

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.04.14

· 临床研究 ·

糖尿病肾病患者血清人巨细胞病毒 miR-US4-3p 水平变化及价值*

王萍萍¹, 王成¹, 王静¹, 张明超², 张春妮¹, 张辰宇³, 汪俊军¹ (1. 南方医科大学第一临床医学院 & 东部战区总医院临床检验科, 南京 210002; 2. 东部战区总医院国家肾脏疾病临床医学研究中心全军肾脏病研究所, 南京 210002; 3. 南京大学生命科学学院, 南京 210046)

摘要:目的 探讨糖尿病肾病(DN)患者血清中人巨细胞病毒(HCMV)编码的 miR-US4-3p 的表达水平变化和临床价值。方法 选取 2019 年 4 月至 2020 年 1 月于东部战区总医院确诊的 DN 患者(DN 组)、单纯糖尿病患者(DM 组)及同期体检健康者(对照组)各 64 例,收集 DN 组、DM 组及对照组血清标本,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术检测血清中 miR-US4-3p 表达水平。采用 ROC 曲线、Spearman 相关性分析、Logistic 回归分析血清 miR-US4-3p 对 DN 的预测评估价值。结果 miR-US4-3p 在 DN 组血清中的表达高于对照组和 DM 组($P<0.001$)。相关分析显示,miR-US4-3p 与半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(Cys C)、甲状旁腺激素(PTH)呈正相关,与肾小球滤过率(eGFR)呈负相关。miR-US4-3p 诊断 DN 的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.792 (95%CI:0.715~0.869),敏感性为 71.9%,特异性为 73.4%;鉴别 DM 和 DN 的 AUC 为 0.748 (95%CI:0.664~0.832),敏感性为 71.9%,特异性为 64.1%。多因素 Logistic 回归分析显示,在校正年龄、性别及其他血脂水平影响后,血清 miR-US4-3p 水平的升高与 DN($OR=7.236, 95\%CI:2.633\sim19.889, P<0.001$)的发生密切相关,且 miR-US4-3p 对 DN 和 DM 的鉴别仍有统计学意义($OR=6.466, 95\%CI:2.778\sim15.052, P<0.001$)。结论 DN 患者血清 miR-US4-3p 水平上调,可作为 DN 的潜在辅助诊断生物标志物。

关键词:人巨细胞病毒;血清 miRNA;miR-US4-3p;糖尿病肾病;生物标志物

中图分类号:R446

文献标志码:A

Changes and value of serum miR-US4-3p levels of human cytomegalovirus in patients with diabetic nephropathy

WANG Pingping¹, WANG Cheng¹, WANG Jing¹, ZHANG Mingchao², ZHANG Chunni¹, ZHANG Chenyu³, WANG Junjun¹ (1. The First School of Clinical Medicine, Southern Medical University/Department of Clinical Laboratory, Eastern Theater General Hospital of PLA, Nanjing 210002, Jiangsu; 2. National Clinical Research Center of Kidney Diseases, Eastern Theater General Hospital of PLA, Nanjing 210002, Jiangsu; 3. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210046, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To investigate the expression level of serum human-cytomegalovirus (HCMV)-encoded miR-US4-3p in the patients with diabetic nephropathy (DN), and explore the clinical significances of miR-US4-3p in the occurrence and development of DN.

Methods The serum samples were collected from 64 diabetic nephropathy patients (DN group) and 64 diabetic mellitus patients (DM group), and 64 age and gender-matched healthy subjects were used as normal controls (NC group) in Eastern Theater General Hospital of PLA from April 2019 to January 2020 respectively. The expression of HCMV miR-US4-3p was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The receiver operating characteristic (ROC) curves, correlation analysis and logistic regression analysis were conducted to evaluate the diagnostic value of serum HCMV miR-US4-3p in the patients with diabetic nephropathy. **Results** The expression of HCMV miR-US4-3p in the serum of DN group was significantly higher than that of NC group and DM groups ($P<0.001$). Correlation analysis showed that miR-US4-3p was positively correlated with cystatin C (Cys C) and parathyroid hormone (PTH), but negatively correlated with estimated glomerular filtration rate (eGFR). The ROC analysis indicated that the area under the curve (AUC) was 0.792 (95%CI: 0.715 to 0.869) for the diagnosis of DN with sensitivity of 71.9% and specificity of 73.4%. The AUC for distinguishing DM and DN was 0.748 (95%CI: 0.664 to 0.832), with sensitivity of 71.9% and specificity of 64.1%. Logistic regression analysis revealed that the increased serum miR-US4-3p level was closely related to the occurrence of DN after adjusting age, gender and serum lipid levels ($OR=7.236, 95\%CI=2.633\sim19.889, P<0.001$) and could discriminate DN and DM ($OR=6.466, 95\%CI=2.778\sim15.052, P<0.001$). **Conclusion** Serum HCMV miR-US4-3p should be significantly expressed in DN patients, suggesting that miR-US4-3p may have the potential to serve as a useful diagnostic biomarker for DN.

