

中文摘要

特发性膜性肾病尿外泌体 lncRNA 的表达谱分析及功能预测

目的:

分析特发性膜性肾病 (idiopathic membranous nephropathy, IMN) 患者尿液外泌体中差异表达的长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 的表达谱, 并进行功能预测, 探讨其在 IMN 中可能的作用机制。

方法:

在 NCBI-SRA 数据库中下载 5 例 IMN 样本和 5 例健康人对照 (healthy control, HC) 样本尿外泌体 lncRNA 的测序数据, 应用生物信息学分析对差异表达的 lncRNA 进行聚类分析。通过基因本体论 (Gene Ontology, GO) 分析和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析预测 IMN 中差异表达的 lncRNA 的功能和可能参与的信号通路。

结果:

在 IMN 组和 HC 组之间共检测到 14865 个上调的 lncRNA, 22819 个下调的 lncRNA。将变化倍数 (Fold change) ≥ 2 和 P 值 ≤ 0.05 作为筛选标准, 有 353 个 lncRNA 差异表达, 分别为 18 个上调的 lncRNA 和 335 个下调的 lncRNA。多数差异表达的 lncRNA 长度小于 500nt, 分布于常染色体, 多来源于基因间区。GO 分析提示表达上调的

lncRNA 可能参与间充质干细胞凋亡过程、一氧化氮合成酶活性调节、激素代谢调控、热休克蛋白 90 结合等过程；表达下调的 lncRNA 可能参与白介素-10 分泌等过程。KEGG 分析提示上调的 lncRNA 可能参与 mTOR 信号通路、HIF-1 信号通路；表达下调的 lncRNA 可能参与 Rap1 信号通路。

结论：

1. 本研究揭示了 IMN 患者尿外泌体中差异表达的 lncRNA 的表达谱和功能特征。
2. 尿外泌体中差异表达的 lncRNA 可能通过 mTOR 信号通路、HIF-1 信号通路、Rap1 信号通路等途径参与 IMN 的发生发展。

关键词：

特发性膜性肾病，尿外泌体，长链非编码 RNA，信号通路

Abstract

Study on the profiling of urinary exosome long noncoding RNAs and prediction of its function in idiopathic membranous nephropathy

Objective:

The present study aims to investigate the profiling and functional prediction of urinary exosomal lncRNA of idiopathic membranous nephropathy (IMN) patients , and to explore its possible mechanism of action in IMN.

Method:

Sequencing data of urinary exosomal lncRNA from five IMN samples and five healthy control (HC) samples were downloaded from the NCBI-SRA database, and bioinformatics analysis was applied to cluster the differentially expressed lncRNA. Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were used to predict the functions and possible signaling pathways involved in the differentially expressed lncRNA in IMN.

Result:

A total of 14865 up-regulated lncRNA and 22819 down-regulated lncRNA were detected between the IMN and HC groups. Using Fold change ≥ 2 and P value ≤ 0.05 as screening criteria, 353 lncRNA were differentially expressed, 18 up-regulated lncRNA and 335 down-regulated lncRNA, respectively. Most of the differentially expressed lncRNA were less than 500 nt in length, distributed in autosomes, and mostly originated from intergenic regions. GO analysis suggested that the up-regulated lncRNA might be involved in mesenchymal cell apoptosis, nitric oxide synthase activity regulation, hormone metabolism regulation, and heat

shock protein 90 binding; the down-regulated lncRNA might be involved in interleukin-10 secretion. KEGG analysis suggested that the up-regulated lncRNA might be involved in mTOR signaling pathway, HIF-1 signaling pathway; the down-regulated lncRNA might be involved in Rap1 signaling pathway.

Conclusion:

1. The study revealed the expression and functional profile of differentially expressed urinary exosome lncRNA in IMN patients.

2. Differentially expressed lncRNA in urinary exosomes may be involved in the development of IMN through mTOR signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, Rap1 signaling pathway and other pathways.

