

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.03.010
文章编号: 1005-8982 (2022) 03-0055-05

临床研究·论著

MicroRNA-590和microRNA-196b在儿童IgA肾病诊断中的价值

沈银红, 沈红

(青海省妇女儿童医院 肾病科, 青海 西宁 810007)

摘要: **目的** 探讨IgA肾病患儿血清microRNA-590 (miR-590)、microRNA-196b (miR-196b)水平的变化及其临床价值。**方法** 选取2017年9月—2019年5月于青海省妇女儿童医院肾活检患儿118例, 83例确诊为IgA肾病患儿, 35例为其他肾小球疾病患儿, 另选取同期该院体检健康儿童42例为对照组。通过qRT-PCR法检测受试者血清miR-590、miR-196b表达水平。参照Lee氏分级分别对IgA肾病患儿进行病理学分级。绘制受试者工作特征(ROC)曲线评价血清miR-590、miR-196b及二者联合检测对IgA肾病的诊断价值。**结果** 3组肌酐、24 h蛋白尿、血清IgA水平比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), IgA肾病组肌酐、24 h蛋白尿、血清IgA水平较对照组、非IgA肾病组升高($P < 0.05$), 白蛋白水平较对照组、非IgA肾病组下降($P < 0.05$)。3组miR-590 mRNA、miR-196b mRNA相对表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), IgA肾病组miR-590 mRNA相对表达量较对照组、非IgA肾病组下降($P < 0.05$), miR-196b mRNA相对表达量较对照组、非IgA肾病组升高($P < 0.05$)。不同程度IgA肾病患儿miR-590 mRNA、miR-196b mRNA相对表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), IgA肾病组患儿miR-590相对表达量随病情加重依次下降($P < 0.05$), miR-196b相对表达量随病情加重依次升高($P < 0.05$)。ROC曲线显示, miR-590、miR-196b及两者联合检测诊断IgA肾病的曲线下面积分别为0.873、0.785和0.904, 敏感性为84.1%、90.7%和88.6%, 特异性为82.6%、64.8%和87.0%。**结论** IgA肾病患儿血清miR-590低表达、血清miR-196b高表达, 两者联合对IgA肾病具有较高的诊断价值。

关键词: IgA肾病; miR-590; miR-196b; 儿童

中图分类号: R692.3

文献标识码: A

Values of microRNA-590 and microRNA-196b in diagnosis of IgA nephropathy children

Yin-hong Shen, Hong Shen

(Department of Nephrology, Qinghai Women's and Children's Hospital, Xining, Qinghai 810007, China)

Abstract: Objective To investigate the changes and clinical values of serum microRNA-590 (miR-590) and microRNA-196b (miR-196b) levels in children with IgA nephropathy. **Methods** From September 2017 to May 2019, the children underwent renal biopsy in our hospital were collected, among them, 83 cases were diagnosed as IgA nephropathy, 35 children with other glomerular diseases, and another 36 healthy children without kidney disease were selected as the control group. The expression levels of miR-590 and miR-196b were detected by qRT-PCR. According to Lee's classification, the pathological classification of IgA nephropathy was carried out. The diagnostic values of serum miR-590, miR-196b and their combined detection in IgA nephropathy were evaluated by drawing the receiver operation characteristic curve (ROC). **Results** Compared with the control group and non-IgA nephropathy group, the levels of creatinine, 24-hour albuminuria, and serum IgA in IgA nephropathy group

