

• 论 著 •

2 型糖尿病肾病患者尿液外泌体中 miRNA 的表达谱分析研究

罗 艳, 胡桂英

(武汉市普仁医院贵宾区 430081)

摘要:目的 研究 2 型糖尿病肾病(DN)患者尿液外泌体中 miRNA 的表达谱。方法 采用 miRNA 芯片技术,分别检测 8 例健康受试者(对照组)、8 例 2 型糖尿病(T2D)患者(T2D 组)、8 例 2 型 DN 患者(DN 组)的尿液来分析期内外泌体的 miRNA 的表达谱。并用实时定量荧光 PCR 进行验证;挑选表达差异最大的 miRNA 与微量蛋白尿进行相关分析。结果 DN 组与对照组、T2D 患者比较,存在 16 个 miRNA 表达异常(大于 2 倍),其中 14 个 miRNA(miR-320c、miR-6068、miR-1234-5p、miR-6133、miR-4270、miR-4739、miR-371b-5p、miR-638、miR-572、miR-1227-5p、miR-6126、miR-1915-5p、miR-4778-5P 和 miR-2861)表达上调,而 2 个 miRNA(miR-30d-5p 和 miR-30e-5p)表达下调。miRNA miR-320c 和 miR-6068 在 DN 组尿液外泌体中表达最多。尿液外泌体 miR-320c 表达上调与肾小球滤过率预计值的增加呈负相关(筛选序列: $R^2 = 0.23, P = 0.11$;确认序列: $R^2 = 0.61, P = 0.004$)。DN 组尿液外泌体 miR-320c 的水平与肾小球滤过率预计值在筛选队列和确认队列中都没有显著相关性(筛选队列: $R^2 = 0.08, P = 0.55$;确认队列: $R^2 = 0.01, P = 0.87$),但与尿清蛋白肌酐比值成显著正相关(R^2 筛选队列: $R^2 = 0.69, P = 0.02$;确认队列: $R^2 = 0.94, P = 0.005$)。结论 DN 组与 T2D 组尿液外泌体中 miRNA 水平有差异,表达异常的 miR-320c 可能通过靶蛋白血小板反应蛋白 1(TSP-1)对转化生长因子(TGF)- β 信号转导通路产生影响,miR-320c 有望作为 DN 的一种新候选标志物,用于在今后研究中评估疾病进展。

关键词: 2 型糖尿病; 糖尿病肾病; 外泌体; 基因芯片

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.09.025 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)09-1271-04

Analysis on miRNA expression profile of urine in patients with type 2 diabetic nephropathy

LUO Yan, HU Guiying

(Puren Hospital of Wuhan City, Wuhan, Hubei 430081, China)

Abstract: Objective To study the miRNA expression profile in urine external secrete body of the patients with type 2 diabetic nephropathy(T2DN). **Methods** The miRNA chip technology was used to analyze the miRNA expression profile in urine external secrete body of 8 healthy subjects(control group), 8 patients with type 2 diabetes(T2D group), 8 cases of type 2 diabetic nephropathy(DN group). The validation was conducted by real time fluorescence quantitative PCR; miRNA with maximal expression difference and microalbuminuria were selected for conducting the correlation analysis. **Results** Comparing the DN group with control group and T2D group, 16 abnormal miRNA expression (greater than 2 times), in which 14 miRNA(miR-320c, miR-6068, miR-1234-5p, miR-6133, miR-4270, miR-4739, miR-371-b-5p, miR - 638, miR-572, miR-1227-5p, miR-6126, miR-1915-5p, miR-4778-5p and miR-2861) expression was up-regulated, while the two miRNA(miR-30d-5p and miR-30e-5p) expression was down-regulated. miRNA miR-320-c and miR-6068 had maximal expression in urine external secrete body of the DN group. The urine external secrete body miR-320c expression up-regulation was negatively correlated with the increase of glomerular filtration rate(GFR) predicted value(screening sequence: $R^2 = 0.23, P = 0.11$; confirm sequence: $R^2 = 0.61, P = 0.004$). The urine external secrete body miR-320c level had no significant correlation with and the GFR predicted value in the screening queue and confirm queue(screening queue: $R^2 = 0.08, P = 0.55$; confirm queue: $R^2 = 0.01, P = 0.87$), but had significant positive correlation with the increase of urinary albumin creatinine ratio(screening queue: $R^2 = 0.69, P = 0.02$; confirm queue: $R^2 = 0.94, P = 0.005$). **Conclusion** The miRNA level in the urine external secrete body has difference between the DN group and T2D group, abnormal expression of miR-320c may affect the TGF-beta signal transduction pathways through the target protein platelet reaction protein 1(TSP-1), so miR-320c is expected to serve as a new type candidate marker of DN, which may be used for the assessment of disease progression in future research.