Keyword:

Idiopathic membranous nephropathy, urinary exosomes, long noncoding RNA, signaling pathway

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解吉林大学有关保留、使用学位论文的规定，同意吉林大学保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权吉林大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文级别： ☒ 硕士 ☐ 博士

学科专业： 内科学

论文题目：特发性膜性肾病尿外泌体 lncRNA 的表达谱分析及功能预测

作者签名：俞元植

指导教师签名：刘锋

2023 年 6 月 2 日

目 录

第 1 章 引言.....	1
第 2 章 综述.....	5
2.1 ncRNA	5
2.1.1 circRNA	6
2.1.2 lncRNA	6
2.1.3 miRNA	7
2.2 ncRNA 与 IMN	8
2.2.1 circRNA 与 IMN	8
2.2.2 lncRNA 与 IMN	9
2.2.3 miRNA 与 IMN	11
2.3 小结与展望	13
第 3 章 材料与方法	14
3.1 在 SRA 数据库中下载数据	14
3.2 lncRNA 的注释	14
3.3 鉴定差异表达的 lncRNA	14
3.4 生物信息学分析	14
3.4.1 绘制图表	14
3.4.2 差异表达 lncRNA 靶基因 GO 功能分析	15
3.4.3 差异表达 lncRNA 靶基因 KEGG 通路分析	15
第 4 章 结果.....	16
4.1 尿外泌体 lncRNA reads 统计	16

4.2 尿外泌体差异表达的 lncRNA 表达谱分析	16
4.3 尿外泌体 lncRNA 靶基因 GO 分析	21
4.4 尿外泌体 lncRNA 靶基因 KEGG 通路分析	22
第 5 章 讨论	24
第 6 章 结论与创新性	32
6.1 结论	32
6.2 创新性	32
参考文献	33
作者简介及在学期间所获得科研成果	43
致 谢	44

中英文缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
IMN	Idiopathic membranous nephropathy	特发性膜性肾病
lncRNA	long noncoding RNA	长链非编码 RNA
HC	healthy control	健康对照
GO	Gene Ontology	基因本体论
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因和基因组百科全书
miRNA	microRNA	微小 RNA
ESRD	end stage renal disease	终末期肾脏病
ncRNA	noncoding RNA	非编码 RNA
ceRNA	competing endogenous RNA	竞争性内源 RNA
BP	Biological Process	生物过程
CC	Cellular Component	细胞成分
MF	Molecular Function	分子功能
NOS	nitric oxide synthase	一氧化氮合成酶
Hsp 90	heat shock protein 90	热休克蛋白 90
IL-10	interleukin-10	白介素-10
mTOR	mammalian target of rapamycin	哺乳动物雷帕霉素蛋白靶蛋白

第 1 章 引言

特发性膜性肾病(Idiopathic membranous nephropathy, IMN)是引起成人肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)的常见原发性肾小球疾病之一,主要病理机制为肾小球血管上皮下有免疫复合物沉积,使毛细血管基底膜增厚。近年来,IMN 的发病率不断升高,以肾病综合征或大量蛋白尿为主要临床表现,约 1/3 患者可自发缓解,另有约 1/3 的患者出现肾功能改变,需经过长期的规范治疗,但仍有部分患者在 5~10 年内进展为终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)^[1]。早期诊断 IMN 可以在一定程度上改善预后,保障患者生活质量。目前诊断 IMN 主要通过肾穿刺活检,但肾穿刺活检有出血、感染等风险,具有侵袭性和一定的禁忌症,且不能多次操作以评估肾脏损伤程度与药物治疗效果,其使用有局限性。而血清肌酐、蛋白尿、血清白蛋白等传统指标在肾脏疾病诊疗中的敏感性和特异性上又较为欠缺。目前关于诊断 IMN 的生物标志物已有多种发现,如 M 型磷脂酶 A2 受体(m-type phospholipase A2 receptor, PLA2R)、1 型血小板反应蛋白 7A 域(thrombospondin type-1 domain-containing 7A, THSD7A)、中性肽链内切酶(NEP)、超氧化物歧化酶 2(superoxide dismutase 2, SOD2)、神经表皮生长因子样蛋白 1(neural epidermal growth factor-like 1 protein, NELL-1)等^[2]。这些标志物中 PLA2R 格外引起了我们注意,它的水平可能可以反应肾脏疾病的严重程度,并可辅助临床判断患者预后情况,是目前应用于临床并作为诊断 IMN、评估病情、制