收稿日期: 2021-08-10

increased ($P < 0.05$), while the level of albumin decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the levels of miR-590 and miR-196b between the non-IgA nephropathy group and the control group ($P > 0.05$), the expression level of miR-590 decreased in IgA nephropathy group ($P < 0.05$), and decreased with the aggravation of the disease, the difference between the any two groups was statistically significant ($P < 0.05$); the expression level of miR-196b increased ($P < 0.05$), and increased with the aggravation of the disease, and the difference between the any two groups was statistically significant ($P < 0.05$); ROC curve showed that the area under the curve of miR-590, miR-196b, and combinationin diagnosing IgA nephropathy was 0.873 (sensitivity was 84.1%, and specificity was 82.6%), 0.785 (sensitivity was 90.7%, and specificity was 64.8%), 0.904 (sensitivity was 88.6%, and specificity was 87.0%), compared with the level of miR-196b in the diagnosis of IgA nephropathy, the diagnosis effect of combined detection of miR-590 and miR-196b was higher ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of miR-590 in serum of children with IgA nephropathy is low, and the expression of miR-196b in serum is high, the combination of the two has high diagnostic value for IgA nephropathy.

Keywords: IgA nephropathy; miR-590; miR-196b; child

IgA 肾病是肾小球系膜区以 IgA 或 IgA 沉积为主, 伴或不伴有其他免疫蛋白在肾小球系膜区沉积的原发性肾小球疾病, 包括局灶节段性病变、毛细血管内增生病变等。临床表现为反复发作性血尿, 伴有不同程度的尿蛋白, 部分患儿可出现肾功能不全, 易发展为终末期肾病, 严重危害患儿生命健康^[1-3]。临床主要通过肾活检病理诊断, 光镜下常见弥漫性系膜细胞增生或局灶阶段增生性肾小球肾炎, 但肾活检术属创伤性技术, 儿童接受度差, 且少数患儿有肾活检并发症需手术止血或肾切除^[4], 因此有必要寻求 IgA 肾病的无创性检查的生物学标志物。研究^[5-6]认为, IgA 肾病的发生与免疫功能低下及氧化应激损伤密切相关。microRNA 在免疫学中的研究日益增多, 研究表明, microRNA-590 (miR-590) 异常低表达可诱发口舌鳞癌中细胞的免疫逃逸^[7]。miR-590 可有效减轻急性肾损伤小鼠肾损伤程度^[8], microRNA-196b (miR-196b) 也参与小鼠肾脏氧化应激损伤^[9]。miR-590 和 miR-196b 在 IgA 肾病中的研究较少, 因此本研究重点探讨 miR-590、miR-196b 在 IgA 肾病中的表达及作用, 为临床 IgA 肾病检查提供新的生物标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 6 月—2019 年 5 月青海省妇女儿童医院经肾活检病理诊断为原发性 IgA 肾病患者 83 例。其中, 男性 42 例, 女性 41 例; 年龄 3~16 岁, 平均 (8.52 ± 1.23) 岁; 病程 1 个月~1.5 年, 平均 $(0.72 \pm$

0.16) 年。纳入标准: 符合 IgA 肾病诊断标准^[10]; 肾活检前 3 个月未进行糖皮质激素及(或)免疫抑制剂治疗。排除标准: 合并系统性红斑狼疮、过敏性紫癜、血液病等系统性疾病引起的继发性 IgA 肾病; 肾活检光镜下肾小球数目 < 8 ; $eGFR < 10 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$ 。选取非 IgA 肾病患者 35 例, 包括肾微小病变 5 例、局灶节段性肾小球肾炎 8 例、膜性肾病 15 例、局灶节段性肾小球硬化症 7 例。其中, 男性 19 例, 女性 16 例; 年龄 3~16 岁, 平均 (8.47 ± 1.45) 岁。另选取同期该院体检健康儿童 42 例作为对照组。其中, 男性 18 例, 女性 24 例; 年龄 3~16 岁, 平均 (8.95 ± 1.35) 岁。3 组性别、年龄等一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有受试者均采集肘静脉血 2 mL, 3 000 r/min, 20 min 离心, 取上清液, 置入 -20°C 冰箱冷冻保存待测。

