

脓毒症急性肾损伤患者血清 miR-125b-5p 的表达水平及意义

陶伍元 邓柳霞 李晓萍

作者单位: 518101 广东深圳, 深圳市宝安区人民医院急诊科(陶伍元、李晓萍), 肾内科(邓柳霞)

通信作者: 邓柳霞, Email: 82811035@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2022.03.019

【摘要】 目的 探讨 miR-125b-5p 在脓毒症急性肾损伤(SAKI)患者血清中的表达水平及其与血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)的相关性。方法 选择 2019 年 6 月—2021 年 12 月深圳市宝安区人民医院收治的 38 例 SAKI 患者作为 SAKI 组, 另外选择 40 名同期健康体检者作为对照组。采集所有受检者静脉血标本, 对各组中 3 例患者的血清样本进行微小 RNA(miRNA)测序分析; 采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测两组血清 miR-125b-5p 表达; 进行京都基因和基因组数据库(KEGG)富集分析; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中 VE-cadherin 水平; 采用 Pearson 相关分析法对血清 miR-125b-5p 表达与 VE-cadherin 水平进行相关性分析。结果 ① 实时荧光定量 PCR 结果显示, SAKI 组的 miR-125b-5p 表达水平明显高于对照组(3.65 ± 0.39 比 1.25 ± 0.21 , $P < 0.05$)。② KEGG 信号通路富集分析结果显示, 靶基因富集于乳头瘤病毒感染、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B(PI3K-Akt)信号通路、肌动蛋白骨架调节、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路。③ SAKI 组患者血清 VE-cadherin 水平明显高于对照组($\text{mg/L}: 22.39 \pm 5.24$ 比 15.54 ± 4.78 , $P < 0.05$)。④ 相关性分析显示, miR-125b-5p 表达水平与血清中 VE-cadherin 水平呈正相关(r 值为 0.743, P 值为 0.001)。结论 SAKI 患者血清 miR-125b-5p 表达水平与血清中的 VE-cadherin 水平呈正相关, 两者间可能存在一定的调控关系。

【关键词】 miR-125b-5p; 脓毒症; 急性肾损伤; 血管内皮钙黏蛋白

基金项目: 深圳市宝安区科技计划项目(2019JD032)

Expression level and significance of serum miR-125b-5p in septic acute kidney injury patients

Tao Wuyuan, Deng Liuxia, Li Xiaoping. Department of Emergency, Shenzhen Bao'an District People's Hospital, Shenzhen 518101, Guangdong, China (Tao WY, Li XP); Department of Nephrology, Shenzhen Bao'an District People's Hospital, Shenzhen 518101, Guangdong, China (Deng LX)

Corresponding author: Deng Liuxia, Email: 82811035@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression level of miR-125b-5p in serum of septic acute kidney injury (SAKI) patients and its relationship with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). **Methods** The 38 sepsis patients admitted to Shenzhen Bao'an District People's Hospital from June 2019 to December 2021 were selected as SAKI group, and 40 health examinees in the same period were selected as control group. The venous blood samples of all subjects were collected, and three patients' sera in each group were selected for microRNA (miRNA) sequencing analysis. The expression of miR-125b-5p in serum of two groups was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). The enrichment analysis of Kyoto Gene and Genome Database (KEGG) was carried out. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the level of VE-cadherin in serum. The correlation between serum miR-125b-5p and VE-cadherin levels was analyzed. **Results** ① Real-time quantitative PCR detection showed that compared with control group, the level of miR-125b-5p expression in SAKI group was elevated (3.65 ± 0.39 vs. 1.25 ± 0.21 , $P < 0.05$). ② The target genes were enriched in human papillomavirus infection, PI3K-Akt signaling pathway, regulation of actin cytoskeleton and MAPK signaling pathway in KEGG enrichment analysis. ③ The serum VE-cadherin level of SAKI patients was higher than that in control group ($\text{mg/L}: 22.39 \pm 5.24$ vs. 15.54 ± 4.78 , $P < 0.05$). ④ miR-125b-5p expression level was positively correlated with serum VE-cadherin level (r value was 0.743 and P value was 0.001). **Conclusion** The expression level of serum miR-125b-5p in SAKI patients is positively correlated with serum VE-cadherin level, with a certain regulatory relationship.

