

血液透析治疗对血中 microRNA-92a 的影响

王蕊 尚粉青 叶玉兰 惠玲玲 郭瑄 王慧

710075 西安,西安高新医院心内科(王蕊,叶玉兰,惠玲玲);710002 西安,西安市第一医院心血管内科(尚粉青,郭瑄,王慧)

【摘要】 **目的** 探讨血液透析治疗对血清中 microRNA-92a 的去除效果及其损伤内皮细胞功能的机制。**方法** 收集西安高新医院长期透析治疗的慢性肾病患者,分别收集透析前、透析后 6 h 左右血清,测定其中 miR-92a 含量变化,同时测定 BUN、Scr 及 hsCRP 水平变化。培养的内皮细胞给予慢性肾脏病患者透析前后血清刺激,观察 miR-92a 及其靶基因 eNOS 表达变化。**结果** 透析前后血清中 miR-92a 含量(1.48 ± 0.24 vs 1.20 ± 0.18 , $P = 0.356$)及 hsCRP(7.6 ± 2.4 vs 7.5 ± 3.1 , $P = 0.862$)水平无显著差异。而透析治疗可显著降低血清中 BUN(26.4 ± 8.8 vs 8.3 ± 2.3 , $P < 0.01$)、Scr(926.3 ± 178.1 vs 312.3 ± 141.2 , $P < 0.01$)水平。进一步体外细胞实验 RT-PCR 检测证实与健康人血清相比,慢性肾脏病患者透析前后血清均可促使培养的脐静脉内皮细胞 miR-92a 表达增加($P < 0.01$),RT-PCR 及 Western Blot 检测证实其靶基因 eNOS 表达均显著降低($P < 0.01$),内皮细胞功能受损。**结论** 血液透析治疗前后血清中 miR-92a 下降不明显,miR-92a 可致内皮细胞 eNOS 表达减少,这可能是透析治疗虽然能维持肾脏功能但是无法避免其心血管并发症发生的部分原因。

【关键词】 血液透析;microRNA-92a;内皮细胞;高敏 C 反应蛋白;内皮型一氧化氮合酶

DOI:10.3969/j.issn.1671-2390.2019.04.002

The effect of hemodialysis therapy on serum microRNA-92a WANG Rui, SHANG Fen-qing, YE Yu-lan, HUI Ling-ling, GUO Xuan, WANG Hui. Department of Cardiology, Xi'an Gaoxin Hospital, Xi'an 710075, China

Corresponding author: SHANG Fen-qing, E-mail: shangfenqing@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of hemodialysis therapy on removal of serum microRNA-92a and its mechanism on injury of vascular endothelial cells. **Methods** The serum samples of patients with chronic kidney diseases in XI'AN GaoXin Hospital treated with long-term hemodialysis were collected before and 6h after dialysis, and serum miR-92a level, BUN, Scr and hsCRP were measured. The cultured endothelial cells were stimulated with the serum samples from patients with chronic kidney diseases before and after dialysis, so as to observe the expression changes of miR-92a and its target gene eNOS. **Results** There was no significant difference in serum miR-92a level (1.48 ± 0.24 vs 1.20 ± 0.18 , $P = 0.356$) and hsCRP (7.6 ± 2.4 vs 7.5 ± 3.1 , $P = 0.862$) before and after hemodialysis. Serum BUN (26.4 ± 8.8 vs 8.3 ± 2.3 , $P < 0.01$) and Scr (926.3 ± 178.1 vs 312.3 ± 141.2 , $P < 0.01$) levels were decreased significantly by hemodialysis therapy. The further in vitro cell assay, RT-PCR, confirmed that compared with

the normal healthy human serum, the serum from chronic kidney disease patients before and after dialysis could promote expression of miR-92a in the cultured HUVEC ($P < 0.001$). RT-PCR and Western Blot test demonstrated that the expression of its target gene eNOS was significantly reduced ($P < 0.001$). **Conclusions** Serum miR-92a level does not obviously decrease after hemodialysis. miR-92a can reduce the expression of eNOS in endothelial cells, which may be part of the reason why dialysis can maintain renal function but cannot prevent against cardiovascular complications.

