

## miR-30e\*在顺铂诱导的肾近端小管上皮细胞凋亡和线粒体损伤中的作用

杨玲云,郭燕,倪佳佳,王荣,林加娟,丁桂霞,黄松明,张爱华\*

(南京医科大学附属南京儿童医院肾脏科,江苏 南京 210008)

**[摘要]** **目的:**观察顺铂诱导肾近端小管细胞损伤过程中 miR-30e\* 的表达变化,并探讨其在顺铂诱导的小管细胞凋亡和线粒体损伤中的作用。**方法:**实时定量 PCR(qRT-PCR)检测顺铂处理后的小管细胞 miR-30e\* 的表达水平;使用重组慢病毒载体感染细胞,稳定高表达或低表达 miR-30e\*;使用流式细胞仪检测细胞凋亡,观察 miR-30e\* 在顺铂诱导的小管细胞凋亡中的作用;qRT-PCR 检测线粒体 DNA(mtDNA)拷贝数,JC-1 检测线粒体膜电位变化,探究 miR-30e\* 在顺铂引起的线粒体损伤中的作用。**结果:**①顺铂处理肾小管上皮细胞后,miR-30e\* 的表达呈时间依赖性和剂量依赖性下调;②使用 qRT-PCR 检测重组慢病毒载体制备的稳定高表达或低表达 miR-30e\* 的小管细胞株中 miR-30e\* 的表达,过表达组增高了 7 倍,敲低表达组降低了近 50%;③加入顺铂后,与对照组相比小管细胞凋亡增加,过表达 miR-30e\* 对凋亡起保护作用,敲低 miR-30e\* 则加重凋亡;④通过检测 mtDNA 的拷贝数发现顺铂诱导的线粒体损伤在 48 h 时有意义,迟于 miR-30e\* 表达的下调,线粒体膜电位检测 JC-1 提示过表达 miR-30e\* 对线粒体有保护作用。**结论:**顺铂处理小管细胞可降低其 miR-30e\* 的表达;体外过表达 miR-30e\* 对顺铂引起的小管细胞的凋亡和线粒体损伤具有保护作用,敲低 miR-30e\* 会加重顺铂诱导的肾近端小管细胞凋亡和线粒体损伤。

**[关键词]** miR-30e\*;顺铂;肾近端小管上皮细胞;线粒体损伤

**[中图分类号]** Q244;Q786

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)08-1060-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150803

## Role of miR-30e\* in cisplatin induced renal proximal tubular cells apoptosis and mitochondrial injury

Yang Lingyun, Guo Yan, Ni Jiajia, Wang Rong, Lin Jiajuan, Ding Guixia, Huang Songming, Zhang Aihua\*

(Department of Nephrology, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

**[Abstract]** **Objective:**To investigate the expression of miR-30e\* and the role of miR-30e\* in cisplatin induced mouse proximal tubular cells(mPTCs) apoptosis and mitochondrial injury. **Methods:**Expression of miR-30e\* in mPTCs treated with cisplatin were determined by quantitative real-time PCR(qRT-PCR). To stably over expression or knock down miR-30e\*, recombinant lentiviral expressing vectors were used for transfection of mPTCs. Flow cytometry was performed to analyze the apoptosis of mPTCs after transfection and treated with or without cisplatin. Mitochondrial DNA (mtDNA) copy numbers were determined by qRT-PCR and mitochondrial membrane potential was examined by JC-1 staining. **Results:**Cisplatin reduced the expression levels of miR-30e\* in a dose and time-dependent manner. MPTCs transfected with over expression miR-30e\* recombinant lentiviral expressing vector gained an increased expression of miR-30e\* for seven fold. While knock down of miR-30e\* decreased the expression of miR-30e\* for 50% compared with vehicle. The apoptosis of mPTCs increased when treated with cisplatin, over expression miR-30e\* reduced cisplatin induced apoptosis and knock down of miR-30e\* facilitated cisplatin induced apoptosis. mtDNA significantly decreased after cisplatin treatment for 48 h, later than the decrease expression of miR-30e\*. JC-1 staining revealed ectopic miR-30e\* can protect mitochondrial membrane from cisplatin induced injury. **Conclusion:**Cisplatin reduced the expression levels of miR-30e\* *in vitro*. Ectopic miR-30e\* can protect mPTCs from apoptosis and mitochondrial membrane potential changes induced by cisplatin.