1.2.2 临床指标 受试者年龄、性别、24 h 蛋白尿、血清白蛋白、血肌酐(Scr)。患儿血清 IgA 水平采用免疫比浊法检测。

1.2.3 病理分级 根据 Lee 氏分级^[11]分为 I 级 7 例, II 级 8 例, III 级 25 例, IV 级 16 例, V 级 27 例。I 级: 肾小球绝大多数正常, 偶见轻度系膜增宽, 伴和(或)不伴细胞增生, 肾小管和肾间质无改变。II 级: 肾小球有局灶系膜增殖和硬化 ($< 50\%$), 有小新月体, 肾小管和肾间质无损害。III 级: 肾小球呈弥漫性系膜增值和增宽 (偶尔局灶节段), 偶见小新月体; 肾小管和肾间质改变则呈现出局灶性肾间质水肿, 偶见细胞浸润, 罕见肾小管萎缩;

IV级: 肾小球病变呈重度弥漫性系膜增生和硬化, 部分或全部肾小球硬化, 可见新月体(< 45%)。肾小管萎缩, 肾间质浸润, 偶见肾间质泡沫细胞; V级: 肾小球新月体形成> 45%; 肾小管和肾间质病变类似于IV级, 但较IV级严重。

1.2.4 qRT-PCR 法检测血清 miR-590、miR-196b 相对表达量 按照 Trizol 试剂盒操作说明书提取血清总 RNA, 按照逆转录试剂盒操作步骤将 2 μg RNA 逆转录为 cDNA, 按照 SYBR Green RCR Master Mix 试剂说明书配制反应体系并加样。完成后将其放入荧光定量 PCR 仪上进行反应, 反应条件为: 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 15 s, 共 40 个循环。miR-590、miR-196b 以 U6 为内参基因, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 1。反应结束后收集数据, 采用 2^{-ΔΔCt} 算法计算 miR-590、miR-196b 相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 LSD-t 检验; 计数资料以构成比或率(%)表示, 比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料的比较

3 组性别、年龄比较, 差异无统计学意义($P >$

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	序列	引物长度/bp
miR-590	正向: 5'-ACGCTCAGTTAATGCTAATCGTGATA-3'	117
	反向: 5'-ATTCCATGTTGTCCACTGTCTCTG-3'	
miR-196b	正向: 5'-CAGCAAACCAACAATGCCGA-3'	150
	反向: 5'-GATCTGCGACCACACCATGA-3'	
U6	正向: 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3'	205
	反向: 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'	

0.05); 3 组肌酐、白蛋白、24 h 蛋白尿、血清 IgA 水平比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), IgA 肾病组肌酐、24 h 蛋白尿、血清 IgA 水平较对照组、非 IgA 肾病组升高($P < 0.05$), IgA 肾病组白蛋白水平较对照组、非 IgA 肾病组下降($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 3 组受试者血清 miR-590 mRNA、miR-196b mRNA 相对表达量的比较

3 组 miR-590 mRNA、miR-196b mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), IgA 肾病组 miR-590 mRNA 相对表达量较对照组、非 IgA 肾病组下降($P < 0.05$), IgA 肾病组 miR-196b mRNA 相对表达量较对照组、非 IgA 肾病组升高($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 3 组一般资料比较

组别	n	男/女/例	年龄/ (岁, $\bar{x} \pm s$)	肌酐/ ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)	白蛋白/ (g/L, $\bar{x} \pm s$)	蛋白尿/ (g/24 h, $\bar{x} \pm s$)	血清 IgA/ (g/L, $\bar{x} \pm s$)
对照组	42	18/24	8.95 ± 1.35	71.88 ± 11.37	43.82 ± 7.30	0.08 ± 0.01	2.34 ± 0.39
非 IgA 肾病组	35	19/16	8.47 ± 1.45	78.79 ± 13.13	43.08 ± 7.18	0.10 ± 0.02	2.52 ± 0.42
IgA 肾病组	83	42/41	8.52 ± 1.23	116.78 ± 19.46 ^{①②}	35.26 ± 5.87 ^{①②}	2.57 ± 0.50 ^{①②}	3.33 ± 0.55 ^{①②}
F/ χ^2 值		1.102	1.798	131.221	31.476	940.643	71.136
P 值		0.577	0.169	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与非 IgA 肾病组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 不同程度 IgA 肾病患者血清 miR-590 mRNA、miR-196b mRNA 相对表达量比较

