高通量测序筛查特发性膜性肾病患者外周血细胞 microRNA 的差异性表达

陈文标[1],黄建溶[2],喻祥琪[1],彭武建[2],林小聪[3],戴　勇[1*]

([1]暨南大学第二临床学院，深圳市人民医院临床医学研究中心，广东　深圳　518020;[2]深圳市第三人民医院肾脏内科，广东　深圳　518112;[3]广东医学院生物化学研究所,广东　湛江　524023)

[摘　要]　**目的**:寻找特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy,IMN)患者外周血单个核细胞小核糖核苷酸(microRNA)的差异性表达以及发生碱基突变的难易度。**方法**:运用高通量测序技术分别对 IMN 患者和健康对照者(NC)的 microRNA 进行测序，构建 IMN 与 NC 组之间 microRNA 差异性表达谱。并对两组的 microRNA 进行碱基编辑分析，寻找发生了碱基突变的 microRNA,比较 IMN 与 NC 组 microRNA 碱基突变的难易程度。**结果**:通过构建表达谱,找到了 has-miR-208b、has-miR-195-3p、has-miR-23b-5p、has-miR-95、has-miR-503、has-miR-449a、has-miR-486-3p 与 has-miR-27 8 个 microRNAs 最具有差异性表达。2 组共同表达的 41 个 microRNA 中,IMN 比 NC 更容易发生碱基编辑而引起碱基突变。**结论**:IMN 患者与健康对照者的 microRNA 存在着差异性表达,差异性表达的 microRNA 特异性很高,可以作为深入研究 IMN 发病机制的靶点。IMN 患者相比健康对照者更容易发生 microRNA 碱基编辑引起碱基突变,这些发生碱基突变的 microRNA 可能用于解释 IMN 的病因基础。

[关键词]　膜性肾病;小核糖核酸;高通量测序;差异性表达;碱基编辑

[中图分类号]　Q754　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2014)11-1507-08

doi:10.7655/NYDXBNS20141110

Identification of different expression of microRNA in membranous nephropathy using high-throughput sequencing technology

Chen Wenbiao[1],Huang Jianrong[2],Yu Xiangqi[1],Peng Wujian[2],Lin Xiaochong[3],Dai Yong[1*]

(*[1]Clinical Research Center,Shenzhen People's Hospital,Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020;[2]Department of Nephrology,the Third People's Hospital of Shenzhen,Shenzhen 518112;[3]Institute of Biochemistry and Molecular Biology,Guangdong Medical College,Zhanjiang 524023,China*)

[Abstract]　**Objective**:To identify microRNA with different expression and the ease on base mutation based on peripheral blood mononuclear cell from idiopathic membranous nephropathy (IMN) patients. **Methods**:We used the high-throughput sequencing technology to establish the differently expressed spectrum of microRNA of IMN patients and healthy people (the control group), respectively. We found out the significantly different expression of microRNA. We also analyzed the base edited in the microRNA to find out the microRNA which happened in base mutation, to compare the microRNA between the two groups which in common to evaluate the ease of base mutation. **Results**:After the creation of microRNA different expression profile,we found out eight microRNAs,which were most significantly different expression,including has-miR-27,has-miR-208b,has-miR-195-3p,has-miR-23b-5p,has-miR-95,has-miR-503, has-miR-449a and has-miR-486-3p. In the common microRNAs between the IMN and the NC groups,there are forty one microRNAs,which had the greater opportunity to have the base edited in the IMN group than in the NC groups. **Conclusion**:The microRNA expression between the IMN and the NC groups showed significant differences,and the significantly different expression microRNAs were special that could be used as target to further research the pathogenesis of IMN. The microRNAs of IMN patients were more easily to have base edited than that of NC group,and the microRNAs with edited base coulbe possibly related to the pathological mechanism of IMN.

[Key words]　membranceous nephrology;microRNA;high-throughput sequencing;diffenent expression;base edit

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(11):1507-1514,1541]

[基金项目]　深圳市卫生局科技项目(201202139)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:daiyong2222@gmail.com

特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy,IMN) 是成年人肾病综合征最常见的病因之一。据资料统计,IMN 的发病率约占原发性肾小球肾炎疾病的 9.9%~13.5%[1]。IMN 主要病理改变是免疫复合物沿着肾小球基底膜膜外侧沉积,肾小球弥漫性病变,基底膜增厚,进而有基底膜钉状突形成[2]。按照发病原因可以分为特发性与继发性。IMN 病因不太明确,多认为是免疫机制有关,继发性膜性肾病与药物、狼疮、肝炎等有关[3]。IMN 患者发病过程可自行缓解,但是仍有 20%~40%进入终末期肾病[4]。目前 IMN 治疗面临的难题是缺乏可用于监测患者体内免疫反应活动状态的标志物。即使是免疫抑制剂的合理使用,仍然不能很好掌握用药的量度,所以常常使治疗处于左右为难的状态。一方面免疫抑制剂缓解病情,另一方面药物带来巨大不良反应[5]。

