

• 论 著 •

尿液外泌体 miR-494-3p 在急性肾损伤患者中的表达水平及诊断价值

魏 萍,王艳侠,尹 娣,石书梅[△]

中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院肾内科肾病实验中心,山东济南 250031

摘 要:**目的** 探讨急性肾损伤(AKI)患者尿液外泌体 miR-494-3p 的表达水平,并分析其作为生物标志物的临床应用价值。**方法** 收集 2019 年 1 月至 2021 年 12 月该院 131 例新诊断未经治疗的 AKI 患者和 96 例健康对照者。提取尿液外泌体,随机将其纳入训练集(48 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)和验证集(83 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)。提取 RNA,通过实时荧光定量聚合酶链反应检测尿液外泌体中 miR-494-3p 的相对表达水平,分析其在 AKI 患者和健康对照者中的差异,绘制受试者工作特征(ROC)曲线,并计算曲线下面积(AUC)。**结果** 训练集 miR-494-3p 在 AKI 患者和健康对照者尿液中呈差异表达($P<0.05$)。训练集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 AUC 为 0.740(95%CI:0.640~0.824),灵敏度为 68.75%,特异度为 75.00%。相对于健康对照者,尿液外泌体 miR-494-3p 在验证集 AKI 患者中同样也呈高表达($P<0.05$),验证集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 AUC 为 0.761(95%CI:0.679~0.831),灵敏度为 72.29%,特异度为 70.83%。尿液外泌体 miR-494-3p 相对表达水平与患者年龄、性别及疾病分期无关($P>0.05$)。**结论** 尿液外泌体 miR-494-3p 在 AKI 患者中呈高表达,对 AKI 具有一定的临床诊断价值。

关键词:尿液外泌体; 急性肾损伤; miR-494-3p; 生物标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.022 **中图法分类号:**R692.5

文章编号:1673-4130(2022)18-2283-05 **文献标志码:**A

Expression level and diagnostic value of urine exosome miR-494-3p in patients with acute kidney injury

WEI Ping, WANG Yanxia, YIN Di, SHI Shumei[△]

Experimental Center of Nephrology, 960 Hospital of PLA Joint Logistic Support Force, Jinan, Shandong 250031, China

Abstract: Objective To investigate the expression level of urine exosome miR-494-3p in the patients with acute kidney injury, and to analyze its clinical application value as a biomarker. **Methods** A total of 131 patients with newly diagnosed and untreated acute kidney injury (AKI) and 96 healthy controls in this hospital from January 2019 to December 2021 were collected. Urine exosome was extracted and randomly included into the training set (48 cases of AKI patients and 48 cases of healthy controls) and validation set (83 cases of AKI patients and 48 cases of healthy controls). RNA was extracted, and the relative expression level of miR-494-3p in urine exosome was detected by qRT-PCR. The difference of AKI was analyzed between the AKI patients and healthy controls. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn and the area under the curve (AUC) was calculated. **Results** miR-494-3p in the train set was differentially expressed in urine between the AKI patients and healthy controls ($P<0.05$). AUC of urine exosome miR-494-3p in the train set for diagnosing AKI was 0.740 (95%CI:0.640-0.824), the sensitivity was 68.75% and the specificity was 75.00%. Related to the healthy controls, urine exosome miR-494-3p in the validation set was also highly expressed in the patients with AKI ($P<0.05$), AUC of urine exosome miR-494-3p for diagnosing AKI in the validation set was 0.761 (95%CI:0.679-0.831), the sensitivity was 72.29%, and the specificity was 70.83%. The relative expression level of miR-494-3p in urine exosome had no relation with the age, sex and disease stage of the patients ($P>0.05$). **Conclusion** Urine exosome miR-494-3p is highly expressed in the patients with AKI, and has a certain clinical diagnostic value for AKI.