不同程度 IgA 肾病患者 miR-590 mRNA、miR-196b mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), IgA 肾病组患者 miR-590 表达水平随病情加

重依次下降 ($P < 0.05$), miR-196b 表达水平随病情加重依次升高 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 miR-590、miR-196b 单独及两者联合对 IgA 肾病的诊断作用

miR-590 对 IgA 肾病诊断的 AUC 为 0.873

表 3 3组受试者血清 miR-590 mRNA、miR-196b mRNA 相对表达量比较

组别	n	miR-590 mRNA	miR-196b mRNA
对照组	42	1.03 ± 0.21	0.75 ± 0.12
非IgA肾病组	35	1.05 ± 0.17	0.77 ± 0.12
IgA肾病组	83	0.80 ± 0.11 ^{①②}	1.64 ± 0.28 ^{①②}
F值		47.541	324.128
P值		0.000	0.000

注：①与对照组比较， $P < 0.05$ ；②与非IgA肾病组比较， $P < 0.05$ 。

表 4 不同程度IgA肾病患儿血清 miR-590 mRNA、miR-196b mRNA 相对表达量的比较

组别	n	miR-590 mRNA	miR-196b mRNA
I、II级	15	0.95 ± 0.15	1.38 ± 0.23
III、IV级	41	0.78 ± 0.13 ^①	1.76 ± 0.34 ^①
V级	27	0.52 ± 0.10 ^{①②}	2.32 ± 0.38 ^{①②}
F值		64.523	41.952
P值		0.000	0.000

注：①与I、II级比较， $P < 0.05$ ；②与III、IV级比较， $P < 0.05$ 。

(95% CI: 0.809, 0.920)，最佳截断值为 0.737，敏感性为 84.1% (95% CI: 0.748, 0.910)、特异性为 82.6% (95% CI: 0.716, 0.907)；miR-196b 对 IgA 肾病诊断的 AUC 为 0.785 (95% CI: 0.713, 0.847)，最佳截断值为 1.927，敏感性为 90.7% (95% CI: 0.838, 0.945)、特异性为 64.8% (95% CI: 0.513, 0.750)；两者联合检测对 IgA 肾病诊断的 AUC 为 0.914 (95% CI: 0.858, 0.952)，敏感性为 88.6% (95% CI: 0.801, 0.944)、特异性为 87.0% (95% CI: 0.767, 0.939)。见图 1。

