进行45个循环,最后38℃延伸5 s。实验重复3次。每个反应体系中荧光信号达到设定阈值所经历的循环数即为Ct值,以U6为内参照,采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算miR-133b的相对表达水平,其中$\triangle Ct=Ct_{目的基因}-Ct_{U6}$,$\triangle\triangle Ct=\triangle Ct_{对照目的基因}-\triangle Ct_{实验目的基因}$。

1.4 肾脏结局

终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)定义为eGFR<15 ml/(min·1.73 m^2)或开始接受维持性肾脏替代治疗。

1.5 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析。连续变量均通过正态性检验和方差齐性检验，符合正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，2组间比较采用成组t检验。计数资料以百分率表示，组间比较采用χ^2检验。相关性分析采用Pearson法。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DN组与对照组患者基线资料比较

DN组男性98例，女性84例，年龄60～84（68.2±7.1）岁；对照组男性42例，女性38例，年龄60～78（66.8±7.2）岁。2组年龄、性别比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。DN组血清miR-133b水平（5.38±1.28）明显高于对照组（1.06±0.25），差异有统计学意义（$P<0.01$）。

2.2 影响血清miR-133b水平的单因素分析

不同的糖尿病病程、24 h尿蛋白定量、SCr、BUN及eGFR水平间血清miR-133b比较，差异有统计学意义；老年DN患者不同肾病分级、IFTA评分及间质炎症分级间血清miR-133b水平比较，差异亦均有统计学意义（$P<0.05$），且随着肾脏病理损伤程度的增加，血清miR-133b水平显著升高（$P<0.05$；表1）。

2.3 血清miR-133b水平与各临床指标的相关性分析

Pearson相关分析显示，患者血清miR-133b水平与24 h尿蛋白定量、SCr、BUN、肾病分级、IFTA及间质炎症呈正相关（r分别为0.492、0.382、0.415、0.463、0.338、0.547，$P<0.01$），与eGFR水平呈负相关（$r=-0.625$，$P<0.01$）。

2.4 老年DN患者血清miR-133b水平与预后的关系

取老年DN患者血清miR-133b水平的平均值（5.38±1.28）为界限，将182例DN患者分为低表达组94例和高表达组88例。最终有76例进入ESRD，其中miR-133b高表达组（65.9%，58/88）相对于低表达组（19.1%，18/94）进入ESRD的比例显著增加（$\chi^2=6.175$，$P=0.006$）。

3 讨 论

DN是2型糖尿病患者最常见且最严重的慢性合并症，在老年人中的发病率明显升高，已成为危害人类的重大疾病[7]。目前，对DN的早期诊断和预后评估是肾脏病学研究的热点问题。miRNA是一种内源性的非编码微小RNA，其广泛存在于真核细

表1 影响血清miR-133b水平的单因素分析

Table 1 Unvariate analysis of risk factors of serum miR-133b level ($\bar{x} \pm s$)

Item	miR-133b level	P value
Age		0.262
≤70 years	5.24±1.20	
>70 years	5.62±1.37	
Gender		0.379
Male	5.36±1.25	
Female	5.52±1.31	
BMI		0.313
<25 kg/m^2	5.28±1.22	
≥25 kg/m^2	5.48±1.26	
Length of diabetes mellitus		0.008
<10 years	3.93±0.74	
≥10 years	6.52±1.63	
Proteinuria		0.028
<3.0 g/24 h	4.50±1.02	
≥3.0 g/24 h	6.27±1.56	
Ca^{2+}		0.427
<2.0 mmol/L	5.58±1.34	
≥2.0 mmol/L	5.25±1.21	
FBG		0.205
<8.0 mmol/L	5.13±1.16	
≥8.0 mmol/L	5.64±1.35	
HbA1c		0.191
<9.0%	5.18±1.20	
≥9.0%	5.71±1.39	
SCr		0.005
<150 μmol/L	4.42±0.94	
≥150 μmol/L	6.53±1.56	
BUN		<0.001
<7.5 mmol/L	4.28±0.85	
≥7.5 mmol/L	6.64±1.70	
eGFR		<0.001
<60 ml/(min·1.73 m^2)	7.42±1.93	
≥60 ml/(min·1.73 m^2)	3.81±0.68	
Nephrotic grade		0.018
Ⅰ	4.15±0.83	
Ⅱ	4.86±1.05	
Ⅲ	5.52±1.36	
Ⅳ	7.24±1.80	
IFTA(score)		0.036
0	4.06±0.78	
1	4.73±1.07	
2	5.64±1.45	
3	6.39±1.61	
Interstitial inflammation(score)		0.025
0	4.90±1.16	
1	5.87±1.72	
2	6.72±1.81	