【Key words】 Hemodialysis; MicroRNA-92a; Endothelial cells; Hypersensitive C-reactive protein (hsCRP); Endothelial nitric oxide synthetase

慢性肾脏疾病(CKD)是心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的独立危险因素,尤以终末期肾病患者 CVD 的发病率更高。血液透析(HD)治疗并未降低 CKD 患者 CVD 的发病率,长期透析不充分、微炎症状态、高磷、心力衰竭等是导致心血管病变的重要原因^[1]。微 RNA(miRNA)是一类非编码 RNA,可调控多种基因的表达,在肾脏发育、平衡和疾病中扮演重要角色。本课题组前期研究证实 miR-92a 可被分泌至血清,在 CKD 患者血清中高表达,与 CKD 患者 CVD 高发病密切相关^[2]。血液透析对 miRNA 的影响目前尚未有相关研究。本研究通过测定透析前后血清中 miR-92a 的含量变化,来明确透析治疗是否可有效清除 miR-92a,同时探讨 miR-92a 与 CKD 患者 CVD 高发病的分子机制。

材料与方 法

一、研究对象

收集西安高新医院病情稳定的终末期肾病维持性透析患者 32 例(年龄 38~76 岁),纳入标准:根据《临床诊疗指南-肾脏病学分册》确诊为终末期肾病,常规行血液透析治疗者。排除标准:急性感染、急性心衰、恶性肿瘤、肝病、营养不良及影响进食的其他疾病者。患者于透析开始前和结束后 6 h 分别采集血样,分离血清-80 °C 保存备用。

二、实验试剂

IS 购自 sigma 公司, β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司, eNOS 抗体、phospho-eNOS(S1177)抗体购自美国 Cell Signaling 公司,蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂购自德国 Roche 公司, ECL 发光液购自美国 Millipore 公司, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, HiScript TM qPCR SuperMix 逆转录试剂盒及 PCR DNA 聚合酶购自 Vazyme 公司,其余试剂为国产分析纯。

三、方法

1. 血液透析 采用标准碳酸氢盐透析液,费森尤斯 4008S 容量超滤透析机,透析液流量 500 mL/min,血流量 220 mL/min。使用费森尤斯 F6 聚砜膜透析器,透析器面积 1.3 m²,超滤系数 13 mL · h⁻¹ · mmHg⁻¹,每次透析时间 4 h,每周 3 次。

2. 血清一般项目测定 血肌酐(Scr)、尿素(BUN)、高敏 C 反应蛋白(hsCRP)由本院生化科使用自动生化分析仪完成。

3. 脐静脉内皮细胞的培养 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)标本取自西安市第一医院妇产科健康孕妇足月剖宫产娩出的脐带组织(排除妊娠高血压、糖尿病、慢性传染病、肝肾功能不全、急性炎症反应、风湿免疫疾病等)。于无菌条件下获得新生儿脐带(长约 15~20 cm,无破损,无钳夹痕迹),置于冰的脐带保鲜液中,12 h 内进行 HUVECs 分离;0.1%的胶原酶灌注消化法分离 HUVECs 细胞;0.125%胰蛋白酶消化传代培养,取生长良好的第 3~6 代细胞用于实验。