定治疗方案的重要无创生物标志物，但 PLA2R 的敏感性较低，其阳性率仅为 70%^[3]。鉴于此，我们需要寻找一种高特异性和敏感性的诊断 IMN 新型无创生物标志物，以尽可能的适用于大多数 IMN 患者。

外泌体是由细胞内多泡体与细胞膜融合后，释放到细胞外基质中的膜性囊泡，具有双层质膜结构，直径约 30-150nm，含有细胞来源的长链非编码 RNA（long noncoding RNA，lncRNA）、微小 RNA（microRNA，miRNA）、信使 RNA（messenger RNA，mRNA）、脂质、蛋白质等多种具有生物学功能的内容物^[4]。研究表明，在大鼠肾组织的各个细胞，如尿道上皮细胞、肾小管上皮细胞、足细胞等，均可发现其存在外泌体，从而提示肾脏细胞可分泌外泌体^[5]。并且同一起来源外泌体的成分在生理和病理状态下表达水平有所不同^[6]。这些物质通过借助外泌体参与细胞间信息传递、免疫应答和物质运输等生物学过程，在细胞损伤、肾间质纤维化、免疫炎症反应等生理、病理过程中均发挥作用，从而影响肾脏疾病进展^[7-10]。与血液、肾组织等其他检测指标相比，尿液更容易无创获取。由于血外泌体不能到达尿液，尿外泌体基本来源于肾脏及尿路细胞。同时尿外泌体的双层质膜结构可保护其携带的生物学信息物质免受外界环境干扰及破坏，如 RNA 酶和反复冻融，与尿液中其他生物分子相比，尿外泌体的数量和其内物质更具完整性和稳定性^[5, 11]。因此尿外泌体在一定程度上更全面地提示了肾脏疾病的发生、发展机制。通过研究 IMN 患者尿外泌体中 lncRNA 的表达以探索其间关系，有助于发现 IMN 新型无创生物标志物。

lncRNA 是由 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase 2, RNAP2) 转录产生, 长度超过 200 个核苷酸, 不具有编码蛋白质功能的 RNA 分子。lncRNA 有较强的组织特异性和细胞特异性, 且数量庞大。lncRNA 通过控制细胞核内染色质的结构和转录, 调节胞质中 mRNA 稳定性, 翻译以及翻译后修饰 (post-translational modifications, PTM), 正在成为基因表达网络中的重要调节因子^[12]。研究发现 lncRNA 与多种肾脏疾病相关, 如糖尿病肾病、局灶性节段性肾小球硬化、IMN、狼疮肾炎、急性肾损伤、多囊肾病等。目前发现由 X-失活中心 (Xic) 基因位点转录的 X 染色体失活特异性转录物 (X-inactive specific tran, XIST) 是一种与 X 染色体失活有关的 lncRNA。Huang 等^[13]在对膜性肾病 (membranous nephropathy, MN) 小鼠模型和包括 MN 的肾小球肾炎患者的尿液研究中发现, lncRNA XIST 表达水平明显升高, 且尿 XIST 浓度与 MN 病情严重程度成正相关性。进一步研究提示在 MN 发生时, XIST 启动子 H3K27me3 水平下降, 诱导 XIST 水平上升。由此可得, 尿 XIST 与 MN 之间有一定关联, 并有望成为 MN 的潜在生物标志物。Jin 等^[14]发现表达 XIST 的下调可以激活 miRNA-217/TLR4 通路, 逆转足细胞凋亡, 进而延缓 MN 进展, 为 MN 的诊断和治疗提供了新思路。