**[Key words]** miR-30e\*; cisplatin; renal tubular cells; mitochondrial injury

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(08): 1060-1065]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81270797)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail:zhaihua@njmu.edu.cn

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是指突然的、持续的肾功能下降<sup>[1]</sup>。AKI 作为一种常见的临床合并症,其发病率逐年增高,近十年已从 0.6% 升高至 5%。AKI 患者病死率增高,2011 年的统计表明危重症患者 AKI 的发生率为 57%,根据急性肾损伤网络诊断标准诊断的一期 AKI 患者的病死率是 13.9%,而无 AKI 患者的病死率仅为 6.2%<sup>[2]</sup>。AKI 的发病机制可分为肾前性、肾性和肾后性,顺铂具有抗实体肿瘤作用,被广泛应用于临床<sup>[3]</sup>,但顺铂是诱发肾性 AKI 的常见原因之一,故其诱发 AKI 常被运用于肾脏病学领域的研究。

微小 RNA (microRNA) 是内生的小的 (~22 nt) 非编码 RNA,能够通过结合靶信使 RNA (mRNA),使 mRNA 降解或翻译受限,起到转录后基因调控作用<sup>[4]</sup>。近年来,越来越多的研究表明 microRNA 参与 AKI<sup>[5]</sup>。本课题组前期运用基因芯片技术发现,发生肾损伤小鼠肾皮质 miR-30e\* 的表达显著高于正常小鼠肾皮质 miR-30e\* 的表达。miR-30 家族包括 5 个成员,命名从 miR-30a 到 miR-30e,参与多种疾病的病理生理过程,如肝癌的侵袭和转移<sup>[6]</sup>。在肾脏领域,关于 miR-30 家族的研究目前主要集中在肾细胞癌<sup>[7-10]</sup>、肾移植<sup>[11-12]</sup>、肾病综合征<sup>[13]</sup>和肾脏纤维化<sup>[14-15]</sup>,未有研究揭示 miR-30e\* 在 AKI 中的表达变化和作用;microRNA 在凋亡中的研究聚焦在肿瘤学<sup>[16-18]</sup>,miR-30e\* 与凋亡的关系未见报道。

本研究检测了顺铂刺激的小管细胞 miR-30e\* 的表达改变,并运用重组慢病毒载体制备了稳定上调或下调 miR-30e\* 的肾近端小管上皮细胞株,探讨了其对顺铂引起的小管细胞的凋亡和线粒体损伤的作用,实验在细胞水平证实了 miR-30e\* 对顺铂诱导的小管细胞凋亡以及线粒体损伤有保护作用,为后续研究奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠肾近端小管上皮细胞株 (mPTECs) 为永生化细胞,由南京医科大学第四临床医学院儿研所保存;顺铂 (Sigma 公司,美国);线粒体 DNA (mtDNA) 及 18s 的上下游引物、转染试剂 Lipofectamine 2000、RNA 提取试剂 TRIzol (Invitrogen 公司,美国);SYBER Green master mix 和 Probe master mix (Roche 公司,瑞士);JC-1 染料 (分子探针公司,美国);DNA 提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (BD Bioscience

公司,美国);RPMI/F12 培养基、胎牛血清、细胞培养瓶/皿等 (Gibco 公司,美国);miRNA 反转录试剂盒 (Life 公司,美国);mmu-miR-30e\* 的引物和探针由上海吉玛合成;miR-30e\* 过表达重组慢病毒载体 (GV254 Ubi-EGFP-MCS-IRES-puromycin)、表达抑制重组慢病毒载体 (GV280 hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin) 及各自的阴性对照重组慢病毒载体由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

mPTECs 用含 10% 胎牛血清的 RPMI/F12 培养液置于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 恒温保湿培养箱内培养。至 80%~90% 融合时,用 0.125% 胰酶+0.02% EDTA 消化后传代。将对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,接种至 6 孔板,待细胞铺满板底 75%~80% 时,加入顺铂终浓度为 10 μg/mL 的无血清培养基培养。