microRNA 是一类内源性长度为 22 nt 非编码小分子 RNA。microRNA 可以通过抑制与降解方式调控基因表达,在动植物生长发育、细胞增殖与死亡、细胞分化及各种疾病的发病机制中起着重要的调控作用[6]。近年来 microRNA 被广泛运用于疾病研究当中, 都取得了突破性进展 [7]。有些开放的 microRNA 基因芯片已经处于临床试验阶段,不久将广泛应用于临床。其中有不少学者运用 microRNA 研究肾脏病学,如 Dai 等[9]首次运用 microRNA 在基因层面对狼疮性肾炎等肾脏疾病进行研究,并且发现特异 microRNA-223 靶点。基于此,本研究运用高通量测序找出 IMN 患者与正常人差异性表达的 microRNA, 并分析 microRNA 发生了碱基编辑而引起的碱基突变。这些差异性表达的 microRNA 与发生碱基突变的 microRNA 特异性很高, 可能作为有效工具用于进一步深入研究 IMN 的发病机制。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2013 年间深圳市人民医院就诊的 IMN患者 100 例为 IMN 组,经肾皮穿刺活检全部诊断为Ⅲ期肾病,在确诊之前没有接受过细胞毒性及免疫抑制剂药物治疗。同期 100 例健康者作为实验对照组(NC 组), 在深圳市人民医院常规体格检查排除了相关肾脏疾病。把 100 例健康者随机分成 10 组,每组 10 例,分别标记为 NC1、NC2、NC3、NC4、NC5、NC6、NC7、NC8、NC9、NC10 (NC1~10) 组别; 同样把 100例 IMN 患者随机分成 10 组, 每组 10 例, 分别标记为 IMN1、IMN2、IMN3、IMN4、IMN5、IMN6、IMN7、IMN8、IMN9、IMN10(IMN1~10)组别。从所有实验参与者静脉抽取全血 5 ml 作为实验标本。本研究得到深圳市人民医院伦理委员会批准,征得参与者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 样品处理及总 RNA 提取

用肝素管收集实验参与者静脉血 5 ml,于采血后 1 h 按照淋巴细胞分离(Ficoll-paque,PLUS)实验说明手册步骤,使用淋巴细胞分离液(Celdarlane 公司,美国)分离外周血单个核细胞。然后按照 TRIzol (Invitrogen 公司,美国)试剂盒说明书提取总 RNA。经过 Bioanalyzer 分析仪(Scanta 公司,美国)监测,满足 RNA 完整指数(RIN)≥8.0,rRNA 比值(28S/18S)≥1,用于小 RNA 数据库建立。

1.2.2 IMN 与 NC 组总 RNA 的小 RNA 分离

IMN1~10 与 NC1~10 组共有 200 例总 RNA 样品,从每例样品中各取 300 ng 总 RNA,以组为单位分别充分混匀,即得到 IMN1~10 与 NC1~10 组共 20 组总 RNA 样品。用 15%变形聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离,回收,纯化 18~30 nt 范围的小 RNA。

1.2.3 小 RNA 数据库的建立及测序

将分离得到的小 RNA 片段经反转录等一系列处理形成 cDNA 片段, 再将接头连接到片段两端经 RT-PCR 扩增成小 RNA 数据库。得到的 RNA 数据库用 Illumina Hiseq™2000 测序仪进行深度测序(深圳华大基因公司)。本实验充分应用华大基因测序平台,使用边合成边测序原理读取碱基序列。将已经接了接头的 cDNA 片段结合在含有接头的芯片上,加入荧光标记 dNTP、聚合酶和接头引物,经反扩增。dNTP 在参与互补链序列延伸时会释放出荧光,每种碱基具有特定波长,荧光信号被测序仪器采集,并运用软件转换为测序峰,最终得到各序列的信息。

1.2.4 测序结果初步分析

测序得到的 50 nt 长度序列,通过去接头、去低质量、去污物等步骤后,完成数据处理并得到干净小 RNA 序列。将干净小 RNA 序列进行一系列分析,包括统计小 RNA 种类及总数, 长度分布与相关数据库比对、小 RNA 分类注释等分析。即运用 SOAP2.0 软件(深圳华大基因公司) 将干净序列与 NCBI Genebank 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)比对及分类注释,去除其他编码 RNA 序列。再将余下序列与 miRbase(http://www.mirbase.org/)比对,获取 20 组已知 microRNA 的含量、表达量及染色体分布等信息。

