Modern Practical Medicine, April 2024, Vol.36, No.4

·诊治分析·

miR-193-5p联合Toll样受体4评估IgA肾病患者肾间质纤维化程度的价值分析

陈槐槐，南娜佳，朱瑶琼，朱丹

【关键词】 IgA 肾病；肾间质纤维化；miR-193-5p；Toll 样受体 4
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.04.013
【中图分类号】 R692 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2024)04-0470-03

IgA肾病是一种以IgA免疫复合物在肾小球沉积引起的慢性肾脏疾病，占所有原发性肾小球疾病的30%～40%[1]。临床上诊断主要依靠肾活检和免疫病理；但是肾活检有一定的创伤性，并发症较多，而且穿刺取样不当可能造成结果不准确[2]。因此迫切需要寻找一种潜在的无创生物标志物用于IgA肾病的早期诊断、临床治疗及预后评估。Toll样受体4（toll like receptor 4，TLR4）作为一种重要的免疫调节蛋白，与IgA肾病发生进展关系密切[3]。TLR4可接收多个活性分子的信号传递，参与调控IgA肾病[4]。miR-193-5p被证实与多种恶性肿瘤的发生密切相关[5]。然而miR-193-5p和TLR4对IgA肾病的肾间质纤维化程度的预测研究报道较少。基于此，本研究重点分析外周循环静脉血中miR-193-5p和TLR4联合诊断IgA肾病患者发生肾间质纤维化的临床价值，现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 回顾性选取2021年6月至2023年9月乐清市人民医院病理确诊的86例IgA肾病患者，其中男41例，女45例；年龄49～76岁，平均（56.2±7.9）岁。纳入标准：（1）年龄＞18岁，（2）符合IgA肾病的免疫病理。排除标准：（1）其他类型的肾炎患者；（2）继发性肾病患者；（3）肾功能障碍、肾脏肿瘤及肾脏手术史患者；（4）感染性疾病、自身免疫性疾病、严重心肺肝功能障碍患者。本研究获得温州医科大学附属乐清医院伦理委员会批准。

1.2 分组 所有患者入院1周内完成肾脏穿刺和病理诊断，由本院经验丰富的肾内科医师完成肾脏穿刺，并由经验丰富的病理科医师进行免疫病理诊断。参照IgA肾脏的病理牛津分型和Lee分级[6]，报告具体的肾间质纤维化和新月体形成的百分比。根据病理分为纤维化组（肾间质明确纤维化，47例）和无纤维化组（未发生纤维化，39例）。纤维化组根据纤维化程度分为轻度亚组（21例）、中度亚组（17例）、重度亚组（9例）。

1.3 肾功能指标检测 所有患者入院后次日空腹抽取肘静脉血，应用全自动生化检测仪检测血肌酐（SCr）、尿素氮（BUN）水平。收集患者24 h尿样本，检测24 h尿蛋白定量。

1.4 miR-193-5p和TLR4 mRNA检测 采用实时荧光定量聚合酶链式反应（qRT-PCR）检测外周循环静脉血中miR-193-5p和TLR4 mRNA表达量。具体步骤：抽取患者清晨外周静脉血10 ml，经离心沉淀后－80 ℃保存集中送检。Trizol试剂提取细胞中总RNA，反转录试剂盒合成cDNA，设计引物序列见表1。然后进行PCR扩增，反应体系为cDNA 2 μl+SYBRGreenMix 10 μl+正向和反向引物各0.5 μl，添加无菌反应水至总体积20 μl。反应条件为95 ℃预变性2 min，95 ℃变性30 s，60 ℃退火30 s和72 ℃延伸30 s，共进行40个循环。最后进行熔解曲线分析，目的基因的表达量采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法表示。

表1 设计引物序列

基因名称	引物序列	片段长度
miR-193-5p	F：5’-AACCTGTGTGCGAC-3’	152 bp
	R：5’-TTGGCGCGCGACATGC-3’	
Toll样受体4	F：5’-CGCGCTTTAAACGCAAT-3’	102 bp
	R：5’-TTCGACACACTGTGTGG-3’	
内参U6	F：5’-GGTTCGCACGTGCG-3’	86 bp
	R：5’-CCGTGTGCGCGACGTGCG-3’	