本研究通过对测序结果进行数据分析, 选择 Fold change ≥ 2 和 P 值 ≤ 0.05 作为差异表达 lncRNA 的阈值, 得到 IMN 与健康对照组之间差异表达的 lncRNA 表达谱。根据已识别的 lncRNA 的表达水平以及 IMN 患者与健康人之间的显著差异进行聚类分析。通过基因本体论

（Gene Ontology, GO）分析和京都基因和基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）分析得到 IMN 患者和健康人之间差异表达的 lncRNA 的预测功能。本研究的结果将进一步验证尿外泌体 lncRNA 作为 IMN 诊疗生物标志物的可能性，并为 lncRNA 在 IMN 发生、发展过程中调控机制的研究提供思路与实践经验。

第2章 综述

外泌体非编码 RNA 在特发性膜性肾病中的研究进展

近年来我国 IMN 发病率逐渐升高，其主要病理特征是上皮下免疫复合物沉积，伴基底膜弥漫性增厚。IMN 临床表现以肾病综合征为主，如大量蛋白尿、低蛋白血症、水肿、高脂血症，其余可表现为无症状型蛋白尿。多数患者病情可反复，病程迁延，仅三分之一患者可自发缓解，另有三分之一患者预后较差，逐渐进展为 ESRD，严重影响了患者的生存质量，加重经济负担^[15]。因此，为缓解 IMN 患者疾病的进展，改善其预后，实现 IMN 的早期诊断和治疗是我们所需关注的重点。

外泌体有稳定的双层膜结构，可保护其内的非编码 RNA（non-coding RNA, ncRNA）免受破坏，是较好的信息通讯载体。研究者们发现 ncRNA 通过与蛋白质、RNA、DNA 等相互作用，调节基因的表达，参与到多种疾病的发生、发展过程中，包括免疫反应、炎症、肿瘤、心血管疾病等^[16-21]。ncRNA 主要包含 miRNA、circRNA 和 lncRNA^[22]。

肾脏细胞几乎都能分泌外泌体，研究表明外泌体可能在肾脏疾病中发挥作用^[23]。本文总结了在 IMN 中外泌体及非外泌体中差异表达的 ncRNA 及其作用，为探索 IMN 早期诊断和治疗提供思路。

2.1 ncRNA

2.1.1 circRNA

circRNA 是单链和共价闭合的 RNA 转录本，没有 5'帽与 3'多聚腺苷尾，可以在一定程度上抵抗酶的降解，有高度的稳定性^[24]。circRNA 大量表达，进化上偏向保守^[25]。circRNA 根据细胞类型的不同、并在不同的组织和发育阶段都有其独特的表达方式，在生物学功能中有关键作用^[25-29]。同时 circRNA 有着较长的半衰期^[30]。circRNA 来源除蛋白质编码的外显子外，还可来自基因组的内含子、未翻译区域或基因间隔区^[31]。这些特性使 circRNA 成为多种疾病的潜在生物标志物。

circRNA 有以下 4 种功能：circRNA 可作为竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)，海绵吸附 miRNA，影响 miRNA 与 mRNA 反应，改变 miRNA 活性及其表达能力^[32, 33]。与蛋白质相互作用：circRNA 通过与 RNA 结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)相互作用，促进蛋白质复合体的形成和反应^[34, 35]。调节转录：一些 circRNA 来自反向剪接(具有保留的内含子)或加工过的内含子套索，可保留在细胞核内，调节转录，既可以增强也可以抑制线性 RNA 的转录^[36, 37]。参与翻译：circRNA 的转录可通过帽子非依赖方式进行。包含无限阅读框的 circRNA 可模拟原核生物的 RNA 翻译模式，实现 DNA 滚环扩增^[38]。

2.1.2 lncRNA

lncRNA 是由 RNAP2 转录产生的一类长度超过 200 个核苷酸的

RNA 分子。lncRNA 缺乏开放性阅读框(ORF)和存在随机性密码子,因而不具有编码蛋白质功能^[39]。lncRNA 组织丰度低,在细胞或组织中特异性表达,低保守性^[40, 41]。根据 lncRNA 与临近蛋白编码基因的相对位置, lncRNA 可分为以下 5 类:正义型(sense)、反义型(antisense)、双向型(bidirectional)、内含子型(intronic)和基因间型(intergenic)