#### 1.2.2 总 RNA 提取、逆转录及实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测 miR-30e\* 的表达

采用 TRIzol 一步法抽提细胞总 RNA,应用分光光度计测定 RNA 浓度及纯度。取总 RNA 250 ng 进行逆转录反应,通过逆转录试剂盒 TaqMan@miRNA Taqman 将总 RNA 逆转录成 cDNA,具体操作按说明书进行。应用 microRNA 特异性探针和 Probe master mix 进行 miR-30e\* 的实时定量检测,U6 为内参。所有实时定量反应均在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行,每组 4 个样本,每个反应设 3 个复孔。

#### 1.2.3 DNA 提取及 qRT-PCR 检测 mtDNA 的表达

采用北京百泰克生物技术有限公司提供的细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 提取细胞 DNA,具体步骤见说明书。采用 real-time PCR 方法检测各组足细胞 mtDNA 及核基因 18s rRNA 含量。mtDNA: 上游引物 5'-ATCCTCCAGGATTTG-GAAT-3', 下游引物 5'-ACCGGTAGGAATTGC-GATAA-3'; 18s rRNA: 上游引物 5'-TTCGGAAGT-GAGGCCATGATT-3', 下游引物 5'-TTTCGCTCTG-GTCCGTCTTG-3'。以 mtDNA 与 18s rRNA 拷贝数的比值计算细胞 mtDNA 的相对含量。

#### 1.2.4 重组病毒转染小鼠肾近端小管上皮细胞

将 mPTECs 铺入 6 孔板长至 30% 时,向 6 孔板中分别加入重组慢病毒 miR-30e\* 过表达 (miR-30e\* OE) 载体 40 μL+100 μL polybrene、miR-30e\* OE 阴性对照载体 10 μL+100 μL polybrene、重组慢病毒 miR-30e\* 表达抑制 (miR-30e\* KD) 载体 40 μL+100

μL polybrene 及 miR-30e\* KD 阴性对照载体 10 μL+100 μL polybrene。混匀,继续培养 8 h 后更换为新鲜培养基。感染 3 d 后,观察荧光表达情况,待细胞长满 6 孔板后将其消化转至培养瓶中继续培养,贴壁后加入 3 μg/mL 嘌呤霉素筛选细胞,直至 miR-30e\* 在 mPTCs 中稳定表达。此处所用表达抑制载体是含 POL III 启动子 U6 的载体,成功被转染入细胞后能驱动表达抑制 miR-30e\* 的 shRNA 片段,抑制内源性 miR-30e\* 的表达。

### 1.2.5 流式细胞检测凋亡

将上述 4 组对数生长期的细胞接种于 6 孔板,24 h 后每组的半数孔加入顺铂 10 μg/mL,48 h 后将孔上清液收集到对应的 10 mL 离心管中,每孔加 1 mL PBS 洗涤后同样收集到对应的离心管中,加胰酶充分消化后每孔加 1 mL PBS 洗涤。离心并收集细胞,加入缓冲液重悬细胞使其密度调整到约 1×10<sup>6</sup> 个/mL,将 100 μL 细胞悬液从细胞培养瓶中(5×10<sup>5</sup> 个细胞)转移到 5 mL 流式细胞仪检测离心管内,加入 5 μL FITC-AnnexinV 及 10 μL PI,混匀并于室温(25℃)避光反应 15 min,每管加入 400 μL 结合缓冲液,立即用流式细胞仪(BD 公司,美国)检测细胞凋亡。