1.2.5 20 组样品 microRNA 差异性表达谱建立

首先将 20 组样品 microRNA 表达量归一化到

同一数量级,获取标准表达量(standard expression)。归一化表达量=microRNA 表达量/样品总表达量×10^6,若 microRNA 表达量为 0,则把数值修正为 0.01;若两样品 micrRNA 表达量都<1,则此 microRNA 不能用于差异性表达分析。利用 Audic and Claverie test 统计学方法比较两样品 microRNA 表达差异[10]。倍比值=$\log_2$(实验组归一化表达量/对照组归一化表达量)。同时引入 P 值用于分析基因表达谱,避免低表达 microRNA 造成数据误差,当倍比值≥2 且 P≤0.01 时,认为 microRNA 具有显著差异性表达。

1.2.6　microRNA 碱基编辑

将 microRNA 序列与 miRBase 数据库中已知 microRNA 序列比对。比较 20 组样品中碱基编辑数量,找到发生碱基突变的 microRNA。运用 Excel 表格统计 20 组样品中发生碱基编辑的 microRNA,并统计碱基编辑数量与碱基总数的比例(base edit/total base)。得到每一个 microRNA 发生碱基编辑数占该 microRNA 碱基总数的比值 Ratio (IMN/ NC),可用于判断 20 组样品中 microRNA 发生碱基编辑而引起基因突变的难易程度。当 Ratio (IMN/NC)>1 时,认为 IMN 更容易发生 microRNA 碱基编辑;当 Ratio(IMN/NC)<1 时,认为 NC 更容易发生碱基编辑。在此统计分析中,筛选 Ratio(IMN/ NC)比值>1 的 microRNA 进行分析。

2　结　果

2.1　IMN 与 NC 组 microRNA 的差异性表达

IMN1~10 与 NC1~10 组差异性表达 microRNA 分析可以看出下调表达的 microRNA 数量要远远大于上调表达的 microRNA(表 1)。IMN1~10 与 NC1~10 组之间 microRNA 差异性表达的聚类分析中可以看出,每一组之间差异性表达的 microRNA 中,下调表达的 microRNA 数量大于上调表达的 microRNA(图 1)。且上调与下调表达的 microRNA 在每一组内基本相同。

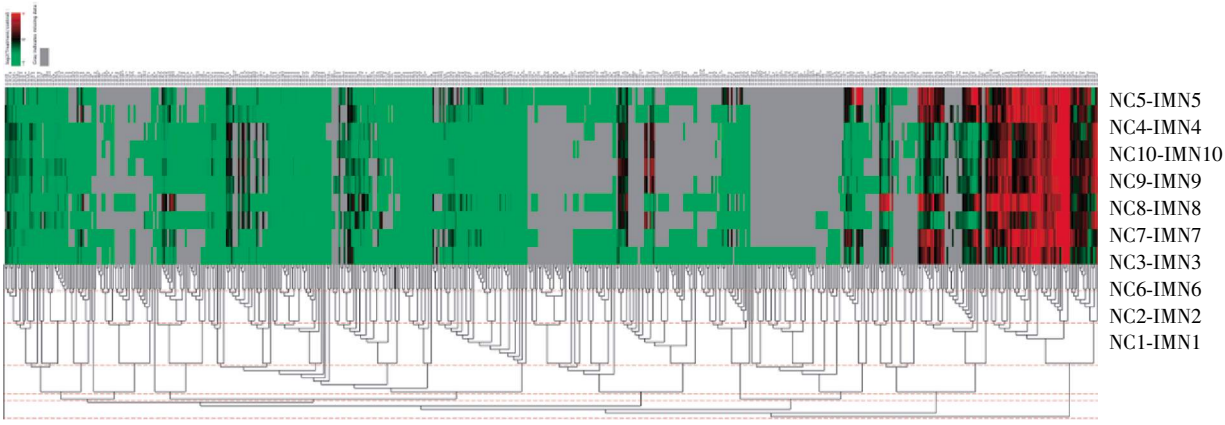
选取 IMN 与 NC 每一组最具有显著差异性表达的前 5 个上调与下调 microRNAs(表 2)。其中 has-miR-208 在 7 个组别中作为上调表达的 microRNA;has-miR-195-3P 在 10 个组别中作为上调表达的 microRNA;has-miR-217 在 7 个组别中作为下调表达的 microRNA;has-miR-23b-5p 在 7 个组别中作为下调表达的 microRNA;has-miR-95 在 6 个组别中作为下调表达的 microRNA;has-miR-449a 在 5 个组别中作为上调表达的 microRNA;has-miR-486-5p 在 6 个组别作为上调表达的 microRNA;has-miR-503 在 8 个组别中作为下调表达的 microRNA;这 8 个 microRNAs 具有显著差异性表达,所以特异性很高。