Key words: type 2 diabetes; diabetic nephropathy; external secrete body; gene chip

糖尿病肾病(DN)是慢性肾脏病最常见形式,是 2 型糖尿病(T2D)可导致的一个主要并发症,最终可导致终末期肾脏疾病(ESRD)^[1]。蛋白尿是广泛用于 DN 的生物标志物。然而,将其在慢性肾脏病中临床相关性作为替代终点是有争议的^[2]。研究表明,微量清蛋白尿是一个不太精确的预测 DN 风险的指标^[3]。miRNAs 是小的非编码 RNA 分子,长度为 18~22 个核苷酸,其通过干扰蛋白质合成、诱导 mRNA 的降解或抑制蛋白

质翻译来调节细胞的生长、分化、凋亡和增殖^[4-5]。miR-192、miR-194、miR-204、miR-215 和 miR-216 在肾脏中的表达比其他组织器官高^[6-7]。

DN 患者中,细胞游离 miRNA 可能反映患者不同的病理生理特征^[8-9]。研究表明,1 型糖尿病患者尿液中细胞游离 miRNA 的变化与清蛋白尿、肾病不同阶段具有相关性^[10],尿液中微量清蛋白尿与低水平 miR-323b-5p、高水平 miR-429 有

关。miRNAs 识别标志的确定具有预测 1 型糖尿病患者微量清蛋白尿发展的潜力^[11]。外泌体是至今为止研究最为透彻的一种细胞外囊泡^[12]。外泌体携带的物质中包括 miRNAs, 非常稳定, 且这些 miRNAs 可作为肾脏疾病潜在的新非侵入性生物标志物。此外, 尿液外泌体中 miR-29c 水平被证明可作为预测狼疮性肾炎早期纤维化的指标^[13-17]。

本研究旨在找出 DN 患者与 T2D 患者、健康受试者尿液外泌体中 miRNA 表达谱的差异。尿液外泌体中不同 miRNAs 表达的异常与微量清蛋白尿程度相关, 有望作为一种新的疾病标志物, 用以评估疾病早期治疗效果和/或早期疾病进展。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究经过本院伦理委员会审核批准通过后实施, 所有患者均签署知情同意书。纳入 2014—2015 年于本院住院患者或门诊体检的健康受试者。本研究中, 健康受试者标准为: 无糖尿病且肾小球滤过率预计值(eGFR) > 90, 且之前无 eGFR 记录。糖尿病且无肾病患者诊断标准为: 历史 eGFR > 90。DN 患者诊断标准为: 历史 eGFR < 60。历史 eGFR 是基于每个研究个体尿液收集日期之前的医疗记录信息。纳入人群的临床和实验室特点, 见表 1, 包括 8 例健康受试者(对照组)、8 例 T2D 患者(T2D 组)、8 例 2 型 DN 患者(DN 组)。8 例 2 型 DN 患者中有 5 例患者伴有微量清蛋白尿[尿清蛋白肌酐比值(ACR)为 30~300 mg/g], 有 3 例患者尿清蛋白正常(ACR < 30 mg/g), 所有人群均留取尿液标本。

表 1 筛选队列中对照组、T2D 组和 DN 组人群的临床特征

组别	n	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	女/男 (n/n)	历史 eGFR [mL/(min · 1.73 m ²), $\bar{x} \pm s$]	ACR (mg/g, $\bar{x} \pm s$)
对照组	8	30.9 ± 7.9	4/4	—	0.69 ± 0.23
T2D	8	56.2 ± 15	3/5	101.25 ± 7.45	1.11 ± 0.32
DN	8	67.1 ± 7.8	4/4	35.25 ± 2.65*	93.52 ± 37.72*