【Key words】 miR-125b-5p; Sepsis; Acute kidney injury; Vascular endothelial cadherin

Fund Program: Project of Shenzhen Bao'an District Science and Technology (2019JD032)

脓毒症致患者器官功能损伤中以急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 为常见。脓毒症急性肾损伤 (septic acute kidney injury, SAKI) 的发病机制较复杂, 有研究显示, 微小 RNA (microRNA, miRNA) 参与 SAKI 的发生发展。本研究通过对 SAKI 患者血清中的 miRNA 进行测序分析, 同时进行京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析, 探讨 miR-125b-5p 在 SAKI 患者血清中的水平变化及其与血管内皮钙黏蛋白 (vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) 水平的相关性, 现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象与分组 选择 2019 年 6 月—2021 年 12 月深圳市宝安区人民医院急诊科收治的 38 例 SAKI 患者作为研究对象, 另外选择同期 40 名健康体检者作为对照组。

1.1.1 纳入标准 ① 年龄 18~70 岁, 符合 2016 版脓毒症与脓毒性休克国际处理指南的诊断标准, 即存在感染或可疑感染, 且序贯器官衰竭评分 (sequential organ failure assessment, SOFA) ≥ 2 分; ② 符合肾脏疾病预后组织指南的 AKI 诊断标准: 48 h 血肌酐 (serum creatinine, SCr) 上升 ≥ 26.5 mmol/L 或 7 d 内 SCr > 1.5 倍基线值, 连续 6 h 尿量 < 0.5 mL \cdot kg⁻¹ \cdot h⁻¹; ③ 病例资料完整。

1.1.2 排除标准 ① 既往有严重慢性病 (糖尿病、恶性肿瘤、慢性肾功能不全、慢性心力衰竭) 病史; ② 长期使用糖皮质激素; ③ 临床资料不全。

1.1.3 伦理学 本研究符合医学伦理学标准, 并经本院伦理审批 (审批号: 2019JD032), 所有检测均获得过患者或家属的知情同意。

1.2 仪器与试剂 Rayto RT-6100 全自动酶标分析仪购自深圳雷度公司, 实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购自美国 ABI 公司, Nanodrop 分光光度计和台式冷冻高速离心机购自美国 Thermo 公司, Agilent 2100 生物分析仪购自美国安捷伦公司, Hiseq 2500 测序仪和 TruSeq Small RNA 建库试剂盒均购自美国 Illumina 公司, miRNeasy RNA 提取试剂盒购自美国 QIAGEN 公司, 人 VE-cadherin 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒, 反转录试剂盒、TB Green qPCR 试剂盒、DEPC 水均购自日本 TAKARA 公司, miRNA 茎环法反转录试剂盒购自美国 EZB 生物公司, Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,

三氯甲烷购自上海试剂一厂, 异丙醇购自中国医药集团有限公司。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 两组血清 miRNA 测序分析 血浆总 RNA 提取: 采用 miRNeasy Kit 试剂盒提取 RNA, 根据说明书操作分离和纯化样品总 RNA, 检测 RNA 的完整性。参照试剂盒说明书构建小 RNA 文库, 具体过程为: 3' 接头序列连接, 5' 接头序列连接, 反转录生成 cDNA 链, PCR 扩增, 电泳纯化目的片段。采用 Agilent 2100 生物分析仪进行质量检验, 合格后采用 Hiseq2500 测序仪进行测序, 读长为 1 \times 50 bp。

1.3.2 采用实时定量荧光 PCR 法检测 miR-125b-5p 表达 取 200 μ L 血清置于 1.5 mL 离心管中, 加入 800 μ L Trizol 试剂混匀。按照反转录试剂盒说明书, 采用两步法将 RNA 反转录成 cDNA, 采用实时定量 PCR 试剂盒进行 cDNA 扩增, PCR 引物由上海生工有限公司合成。见表 1。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 90 s; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 40 个循环。以 cel-miR-39-3p 为内参基因, 对 miR-125b-5p 的相对表达水平进行定量检测, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值进行计算, 对各组数值进行统计分析。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'—3')
cel-miR-39-3p	反转录 CAGTGCAGGTCAGAGGTCAGAGC CACCTGGCAATTTTTTTTTTTT
	上游引物 AACACGCTCACCGGTGTAA
	下游引物 CAGTGCAGGTCAGAGGTCAGAGC
hsa-miR-125b-5p	反转录 CAGTGCAGGTCAGAGGTCAGAGC CACCTGGCAATTTTTTTTTTTT
	上游引物 AACCAGTCCCTGAGACCCTA
	下游引物 CAGTGCAGGTCAGAGGTCAGAGC