在高通量测序得到的 8 个特异性高的 microRNAs 中,发现在每组中,microRNA 的 fold change-

表 1　每组中差异性表达 microRNAs 的数量

Table 1　The number of different expression microRNAs in each group

组别	差异表达 microRNA 的数量	上调数量	下调数量
IMN1-NC1 组	422	43	379
IMN2-NC2 组	355	64	291
IMN3-NC3 组	362	68	294
IMN4-NC4 组	351	57	294
IMN5-NC5 组	351	66	285
IMN6-NC6 组	329	40	289
IMN7-NC7 组	329	40	289
IMN8-NC8 组	319	48	271
IMN9-NC9 组	319	48	271
IMN10-NC10 组	337	37	300



图中红色区域代表上调表达 microRNA 聚集一起,绿色区域代表下调表达 microRNA 也聚集一起。

图 1　差异性表达 microRNAs 的聚类分析图

Figure 1　Heat map cluster analysis of differently expressed microRNAs

表 2 microRNAs 差异性表达

Table 2 Differently expressed microRNAs

miRNA 名称	NC 组	IMN 组	倍数(log_2IMN/NC)	*P* 值	上调或下调
IMN1-NC1 组					
has-miR-208b	0.01	4.86	8.93	<0.001	上调
has-miR-195-3p	0.01	2.25	7.81	<0.001	上调
has-miR-100-3p	0.01	1.98	7.63	<0.001	上调
has-miR-5683	0.01	1.53	7.26	<0.001	上调
has-miR-1269a	0.01	1.08	6.76	<0.001	上调
has-miR-217	73.60	0.01	−12.85	<0.001	下调
has-miR-23b-5p	142.78	0.01	−13.80	<0.001	下调
has-miR-95	258.85	0.01	−14.66	<0.001	下调
has-miR-503	367.04	0.01	−15.16	<0.001	下调
has-miR-122-5p	921.74	0.01	−16.49	<0.001	下调
IMN2-NC2 组					
has-miR-208b	0.01	4.86	8.93	<0.001	上调
has-miR-449a	0.01	4.14	8.69	<0.001	上调
has-miR-19a-3p	0.17	51.31	8.24	<0.001	上调
has-miR-195-3p	0.01	2.25	7.81	<0.001	上调
has-miR-449c-5p	0.01	1.98	7.63	<0.001	上调
has-miR-217	33.99	0.01	−11.73	<0.001	下调
has-miR-503	36.79	0.01	−11.85	<0.001	下调
has-miR-1291	38.15	0.01	−11.90	<0.001	下调
has-miR-216b	65.02	0.01	−12.67	<0.001	下调
has-miR-23b-5p	78.50	0.01	−12.94	<0.001	下调
IMN3-NC3 组					
has-miR-1468	0.01	9.09	9.83	<0.001	上调
has-miR-136-3p	0.01	6.12	9.26	<0.001	上调
has-miR-449a	0.01	4.14	8.69	<0.001	上调
has-miR-195-3p	0.01	2.25	7.81	<0.001	上调
has-miR-486-5p	64.24	13 344.79	7.70	<0.001	上调
has-miR-215	4 028.37	1.71	−11.20	<0.001	下调
has-miR-503	31.16	0.01	−11.61	<0.001	下调
has-miR-23b-5p	57.30	0.01	−12.48	<0.001	下调
has-miR-217	125.37	0.01	−13.61	<0.001	下调
has-miR-320c	216.04	0.01	−14.40	<0.001	下调
IMN4-NC4 组					
has-miR-208b	0.01	4.86	8.93	<0.001	上调
has-miR-195-3p	0.01	2.25	7.81	<0.001	上调
has-miR-449c-5p	0.01	1.98	7.63	<0.001	上调
has-miR-5683	0.01	1.53	7.26	<0.001	上调
has-miR-19a-3p	0.37	51.31	7.10	<0.001	上调
has-miR-503	32.30	0.01	−11.66	<0.001	下调
has-miR-23b-5p	40.21	0.01	−11.97	<0.001	下调
has-miR-4508	41.10	0.01	−12.01	<0.001	下调
has-miR-4286	49.08	0.01	−12.26	<0.001	下调
has-miR-217	52.96	0.01	−12.37	<0.001	下调
IMN5-NC5 组					
has-miR-381	0.01	8.19	9.68	<0.001	上调
has-miR-509-3p	0.09	40.96	8.78	<0.001	上调
has-miR-449a	0.01	4.14	8.69	<0.001	上调
has-miR-19a-3p	0.19	51.31	8.10	<0.001	上调

