

肾移植术后急性排斥反应期外周血中 miRNA 表达*

段斌¹, 高妍婷², 罗永康¹, 孙建国^{1**}, 杜鹏¹, 黄启福¹

(1. 陕西省人民医院 肾移植科, 陕西 西安 710068; 2. 陕西省人民医院 肾内科, 陕西 西安 710068)

[摘要] 目的: 研究肾移植术后急性排斥反应期外周血中 miRNAs 的表达。方法: 选取 10 个肾移植术后确诊发生急性排斥反应期的病例为观察组, 均经肾穿刺病理证实, 每个病例在急性排斥反应发生时抽取外周血; 同期选取 10 例肾移植术后恢复良好、病情稳定患者抽取外周血作为对照组; Trizol 法分离总 RNA, 采用 miRCU-RYTMArray microarraykit 试剂盒进行 miRNA 芯片杂交, 经 SAM 软件选取差异表达有统计学意义的 miRNA。结果: 与对照组比较, 在急性排斥反应患者外周血检测发现, miRNA 芯片检测出 4 个 miRNA (miR142-5p, miR146b-5b, miR155, miR223) 表达上调, 2 个 miRNA (miR125b, miR324-3b) 表达下调。结论: 外周血 miRNAs 表达水平改变可作为判断急性排斥反应发生的检测指标。

[关键词] 肾移植; 急性排斥反应; miRNA 表达

[中图分类号] R617 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)06-0632-03

MicroRNA Expression in Peripheral Blood of Patients with Acute Rejection

DUAN Bin¹, GAO Yanting², LUO Yongkang¹, SUN Jianguo¹, DU Peng¹, HUANG Qifu¹

(1. Department of Renal Transplantation, People's Hospital of Shanxi Province, Xian 710000, Shanxi, China;

2. Department of Nephrology, People's hospital of Shanxi Province, Xian 710000, Shanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of MicroRNAs in peripheral blood of patients with acute rejection after renal transplantation, and so as to explore new methods for diagnosis of acute rejection. **Methods:** Ten patients with acute rejection after renal transplantation were collected as acute rejection group, and all the acute rejection patients were confirmed by renal biopsy and pathological examination. Peripheral blood of them was taken during acute rejection. Meanwhile, peripheral blood of ten patients with stable condition after renal transplantation was taken and served as control group. Total RNA was extracted with trizol method. MiRNA chip hybridization was carried out by using miRCU-RYTMArray microarray kit. Differential expression microRNAs were chosen by SAM software. **Results:** Compared with control group, four microRNAs (hsa-miR142-5p, hsa-miR146b-5b, hsa-miR155, hsa-miR223) detected by microRNAs chip showed higher expression during acute rejection. **Conclusions:** Peripheral blood microRNAs test may be a method for detecting acute rejection.

[Key words] renal transplantation; acute rejection; miRNA expression

肾移植是目前终末期肾病患者最理想、最经济的一种治疗方法,但移植后排斥反应严重影响着移植植物及受者的存活。目前,移植肾活检是能明确诊断排斥反应的唯一方法,但此方法既昂贵又不方

便,还易引起肾损伤及各种并发症。因此,有效、方便、无创伤的排斥反应早期生物标记的研究,将有助于对移植后排斥反应的诊断,提高肾移植的治疗效率。微小 RNA (miRNA) 是一类长约 21 ~ 24 nt

* [基金项目] 西安市科技局 2010 年科技计划项目 [SF1025(4)]。

** 通信作者 E-mail: pangziduanbin@sina.com

的通过转录后负调控靶基因表达的非蛋白编码 RNA 分子,miRNA 在胚胎发育、细胞分化及人类疾病的发生机制中起重要作用^[1]。本研究应用 miRNA 芯片技术,筛选在肾移植急性反应中差异表达显著的 miRNA,并通过预测差异表达 miRNA 进一步探讨 miRNA 在肾移植排斥反应中的作用机制。

1 研究材料与方法

1.1 一般资料 选择 10 位肾移植后确诊发生急性排斥反应的病例为观察组,男性 6 例,女性 4 例,年龄 26 ~ 46 岁,平均(39.0 ± 11.3)岁;临床诊断为血肌酐升高、蛋白尿、尿量减少、血尿、移植肾区胀痛,B 超显示血流阻力指数增高等。病理检查结果包括光镜和免疫组化检查,光镜可观察到 12 ~ 16 个肾小球,患者临床及病理综合诊断为移植肾急性排斥反应(Banff 97,IA-IB);患者移植后免疫抑制剂用药方案为环孢素 + 霉酚酸酯 + 醋酸泼尼松(强的松)。随机选择 10 位肾移植术后恢复良好,病情稳定患者抽取外周血作为对照组,男性 7 例,女性 3 例,21 ~ 49 岁,平均(39.8 ± 12.4)岁,免疫抑制剂用药方案同观察组。