* 基金项目:国家自然科学基金(81871702,81772282);江苏省青年医学人才项目(QNRC2016893)。

作者简介:王萍萍,1995 年生,女,硕士研究生,主要从事临床检验诊断学研究。

通信作者:汪俊军,主任技师,教授,博士研究生导师,E-mail:wangjj9202@163.com。

Key words: human cytomegalovirus; serum miRNA; miR-US4-3p; diabetic nephropathy; biomarker

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetic mellitus, DM)晚期主要微血管并发症,也是终末期肾病的主要病因^[1],但其发病机制尚不明确。人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是一种具有囊膜包被的线性双链 DNA 病毒,其基因组大小为 220~240 kb,可在新生儿和免疫功能低下的个体中引起较高的发病率和死亡率,是目前发现的唯一可产生 miRNA 的 β 疱疹病毒, HCMV 能够编码 26 个成熟 miRNA^[2]。越来越多的证据显示, HCMV 编码的 miRNA 可调节各种生物过程,包括病毒复制、潜伏感染、免疫逃逸和宿主细胞周期^[3-5]。有报道显示,原发性高血压患者血浆中 hcmv-miR-UL112 表达较健康对照者明显上调,提示 HCMV 编码 miRNA 可能是介导 HCMV 感染导致血管损伤和血压升高的关键因子^[6]。在 2 型糖尿病(T2DM)、胶质母细胞瘤及口腔扁平苔藓患者外周血中也观察到 HCMV miRNA 的高表达^[7-8],提示循环中 HCMV 编码 miRNA 是一类潜在的新型疾病生物标志物。研究证实, HCMV miR-US4-3p 靶向内质网氨肽酶 ERAP1, ERAP1 功能的变化或丧失会改变组织相容性复合体(MHC) I 分子呈递的抗原组成从而影响 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞的激活,导致免疫应答缺陷和疾病的发生^[9-10]。DN 的发生发展与炎症和免疫反应有关^[11],我们推测 miR-US4-3p 与 DN 之间可能存在关联,目前关于 miR-US4-3p 在 DN 患者中的表达变化及其临床价值研究未见报道。因此,本研究通过 qRT-PCR 方法检测 DN 患者、单纯 DM 患者和健康对照者中血清 miR-US4-3p 的表达,以探讨其在 DN 中的潜在临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2019 年 4 月至 2020 年 1 月于中国人民解放军东部战区总医院(原南京军区总医院)确诊的 T2DM 患者 128 例,所有患者均符合 T2DM 诊断标准^[12]。其中 T2DM 患者(DM 组)64 例, DN 患者(DN 组)64 例。DM 组男性 48 例,女性 16 例,年龄(55.92 ± 17.46)岁, DM 病程[3(0.08, 7)]年; DN 组男性 42 例,女性 22 例,年龄(55.78 ± 11.88)岁, DM 病程[10(5, 16)]年。DN 诊断标准患者符合下列任何一项者:①大量清蛋白尿;②糖尿病视网膜膜病变伴微量蛋白尿;③肾脏穿刺活检符

合 DN 病理表现,即诊断为 DN^[13]。选取同期健康体检者 64 例作为对照组,男性 42 例,女性 22 例,平均年龄(53.20 ± 10.74)岁。排除标准为:其他急慢性肾病、继发性糖尿病、心脏与肝脏等全身疾病引发的肾脏疾病、创伤、急性感染、恶性肿瘤和自身免疫病者。各组性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究获中国人民解放军东部战区总医院伦理委员会批准许可(批准文号:2018NZGKJ-096),研究对象均签署了知情同意书。