续表 2　microRNAs 差异性表达

Table 2　(Continued) Differently expressed microRNAs

miRNA 名称	NC 组	IMN 组	倍数(log_2IMN/NC)	*P* 值	上调或下调
has-miR-195-3p	0.01	2.25	7.81	<0.001	上调
has-miR-1291	50.13	0.01	−12.29	<0.001	下调
has-miR-193a-5p	54.05	0.01	−12.40	<0.001	下调
has-miR-483-5p	166.06	0.01	−14.02	<0.001	下调
has-miR-129-2-3p	204.70	0.01	−14.32	<0.001	下调
has-miR-23b-5p	267.71	0.01	−14.71	<0.001	下调
IMN6-NC6 组					
has-miR-486-5p	26.56	13 344.79	8.97	<0.001	上调
has-miR-208b	0.01	4.86	8.93	<0.001	上调
has-miR-133a	0.69	306.05	8.80	<0.001	上调
has-miR-449a	0.01	4.14	8.69	<0.001	上调
has-miR-195-3p	0.01	2.25	7.81	<0.001	上调
has-miR-671-5p	22.19	0.01	−11.12	<0.001	下调
has-miR-95	30.00	0.01	−11.55	<0.001	下调
has-miR-216b	38.12	0.01	−11.90	<0.001	下调
has-miR-216a	66.68	0.01	−12.70	<0.001	下调
has-miR-217	191.86	0.01	−14.23	<0.001	下调
IMN7-NC7 组					
has-miR-486-5p	26.13	13 344.79	9.00	<0.001	上调
has-miR-208b	0.01	4.86	8.93	<0.001	上调
has-miR-449a	0.01	4.14	8.69	<0.001	上调
has-miR-133a	0.81	306.05	8.56	<0.001	上调
has-miR-195-3p	0.01	2.25	7.81	<0.001	上调
has-miR-503	26.94	0.01	−11.40	<0.001	下调
has-miR-95	30.69	0.01	−11.58	<0.001	下调
has-miR-216b	34.75	0.01	−11.76	<0.001	下调
has-miR-216a	38.56	0.01	−11.91	<0.001	下调
has-miR-217	64.38	0.01	−12.65	<0.001	下调
IMN8-NC8 组					
has-miR-1468	0.01	9.09	9.83	<0.001	上调
has-miR-486-5p	26.05	13 344.79	9.00	<0.001	上调
has-miR-208b	0.01	4.86	8.93	<0.001	上调
has-miR-133a	0.84	306.05	8.51	<0.001	上调
has-miR-195-3p	0.01	2.25	7.81	<0.001	上调
has-miR-514a-5p	9.95	0.01	− 9.96	<0.001	下调
has-miR-503	13.57	0.01	−10.41	<0.001	下调
has-miR-3653	14.09	0.01	−10.46	<0.001	下调
has-miR-95	19.46	0.01	−10.93	<0.001	下调
has-miR-1246	36.33	0.01	−11.83	<0.001	下调
IMN9-NC9 组					
has-miR-1468	0.01	9.09	9.83	<0.001	上调
has-miR-486-5p	26.05	13 344.79	9.00	<0.001	上调
has-miR-208b	0.01	4.86	8.93	<0.001	上调
has-miR-133a	0.84	306.05	8.51	<0.001	上调
has-miR-195-3p	0.01	2.25	7.81	<0.001	上调
has-miR-514a-5p	9.95	0.01	−9.96	<0.001	下调
has-miR-503	13.57	0.01	−10.41	<0.001	下调
has-miR-3653	14.09	0.01	−10.46	<0.001	下调
has-miR-95	19.46	0.01	−10.93	<0.001	下调

续表 2 microRNAs 差异性表达

Table 2 (Continued) Differently expressed microRNAs

miRNA 名称	NC 组	IMN 组	倍数(log_2IMN/NC)	*P* 值	上调或下调
has-miR-1246	36.33	0.01	−11.83	<0.001	下调
IMN10-NC10 组					
has-miR-486-5p	23.02	3 344.79	9.18	<0.001	上调
has-miR-133a	0.89	306.05	8.43	<0.001	上调
has-miR-195-3p	0.01	2.25	7.81	<0.001	上调
has-miR-449c-5p	0.01	1.98	7.63	<0.001	上调
has-miR-133b	0.14	9.99	6.20	<0.001	上调
has-miR-216b	13.69	0.01	−10.42	<0.001	下调
has-miR-95	19.55	0.01	−10.93	<0.001	下调
has-miR-216a	34.46	0.01	−11.75	<0.001	下调
has-miR-503	36.43	0.01	−11.83	<0.001	下调
has-miR-217	104.33	0.01	−13.35	<0.001	下调

log_2(IMN/NC)值基本相同。例如:has-miR-208 在每组值为 8.93;has-miR-195-3p 在每组值为 7.81;has-miR-217 在 IMN1-NC1、IMN2-NC2、IMN3-NC3、IMN4-NC4 的值分别为−12.85、−11.73、−13.61、−12.37,数值差别不大;has-miR-95 在 IMN1-NC1、IMN6-NC6、IMN7-NC7、IMN8-NC8 的值分别为−14.66、−11.55、−11.58、−10.93,数值差别也不大。以上组间数据的可比性反映了本实验结果的可靠性。