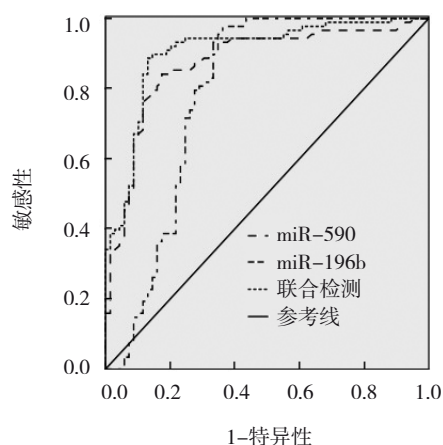


图 1 miR-590、miR-196b 及两者联合检测对 IgA 肾病诊断的 ROC 曲线

3 讨论

研究^[12]表明，糖基化异常的 IgA 分子与抗聚糖 IgG 自身抗体结合形成免疫复合物在血液循环中逃脱正常清除机制，在肾小球系膜区沉积，诱导炎症反应与系膜细胞的增殖导致肾小球损伤，是造成 IgA 肾病的原因之一。林佳如等^[13]研究表明，Th17 细胞免疫失衡在调控 IgA 糖基化过程中发挥重要作用。研究^[7]显示，miR-590 mimics 可增强免疫效应细胞的生存率，阻断舌癌的免疫逃逸，进而减少免疫活性细胞凋亡。ZHOU 等^[14]研究表明，miR-590 通过控制 IL-2 表达对 T 细胞免疫应答，抑制结肠癌血管生成和转移。BROGAARD 等^[15]研究显示，miR-590 是猪对甲型 H1N2 流感肺部免疫应答的重要调节因子。研究^[8]显示，miR-590 可抑制脓毒症小鼠肿瘤坏死因子受体相关因子 6 表达从而减轻小鼠急性肾损伤程度。miR-590 通过靶向 *tob1* 促进致病性 th17 细胞分化，与多发性肝硬化有关^[16]。以上研究均显示，miR-590 可能与机体免疫活性密切相关。本研究 IgA 肾病患儿血清 miR-590 mRNA 相对表达量低于非 IgA 肾病患儿及健康儿童，且随 IgA 肾病患儿病情加重而依次降低，提示 miR-590 与 IgA 肾病的发病、发展可能有一定联系，猜测可能通过影响免疫系统平衡参与 IgA 肾病发生，具体机制有待进一步研究。本研究 ROC 结果显示，血清 miR-590 水平对诊断 IgA 肾病的曲线下面积为 0.873，特异性和敏感性均在 80% 左右，提示 miR-590 可能作为诊断 IgA 肾病的生物学指标，截断值为 0.737，表明 miR-590 水平低于 0.737 者发生 IgA 肾病的风险高，为基础研究者和临床诊治者进行 IgA 肾病研究及治疗提供了 miRNA 靶点。

研究表明，异常糖基化 IgA 不足以致病，机体在氧化应激过程中产生大量活性氧，ROS 堆积导致抗氧化防御系统遭到破坏，脂质过氧化物造成细胞膜转运功能障碍，酶活力、亚细胞器功能改变，自由基可经离子通道进入细胞内破坏细胞器成份，造成组织细胞损伤导致 IgA 肾病的发生^[17]。miR-196b 是 miR-196 家族成员之一，位于人 7p15.2 的进化高度保守区域^[18]。孟娇等^[19]从 IgA 肾病患者活检标本绘制出 miRNA 表达图谱，发现 IgA 肾病患者中 miR-196b 等 65 种 miRNA 分子表达下调，且降低程度与病情严重程度密切相关，提示 miR-196b 在早期 IgA 肾病

的病理发展过程中发挥重要作用。本研究IgA肾病患儿血清miR-196b表达水平高于非IgA肾病患儿及健康儿童,提示miR-196b与IgA肾病的发生、发展密切相关。李慧聪等^[20]研究表明,miR-196高表达通过抑制二硫化物异构酶A3表达,进而抗氧化应激能力减弱参与小鼠肾脏损伤。猜测miR-196可能通过氧化应激损伤途径参与IgA肾病的发生。进一步研究显示,血清miR-196b水平诊断IgA肾病发病的曲线下面积为0.785,敏感性高,但特异性为64.8%,提示miR-196b仅能作为辅助指标判别患儿是否发生IgA肾病。本研究发现miR-590、miR-196b两者联合检测诊断IgA肾病曲线下面积、敏感性、特异性大或高于miR-590、miR-196b对IgA肾病的诊断效果。提示联合检测效果优于单一检测,可能作为临床诊断IgA肾病的辅助检测指标,有利于先筛查出高危IgA肾病患儿,再进一步进行肾活检,从而优化疑似IgA肾病的诊断流程。

综上所述,IgA肾病患儿血清miR-590低表达、血清miR-196b高表达,两者联合检测对IgA肾病具有较高诊断价值。但本研究存在一定不足,由于样本量较少,可能对本结果造成一定偏倚,此外对于miR-590、miR-196b参与IgA肾病的发病机制有待进一步研究。

参 考 文 献 :

[1] 谢伟基,洪桂填,薛茜,等.血清IgA/C3对IgA肾病诊断及治疗预后的意义[J].临床肾脏病杂志,2019,19(5):311-316.

