

环境镉暴露致肾功能损伤：TGF- β 1/Smad3及其相关微小RNA的作用

雷立健, 康辉, 郭建勇, 史秀京, 张真, 高媛媛, 张国艳

山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室, 山西 太原 030001

摘要:

[背景] 镉是一种重要的环境污染物, 低剂量环境镉暴露能够对机体产生健康损伤。肾脏是镉毒性作用重要的靶器官之一, 但目前关于镉暴露致肾损伤的机制尚不清楚。

[目的] 探讨低剂量环境镉暴露与外周血转化生长因子(TGF)- β 1/Smad3、相关微小RNA(miRNA)和肾损伤的关系。

[方法] 选择有污染灌溉史的某社区居民223人为暴露组, 选择与该社区相距约32 km无污染灌溉史的某社区居民237人为对照组。采用面对面问卷调查的形式收集镉暴露区和非镉暴露区居民的一般情况; 采集空腹静脉血检测血浆TGF- β 1及Smad3, 采集尿液检测尿N-乙酰- β -葡萄糖苷酶(UNAG)、尿白蛋白(UALB)、尿肾损伤因子1(UKim-1)以及尿镉水平。分析尿镉与血浆TGF- β 1/Smad3及肾功能指标的关系。通过1:1匹配的病例对照研究设计在镉接触肾损伤组和对照组中比较血浆TGF- β 1/Smad3相关miRNA的表达水平。

[结果] 暴露组人群尿镉的总体水平为1.06 μ g/g(以肌酐校正, 余同), 高于对照组(0.74 μ g/g)($P < 0.001$)。此外, 镉暴露组血浆TGF- β 1、血浆Smad3、UNAG和UALB水平均高于对照组(均 $P < 0.05$)。暴露组UNAG和UALB的水平以及对照组UNAG和UKim-1水平均随年龄增加而增加(均 $P_{趋势} < 0.01$)。Pearson相关分析结果显示, 血浆TGF- β 1水平与UNAG、血浆Smad3水平呈正相关关系($r = 0.133, P < 0.001$; $r = 0.091, P < 0.05$)。回归分析结果显示, UNAG($b = 0.285, 95\%CI: 0.076 \sim 0.494$)、UALB($b = 0.738, 95\%CI: 0.385 \sim 1.092$)和UKim-1($b = 0.038, 95\%CI: 0.014 \sim 0.062$)的变化与尿镉关系密切。镉暴露且肾损伤组miRNA-21、miRNA-192和miRNA-126的表达水平均高于对照组(均 $P < 0.001$)。

[结论] 环境镉暴露人群血浆TGF- β 1、Smad3水平增加, miRNA-21、miRNA-192和miRNA-126表达水平的增加与镉暴露相关肾损伤可能有关。

关键词: 镉暴露; 转化生长因子- β 1; Smad3; 微小RNA; 肾损伤

Renal impairment induced by environmental cadmium exposure: Role of TGF- β 1/Smad3 and related microRNAs LEI Li-jian, KANG Hui, GUO Jian-yong, SHI Xiu-jing, ZHANG Zhen, GAO Yuan-yuan, ZHANG Guo-yan (Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:

[Background] Cadmium is a major environmental pollutant, and can induce damage to human health at low levels. Kidney is one of the target organs of cadmium. However, the mechanism of renal impairment caused by cadmium exposure is not clear yet.

[Objective] This study is designed to evaluate the relationship of low-level environmental cadmium exposure with plasma transforming growth factor (TGF)- β 1/Smad3, related microRNAs (miRNA), and kidney injury.

[Methods] A total of 223 community residents from a village irrigated with cadmium polluted water were selected as exposed group, and 237 community residents from a village 32 km away from the polluted area and not irrigated with cadmium polluted water were selected as control group. A face-to-face questionnaire survey was conducted to collect general information of the residents from cadmium polluted and non-polluted areas. Fasting venous blood samples were collected to detect plasma TGF- β 1 and Smad3, and urinary samples were also collected to detect urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (UNAG), albumin (UALB), kidney injury molecule-1

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18819

基金项目

国家自然科学基金(81273040, 81872701); 山西省出国留学人员科研资助项目(2015-055)

作者简介

雷立健(1970—), 女, 博士, 副教授; E-mail: wwdlijian@sxmu.edu.cn

通信作者

雷立健, E-mail: wwdlijian@sxmu.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-12-10

录用日期 2019-02-27

文章编号 2095-9982(2019)06-0511-08

中图分类号 R124

文献标志码 A

引用

雷立健, 康辉, 郭建勇, 等. 环境镉暴露致肾功能损伤: TGF- β 1/Smad3及其相关微小RNA的作用[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(6): 511-518.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18819

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LEI Li-jian, E-mail: wwdlijian@sxmu.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2018-12-10

Accepted 2019-02-27

To cite

LEI Li-jian, KANG Hui, GUO Jian-yong, et al. Renal impairment induced by environmental cadmium exposure: Role of TGF- β 1/Smad3 and related microRNAs[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(6): 511-518.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18819

(UKim-1), and cadmium. The associations among urinary cadmium, plasma TGF- β 1/Smad3, and kidney injury were analyzed. The expressions of miRNAs between cadmium exposure with kidney damage group and control group were compared by 1:1 matched case-control design.