基金项目：温州市基础性公益科研项目（Y20220346）
作者单位：325600 浙江省乐清，乐清市人民医院
通信作者：陈槐槐，Email：13676787336@139.com

1.5　肾组织 Masson 染色检测纤维化　肾组织经脱水、包埋、切片后，脱蜡至水；切片入 Bouin 液，37 ℃温箱内 2 h，流水冲洗；天青石蓝染料滴染 2 ～ 3 min，稍水洗；苏木素染色液滴染 2 ～ 3 min，稍水洗；酸性乙醇分化液分化数秒，流水冲洗 10 min；丽春红品红染色液滴染 10 min，蒸馏水稍水洗；磷钼酸溶液处理 10 min；倾去上液，滴入苯胺蓝染色液染 5 min；弱酸溶液处理 2 min；脱水、透明、中性树胶封固。每例选取 3 张切片观察 10 个非重复视野（×200），以蓝色为阳性表达，计算 Masson 染色阳性面积占整个视野的百分比，对其进行半定量分析。半定量评分标准：0 分，无着色；1 分，轻度，面积＜ 10%；2 分，中度，面积 11%～ 25%；3 分，重度，面积 26%～ 50%；4 分，极重度，面积＞ 50%。

1.6　统计方法　使用 SPSS 20.0 统计软件进行处理，计量资料以均数±标准差表示，多组比较采用单因素方差分析，两组比较采用 t 检验；计数资料以百分比表示，采用 χ^2 检验；相关分析采用 Pearson 相关性分析；影响因素分析采用多因素 Logistic 回归分析；诊断效能分析采用受试者工作特征（ROC）曲线，曲线下面积（AUC）比较采用 Z 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　两组临床资料比较　两组性别、年龄、体质量指数、高血压病史和糖尿病史差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$），见表 2。

2.2　两组肾功能指标比较　纤维化组 SCr、BUN、24 h 尿蛋白定量、肾间质纤维化百分比和新月体形成百分比均高于无纤维化组（均 $P < 0.05$），见表 3。

2.3　两组及亚组间 miR-193-5p 和 TLR4 mRNA 比较　纤维化组 miR-193-5p 和 TLR4 mRNA 表达量高于无纤维化组（t=7.10、4.38，均 $P < 0.05$）；纤维化组各亚组间 miR-193-5p 和 TLR4 mRNA 表达量差异均有统计学意义（F=6.84、5.46，均 $P < 0.05$），其中中度亚组 miR-193-5p 和 TLR4 mRNA 表达量低于重度亚组，高于轻度亚组（均 $P < 0.05$），见表 4。

2.4　miR-193-5p、TLR4 mRNA 与肾功能指标间的相关性分析　miR-193-5p 和 TLR4 mRNA 表达量呈正相关（$P < 0.05$），且 miR-193-5p 和 TLR4 mRNA 表达量与病理中肾间质纤维化和新月体形成百分比呈正相关（均 $P < 0.05$），见表 5。

2.5　肾病患者肾间质纤维的影响因素分析　以肾间质纤维化程度为因变量，以 SCr、BUN、24 h 尿蛋白、肾间质纤维化百分比、新月体形成百分比、TLR4 mRNA、miR-193-5p 为自变量，进行多元 Logistic 回归分析。结果表明，血清 TLR4 mRNA、miR-193-5p 是肾间质纤维化程度的危险因素（均 $P < 0.05$），见表 6。

2.6　miR-193-5p 和 TLR4 诊断肾间质纤维化的 ROC　miR-193-5p 和 TLR4 mRNA 表达量诊断 IgA 肾病患者发生肾间质纤维化的 AUC 为 0.76 和 0.70，两者联合诊断的 AUC 为 0.85，高于单一指标，见表 7。