1.2 主要仪器与试剂 D10 糖化血红蛋白检测仪(美国 Bio-Rad 公司);7600 型全自动生化分析仪(日本 Hitachi 公司);Cobas e601 型全自动电化学发光免疫分析仪(瑞士 Roche 公司);5418 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);SAS67120 型超纯水仪(美国 Millipore 公司);2720 型 PCR 仪(美国 ABI 公司);LightCycler[®] 96 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

RNA 提取试剂即酸性水饱和酚(北京索莱宝公司);分析纯级氯仿、异丙醇、无水乙醇(上海国药集团试剂公司);人工合成的 peu-MIR2911 成熟体(上海 Invitrogen 公司);miRNA 逆转录引物及 Taq-Man 探针(美国 ABI 公司)(peu-miR2911 货号:242025_mat; hcmv-miR-US4-3p 货号:469699_mat);逆转录体系和 qRT-PCR 体系所用试剂(大连 TaKaRa 公司);总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)试剂及校准品购自英国 Randox 公司;低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂及校准品购自日本第一化学株式会社;糖化血红蛋白(Hemoglobin A1c, HbA1c)检测试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司;半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(Cystatin C, Cys C)检测试剂盒购自宁波普瑞柏生物技术公司;空腹血糖(FPG)检测试剂盒购自富士胶片和光纯耀(上海)化学公司;肌酐(creatinine, Cr)检测试剂盒购自四川 maccura 生物公司;甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)试剂及校准品购自瑞士 Roche 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集与处理 采集研究对象清晨空腹状态下静脉血 3~5 mL,离心后获取上层血清液,于 -80 ℃ 保存,用于 miRNA 和生化指标的检测。

1.3.2 血清 HCMV miRNA 表达的检测 基于 Taq-Man 探针的 qRT-PCR 方法检测血清 miR-US4-3p (5'-UGACAGCCCCGUACACCUCU-3') 的水平。首先,取单个血清样本 100 μ L,总 RNA 提取采用酸性苯酚-氯仿一步法进行抽提^[14],每个血清样品在提取过程中均加入 20 μ L 人工合成的浓度为 10⁷ fmol/L 的植物 MIR2911 (5'-GGCCGGGGACGGGC UGGA-3') 成熟体作为外源性参照,用于校正 RNA 提取效率和误差,提取后的总 RNA 溶于 22 μ L DEPC 水。

血清 RNA 逆转录 PCR 反应体系为 10 μ L: DEPC 水 3.5 μ L、5 $\times$ AMV 缓冲液 2 μ L、dNTPs 1 μ L、逆转录引物 1 μ L、AMV 逆转录酶 0.5 μ L、RNA 样品 2.0 μ L。反应条件参数为:16 $^{\circ}$ C 30 min;42 $^{\circ}$ C 30 min;85 $^{\circ}$ C 5 min,每个反应均为 1 个循环。逆转录所得 cDNA 冻存于-20 $^{\circ}$ C。

qRT-PCR 反应体系为 20 μ L:ddH₂O 14.77 μ L、10 $\times$ PCR 缓冲液 2 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μ L、dNTPs 0.4 μ L、Taq 聚合酶 0.3 μ L、miRNA 检测探针 0.33 μ L、cDNA 1 μ L。反应条件参数为:95 $^{\circ}$ C 5 min,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,共 40 个循环。

实验结果采用 2^{- Δ Ct} 方式计算 miR-US4-3p 的相对表达量, Δ Ct = Ct_{目的miRNA} - Ct_{MIR2911}。每个 Ct 值为相应样品重复测定 3 次后所得均值,同时以不含 RNA 的模板的 ddH₂O 水作为阴性对照。

1.4 统计学分析 采用 SPSS20.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料采用单样本 Kolmogorov-

Smirnov 检验数据分布的正态性。正态分布资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,两组间比较采用两独立样本的 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性时组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,方差非齐性时采用 Tamhane's *T2* 检验。非正态分布资料采用中位数(第 25 百分位数,第 75 百分位数) [*M* (*P*₂₅,*P*₇₅)] 表示,两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验,多组间比较采用 Kruskal-wallis *H* 秩和检验。计数资料采用百分比表示,两组间比较采用 χ^2 检验。变量间相关性分析采用 Spearman 相关分析。采用 ROC 曲线和 Logistic 回归分析血清 miR-US4-3p 水平对 DN 预测和区分价值。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般资料 对 DN、DM 和对照组患者的一般资料进行单因素方差分析,结果显示,3 组患者的 DM 病程、HbA1c、FPG、TG、LDL-C、HDL-C、Cr 和 Cys C 差异均有统计学意义(*P* 均<0.05)。对差异有统计学意义的指标进行两两比较,结果显示 DN 组和对照组间,HbA1c、FPG、TG、LDL-C、HDL-C 和 Cre 差异均有统计学意义(*P* 均<0.05)。DN 组与 DM 组相比,糖尿病病程、HbA1c、LDL-C、Cre 和 Cys C 差异均有统计学意义(*P* 均<0.05)。DM 组与对照组相比,HbA1c、FPG、TG、HDL-C 差异均有统计学意义(*P* 均<0.05)。而各组研究对象性别、年龄等比较差异均无统计学意义(*P* 均>0.05)。见表 1。