4. 血清中 miR-92a 的测定方法 (1)总 RNA 提取:在 1.5 mL 的离心管中,分别加入 200 μ L 的血清样品,800 μ L 的 TRIzol,同时加入外参 cel-mir-39-3p(每 200 μ L 的血清加入 250 fmol Cel-39 2 μ L);混匀,室温孵育 5 min。加入 200 μ L 的氯仿,手动剧烈震动充分混匀,室温下孵育 10 min;4 °C, 12 000 r · min⁻¹,离心 15 min,吸取上清至另一无 RNA 酶的 EP 管中,加同体积的异丙醇,混匀,-20 °C 过夜。4 °C, 12 000 r · min⁻¹,离心 10 min,可见管底有少量白色的沉淀物即为 RNA,弃去上清液;加入 1 mL 75%的乙醇重悬沉淀,4 °C, 7 500 r · min⁻¹,离心 10 min,再弃去上清液,室温下干燥 5~8 min。加入 10 μ L 的 DEPC 处理水溶解 RNA,-80 °C 保存。(2)cDNA 的合成:反转录体系包括 10 \times RT Buffer 0.5 μ L; Rnase-Inhibitor 0.063 μ L;

100 nmol · L⁻¹; dNTP with dTTP 0.05 μL; Multi-scribe Reverse Transcriptase 0.33 μL; Cel-mir-39 RT primer 1 μL; His-miR-92a RT primer 1 μL; RNA 1.06 μL; DEPT water 1 μL; Total 5 μL。PCR 扩增仪上反应程序为 16 °C 30 min, 42 °C 40 min, 85 °C 5 min。扩增产物加入 30~50 μL DEPC 处理水稀释, -20 °C 冰箱保存。(3) RT-PCR 反应: MIX 7.5 μL, PCR primer 0.75 μL, cDNA 6.75 μL。反应条件为 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 30 s, 60 °C 60 s, 40 个循环, 记录循环阈值(CT)。每份标本设 2 个复管检测, 内参 Cel-39 以相同条件扩增; 2^{-ΔΔCT} 表示样品中目的基因初始 cDNA 相对表达量。

5. Real time-PCR 和 Western Blot 分析 在培养的内皮细胞中, 加入无血清的培养基 800 μL, 分为三组, 透析前和透析后组分别同时加入透析前与透析后慢性肾病患者血清 200 μL, 对照组加入健康人血清, 体积分数 20%, 作用于内皮细胞 24 h, 提取内皮细胞总 RNA, 测定其浓度。取 2 μg RNA 进行反转录。逆转录得到的 cDNA 进行实时定量 PCR 反应, 反应体系参照 TaqMan universal PCR Master Mix 说明书。六孔板每孔细胞加入蛋白裂解液约 120 mL, 冰上裂解 20 min, 刮取蛋白质; 液氮冻融 3 次, 4 °C, 12 000 r · min⁻¹, 离心 15 min, 取上清, ABC 法测定蛋白浓度。加入上样缓冲液, 95 °C, 8 min 蛋白变性。10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(上层胶 30 mA, 30 min; 下层胶 50 mA, 90 min), 转膜(230 mA, 2 h), 5% 的脱脂牛奶(TTBS 配制)封闭 1 h, 孵一抗(eNOS、p-eNOS: 1:1 000; β-actin: 1:5 000) 4 °C 过夜, TTBS 洗 3 遍, 每遍 5 min; 孵二抗, 室温 1 h; ECL 发光, 自动洗片机洗片。标定 Marker, 进行扫描和分析。PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物列表

目的基因	引物序列
eNOS	Forward: 5'-TGGCTTTCCTTCCAGTTC-3' Reverse: 5'-AGAGGCGTTTTGCTCCTTC-3'
GAPDH	Forward: 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTTCGTAT-3' Reverse: 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'
miR-92a	RT: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAGGCCG-3' Forward: 5'-ACACTCCAGCTGGGATATTGCACTGTCCC-3' Reverse: 5'-CTGGTGTCTGGAGTCGG-3'
U6	Forward: 5'-ACACTCCAGCTGGGAUCACCGGGUGUAAA-3' Reverse: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

四、统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料用百分构成比表示; 用 SPSS 11.5 统计软件进行数据统计。正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验, 方差齐性检验采用 Levene 检验; 计量资料多组均数间比较采用方差分析, 两两均数间比较采用 LSD-t 检验, 计数资料组间比较用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、透析前后血液中 miR-92a 水平变化