1.3.3 ELISA 检测两组血清 VE-cadherin 水平 采集两组患者静脉血 4 mL, 以 2 000 r/min 离心 10 min 提取血清, 于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。取血清 100 μ L, 采用 ELISA 法检测血清中 VE-cadherin 水平, 按照试剂盒和相关仪器说明书进行操作。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据, 符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较采用 *t* 检验; 计数资料以例 (%) 表示, 采用 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 两组研究对象性别、年龄、体质量指数 (body mass index, BMI) 等一般资料比较差异均无统计学意义 (均 P > 0.05), 有可比性。见表 2。

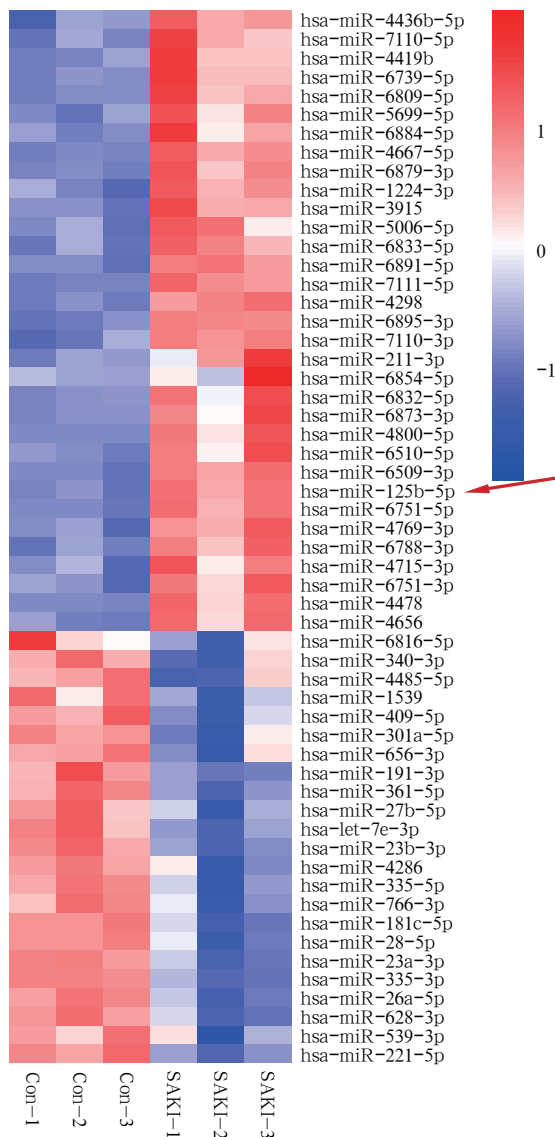
SAKI 组中感染来源分别为腹腔感染 6 例,泌尿系统感染 8 例,肺部感染 8 例,胆道感染 6 例,肠道感染 3 例,软组织感染 4 例,血液循环系统感染 3 例。

表 2 对照组与 SAKI 组的一般资料比较

组别	例数 (例)	性别 (例)		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	BMI ($\text{kg/m}^2, \bar{x} \pm s$)
		男性	女性		
对照组	40	22	18	49.31 ± 12.57	24.43 ± 3.87
SAKI 组	38	22	16	47.23 ± 14.67	25.85 ± 3.65

注: SAKI 为脓毒症急性肾损伤, BMI 为体质指数

2.2 两组患者血清 miRNA 测序分析结果比较 SAKI 组血清中有 33 种 miRNA 表达水平明显高于对照组, 23 种 miRNA 表达水平明显低于对照组; SAKI 组 miR-125b-5p 表达水平明显高于对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见图 1。



