

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.22.024

联合检测 miR-518b、miR-15b 和 ACR 对妊娠期 高血压疾病肾功能损伤的诊断价值

李 虹

上海中医药大学附属第七人民医院妇产科, 上海 200137

摘要:目的 联合检测 miR-518b、miR-15b 和随机尿清蛋白与尿肌酐比值(ACR)对诊断妊娠期高血压疾病(HDP)肾功能损伤的价值。方法 选择 2018 年 1 月至 2019 年 12 月于该院就诊的 HDP 患者 108 例作为 HDP 组。选择同期在该院行妊娠体检的健康孕妇 75 例作为正常妊娠组,健康体检妇女 45 例作为健康对照组。采用实时荧光定量反转录 PCR 检测血清 miR-518b 和 miR-15b 水平。观察各组血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 水平;分析血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 水平与 HDP 患者严重程度及肾功能损伤的关系;分析这 3 项指标对诊断 HDP 肾功能损伤的效能及指标之间的相关性。结果 HDP 组血清 miR-518b 和 ACR 水平高于正常妊娠组和健康对照组($P < 0.01$),并且随着 HDP 严重程度的升高而升高;正常妊娠组血清 miR-518b 水平高于健康对照组($P < 0.01$)。肾功能损伤组的血清 miR-518b 和 ACR 水平明显高于肾功能正常组($P < 0.01$);而 HDP 患者血清 miR-15b 水平明显低于正常妊娠组和健康对照组($P < 0.01$),而正常妊娠组明显低于健康对照组($P < 0.01$),随着 HDP 严重程度的升高而降低,肾功能损伤组血清 miR-15b 水平明显低于肾功能正常组。血清 miR-518b($r = -0.652, P < 0.05$)和 ACR($r = -0.715, P < 0.05$)水平与血清 miR-15b 水平呈负相关,而血清 miR-518b 与 ACR 水平呈正相关($r = 0.812, P < 0.05$)。血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 水平在诊断 HDP 合并肾功能损伤中具有较高的效能,联合检测(miR-518b+miR-15b+ACR)的灵敏度为 90.5%,特异度为 85.1%,其曲线下面积为 0.940,明显高于 miR-518b、miR-15b 和 ACR($Z = 1.972, 2.624, 2.652, P < 0.05$),而 miR-518b、miR-15b 和 ACR 指标之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 水平是 HDP 肾功能损伤的敏感指标,三个指标联合检测能够提高对 HDP 患者肾功能损伤的诊断效能。

关键词:微小 RNA; 妊娠期高血压疾病; 肾损伤; 受试者曲线; 定量 PCR

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)22-3308-04

The value of combined detection of miR-518b, miR-15b and ACR in the diagnosis of renal function impairment in hypertensive disorders of pregnancy

LI Hong

Department of Obstetrics and Gynecology, the Seventh People's Hospital,
Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200137, China

Abstract: Objective To investigate the clinical value of combined detection of miR-518b, miR-15b and random urine albumin to urine creatinine ratio (ACR) in predicting renal function impairment in hypertensive disorders of pregnancy (HDP). **Methods** A total of 108 HDP patients treated in the hospital from January 2018 to December 2019 were enrolled as the HDP group, while 75 healthy pregnant women and 45 healthy women who underwent physical examinations in the hospital during the same period were enrolled as the normal pregnancy group and healthy control group. Quantitative RT-PCR was used to detect the expression of miR-518b and miR-15b. The serum miR-518b, miR-15b and ACR levels were observed in each group, and the relationship among the serum miR-518b, miR-15b and ACR levels, the severity of HDP patients and renal damage was also observed, and the predictive efficacy of HDP renal function damage and the correlation among the indicators were also observed. **Results** The levels of serum miR-518b and ACR in HDP group were significantly higher than those in normal pregnancy group and healthy control group ($P < 0.01$), and the levels of those in HDP group increased as the severity of HDP increased. The levels of those in normal pregnancy group were significantly higher than those in healthy control group ($P < 0.01$). The serum levels of those in renal impairment group were significantly higher than those in normal renal function group ($P < 0.01$); while the levels of serum miR-15b in HDP group were significantly lower than those in normal pregnancy group and healthy control group ($P < 0.01$), the levels of that in normal pregnancy group was significantly lower than that in healthy control group ($P < 0.01$), the levels of that decreased with the increase of the severity of HDP, and the miR-15b levels in renal impairment group was significantly lower compared with the normal re-