^[42, 43]。

lncRNA 可依赖其二级或三级结构发挥生物学功能,通过以下 5 种方式在表观遗传、转录和转录后水平调控基因表达: lncRNA 通过自身转录,抑制基因表达; lncRNA 作为分子支架,招募表观遗传因子,调控染色质结构,重塑染色质;同时 lncRNA 有增强子作用; lncRNA 也可海绵吸附 miRNA;作为小 RNA 的前体, lncRNA 可转录为相应的 miRNA^[44, 45]。lncRNA 主要作用模式有信号、诱饵、引导和支架。lncRNA 可在不同的条件和信号通路下,经过特异性转录,作为信号传导分子,调控下游基因转录。lncRNA 经转录后与相应蛋白结合,作为分子阻断剂,阻断特定的信号通路和功能。lncRNA 与蛋白质结合后,诱导基因表达改变,产生的核糖核蛋白复合物由 lncRNA 导向染色质和其他靶标。lncRNA 可作为支架,结合多个转录因子或 miRNA^[46]。

2.1.3 miRNA

miRNA 是由 RNAP2 转录产生的一类长度为 20-25 个核苷酸的小型非编码 RNA。miRNA 有高度保守性和组织特异性,不同组织器官

中 miRNA 的表达水平不同。

miRNA 可抑制 mRNA 翻译或促进 mRNA 降解，在转录及转录后水平调控基因表达^[47, 48]。

2.2 ncRNA 与 IMN

2.2.1 circRNA 与 IMN

在 IMN 患者尿外泌体差异表达的 circRNA 中，hsa_circ_0001250 表达显著上调，且与大量蛋白尿相关，并经过验证发现，hsa_circ_0001250 可能通过靶向 hsa-miR-639 和 hsa-miR-4449 在 IMN 的发病过程中发挥作用^[49]。同时有研究表明 hsa_circ_0001250 可以海绵吸附和靶向抑制 hsa_miR-876-5p，促进血管紧张素 II（Angiotensin II，Ang II）诱导的足细胞凋亡与 NLRP3 炎症小体激活引起的炎性损伤^[50]。

在 IMN 患者血清与尿外泌体中，对应 7 号染色体上的 circRNA 的基因、黏蛋白 3A（MUC3A）基因，均表现为上调趋势。其可能通过甘露糖结合凝集素途径和介导抗原抗体免疫复合物形成参与到疾病的发生发展中。且差异性表达的 circRNA 基本是内含子来源的核仁小 RNA（small nucleolar RNAs，snoRNA），主要为 SNORA25、SNORA31、SNORA51、SNORA75、SNORD112。snoRNA 可调控基因表达，在急性应激反应的早期中起到保护作用，这提示特定的 snoRNA 所对应的 circRNA 可能可以作为 IMN 早期肾脏损伤的生物标志物^[51]。在 IMN 患者血浆中，hsa_circRNA_101022、hsa_circRNA_

103668、hsa_circRNA_100789 表达上调, hsa_circRNA_101145 表达下调, 但 IMN 患者与非 IMN 患者相比, hsa_circRNA_101022 具有显著差异, 但准确性欠佳, 而与抗 PLA2R 抗体联合检测则能大大提高诊断准确性^[52]。

除外泌体 circRNA 外, 还发现在 IMN 患者外周血中 circRNA 10139 表达明显上调, 与 miR-135 家族的多个分子相关, 主要是 miR-135a 和 miR-135b^[53]。同时有研究表明 miR-135a 和 miR-135b 可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路参与足细胞损伤, 并且该通路在肾脏损伤和修复及肾脏疾病的进展中有着重要作用^[54]。而靶向抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可改善模型动物的足细胞损伤和蛋白尿^[55]。