Key words: urine exosome; acute kidney injury; miR-494-3p; biomarkers

急性肾损伤(AKI)是指由各种原因引起肾小球滤过率在短期内急剧下降的临床综合征^[1]。AKI 是

一种具有极高病死率的常见危急重症,且缺乏有效的治疗手段,该病已成为全球主要的公共卫生问题^[2]。目前,临床开展的检测方法无法可靠地预测 AKI 的发生风险和严重程度。因此,积极寻找新的高灵敏度和高特异度的早期诊断 AKI 的生物标志物,早期发现 AKI 并采取有效的干预手段是当务之急。外泌体是一类直径为 30~150 nm、脂质双分子层包裹的细胞外囊泡,存在于血清、尿液、唾液、胸腔积液等多种体液中^[3]。微小核糖核酸(miRNA)是一类长度为 19~25 个核苷酸的内源性非编码 RNA^[4]。外泌体被受体细胞摄取后,其内部的 miRNA 等遗传物质也被携带至受体细胞内,从而使受体细胞内的分子组成发生改变,并通过基因调控和信号传导通路等影响受体细胞发挥功能,参与调控包括 AKI 在内的多种疾病^[5-6]。miR-494-3p 被证明以激活转录因子 3(ATF3)的 3'-非翻译区(UTR)为靶点,ATF3 是一种已被证明可减轻肾脏缺血/再灌注损伤的蛋白质^[7]。这种特异性结合抑制了 ATF3 的转录,从而促进缺血/再灌注的炎症发生^[8]。上述研究中,miR-494-3p 的过表达显著降低了肾脏缺血/再灌注损伤后 ATF3 的表达,诱导炎症介质过表达,导致肌酐水平显著升高^[7]。但 miR-494-3p 在 AKI 患者尿液外泌体中的表达却缺乏相关报道。本文主要分析尿液外泌体 miR-494-3p 在 AKI 患者中的相对表达情况,旨在进一步了解尿液外泌体 miR-494-3p 对 AKI 的临床诊断价值,为 AKI 的早期诊断提供新的检测途径。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2019 年 1 月至 2021 年 12 月在中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院住院的 AKI 患者 131 例作为 AKI 组,其中男 71 例,女 60 例。AKI 诊断标准主要有以下 3 项:(1)在 48 h 内,患者血肌酐升高超过 0.3 mg/dL 或 26.5 μmol/L;(2)患者血肌酐升高值大于基础值的 1.5 倍,并且发生在 7 d 内;(3)患者的尿量小于 0.5 mL/(kg·h),持续超过 6 h。上述 3 项中满足 1 项即可诊断为 AKI^[9]。健康对照组 96 例,其中男 50 例,女 46 例。AKI 患者纳入标准:未经过透析或者药物等手段的干预。健康对照组纳入标准:根据生化检查等排除泌尿系统、消化系统重大疾病。本研究已获得医院伦理委员会批准同意[伦理号:(2022)科研伦理审第(34)号]。随机将研究对象纳入训练集(48 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)和验证集(83 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)。训练集和验证集分别是两组独立的样本,训练集用于筛选候选分子,验证集用于将训练集中筛选出的分子纳入另一组独立样本进一步验证得出的结论。训练集和验证集所有研究对象的性别、年龄差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。根据改善全球肾脏

病预后组织(KDIGO)^[9]AKI 临床实践指南中的 AKI 分期标准进行分期:血肌酐 48 h 内升高超过 26.5 μmol/L,或在 7 d 内升高≥基础值的 1.5 倍而小于 2.0 倍为 AKI 1 期;升高达基础值的 2.0~3.0 倍为 AKI 2 期;升高达基础值 3.0 倍以上,或血肌酐>353.6 μmol/L,或开始行肾脏替代治疗为 AKI 3 期。

表 1 训练集和验证集中 AKI 患者和健康对照者的临床特征(<i>n</i>)				
项目	训练集(<i>n</i> =96)	验证集(<i>n</i> =131)	χ^2	<i>P</i>
健康对照者	48	48		
年龄(岁)			0.042	0.838
≤48	24	25		
>48	24	23		
性别			0.668	0.414
男	23	27		
女	25	21		
AKI 患者	48	83		
年龄(岁)			1.044	0.307
≤48	27	39		
>48	21	44		
性别			<0.001	0.996
男	26	45		
女	22	38		
AKI 分期			0.334	0.846
1 期	12	21		
2 期	26	48		
3 期	10	14		