表 1 3 组研究对象临床基本资料比较

变量	对照组(<i>n</i> = 64)	DM 组(<i>n</i> = 64)	DN 组(<i>n</i> = 64)	<i>P</i>
年龄(岁)	53.20 $\pm$ 10.737	55.92 $\pm$ 17.457	55.78 $\pm$ 11.880	0.450
性别(<i>n</i>)				
男	42	48	42	0.418
女	22	16	22	
DM 病程(年)	—	3(0.08,7)	10(5,16) [#]	<0.001
HbA1c(%)	5.51 $\pm$ 0.29	8.63 $\pm$ 2.06 [*]	6.88 $\pm$ 1.17 ^{*#}	<0.001
FPG(mmol/L)	4.90(4.70,5.30)	7.40(5.70,9.78) [*]	8.17(5.56,11.22) [*]	<0.001
TG(mmol/L)	0.88(0.68,1.26)	1.50(0.98,2.19) [*]	1.48(0.98,2.23) [*]	<0.001
TC(mmol/L)	4.39 $\pm$ 0.61	4.41 $\pm$ 1.40	4.81 $\pm$ 1.63	0.123
LDL-C(mmol/L)	2.72 $\pm$ 0.68	2.69 $\pm$ 1.02	1.96 $\pm$ 1.34 ^{*#}	<0.001
HDL-C(mmol/L)	1.49(1.24,1.74)	1.03(0.87,1.23) [*]	1.01(0.89,1.24) [*]	<0.001
Cr(μ mol/L)	61.90(54.38,70.98)	56.90(47.80,66.05)	104.31(78.68,205.97) ^{*#}	<0.001
Cys C(mg/L)	—	0.92(0.85,1.01)	1.44(1.07,2.26) [#]	<0.001
PTH(pg/mL)	—	—	51.76(25.25,152.45)	—

注:*,与对照组相比,*P*<0.05;#,与 DM 组相比,*P*<0.05。

2.2 各组血清 miR-US4-3p 表达水平比较 qRT-PCR 结果显示,与对照组及 DM 组相比,DN 组患

者血清 miR-US4-3p 的表达水平升高 ($P<0.001$), 而 DM 组与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组血清 miR-US4-3p 表达水平比较

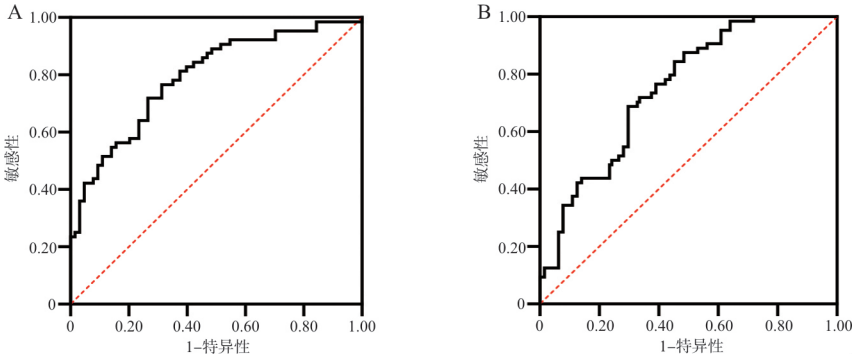
分组	n	miR-US4-3p
对照组	64	0.006(0.003 2,0.013 1)
DM 组	64	0.007(0.000 6,0.019 2)
DN 组	64	0.019(0.009 9,0.060 1) **
H 值	37.137	
P 值	0.000	