1.2 方法 观察组患者于急性排斥反应发生时抽取外周血,在抽血后 30 min 内离心分离血清,采用 miRCURY™ Array microarraykit 试剂盒进行 miRNA 芯片杂交,用 TRIzol 试剂提取细胞的总 RNA,并用分光光度计对 RNA 进行质量检测;使用 miScriptReverse Transcription Kit 试剂盒里带有的含 universalTag 的 Oligo-dT 引物,分别进行 cDNA 合成,按照 SYBR 说明书配置 PCR 反应液,混匀后置于 7500 自动荧光检测仪,然后进行 miRNA 的实时定量 PCR 测定,按照 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 扩增仪说明书设定参数,按下列条件扩增。95 ℃ 预变性 10 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,40 个循环。反应结束后,由电脑自动分析计算出模板的拷贝

数。反向引物来自 miScriptReverse Transcription Kit 试剂盒,正向引物分别为 223'-TTTCCTATGCATATACTTCTTT-3'、142-5p'-TTTGTGCATTGCTGTTGCATTGCA-5p'、324-3p'-TTTATGTATAAATGTATACACAC-3'、155'-TTTATTCTAATTTCTCCAGGT-CTTTG-3'、146b-5b'-GTCGTATCCAGTGCCTGTCGTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACgaaagtg3'、125b'-GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGTGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACTTCGCCC3'。以实时定量 PCR 的荧光动力曲线的曲线下面积(AUC)表示单个 miRNA 表达水平。

1.3 统计学处理 经 SAM 软件将实时定量 PCR 检测出的所有 miRNA 中表达强度高的带入计算,选择软件所显示的敏感性 & 特异性均较高的 miRNA,验证所选取的 miRNA 是否具有差异表达的统计学意义(P < 0.05)。

2 结果

所提取的 RNA 经过检测符合芯片实验需求。观察组和对照组芯片研究结果经 SAM 软件选取差异表达有统计学意义的 miRNA(表 1),所筛选出的实时定量 PCR 法荧光动力曲线的曲线下面积(AUC)较高,提示 miRNA 表达水平较高的 miRNA 中,6 个 miRNA 敏感性 & 特异性均较高,具有统计学意义,可作为临床工作诊断排斥反应的依据及检测指标。参考 John Quackenbush 提出的计算机分析 miRNA 方法,认为样本标准值与对照组标准值的比值(ratio,R) > 2,差异表达显著上调;若比值 < 0.5,认为差异表达显著下调,比值 0.5 ~ 2.0,认为差异表达不显著。发现观察组 4 个 miRNA(miR142-5p,miR146b-5b,miR155,miR223)差异表达显著上调,2 个 miRNAs(miR125b,miR324-3p)差异表达显著下调(表 2)。

表 1 肾移植术后急性排斥反应期外周血中 miRNA 表达

| Tab. 1 Specific miRNAs in peripheral blood of patients with acute rejection after transplantation | | | | | |
|---|------|--------|--------|--------------------|--------|
| miRNA | 数据点 | 敏感性(%) | 特异性(%) | 曲线下面积(AUC)(95% CI) | P |
| miR142-5p | 0.11 | 100 | 95 | 0.99(0.96~1.02) | 0.0001 |
| miR146b-5b | 0.64 | 92 | 61 | 0.73(0.55~0.92) | 0.03 |
| miR155 | 0.06 | 100 | 90 | 0.98(0.94~1.01) | 0.0001 |
| miR223 | 0.44 | 92 | 90 | 0.96(0.90~1.02) | 0.0001 |
| miR125b | 1.33 | 100 | 62 | 0.83(0.69~0.97) | 0.002 |
| miR324-3p | 0.57 | 67 | 76 | 0.79(0.63~0.95) | 0.007 |

表 2 肾移植后急性排斥反应期外周血
miRNA 差异性表达
Tab. 2 Differential expression of miRNAs in
peripheral blood of patients with acute
rejection after transplantation

| miRNAs | miRNA 表达标准值 | | AR/NC | 类型 |
|------------|-------------|---------|-------|----|
| | 观察组(AR) | 对照组(NC) | | |
| miR142-5p | 0.440 | 0.185 | 2.380 | 上调 |
| miR146b-5b | 0.509 | 0.117 | 4.350 | 上调 |
| miR155 | 0.463 | 0.214 | 2.162 | 上调 |
| miR223 | 0.035 | 0.008 | 4.338 | 上调 |
| miR125b | 0.000 43 | 0.086 | 0.005 | 下调 |
| miR324-3p | 0.015 | 0.701 | 0.021 | 下调 |