[2] 王洋,王曦.来氟米特联合糖皮质激素对正常血压IgA肾病患者动脉病变的疗效及可能机制[J].临床内科杂志,2019,36(3):174-177.

[3] 刘林林,刘楠,王娟,等.肾小球C4d沉积为IgA肾病的预后因子[J].中国医科大学学报,2017,46(1):23-27.

[4] 杨希,魏日胞.补体旁路途径及活化在IgA肾病的作用研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2017,18(5):448-450.

[5] 张鹏,何晓东,陈望.厄沙贝坦联合活性维生素D对IgA肾病患者免疫功能及TGF-β1和sTfR表达的影响[J].临床和实验医学杂志,2018,17(5):495-499.

[6] 丁丽娜,吴丽华,周晓玲,等.IgA肾病患者血清氧化应激相关指标水平与肾间质纤维化的相关性[J].中华肾脏病杂志,2019,35(5):336-341.

[7] 吴棣,徐艳雪,韩瞳瞳,等.FasL的特异性miRNA阻断舌鳞癌细胞免疫逃逸的研究[J].安徽医科大学学报,2017,52(8):1115-1119.

[8] MA J, LI Y T, ZHANG S X, et al. MiR-590-3p Attenuates acute kidney injury by inhibiting tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in septic mice[J]. Inflammation. 2018, 42(1): 637-649.

[9] 李慧聪. miR-196a高表达在肾脏损伤中作用的分子生物学机制[J].中国老年学杂志,2018,38(10):173-176.

[10] 丁洁.儿童常见肾脏疾病诊治循证指南(试行)解读(四):原发性IgA肾病诊断治疗[J].中华儿科杂志,2010,48(5):355-357.

[11] 廖莹,何永成,齐东丽,等.蛋白尿与免疫球蛋白A肾病患者Lee氏分级的相关性及疾病影响因素分析[J].中国全科医学,2017,20(2):115-117.

[12] 宋轻雷,刘颖,刘乃全,等.血清异常糖基化IgA1在40例IgA肾病诊断中的应用价值研究[J].中国实用内科杂志,2019,39(3):270-273.

[13] 林佳如,樊均明.白细胞介素17在IgA肾病中引起IgA1糖基化异常的作用研究[J].重庆医学,2016,45(28):3907-3909.

[14] ZHOU Q X, ZHU Y K, WEI X L, et al. miR-590-5p inhibits colorectal cancer angiogenesis and metastasis by regulating nuclear factor 90/vascular endothelial growth factor A axis[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(10): e2413.

[15] BROGAARD L, LARSEN L E, PMH H, et al. IFN-λ and microRNAs are important modulators of the pulmonary innate immune response against influenza A (H1N2) infection in pigs[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0194765.

[16] LIU Q, GAO Q, ZHANG Y, et al. MicroRNA-590 promotes pathogenic Th17 cell differentiation through targeting Tob1 and is associated with multiple sclerosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(2): 901-908.

[17] FANG Y, XIE T, XUE N, et al. miR-382 Contributes to renal tubulointerstitial fibrosis by downregulating HSPD1[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017(6): 1-16.

[18] FANTINI S, SALSÌ V, REGGIANI L, et al. The miR-196b miRNA inhibits the GATA6 intestinal transcription factor and is upregulated in colon cancer patients[J]. Oncotarget, 2017, 8(3): 4747-4759.

[19] 孟娇,李丽民,刘志红,等.肾脏特异性microRNA的鉴定及功能预测[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2015,24(2):107-112.

[20] 李慧聪. miR-196a高表达在肾脏损伤中作用的分子生物学机制[J].中国老年学杂志,2018,38(10):173-176.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 沈银红,沈红. MicroRNA-590和microRNA-196b在儿童IgA肾病诊断中的价值[J].中国现代医学杂志,2022,32(3):55-59.

Cite this article as: SHEN Y H, SHEN H. Values of microRNA-590 and microRNA-196b in diagnosis of IgA nephropathy children[J]. China Journal of Modern Medicine, 2022, 32(3): 55-59.