

· 中医证候研究 ·

血浆 miR-127-3p 及 miR-129-5p 分子与狼疮性肾炎 微观血瘀证的相关性探讨

张绍杰¹, 汤水福², 涂晓³, 钱飞婷⁴, 胡芳玉³

(1. 杭州市丁桥医院肾病科, 浙江杭州 310021; 2. 广州中医药大学第一附属医院肾病科, 广东广州 510405;
3. 杭州市中医院, 浙江杭州 310007; 4. 绍兴市中医院肾病科, 浙江绍兴 312000)

摘要:【目的】探讨狼疮性肾炎(LN)患者 miR-127-3p、miR-129-5p 分子的表达情况及与微观血瘀证和相关临床指标的相关性。【方法】收集符合微观血瘀证及微观非血瘀证的 LN 患者各 30 例, 同时选取 15 例健康志愿者作为健康对照组。应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测所有受试者血浆 miR-127-3p、miR-129-5p 分子表达量, 比较 2 组 LN 患者肾功能[血尿素氮(BUN)、血尿酸(UA)、血肌酐(Cr)、血清胱抑素(Cys-C)]和肾病理指数[活动性指数(AI)、慢性化指数(CI)]的差异, 分析 miR-127-3p、miR-129-5p 分子与上述临床指标的相关性。【结果】(1)微观血瘀证组患者 miR-127-3p、miR-129-5p 及 Cr、BUN、UA、Cys-C、AI、CI 水平均明显高于非血瘀证组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。微观血瘀证组 miR-127-3p 的表达量明显高于健康对照组($P < 0.05$), 而 2 组 LN 患者 miR-129-5p 表达与健康对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。(2)LN 患者 miR-127-3p 表达量与血 Cr、BUN、UA、Cys-C、AI 水平具有正相关性($P < 0.05$), miR-129-5p 表达量与血 Cr、BUN 水平具有正相关性($P < 0.05$)。【结论】LN 合并微观血瘀证患者肾功能更差, 病理活动、慢性化程度均更高; miR-127-3p、miR-129-5p 分子与微观血瘀证具有一定相关性, 有可能作为潜在的生物标志物以指导辨证。

关键词: 狼疮性肾炎; 微观血瘀证; miR-127-3p; miR-129-5p

中图分类号: R593.24*2

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)09-1775-05

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.09.001

Correlation of Plasma miR-127-3p and miR-129-5p with Micro-blood Stasis Syndrome of Lupus Nephritis

ZHANG Shao-Jie¹, TANG Shui-Fu², TU Xiao³, QIAN Fei-Ting⁴, HU Fang-Yu³

(1. Dept. of Nephrology, Dingqiao Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310021 Zhejiang, China; 2. Dept. of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 3. Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007 Zhejiang, China; 4. Dept. of Nephrology, Shaoxing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shaoxing 312000 Zhejiang, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-127-3p and miR-129-5p in patients with lupus nephritis (LN), and to study their correlation with micro-blood stasis syndrome and related clinical indicators. **Methods** The 30 cases of LN patients with micro-blood stasis syndrome and 30 LN patients without blood stasis syndrome were enrolled into the study. Meanwhile, 15 healthy volunteers served as the healthy control group. The expression levels of miR-127-3p and miR-129-5p in the plasma of all studying subjects were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The renal function indicators of blood urea nitrogen (BUN), blood uric acid (UA), serum creatinine (Cr), and serum cystatin C (Cys-C), and the renal pathological indexes of activity index (AI) and chronic index (CI) in the two groups of LN patients were compared. And finally, the correlation of miR-127-3p and miR-129-5p expression levels with the renal function indicators and the

收稿日期: 2020-12-13

作者简介: 张绍杰(1983-), 男, 博士, 主治医师; E-mail: 625368403@qq.com

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(编号: 2018ZQ043, 2021ZQ061)

pathological indexes was analyzed. **Results** (1) The levels of miR-127-3p, miR-129-5p, Cr, BUN, UA, Cys-C, AI, and CI in the LN patients with micro-blood stasis syndrome were significantly higher than those in the LN patients with non-blood stasis syndrome, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of miR-127-3p in micro-blood stasis syndrome LN group was obviously higher than those in the healthy control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in miR-129-5p expression level between the two LN patients groups and the healthy control group ($P > 0.05$). (2) The expression level of miR-127-3p in LN patients was positively correlated with the levels of blood Cr, BUN, UA, Cys-c and AI ($P < 0.05$), and the expression level of miR-129-5p was positively correlated with the blood levels of Cr and BUN ($P < 0.05$). **Conclusion** LN patients with micro-blood stasis syndrome present worse renal function and higher degree in pathological activity and chronicity. The molecules of miR-127-3p and miR-129-5p have certain correlation with micro-blood stasis syndrome, which might be used as the potential biomarkers to guide the syndrome differentiation. **Keywords:** lupus nephritis; micro-blood stasis syndrome; miR-127-3p; miR-129-5p

狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)是系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)的肾脏损害,肾活检显示肾脏受累几乎为100%。LN是继发性肾小球肾炎的最常见原因,约占60%^[1]。本病治疗较为困难,且易复发。LN除引起肾小球的病变外,尚可引起肾小管间质病变。有报道LN中肾小管间质病变可达6.9%~86.5%^[2]。我们前期的研究发现,IV型LN患者合并肾间质病变达62.5%,且与血瘀证密切相关^[3]。

肾小管萎缩及肾间质纤维化等病理改变符合中医学的血瘀证表现,王永钧教授提出对肾脏疾病血瘀证的辨证应宏观与微观、临床与病理相结合,认为肾小球毛细血管微血栓形成、肾小球硬化、肾小管萎缩及间质纤维化等均属于微观意义上的血瘀证^[4]。这其中很大一部分患者并无肌肤甲错、舌质紫暗等外在瘀血征象。出现上述病理表现后则治疗较为棘手,且效果欠佳。若能早期诊断微观血瘀证,及时加以干预,则可在一定程度上延缓病情进展。故在此围绕LN微观血瘀证,选取miR-127-3p、miR-129-5p及相关实验室指标进行对照研究,以期能对微观血瘀证的辨证提供简便客观的指标,以利于临床上的早期诊断及干预。现将研究结果报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象及分组 收集2018年6月至2020年1月在杭州市中医院住院治疗的LN患者,共60例,

其中微观血瘀证组与非血瘀证组各30例。所有患者均已于本院或外院行肾穿刺活检,具有明确的病理结果。同时,选取15例健康志愿者作为健康对照组。

1.2 病例选择标准

1.2.1 诊断标准 西医诊断标准:参照1997年美国风湿病协会制定的SLE诊断标准,符合4项或4项以上者即可诊断为SLE,其中包含第7项者即可诊断为LN。中医微观血瘀证诊断标准:参照王永钧教授《IgAN肾病理的中医微观辨证》^[4]中的瘀痹证标准制定。①死血凝着:肾小球毛细血管内微血栓形成,毛细血管内血栓样物质沉积,肾小静脉血栓,毛细血管闭塞、淤血。②肾内微癥积:肾小球局灶、节段硬化,肾小管萎缩,间质纤维化,纤维性新月体,球周纤维化。符合上述病理表现任意一项者即可辨为微观血瘀证。

1.2.2 纳入标准 ①符合上述西医LN的诊断标准;②符合上述中医微观血瘀证诊断标准;③临床资料完善的患者。

1.2.3 排除标准 ①合并有高血压、糖尿病等其他能引起肾脏损伤的疾病患者;②患有混合性结缔组织病的患者;③患有尿路感染等感染性疾病的患者;④合并有心、脑、肝和造血系统等严重原发性疾病的患者;⑤临床资料不完善的患者。

1.3 观察指标

1.3.1 miR-127-3p、miR-129-5p分子表达情况 所有受试者均空腹抽取静脉血8 mL,乙二胺四乙酸

(EDTA)抗凝,以4 000 r/min(离心半径为13.5 cm)离心10 min,分离血浆,并于-80 ℃保存。委托广州维伯鑫生物科技股份有限公司完成血浆miR-127-3p、miR-129-5p分子的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测。

1.3.2 肾病理指数 包括活动性指数(AI)和慢性化指数(CI),均采用Austin半定量法判定,其中AI为0~24分,CI为0~12分。

1.3.3 肾功能指标 检测LN患者血尿素氮(BUN)、血尿酸(UA)、血肌酐(Cr)、血清胱抑素(Cys-C)等肾功能指标。

1.4 统计方法 应用SPSS 17.0统计软件进行数据的统计分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布者采用 t 检验,非正态分布者采用秩和检验;计数资料用率或构成比表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用Spearman秩相关系数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组患者的基线资料比较 表1结果显示:2组患者的性别、年龄等基线资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

表1 2组狼疮性肾炎(LN)患者的性别和年龄比较

Table 1 Comparison of the gender and age of LN patients between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	性别[男/女(例)]	平均年龄(岁)
微观血瘀证组	30	5/25	42.76 ± 15.98
非血瘀证组	30	1/29	42.50 ± 13.71
F/h 值		2.963	0.195
P 值		0.195	0.846

2.2 2组患者的肾功能指标比较 表2结果显示:微观血瘀证组患者的BUN、UA、Cr和Cys-C水平均明显高于非血瘀证组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 2组狼疮性肾炎(LN)患者肾功能指标比较