[Results] The urinary cadmium level of the exposed group (1.06 $\mu\text{g/g}$, adjusted by urinary creatinine, thereafter) was higher than that of the control group (0.74 $\mu\text{g/g}$) ($P < 0.001$). Compared with the control group, the levels of plasma TGF- β 1, plasma Smad3, UNAG, and UALB were significantly higher in the exposed group ($P < 0.05$). With the increasing of age, the levels of UNAG and UALB in the exposed group and the levels of UNAG and UKim-1 in the control group increased significantly ($P_{\text{trend}} < 0.01$). The Pearson correlation analysis results showed that plasma TGF- β 1 had a positive correlation with UNAG and plasma Smad3 ($r = 0.133$, $P < 0.001$; $r = 0.091$, $P < 0.05$). The regression analysis results showed that urinary cadmium was closely associated with UNAG ($b = 0.285$, 95%CI: 0.076-0.494), UALB ($b = 0.738$, 95%CI: 0.385-1.092), and UKim-1 ($b = 0.038$, 95%CI: 0.014-0.062). The expression levels of miRNA-21, miRNA-192, and miRNA-126 were higher in the cadmium exposure and kidney damage group than those of the control group.

[Conclusion] The levels of peripheral blood TGF- β 1 and Smad3 are increased among the participants with low-level environmental exposure to cadmium. The increasing expression levels of miRNA-21, miRNA-192, and miRNA-126 might be involved in the renal impairment associated with cadmium exposure.

Keywords: cadmium exposure; transforming growth factor- β 1; Smad3; microRNA; renal impairment

慢性肾脏疾病指因肾脏功能受损而出现的一系列临床综合征。2017年,高收入国家慢性肾脏疾病患病率为11%,而在中低收入国家慢性肾脏疾病的风险更高^[1],所以慢性肾脏疾病已为国际公共健康资源带来了沉重的负担。大量的研究证实肾脏毒性是慢性镉暴露者最早出现、也是最严重的毒性作用。进入体内的镉1/3蓄积在肾脏近曲小管上皮细胞,可导致肾小管出现相应的功能障碍,低分子蛋白尿即为表现形式之一^[2]。长期低剂量的镉暴露可能会导致反映肾小管功能损伤的尿N-乙酰- β -葡萄糖苷酶(urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase, UNAG)和尿肾损伤因子1(urinary kidney injury molecule 1, UKim-1)以及反映肾小球损伤的尿白蛋白(urinary albumin, UALB)在尿液中排出量增加。慢性镉暴露通过氧化应激介导细胞毒性,导致肾脏纤维化的病理学改变^[3-5]。转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)/Smad信号通路是肾纤维化的主要通路^[6-7],其中Smad3是促进肾脏纤维化的重要调节因子^[8]。有研究表明,TGF- β /Smads信号通路可以对微小RNA(miRNA)的转录及转录后水平进行调控^[9-11]。本研究拟探讨外周血TGF- β 1和Smad3水平及其相关miRNA(miRNA-21, miRNA-192, miRNA-126)与镉暴露所致肾损害之间的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

选择某市有污染灌溉史、且土壤镉含量较高(0.238 mg/kg)^[12]的某社区居民为镉暴露组(该社区居民长期食用自产农作物),选择土壤镉含量较低(0.077 mg/kg)^[13]相距约32 km的社区居民为对照组,

于2015年4—6月期间采用方便抽样的方法抽取调查对象。两组研究对象经济水平相近,生活行为方式相似。调查对象纳入标准:年龄>20周岁、无镉职业暴露史、在当地居住5年以上者。排除标准:①急性心、肝、肾及呼吸衰竭等疾病患者;②严重听力、视力障碍及重度痴呆者;③不接受调查者。剔除信息不完整、生物样品不足者后,460名研究对象被纳入本次研究,其中镉暴露组223人,对照组237人。所有研究对象均被告知研究内容及注意事项。由经统一培训的调查员进行问卷调查。本研究经山西医科大学伦理委员会批准(No.2012009),参与此次调查的所有研究对象均知情同意。

1.2 主要仪器与试剂

Agilent 7700电感耦合等离子体质谱仪(Agilent, 美国), Infinite M200 Pro多功能酶标仪(Tecan公司, 奥地利), Bio-Rad CFX PCR仪(Bio-Rad公司, 美国)。血浆TGF- β 1、UNAG、UALB测定试剂盒(南京建成生物科技有限公司, 中国), Smad3测定试剂盒(上海江林生物科技有限公司, 中国), UKim-1测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 中国), 柱式miRNA抽提试剂盒(中国生工生物有限公司, 中国), miRNA荧光定量PCR试剂盒(广州锐博生物科技有限公司, 中国)。

1.3 问卷调查

采用面对面调查的方式收集研究对象的一般情况和健康状况资料。问卷内容包括年龄、性别、吸烟、饮酒、职业史等一般情况;现场体检包括身高、体重等,并计算体质量指数(body mass index, BMI)。BMI (kg/m^2) = 体重/身高²。