在 IMN 中 circ_0000524 和 CXCL16 趋化因子配体 16 (CXCL16) 表达上调, 而 miR-500a-5p 表达下调。circ_0000524 负调节 miR-500a-5p 的表达, 同时 circ_0000524 低水平可抑制足细胞凋亡, 而 miR-500a-5p 的缺失可缓解足细胞凋亡。miR-500a-5p 含有与 CXCL16 的结合位点。circ_0000524 基因敲除通过上调 miR-500A-5p 的表达来抑制 CXCL16 的表达。此外, miR-500A-5p 上调抑制了 Ang II 诱导的足细胞凋亡, 而 CXCL16 的表达增强挽救了这一作用。circ_0000524/miR-500a-5p/CXCL16 通路可调控 IMN 中足细胞的凋亡^[56]。

2.2.2 lncRNA 与 IMN

研究发现 XIST 是由 Xic 基因位点转录的一种与 X 染色体失活有关的 lncRNA。MN 小鼠模型中, 发现 XIST、NEAT1 这两种 lncRNA

在肾小管上皮细胞和肾小球细胞中的表达水平明显上调。肾小球足细胞损伤也是 IMN 的病理表现之一。因此用脂多糖处理小鼠足细胞,使足细胞损伤,发现 XIST 的水平升高,而 NEAT1 的水平并没有随之升高。随后的研究表明,在 MN 小鼠和肾小球肾炎患者的尿液中,XIST 水平显著升高。染色质免疫沉淀实验提示 XIST 启动子区域的 H3K27me3 减少。这表明在 MN 的病程中,XIST 启动子区域 H3K27me3 的减少导致尿液 XIST 水平升高。因此,尿 XIST 与 MN 之间有一定关联,尿 XIST 有望成为 MN 的生物标志物^[13]。

另有研究发现,MN 患者的肾组织中 XIST 和 Ang II 水平升高。Ang II 可诱导 XIST 增加和足细胞凋亡,而下调 XIST 可逆转 Ang II 诱导的足细胞凋亡。同时 miR-217 受到 XIST 的负调控。而 miR-217 又可以通过靶向其 3'-非翻译区来控制 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)。因此 XIST 可以通过 miR-217 调节 TLR4。XIST 的下调可以激活 miRNA-217/TLR4 通路,逆转足细胞凋亡,进而延缓 MN 进展,为 MN 的诊断和治疗提供了新思路^[14]。

基于 mRNA 相关的 miRNA 和 lncRNA 预测,经过 30 种 lncRNA-miRNA-mRNA 的探索,发现 KCNQ1OT1 作为 lncRNA,通过 KCNQ1OT1-miR-204-5p-SRY-Box 转录因子 4 (SRY-box transcription factor 4, SOX4) 参与 MN 的发生发展^[57]。

相关报道表明,在 IMN 患者的全血标本和肾组织中存在着差异表达的 15 个 lncRNA,经检索发现其中的 ENST00000433035 下游与氧化应激密切相关,这可能是 lncRNA 参与 IMN 发生发展的一种方

式，但具体的机制尚不明确，仍需进一步探索^[58]。

2.2.3 miRNA 与 IMN

有报道发现在尿外泌体中 miR-184 表达明显上调，而 miR-184 可能通过靶向磷脂酰肌醇 3 激酶（phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B, AKT 或 PKB）信号通路和丝裂原活化蛋白激酶（mitogen activated protein kinase, MAPK）通路损伤足细胞，在 IgA 肾病的病程中发挥作用^[59]。因此当 IMN 患者尿外泌体中 miR-184 表达明显上调时，猜测其也可能通过 PI3K/AKT 信号通路或 MAPK 通路损伤足细胞，从而引发 IMN。同时经过生物信息学分析，发现尿外泌体差异表达 miRNA 靶基因可能通过 MAPK 通路、Wnt 通路、胰岛素通路，损伤足细胞，产生蛋白尿，最终导致 IMN^[60]。