3　讨论

IgA 肾病是一种复杂的综合征，由遗传、免疫系统异常和环境因素相互作用所致。临床特征包括血尿、蛋白尿、高血压和肾功能损害等，病理类型包括两种经典型 IgA 肾病和毛细血管内 IgA 沉积病。目前没有特效的治疗方法，主要针对症状和疾病的进展进行，患者预后差异较大。

miRNAs 参与了肾病的发生和发展过程，可能成为 IgA 肾病分子诊断的新方向。本研究发现，IgA

表 2　两组 IgA 肾病患者临床资料比较

组别	例数	性别比（男/女，例）	年龄（岁）	体质量指数（kg/m²）	高血压史[例（%）]	糖尿病史[例（%）]
无纤维化组	39	17/22	55.6±5.7	22.6±1.8	14（35.9）	7（17.9）
纤维化组	47	24/23	56.8±5.9	22.9±1.7	17（36.2）	10（21.3）
χ^2（t）值		0.48	（0.66）	（0.46）	0.00	0.15
P 值		＞ 0.05	＞ 0.05	＞ 0.05	＞ 0.05	＞ 0.05

表 3　两组 IgA 肾病患者肾功能指标比较

组别	例数	血肌酐（μmol/L）	尿素氮（mmol/L）	尿蛋白（g/24 h）	肾间质纤维化百分比[例（%）]	新月体形成百分比[例（%）]
无纤维化组	39	178.5±42.3	12.4±3.5	2.5±0.6	2（5.13）	1（2.56）
纤维化组	47	245.6±65.9	23.5±7.8	4.6±0.9	44（93.62）	45（95.74）
t（χ^2）值		4.24	6.66	5.86	（67.08）	（74.39）
P 值		＜ 0.05	＜ 0.05	＜ 0.05	＜ 0.05	＜ 0.05

表 4　两组及亚组 IgA 肾病患者血清 miR-193-5p 和 TLR4mRNA 水平比较

组别	例数	miR-193-5p	TLR4 mRNA
无纤维化组	39	0.14±0.04	0.19±0.06
纤维化组	47	0.24±0.08	0.27±0.10
轻度亚组	21	0.17±0.05	0.24±0.08
中度亚组	17	0.20±0.08	0.29±0.09
重度亚组	9	0.25±0.06	0.34±0.03

注：TLR4 为 Toll 样受体 4

肾病的肾间质纤维化可能与 miR-193-5p 和 TLR4 的高表达有关。Duan 等[7]研究发现，IgA 肾病组患者尿中红细胞来源的外泌体 miR-144-3p 和 miR-486-5p 高于正常组。Min 等[8]实验证明，IgA 肾病患者尿中 miR-215-5p 和 miR-378i 水平高于健康对照组，而 miR-29c 和 miR-205-5p 水平显著下调。本研究显示，miR-193-5p 和 TLR4 mRNA 表达量与肾间质纤维化和新月体形成百分比呈正相关。肾间质纤维化的发生提示 IgA 肾病患者的临床预后较差。miR-193-5p 的高表达与 IgA 肾病患者的临床表现、疾病进展和预后相关。miR-193-5p 可能通过调控多个靶基因，参与 IgA 肾病的炎症反应、免疫反应和肾小球损伤过程。TLR4 是一种能够感应细菌和病毒感染的受体，与免疫系统的调节密切相关。在肾小球肾炎中，TLR4 通过介导炎症反应，导致肾小球的炎症细胞浸润和蛋白尿的产生[9]。此外，TLR4 同样参与了糖尿病肾病和慢性肾病的发生和发展过程[10]。

本研究结果还显示，miR-193-5p 联合 TLR4 mRNA 表达量诊断 IgA 肾病患者发生肾间质纤维化有较好的应用潜能，其中 miR-193-5p 表达量大于 0.190 或者 TLR4 mRNA 表达量大于 0.202 可提示肾间质纤维化的风险较高。

本研究存在一些局限性：首先，样本量较少，结果的稳定性有待考证；此外，本研究未能深入探讨 miR-193-5p 和 TLR4 参与 IgA 肾病及肾间质纤维化的发生机制。有待通过多中心、前瞻性、大样本病例随机对照试验进一步验证。

