

## 论 著

## miR-30a和SNAI1基因多态性与糖尿病肾病的相关性分析

杨彩莲, 童涛, 孙明芳, 周波\*

重庆医科大学附属第一医院内分泌科, 重庆 400016

**[摘要]** **目的** 探讨微小RNA-30a(miR-30a)和SNAI1单核苷酸多态性与2型糖尿病(T2DM)患者发生糖尿病肾病(DKD)的相关性。**方法** 纳入2018年10月—2019年9月重庆医科大学附属第一医院内分泌科收治的520例T2DM患者进行回顾性分析, 其中240例T2DM合并DKD的患者为病例组, 280例T2DM不合并DKD的患者为对照组。采用TaqMan探针等位基因特异性杂交法检测miR-30a rs2222722和SNAI1 rs1543442的单核苷酸多态性, 计算各组基因型及等位基因频率, 采用logistic回归分析DKD的独立危险因素, 分析各变量对DKD发生的影响。**结果** 在T2DM患者中, miR-30a rs2222722的CC基因型携带者较TT、CT基因型携带者更易发生DKD( $OR=2.73$ ,  $95\%CI$  1.61~4.61,  $P<0.001$ ), 且CC基因型是肾小球滤过率下降( $OR=2.13$ ,  $95\%CI$  1.37~3.32,  $P=0.001$ )及尿微量白蛋白/肌酐比值(ACR)升高( $OR=1.59$ ,  $95\%CI$  1.08~2.34,  $P=0.019$ )的危险因素。SNAI1 rs1543442 GG基因型携带者较AA、AG基因型携带者更易发生DKD( $OR=1.70$ ,  $95\%CI$  0.73~1.58,  $P=0.036$ )。**结论** miR-30a rs2222722 CC基因型和SNAI1 rs1543442 GG基因型是DKD发生的危险因素, 且miR-30a rs2222722 CC基因型与肾小球滤过率下降和ACR升高的产生密切相关。

**[关键词]** 单核苷酸多态性; 微小RNA-30a; SNAI1; 糖尿病肾病

**[中图分类号]** R58

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0577-7402(2021)09-0899-07

**[DOI]** 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.09.09

## Relation of miR-30a and SNAI1 gene polymorphism to diabetic nephropathy

Yang Cai-Lian, Tong Tao, Sun Ming-Fang, Zhou Bo\*

Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

\*Corresponding author, E-mail: zhoub915@126.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81370940)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the possible relation of miR-30a rs2222722 and its potential target gene SNAI1 rs1543442 mononucleotide polymorphisms to diabetic kidney disease (DKD) in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** A total of 520 patients with T2DM, admitted in the Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from October 2018 to September 2019, were included in present study. Of them 240 cases concurred with DKD were set as case group, the other 280 cases non-concurred with DKD as control group. Allele specific TaqMan probe hybridization method was employed to detect the single nucleotide polymorphisms of miR-30a rs2222722 (C>T) and SNAI1 rs1543442 (G>A), and calculate the genotype and allele frequencies of each group. Logistic regression analysis was performed to analyze the independent risk factor of DKD, and the effects of various variables on DKD. **Results** Among patients with T2DM, the CC genotype carriers of miR-30a rs2222722 were more prone to DKD than the TT and CT genotype carriers ( $OR=2.73$ ,  $95\%CI$  1.61-4.61,  $P<0.001$ ). Moreover, the CC genotype was the risk factor of the decreased glomerular filtration rate ( $OR=2.13$ ,  $95\%CI$  1.37-3.32,  $P=0.001$ ) and the increased urinary microalbumin/creatinine ratio (ACR) ( $OR=1.59$ ,  $95\%CI$  1.08-2.34,  $P=0.019$ ). What's more, the GG genotype carriers of SNAI1 rs1543442 was more prone to DKD than the AA and AG genotype carriers ( $OR=1.70$ ,  $95\%CI$  0.73-1.58,  $P=0.036$ ). Multivariate logistic regression analysis showed that the miR-30a CC and SNAI1 GG genotype were independent risk factors to the development of DKD. **Conclusions** The CC genotype of miR-30a rs2222722 and GG genotype of SNAI1 rs1543442 might be the risk factors for the occurrence of diabetic kidney disease. And miR-30a rs2222722 CC genotype is closely related to the decrease of glomerular filtration rate and the increase ACR.