注: —表示无数据; 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

1.2 方法

1.2.1 尿液外泌体中 miRNAs 的分离 取 3 mL 的尿液用以分离外泌体, 使用外泌体沉淀试剂 exoquick-TC(System Biosciences; Mountain View, CA)。笔者采用改良的外泌体沉淀试验方法^[18]。尿液标本 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液加入 1/3 体积的 exoquick TC(System Biosciences)。样品放入 4 °C 冰箱经过一夜沉淀, 然后将样品在室温下 10 000 r/min 离心 30 min, 由此产生的外泌体沉淀在室温用 200 μL 外泌体缓冲液重新悬浮, 随后用 150 μL 裂解缓冲液裂解外泌体 5 min。根据制造商说明书, 使用 seramir 外泌体 RNA 扩增试剂盒(System Biosciences)分离外泌体中的 miRNAs。使用外泌体 RNeasy 血清/血浆分离抽提试剂盒(Qiagen, Hilden)分离独立的确认队列人群尿液中外泌体 miRNAs。在安捷伦 2100 生物分析仪上进行质量控制, 利用 RNA 6000Nano 试剂盒, 根据说明书记录的试验方法, 使用 Quant-IT miRNA 分析试剂盒(Life Technologies)检测 miRNA 水平。

1.2.2 miRNAs 芯片分析 采用高分辨率芯片扫描仪 GS2505_C(安捷伦科技, 德国)分析标本, 采用自定义内容的安捷伦芯片(包含 Sanger miR Base 19 的所有 microRNAs)^[19]。每个玻璃片由 8 个高清 60K 阵列组成(每个阵列都有 60 000 个功能)。除每个 miRNAs 的 20 个复制外, 每个阵列还携带控

制探头, 用以进行网格的对齐、标记及插入对照组杂交。采用含菁 3-胞嘧啶磷酸二氢钠(PCP)的杂交试剂盒进行标记, 杂交时间为 20 h, 55 °C、20 r/min。结果采用安捷伦特色性提取分析软件(10.7.3.1)分析。为使具有差异表达的 miRNAs 可视化, 笔者生成了一个热图, 其中每个值都对根据对照组的平均表达值进行标准化(Spotfire, TIBCO)。采用使用 miRWalk 数据库来对每个具有表达差异 miRNAs 靶基因及其相关通路进行预测。通过独特路径分析(QIAGEN)研究生物途径的潜在影响。

1.2.3 实时定量荧光聚合酶链式反应(qRT-PCR) miRNA 逆转录采用 TaqMan miRNAs 逆转录试剂盒, TaqMan miRNAs 试验用于检测特定的 miR-320c, miR-6078, miR-6076 和 miR-197-5p。根据操作说明书的试验方法, 笔者采用 TaqMan 基因表达混合体系进行 PCR 反应。所有样品复制后运行, 初始 Ct 值分别用 SDS 软件(v. 2.4)计算。根据 NormFinder 软件, miR-197-5p 被确定为合适的标准化候选 miRNAs。miRNAs 表达的倍数变化采用比较 Ct 值的方法计算($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。

1.3 统计学处理 试验统计分析采用 SPSS17.0 软件进行处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料以百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 型 DN 组尿液外泌体中差异表达的 miRNA 主要成分分析结果显示, 对照组和 T2D 组的 miRNAs 表达谱比较相似, 表明个体间变异较低。DN 组中发现 1 例异常患者, 遂以 7 例标本进行下一步分析。笔者共检测尿液外泌体中 309 个 miRNAs。其中对照组和 T2D 组与 DN 组 2、3、4、5、6 号标本结果不同。T2D 组与对照组比较, 尿中外泌体 miRNAs 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。DN 组与 T2D 组、对照组比较, 有 14 种尿液外泌体 miRNAs 表达上调 2 倍以上, 有 2 种 miRNA 表达下调 2 倍以上。

2.2 T2D 患者尿液外泌体 miRNA 的 qRT-PCR 验证 DN 组尿液外泌体表达上调的 miRNAs 中, miR-320c 和 miR-6068 是上调表达最强的 miRNAs, 笔者将上述 2 个 miRNA 筛选出来, 并在所有受试者中通过 qRT-PCR 进行结果验证。miR-6076 作为阴性对照, 其表达水平在所有受试者中恒定不变, 与 qRT-PCR 分析结果相一致, 说明尿液外泌体 miR-320c 和 miR-6068 表达水平在 DN 组中显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 miR-6076 表达没有影响。