表 5　miR-193-5p、TLR4 mRNA 与肾功能指标间的相关性分析

指标	TLR4	肾间质纤维化百分比	新月体形成百分比
miR-193-5p	0.75[a]	0.65[a]	0.68[a]
TLR4 mRNA	—	0.63[a]	0.65[a]

注：TLR4 为 Toll 样受体 4，aP ＜ 0.05

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

参　考　文　献

[1] 郭康林,程一春,葛树旺,等.IgA 肾病国际风险预测工具在中国人群中的预测效果评价[J].首都医科大学学报,2022,43(5):713-719.

[2] 王娇,汪丽珍,王昱,等.基于无创指标的 IgA 肾病诊断预测模型的建立与验证[J].中国临床医学,2022,29(4):603-609.

[3] 吴俊波,杨杰,肖锋,等 .miR-146a 调控 TLR4/NF-κB 通路对脑出血模型大鼠保护作用及机制研究[J].中国免疫学杂志,2024,40(1):82-85.

[4] 魏娜,魏颖,胡祥坤.急诊开颅术后肺部感染病原学及 TLR4/NF-κB 信号通路炎症因子表达[J].中华医院感染学杂志,2023,9(17):2629-2633.

[5] 郭丽宁,常蕊,杨杰,等.MUC4、CUEDC2、miR-193a-5p 在子宫内膜癌组织中的表达及其临床价值[J].国际检验医学杂志,2022,43(22):2716-2721.

[6] 付双双,杨伊雅,梁玉梅,等.Lee 氏分级和牛津分型在 IgA 肾病中应用和临床意义[J].中国实验诊断学,2019,23(10):1679-1682.

[7] DUAN Z Y, CAI G Y, BU R, et al. Selection of urinary sediment miRNAs as specific biomarkers of IgA nephropathy[J]. Sci Rep, 2016,6(2):23498.

[8] MIN Q H, CHEN X M, ZOU Y Q, et al. Differential expression of urinary exosomal microRNAs in IgA nephropathy[J]. J Clin Lab Anal, 2018,32(2):e22226.

[9] ZHANG J, MI Y, ZHOU R, et al. The TLR4-MyD88-NF-κB pathway is involved in sIgA-mediated IgA nephropathy[J]. J Nephrol, 2020,33(6):1251-1261.

[10] HAN W, MA Q, LIU Y, et al. Huangkui capsule alleviates renal tubular epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and TLR4/NF-κB signaling[J]. Phytomedicine,2019,57(4):203-214.

收稿日期：2023-12-15

（本文编辑：孙海儿）

表 6　影响肾间质纤维化的多元 Logistic 回归分析

变量	β 值	SE 值	Waldχ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
血肌酐	1.29	0.71	3.26	＞ 0.05	3.625	0.90 ～ 14.66
尿素氮	0.90	0.57	2.55	＞ 0.05	2.471	0.82 ～ 7.49
24 h 尿蛋白	0.70	0.45	2.40	＞ 0.05	2.015	0.83 ～ 4.89
肾间质纤维化百分比	0.75	0.56	1.80	＞ 0.05	2.126	0.71 ～ 6.40
新月体形成百分比	0.58	0.38	2.29	＞ 0.05	1.782	0.84 ～ 3.77
Toll 样受体 4	1.05	0.41	6.42	＜ 0.05	2.854	1.27 ～ 6.42
miR-193-5p	1.25	0.46	7.31	＜ 0.05	3.486	1.41 ～ 8.62

表 7　miR-193-5p 和 TLR4 诊断肾间质纤维化的 ROC 曲线

指标	AUC	95%CI	P 值	敏感度（%）	特异度（%）	截断值
miR-193-5p	0.76	0.70 ～ 0.80	＜ 0.05	78.6	76.3	0.190
Toll 样受体 4	0.70	0.66 ～ 0.77	＜ 0.05	51.4	84.1	0.202
两者联合	0.85	0.80 ～ 0.90	＜ 0.05	90.5	91.2	—