**[Key words]** single nucleotide polymorphism; microRNA-30a; SNAI1; diabetic kidney disease

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81370940)

**[作者简介]** 杨彩莲, 硕士研究生, 主要从事糖尿病并发症的基础与临床研究

**[通信作者]** 周波, E-mail: zhoub915@126.com

糖尿病肾病(DKD)以持续性蛋白尿或肾小球滤过率(GFR)下降为特征,是导致终末期肾病(ESKD)的主要原因<sup>[1-2]</sup>。随着糖尿病发病率的上升,尽管临床上使用了各种控制血糖、血压的药物,以及生活方式的干预策略,DKD的发生率仍不断增长<sup>[3]</sup>。目前研究发现,高血糖、脂质代谢紊乱、氧化应激、炎症反应和多种细胞因子反应均与DKD的发展密切相关,但其机制尚未完全明确<sup>[4-7]</sup>。多项临床及流行病学研究证实,遗传因素对DKD的发生也有着不可忽视的作用<sup>[8-12]</sup>。微小RNA(microRNAs, miR)为非编码小分子RNA,可通过参与调控相关基因的表达而影响各种肾脏疾病的发生发展<sup>[13-17]</sup>,其中miR-30a因在肾脏组织中的高丰度表达而备受关注<sup>[18-20]</sup>。本课题组既往研究发现,锌指转录因子SNAI1作为miR-30a的潜在靶基因(<http://www.targetscan.org/>, <https://www.mirbase.org/>),在体外高糖环境诱导的足细胞上皮-间质细胞转分化(EMT)过程中明显上调,且具有代谢记忆现象<sup>[21]</sup>。NCBI基因库数据显示,rs2222722位于miR-30a基因编码区,其多态性可能影响miR-30a的表达与功能。已有研究证实,rs2222722基因多态性与原发性肾病综合征<sup>[22]</sup>及各种肿瘤<sup>[23-25]</sup>的发生密切相关。而rs1543442位于SNAI1基因的3'端非编码区,是miR-30a调控SNAI1基因表达可能的功能位点,该位点的基因多态性很可能与SNAI1基因的表达相关。鉴于目前尚未见miR-30a rs2222722和SNAI1 rs1543442单核苷酸基因多态性与DKD关系的报道,本研究以表观遗传调节为切入点,采用病例对照设计,探讨miR-30a rs2222722和SNAI1 rs1543442单核苷酸基因多态性与中国重庆地区2型糖尿病(T2DM)患者发生DKD的关系,以及DKD在基因水平的危险因素,旨在为早期筛查易感患者并进行干预、延缓DKD的发生和进展提供前期依据。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 纳入2018年10月—2019年9月重庆医科大学附属第一医院内分泌科收治的520例T2DM患者进行回顾性分析,其中240例T2DM合并DKD的患者为病例组,280例T2DM不合并DKD的患者为对照组。DKD的诊断依据为2012年KDIGO指南<sup>[26]</sup>。纳入标准:(1)根据1999年世界卫生组织公布的糖尿病诊断和分型标准,确诊为T2DM的患者<sup>[27]</sup>;(2)年龄 $\geq 40$ 岁,汉族,相互无亲缘关系;(3)糖尿病病程 $\geq 5$ 年。排除标准:(1)有急性应激状态史如手术史、高血糖危象、心力衰竭或尿路感染等;(2)有各种肿瘤、活动性肝脏疾病、遗传性疾病或自身免疫性疾病史;(3)有其他原因引起的

肾功能损害并影响尿微量白蛋白/肌酐比值(ACR)者。本研究已获重庆医科大学第一附属医院伦理委员会批准(批号:2020-480)。

**1.2 基因多态性检测** 收集外周血400  $\mu$ l,利用DNA提取试剂盒(QIAamp DNA blood mini kit,德国Qiagen公司)提取基因组DNA。使用NanoDrop 2000C分光光度计(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)测量基因组DNA的浓度和纯度。采用TaqMan-MGB探针等位基因特异性杂交法检测miR-30a rs2222722和SNAI1 rs1543442的单核苷酸多态性,反应体系包括2  $\mu$ l DNA、12.5  $\mu$ l TaqMan PCR酶、10  $\mu$ l三蒸水、1.0  $\mu$ l TaqMan FAM探针、1.0  $\mu$ l TaqMan HEX探针、1  $\mu$ l正向引物和1  $\mu$ l反向引物。扩增条件为:95  $^{\circ}$ C 30 s、95  $^{\circ}$ C 5 s、60  $^{\circ}$ C 30 s,持续40个周期。用于检测单核苷酸多态性(SNPs)的引物和探针由TaKaRa Bio公司提供(RS2222722探针C FAM-TGTACGCTTTAcGCTGT-MGB,探针T HEX-ATGTACGCTTTAtGCTGTT-MGB,正向引物TAGTCTAAGTTCCTCAACTGCAGTATTTG,反向引物GCAAAAGTGACCAAACACAGAAAC;RS1543442探针A FAM-CTTCCCATGGCCAT-MGB,探针G HEX-AAGAGGCCTTCCCGTG-MGB,正向引物TTGATGAAGACCATTTTCTGGTTCT,反向引物GATACAAAACCCACGCAGACA),扩增仪器为CFX96实时PCR检测仪(美国Bio-Rad公司)。随机选择DNA扩增样本,由上海生工生物科技公司进行测序,以验证TaqMan-MGB法测定基因型的准确性。结果表明,本研究使用的TaqMan-MGB检测方法准确率为100%。