2.3 miR-320c 表达上调与微量清蛋白尿的关系 相关分析显示, 尿液外泌体 miR-320c 的表达上调与 eGFR 的增加呈负相关(筛选序列: $R^2 = 0.23, P = 0.11$; 确认序列: $R^2 = 0.61, P = 0.004$)。DN 组尿液外泌体 miR-320c 水平与 eGFR 在筛选队列和确认队列中无显著相关性(筛选队列: $R^2 = 0.08, P = 0.55$; 确认队列: $R^2 = 0.01, P = 0.87$); 但其与尿 ACR 成正相关(R^2 筛选队列: $R^2 = 0.69, P = 0.02$; 确认队列: $R^2 = 0.94, P = 0.005$)。在 7 例 DN 组中, 其中 3 例为尿清蛋白正常, 4 例为微量清蛋白尿。在伴有微量蛋白尿的患者中, miR-320c 表达上调, 而在清蛋白尿正常患者中其表达不受影响。此外, 4 例合并微量蛋白尿的患者(DN 组 2、3、56 号)也通过主要成分分析确定其最具差异的表达, 确认队列中 DN 组 5 号为微量清蛋白尿。

3 讨 论

本研究证实 2 型 DN 患者尿液外泌体 miRNAs 表达谱的变化,发现差异 miRNAs 标识:14 个 miRNAs 表达上调 2 倍以上,而 2 个 miRNAs 下调 2 倍以上。本研究分析发现,尿液外泌体 miRNAs 的异常表达发生于微清蛋白尿患者和正常蛋白尿的患者。笔者在确认队列(所有患者都伴微量清蛋白尿)中进一步研究证实了这一发现。研究表明,糖尿病伴有早期 DN 及尿微量清蛋白的患者,其尿液外泌体 miRNAs 会产生变化:miR-145 和 miR-130a 上调,miR-155 和 miR-424 下调,这些 miRNA 对转化生长因子(TGF)- β 信号通路产生影响^[20-21]。笔者的研究结果并没有揭示这些 miRNA 的异常。

笔者鉴定的大多数尿液外泌体 miRNAs 被认为是在肾脏疾病中下调的。微小病变肾病(MCD)患者血浆标本中 miR-1234-5p 和 miR-371-5p 表达上调,MCD 患者尿液表达 miR-1915-5p 上调。miR-1915-5p 通过肾干细胞标志物如 CD133 和 PAX2 的调节参与成人肾祖细胞(ARPCs)的调节。此外,TLR2 作为急性肾小管细胞损伤的一个重要标志物,可以被 miR-1915-5p 调节,其通过驱使 ARPCs 细胞分泌抑制素-A、核心蛋白聚糖和细胞周期蛋白 D1 来修复受损的肾小管上皮细胞^[22]。表达上调的 miR-1915-5p 会抑制重要的肾脏修复机制。肾损伤的另一重要方面是 Smad2 依赖性 miR-30 的下调,其为 TGF- β 诱导的肾小球硬化足细胞凋亡的必须过程。此外,由糖皮质激素治疗足细胞病可以防止 miR-30 表达下调。在早起肾细胞癌(RCC)中 miR-572 的表达上调,所以 miR-572 可以部分作为一个潜在的诊断 RCC 的工具^[23]。

最近,某些研究探讨 DN 患者尿液外泌体中表达的 miRNAs 可以作为潜在疾病进展的生物标志物。肾脏纤维化是各种慢性肾脏疾病的标志,TGF- β 是肾脏纤维化的重要媒介。上调肾小球系膜 TGF- β 诱导 miR-192 的表达,会导致肾脏纤维化增加。1 型 DN 患者尿液中没有游离的 miRNAs 表达,且在早期 DN 患者中也没有尿液外泌体 miRNAs 表达,这提示 miR-192 表达上调。与上述在尿液中游离的 miRNAs 的发现相反,笔者对尿液外泌体的分析显示,未检测到 miR-192 水平,这与“外泌体主要携带 miRNAs 并运送到远处目标细胞”的观念相一致。相反,miR-29 家族和 miR-200 家族成员都由 TGF- β 负调控,其作用分别为抑制上皮细胞向间质细胞转化防止肾纤维化和防止细胞外基质沉积^[24-25]。此外,在慢性肾脏病患者和狼疮性肾炎患者中,尿液外泌体 miR-29 水表达明显显著下调。在小鼠糖尿病肾脏中 DPP-4 的诱导与 miR-29 家族成员的抑制表达有关联。而采用 DPP-4 抑制剂 linagliptin 处理会导致 miR-29 的水平恢复和 DPP-4 相关蛋白水平的抑制。笔者研究显示,在 T2D 组中尿液外泌体中 miR-29 和 miR-200 的水平受到抑制,这种影响在 T2D 患者中更为显著,但差异并不显著(数据未显示),因此,其不包括在笔者研究队列中。