2.2 IMN 与 NC 组 microRNA 碱基编辑

IMN1~10 与 NC1~10 组中,发生了碱基编辑的 microRNAs 共有 62 个。其中 IMN1-NC1 比对中,有 48 个 microRNAs 的 Ratio(IMN/NC)>1,14 个 microRNAs 的 Ratio(IMN/NC)<1;IMN2-NC2 中,48 个>1,14 个<1;IMN3-NC3 中,53 个>1,9 个<1;IMN4-NC4 中,47 个>1,15 个<1;IMN5-NC5 中,49 个>1,13 个<1;IMN6-NC6 中,48 个>1,14 个<1;IMN7-NC7 中,49 个>1,13 个<1;IMN8-NC8 中,49 个>1,13 个<1;IMN9-NC9 中,51 个>1,11 个<1;IMN10-NC10 中,49 个>1,13 个<1。总的来说,IMN1~10 相比于 NC1~10,IMN 碱基编辑数所占的比例在每一条 microRNA 要大,表明了 IMN 组 microRNA 碱基更易于发生碱基编辑引起的碱基突变。

筛选了 microRNA 在 10 组 Ratio (IMN1~10/NC1~10)比值都>1 进行分析(表 3)。总共有 41 个 microRNAs 在每组中 Ratio(IMN1~10/NC1~10)>1。这 41 个 microRNAs 在 IMN 中更容易发生碱基编辑。如 has-miR-1466、has-miR-1、has-miR-30c-5p 与 has-miR-125b-5p 等,Ratio(IMN1~10/NC1~10)值较大,说明发生了大量的碱基编辑,这些发生了大量碱基编辑的 microRNAs 可能与 IMN 发病机制有关。

3 讨 论

高通量测序技术以单碱基测序成本与高产的数据量,为基因组学带来新的研究方法与解决方案,为生命科学研究提供前所未有的机遇[11]。本研究的技术是基于高通量测序,找出 IMN1~10 组与 NC1~10 组之间差异性表达的 microRNA,并分析 microRNA 碱基编辑引起的碱基突变。在高通量测序的基础上,得出数据的精确性与特异性。本研究发现了特异性高、最具有显著性差异性表达的 8 个 microRNAs。作为上调表达的 has-miRNA-208、has-miR-195-3P、has-miR-449a、has-miR-486-5p 的 fold change-log_2(IMN/NC) 绝对值都<10,而作为下调表达的 has-miR-217、has-miR-23b-5p、has-miR-95、has-miR-50 3 的 fold change-log_2(IMN/NC)绝对值都>10。所以本文猜测在差异性表达的 microRNA 中,IMN 相比于 NC,microRNA 过低表达。过低表达的 microRNA 可能与 IMN 发病机制有关。有趣的是,在 8 个特异性高的 microRNAs 中,发现作为上调表达的 has-miRNA-208、has-miR-195-3P、has-miR-449a、has-miR-486-5p 的 fold change-log_2(IMN/NC)在每组是相同的;而作为下调表达的 has-miR-217、has-miR-23b-5p、has-miR-95、has-miR-503 的fold change-log_2(IMN/NC)在每组是不同的,但是差异不大。这也许提示下调表达的 microRNA 才是真正深入研究 IMN 发病机制的有效靶点。许多研究表明 microRNA 的表达水平可以作为肾脏疾病潜在的靶点。microRNA-192 的表达下调与肾小球滤过率有关,常用于糖尿病肾病标志物[12]。microRNA-223 在狼疮性肾炎下调表达,可以作为诊断标志物[9]。microRNA-21 在肾小管与肾间质上调表达意味肾脏纤维化趋向性[13]。microRNA-29 家族