1.4 样品收集和生化指标的检测

现场采集研究对象空腹静脉血并分离血浆，置于-20℃贮存待测。酶联免疫吸附法(ELISA)测定血浆TGF-β1和Smad3的水平。现场收集研究对象空腹晨尿，-20℃贮存。采用电感耦合等离子体质谱仪测定尿镉，硝基苯比色法测定UNAG，ELISA测定UALB、UKim-1的水平，苦味酸法测定尿肌酐。所检测的尿液指标均以尿肌酐校正。

1.5 1:1匹配病例对照

UNAG是镉接触者健康监测的一个敏感指标，在其他指标尚未发生变化时，UNAG已经发生了改变^[14]。因此本研究以对照组UNAG水平中位数作为截断值，选择镉暴露水平较高且有肾损伤的34人作为镉暴露肾损伤组，选择镉暴露水平较低且肾功能正常的34人作为对照组，两组按照年龄、性别、吸烟情况等方面严格进行1:1匹配，对两组miRNA表达水平进行比较。

1.6 血浆总RNA的提取及实时荧光定量PCR检测miRNA

采用柱式miRNA抽提试剂盒提取RNA，甲醛变性凝胶电泳检测其完整性及是否被降解，要求RNA样品电泳条带清晰，紫外分光光度计测定其浓度和纯度，要求RNA纯度 $D_{260}/D_{280} \geq 1.90$ ，RNA总量 $\geq 10 \mu\text{g}$ 。

1 μg总RNA、5×Poly(A)聚合酶反应缓冲液2 μL、10 mmol/L腺嘌呤1.5 μL、25 mmol/L MnCl₂ 1 μL、多聚酶/酵母(1 U/μL) 0.5 μL、无RNA酶水补足至10 μL，混匀，37℃孵育30 min。加10 μmol/L入miRNA多聚腺苷嘧啶2 μL，混匀，65℃孵育5 min，冰上快速冷却。加入10 mmol/L脱氧核糖核苷三磷酸1 μL、5×RT缓冲液4 μL、200 U/μL反转录酶1 μL、无RNA酶水2 μL，混匀，随后42℃孵育5 min，70℃ 10 min，冷却后用于实时荧光定量PCR。

使用miRNA荧光定量PCR试剂盒，具体按照说明书进行操作，反应体系为20 μL。反应条件：酶活化95℃ 10 min，95℃ 10 s变性，63℃ 15 s退火，72℃ 5 s延伸，40个循环终止延伸。采用U6基因作为内参，通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算两组之间miRNA表达量的差异： $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ ， $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{镉暴露组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ ， $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示镉暴露组miRNA的表达量相对于对照组miRNA表达量的变化倍数^[7]。

1.7 统计学分析

采用EpiData 3.0双人双录入建立数据库，SPSS

21.0软件进行统计分析。正态分布的计量资料如年龄采用 $\bar{x} \pm s$ 描述，组间比较采用方差分析；偏态分布的计量资料如尿镉、血浆TGF-β1、血浆Smad3、UNAG、UKim-1、UALB，以中位数(M)和 P_{25} 、 P_{75} 表示，采用Kruskal Wallis检验方法分析，组间两两比较采用Mann-Whitney检验方法分析。计数资料采用例数和百分数描述， χ^2 检验进行比较分析。非正态分布数据经对数转换后进行Pearson相关分析，采用多元线性回归分析揭示肾功能异常的影响因素。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 研究对象基本特征

镉暴露组223人，其中男性93人、女性130人；对照组237人，男性78人、女性159人。镉暴露组与对照组在性别、BMI、吸烟以及饮酒情况构成上差异均无统计学意义；镉暴露组平均年龄为(65.52±8.60)岁，对照组为(57.11±13.76)岁，两组年龄构成差异有统计学意义($P < 0.001$)。暴露组尿镉、血浆TGF-β1、血浆Smad3、UNAG和UALB水平高于对照组($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组调查对象的基本特征及各指标水平
[n (%), M (P_{25} , P_{75})]

Table 1 General characteristics and selected index levels of exposure group and control group

变量 (Index)	对照组 (n=237) Control group	镉暴露组 (n=223) Cadmium exposure group	χ^2/Z	P
性别 (Sex)			3.803	0.051
男 (Male)	78 (32.9)	93 (41.7)		
女 (Female)	159 (67.1)	130 (58.3)		
年龄 (岁) (Age, years)			73.283	<0.001
<50	61 (25.7)	8 (3.6)		
50~	56 (23.6)	22 (9.9)		
60~	75 (31.6)	132 (59.2)		
≥70	45 (19.1)	61 (27.3)		
BMI (kg/m ²)			5.622	0.132
0~	4 (1.7)	4 (1.8)		
18.5~	89 (37.5)	65 (29.1)		
24~	91 (38.4)	85 (38.2)		
≥28	53 (22.4)	69 (30.9)		
饮酒 (Alcohol drinking)			0.640	0.424
否 (No)	192 (81.0)	187 (83.9)		
是 (Yes)	45 (19.0)	36 (16.1)		
吸烟 (Smoking)			2.396	0.122
否 (No)	175 (73.8)	150 (67.3)		
是 (Yes)	62 (26.2)	73 (32.7)		