nal function group. The miR-518b and ACR levels were negatively correlated with miR-15b ($r = -0.652, -0.715, \text{all } P < 0.05$), while the miR-518b levels were positively correlated with ACR ($r = 0.812, P < 0.05$). Serum miR-518b, miR-15b, and ACR levels had a higher diagnostic efficacy in predicting the renal impairment in patients with HDP. The sensitivity of the combined detection (miR-518b + miR-15b + ACR) was 90.5%, the specificity was 85.1%, and AUC was 0.940 which was significantly higher than miR-518b, miR-15b and ACR ($Z = 1.972, 2.624, 2.652, \text{all } P < 0.05$), while there was no significant difference among miR-518b, miR-15b and ACR ($P > 0.05$). **Conclusion** The serum miR-518b, miR-15b and ACR levels are sensitive indicators of renal impairment in patients with HDP, and the detection of the three indicators can improve the predictive efficacy of renal impairment in patients with HDP.

Key words: microRNA; hypertensive disorders of pregnancy; renal impairment; subject curve; quantitative PCR

妊娠期高血压疾病(HDP)是妊娠期间发生的高血压,临床水肿和蛋白尿等是其临床表现,病情较重的患者可出现严重的并发症,尤其是肾脏的损伤。目前诊断肾功能损伤的主要指标是尿清蛋白和血肌酐,而早期肾功能损伤者往往血肌酐和尿素氮水平均在正常范围,尿蛋白常常为阴性。因此,寻找更为灵敏的肾损伤指标成为目前研究的热点。有研究表明,微小RNA(miRNA)参与了HDP的发生、发展过程,并且miR-518b和miR-15b参与了子痫前期的发生、发展过程,是子痫前期严重程度的预测指标^[1],但其是否能够用于诊断肾功能损伤鲜见报道。本研究对HDP患者血清miR-518b和miR-15b水平检测在诊断肾功能损伤中的价值进行了探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2018年1月至2019年12月在本院就诊的HDP患者108例作为HDP组,均符合HDP的诊断标准;根据病情的严重程度分为妊娠期高血压组(50例)、轻度子痫前期组(38例)和重度子痫前期组(20例)。根据KDIGO的标准^[2],采用CT对肾脏功能是否损伤进行诊断,将HDP患者分为肾功能损伤组(内生肌酐清除率 $< 80 \text{ mL/min}$, 21例)和肾功能正常组(87例);肾功能正常组年龄21~40岁、平均(28.34±6.82)岁,孕周21~37周、平均(30.75±3.85)周,体质量57.65~79.8 kg、平均(69.56±4.65)kg;肾功能损伤组年龄22~38岁、平均(28.83±7.19)岁,孕周22~38周、平均(31.09±3.18)周,体质量57.16~79.18 kg、平均(69.82±5.19)kg。选择同期于本院行妊娠体检的健康孕妇75例作为正常妊娠组,年龄20~38岁、平均(28.67±7.28)岁,孕周21~37周、平均(30.48±3.62)周,体质量58.64~78.61 kg、(68.92±5.16)kg。选择同期在本院行体检的健康妇女45例作为健康对照组,年龄21~39岁、平均(28.19±8.16)岁,体质量58.64~78.19 kg、平均(68.49±4.86)岁。纳入标准:妊娠妇女均为单胎和头位妊娠。排除标准:妊娠前有高血压和糖尿病者;妊娠前有肾脏疾病如肾小球肾炎、肾病综合征者;有恶性肿瘤者;有肝炎、结核和肺部感染等急、慢性感染者;有妊娠期其他合并症者。各组年龄和体质量等基线资料比较差异无统计学意

义($P > 0.05$),具有可比性。纳入研究者均知情同意,本研究经医院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 纳入研究者入院后抽取肘静脉血10 mL,留取小便中段尿液10 mL。血液标本以3 000 r/min离心15 min,抽取上清液放置在除酶管内,于-70℃冰箱保存。尿蛋白和尿肌酐采用西门子ADVIA 2400型全自动生化仪检测(免疫比浊法),使用配套试剂盒。

1.2.2 实时荧光定量反转录PCR(qRT-PCR) 总RNA提取:取受试者血清400 μL,采用TaqMan miRNA试剂盒提取血清总RNA,反转录引物由上海化生有限公司合成。miR-518b引物序列,上游:5'-CAA AGC GCT CCC C-3',下游:5'-GAG CAG GCT GGA GAA-3'; miR-15b引物序列,上游:5'-ACA CTC CAG CTG GGT TAG CAG CAC ATC AT-3',下游:5'-CAC AGC TCG TAG AAC AGG AGG-3'。U6引物序列,上游:5'-TGC GGG TGC TCG CTT CGG CAG CA-3',下游:5'-CCA CTG CAG GGT CCG AGG T-3'。取反转录酶1 μL、RNA 5 μL、引物3 μL,采用美国ABI公司TaqMan PreAmp Master Mix试剂盒进行扩增,20 μL反应体系,在荧光定量仪中进行,反应条件:95℃预变性为15 min,94℃变性15 s,55℃退火30 s,70℃延伸30 s,连续40个循环。每个样品检测3次,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达水平。