1.2 主要仪器与试剂 CFX-96 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)仪、Nanodrop2000 分光光度计、聚丙烯酰胺凝胶电泳仪、纳米颗粒跟踪分析仪、透射电子显微镜。尿液外泌体提取试剂盒(加拿大,Norgen Biotek)、总 RNA 提取试剂盒(德国,QIAGEN)、反转录试剂盒(大连,TAKARA)、qRT-PCR 试剂(大连,TAKARA)、miR-494-3p 和 miR-16-5p 的 PCR 引物(博尚生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 尿液标本收集 尿液采集后均在 2 h 内进行处理,在 4℃于离心机中以 3 500 r/min 离心 5 min,再以 10 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液于无 RNA 酶的离心管中,于-80℃冰箱保存待用。AKI 患者标本采集必须符合以下标准:入院第 2 天,禁食禁水 8 h 以上首次留取的晨尿。健康对照组标本收集标准:禁食禁水 8 h 以上留取的晨尿。

1.3.2 提取、鉴定尿液外泌体 按照尿液外泌体提取试剂盒操作步骤提取尿液外泌体。将获得的外泌体悬液经 2%醋酸双氧铀染色后,置于低分辨率透射

电子显微镜(TEM)下观察外泌体大小、形态。采用纳米颗粒跟踪分析(NTA)技术分析外泌体粒径大小和浓度分布情况。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测外泌体表面标志蛋白,其中所使用的抗体包括兔抗人 CD9 蛋白单克隆抗体(美国, CST)、鼠抗人 TSG101 蛋白单克隆抗体(英国, Abcam)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(美国, CST)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(美国, CST)。

1.3.3 尿液外泌体 miR-494-3p 检测 采用 RNA 提取纯化试剂盒提取总 RNA,操作步骤参照试剂盒说明书。采用紫外可见分光光度计测定 RNA 的 A_{260} 、 A_{280} , A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.0 表示提取的 RNA 样本含 DNA 和蛋白质杂质较少。利用反转录试剂盒行 RNA 反转录。用 qRT-PCR 对合成的 cDNA 进行扩增,反应体系为 25.0 μ L,反应试剂: Tli RNaseH Plus 12.5 μ L,PCR 前向引物(10 μ mol/L) 1.0 μ L,PCR 反向引物(10 μ mol/L) 1.0 μ L, cDNA 2.0 μ L,去 RNA 酶水 8.5 μ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,共 45 个循环。实验中 U6 不适合作为外泌体 miRNA 的内参,根据外泌体 miRNA 的有关报道,选定 miR-16-5p 作为检测的内参^[10-11]。其中 hsa-miR-16-5p 引物序列为 5'-CAG-CACGTAAATATTGGCGA-3',目的分子 hsa-miR-494-3p 引物序列为 5'-TGAAACATACACGG-

GAAACCTC-3'。每个样本均重复检测 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算其相对表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件进行统计处理和分析。对计量资料进行正态性检验,不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。利用 GraphPad Prism 5 进行作图。受试者工作特征(ROC)曲线和曲线下面积(AUC)均使用 MedCalc 软件绘制、计算。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鉴定尿液外泌体 为确定通过尿液外泌体提取试剂盒得到的沉淀为外泌体,本研究通过 TEM、NTA 技术和 Western blot 对外泌体进行鉴定。TEM 下可观察到直径为 60~150 nm 具有茶托样结构的囊状小泡(图 1A)。NTA 技术分析结果显示,所提取的外泌体悬液颗粒主峰和平均直径均在外泌体粒径范围内(图 1B)。Western blot 结果显示,在提取的尿液外泌体蛋白裂解液中成功鉴定出外泌体表面标志蛋白 CD9、TSG101,而其在去除外泌体的上清液中呈低表达(图 1C)。本研究从尿液中提取的沉淀为具有完整形态的外泌体,这为下一步研究尿液外泌体中的生物标志物提供了基础保证。