续表 1

变量 (Index)	对照组 (n=237) Control group	镉暴露组 (n=223) Cadmium exposure group	χ^2/Z	P
尿镉 ($\mu\text{g/g}$) ^a Urinary cadmium	0.74 (0.43, 1.18)	1.06 (0.57, 2.68)	4.754	<0.001
TGF- β 1 (ng/mL) *	8.65 (5.13, 12.10)	16.13 (6.24, 24.05)	8.425	<0.001
Smad3 (ng/mL) *	4.25 (2.96, 6.63)	6.42 (4.25, 9.09)	5.807	<0.001
UKim-1 ($\mu\text{g/g}$) ^a	1.38 (0.83, 2.03)	1.50 (1.01, 2.04)	1.383	0.167
UNAG (U/g) ^a	14.98 (9.75, 22.95)	17.63 (12.38, 26.77)	2.855	0.004
UALB (mg/g) ^a	11.70 (7.91, 17.16)	12.39 (8.40, 22.06)	4.541	0.033

[注] 吸烟指每天吸烟1支及以上且连续或累计吸6个月; 饮酒指平均每周饮酒1次或以上, 连续或累计饮酒6个月。*: 采用 Mann-Whitney 检验。a: 以肌酐校正。

[Note] Smoking refers to smoking more than one cigarette a day for six months continuously or cumulatively. Drinking refers to consuming alcohol at least once a week for six months continuously or cumulatively. *: Mann-whitney test. a: Adjusted by creatinine.

2.2 不同年龄组肾功能指标

由于暴露组和对照组年龄分布差异有统计学意义, 因此对各年龄段人群的肾功能指标水平进行了

比较分析。不同年龄段镉暴露组和对照组 UKim-1 水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。对照组中, 年龄 70~ 岁组及 60~ 岁组 UKim-1 水平均高于年龄 <50 岁组 (均 $P < 0.001$)。趋势检验结果显示对照组随着年龄的增长 UKim-1 水平增高 ($P_{\text{趋势}} < 0.001$), 但暴露组未见趋势变化。对于 UNAG, 无论暴露组还是对照组均显示随着年龄的增长而增高 (均 $P_{\text{趋势}} < 0.001$)。镉暴露组 UALB 水平也随着年龄的增长而增高 ($P_{\text{趋势}} = 0.007$), 其他未见有明显改变。见表 2。

2.3 不同年龄组血浆 TGF- β 1 和 Smad3 水平

无论镉暴露组还是对照组不同年龄段血浆 TGF- β 1 和 Smad3 水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。年龄分组比较结果显示, 镉暴露组年龄 50~ 岁及 60~ 岁组研究对象血浆 TGF- β 1 水平高于同年龄段的对照组 (均 $P < 0.001$)。镉暴露组年龄 60~ 岁组和 ≥ 70 岁组 Smad3 水平均高于同年龄段的对照组 ($P < 0.001$ 和 $P < 0.003$)。见表 2。

表 2 不同年龄两组人群肾损伤标志及 TGF- β 1、Smad3 水平的比较Table 2 Comparison of urinary kidney injury marker, TGF- β 1, and Smad3 levels between two groups stratified by age

年龄 (岁) (Age, years)	对照组 (Control group)		镉暴露组 (Cadmium exposure group)		Z	P
	n	M (P_{25} , P_{75})	n	M (P_{25} , P_{75})		
UNAG (U/g) ^a						
<50	61	10.51 (7.18, 15.70)	8	14.96 (9.25, 17.04)	1.031	0.303
50~	56	13.11 (7.98, 22.57)	22	15.14 (11.95, 22.61)	1.044	0.297
60~	75	17.69 (12.52, 26.16) **	132	17.11 (11.65, 24.61)	-0.471	0.638
70~	45	20.86 (14.86, 28.37) **	61	20.32 (16.28, 30.22) **	0.547	0.585
$\chi^2_{\text{趋势}} (\chi^2_{\text{trend}})$	22.047		14.931			
$P_{\text{趋势}} (P_{\text{trend}})$	<0.001		<0.001			
UKim-1 ($\mu\text{g/g}$) ^a						
<50	61	0.83 (0.54, 1.40)	8	1.14 (0.84, 1.44)	1.162	0.245
50~	56	1.42 (0.71, 1.75)	22	1.30 (1.12, 1.79)	0.366	0.714
60~	75	1.58 (1.11, 2.19) **	132	1.53 (1.02, 2.03)	-1.024	0.306
70~	45	1.69 (1.06, 3.29) **	61	1.55 (0.92, 2.35)	-0.949	0.343
$\chi^2_{\text{趋势}} (\chi^2_{\text{trend}})$	20.156		1.684			
$P_{\text{趋势}} (P_{\text{trend}})$	<0.001		0.194			
UALB (mg/g) ^a						
<50	61	10.15 (7.16, 18.61)	8	10.25 (8.01, 14.58)	0.010	0.970
50~	56	14.04 (8.01, 23.06)	22	9.26 (7.30, 19.09)	1.805	0.179
60~	75	12.07 (7.87, 21.23)	132	11.17 (7.43, 15.93)	1.102	0.134
70~	45	13.70 (11.09, 24.21)	61	13.11 (8.92, 23.24) **	0.555	0.456
$\chi^2_{\text{趋势}} (\chi^2_{\text{trend}})$	0.016		7.354			
$P_{\text{趋势}} (P_{\text{trend}})$	0.899		0.007			
TGF- β 1 (ng/mL)						
<50	61	4.30 (2.84, 7.05)	8	6.47 (5.01, 8.22)	1.837	0.066
50~	56	4.11 (3.07, 6.59)	22	7.07 (5.35, 12.11)	3.909	<0.001
60~	75	3.83 (2.83, 6.21)	132	6.73 (4.49, 9.55)	4.869	<0.001
70~	45	4.77 (3.10, 8.60)	61	5.54 (3.14, 7.68)	0.708	0.708
$\chi^2_{\text{趋势}} (\chi^2_{\text{trend}})$	0.246		2.393			
$P_{\text{趋势}} (P_{\text{trend}})$	0.620		0.122			