Table 2 Comparison of renal function indexes between the two groups of LN patients ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	BUN($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	UA($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Cr($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Cys-C($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
微观血瘀证组	30	12.75 ± 8.56 ^①	403.93 ± 102.43 ^①	182.97 ± 161.12 ^①	2.13 ± 1.18 ^①
非血瘀证组	30	5.42 ± 4.02	308.70 ± 94.17	58.53 ± 27.29	0.99 ± 0.28

① $P < 0.05$,与非血瘀证组比较

2.3 2组患者的肾病理指数比较 表3结果显示:微观血瘀证组患者的AI和CI水平均明显高于非血瘀证组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表3 2组狼疮性肾炎(LN)患者肾病理指数比较

Table 3 Comparison of renal pathological indexes of LN patients between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	活动性指数(AI)	慢性化指数(CI)
微观血瘀证组	30	8.32 ± 4.20 ^①	4.05 ± 2.26 ^①
非血瘀证组	30	5.53 ± 4.51	2.53 ± 21.65

① $P < 0.05$,与非血瘀证组比较

2.4 2组患者miRNA分子表达量比较 表4结果显示:在miR-127-3p分子的表达方面,微观血瘀证组的miR-127-3p分子表达量明显高于非血瘀证组及健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而非血瘀证组与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。在miR-129-5p分子的表达方面,微观血瘀证组的miR-129-5p分子表达量明

表4 2组狼疮性肾炎(LN)患者miR-127-3p、miR-129-5p分子表达量比较

Table 4 Comparison of miR-127-3p and miR-129-5p molecular expression levels between the two groups

组别	例数(例)	miR-127-3p	miR-129-5p
微观血瘀证组	30	7.38 ± 3.76 ^{①②}	1.85 ± 1.09 ^①
非血瘀证组	30	1.73 ± 2.13	0.81 ± 0.66
健康对照组	15	1.27 ± 1.23	1.53 ± 2.10

① $P < 0.05$,与非血瘀证组比较;② $P < 0.05$,与健康对照组比较

显高于非血瘀证组($P < 0.05$);而微观血瘀证组、非血瘀证组与健康对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 相关性分析 经Spearman秩相关分析,60例狼疮性肾炎患者miR-127-3p表达量与血Cr、BUN、UA、Cys-C水平呈显著正相关($r=0.541$, $P=0.00$;

$r=0.490$, $P=0.000$; $r=0.490$, $P=0.004$; $r=0.367$, $P=0.003$)。miR-129-5p 表达量与血 Cr、BUN 水平呈显著正相关($r=0.408$, $P=0.001$; $r=0.339$, $P=0.008$), 而与血 UA、Cys-C 水平无明显相关性($r=0.194$, $P=0.138$; $r=0.265$, $P=0.068$)。miR-127-3p 表达量与 AI 呈显著正相关($r=0.307$, $P=0.048$), 而与 CI 无明显相关性($r=0.172$, $P=0.276$)。miR-129-5p 表达量与 AI、CI 均无明显相关性($r=0.267$, $P=0.087$; $r=0.145$, $P=0.359$)。

3 讨论

狼疮性肾炎(LN)患者很大一部分合并肾小管间质病变, 而此病理改变是促使 LN 进入终末期肾病的最大危险因素^[5]。我们前期研究数据证实此种病理改变与血瘀证密切相关, 也就是说出现血瘀证后预后一般较差, 尤其是出现肾小管萎缩及间质纤维化等较严重的改变, 此时治疗虽有一定效果, 但难以逆转, 很快便进展至终末期肾病, 若能早期加以干预, 或可延缓病情进展。肾穿刺活检不能反复进行, 故需探索简单易行的客观指标来辅助诊断微观血瘀证。

本研究结果显示, LN 微观血瘀证患者 Cr、BUN、UA、Cys-C 水平均明显高于非血瘀证患者。从现代医学角度来看, Cr、BUN、UA、Cys-C 等指标均反映肾功能程度, 微观血瘀证患者病理表现为肾组织硬化、纤维化、萎缩等, 这均是病情加重的表现, 所以肾功能程度要比非血瘀证组差。从中医方面来讲, 瘀血痹阻肾络, 肾失泄浊, 久之浊毒内留, 故血肌酐、尿素氮等毒素蓄积体内而导致这些肾功能指标升高。陈丽贞等^[6]研究也证实, LN 合并血瘀证的患者肾功能指标要显著高于未合并血瘀证患者, 这与我们的研究结果相符合。对血瘀证患者加以中药干预可取得一定的效果。胥晓芳等^[7]研究证实, 活血化瘀中药治疗可改善慢性肾脏病患者肾小管间质损伤程度, 从而能够起到保护肾小管功能的作用。