注: hsa 为人类微小 RNA, 红色箭头指向 miR-125b-5p, SAKI 为脓毒症急性肾损伤

图 1 两组血清 miR-125b-5p 测序分析结果比较

2.3 两组血清 miRNA-125b-5p 表达水平比较 实时荧光定量 PCR 法检测结果显示, SAKI 组患者血清中 miRNA-125b-5p 表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

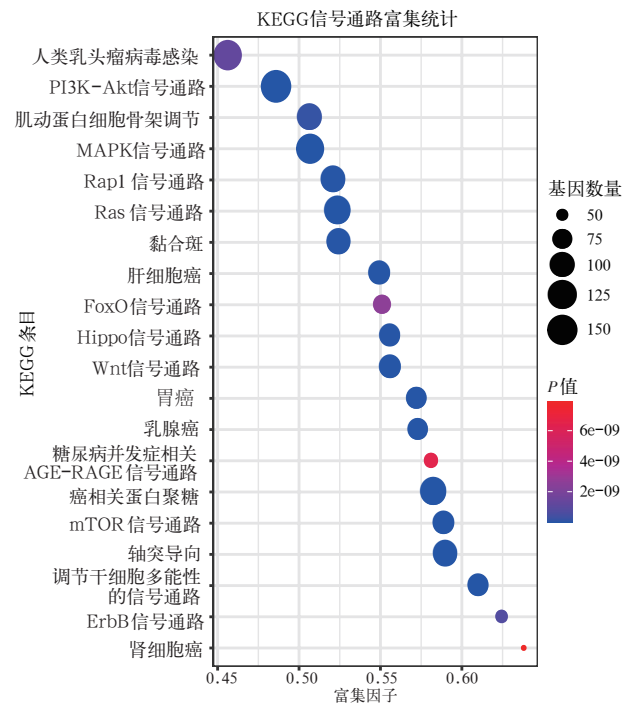
2.4 两组血清 VE-cadherin 水平比较 SAKI 组患者血清 VE-cadherin 水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 对照组与 SAKI 组血清 miR-125b-5p 表达和 VE-cadherin 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	miR-125b-5p	VE-cadherin (mg/L)
对照组	40	1.25 ± 0.21	15.54 ± 4.78
SAKI 组	38	3.65 ± 0.39	22.39 ± 5.24
<i>t</i> 值		19.880	5.852
<i>P</i> 值		0.001	0.001

注: SAKI 为脓毒症急性肾损伤, VE-cadherin 为血管内皮钙黏蛋白

2.5 KEGG 富集分析 KEGG 信号通路富集分析结果显示, 靶基因显著富集于乳头瘤病毒感染、磷脂酰肌醇 3- 激酶 - 蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B, PI3K-Akt) 信号通路、肌动蛋白骨架调节、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路等。见图 2。



注: KEGG 为京都基因和基因组数据库

图 2 KEGG 富集分析图

2.6 血清 VE-cadherin 与 miR-125b-5p 的相关性 Pearson 相关分析表明, 血清中 VE-cadherin 与 miR-125b-5p 水平呈正相关, r 值为 0.743, P 值为 0.001。

3 讨论

AKI 在临床多发,且病死率较高,全球每年约有 1 300 万名 AKI 患者^[1]。重症监护病房(intensive care unit, ICU)患者 AKI 发生率为 30.4%~60.0%^[2-3]。AKI 的常见病因主要有感染、休克、药物、手术、应激等,其中脓毒症患者的 AKI 发病率高达 40%~70%^[4]。近年来研究表明,脓毒症可导致血管内皮损伤,从而造成 AKI 的发生^[5]。

VE-cadherin 是一种内皮细胞紧密连接蛋白,在维持内皮细胞屏障功能中具有决定性作用^[6]。脓毒症造成的炎症级联反应可损伤 VE-cadherin 在内皮细胞膜上的紧密连接,破坏内皮细胞的间隙,从而导致细胞通透性增大,毛细血管渗漏,造成微循环障碍^[7-8]。本课题组前期动物实验研究表明,脓毒症实验动物肾组织中 VE-cadherin 蛋白表达减少,促进 SAKI 的发生发展。

miRNA 是一种内源性非编码单链 RNA,参与转录后基因表达调控。目前关于 miRNA 在 SAKI 中的研究甚少,国外有文献报道,miR-34a 和 miR-21 可参与 SAKI 的调控^[9-10]。近年来关于 miRNA 参与 SAKI 发生发展的文献较少。利用 Targetscan 软件预测 VE-cadherin 可能作为 miR-125-5p 的靶基因。