本研究中,DN 患者都接受标准护理药物治疗,如血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素受体阻滞剂(ARBs)。总体而言,ACEI 和 ARBs 对 miRNAs 表达的影响会根据各种心血管疾病而有所不同,如冠心病(CAD)使用 ACEI 和他汀类药物联合治疗,可降低冠心病患者外周血单个核细胞中 miR-146a/b 的水平^[26]。用 ACEI 抑制剂处理可以导致肾组织中 miR-324-3p 表达下调。在大鼠自发性进展性肾病肾脏组织活检中,miR-324-3p 是上调表达最强的 miRNA^[27]。脯氨酸内肽

酶是参与血管紧张素代谢的丝氨酸蛋白酶,也是 miR-324-3p 的靶蛋白,其表达非常低。笔者数据显示,尿液外泌体 miR-324-3p 表达没有显著变化。用 ACEI/ARBs 治疗会导致 DN 肾脏 miR-21 上调的表达水平降低。笔者数据显示,在 DN 患者中 miR-21 水平上调 1.8 倍($P=0.3$)。到目前为止,关于 ACEI/ARB 对尿液外泌体中 miRNAs 表达的影响仍无可用的数据。

笔者研究发现,2 型 DN 患者尿液外泌体中 miR-320c 上调表达强烈。let-7d、miR-203 和 miR-320c 在其他 2 个 miRNAs 表达谱平台中被确定为大鼠药物诱导肾小管上皮细胞损伤的新尿液标志物^[28]。miR-320c 可通过靶蛋白 ADAMTS5 调节人体软骨的代谢,ADAMTS5 是一种高效的聚集蛋白聚糖酶,可诱导软骨退变。此外,miR-320c 参与人骨髓间充质干细胞成脂分化的调节并可通过靶蛋白 CDK6 抑制膀胱癌等肿瘤的行为^[29]。miRWalk 数据库和独特路径分析(IPA)显示,血小板反应蛋白(TSP)-1、TSP-4 和骨形态发生蛋白 6(BMP6)作为预测的靶蛋白,均参与 TGF- β 信号通路的调节。BMP6 能够改善 TGF- β 诱导 HK-2 细胞的变化。因此,表达上调的 miR-320c 可诱导 BMP6 表达下调并可加重肾脏纤维化。TSP-1 是肾脏纤维化疾病中 TGF- β 的一个主要激活因子,其 1 型和 2 型 DN 患者肾小球中不断增加,这与 TGF- β 的活动有关。在 DN 的小鼠模型中,研究表明阻断 TSP-1 依赖的 TGF- β 活性会使得肾脏损伤减轻、尿清蛋白减少。笔者预测 TSP-1 是 miR-320c 的直接靶蛋白,其可能对 TGF- β 通路具有负性影响,可作为上调的 TGF- β 信号通路代偿结果。TSP-4 是组织重塑的重要调节因子,通过调节胶原的合成来调节组织重塑。TSP-4 的缺乏可显著促进心肌纤维化的发生。miR-320c 可诱导 TSP-4 表达抑制,进而促进肾脏纤维化进程加快。有研究表明,在 T2D 大鼠模型中,心肌细胞介导的抗血管生成作用可通过外泌体(含有 miR-320)转运到内皮细胞中可,被转运入含有 miR-320 外泌体的内皮细胞抗血管生成的相关靶基因表达下调,血管生成相关基因(IGF-1, HSP20 和 Ets2)下调^[30-31]。

因此,低 eGFR、大量蛋白尿患者和微量清蛋白尿患者在更大 eGFR 范围内与 miR-320c 水平的梯度相关,在正常清蛋白尿、微量清蛋白尿、大量清蛋白尿范围的尿 ACR 将进一步支持这一结果。本研究提供了 2 型 DN 患者尿液外泌体差异 miRNAs 的表达谱。这些新的、非侵入性标志物对于肾脏病理生理学的机制研究有一定的前景。但本研究还需要进一步扩大横断面样本数来确认以上结果。另 1 个混杂因素可能是患者的药物治疗,因为患者采用二甲双胍、ACEI、ARBs 和其他抗高血压药物进行治疗。

参考文献

- [1] Chan G, Tang SC. Current practices in the management of diabetic nephropathy[J]. J R Coll Physicians Edinb, 2013, 43(4):330-332.
- [2] Weir MR, Bakris GL. Editorial perspective. Should microalbuminuria ever be considered as a renal endpoint in any clinical trial[J]. Am J Nephrol, 2010, 31(5):469-470.
- [3] Fried LF, Lewis J. Rebuttal of the Pro View: Albuminuria Is an Appropriate Therapeutic Target in Patients with CKD[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2015, 10(6):1095-