### 1.2.6 JC-1 检测线粒体膜电位

吸除待检测 6 孔板中培养液,用 PBS 洗涤细胞 1 次,加入 1 mL 细胞培养液;加入 JC-1 染色工作液,充分混匀,细胞培养箱中 37℃ 孵育 20 min。JC-1 染色缓冲液配制:在孵育期间,按照每 1 mL JC-1 染色缓冲液(×5)加入 4 mL 蒸馏水的比例,配制适量 JC-1 染色缓冲液(×1),并放置于冰浴;37℃ 孵育结束后吸除上清,用 JC-1 染色缓冲液(×1)洗涤 2 次。流式细胞仪检测。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件。两组样本比较采用 *t* 检验,多组样本比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法检验,*P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 顺铂抑制肾小管上皮细胞中 miR-30e\* 的表达

不同浓度的顺铂(1、2、5、10、20 μg/mL)刺激 mPTCs,24 h 后提取 RNA,实时定量 PCR 检测到 miR-30e\* 的表达呈顺铂浓度依赖性下降,在顺铂浓度为 5 μg/mL 时开始有统计学意义(*P* < 0.05,图 1A);用 10 μg/mL 顺铂在不同时间点刺激细胞,miR-

30e\* 的表达下调呈时间依赖性,在作用 4 h 后有统计学意义(图 1B)。

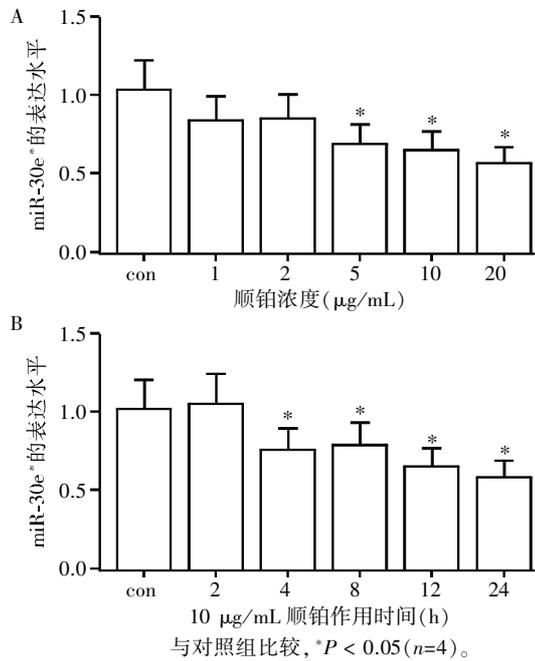


图 1 顺铂处理小鼠肾近端小管上皮细胞后不同浓度(A)和不同时间(B)miR-30e\* 的表达情况

Figure 1 The expression of miR-30e\* in mPTCs treated with cisplatin for different concentrations(A) and different times(B)

### 2.2 稳定高表达及低表达 miR-30e\* 的肾小管上皮细胞株的制备

mPTCs 转染 miR-30e\* 过表达重组慢病毒载体后,与阴性对照相比其表达增高;mPTCs 转染 miR-30e\* 低表达重组慢病毒载体后,与阴性对照相比其表达降低(图 2)。

### 2.3 miR-30e\* 抑制顺铂诱导的肾小管上皮细胞凋亡

流式细胞术检测细胞凋亡,miR-30e\* 高表达组凋亡明显减少(*P* < 0.05),10 μg/mL 顺铂可诱导细胞凋亡显著增多(*P* < 0.05)。过表达 miR-30e\* 可降低顺铂诱导的细胞凋亡(图 3A),低表达 miR-30e\* 则使细胞凋亡增多(图 3B)。

### 2.4 miR-30e\* 抑制顺铂诱导的 mtDNA 拷贝数下降

用 10 μg/mL 顺铂在不同的时间点刺激细胞,提取 DNA 后实时定量 PCR 检测线粒体拷贝数。图 4A 显示线粒体 DNA 拷贝数在 24 h 有下降趋势,48 h 显著降低 (*P* < 0.05)。高表达 miR-30e\* 组 mtDNA 拷贝数增多并对顺铂引起的 mtDNA 拷贝数下降有保护作用(图 4B)。