miR-30b-5p 和 miR-9-5p 在 IMN 患者尿外泌体中表达明显下调，可能与足细胞及肾脏纤维化有关^[61]。在糖尿病肾病小鼠模型和人肾组织中 miR-30b-5p 同样表达下调，可能是通过上皮间充质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）参与肾脏纤维化促进糖尿病肾病的进展。而 miR-30b-5p 水平升高可缓解高糖状态下的 EMT^[62]。miR-30 下调会导致足细胞损伤并形成蛋白尿^[63]。同时 miR-30 家族可能通过调节钙/钙调神经磷酸酶（Calcineurin, CaN）信号通路，改善足细胞损伤，减少蛋白尿^[64]。研究发现 miR-9-5p 可减轻足细胞损耗并缓解肾脏纤维化^[65, 66]。因此在 IMN 患者尿外泌体中上述两种 miRNA 表达水平的改变可能与 IMN 相关。

研究发现 IMN 患者尿外泌体 miRNA-193a 表达上调, 且与疾病严重程度相关, 疾病缓解, miR-193a 表达水平随之下降^[67]。miR-193a 可抑制肾母细胞瘤 1 型 (Wilms tumor type 1, WT1) 表达, 而 WT1 是足细胞分化和稳态的转录因子和主要调节因子, 可以防止足突黏连, 维持足细胞结构稳定。WT1 表达降低有可导致其靶基因足细胞毒素 (podocalyxin, PODXL) 下调, 进而发生足细胞损伤^[68]。另有研究证明 IMN 患者尿外泌体中 miR-193a 表达上调, 而 WT1 和 PODXL 表达下调, 三者联合检测是一种评估 IMN 预后的方式, 并能区分不同分期 IMN 患者的预后^[69]。

IMN 患者尿外泌体中 hsa-miR-486-5p 表达上调, hsa-miR-146a-5p 表达下调。并通过 KEGG 通路分析发现, 两种 miRNA 对应的靶基因参与多条信号通路, 如 TGF- β 信号通路、NF- κ B 信号通路、Toll 样信号通路、MAPK 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、哺乳动物雷帕霉素蛋白靶蛋白复合物 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路, 这为 IMN 的后续研究提供了探索方向。根据 IMN 尿外泌体中差异表达的 miRNA 和分析 miRNA-mRNA 调控网络, 发现了 miR-155-5p-FOS 和 miR-146a-5p-BTG2, 可能通过影响免疫参与 IMN 的发病^[70]。

此外, 在 IMN 患者肾组织和血浆中发现 miR-217 表达下调, 通过靶向 TNFSF11 诱导足细胞凋亡^[71]。在 MN 中, 肾连蛋白 (nephrin, NPNT) 定位于细胞外基质, 而 miR-378a 对其有特异性。两者表达呈负相关。转化生长因子 β (TGF β) 诱导 miR-378a 表达, 导致 NPNT

表达缺失。如在斑马鱼模型中，敲除 NPNT 或表达 miR-378a，则导致足细胞足突消失、基底膜改变，出现水肿^[72]。这些结果虽不是在外泌体中发现上述 miRNA，但也能从一定程度上反应 miRNA 与足细胞损伤相关，为探索 IMN 新型生物标志物提供了指导意义。

2.3 小结与展望

ncRNA 在 IMN 患者的体液中的差异表达提示其与 IMN 有着密切的关系，不似肾组织穿刺活检，外泌体及外周血 ncRNA 检查更为便捷，易反复获取，而肾组织中差异表达的 ncRNA 对 IMN 的诊断有一定的指导意义，上述研究发现有助于对 IMN 的疾病活动、疗效、预后等多方面进行评估测定，便于进一步探索诊断 IMN 的无创生物标志物。但其研究处于进展阶段，ncRNA 参与 IMN 的发病机制尚待明确，仍需要不断研究深入，希望能够发现针对 IMN 特异性和敏感性更高的无创生物标志物。

第3章 材料与方法

3.1 在 SRA 数据库中下载数据

从 NCBI-SRA 数据库中下载 5 例 IMN 样本和 5 例健康人对照 (healthy control, HC) 样本尿外泌体 lncRNA 的测序数据。