**1.3 DKD的危险因素分析** 分析病例组与对照组各临床和生化指标的差异及miR-30a rs2222722、SNAI1 rs1543442基因型的分布情况,筛选出DKD的危险因素,对其临床特征进行分层分析,并分析各临床特征与估算肾小球滤过率(eGFR)和ACR的相关性,然后对miR-30a rs2222722、SNAI1 rs1543442各基因型对DKD的发生是否存在协同作用进行分析。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS 21.0软件进行统计分析。对两个目标位点基因型的分布情况进行Hardy-Weinberg平衡分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验;偏态分布的以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,对组间不符合正态分布的连续变量的差异性分析采用非参数检验法。计数资料以例(%)表示,组间比较采用Pearson  $\chi^2$ 检验。采用logistic回归分析对可能影响结果的混杂因素进行调整,分析miR-30a和SNAI1单核苷酸多态性与DKD发生的关系,采用比值比(OR)和95%可信区间(CI)表示各变量对DKD发生的影响。 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

## 2 结果

**2.1** 两组患者临床及生化指标的差异 与对照组比较, 病例组患者年龄大, 收缩压、脉压差、纤

维蛋白原、C反应蛋白和ACR高, 糖尿病、高血压病程长, 吸烟率、饮酒率和eGFR低; 而两组的性别、体重指数(BMI)、舒张压、空腹血糖、糖化血红蛋白(HbA<sub>1c</sub>)、血脂等指标差异均无统计学意义( $P>0.05$ )(表1)。

表1 病例组与对照组一般资料比较

Tab.1 Comparison of general characteristics of patients in case and control groups

指标	病例组(n=240)	对照组(n=280)	P
年龄(岁, $\bar{x}\pm s$ )	67.8 ± 10.0	60.0 ± 9.3	<0.001
性别(男/女)	120/120	163/117	0.061
糖尿病病程(年, $\bar{x}\pm s$ )	12.40 ± 6.76	9.67 ± 5.67	<0.001
高血压病程[年, $M(Q_1, Q_3)$ ]	5(0, 10)	0(0, 8)	<0.001
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ , $\bar{x}\pm s$ )	24.88 ± 3.94	25.28 ± 3.30	0.204
收缩压(mmHg, $\bar{x}\pm s$ )	138.24 ± 18.49	129.62 ± 16.07	<0.001
舒张压(mmHg, $\bar{x}\pm s$ )	76.50 ± 10.96	76.38 ± 9.43	0.891
脉压差(mmHg, $\bar{x}\pm s$ )	61.74 ± 14.01	53.05 ± 12.21	<0.001
吸烟[例(%)]	54(22.5)	97(34.6)	0.002
饮酒[例(%)]	45(18.8)	82(29.3)	0.005
空腹血糖(mmol/L, $\bar{x}\pm s$ )	9.65 ± 4.70	8.956 ± 3.40	0.052
HbA <sub>1c</sub> (%, $\bar{x}\pm s$ )	8.50 ± 2.11	8.37 ± 2.05	0.492
总胆固醇(mmol/L, $\bar{x}\pm s$ )	4.64 ± 1.45	4.54 ± 1.39	0.388
三酰甘油(mmol/L, $\bar{x}\pm s$ )	2.16 ± 2.27	2.32 ± 2.90	0.513
HDL-C (mmol/L, $\bar{x}\pm s$ )	1.16 ± 0.33	1.15 ± 0.33	0.915
LDL-C (mmol/L, $\bar{x}\pm s$ )	2.76 ± 1.07	2.66 ± 0.92	0.272
纤维蛋白原(g/L, $\bar{x}\pm s$ )	3.25 ± 0.73	2.90 ± 0.64	<0.001
高敏C反应蛋白(mg/L, $\bar{x}\pm s$ )	2.15 ± 2.83	1.39 ± 1.85	<0.001
ACR[mg/g, $M(Q_1, Q_3)$ ]	62.60(15.15, 299.15)	5.75(2.80, 12.45)	<0.001
eGFR[ml/(min·1.73 m <sup>2</sup> ), $\bar{x}\pm s$ ]	60.16 ± 26.96	95.23 ± 26.21	<0.001