### 2.5 miR-30e\* 阻断顺铂诱导的线粒体膜电位下降

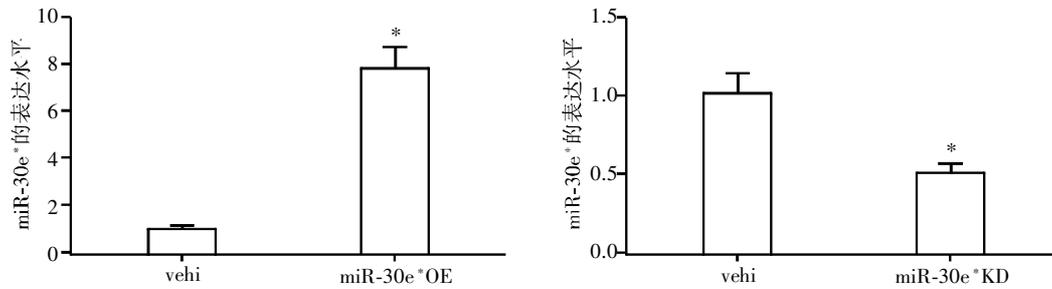
JC-1 检测线粒体膜电位改变,miR-30e\* 高表达组

对顺铂引起的膜电位的降低有保护作用(图 5A), miR-30e\*敲低表达则加重了膜电位的降低(图 5B)。

### 3 讨论

本课题组前期研究运用基因芯片技术,观察到

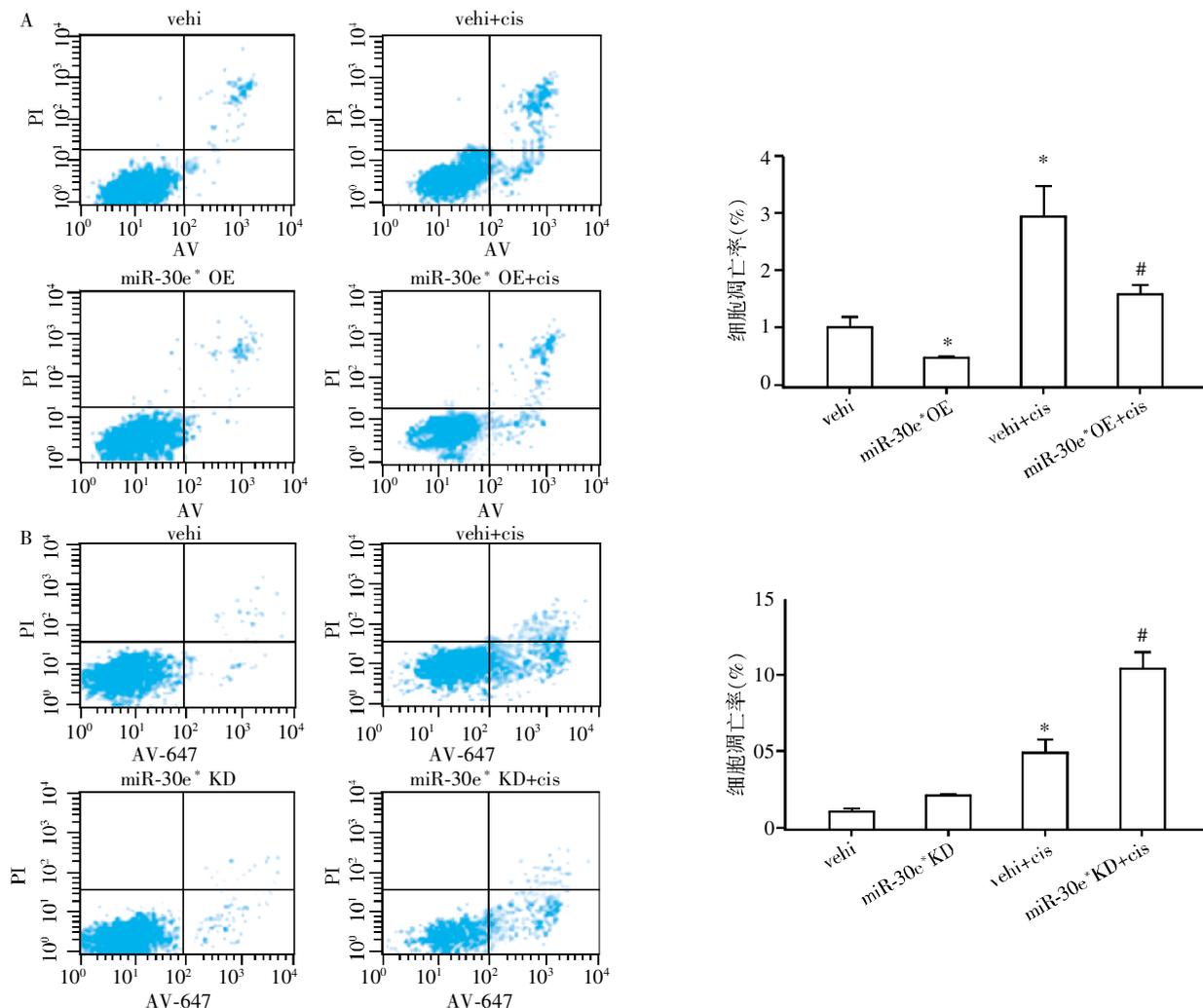
发生肾损伤小鼠肾皮质 miR-30e\* 的表达显著高于正常小鼠。而体外用顺铂刺激小管细胞后检测到 miR-30e\* 表达下调,进一步研究发现 miR-30e\* 对顺铂引起的小管细胞凋亡和线粒体损伤起到保护作用。推测是因为在体内,这个具有保护性的 mi-