慢性化指数(CI)能反映肾脏的慢性损害程度, 肾小球硬化、纤维性新月体形成、肾小管萎缩、间质纤维化等病理表现均属于微观血瘀证的范畴, 故其 CI 显著增高。这与我们前期研究结果相符合, 研究证实传统意义上的血瘀证 LN 患者 CI 也显著增高, 并认为血瘀证与 CI 具有一定相关

性^[5]。活动性指数(AI)能反映肾脏活动性病变的程度, 其水平越高, 说明微观血瘀证组患者疾病活动性越强, 需要更为积极的治疗来控制病情活动。若治疗不及时或治疗强度不足, 活动性病变未有效控制, 逐渐演变为硬化、纤维化等病理改变, 进而导致 CI 水平的进一步升高。

LN 微观血瘀证患者 miR-127-3p、miR-129-5p 分子表达量显著高于非血瘀证患者, 且二者与部分肾功能指标具有正相关性。通过与健康对照组比较, 可以排除 LN 疾病本身导致的 2 个分子表达量改变, 说明二者与微观血瘀证具有一定相关性, 并能在一定程度上反映肾功能情况。已有研究证明 miR-127 分子能起到保护肾小管功能的作用^[8]; 同时又有研究^[9]表明, 百令胶囊可能通过调控 miR-127 的表达而达到缓解 LN 病情的目的。这说明 miR-127 分子在肾脏疾病中具有重要作用。Li C 等^[10]研究发现, miR-129 能参与小鼠肾脏纤维化的发生发展。Wang Q 等^[11]研究发现, miR-129 等分子能促进糖尿病肾病小鼠肾脏纤维连接蛋白的合成, 最终导致纤维化的发生。肾脏纤维化属于微观血瘀证范畴, 这也从侧面说明 miR-129 分子与微观血瘀证密切相关。miR-127-3p 表达量与 AI 具有显著正相关, 说明该分子可直接反映肾脏病理活动性情况。本研究显示 2 个分子与 CI 并无直接相关性, 但并不能说明二者与肾脏慢性化病变无关, 毕竟二者在微观血瘀证组中的表达是显著增高的, 不排除由于本研究样本量少, 可能存在偏倚等情况, 而且并没有对肾脏病理改变情况进行细致的评估, 故确切的结论有待今后更深入的研究加以证实。

miRNA 除存在于组织外, 也存在于血液、尿液、唾液等体液中, 这更方便临床采集标本, 实用性较好。且 miRNA 比较稳定, 有研究发现标本在室温存放 1 周或反复冻融后, miRNA 的变化很轻微^[12]。由此可见, miRNA 分子是较理想的研究指标。本研究的 2 个 miRNA 分子已证实与微观血瘀证具有一定相关性, 加之检测方便、稳定, 具有作为特异性标志物的潜力, 但还需后期进一步的研究来证实。

参考文献:

- [1] WANG H, REN Y L, CHANG J, et al. A systematic review and

- meta-analysis of prevalence of biopsy-proven lupus nephritis [J]. *Arch Rheumatol*, 2018, 33(1): 17-25.
- [2] 张岩, 蔡广研, 刘述文, 等. 狼疮肾炎肾小管间质损伤的临床特点及其对预后的影响 [J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2017, 6(2): 58-63.
- [3] 张绍杰, 汤水福. IV型狼疮性肾炎中医证型与肾间质病变的相关性探讨 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(5): 1200-1202.
- [4] 王永钧. IgAN 肾病理的中医微观辨证 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2011, 12(2): 95-98.
- [5] 孙海鸥, 胡伟新, 谢红浪, 等. V型狼疮性肾炎的远期预后 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2007, 16(1): 14-18.
- [6] 陈丽贞, 戴秀娟, 罗金国. 狼疮性肾炎临床指标、肾脏病理与中医证型相关性研究 [J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(5): 118-120.
- [7] 胥晓芳, 张权, 何立群, 等. 抗纤灵二号方干预慢性肾脏病肾小管间质损伤的临床研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2016, 17(2): 123-126.
- [8] AGUADO-FRAILE E, RAMOS E, SÁENZ-MORALES D, et al. MiR-127 protects proximal tubule cells against ischemia/reperfusion: identification of kinesin family member 3B as miR-127 target [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44305.
- [9] 舒岍, 谭菲, 黄亮桦, 等. 百令胶囊对狼疮性肾炎患者巨噬细胞功能的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(6): 733-738.
- [10] LI C, LIU Y F, HUANG C, et al. Long non-coding RNA NEAT1 sponges miR-129 to modulate renal fibrosis by regulation of collagen I [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 319(1): F93-F105.
- [11] WANG Q, WANG Y, MINTO A W, et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy [J]. *FASEB J*, 2008, 22(12): 4126-4135.
- [12] 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 USA*, 2008, 105(30): 10513-10518.

【责任编辑：陈建宏】