注: *, 与对照组相比, $P<0.05$; #, 与 DM 组相比, $P<0.05$ 。

2.3 血清 miR-US4-3p 与 DN 患者临床指标之间的相关性分析 Spearman 相关性分析显示, DN 患者血清 miR-US4-3p 与 Cys C ($r=0.288, P=0.023$)、PTH($r=0.493, P=0.045$) 呈正相关, 与 eGFR 呈负相关 ($r=-0.280, P=0.026$), 而与 HbA1c ($r=$

$-0.127, P=0.342$)、FPG ($r=0.028, P=0.826$)、TG ($r=0.032, P=0.803$)、TC ($r=0.135, P=0.288$)、LDL-C($r=0.062, P=0.629$)、HDL-C($r=-0.103, P=0.468$)、Cr ($r=0.245, P=0.053$)、糖尿病病程 ($r=-0.053, P=0.699$) 不相关。

2.4 血清 miR-US4-3p 对 DN 的预测及区分价值 ROC 曲线分析显示, miR-US4-3p 能够较好区分 DN 患者和健康对照者, 其 ROC 曲线下面积 (areas under the ROC curve, AUC) 为 0.792 (95%CI: 0.715 ~ 0.869), 见图 1A。当 cut-off 值为 0.011 时, miR-US4-3p 诊断 DN 的敏感性为 71.9%, 特异性为 73.4%。此外, miR-US4-3p 在鉴别 DM 和 DN 的 AUC 为 0.748 (95%CI: 0.664 ~ 0.832), 见图 1B。在 cut-off 值为 0.012 时, 其敏感性为 71.9%, 特异性为 64.1%。



注: A, miR-US4-3p 诊断 DN 的 ROC 曲线; B, miR-US4-3p 区分 DN 和 DM 的 ROC 曲线。

图 1 miR-US4-3p 对 DN 预测和区分的 ROC 曲线

Logistic 回归单因素模型中仅纳入血清 miR-US4-3p 分析, 结果显示: 以对照组为参考类别, 高血清 miR-US4-3p 水平与 DN 的发生相关 ($OR=7.065, 95\%CI=3.247\sim15.376, P<0.001$); 以 DM 组为参考类别, 血清 miR-US4-3p 水平的升高还可区分 DN 和 DM ($OR=4.879, 95\%CI=2.304\sim10.332, P<0.001$)。多因素模型中除了纳入血清

miR-US4-3p 外, 还同时纳入年龄、性别及血脂指标 (TG、TC、LDL-C、HDL-C), 结果显示, 在校正年龄、性别及其他血脂水平影响后, 血清 miR-US4-3p 水平的升高仍与 DN 的发生密切相关 ($OR=7.236, 95\%CI=2.633\sim19.889, P<0.001$), 对 DN 和 DM 的区分仍具有统计学意义 ($OR=6.466, 95\%CI=2.778\sim15.052, P<0.001$)。见表 3。

表 3 多因素 Logistic 回归分析血清 miR-US4-3p 水平对 DN 的预测及区分价值

模型	单因素分析		多因素分析	
	OR (95%CI)	P 值	OR (95%CI)	P 值
模型 1				
DN	7.065 (3.247~15.376)	<0.001	7.236 (2.633~19.889)	<0.001
模型 2				
DN	4.879 (2.304~10.332)	<0.001	6.466 (2.778~15.052)	<0.001

注: DN 为糖尿病肾病, DM 为单纯糖尿病; 模型 1 中, 非独立变量为“DN 和对照组”的二分类变量, 以“对照组”为参考类别; 模型 2 中, 非独立变量为“DN 和 DM 组”的二分类变量, 以“DM 组”为参考类别; 单因素分析, 独立变量为血清 miR-US4-3p; 多因素分析, 独立变量为血清 miR-US4-3p 和年龄、性别、血脂参数 (TG、TC、LDL-C、HDL-C)。