3.2 lncRNA 的注释

Cufflinks 计算对比到每个 lncRNA 的 reads, 并使用每个 lncRNA 的长度标准化这个计数。通过 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments) 确保不同 lncRNA 的表达水平可以进行比较。

3.3 鉴定差异表达的 lncRNA

应用 cuffdiff 软件计算并检测两组样本间的差异表达 lncRNA。按照 $\text{Fold change} \geq 2.0$, 即 $|\log_2(\text{FC})| \geq 1.0$, $P \text{ 值} \leq 0.05$, 以及 FPKM 值至少在一个样本中 ≥ 0.5 作为差异表达 lncRNA 的标准, 筛选出显著差异表达的 lncRNA。

3.4 生物信息学分析

3.4.1 绘制图表

应用 edgeR 软件, 计算 $\log_2(\text{FC})$ 值和 P 值, 并应用 R 语言计算 $\log \text{FPKM}$ 值和均值, 应用 Python 语言 matplotlib 包绘制火山图和

散点图。应用 R 的 heatmap2 函数，以 FPKM 值进行差异表达 lncRNA 聚类分析。

3.4.2 差异表达 lncRNA 靶基因 GO 功能分析

GO 计划提供了一个受控词汇表来描述任何生物体中的基因和基因产物属性。其本体包括生物过程 (Biological Process, BP)、细胞成分 (Cellular Component, CC) 和分子功能 (Molecular Function, MF)。对差异表达 lncRNA 靶基因进行 GO 功能分析，注释并推测这些 lncRNA 的功能。Fisher 精确检验用于查找基因列表和 GO 注释列表之间的重叠是否比偶然预期的更多。P 值表示基因中 GO 项富集的重要性，P 值越低，GO Term 越重要，设定 $P \leq 0.05$ 为显著富集的标准。

3.4.3 差异表达 lncRNA 靶基因 KEGG 通路分析

KEGG 通路分析是将基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学中的分子数据映射到 KEGG 通路图上，并解释这些分子的生物学功能。对差异表达 lncRNA 靶基因进行 KEGG 通路分析，注释并推测这些 lncRNA 参与的通路。Fisher P 值表示与条件相关的通路的重要性，P 值越小，越显著，设定 $P \leq 0.05$ 为显著富集的标准。

第 4 章 结果

4.1 尿外泌体 lncRNA reads 统计

如表 4.1 所示，样本的 clean reads 占比在均在 99%以上，且基因比对率均超过 68%，比对效果良好。

表 4.1 reads 统计

Sample	Raw reads	Clean reads	Clean ration	Aligned reads	Aligned rate
IMN-1	95,582,556	95,399,850	99.81%	82,202,100	86.17%
IMN-2	80,113,488	80,020,974	99.88%	66,039,208	82.53%
IMN-3	80,207,992	79,936,570	99.66%	68,594,915	85.81%
IMN-4	80,254,068	80,071,194	99.77%	71,623,527	89.45%
IMN-5	95,908,420	95,781,818	99.87%	86,548,180	90.36%
HC-1	83,597,758	83,514,968	99.90%	73,731,186	88.28%
HC-2	88,811,678	88,771,316	99.95%	79,856,816	89.96%
HC-3	89,942,936	89,819,898	99.86%	78,601,561	87.51%
HC-4	90,838,408	90,586,124	99.72%	61,693,142	68.10%
HC-5	83,129,710	83,058,026	99.91%	69,278,042	83.41%

注：Clean ration 为 Clean reads 占 Raw reads 的百分比。

4.2 尿外泌体差异表达的 lncRNA 表达谱分析

对 lncRNA 的测序结果进行分析，将 Fold change ≥ 2 和 P 值 ≤ 0.05 作为筛选标准，如火山图（图 4.1 A）和散点图（图 4.1C）所示，在 IMN 组和 HC 组中 lncRNA 的表达有显著差异性，表达上调的 lncRNA 数量相较于下调的 lncRNA 明显偏少。同时聚类热图（图 4.1B）提示

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/655233103244011111>