1.2.3 观察指标 观察各组血清miR-518b、miR-15b水平和随机尿清蛋白与尿肌酐比值(ACR)水平;分析血清miR-518b、miR-15b和ACR水平与HDP患者严重程度和肾损伤的关系,分析这3个指标用于HDP肾功能损伤诊断的效能及各指标之间的相关性。

1.3 统计学处理 采用SPSS15.0软件对数据进行分析;呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用方差分析,两组间的比较采用LSD-*t*检验;采用Logistic二元回归分析得出血清miR-518b和miR-15b联合变量,绘制出受试者工作特征(ROC)曲线评价其用于诊断HDP肾功能损伤的效能;计数资料采用率表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组间血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 水平的比较 HDP 组血清 miR-518b 和 ACR 水平均高于正常妊娠组和健康对照组 ($P < 0.01$), 正常妊娠组血清 miR-518b 水平高于健康对照组 ($P < 0.01$)。HDP 患者血清 miR-15b 水平低于正常妊娠组和健康对照组 ($P < 0.01$), 正常妊娠组低于健康对照组 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组间血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-518b	miR-15b	ACR
HDP 组	108	4.41 ± 1.26 ^{ab}	1.21 ± 0.72 ^{ab}	121.09 ± 44.13 ^{ab}
正常妊娠组	75	2.06 ± 0.95 ^a	3.16 ± 0.96 ^a	8.97 ± 2.16
健康对照组	45	0.98 ± 0.25	5.38 ± 1.15	5.92 ± 1.65
F		237.555	408.851	438.154
P		0.000	0.000	0.000

注:与健康对照组比较, ^a $P < 0.01$;与正常妊娠组比较, ^b $P < 0.01$ 。

2.2 各组间血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 水平与妊娠高血压严重程度的关系 重度子痫前期组血清 miR-518b 和 ACR 水平高于轻度子痫前期组和妊娠期高血压组 ($P < 0.01$), 轻度子痫前期组高于妊娠期高血压组 ($P < 0.01$); 重度子痫前期组血清 miR-15b 水平低于轻度子痫前期组和妊娠期高血压组 ($P < 0.01$), 而轻度子痫前期组低于妊娠期高血压组 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 水平与妊娠高血压严重程度的关系

组别	n	miR-518b	miR-15b	ACR
妊娠期高血压组	50	3.37 ± 0.62	1.85 ± 0.52	85.23 ± 22.92
轻度子痫前期组	38	5.10 ± 0.55 ^a	0.75 ± 0.25 ^a	147.49 ± 25.40 ^a
重度子痫前期组	20	5.69 ± 1.37 ^{ab}	0.49 ± 0.25 ^{ab}	160.61 ± 43.97 ^{ab}
F		92.096	134.848	82.884
P		0.000	0.000	0.000

注:与健康对照组比较, ^a $P < 0.01$;与正常妊娠组比较, ^b $P < 0.01$ 。

2.3 血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 之间的相关性分析 血清 miR-518b、ACR 水平与血清 miR-15b 水平均呈负相关 ($r = -0.652, -0.715$, 均 $P < 0.05$), 而血清 miR-518b 和 ACR 水平呈正相关 ($r = 0.812, P < 0.05$)。

2.4 血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 与妊娠高血压肾功能损伤的关系 肾功能损伤组血清 miR-518b 和 ACR 水平高于肾功能正常组 ($P < 0.01$), 而血清 miR-15b 水平低于肾功能正常组 ($P < 0.01$), 见表 3。

2.5 血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 水平对 HDP 合并肾功能损伤的诊断价值 miR-518b、miR-15b 和 ACR 3 个指标的二元 Logistic 回归方程为 $Y = 0.877X_{miR-518b} - 2.698X_{miR-15b} + 0.031X_{ACR} - 7.518$, miR-518b、miR-15b、ACR 联合检测的灵敏度为 90.5%, 特异度为 85.1%, 曲线下面积 (AUC) 为

0.940, 明显高于 miR-518b、miR-15b 和 ACR ($Z = 1.972, 2.624, 2.652$, 均 $P < 0.05$), 而 miR-518b、miR-15b 和 ACR 间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1、表 4。