续表 2

年龄 (岁) (Age, years)	对照组 (Control group)		镉暴露组 (Cadmium exposure group)		Z	P
	n	M (P ₂₅ , P ₇₅)	n	M (P ₂₅ , P ₇₅)		
Smad3 (ng/mL)						
<50	61	7.39 (4.49, 10.91)	8	14.31 (5.47, 20.02)	1.856	0.064
50~	56	8.09 (4.41, 15.27)	22	14.82 (4.82, 19.90)	1.743	0.081
60~	75	9.68 (6.77, 12.01)	132	16.84 (10.71, 25.80)	5.890	<0.001
70~	45	9.59 (4.91, 12.02)	61	13.27 (7.15, 23.21)	3.001	0.003
χ ² 趋势 (χ ² trend)	2.113		0.422			
P 趋势 (P trend)	0.146		0.516			

[注] 与 <50 岁组相比, * : P<0.05 ; ** : P<0.001。# : 与 60~ 岁组相比, P<0.05。a : 以肌酐校正。

[Note] Compared to the <50 years age group, *: P<0.05; **: P<0.001. #: Compared with the 60- years age group, P<0.05. a: Adjusted by creatinine.

2.4 不同尿镉水平组血浆 TGF-β1/Smad3 及肾功能指标

以对照组人群尿镉中位数 (0.74 μg/g) 将全部研究对象分为低尿镉组和高尿镉组, 比较血浆 TGF-β1/Smad3 及肾功能标志水平, 结果显示高尿镉组 UNAG、UALB、血浆 TGF-β1 和血浆 Smad3 水平均高于低尿镉组 (均 P<0.05)。见表 3。

表 3 不同尿镉水平两组人群血浆 TGF-β1/Smad3 及肾损伤标志水平的比较 [M (P₂₅, P₇₅)]

Table 3 Comparison of plasma TGF-β1/Smad3 levels and kidney injury marker levels between two groups stratified by urinary cadmium level

指标 Index	低尿镉组 (n=201) Low urinary cadmium group	高尿镉组 (n=259) High urinary cadmium group	Z	P
UNAG (U/g) ^a	14.76 (9.68, 21.48)	18.34 (12.06, 26.80)	3.647	<0.001
UKim-1 (μg/g) ^a	1.38 (0.82, 1.83)	1.49 (0.94, 2.15)	1.939	0.052
UALB (mg/g) ^a	10.41 (7.75, 14.45)	14.03 (8.46, 25.36)	24.044	<0.001
TGF-β1 (ng/mL)	10.11 (5.67, 16.73)	11.52 (7.05, 20.07)	2.492	0.013
Smad3 (ng/mL)	4.52 (3.22, 6.01)	5.08 (3.99, 8.26)	4.754	<0.001

[注] a : 以肌酐校正。[Note] a: Adjusted by creatinine.

2.5 血浆 TGF-β1/Smad3 与尿镉及肾损伤标志的相关关系

相关关系分析结果显示, 血浆 Smad3 和 UNAG 均与血浆 TGF-β1 水平呈正相关关系, 尿镉与各肾损伤标志水平也均呈正相关关系 (均 P<0.05)。见表 4。

表 4 环境镉暴露人群各指标间的相关关系 (r)

Table 4 Correlations among selected indices in participants with environmental cadmium exposure

指标 Index	Smad3	尿镉 Urinary cadmium	UNAG	UALB	UKim-1
TGF-β1	0.091 [*]	0.018	0.133 [#]	-0.003	0.075
Smad3	—	0.070	0.032	-0.002	0.031
尿镉 Urinary cadmium	—	—	0.264 [#]	0.263 [#]	0.102 [*]
UNAG	—	—	—	0.166 [#]	0.341 [#]
UALB	—	—	—	—	-0.012

[注 (Note)] * : P<0.05 ; # : P<0.001。

2.6 肾损伤标志影响因素的多元线性回归分析

分别以肾损伤指标血浆 TGF-β1、血浆 Smad3、UNAG、UKim-1 和 UALB 为应变量, 年龄、性别、BMI、吸烟/饮酒情况、尿镉为自变量, 进行一元线性回归分析, 进入回归方程的自变量进一步进行多元线性回归分析。结果显示: UNAG、UALB 和 UKim-1 均与尿镉水平呈正相关关系; 年龄与 UNAG、UKim-1 和血浆 TGF-β1 呈正相关关系, 而 BMI 与血浆 Smad3 呈正相关关系, 与 UALB 呈负相关关系 (均 P<0.05), 见表 5。