DN: diabetic nephropathy; BMI: body mass index; FBG: fasting blood glucose; HbA1c: glycosylated hemoglobin A1c; SCr: serum creatinine; BUN: blood urea nitrogen; eGFR: estimated glomerular filtration rate; IFTA: interstitial fibrosis and tubular atrophy

胞中，长度约为22个核苷酸，通过转录后调控靶基因表达，参与各种重要的生物学过程，如细胞增殖、分化、凋亡、免疫、发育、代谢、病毒感染及肿瘤发生等[8,9]。已有研究证实，一些miRNA参与DN的发生发展，影响细胞结构和功能及微环境，并形成一个错综复杂的网络，有可能成为DN新的治疗靶点[10,11]。最近研究表明，检测miRNA对DN的早期诊断、疾病发展程度、疗效判断、预后观察、特异性药物设计等方面都具有重要的意义，未来以miRNA为靶点开发的药物将有望应用于DN的治疗[12]。He等[13]研究发现，在DN患者的血清和肾组织以及糖尿病小鼠中miR-135a高表达，通过抑制瞬时受体电位阳离子通道C1（transient receptor potential canonical channel-1，TRPC1）水平，阻断Ca^{2+}进入细胞内，使纤连蛋白和胶原蛋白沉积，促进细胞外基质沉积，而TRPC1过表达能扭转miR-135a所致的系膜细胞增殖和细胞外基质蛋白的沉积，进而促进DN的发生发展。Eissa等[14]通过采用qRT-PCR法检测DN患者和健康对照组尿液miR-133b、miR-342及miR-30a水平，发现DN患者尿液miR-133b、miR-342及miR-30a水平明显高于对照组（$P<0.01$），提示这3种miRNA可能作为DN患者的尿生物标志物。本研究显示，DN组血清miR-133b水平明显高于对照组，且影响miR-133b水平的因素有糖尿病病程、24 h尿蛋白定量、SCr、BUN及eGFR水平，其中糖尿病病程≥10年、24 h尿蛋白定量≥3.0 g/24 h、SCr≥150 μmol/L、BUN≥7.5 mmol/L及eGFR<60 ml/（min·1.73 m^2）患者的血清miR-133b水平较高，提示血清miR-133b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。DiStefano等[15]研究发现，血清miRNA水平变化可反映肾功能及肾脏损伤情况，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，循环miRNA可能参与DN的病理机制，如脂质代谢紊乱、氧化应激、细胞外基质沉积及肾纤维化，有望作为2型DN早期诊断的新型标志物[16]。

DN的主要病理改变是肾小球硬化，其中肾脏系膜细胞、足细胞及肾小管上皮细胞等多种细胞的损伤，均参与肾小球硬化。miRNA参与系膜细胞肥大、细胞外基质沉积、足细胞凋亡以及肾小管间质纤维化，共同导致肾小球硬化[17]。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。本研究采用肾病分级、IFTA及间质炎症共3个指标来评价肾脏损伤程度，结果显示老年DN患者不同肾病分级、IFTA及间质炎症间血清miR-133b水平差异均有统计学意义，且随着肾脏病理损伤程度的增加，血清miR-133b水平显著升高，提示血清miR-133b水平与肾功能进展及严重程度密切相关，可作为预测DN进展的重要指标。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miR-133b高表达组相对于低表达组发展为ESRD的比例增加，推测高水平的miR-133b可产生细胞毒性，导致间质纤维化、小管萎缩和间质炎症。Pearson相关分析显示，ESRD患者血清miR-133b水平与24 h尿蛋白定量、SCr、BUN、肾病分级、IFTA及间质炎症呈正相关，与eGFR水平呈负相关，进一步提示血清miR-133b水平与肾脏病理损伤程度及DN预后不良有关。Bhatt等[18]研究亦表明，当肾小管间质损伤时，血液中miRNA水平显著升高，而肾小管间质损伤与DN患者肾脏预后不良显著相关，这与本研究结果类似。

综上所述，老年DN患者血清miR-133b水平明显升高，且其水平与老年DN患者肾脏损伤及预后有关，miR-133b水平较高的患者肾脏损伤程度较严重且预后较差，因此，检测miR-133b对老年DN的病情判断及预后评估具有一定价值，同时亦为阐明DN发病的分子机制提供新的线索。

【参考文献】

[1] Grice BA, Nelson RG, Williams DE, *et al*. Associations between persistent organic pollutants, type 2 diabetes, diabetic nephropathy and mortality[J]. Occup Environ Med, 2017, 74(7): 521-527. DOI: 10.1136/oemed-2016-103948.