BMI. 体重指数; HbA<sub>1c</sub>. 糖化血红蛋白; HDL-C. 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C. 低密度脂蛋白胆固醇; ACR. 尿微量白蛋白/肌酐比值; eGFR. 估算肾小球滤过率

**2.2** miR-30a rs2222722、SNAI1 rs1543442各基因型与DKD的关系 Logistic回归分析结果显示, 在显性模型中, miR-30a rs2222722 C等位基因携带者发生DKD的风险是T等位基因携带者的2.61倍(校正95%CI 1.09~6.27,  $P=0.032$ )。在隐性模型中, rs2222722 CC基因型携带者发生DKD的风险是CT或TT基因型携带者的2.73倍(校正95%CI 1.61~4.61,  $P<0.001$ )。此外, 在SNAI1 rs1543442隐性模型中, 校正相关混杂因素后, GG基因型也显著增加了携带者发生DKD的风险(校正OR=1.70, 95%CI 0.73~1.58,  $P=0.036$ )(表2)。

**2.3** 临床特征分层分析 根据年龄、性别、糖尿病病程、HbA<sub>1c</sub>和BMI水平对两组研究对象进行分层, 分析在不同人群中miR-30a rs2222722(C>T)和SNAI1 rs1543442(G>A)各基因型与DKD之间的相关性。结果显示, miR-30a rs2222722 (C>T)CC基因型与DKD的关系在较年轻(<65岁)、血糖控制较差(HbA<sub>1c</sub>>8%)、BMI较低(<24 kg/m<sup>2</sup>)的研究对象中更明显( $P<0.05$ )。SNAI1 rs1543442(G>A)GG基因型与

DKD的关系在男性、糖尿病病程<10年、HbA<sub>1c</sub><8%和BMI<24 kg/m<sup>2</sup>的研究对象中更明显(表3)。

**2.4** miR-30a rs2222722和SNAI1 rs1543442基因型与eGFR和蛋白尿的关系 采用logistic回归法进一步分析miR-30a rs2222722和SNAI1 rs1543442不同基因型与eGFR和ACR升高的关系, 校正年龄和性别后发现, 在miR-30a rs2222722(C>T)隐性模型(TT+CT vs. CC)中, CC基因型携带者较TT+CT基因型携带者更容易发生eGFR下降(OR=2.13, 95%CI 1.37~3.32,  $P=0.001$ )及ACR升高(OR=1.59, 95%CI 1.08~2.34,  $P=0.019$ ), 且C等位基因携带者发生eGFR降低(OR=1.59, 95%CI 1.15~2.18,  $P=0.005$ )及ACR升高(OR=1.43, 95%CI 1.07~1.91,  $P=0.015$ )的风险也明显高于T等位基因携带者。然而, 在SNAI1 rs1543442(G>A)隐性和显性模型中, 均未见与eGFR降低和ACR升高有相关性(表4)。

**2.5** DKD独立危险因素分析 Logistic回归分析结果显示, miR-30a rs2222722的CC基因型和SNAI1 rs1543442的GG基因型是DKD的独立危险因素(表5)。

表2 mir-30a rs2222722和SNAI1 rs1543442基因型与DKD的关系

Tab.2 Correlation of miR-30a rs2222722 and SNAI1 rs1543442 genotype with DKD in diabetic patients

基因	基因型	未调整模型		调整模型 <sup>a</sup>	
		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
miR-30a rs2222722	TT	参照		参照	
	CT	1.10(0.62~1.97)	0.748	1.69(0.68~4.25)	0.262
	CC	1.84(1.02~3.23)	0.042	4.20(1.66~10.66)	0.002
	显性模型(CT+CC vs. TT)	1.39(0.80~2.42)	0.242	2.61(1.09~6.27)	0.032
	隐性模型(CC vs. CT+TT)	1.70(1.20~2.43)	0.003	2.73(1.61~4.61)	<0.001
	等位基因(C vs. T)	1.42(1.10~1.84)	0.007	2.07(1.42~3.02)	<0.001
SNAI1 rs1543442	AA	参照		参照	
	AG	0.83 (0.39~1.77)	0.626	0.40(0.13~1.31)	0.130
	GG	1.25(0.59~2.64)	0.557	0.76(0.24~2.41)	0.637
	显性模型(AG+GG vs. AA)	1.04(0.50~2.16)	0.909	0.58(0.18~1.80)	0.343
	隐性模型(GG vs. AA+AG)	1.47(1.04~2.09)	0.028	1.70(0.73~1.58)	0.036
	等位基因(G vs. A)	1.29(0.98~1.70)	0.073	1.33(0.89~1.99)	0.171