3 讨论

DN 约占 DM 患者的 40%,但其发病机制尚未明确。既往研究已证实,多种 miRNAs 参与肾小管上皮细胞氧化应激反应、糖代谢紊乱、肾纤维化、系膜细胞肥大的病理过程^[15]。病原微生物与人类疾病的关系日益受到重视,诸多证据表明 HCMV 感染与炎症反应激活、血管重塑相关,HCMV 利用自身编码的 miRNAs 调节自身及宿主细胞的基因差异表达可进一步完成免疫逃避、细胞进程调节、病毒 DNA 复制以及对细胞凋亡的调节功能。HCMV miRNAs 的研究可为进一步了解病毒致病机制和宿主防御机制提供线索。Pan 等^[16]研究表明,血清 HCMV miR-US4-1 可作为预测干扰素 α 治疗慢性乙型肝炎患者疗效新的生物标志物,提示检测 HCMV miRNA 的变化在疾病中具有重要意义。然而,HCMV miRNA 与 DN 之间的联系尚未得到阐明。本研究发现,DN 患者血清 HCMV miR-US4-3p 的表达显著高于健康人群和 DM 患者,而 DM 患者与健康人群间的表达差异无统计学意义,进一步多因素 Logistic 回归分析显示,在校正了年龄、性别、其他血脂指标影响后,血清高 miR-US4-3p 是 DN 发生的危险指标,且对 DN 和 DM 患者的鉴别具有重要意义,提示血清 miR-US4-3p 有望成为 DN 发病的辅助诊断指标及 DN 与 DM 间潜在的鉴别指标。

研究显示,免疫及炎症反应在 DN 发病机制中发挥重要作用^[11]。Kim 等^[9]报道,HCMV miR-US4-1 可调控 *ERAP1* mRNA 的翻译水平,从而极大地降低抗原的呈递,逃逸宿主对其的监控和免疫。Huang 等^[5]研究表明,hcmv-miR-UL112 通过下调 I 型 IFN 信号传导抑制 NK 细胞的细胞毒性来破坏先天免疫,表明 HCMV 可以利用基于 miRNA 的免疫逃逸机制。既往研究证实,HCMV 感染导致细胞转录因子 NF- κ B 的激活^[17],而高血糖导致糖基化终产物增多,可通过 NF- κ B 信号通路诱导巨噬细胞迁移并释放炎症细胞因子 TNF- α 及 IL-1 β ,NF- κ B 活化可刺激趋化因子和黏附分子的转录。近年来研究证实内皮功能障碍对肾小球疾病的发生、发展有着重要影响,肾小球内皮细胞通过与系膜细胞及足细胞的交流可进一步促进 DN 发展。Shen 等^[18]研究发现,HCMV miR-UL112 可通过丝裂原活化蛋白激酶信号通路、细胞黏附分子、趋化因子信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用等途径诱导血管细胞(如内皮细胞、平滑肌细胞)功能障

碍,导致血管损伤;miR-UL112 还可通过调控 ACE2 基因在肾脏中的表达,影响肾素血管紧张素系统从而调控机体血压水平^[19]。因此,我们推测 miR-US4-3p 可能参与调节 DN 的免疫逃避及炎症反应进程,并通过诱导血管内皮功能障碍,使足细胞、系膜细胞发生改变,进一步加重 DN 发展。本研究中相关分析证实血清 miR-US4-3p 的表达与 Cys C、PTH 显著正相关,Cys C 不受性别、年龄等因素影响,并且肾脏是其唯一清除器官,能够灵敏反映肾脏损伤程度^[20];DN 时由于患者肾小球通透性增强,血钙丢失刺激 PTH 分泌增多,因此 PTH 的检测也可作为判定早期肾脏损伤的预警指标之一。以上研究均提示 miR-US4-3p 参与 DN 发展进程。

研究发现,细胞外囊泡(EVs)中富含 miRNA,并能保护其不被降解^[21]。越来越多的证据表明,EVs 通过细胞与细胞之间的交流在病毒感染中起着重要作用。已经发现病毒感染可以改变宿主细胞中 EVs miRNA 的表达,Zhang 等^[2]通过深度测序分析人类胚胎肺成纤维细胞(HELFI)中 EVs miRNA 发现,EVs 中 miR-US25-1-5p 和 miR-UL112-3p 在感染后 6 h 水平升高,HCMV 感染婴儿血清 EVs miR-US25-1-5p 和 miR-UL112-3p 的水平与肝损害密切相关。从 Zhang 等^[2]结果中发现,感染细胞可释放更多的 EVs,HCMV miRNA 可以通过 EVs 转运至受体细胞发挥作用。Ding 等^[22]发现,在 HCMV 潜伏期,口腔扁平苔藓病患者血浆样本中 hcmv-miR-UL59 大多数以外泌体形式存在。因此,可以推测 HCMV miRNA 的变化也可能是由病毒感染或炎症细胞分泌的 EVs 引起。但是,各种疾病中 HCMV miRNA 的存在形式仍需进一步验证,HCMV 感染与 EVs miRNA 之间的具体机制仍然未知。

综上所述,血清 HCMV miR-US4-3p 在 DN 中高表达,其可能是 DM 患者肾脏损伤的重要生物学标志物,但血清 miR-US4-3p 与微量尿蛋白指标的比较以及其在 DN 发生发展过程中的具体病理生理机制仍需深入研究。鉴于本研究例数有限,仍需要进一步扩大样本量、开展前瞻性研究及临床随访再次验证和确定血清 HCMV miR-US4-3p 对 DN 患者的临床价值。

4 参考文献

- [1] Alicie RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2017, 12(12): 2032-2045.