本研究结果显示:①与对照组比较,SAKI 患者血清 miRNA-125b-5p 呈高表达,且差异有统计学意义;通过实时荧光定量 PCR 验证了这一结果,因此 miR-125b-5p 表达的升高可能参与了脓毒症的发生发展。②KEGG 富集分析结果显示,靶基因显著富集于乳头瘤病毒感染、PI3K-Akt 信号通路、肌动蛋白骨架调节、MAPK 等主要信号通路。有研究表明,PI3K-Akt 信号通路与 miR-125b-5p 可能存在一定的调控关系,同时 SAKI 患者血清中 VE-cadherin 水平高于对照组,可能因脓毒症导致血管内皮受损,血管内皮中 VE-cadherin 释放进入血液循环,造成 VE-cadherin 在血清中水平升高,而血管内皮中的 VE-cadherin 水平下降^[11]。相关性分析显示,miR-125b-5p 表达与血清中 VE-cadherin 水平呈正相关,表明 miR-125b-5p 可能参与了血管内皮中 VE-cadherin 表达调控。TargetScan 软件分析结果显示,VE-cadherin 作为 miR-125-5p 的靶向基因,miR-125-5p 有可能下调血管内皮中 VE-cadherin 的表达。

综上所述,miR-125b-5p 在脓症患者体内表

达水平升高,可能抑制血管内皮细胞中 VE-cadherin 生成,导致其被降解为可溶性 VE-cadherin 释放入血。因此 miR-125b-5p、VE-cadherin 共同参与 SAKI 的发生发展,两者间的信号调节通路仍有待于进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- MEHTA R L, CERDA J, BURDMANN E A, et al. International Society of Nephrology's Oby25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9987): 2616-2643. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60126-X.
- MATSA R, ASHLEY E, SHARMA V, et al. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the diagnosis of new onset acute kidney injury in critically ill patients [J]. *Crit Care*, 2014, 18 (4): R137. DOI: 10.1186/cc13958.
- BOUCHARD J, ACHARYA A, CERDA J, et al. A prospective international multicenter study of AKI in the intensive care unit [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015, 10 (8): 1324-1331. DOI: 10.2215/CJN.04360514.
- PEERAPORNATANA S, MANRIQUE-CABALLERO C L, GOMEZ H, et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment [J]. *Kidney Int*, 2019, 96 (5): 1083-1099. DOI: 10.1016/j.kint.2019.05.026.
- LI Y M, ZHU Y, ZHANG J, et al. Sepsis and acute kidney injury [J]. *Natl Med J China*, 2021, 101 (17): 1210-1213. DOI: 10.3760/ema.j.cn112137-20201201-03232.
- YANG S K, XIAO L, ZHANG H, et al. Significance of serum procalcitonin as biomarker for detection of bacterial peritonitis: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14: 452. DOI: 10.1186/1471-2334-14-452.
- WACKER C, PRKNO A, BRUNKHORST F M, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13 (5): 426-435. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70323-7.
- LIU Y, HOU J H, LI Q, et al. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Springerplus*, 2016, 5 (1): 2091. DOI: 10.1186/s40064-016-3591-5.
- 姜启栋, 伍长学, 张琼. miR-34a 调控 Kruppel 样因子 4 参与脂多糖介导的脓毒症相关性肾损伤 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30 (4): 351-354. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2018.04.013.
- FU D, DONG J, LI P, et al. miRNA-21 has effects to protect kidney injury induced by sepsis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 1138-1144. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.098.
- YU W K, McNEIL J B, WICKERSHAM N E, et al. Vascular endothelial cadherin shedding is more severe in sepsis patients with severe acute kidney injury [J]. *Crit Care*, 2019, 23 (1): 18. DOI: 10.1186/s13054-019-2315-y.

(收稿日期: 2022-05-20)

(本文编辑: 邵文)