与 vehi 组比较, \* $P < 0.05$  ( $n=4$ )。

图 2 重组慢病毒载体制备的稳定高表达或低表达 miR-30e\* 的 mPTECs 中 miR-30e\* 的表达状况

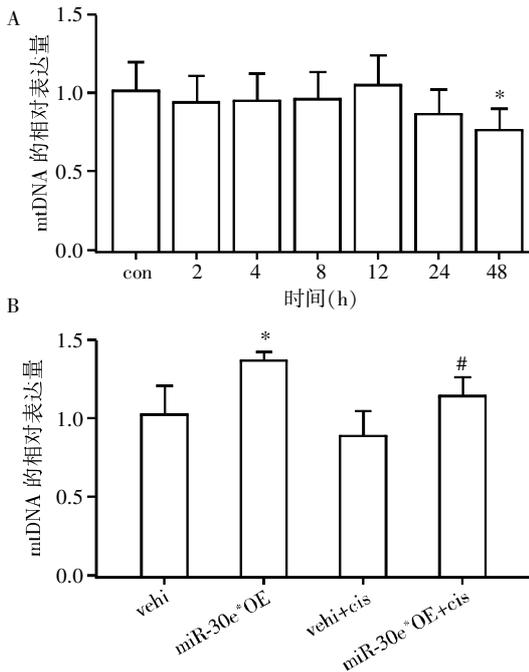
Figure 2 The expression of miR-30e\* in mPTECs transfected with recombinant lentiviral expressing vector over expression miR-30e\* or knock down miR-30e\*



与 vehi 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 vehi+cis 组比较, # $P < 0.05$  ( $n=4$ )。

图 3 miR-30e\* 阻断顺铂诱导的小鼠肾近端小管上皮细胞凋亡(A), 低表达 miR-30e\* 加重顺铂诱导的小鼠肾近端小管上皮细胞凋亡(B)

Figure 3 Over expression miR-30e\* can reduce cisplatin induced apoptosis(A), whereas low expression of miR-30e\* facilitates cisplatin induced apoptosis of mPTECs(B)



A: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; B: 与 vehi 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 vehi+cis 组比较, # $P < 0.05$ ( $n=4$ )。