表 3　IMN1~10 与 NC1~10 组碱基编辑的 Ratio(IMN/NC)值

Table 3　The bases edit of the IMN1~10 and the NC1~10 groups

microRNA	IMN1/NC1	IMN2/NC2	IMN3/NC3	IMN4/NC4	IMN5/NC5	IMN6/NC6	IMN7/NC7	IMN8/NC8	IMN9/NC9	IMN10/NC10
has-miR-146b-5p	13.4	9.9	31.3	19.7	36.8	17.1	9.4	15.8	13.4	14.4
has-miR-1	14.1	5.1	52.6	10.7	2.6	53.2	9.6	32.5	10.6	12.0
has-miR-125b-5p	10.2	5.8	29.6	11.0	8.9	6.8	5.1	9.6	7.7	7.7
has-miR-23b-3p	6.3	3.6	8.0	5.9	7.9	5.6	4.7	10.1	9.2	7.7
has-miR-30c-5p	15.4	12.8	44.3	8.2	31.5	7.8	6.5	10.1	9.4	7.4
has-miR-143-3p	4.3	4.0	8.4	5.4	5.0	6.2	3.7	5.8	6.9	6.5
has-miR-24-3p	12.4	11.5	9.3	8.1	9.9	5.2	3.8	6.0	6.2	6.3
has-miR-26b-5p	4.5	4.5	9.7	5.2	5.4	9.4	4.8	15.9	8.1	5.9
has-miR-451a	2.7	2.4	6.8	2.3	5.3	7.0	3.5	23.3	9.0	5.5
has-miR-199b-3p	7.3	5.1	9.3	7.4	7.3	8.1	5.5	7.8	6.2	5.3
has-miR-23a-3p	6.0	2.2	15.4	3.1	5.6	3.2	2.4	6.2	5.0	5.2
has-miR-21-5p	6.3	3.8	12.5	6.9	6.9	4.9	4.3	6.2	5.3	4.8
has-miR-199a-3p	6.5	4.6	8.3	6.7	6.6	7.3	5.0	6.9	5.6	4.8
has-miR-195-5p	13.1	4.2	17.0	26.7	13.9	6.6	6.2	13.2	22.5	4.6
has-miR-140-3p	6.3	3.3	9.6	3.8	5.5	4.7	3.3	4.5	4.3	4.4
has-miR-28-3p	14.0	3.8	9.9	4.8	35.3	5.3	4.0	6.7	4.9	4.3
has-miR-29a-3p	1.9	3.2	34.6	1.9	6.9	4.1	4.8	6.9	6.4	4.3
has-miR-99b-5p	6.2	2.8	10.3	4.1	4.6	3.6	2.8	4.7	4.0	3.7
has-let-7i-5p	6.9	8.9	6.0	5.4	7.5	3.3	3.2	4.0	4.0	3.7
has-miR-26a-5p	4.5	3.1	5.9	4.3	5.4	4.3	3.1	5.4	4.8	3.6
has-miR-101-3p	5.3	3.0	7.9	4.4	4.7	3.9	2.7	3.7	3.6	3.4
has-miR-191-5p	5.4	2.8	6.0	4.5	4.9	3.3	2.8	4.9	4.6	2.8
has-miR-378c	17.6	3.6	4.2	7.3	3.0	3.4	2.6	6.9	3.5	2.8
has-let-7g-5p	2.7	1.0	4.6	2.0	2.2	2.8	2.3	2.5	2.6	2.7
has-miR-30a-3p	6.1	4.6	35.1	7.2	4.3	1.8	1.8	1.7	1.4	2.7
has-miR-378a-3p	5.7	2.6	5.3	4.6	3.1	3.2	2.8	3.3	3.1	2.6
has-miR-200b-3p	5.9	2.7	6.9	3.7	3.1	2.1	2.1	3.6	3.0	2.2
has-let-7b-5p	2.5	1.4	14.9	1.7	1.6	2.9	1.8	1.8	1.6	2.2
has-miR-145-5p	4.1	2.8	5.5	4.0	24.1	7.5	4.0	23.8	4.6	2.2
has-miR-22-3p	6.5	2.7	19.6	2.3	3.8	4.8	1.7	2.6	2.3	1.9
has-miR-424-5p	4.6	1.9	7.2	5.1	5.6	2.5	1.5	5.6	1.9	1.7
has-miR-10a-5p	1.3	1.3	1.5	1.3	1.3	1.3	1.8	2.5	2.1	1.4
has-miR-181d	1.2	1.2	1.4	1.8	1.4	1.0	1.2	1.8	1.8	1.3
has-miR-30d-5p	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.1	1.1
has-miR-4510	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
has-miR-422a	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
has-miR-378f	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
has-miR-378b	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
has-miR-23c	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
has-miR-378i	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
has-miR-378h	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

(microRNA-29a、microRNA-29b、microRNA-29c) 的下调表达降低了肾脏纤维化发生机率[14]。

本研究结果表明下调表达的差异性 microRNA 多,但是许多研究表明在各种疾病中,如肾脏疾病、心血管疾病、肿瘤疾病等, 上调表达的差异性 microRNA 要比下调的 microRNA 多。本文猜测这与膜性肾病的基底膜复合物沉积导致大量的内皮细胞、上皮细胞与足细胞凋亡有关。Ho 等[15]认为 miR-23b、miR-26a 与 miR-24 的大量丢失与肾小球和肾小管的损伤有关, 肾小球和肾小管在维持肾小球滤过率中起着重要作用。有趣的是,本研究发现 miR-24 与 miR-26a 是下调表达的。所以猜测,在 IMN 患者中,

肾小球基底膜的损伤导致 microRNA 的丢失，这就造成 microRNA 下调表达。如果本研究选择肾脏组织为实验标本,可能更能说明肾小球基底膜的病理改变与 microRNA 低表达的联系，这还有待于进一步研究。