<sup>a</sup>校正因素：年龄、糖尿病病程、高血压病程、收缩压、总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、纤维蛋白原、高敏C反应蛋白

表3 临床特征分层分析miR-30a和SNAI1单核苷酸多态性与DKD的关系

Tab.3 Stratified analysis of the correlation between the miR-30a SNAI1 SNP and risk of DKD

基因	指标	基因型	病例组 vs. 对照组		
			OR (95% CI)	P	
miR-30 rs2222722	年龄(岁)	CC vs. CT+TT	2.52(1.48~4.28)	0.001	
		≥65	1.590(0.93~2.73)	0.092	
	性别	男	1.85(1.15~2.98)	0.012	
		女	1.67(0.98~2.86)	0.060	
	糖尿病病程(年)	<10	1.75(1.01~3.07)	0.048	
		≥10	1.67(1.04~2.67)	0.032	
	HbA <sub>1c</sub> (%)	<8	1.61(0.98~2.66)	0.060	
		≥8	1.82(1.10~3.02)	0.020	
	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<24	1.20(1.11~3.60)	0.021	
		≥24	1.53(0.97~2.39)	0.065	
	SNAI1 rs1543442	年龄(岁)	GG vs. AA+AG	1.47(0.88~2.48)	0.145
			≥65	1.23(0.74~2.05)	0.429
		性别	男	1.64(1.01~2.64)	0.044
			女	1.33(0.80~2.22)	0.272
糖尿病病程(年)		<10	1.97(1.12~3.45)	0.018	
		≥10	1.26(0.80~1.99)	0.316	
HbA <sub>1c</sub> (%)		<8	1.91(1.16~3.15)	0.011	
		≥8	1.17(0.72~1.91)	0.532	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )		<24	1.78(1.01~3.15)	0.048	
		≥24	1.28(0.82~2.00)	0.269	

HbA<sub>1c</sub>. 糖化血红蛋白; BMI. 体重指数

表4 miR-30a和SNAI1单核苷酸多态性与eGFR≤60 ml/(min·1.73 m<sup>2</sup>)和ACR≥30 mg/g的关系

Tab.4 Correlation between miR-30a, SNAI1 SNP genotypes and the risk of eGFR ≤60 ml/(min·1.73 m<sup>2</sup>) and ACR ≥30 mg/g

基因	遗传模型	ACR ≥30 mg/g vs. ACR <30 mg/g		eGFR ≤60 ml/(min·1.73 m <sup>2</sup> ) vs. eGFR >60 ml/(min·1.73 m <sup>2</sup> )	
		OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P
miR-30a rs2222722	显性模型(CT+CC vs. TT)	1.02(0.99~1.03)	0.107	1.39(0.70~2.74)	0.347
	隐性模型(CC vs. CT+TT)	1.59(1.08~2.34)	0.019	2.13(1.37~3.32)	0.001
	等位基因(C vs. T)	1.43(1.07~1.91)	0.015	1.59(1.15~2.18)	0.005
SNAI1 rs1543442	显性模型(AG+GG vs. AA)	1.14(0.49~2.61)	0.764	1.04(0.39~2.79)	0.946
	隐性模型(GG vs. AA+AG)	1.19(0.81~1.74)	0.383	1.44(0.99~2.10)	0.080
	等位基因(G vs. A)	1.14(0.83~1.55)	0.419	1.30(0.91~1.84)	0.149

ACR. 尿微量白蛋白/肌酐比值; eGFR. 估算肾小球滤过率

2.6 miR-30a rs2222722和SNAI1 rs1543442基因型协同作用分析 进一步分析miR-30a rs2222722和SNAI1 rs1543442各基因型间是否存在增加DKD发生风险

的协同作用, 结果未发现两个位点基因型间存在协同作用(P>0.05, 表6)。

表5 DKD独立危险因素分析

Tab.5 Analysis on the independent risk factors for DKD

独立变量	β	SE	P	OR	95%CI
年龄	0.082	0.015	<0.001	1.085	1.053~1.119
收缩压	0.017	0.008	0.024	1.017	1.002~1.032
纤维蛋白原	0.664	0.205	0.001	1.942	1.298~2.905
CC(miR-30a rs2222722)	1.199	0.283	0.000	3.317	1.905~5.776
GG(SNAI1 rs1543442)	0.812	0.274	0.003	2.253	1.317~3.854
ACEI/ARB使用	0.913	0.327	0.005	2.493	1.314~4.729