透析治疗后血清中 miR-92a 的水平, 与透析前水平比较有轻度下降, 但未见显著性差异 ($P = 0.356$)。(图 1)

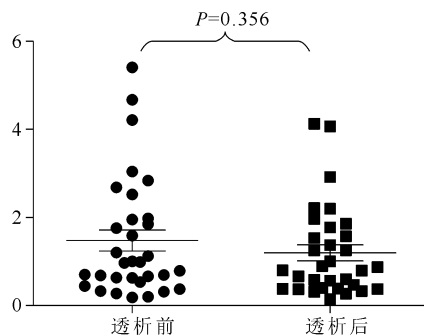


图 1 透析前后血清中 miR-92a 水平变化

二、透析前后血清中 BUN、Scr、hsCRP 的变化

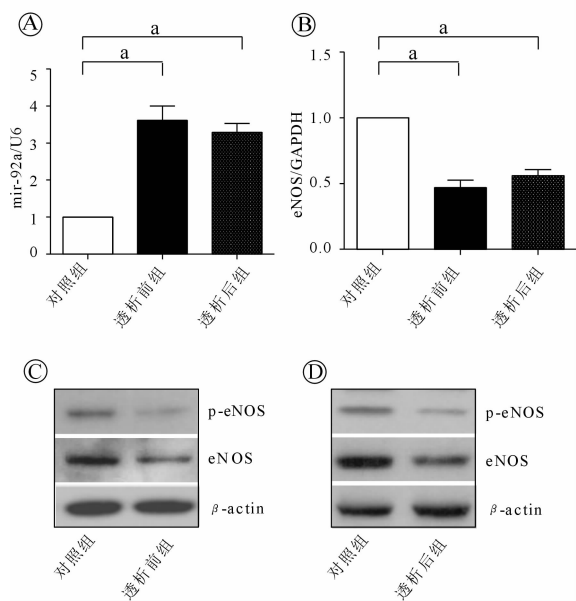
透析后 BUN、Scr 水平明显下降 ($P < 0.01$), 下降率分别达 68.46%、66.28%; hsCRP 水平无明显变化 ($P > 0.05$)。(表 2)

表 2 透析前后血清中各因子浓度变化

	透析前	透析后	下降率(%)	P 值
BUN(mmol/L)	26.4 ± 8.8	8.3 ± 2.3	68.46	< 0.01
Scr(μmol/L)	926.3 ± 178.1	312.3 ± 141.2	66.28	< 0.01
hsCRP(mg/L)	7.6 ± 2.4	7.5 ± 3.1	1.96	0.862

三、慢性肾病患者血清对内皮细胞 miR-92a 表达及血管内皮功能的影响

与对照组相比, 透析前组与透析后组慢性肾病患者血清均显著增加内皮细胞 miR-92a 的表达 ($P < 0.01$, 图 2A), 同时内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS)及其磷酸化水平均显著降低 ($P < 0.01$, 图 2B、C、D)。透析前后两组血清之间对 miR-92a ($P > 0.05$) 及 eNOS ($P > 0.05$) 的影响无显著性差异。



注:组间比较,* $P < 0.01$

图2 慢性肾病患者血清对内皮细胞 miR-92a 及 eNOS 表达的影响

讨 论

早在上世纪 90 年代,已经有人提出将 CKD 作为 CVD 的独立危险因素。既往研究认为 CKD 患者存在与 CKD 相关的非传统危险因素:如贫血、蛋白尿、钙磷代谢紊乱、继发性甲状旁腺功能亢进、高同型半胱氨酸血症、微炎症状态、氧化应激、内皮损伤、营养不良等。但是这些并不能完全解释其高 CVD 风险的原因。特别是对于终末期肾病患者,透析治疗是其唯一的有效治疗措施,然而透析治疗并不能有效降低 CKD 患者的心血管发病风险。