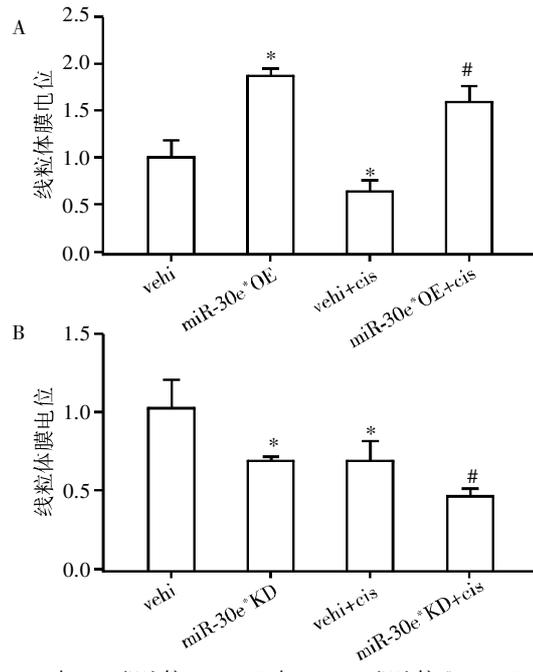
图4 顺铂 10  $\mu\text{g/mL}$  能诱导 mtDNA 拷贝数降低(A), 过表达 miR-30e\* 可增加 mtDNA 的拷贝数(B)

Figure 4 Cisplatin 10  $\mu\text{g/mL}$  can reduce the copies of mitochondrial DNA (A), while ectopic miR-30e\* increased the copies of mitochondrial DNA (B)

croRNA 早期呈升高表现。

已有很多研究报道了顺铂引起的肾毒性作用、AKI 的机制,包括氧化应激、线粒体功能障碍、炎症和对肾小管上皮细胞的直接毒性作用<sup>[19]</sup>。本研究仅观察了顺铂诱导的小管细胞的凋亡和线粒体损伤中 miR-30e\* 的作用,miR-30e\* 是否对顺铂引起的小管细胞氧化应激和炎症等同样有作用仍需进一步研究。图 4A 中 mtDNA 48 h 才有显著降低,迟于图 1B 中 miR-30e\* 表达的降低,提示 miR-30e\* 的降低可能参与线粒体损伤。顺铂引起肾小管上皮细胞凋亡主要是通过死亡受体途径、线粒体途径及内质网应激 3 条途径发挥作用,已有研究表明保护线粒体功能可以减少顺铂的肾毒性作用<sup>[20]</sup>,miR-30e\* 对小管细胞凋亡的保护作用可能来源于其对线粒体的保护作用。

microRNA 参与多种生理学和病理学过程,能在翻译前水平调节基因表达<sup>[4,21]</sup>。miR-30e\* 是通过调节其靶基因发挥保护作用的,具体是哪些基因并且有怎样的调控关系还需深入研究。microRNA 的 5' 端 2~8 个核苷酸序列是它们与靶信使 RNA 结合的关键位点,被称为种子序列<sup>[22]</sup>。miR-30 家族成员



与 vehi 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 vehi+cis 组比较, # $P < 0.05$ ( $n=4$ )。

图5 miR-30e\* 减轻顺铂引起的线粒体膜电位下降(A), 敲低 miR-30e\* 则加重顺铂引起的线粒体膜电位下降(B)

Figure 5 Ectopic miR-30e\* alleviates the change of mitochondrial membrane potential induced by cisplatin(A), and knock down miR-30e\* add to the change of mitochondrial membrane potential(B)

的种子序列共有 3 种,在人类 miR-30e\* 的种子序列与 miR-30a\* 和 miR-30d\* 的种子序列相同,它们的生物学功能是否相似仍不明确。目前关于 miR-30 家族和 AKI 的研究仅 1 篇报道:Nan 等<sup>[23]</sup> 检测了尿液中的 miR-30d 的含量,发现比检测血尿素氮(BUN) 能更敏感地预测 AKI 的发生。通过缺血再灌注方法制造的小鼠 AKI 模型中,尿中 miR-30d 的含量与肾损伤程度呈正相关。