ACEI. 血管紧张素转化酶抑制剂; ARB. 血管紧张素 II 受体阻滞剂

表6 miR-30a rs2222722和SNAI1 rs1543442基因多态性对DKD发生的协同作用分析

Tab.6 Synergistic effect of miR-30a rs2222722 and SNAI1 rs1543442 polymorphisms on DKD

基因型	OR (95%CI)	P
miR-30a(rs2222722) SNAI1(rs1543442)		
CC	基线值	
	AG	0.51(0.09-2.89) 0.445
	GG	0.69(0.12-4.00) 0.683
CT+TT	基线值	
	AG	0.46(0.27-0.76) 0.003
	AA	0.74(0.32-1.74) 0.492

### 3 讨论

本研究结果显示, miR-30a rs2222722(C>T)CC基因型与DKD的发生存在明显相关性。在调整了相关混杂因素后, CC基因型携带者发生DKD的风险是CT和TT基因型患者的2.73倍; 进一步探讨miR-30a rs2222722基因型与ACR升高和eGFR水平之间的关系发现, CC基因型携带者较TT或CT基因型携带者更容易发生ACR升高和eGFR降低。

研究发现, 足细胞损伤在DKD的发生、发展中具有重要作用, 而EMT是DKD足细胞损伤的重要形式<sup>[28-31]</sup>。细胞发生EMT后细胞间连接和黏附减

弱, 失去了细胞极性和原始形态, 而细胞运动和迁移能力则增强<sup>[32-33]</sup>。足细胞发生EMT可能是足细胞功能障碍、蛋白尿和肾小球硬化的主要原因<sup>[30]</sup>。miR-30a以各种方式参与细胞不同的生理生化过程, 进而影响细胞的结构与功能, 其中也包括细胞EMT过程<sup>[34-35]</sup>。有研究发现, 在不同类型的肾脏疾病(如DKD、局灶节段性肾小球硬化和膜增生性肾小球肾炎)中, 人体肾脏穿刺活检发现miR-30a表达水平明显降低<sup>[20]</sup>, 而足细胞损伤是这些疾病的重要特征。还有研究发现, 经阿霉素(ADR)处理后的肾脏足细胞miR-30a表达水平明显降低, 当外源性给予miR-30a类似物时, 足细胞上皮标记物的表达则明显上调, 而间质细胞标记物在miR-30a模拟物的存在下其表达被抑制; 当足细胞转染外源性miR-30a抑制剂时, 其上皮标记物的表达下调, 而间质标记物的表达上调, 这表明miR-30a可能对预防足细胞EMT有着不可忽视的作用<sup>[36]</sup>。此外, 有研究发现, 在血管紧张素 II 诱导下, miR-30a在小鼠足细胞中的表达明显下调, 而给予外源性miR-30a类似物后, 小鼠肾小球及足细胞损伤得到明显改善<sup>[37]</sup>, 提示miR-30a对足细胞具有保护作用。

SNAI1 rs1543442的GG基因型也与DKD的发生相关, 在隐性模型中, rs1543442 GG基因型携带

者发生DKD的风险是AA或AG基因型携带者的1.70倍。作为miR-30a的一个潜在靶基因，SNAI1基因锌指结构域可与钙黏蛋白E(E-cadherin)启动子区域内的CAGGTG序列结合，导致E-cadherin的表达下调，启动细胞EMT过程<sup>[38]</sup>。据报道，SNAI1基因活化后通过下调E-cadherin抑制了肾小管上皮表型相关蛋白的表达，同时伴有波形蛋白、 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和I型胶原的表达上调，诱导了肾纤维化，因此，抑制SNAI1基因活性可能对抑制甚至逆转肾纤维化有重要意义<sup>[39]</sup>。且已有研究证实，miR-30a可通过下调SNAI1的表达抑制肝星状细胞的活化和EMT过程，延缓肝脏纤维化<sup>[40]</sup>。此外，在糖尿病性白内障模型中，miR-30a的上调可使SNAI1、 $\alpha$ -SMA及波形蛋白的表达水平降低，并抑制高糖和转化生长因子- $\beta_2$ (TGF- $\beta_2$ )诱导的细胞EMT过程<sup>[41]</sup>。但本研究结果显示SNAI1 rs1543442多态性与患者的ACR升高或eGFR水平无关；因此，SNAI1与DKD的关系仍需进一步研究。同时，本研究也未发现miR-30a rs2222722与SNAI1 rs1543442的多态性之间存在协同作用，miR-30a与SNAI1对足细胞EMT的影响的作用机制仍需进一步探讨。