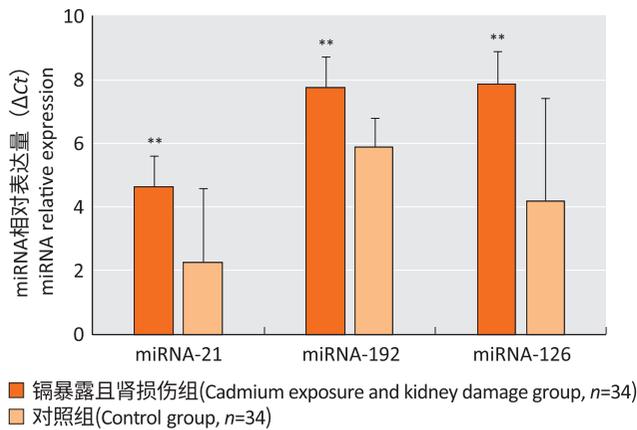
表 5 环境镉暴露人群肾功能相关影响因素的多元线性回归分析结果

Table 5 Multiple linear regression analysis of factors related to renal function in participants with environmental cadmium exposure

变量 Variable	b	95%CI	S _x	b'	t	P
UNAG						
年龄 Age	0.202	0.111~0.292	0.046	0.203	4.379	<0.001
尿镉 Urinary cadmium	0.285	0.076~0.494	0.106	0.122	2.680	0.008
UALB						
性别 Sex	5.901	1.203~10.599	2.391	0.144	2.468	0.014
尿镉 Urinary cadmium	0.738	0.385~1.092	0.180	0.187	4.108	<0.001
BMI	-0.823	-1.304~-0.342	0.245	-0.150	-3.362	0.001
UKim-1						
年龄 Age	0.014	0.004~0.024	0.005	0.125	2.653	0.008
尿镉 Urinary cadmium	0.038	0.014~0.062	0.012	0.142	3.081	0.002
血浆 TGF-β1 Plasma TGF-β1						
年龄 Age	0.143	0.050~0.236	0.047	0.141	3.029	0.003
血浆 Smad3 Plasma Smad3						
BMI	0.629	0.132~1.126	0.253	0.115	2.486	0.013

2.7 镉暴露肾损伤组和对照组 miRNA 表达水平比较

通过 1:1 匹配病例对照研究比较研究对象中镉暴露肾损伤组和对照组中 miRNA 表达量的差异, 结果显示, 镉暴露肾损伤组中 miRNA-21、miRNA-192、miRNA-126 的表达水平均高于对照组 ($P < 0.001$), 见图 1。



[注] **: 与对照组比较, $P < 0.001$ 。

[Note] **: Compared with the control group, $P < 0.001$.

图 1 镉暴露且肾损伤人群与正常对照组 miRNA 的相对表达量

Figure 1 The relative expressions of miRNAs in the combined cadmium exposure and kidney damage group and the control group

3 讨论

环境镉暴露引发的人群健康风险越来越受到学者们的重视^[15]。本研究揭示了长期环境镉暴露不仅使人群尿镉水平升高, 且能够引起肾损伤, 使尿液中 UNAG、UALB 水平增加, 纤维化指标血浆 TGF- β 1 和 Smad3 水平增加, 且血浆 miRNA-21、miRNA-192、miRNA-126 的表达水平也明显升高。

重金属镉进入机体后能够诱导金属硫蛋白的生物合成, 镉与金属硫蛋白结合从而在各个组织器官分布。当蓄积达到一定剂量, 体内镉将以游离镉的形式存在并发挥毒性作用。人体内镉多经肾脏由尿液排出, 因此常以尿镉反映机体镉负荷情况。本研究中暴露组尿镉总体水平高于对照组, 可见长期环境镉暴露会导致镉在体内蓄积。

本研究结果显示长期镉暴露引起暴露区人群 UNAG 增加, 且随着年龄的增加 UNAG 水平升高, 提示年龄的增长与镉引起的肾损伤效应有关联, 与 Gunier 等^[16] 对美国镉暴露者和 Horiguchi 等^[17] 对日本女性镉暴露者的研究结果一致。进一步分析结果提示, 机体年龄越大, 尿镉水平越高, 肾功能损伤效应越明显。同时研究结果显示尿镉与 UALB 呈正相关关系, 与温

贤忠等^[14] 对职业镉暴露人群的研究结果一致。随着年龄的增高, 肾脏代谢机能减弱, 尿 UALB 水平升高。

在肾脏纤维化过程中, 肾脏局部 TGF- β 1 升高能够导致肾小球系膜区细胞外基质堆积和纤维化^[18-19]。本研究中, 血浆 TGF- β 1 水平在镉暴露组高于对照组, 与尿镉呈正相关关系, 提示长期环境镉暴露可能与外周血 TGF- β 1 的升高有关, 并且可能与肾脏纤维化有关, 但尚需进一步的研究证实。TGF- β 1 水平的升高与肾脏纤维化有关的机制可能与 TGF- β 1 能够促进巨噬细胞和 T 淋巴细胞的浸润, 进而促进肾小管上皮细胞损伤有关^[20]。本研究也发现血浆 TGF- β 1 与 UKim-1 和 UNAG 存在正相关关系, 但相关机制尚不清楚。