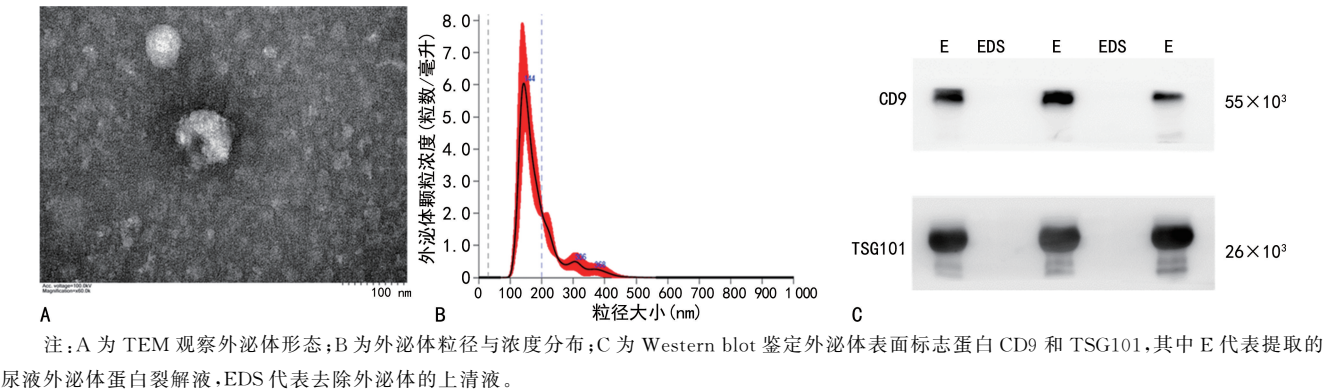


图1 尿液外泌体特征

2.2 训练集和验证集尿液外泌体 miR-494-3p 的相对表达量 训练集、验证集尿液外泌体 miR-494-3p 在 AKI 患者中的相对表达水平高于健康对照者($P<0.05$)。见表 2。

表 2 miR-494-3p 在训练集和验证集尿液外泌体中的相对表达水平 [$M(P_{25}, P_{75})$]				
项目	健康对照组	AKI 组	Z	P
训练集	1.09(0.50, 1.85)	2.11(1.20, 2.79)	-4.05	<0.001
验证集	1.20(0.59, 2.17)	2.97(1.27, 5.06)	-4.97	<0.001

2.3 训练集尿液外泌体 miR-494-3p 的诊断效能

训练集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 AUC 为 0.740(95%CI: 0.640~0.824),灵敏度为 68.75%,特异度为 75.00%。见图 2。

2.4 验证集尿液外泌体 miR-494-3p 的诊断效能 验证集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 AUC 为 0.761(95%CI: 0.679~0.831),灵敏度为 72.29%,特异度为 70.83%。见图 3。

2.5 尿液外泌体 miR-494-3p 的相对表达水平与 AKI 患者临床特征的关系 尿液外泌体 miR-494-3p 相对表达水平与患者年龄、性别及疾病分期无关($P>0.05$)。见表 3。

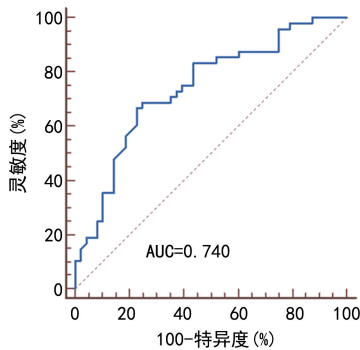


图 2 训练集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 ROC 曲线

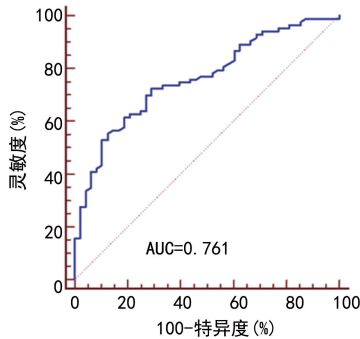


图 3 验证集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 ROC 曲线

表 3 尿液外泌体 miR-494-3p 的相对表达水平与 AKI 患者临床特征的关系[$M(P_{25}, P_{75})$]

项目	<i>n</i>	miR-494-3p	<i>Z</i>	<i>P</i>
年龄(岁)			-1.94	0.093
≤46	66	2.76(1.88,5.09)		
>46	65	2.23(1.16,3.71)		
性别			-0.95	0.726
男	71	2.38(1.27,4.17)		
女	60	2.43(1.26,4.07)		
AKI 分期			1.87	0.068
1 期	33	2.10(1.04,4.65)		
2 期	74	2.38(1.22,3.84)		
3 期	24	3.39(2.22,6.61)		