本研究还根据患者年龄、性别、糖尿病病程、BMI和HbA<sub>1c</sub>水平对各基因型与DKD的相关性进行了分层分析。结果表明，rs2222722 CC基因型与DKD呈正相关，且在年龄<65岁、男性、BMI<24 kg/m<sup>2</sup>、血糖控制不良(HbA<sub>1c</sub>≥8%)的患者中更明显。而rs1543442 GG基因型携带者与DKD呈正相关，且在男性、糖尿病病程<10年、HbA<sub>1c</sub><8%、BMI<24 kg/m<sup>2</sup>的患者中更明显，提示miR-30a和SNAI1基因型与DKD发生的关系还与临床特征有关。

本研究也存在不足之处：(1)本研究的样本量较小，应招募更多的T2DM患者组成更大的研究队列，以提高结果的代表性；(2)尽管本研究结果显示在中国重庆汉族人群中，miR-30a rs2222722 CC基因型和SNAI1 rs1543442 GG基因型是T2DM患者发生DKD的危险因素，但仍需选择更多的基因位点来验证目标基因单核苷酸多态性与DKD之间的关系；(3)目前尚未有其他探讨miR-30a和SNAI1基因多态性与DKD关系的研究，本研究结果仍需在其他人群中进一步验证。

总之，本研究在中国重庆人群中发现miR-30a rs2222722(C>T)CC基因型和SNAI1 rs1543442(G>A)GG基因型与T2DM患者DKD的发生发展密切相关。此外，miR-30a rs2222722 CC基因型与eGFR降低和ACR升高也有密切联系，但尚需更大样本、多中心、前瞻性研究进一步验证。

## 【参考文献】

- [1] Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12(12): 2032-2045.
- [2] Tuttle K, Bakris G, Bilous R, et al. Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference[J]. *Am J Kidney Dis*, 2014, 64(4): 510-533.
- [3] Fogelfeld L, Hart P, Miernik J, et al. Combined diabetes-renal multifactorial intervention in patients with advanced diabetic nephropathy: proof-of-concept[J]. *J Diabetes Complications*, 2017, 31(3): 624-630.
- [4] Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(6): 327-340.
- [5] Gheith O, Farouk N, Nampoory N, et al. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors[J]. *J Nephropharmacol*, 2016, 5(1): 49-56.
- [6] Guo HY, Xing ZH, Wang LL, et al. Effects of silencing GDF15 gene on high glucose-induced apoptosis and oxidative stress in renal tubular epithelial cells[J]. *J Zhengzhou Univ (Med Sci)*, 2020, 55(3): 368-373. [郭海燕, 邢志华, 王丽丽, 等. 沉默GDF15基因表达对高糖诱导的肾小管上皮细胞凋亡和氧化应激的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2020, 55(3): 368-373.]
- [7] Wang XL, Hu CF, Tang LY, et al. Effects and mechanism of high ARNO expression on the permeability of human renal glomerular endothelial cells under high glucose condition[J]. *Med J Chin PLA*, 2020, 45(1): 55-61. [王小龙, 胡成芳, 唐璐瑶, 等. 高糖条件下高表达ARNO对人肾小球内皮细胞通透性的影响及其作用机制[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(1): 55-61.]
- [8] Sun YM, Su Y, Li J, et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 433(4): 359-361.
- [9] Brorsson C, Pociot F. Genetics of diabetic nephropathy in diverse ethnic groups[J]. *Contrib Nephrol*, 2011, 170: 8-18.
- [10] Wei L, Xiao Y, Li L, et al. The susceptibility genes in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2018, 4(4): 226-237.
- [11] Gu HF. Genetic and epigenetic studies in diabetic kidney disease[J]. *Front Genet*, 2019, 10: 507.
- [12] Agius E, Attard G, Shakespeare L, et al. Familial factors in diabetic nephropathy: an offspring study[J]. *Diabet Med*, 2006, 23(3): 331-334.
- [13] Chen YQ, Wang XX, Yao XM, et al. MicroRNA-195 promotes apoptosis in mouse podocytes via enhanced caspase activity driven by BCL2 insufficiency[J]. *Am J Nephrol*, 2011, 34(6): 549-559.
- [14] Long JY, Wang Y, Wang W, et al. Identification of microRNA-93 as a novel regulator of vascular endothelial growth factor in hyperglycemic conditions[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(30): 23457-23465.
- [15] Du R, Sun W, Xia L, et al. Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-34a promotes EMT by targeting the Notch signaling pathway in tubular epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30771.