Smad 蛋白是 TGF- β 1/Smad 信号通路中的重要介质, 磷酸化的 Smad3 与 TGF- β 1 结合成复合物后, 转移到细胞核对 TGF- β 1 作用的靶基因发挥调控作用^[21]。本研究中, 血浆 Smad3 在镉暴露组高于对照组, 与尿镉和 UKim-1 均存在正相关关系。有研究显示, TGF- β 1 表达的增加可引起下游通路中 Smad3 蛋白表达, 导致纤维化, 而在 Smad3 缺乏的单侧输尿管梗阻的模型小鼠中肾小管细胞的凋亡也明显改善, 由此可见 Smad3 可能与肾脏疾病的发生发展密切相关^[22-23]。而本研究结果也显示 Smad3 与 TGF- β 1 呈正相关关系, 提示 TGF- β 1 可能通过促进 Smad3 表达的增加作用于肾脏。

在肾组织发育、肾功能稳定中, 机体内环境的 miRNA 发挥着重要的作用^[24-25], miRNA 的表达失调可能会导致相关疾病的发生。尤其在肾脏纤维化过程中存在大量 miRNA 的表达异常^[26]。本研究显示 miRNA-21、miRNA-192 和 miRNA-126 在镉暴露肾功能异常组表达均升高。前期的动物实验也发现镉暴露致肾损伤时 miRNA-21 表达增加^[9], 可能与 TGF- β 1 通过 Smad3 结合到 miRNA-21 启动子区, 进而促使 miRNA-21 的表达增加, 参与肾损伤过程有关。miRNA-192 参与多种肾脏病变的生理病理过程已有报道^[27]。miRNA-192 通过上调钙黏蛋白的表达, 参与 TGF- β 1/Smads 通路激活钙黏蛋白转录调节因子的表达, 增加胶原蛋白的合成, 导致系膜细胞增生和肾小球硬化的产生^[28-29], 但在镉暴露者中 miRNA-192 是否通过参与 TGF- β 1/Smad 通路导致肾损伤尚需进一步开展动物实验或体外实验予以研究。刘洋等^[10] 比较了肾损伤组和健康组研究对象尿 miRNA-126 的表达水平, 结果显示肾损伤组尿中 miRNA-126 表达水

平明显高于健康对照组。miRNA-126 在内皮细胞特异性高表达,参与调控血管发育、血管炎症反应过程,并参与多种疾病进程。在镉暴露所致肾功能异常中,miRNA-126 可能通过影响内皮细胞的功能,调控血管炎症反应,进而影响肾脏功能,但本研究尚不能确证。由此可见,多种 miRNA 可能通过调控肾脏细胞基因表达,参与镉暴露所致的肾损伤。

由于人体肾脏组织不易获取,因此本研究通过分析不同尿镉水平组研究对象血浆中 TGF- β 1 和 Smad3 水平及其与肾功能之间的关系,探讨 miRNA 的表达水平的改变,具有一定的局限性;同时由于样本量比较小,且本研究为非前瞻性研究,因此可能对揭示镉暴露致肾功能损伤与血浆 TGF- β 1/Smad3 和 miRNA 表达的相关性有一定局限。但本研究为后续进一步采用前瞻性研究的方法研究三者之间的关系提供了一些线索。

综上,在长期低剂量环境镉暴露所致肾损伤中,TGF- β 1 和 Smad3 可能发挥了一定的作用,且与血浆 TGF- β /Smads 相关的 miRNA-21、miRNA-192 和 miRNA-126 的表达水平增加。本研究为深入揭示镉暴露所致肾损伤的分子机制提供了依据,也为探索镉暴露所致肾损伤的早期标志开辟了新的思路。