3 讨 论

尿液外泌体中富含 miRNA,外泌体的脂质双分子结构具有保护 miRNA 免受 RNA 酶降解的作用,从而保持其稳定性^[12]。尿液外泌体是一种极具潜力的生物标志物,它们很容易获得,检测尿液外泌体具有非侵入性和无创等优点。生理状态下,血清中的外泌体无法通过肾小球滤过机制进入尿液^[13],因此尿液外泌体被认为来源于肾脏细胞,而肾脏细胞分泌的外泌体可以通过 miRNA 等遗传物质影响肾脏功能^[14]。因此,尿液外泌体包裹的 miRNA 更能反映肾脏的功能^[15]。

miRNA 在不同类型的 AKI 中发生显著改变^[16]。相关研究表明,miR-24、miR-126、miR-494 和 miR-687 可与其靶基因的 3'-UTR 结合,在 AKI 损伤和修复阶段调控炎症、程序性细胞死亡和细胞周期,表明其在 AKI 中的治疗潜力^[17]。GONG 等^[18]研究发现,AKI 患者 miR-494 表达升高,后者可抑制 ATF3 表达,从而促进炎症反应,导致肾小管细胞的凋亡和坏死。ZHANG 等^[19]研究发现,AKI 患者尿液外泌体中的 miRNA 与转化生长因子-β 信号有关,外泌体 miRNA 可能是控制 AKI 进展的物质。在狼疮性肾炎患者中,尿液外泌体 miR-135b-5p、miR-107 和 miR-31 通过抑制低氧诱导因子 1α 调控系膜细胞的功能^[20]。尿液外泌体 miR-21 水平在慢性肾脏病和不同的足细胞损伤模型中呈显著上升趋势^[21]。以上研究表明尿液外泌体 miRNA 将成为判断肾脏疾病发生、发展和预后潜在的生物标志物。

本研究运用 TEM、NTA 和 Western blot 3 种方法验证利用尿液外泌体提取试剂盒可以成功提取完整的外泌体。随着对外泌体研究不断深入,笔者相信外泌体的分离、富集技术会不断得到优化。本研究重点评估了尿液外泌体 miR-494-3p 作为诊断 AKI 的生物标志物的潜在价值。尿液外泌体 miR-494-3p 在训练集(48 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)中呈差异表达,其诊断 AKI 的 AUC 为 0.740,灵敏度为 68.75%,特异度为 75.00%。在验证集中进一步验证后得出结论:尿液外泌体 miR-494-3p 在验证集(83 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)中同样也呈差异表达($P<0.05$),其诊断 AKI 的 AUC 为 0.761,灵敏度为 72.29%,特异度为 70.83%。训练集和验证集得出了同样的结论,表明尿液外泌体 miR-494-3p 对 AKI 具有一定的临床诊断价值。在此基础上,本研究统计、分析了尿液外泌体 miR-494-3p 与 AKI 患者性别、年龄和分期等临床特征的关系,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。这可能与实验方法、样本差异导致不同的结果有关,后期亟待开展大样本、多中心的研究进一步验证上述结论。

目前,肾脏和泌尿系统疾病的诊断是基于不敏感和非特异性的生物标志物。临床上常用的诊断 AKI 的生物标志物有中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白、胱抑素 C 及肾脏损伤分子-1 等。后期笔者也会开展尿液外泌体 miR-494-3p 与常用标志物的比较和联合诊断方面的研究。

需要指出的是,虽然尿液外泌体 miR-494-3p 相对表达水平在 AKI 患者和健康对照者中呈明显差异,但本研究没有比较该分子在肾脏其他疾病中的表达情况,后续将进一步开展该方面的研究。鉴于本研究中的样本均来自同一医院,样本量相对有限且单

一,后期需要扩大样本,纳入多中心和前瞻性研究进一步验证上述结论。此外还需要通过细胞和动物实验等基础研究来阐明 miR-494-3p 在 AKI 发生、发展中的生物学功能和机制,并通过生物信息学分析其在 AKI 中的可能作用。