表 3 血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 与妊娠期高血压肾功能损伤的关系 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-518b	miR-15b	ACR
肾功能正常组	87	4.10 ± 1.03	1.36 ± 0.72	111.63 ± 39.11
肾功能损伤组	21	5.71 ± 1.34	0.60 ± 0.23	160.29 ± 42.88
t		6.046	4.764	5.023
P		0.000	0.000	0.000

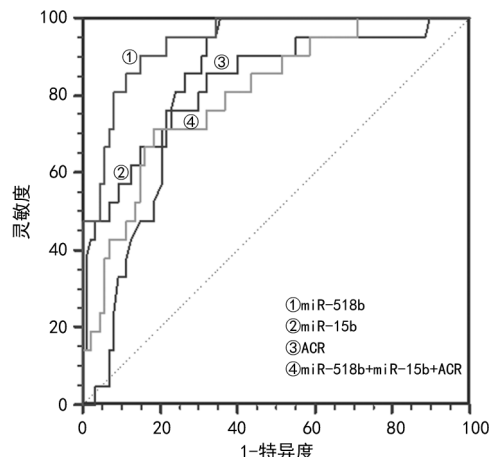


图 1 miR-518b、miR-15b 和 ACR 用于 HDP 诊断的 ROC 曲线

表 4 miR-518b、miR-15b 和 ACR 对 HDP 肾功能损伤的诊断效能

指标	临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC	95%CI
miR-518b	>4.94	76.2	78.2	0.836	0.752~0.900
miR-15b	≤1.05	100.0	64.4	0.829	0.744~0.895
ACR	>146.36	71.4	81.6	0.802	0.715~0.873
miR-518b+miR-15b+ACR	—	90.5	85.1	0.940	0.877~0.976

注:—表示该项无数据。

3 讨 论

HDP 是产科常见的妊娠并发症, 发生率高达 10%, 与妊娠期心脏病和产后出血同为造成产妇死亡的重要原因。其主要的病理、生理变化是血管内皮细胞受损, 血管系统发生炎症反应, 导致患者全身毛细血管痉挛^[2]。而肾脏对这些变化最为敏感, 表现为基底膜受损和肾小球通透性增加, 故 HDP 早期会出现肾脏微循环障碍和功能损伤。ACR 是尿清蛋白和肌酐的比值, 其中尿清蛋白常用于早期肾功能损伤的诊断^[3]。有研究显示, 约有 10% 肾功能损伤患者尿清蛋白水平未出现异常, 在未接受治疗的情况下, 肾功能损伤的患者尿清蛋白水平可在正常范围, 故通过单独检测尿清蛋白对肾功能损伤进行诊断具有一定的局限性^[4]。ACR 能校正尿清蛋白水平的波动, 能更为准确地反映肾功能的损伤情况。本研究表明, HDP 组

尿 ACR 水平明显高于正常妊娠组和健康对照组,并且随着 HDP 严重程度的升高而升高,说明 ACR 水平能够反映 HDP 疾病的严重程度。肾功能损伤组尿液 ACR 水平高于肾功能正常组,与 ACR 能够反映 HDP 患者肾功能损伤的报道一致^[4];ACR 对肾功能损伤的诊断效能较高,当诊断界值为 146.30 时,灵敏度为 71.4%,特异度为 81.6%,AUC 为 0.802。

miR-518b 位于 19 号染色体,主要在生殖细胞和胎盘组织中表达,主要由胎盘绒毛滋养细胞分泌,与胎盘的发育具有密切关系,是反映妊娠状态的指标^[6]。本研究显示,HDP 组患者血清 miR-518b 水平明显高于正常妊娠组和健康对照组,并且随着 HDP 严重程度升高而升高,说明 miR-518b 参与了 HDP 的发生、发展过程。有文献报道,胚胎中 miR-518b 水平与疾病的严重程度相关,miR-518b 可能与子痫前期的发病具有密切关系^[6-7]。本研究发现,肾功能损伤组患者血清 miR-518b 水平明显高于肾功能正常组,并且发现当以 4.94 作为诊断临界值时,其用于诊断 HDP 肾功能损伤的灵敏度为 76.2%,特异度为 78.2%,AUC 为 0.836,说明血清 miR-518b 水平对 HDP 肾损伤具有较高的诊断效能,与现有的报道一致^[1]。在一项 miRNA 微阵列芯片的研究中,发现 34 个 miRNA 基因出现异常,11 个高表达,23 个低表达,其中 miR-518b 在重度子痫前期的胎盘中呈高表达^[8],在另一项研究中证实 miR-518b 是发生妊娠期高血压的危险因素,在胎盘和外周血中水平均明显增高^[9]。