- [16] Tang O, Chen XM, Shen S, *et al.* MiRNA-200b represses transforming growth factor- $\beta$ 1-induced EMT and fibronectin expression in kidney proximal tubular cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(10): F1266-F1273.
- [17] Tian LL, Li M, Li HF, *et al.* Prognostic value of serum miR-133b and miR-135b levels in patients with diabetic nephropathy[J]. *Clin J Med Offic*, 2019, 47(7): 739-741. [田霖林, 李敏, 李华峰, 等. 血清miR-133b、miR-135b水平对糖尿病肾病患者预后预测价值研究[J]. *临床军医杂志*, 2019, 47(7): 739-741.]
- [18] Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, *et al.* Podocyte-specific deletion of dicer alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(11): 2150-2158.
- [19] Agrawal R, Tran U, Wessely O. The miR-30 miRNA family regulates *Xenopus* pronephros development and targets the transcription factor *Xlim1/Lhx1*[J]. *Development*, 2009, 136(23): 3927-3936.
- [20] Baker MA, Davis SJ, Liu PY, *et al.* Tissue-specific MicroRNA expression patterns in four types of kidney disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(10): 2985-2992.
- [21] Zhang J, Yang CL, Zhang L, *et al.* Transcriptome analysis of podocyte to epithelial mesenchymal cell transformation in mouse high glucose memory model[J]. *Med J Chin PLA*, 2020, 45(2): 162-170. [张娇, 杨彩莲, 张路, 等. 小鼠高糖记忆模型中足细胞向上皮间质细胞转化的转录组学分析[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(2): 162-170.]
- [22] Yang R, Hong H, Wang M, *et al.* Correlation between single-nucleotide polymorphisms within miR-30a and related target genes and risk or prognosis of nephrotic syndrome[J]. *DNA Cell Biol*, 2018, 37(3): 233-243.
- [23] Xie K, Wang C, Qin N, *et al.* Genetic variants in regulatory regions of microRNAs are associated with lung cancer risk[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 47966-47974.
- [24] Sadeghi H, Nazemalhosseini-Mojarad E, Yaghoob-Taleghani M, *et al.* miR-30a promoter variation contributes to the increased risk of colorectal cancer in an Iranian population[J]. *J Cell Biochem*, 2018. doi: 10.1002/jcb.28047.
- [25] Wang W, Zhang H, Duan X, *et al.* Association of genetic polymorphisms of miR-145 gene with telomere length in omethoate-exposed workers[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 172: 82-88.
- [26] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease[J]. *Kidney Int Suppl*, 2013, 3: 1-150.
- [27] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation[J]. *Diabet Med*, 1998, 15(7): 539-553.
- [28] Dai HY, Ma LN, Cao Y, *et al.* Protection of CTGF antibody against diabetic nephropathy in mice via reducing glomerular  $\beta$ -catenin expression and podocyte epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(11): 3706-3712.
- [29] Li Y, Kang YS, Dai C, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(2): 299-308.
- [30] Liu YH. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(2): 212-222.
- [31] Reddy GR, Kotlyarevska K, Ransom RF, *et al.* The podocyte and diabetes mellitus: is the podocyte the key to the origins of diabetic nephropathy?[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008, 17(1): 32-36.
- [32] Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1776-1784.
- [33] Dai H, Liu Q, Liu B. Research progress on mechanism of podocyte depletion in diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 2615286.
- [34] Ferland-Mccollough D, Ozanne SE, Siddle K, *et al.* The involvement of microRNAs in type 2 diabetes[J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(6): 1565-1570.
- [35] Lin YC, Chang YH, Yang SY, *et al.* Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease[J]. *J Formos Med Assoc*, 2018, 117(8): 662-675.
- [36] Peng R, Zhou L, Zhou Y, *et al.* MiR-30a inhibits the epithelial-mesenchymal transition of podocytes through downregulation of NFATc3[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 24032-24047.
- [37] Zhao Y, Wu JN, Zhang MC, *et al.* Angiotensin II induces calcium/calcineurin signaling and podocyte injury by downregulating microRNA-30 family members[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(8): 887-898.
- [38] Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer[J]. *Development*, 2005, 132(14): 3151-3161.
- [39] Prunotto M, Chaykovska L, Bongiovanni M, *et al.* Tubular cytoplasmic expression of zinc finger protein SNAI1 in renal transplant biopsies: a sign of diseased epithelial phenotype?[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(1): 55-69.
- [40] Zheng J, Wang W, Yu F, *et al.* MicroRNA-30a suppresses the activation of hepatic stellate cells by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(1): 82-92.
- [41] Zhang L, Wang Y, Li WF, *et al.* MicroRNA-30a regulation of epithelial-mesenchymal transition in diabetic cataracts through targeting SNAI1[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1117.

(收稿日期: 2021-05-26; 修回日期: 2021-07-19)

(责任编辑: 张小利)