综上所述,本研究成功提取并鉴定尿液外泌体。通过 qRT-PCR 检测发现,尿液外泌体 miR-494-3p 相对表达水平在 AKI 患者中较健康对照者显著增加。miR-494-3p 对 AKI 具有较高的诊断价值,是潜在的诊断 AKI 的生物标志物。尿液外泌体 miRNA 可能在 AKI 发病和组织修复过程中发挥双重作用,并可作为新的非侵入性生物标志物,亦可能成为治疗 AKI 的新靶点,为 AKI 诊断和治疗提供新思路和新方法。

参考文献

- [1] MASEWU A, MAKULO J R, LEPIRA F, et al. Acute kidney injury is a powerful independent predictor of mortality in critically ill patients: a multicenter prospective cohort study from kinshasa, the democratic republic of congo[J]. BMC Nephrol, 2016, 17(1): 118.
- [2] BA AQEEL S H, SANCHEZ A, BATLLE D. Angiotensinogen as a biomarker of acute kidney injury[J]. Clin Kidney J, 2017, 10(6): 759-768.
- [3] KOWAL J, TKACH M, THÉRY C. Share biogenesis and secretion of exosomes[J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 29: 116-25.
- [4] ALI SYEDA Z, LANGDEN S S S, MUNKHZUL C, et al. Regulatory mechanism of microrna expression in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1723.
- [5] WU Y L, LI H F, CHEN H H, et al. MicroRNAs as biomarkers and therapeutic targets in inflammation- and ischemia-reperfusion-related acute renal injury [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6738.
- [6] REN G L, ZHU J, LI J, et al. Noncoding RNAs in acute kidney injury[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2266-2276.
- [7] ZHOU P, CHEN Z, ZOU Y, et al. Roles of non-coding rnas in acute kidney injury[J]. Kidney Blood Press Res, 2016, 41(6): 757-769.
- [8] LAN Y F, CHEN H H, LAI P F, et al. MicroRNA-494 reduces ATF3 expression and promotes AKI[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23: 2012-2023.
- [9] KHWAJA A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury[J]. Nephrol Clin Pract, 2012, 120(4): 179-184.
- [10] DEJIMA H, IINUMA H, KANAOKA R, et al. Exosomal

microRNA in plasma as a non-invasive biomarker for the recurrence of non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 13: 1256-1263.

- [11] LIU T, ZHANG X, DU L, et al. Exosome-transmitted miR-128-3p increase chemosensitivity of oxaliplatin-resistant colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 43.
- [12] LV L L, FENG Y, TANG T T, et al. New insight into the role of extracellular vesicles in kidney disease[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(2): 731-739.
- [13] MERCHANT M L, ROOD I M, DEEGENS J K J, et al. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery[J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(12): 731-749.
- [14] DING H, LI L X, HARRIS P C, et al. Extracellular vesicles and exosomes generated from cystic renal epithelial cells promote cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4548.
- [15] ERDBRÜGGER U, BLIJNDORP C J, BIJNSDORP I V, et al. Urinary extracellular vesicles: a position paper by the urine task force of the international society for extracellular vesicles[J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10(7): e12093.
- [16] AOMATSU A, KANEKO S, YANAI K, et al. MicroRNA expression profiling in acute kidney injury[J]. Transl Res, 2021, 244: 1-31.
- [17] REN G L, ZHU J, LI J, et al. Noncoding RNAs in acute kidney injury [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2266-2276.
- [18] GONG Q, SHEN Z M, SHENG Z, et al. Hsa-miR-494-3p attenuates gene HtrA3 transcription to increase inflammatory response in hypoxia/reoxygenation HK2 Cell[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1665.
- [19] ZHANG Y, WANG J, YANG B, et al. Transfer of microRNA-216a-5p from exosomes secreted by human urine-derived stem cells reduces renal ischemia/reperfusion injury[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 610587.
- [20] GARCIA-VIVES E, SOLÉ C, MOLINÉ T, et al. The urinary exosomal mirna expression profile is predictive of clinical response in lupus nephritis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4): 1372.
- [21] LANGE T, ARTELT N, KINDT F, et al. MiR-21 is up-regulated in urinary exosomes of chronic kidney disease patients and after glomerular injury[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(7): 4839-4843.

(收稿日期: 2022-02-12 修回日期: 2022-04-27)