[2] Krolewski AS, Skupien J, Rossing P, *et al*. Fast renal decline to end-stage renal disease: an unrecognized feature of nephropathy in diabetes[J]. Kidney Int, 2017, 91(6): 1300-1311. DOI: 10.1016/j.kint.2016.10.046.

[3] Zhang M, Du X. Non-coding RNAs in gastric cancer: research progress and prospects[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(29): 6610-6618. DOI: 10.3748/wjg.v22.i29.6610.

[4] O'Sullivan F, Keenan J, Aherne S, *et al*. Parallel mRNA, proteomics and miRNA expression analysis in cell line models of the intestine[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(41): 7369-7386. DOI: 10.3748/wjg.v23.i41.7369.

[5] Zhou W, Bi X, Gao G, *et al*. miRNA-133b and miRNA-135a induce apoptosis *via* the JAK2/STAT3 signaling pathway in human renal carcinoma cells[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84(12): 722-729. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.09.074.

[6] Tanyeri F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. Am Fam Physician, 2014, 58(6): 1355-1362.

[7] Gariani K, de Seigneux S, Pechère-Bertschi A, *et al*. Diabetic nephropathy: an update[J]. Rev Med Suisse, 2012, 8(330): 473-479.

[8] 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. DOI: 10.1002/jcp.25801.

[9] Głobińska A, Pawełczyk M, Kowalski ML. MicroRNAs and the immune response to respiratory virus infections[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2014, 10(7): 963 - 971. DOI: 10.1586/1744666X.2014.913482.

[10] Al-Kafaji G, Al-Mahroos G, Al-Muhtaresh HA, *et al*. Decreased expression of circulating microRNA-126 in patients with type 2 diabetic nephropathy: a potential blood-based biomarker[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(2): 815 - 822. DOI: 10.3892/etm.2016.3395.

[11] Kantharidis P, Hagiwara S, Brennan E, *et al*. Study of microRNA in diabetic nephropathy: isolation, quantification and biological function[J]. Nephrology (Carlton), 2015, 20(3): 132 - 139. DOI: 10.1111/nep.12374.

[12] Simpson K, Wonnacott A, Fraser DJ, *et al*. MicroRNAs in diabetic nephropathy: from biomarkers to therapy[J]. Curr Diab Rep, 2016, 16(3): 35. DOI: 10.1007/s11892-016-0724-8.

[13] He F, Peng F, Xia X, *et al*. MiR-135a promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by regulating TRPC1[J]. Diabetologia, 2014, 57(8): 1726 - 1736. DOI: 10.1007/s00125-014-3282-0.

[14] Eissa S, Matboli M, Bekhet MM. Clinical verification of a novel urinary microRNA panal: 133b, -342 and -30 as biomarkers for diabetic nephropathy identified by bioinformatics analysis[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83(10): 92 - 99. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.06.018.

[15] DiStefano JK, Taila M, Alvarez ML. Emerging roles for miRNAs in the development, diagnosis, and treatment of diabetic nephropathy[J]. Curr Diab Rep, 2013, 13(4): 582 - 591. DOI: 10.1007/s11892-013-0386-8.

[16] Lv C, Zhou YH, Wu C, *et al*. The changes in miR-130b levels in human serum and the correlation with the severity of diabetic nephropathy[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2015, 31(7): 717 - 724. DOI: 10.1002/dmrr.2659.

[17] Gupta V, Reiser J. MicroRNAs: a macroview into focal segmental glomerulosclerosis[J]. Am J Kidney Dis, 2015, 65(2): 206 - 208. DOI: 10.1053/j.ajkd.2014.11.003.

[18] 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. DOI: 10.1152/ajprenal.00387.

（编辑：张美）

·消 息·

《中华老年多器官疾病杂志》关于录用稿件优先数字出版的启事

为缩短学术论文发表周期，提高学术成果的传播和利用价值，争取科研成果的首发权，《中华老年多器官疾病杂志》已启用优先数字出版（online first）平台。

编辑部会将已被录用并完成排版校对的论文先于印刷版在杂志网站优先数字出版。同时，印刷版一经确定卷、期、页码，将上传至网络出版平台并取代优先出版的数字版。若有作者参阅本刊优先数字出版文献并引为参考文献的，请务必在其引用格式中标注数字出版的时间和网址，以确认该文的首发权。若有不同意优先数字出版的作者，请投稿时特别说明。

地址：100853 北京市复兴路28号，《中华老年多器官疾病杂志》编辑部

电话：010 - 66936756

网址：www.mode301.cn

E-mail：zhlndqg@mode301.cn