总的来说,本研究结果提示 miR-30e\* 在小管细胞的凋亡和线粒体损伤中发挥重要作用,它抑制凋亡的作用可能是通过减少线粒体损伤来实现。虽然具体机制尚待进一步研究,但已能为 AKI 的研究提供新的思路。

[参考文献]

[1] Hoste EA, Clermont G, Kersten A, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients; a cohort analysis [J]. Crit Care, 2006, 10(3): R73

[2] Mandelbaum T, Scott DJ, Lee J, et al. Outcome of critically ill patients with acute kidney injury using the Acute Kidney Injury Network criteria [J]. Crit Care Med,

- 2011,39(12):2659-2664
- [3] Schrier RW:Cancer therapy and renal injury[J]. *J Clin Invest*,2002,110(6):743-745
- [4] Bartel DP. MicroRNAs:genomics,biogenesis,mechanism, and function[J]. *Cell*,2004,116(2):281-297
- [5] Kumar S,Liu J,McMahon AP. Defining the acute kidney injury and repair transcriptome [J]. *Semin Nephrol*, 2014,34(4):404-417
- [6] 孔亮亮,倪庆锋,卢叶挺,等. miR-30c 减轻肝细胞肝癌的侵袭与转移[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2014,34(7):937-943
- [7] Mathew LK, Lee SS, Skuli N, et al. Restricted expression of miR-30c-2-3p and miR-30a-3p in clear cell renal cell carcinomas enhances HIF2alpha activity[J]. *Cancer Discov*,2014,4(1):53-60
- [8] Heinzelmann J, Unrein A, Wickmann U, et al. MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma:a comparison of primary tumors and distant metastases [J]. *Ann Surg Oncol*,2014,21(3):1046-1054
- [9] Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, et al. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma [J]. *World J Urol*,2011,29(3):367-373
- [10] Huang QB, Ma X, Zhang X, et al. Down-regulated miR-30a in clear cell renal cell carcinoma correlated with tumor hematogenous metastasis by targeting angiogenesis-specific DLL4[J]. *PLoS One*,2013,8(6):e67294
- [11] Oghumu S, Bracewell A, Nori U, et al. Acute pyelonephritis in renal allografts:a new role for microRNAs? [J]. *Transplantation*,2014,97(5):559-568
- [12] Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2009,106(13):5330-5335
- [13] 孙 伟,李春庆,陈继红,等. 嘌呤霉素肾病模型肾组织微小 RNA 的差异性表达及雷至胶囊的干预作用[J]. *中国中药杂志*,2013,38(1):81-90
- [14] Denby L, Ramdas V, McBride MW, et al. miR-21 and miR-214 are consistently modulated during renal injury in rodent models [J]. *Am J Pathol*,2011,179(2):661-672
- [15] Huang J, Yao X, Zhang J, et al. Hypoxia-induced down-regulation of miR-30c promotes epithelial-mesenchymal transition in human renal cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*,2013,104(12):1609-1617
- [16] 朱 楠,张积森,荆珏华,等. MicroRNA-199a-3p 对骨肉瘤细胞凋亡的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2014,34(2):159-163
- [17] 吴 夕,缪 珩. microRNA-21 对人甲状腺乳头状癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2014,34(4):437-441
- [18] 曹 艳,王 鹏,娄鉴芳,等. miR-638 对人肺腺癌细胞凋亡的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2014,34(3):287-290
- [19] Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, et al. Cisplatin nephrotoxicity:a review [J]. *Am J Med Sci*,2007,334(2):115-124
- [20] Yang Y, Liu H, Liu F, et al. Mitochondrial dysregulation and protection in cisplatin nephrotoxicity[J]. *Arch Toxicol*,2014,88(6):1249-1256
- [21] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature*,2004,431(7006):350-355
- [22] Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation [J]. *RNA*,2003,9(3):277-279
- [23] Wang N, Zhou Y, Jiang L, et al. Urinary microRNA-10a and microRNA-30d serve as novel, sensitive and specific biomarkers for kidney injury [J]. *PLoS One*,2012,7(12):e51140

[收稿日期] 2015-01-17