本研究发现,HDP 组患者血清 miR-15b 水平低于正常妊娠组和健康对照组,并且随着 HDP 严重程度升高而降低,说明 miR-15b 是 HDP 的保护因子,与 HDP 的发生、发展具有相关性。miR-15b 家族成员位于染色体 3q25.33 区域,主要功能是调控血管内皮细胞,通过对血管内皮细胞生长因子受体 2 结合降低血管内皮细胞受体 2 的表达水平,从而减弱血管内皮细胞形成血管的能力,达到对血管的生成具有明显拮抗作用^[10-11]。在子痫前期和流产的胎盘组织中,miR-15b 的表达出现明显降低,miR-15b 在滋养层细胞和内皮细胞中具有重要的调控作用^[1,12]。当血清 miR-15b 的诊断界值为 1.05 时,血清 miR-15b 对 HDP 患者发生肾功能损伤诊断的灵敏度为 100.0%,特异度为 64.4%,AUC 为 0.829,诊断效能较高。HDP 患者血清 miR-518b 和 ACR 水平与血清 miR-15b 水平呈负相关,而血清 miR-518b 和 ACR 水平呈正相关,说明三者间在 HDP 的发病过程中具有某种内在联系,其具体内在机制仍需进一步研究。miR-518b、miR-15b 和 ACR 联合检测能够提高对 HDP 肾功能损伤的诊断效能,联合检测的灵敏度为 90.5%,特异度为 85.1%,AUC 为 0.940,明显高于各个指标单独检测,说明 3 个指标在检测 HDP 肾功能损伤方面具有一定的互补性,可以提高诊断效能,但其确切的内在机制需要进一步研究。

总之,血清 miR-518b、miR-15b 和 ACR 水平是 HDP 肾功能损伤的敏感指标,3 个指标的联合检测能够提高对 HDP 患者肾功能损伤的诊断效能。

参考文献

- [1] JAIRAJPURI D S, MALALLA Z H, MAHMOOD N A. Circulating microRNA expression as predictor of preeclampsia and its severity[J]. *Gene*, 2017, 627: 543-548.
- [2] GAWADIA J, MISHRA K, KUMAR M, et al. Prediction of severe acute kidney injury using renal angina index in a pediatric intensive care unit[J]. *Indian Pediatr*, 2019, 56(8): 647-652.
- [3] 叶夏斌, 吴星梅. Kyn/Trp、PIGF、sFlt-1 及 ACR 值与妊娠期高血压疾病的关系[J]. *中国妇幼健康研究*, 2019, 30(6): 687-690.
- [4] 阙林, 林见敏, 梁爱凤, 等. 尿 L-FABP 与 ACR 联合检测在妊娠期高血压综合征早期肾损伤中的诊断价值[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(9): 1164-1166.
- [5] ILONA H, LENKA D, KATERINA K, et al. The prediction of gestational hypertension, preeclampsia and fetal growth restriction via the first trimester screening of plasma exosomal C19MC microRNAs[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2972.
- [6] MURAKAMI Y, MIURA K, SATO S, et al. Reference values for circulating pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma and their clinical usefulness in uncomplicated pregnancy and hypertensive disorder of pregnancy [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2018, 44(5): 840-851.
- [7] MING L, WANG Y Q, LU H F, et al. MiR-518b enhances human trophoblast cell proliferation through targeting rap1b and activating Ras-MAPK signal[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 100.
- [8] LUISA F O, JONATHAN A H, MCLENNAN S V. Effects of sample processing and storage on the integrity of cell-free miRNAs in maternal plasma[J]. *Prenat Diagn*, 2017, 37(8): 744-749.
- [9] HROMADNIKOVA I, KOTLABOVA K, IVANKOVA K, et al. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs and the evaluation of their potential to predict the onset of preeclampsia and IUGR[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171756.
- [10] LIU T, LIU Y, HUANG Y, et al. miR-15b induces premature ovarian failure in mice via inhibition of α -Klotho expression in ovarian granulosa cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 141: 383-392.
- [11] LEI Z, LIU X R, CUI J Z, et al. LncRNA882 regulates leukemia inhibitory factor (LIF) by sponging miR-15b in the endometrial epithelium cells of dairy goat[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4754-4767.
- [12] YANG M, CHEN Y, CHEN L, et al. miR-15b-AGO₂ play a critical role in HTR8/SVneo invasion and in a model of angiogenesis defects related to inflammation[J]. *Placenta*, 2016, 41(1): 62-73.