- 1098.
- [4] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels[J]. *Nature*, 2010, 466(7308):835-840.
- [5] Chung AC, Huang XR, Meng X, et al. miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(8):1317-1325.
- [6] Tian Z, Greene AS, Pietrusz JL, et al. MicroRNA-target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatic analysis [J]. *Genome Res*, 2008, 18(3):404-411.
- [7] Shi S, Yu L, Zhang T, et al. Smad2-dependent downregulation of miR-30 is required for TGF-beta-induced apoptosis in podocytes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e75572.
- [8] Lorenzen JM, Thum T. Circulating and urinary microRNAs in kidney disease[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012, 7(9):1528-1533.
- [9] Yang Y, Xiao L, Li J, et al. Urine miRNAs; potential biomarkers for monitoring progression of early stages of diabetic nephropathy[J]. *Med Hypotheses*, 2013, 81(2):274-278.
- [10] Argyropoulos C, Wang K, McClarty S, et al. Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54662.
- [11] Argyropoulos C, Wang K, Bernardo J, et al. Urinary MicroRNA Profiling Predicts the Development of Microalbuminuria in Patients with Type 1 Diabetes [J]. *J Clin Med*, 2015, 4(7):1498-1517.
- [12] Balkom BW, Pisitkun T, Verhaar MC, et al. Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases[J]. *Kidney Int*, 2011, 80(11):1138-1145.
- [13] Neal CS, Michael MZ, Pimlott LK, et al. Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(11):3794-3802.
- [14] AS EI, Mager I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles; biology and emerging therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5):347-357.
- [15] Erdbrugger U, Le TH. Extracellular Vesicles in Renal Diseases; More than Novel Biomarkers [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(1):12-26.
- [16] Ramezani A, Devaney JM, Cohen S, et al. Circulating and urinary microRNA profile in focal segmental glomerulosclerosis; a pilot study[J]. *Eur J Clin Invest*, 2015, 45(4):394-404.
- [17] Sole C, Cortes-Hernandez J, Felipe ML, et al. miR-29c in urinary exosomes as predictor of early renal fibrosis in lupus nephritis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30(9):1488-1496.
- [18] Alvarez ML. Isolation of urinary exosomes for RNA bio-marker discovery using a simple, fast, and highly scalable method[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1182:145-170.
- [19] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(D1):D68-D73.
- [20] Louafi F, Martinez-Nunez RT, Sanchez-Elsner T. MicroRNA-155 targets SMAD2 and modulates the response of macrophages to transforming growth factor-beta[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(53):41328-41336.
- [21] Rai D, Kim SW, Mckeller MR, et al. Targeting of SMAD5 links microRNA-155 to the TGF-beta pathway and lymphomagenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(7):3111-3116.
- [22] Sallustio F, Serino G, Costantino V, et al. miR-1915 and miR-1225-5p regulate the expression of CD133, PAX2 and TLR2 in adult renal progenitor cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e68296.
- [23] Wang C, Hu J, Lu M, et al. A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:7610.
- [24] Patel V, Noureddine L. MicroRNAs and fibrosis[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2012, 21(4):410-416.
- [25] Ramdas V, McBride M, Denby L, et al. Canonical transforming growth factor-beta signaling regulates disintegrin met metalloprotease expression in experimental renal fibrosis via miR-29[J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(6):1885-1896.
- [26] Lv LL, Cao YH, Ni HF, et al. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(8):F1220-1227.
- [27] Macconi D, Tomasoni S, Romagnani P, et al. MicroRNA-324-3p promotes renal fibrosis and is a target of ACE inhibition[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(9):1496-1505.
- [28] Nassirpour R, Mathur S, Gosink MM, et al. Identification of tubular injury microRNA biomarkers in urine; comparison of next-generation sequencing and qPCR-based profiling platforms[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1):485.
- [29] Hamam D, Ali D, Vishnubalaji R, et al. microRNA-320/RUNX2 axis regulates adipocytic differentiation of human mesenchymal (skeletal) stem cells[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(10):e1499.
- [30] Wang X, Huang W, Liu G, et al. Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 74(9):139-150.
- [31] Shantikumar S, Angelini GD, Emanuelli C. Diabetes, microRNAs and exosomes; Les liaisons dangereuses [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 74(9):196-198.