- [2] Zhang J, Huang YJ, Wang Q, *et al.* Levels of human Cytomegalovirus miR-US25-1-5p and miR-UL112-3p in serum extracellular vesicles from infants with HCMV active infection are significantly correlated with liver damage[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39(3): 471-481.
- [3] Ng KR, Li JY, Gleadle JM. Human Cytomegalovirus encoded microRNAs; hitting targets[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015, 13(12): 1469-1479.
- [4] Abdalla AE, Mahjoob MO, Abosalif KOA, *et al.* Human Cytomegalovirus-encoded MicroRNAs; a master regulator of latent infection[J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 78: 104119.
- [5] Huang YY, Chen DD, He JY, *et al.* Hcmv-miR-UL112 attenuates NK cell activity by inhibition type I interferon secretion[J]. *Immunol Lett*, 2015, 163(2): 151-156.
- [6] Li SQ, Zhu JG, Zhang WL, *et al.* Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human Cytomegalovirus infection[J]. *Circulation*, 2011, 124(2): 175-184.
- [7] Mohammad AA, Rahbar A, Lui WO, *et al.* Detection of circulating hcmv-miR-UL112-3p in patients with glioblastoma, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus and healthy controls[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e113740.
- [8] 薛丽君, 丁梦, 王翔, 等. 口腔扁平苔藓患者血浆中人巨细胞病毒编码 miR-UL112-3p 水平的变化[J]. *临床检验杂志*, 2018, 36(7): 486-489.
- [9] Kim S, Lee S, Shin J, *et al.* Human Cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(10): 984-991.
- [10] Saulle I, Vicentini C, Clerici M, *et al.* An overview on ERAP roles in infectious diseases[J]. *Cells*, 2020, 9(3): 720.
- [11] Pérez-Morales RE, del Pino MD, Valdivielso JM, *et al.* Inflammation in diabetic kidney disease[J]. *Nephron*, 2019, 143(1): 12-16.
- [12] Chinese Diabetes Society, 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38(4): 292-344.
- [13] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组. 糖尿病肾病防治专家共识(2014 年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2014, 6(11): 792-801.
- [14] Luo Y, Wang C, Chen X, *et al.* Increased serum and urinary microRNAs in children with idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(4): 658-666.
- [15] 焦婷婷, 韩秋霞, 张冬, 等. 微小 RNA 在糖尿病肾病中的作用机制研究进展[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2019, 8(3): 138-141.
- [16] Pan Y, Wang N, Zhou Z, *et al.* Circulating human Cytomegalovirus-encoded HCMV-miR-US4-1 as an indicator for predicting the efficacy of IFN α treatment in chronic hepatitis B patients[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23007.
- [17] Yurochko AD, Mayo MW, Poma EE, *et al.* Induction of the transcription factor Sp1 during human Cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters[J]. *J Virol*, 1997, 71(6): 4638-4648.
- [18] Shen K, Xu LY, Chen DD, *et al.* Human Cytomegalovirus-encoded miR-UL112 contributes to HCMV-mediated vascular diseases by inducing vascular endothelial cell dysfunction[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(2): 172-181.
- [19] 戴媛. hcmv-miR-UL112 和 mcmv-miR-m01-2 通过影响 ACE2 基因表达参与血压调控[D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
- [20] 宋娜, 苏东峰, 高宇, 等. 糖尿病肾病患者血清 miR-21、CysC 与氧化应激指标的关系及其诊断价值[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(15): 3643-3646.
- [21] Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation[J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 22(2): 182-193.
- [22] Ding M, Wang X, Wang C, *et al.* Distinct expression profile of HCMV encoded miRNAs in plasma from oral lichen planus patients[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 133.

(收稿日期: 2020-11-26)

(本文编辑: 王海燕)