本研究发现在 8 个特异性高的 microRNA 中,下调表达的 microRNA 相比于上调表达的 microRNA，fold change-log_2(IMN/NC)绝对值要大。且上调表达 microRNA 的倍比值在每组是相同的，而下调表达 microRNA 的倍比值在每组不同,略有差异。所以下调表达的 microRNA 在 IMN 的发病机制中起着重要作用。has-miR-217 的低表达与许多疾病有着密切关系，研究表明 has-miR-217 低表达与肾透明细胞癌有关，且 has-miR-217 的表达水平可以作为判断肾透明细胞癌患者存活时间的指标,表达水平越低,患者存活时间越短。同时研究表明 has-miR-217 的表达水平可以作为判断肿瘤恶性程度与分期指标,表达水平越低,肿瘤恶性程度越高[16]。本研究发现 has-miR-217 在 IMN 低表达,在下一步研究中将深入探讨 has-miR-217 的表达水平是否与 IMN 患者病情缓解或加重有关,以便用于判断临床病情变化。异常表达的 microRNA 常常引起免疫异常而造成疾病发生。其中公认的 microRNA 免疫靶点有 has-miRNA-146a、has-miRNA-146b 和 has-miRNA-95。它们在血液疾病、牙周疾病、肝脏疾病等中发挥重要作用[17]。本研究发现下调表达的 has-miRNA-95 在 IMN1-NC1 的 fold change-log_2（IMN/NC）达-14.66。由于 IMN 病因不太明确,多认为是免疫机制有关,所以 has-miRNA-95 可能在 IMN 的免疫机制中起着重要作用。has-miR-503 在本研究中作为下调表达的 microRNA，而许多研究也表明了 has-miR-503 下调在疾病发生中的作用。Caporali 等[18]则发现低表达的 has-miR-503 有益于糖尿病患者动脉内膜修复与功能恢复，所以 has-miR-503 可以作为下肢缺血治疗的有效监控靶点;Roy 等[19] 指出 has-miR-503 在 β-地中海贫血中下调;Zhou 等[20]发现低表达的 has-miR-503 调节着肝癌细胞的转移功能。虽然还没有相关前期研究发现低表达的 has-miR-503 与 IMN 等肾脏疾病有关，但是可以在下一步研究中对has-miR-503 作深入研究。

成熟 microRNA 序列的第 2~8 碱基被称为“种子”序列,保守型很高,若在这一区域发生碱基突变则可能改变 microRNA 的靶基因作用位点[21]。本研究结果发现,IMN1~10 相比于 NC1~10 每一组,IMN 碱基编辑所占的比例在每一个 microRNA 要大,说明 IMN 患者更易于发生碱基编辑而引起的碱基突变。本文猜测 IMN 病因与 microRNA 发生碱基突变有着密切关系,microRNA 的碱基突变改变了基因稳定性，易造成碱基对组成或排列顺序改变。虽然 microRNA 是非编码序列,不承担转录、翻译功能,但是在监管、控制转录组翻译与蛋白质表达方面发挥重要作用。

本研究是基于前期 microRNA 与肾脏疾病研究基础上并查阅大量相关文献前提上作出的新探索。由于条件限制，研究仍处于初步阶段，对 microRNA 在 IMN 病因机制中的作用仍需要深入探讨，以期望 microRNA 真正成为深入研究 IMN 发病机制的有意义靶点。

[参考文献]

[1] Ponticelli C,Passerini P. Can prognostic factors assist therapeutic decisions in idiopathic membranous nephropathy? [J]. J Nephrol,2010,23 (2):156-63

[2] Cybulsky AV,Quigg RJ,Salant DJ. Experimental membranous nephropathy redux [J]. Am J Physiol Renal Physiol,2005,289 (4):F660-671

[3] Couser WG. Membranous nephropathy:a long road but well traveled [J]. J Am Soc Nephrol,2005,16 (5):1184-1187

[4] Ponticelli C. Membranous nephropathy [J]. J Nephrol, 2007,20(3):268-87

[5] Fervenza FC,Sethi S,Specks U. Idiopathic membranous nephropathy:diagnosis and treatment [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2008,3(3):905-919

[6] Bartel DP. MicroRNAs:genomics,biogenesis,mechanism, and function[J]. Cell,2004,116 (2):281-297

[7] Lundstrom K. Micro-RNA in disease and gene therapy [J]. Curr Drug Discov Technol,2011,8(2):76-86

[8] Chung AC,Yu X,Lan HY. MicroRNA and nephropathy: emerging concepts [J]. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2013,6(1):169-179

[9] Dai Y,Sui W,Lan H,et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients[J]. Rheumatol Int,2009,29 (7):749-754

[10] Audic S,Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles[J]. Genome Res,1997,7 (10):986-995

[11] Koboldt DC,Steinberg KM,Larson DE,et al. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics[J]. Cell,2013,26,155 (1):27-38

[12] Putta S,Lanting L,Sun G,et al. Inhibiting microRNA-192

(下转第 1541 页)