近期有实验证实,尿毒症毒素可通过多种机制损伤血管内皮,促进动脉血管硬化及动脉粥样硬化斑块形成^[3-5],而这些尿毒症毒素大多透析清除率很低。目前虽有针对这些毒素的部分药物,但是疗效有限且种类繁多。本课题组前期研究证实,硫酸吡哆酚、吡哆 3 乙酸、马尿酸等尿毒素可以增加内皮细胞 miR-92a 的表达,miR-92a 作用于其靶基因 KLF-2、KLF-4、SIRT1,激活炎症小体,从而促进内皮细胞炎症反应及内皮损伤^[2]。而 miR-92a 作为其中心环节起重要作用,那么透析治疗是否可有效祛除 miR-92a,值得进一步深入研究。

文献报道,miR-92a 在内皮细胞特异性高表达。在 CVD 方面,在急性心肌梗死的动物模型及临床患者血清中均检测到 miR-92a 明显升高^[6-7],冠心病

患者他汀类药物及 PCI 治疗均可使 miR-92a 表达下降^[7-8]。miR-92a 的靶基因有 eNOS、血栓调节蛋白(TM)、血管性血友病因子(vWF)、胎肝激酶-1(FLK-1)等,均为内皮细胞功能调节的重要因子。本实验室前期对 miR-92a 进行了大量研究工作,发现 miR-92a 过表达可以减少 KLF2 的表达^[8]。miR-92a 通过靶向调节其靶基因 KLF2、KLF4J 及 SIRT1,促进内皮细胞炎症反应及动脉粥样硬化的发生^[9]。本课题组的前期研究还证实 CKD 患者血清中 miR-92a 较正常人明显升高。而用 CKD 患者的血清刺激内皮细胞可见内皮细胞 miR-92a 表达明显增加,miR-92a 可以从内皮细胞被分泌至血清中,从而检测到血清中内皮源性的 miR-92a 表达明显增加^[2]。为进一步明确 miR-92a 对内皮细胞功能的影响程度及透析治疗是否可以有效去除 miR-92a,本实验中我们收集 CKD 透析前后患者的血清测定其中 miR-92a 的含量变化,发现透析后血清中 miR-92a 仅仅轻度下降,未达到统计学差异,说明透析治疗并不能有效去除血清中的 miR-92a。我们进一步用透析前后患者血清分别作用于体外培养的内皮细胞,发现透析前后的血清均可诱发内皮细胞 miR-92a 表达增加,同时其靶基因 eNOS 表达减少,内皮功能受损。此结果为我们敲响警钟,提示透析治疗的同时应进一步注意保护内皮细胞功能,减少心血管疾病并发症。

通过本研究,我们进一步明确 miR-92a 在 CKD 患者中的表达差异,明确升高的血清 miR-92a 可降低 eNOS,造成内皮功能障碍。透析治疗不能有效清除血清中 miR-92a。那么阻断 miR-92a 的作用是否可以进一步阻断 CKD 等疾病造成的心血管损害,从而提高患者的生活质量,延长患者的生命,值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 钱慕周,陈澄,贾蔚. 辅酶 Q10 联合贝那普利对血液透析患者心室重构的干预作用[J]. 山东医药,2017,57(1):46-48.
- [2] Shang F, Wang SC, Hsu CY, et al. MicroRNA-92a mediates endothelial dysfunction in CKD[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(11):3251-3261.
- [3] Lin CJ, Liu HL, Pan CF, et al. Indoxyl sulfate predicts cardiovascular disease and renal function deterioration in advanced chronic kidney disease[J]. Arch Med Res, 2012,43(6):451-456.
- [4] Wu CC, Hsieh MY, Hung SC, et al. Serum indoxyl sulfate associates with postangioplasty thrombosis of dialysis grafts[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(4):1254-1264.

[9] 周康康,张均玉,周红卫. 终末期肾病患者死亡原因及危险因素分析[J]. 临床肾脏病杂志, 2018, 18(4): 224-228.

[10] 李静,王利华,程丽娟,等. 2010-2012 年山西省血液透析死亡患者流行病学调查[J]. 中华肾脏病杂志, 2014, 30(2): 123-127.