参考文献

- [1] WEBSTER AC, NAGLER EV, MORTON RL, et al. Chronic kidney disease [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10075): 1238-1252.
- [2] EDWARDS JR, PROZIALECK WC. Cadmium, diabetes and chronic kidney disease [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 238 (3): 289-293.
- [3] DKHIL MA, AI-QURAIHY S, DIAB MM, et al. The potential protective role of *Physalis peruviana* L. fruit in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 74: 98-106.
- [4] TSUTSUMI T, ISHIHARA A, YAMAMOTO A, et al. The potential protective role of lysophospholipid mediators in nephrotoxicity induced by chronically exposed cadmium [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 65: 52-62.
- [5] CHAKRABORTY PK, SCHARNER B, JURASOVIC J, et al. Chronic cadmium exposure induces transcriptional activation of the Wnt pathway and upregulation of epithelial-to-mesenchymal transition markers in mouse kidney [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 198 (1): 69-76.
- [6] 刘勇,王锐,施欣辛,等. TGF- β 1/Smads 调控与肾脏纤维化治疗研究进展 [J]. *实用中医药杂志*, 2016, 32 (10): 1041-1042.
- [7] 孟祥娟,崔玉杰,李红娟,等. 肾间质纤维化中 MicroRNA 表达研究进展 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23 (3): 344-347.
- [8] 武贵群,高翔,梅长林. TGF- β /Smads 通路 with 肾脏纤维化研究进展 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2012, 13 (5): 459-461.
- [9] 史秀京,雷立健,郭建勇,等. 镉致大鼠肾脏微小 RNA-21 表达的生物信息学分析 [J]. *环境与职业医学*, 2016, 33 (2): 113-118.
- [10] 刘洋,梁红艳,高光强,等. 人尿中微小 RNA 的稳定性及其诊断肾损伤的价值 [J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2013, 1 (1): 53-57.
- [11] 陈灿. TGF- β 1/SMAD3 及其靶向调控 microRNA 表达量与冠心病易感性的关联关系及机制研究 [D]. 武汉:武汉大学, 2014.
- [12] 张萌,毋燕妮,解静芳,等. 太原市污灌区土壤镉存在形态与生物可利用性研究 [J]. *环境科学学报*, 2015, 35 (10): 3276-3283.
- [13] 解文艳,樊贵盛,周怀平,等. 太原市污灌区土壤重金属污染现状评价 [J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30 (8): 1553-1560.
- [14] 温贤忠,李森华. 职业性镉接触工人早期肾脏损害指标变化研究 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27 (15): 2751-2753.
- [15] RODRÍGUEZ-BARRANCO M, LACASAÑA M, AGUILAR-GARDUÑO C, et al. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: a systematic review and meta-analysis [J]. *Sci Total Environ*, 2013 (454/455): 562-577.
- [16] GUNIER RB, HORN-ROSS PL, CANCHOLA AJ, et al. Determinants and within-person variability of urinary cadmium concentrations among women in northern California [J]. *Environ Health Perspect*, 2013, 121 (6): 643-649.
- [17] HORIGUCHI H, OGUMA E, SASAKI S, et al. Age-relevant renal effects of cadmium exposure through consumption of home-harvested rice in female Japanese farmers [J]. *Environ Int*, 2013, 56: 1-9.
- [18] BUČKOVA D, IZAKOVIČOVÁ HOLLÁ L, BENEŠ P, et al. TGF- β 1 gene polymorphisms [J]. *Allergy*, 2001, 56 (12): 1236-

- 1237.
- [19] KAIJZEL EL, VAN DONGEN H, BAKKER AM, et al. Relationship of polymorphisms of the Interleukin-1 gene cluster to occurrence and severity of rheumatoid arthritis [J]. Tissue Antigens, 2002, 59 (2) : 122-126.
- [20] 马云波, 吕家驹. TGF- β 1 与肾小管间质肾炎关系的研究进展 [J]. 国际泌尿系统杂志, 2007, 27 (4) : 537-541.
- [21] HILL C S. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins [J]. Cell Res, 2009, 19 (1) : 36-46.
- [22] INAZAKI K, KANAMARU Y, KOJIMA Y, et al. Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction [J]. Kidney Int, 2004, 66 (2) : 597-604.
- [23] 苏丽娜, 覃远汉, 周添标, 等. 转化生长因子- β 1/Smad3 信号通路在肾间质纤维化大鼠肾脏组织中的表达和作用 [J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26 (5) : 325-328.
- [24] AKKINA S, BECKER B N. MicroRNAs in kidney function and disease [J]. Transl Res, 2011, 157 (4) : 236-240.
- [25] BHATT K, MI QS, DONG Z. MicroRNAs in kidneys : biogenesis, regulation, and Pathophysiological roles [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 300 (3) : F602-F610.
- [26] GOMEZ IG, GRAFALS M, PORTILLA D, et al. MicroRNAs as potential therapeutic targets in kidney Disease [J]. J Formos Med Assoc, 2013, 112 (5) : 237-243.
- [27] 熊加川, 胡章学. MicroRNA-192 在肾脏疾病中的研究进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13 (12) : 1123-1125.
- [28] WANG B, HERMAN-EDELSTEIN M, KOH P, et al. E-cadherin expression is regulated by miR-192/215 by a mechanism that is independent of the profibrotic effects of transforming growth factor- β [J]. Diabetes, 2010, 59 (7) : 1794-1802.
- [29] 康辉. 外周血 TGF- β 1/Smad3 水平及其相关 miRNA 表达与镉致肾功能损伤的关系 [D]. 太原 : 山西医科大学, 2018.

(英文编辑 : 汪源 ; 编辑 : 王晓宇 ; 校对 : 汪源)

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》2019 年全新改版



自 1984 年创刊起,《环境与职业医学》杂志始终坚持以环境医学与职业医学为主体,融合相关学科的内容;以维护人群尤其是职业人群的健康为目标;以突出报道学科前沿研究成果为方向;以立足国内学术前沿,汲取国际研究精华,推进环境与职业医学学科发展,提高职业和全体人群健康水平为宗旨。

2019 年起,《环境与职业医学》杂志全新改版!

此次改版给《环境与职业医学》杂志注入了焕然一新的活力,更突出环境医学与职业医学的跨学科发展,更顺应媒体融合发展新趋势,更聚焦热点研究,更好地发挥学科引领作用,以科学可信的数据为政府决策提供依据,保障公众健康。

新封面设“本期推荐”,介绍本期的专栏、原创精选或重点推荐文章。内页全新布局,伦理审批、利益冲突、引用、链接等文章信息一目了然。此外,新的视觉效果兼顾舒适的纸质和电子阅读体验。

此外,新的视觉效果兼顾舒适的纸质和电子阅读体验。

欢迎广大读者、作者订阅,或登录本刊官方网站 www.jeom.org 免费阅读、下载。