3 讨论

miRNA 是一种长约 22 nt 的非编码性小 RNA, 通过与靶基因的 3'非翻译区(3'-UTR)结合来调控靶基因的表达^[2]。miRNA 的功能涉及多种生物学过程。近年来发现,miRNA 在免疫细胞的产生、发育以及免疫应答过程中有着重要的作用^[3]。成熟 miRNA 能够通过核酸序列互补识别特定的目标 miRNA,使之降解或抑制其翻译,从而抑制蛋白质的合成,达到调控基因表达的目的^[4]。一些相关研究已经证实,在造血干细胞向免疫细胞分化的不同阶段,miRNA 表达会发生相应的变化。比如在脾脏来源的成熟 B 细胞中可以检测到 miR-150 表达明显上调,而在骨髓来源的 pro-B 细胞中却并未看到。T 细胞成熟过程中 miR-150 表达水平亦可明显升高,但是在进一步向 Th1、Th2 亚群分化时它的表达水平又会迅速下降。与之不同,miR-146 表达水平在 Th1 细胞亚群中升高,而在 Th2 细胞亚群中则表现为降低。Li 等^[5]研究也发现 miR-181a 在 T 细胞分化早期双阴性期表达水平较高,而在双阳性期及以后各期其表达水平明显下降。

本实验基于 miRNA 在免疫反应中的特异性表达,证明微阵列芯片是有效的高通量分析肾移植排斥反应 miRNA 差异表达的研究手段。目前已知 miRNA 家族是基因表达调控网络中关键的一员,同时影响着多条信号传导通路。已发现的人类 miRNA 有 500 多种,小鼠 miRNA 已达 400 多种,并且这个数目一直在增加^[6],本研究使用实时定量 PCR 法筛选出表达强度较高的 miRNA,即使如此,所检测出的 miRNA 种类数量也是较多的,进而使

用 SAM 软件对筛选出表达强度较高的 miRNA 进行统计学分析,选择软件所显示的敏感性 & 特异性均较高的 miRNA 作为临床检测指标,并以此作为判断临床诊断排斥反应的依据。

本实验应用 SAM 软件筛选出的 6 个在肾移植急性排斥反应中差异表达显著的 miRNA,证实 miRNA 在肾移植排斥反应中出现显著的差异表达,提示差异表达显著的 miRNA 广泛参与基因的转录调控过程,有可能是肾移植排斥反应的新的有效生物标记。

由于 miRNA 在细胞分化、肿瘤形成、免疫系统发展等多种生物学过程中具有重要作用,因此,miRNAs 将成为一类新的诊断和治疗人类疾病的靶点。许多研究正致力于抑制不正常 miRNA 的表达,如反义核酸技术、锁核酸技术(locked nucleic acid)和“miRNA 海绵体”(miRNA sponges),均实现了抑制 miRNA 的表达^[7]。随着对 miRNA 研究方法的不断更新与进步,将充分了解 miRNA 在免疫系统复杂的基因表达调控中的作用,这不仅有助于理解免疫系统的平衡,更有助于利用 miRNA 的作用靶点来调控免疫反应,为治疗疾病、维护机体健康提供一条新的途径。

4 参考文献

- [1] Clarke W. Proteomic research in renal transplantation[J]. Ther Drug Monit,2006(1):19-22.
- [2] 丁瑜. miRNAs 与免疫系统[J]. 中国生物制剂学杂志, 2008(12):1132-1133.
- [3] Susanta K. Behura. Insect miRNAs: structure, function and evolution[J]. Biochemistry and Molecular Biology, 2007 (37):3-9.
- [4] Dany Anglicheau. miRNAs: small RNAs with big effects [J]. Transplantation,2010(90):105-112.
- [5] Stuart M. Flechner, kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes[J]. American Journal of Transplantation[J]. 2004(4):1475-1489.
- [6] Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, et al. MiRNA profiling of the murine hematopoietic system[J]. Genome Biol, 2005(8): R71.
- [7] Jordan YZ LI. The role of miRNAs in kidney disease[J]. Nephrology, 2010(15):599-608.

(2012-07-20 收稿,2012-09-28 修回)

编辑:潘 娅