[11] 马云华,潘玲,廖蕴华. 腹膜透析患者血清铁蛋白水平与微炎症及透析效果相关性分析[J]. 中华肾病研究电子杂志, 2016, 5(2): 65-69.

[12] Pourmoghaddas A, Sanei H, Garakyaraghi M, et al. The relation between body iron store and ferritin, and coronary artery disease[J]. ARYA Atheroscler, 2014, 10(1): 32-36.

[13] Klip IT, Voors AA, Swinkels DW, et al. Serum ferritin and risk for new-onset heart failure and cardiovascular events in the community[J]. Eur J Heart Fail, 2017, 19(3): 348-356.

[14] Kuragano T, Matsumura O, Matsuda A, et al. Association between hemoglobin variability, serum ferritin levels, and adverse events/mortality in maintenance hemodialysis patients [J]. Kidney Int, 2014, 86(4): 845-854.

[15] Grammer TB, Kleber ME, Silbernagel G, et al. Hemoglobin, iron metabolism and angiographic coronary artery disease (The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study) [J]. Atherosclerosis, 2014, 236(2): 292-300.

[16] Ishida JH, Johansen KL. Iron and infection in hemodialysis patients[J]. Semin Dial, 2014, 27(1): 26-36.

[17] Kao JK, Wang SC, Ho LW, et al. Chronic iron overload results in impaired bacterial killing of thp-1 derived macrophage through the inhibition of lysosomal acidification [J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0156713.

[18] Kato S, Lindholm B, Yuzawa Y, et al. High ferritin level and malnutrition predict high risk of infection-related hospitalization in incident dialysis patients: a Japanese prospective cohort study[J]. Blood Purif, 2016, 42(1): 56-63.

[19] 车伟伟,赵德龙. 维持性血液透析患者血清铁蛋白与血红蛋白及其达标率关系探讨[J]. 中国血液净化, 2017, 16(10): 672-675.

[20] Pourmoghaddas A, Sanei H, Garakyaraghi M, et al. The relation between body iron store and ferritin and coronary artery disease[J]. ARYA Atheroscler, 2014, 10(1): 32-36.

[21] 林丽容,黄明生,林石生. 慢性肾病患者血肌酐含量检测及其与心功能损害的关系[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(1): 61-62.

[22] Supiano KP, Luptak M. Complicated grief in older adults: a randomized controlled trial of complicated grief group therapy [J]. Gerontologist, 2014, 54(5): 840-856.

[23] 俞雨生. 腹膜透析患者纠正钙磷代谢紊乱应注意的问题[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2013, 22(6): 545-546.

(收稿日期:2018-11-26)

~~~~~  
(上接第 239 页)

[5] Tumur Z, Niwa T. Indoxyl sulfate inhibits NO production and cell viability by inducing oxidative stress in vascular endothelial cells[J]. Am J Nephrol, 2009, 29(6): 551-557.

[6] 王虹,林英忠,陆红梅,等. ST 段抬高型心肌梗死患者循环微 RNA-92a 表达的研究. 中国危重病急救杂志, 2011, 23(12): 718-722.

[7] 方石虎,李志梁,李峰进,等. 冠心病患者 PCI 治疗前后外周血 miR-92a 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2013, 53(3): 40-42.

[8] 王虹,陆红梅,阳文辉,等. 他汀类药物对冠心病患者循环微小 RNA-92a 表达的影响[J]. 中国危重病急救杂志, 2012, 24(4): 215-218.

[9] Wu W, Xiao H, Laguna-Fernandez A, et al. Flow-dependent regulation of kruppel-like factor 2 is mediated by microRNA-92a[J]. Circulation, 2011, 124(5): 633-641.

[10] Zhen C, Liang W, Marcy M, et al. Oxidative stress activates endothelial innate immunity via sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) transactivation of microRNA-92a[J]. Circulation, 2015, 131(9): 805-814.

(收稿日期:2018-12-20)