生理学报 *Acta Physiologica Sinica*, December 25, 2018, 70(6): 644–648
DOI: 10.13294/j.aps.2018.0070 http://www.actaps.com.cn

综 述

慢性肾脏病尿液生物标志物研究进展：聚焦RNA转录标志物

吕林莉，刘必成*

东南大学肾脏病研究所/东南大学附属中大医院肾脏科，南京 210009

摘 要：慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)已经越来越成为世界范围内的主要疾病负担之一，然而，目前仍缺乏早期诊断及动态监测其发生和发展的生物标志物。因此，在未来的精准医疗时代，寻找敏感、无创诊断标志物已经成为CKD诊疗所面临的重要挑战。本文将从尿液的沉渣、上清、细胞外囊泡三个方面，聚焦基因转录标志物(miRNA, mRNA)，论述CKD尿液生物标志物的研究进展及尿液基因转录标志物研究所面临的挑战和未来可能的研究方向。

关键词：尿液；生物标志物；慢性肾脏病；细胞外囊泡；基因转录
中图分类号：R334；R692

Urinary biomarkers for chronic kidney disease: a focus on gene transcript

LYU Lin-Li, LIU Bi-Cheng*
Institute of Nephrology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

Abstract: Chronic kidney disease (CKD) is becoming an alarming health burden worldwide, however, there is still lack of early biomarkers and effective treatment options. Thus, in the upcoming era of precision medicine, searching for the sensitive, non-invasive biomarkers has been the cornerstone and major challenge in the management of CKD. Urine contains rich biological information which could be an ideal source for non-invasive biomarkers of CKD. This review will discuss the recent advances in biomarker study from urine sediment, urine supernatant and urinary extracellular vesicles with special interest in gene transcript (miRNA, mRNA) biomarkers. Besides, the challenges and future directions for urinary gene transcript biomarker study will be discussed.

Key words: urine; biomarkers; chronic kidney disease; extracellular vesicle; gene transcript

1 前言

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 已经越来越成为世界范围内的主要疾病负担之一，我国的 CKD 患病率已高达 10.8% [1]。现今 CKD 诊疗面临的主要挑战是在临床早期诊断率低，疾病进展缺乏敏感生物标志物。目前 CKD 早期诊断的主要指标分别为尿白蛋白、血清肌酐和尿素氮等，然而，这些指标易受年龄、饮食、感染、运动等多种因素的影响，尤其是不能准确反映肾脏病理活动情况。尽管病理检查可以清楚显示肾脏病理改变，但是由于其操作的有创性并不适用于早期筛查及长期的病情随访。因此，寻找 CKD 早期、无创生物标志物是实现未来肾脏病精准诊疗亟待解决的关键问题 [2]。

肾脏是机体重要的滤过和排泄器官，长期以来，尿液检查一直是临床肾脏病诊断的重要手段。既往人们通过对尿液蛋白质含量和成分的分析已经为肾脏病临床诊断建立了一系列的方法，但是由于受到检测技术的局限，尿液中仍有更多待挖掘的信息。尿液通过离心分离，可以分为尿液沉渣、尿液上清

Received 2018-06-05 Accepted 2018-10-11
Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81470922, 81670696) and the Jiangsu Provincial Clinical Research Center of Kidney Diseases, China (No. BL2014080).
*Corresponding author. Tel: +86-25-83262422; E-mail: liubc64@163.com

和最新发现的尿液细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 结构组分，这些组分中包含丰富的生物学信息，包括细胞成分、蛋白和核酸。本文将从尿液不同组分出发，讨论尿液生物标志物的研究进展，尤其是 RNA 转录标志物。

2 CKD尿液新型生物标志物

2.1 尿液沉渣

很久以来，尿液沉渣分析是肾脏病诊断的重要手段，但检测内容进展缓慢。众所周知，尿液中有多种细胞成分，如足细胞、小管上皮细胞、免疫细胞和干细胞 / 祖细胞等，对这些细胞组分的分析可能为肾脏组织损伤提供更多有价值的信息。Kopetschke 等人研究显示，在系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 肾脏活动病变人群，尿液 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞数量显著增加，且可有效诊断 SLE 中增生性狼疮肾炎的病例 [3]。此外，在一过性及持续性肾小球损伤大鼠模型中，计数尿液活性足细胞，发现 $WT\text{-}1^+$ 足细胞数量随肾小球损伤呈现特征性时间变化趋势。在嘌呤霉素肾病模型和系膜增殖性肾炎模型 (anti-Thy 1.1) 中，尿液足细胞与蛋白尿早期出现同时发生，而随着足细胞尿 (podocyturia) 的恢复，蛋白尿仍持续存在。在慢性肾小球损伤模型，即 5/6 肾大部分切除模型中，尿液足细胞和蛋白尿、高血压始终平行性存在 [4]。

除了细胞计数外，近年的研究显示，尿液沉渣中的细胞 mRNA 可能成为肾脏病新型诊断标志物。2001 年，Li 等人首次发现尿液沉渣 perforin 和 granzyme B mRNA 在移植肾脏发生排斥反应的患者中显著升高，两者可以有效诊断移植肾脏排斥患者 [5]。Szeto 等人研究显示，尿液沉渣细胞因子 mRNA 水平与小管间质纤维化和肾小球硬化密切相关 [6]，在进一步的前瞻性研究中，尿液肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) mRNA 可以独立预测 CKD 进展 [7]。最近，本研究组研究显示尿液沉渣肾脏纤维化相关基因α平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、纤粘连蛋白 (fibronectin)、基质金属蛋白酶 -9 (matrix metalloproteinase-9, MMP9)、成纤维细胞特异蛋白 -1 (fibroblast-specific protein-1, FSP1) mRNA 在糖尿病肾病患者中显著升高 [8]。此外，足细胞相关 mRNA 在糖尿病肾病患者中显著升高，并且与肾脏功能下降密切相关 [9]。除 mRNA 之外，尿液沉渣细胞中含有可检测的高拷贝 microRNA (miRNA)。Wang 等人研究显示在狼疮肾炎患者中，尿液 miR-146a 和 miR-155 可能成为诊断、判断疾病活动度及治疗效果的指标 [10]。

由于 CKD 进展涉及复杂的信号通路，因此高通量分析途径可能有助于更为有效地筛选候选生物标志物。我们在既往的研究中，构建了靶向 PCR 芯片，并对糖尿病肾病患者尿液沉渣 mRNA 进行了筛选 [11]，进一步的验证发现 vimentin mRNA 与 CKD 肾脏功能下降和肾脏纤维化病理评分密切相关 [12]。此外，我们基于芯片特征选择和芯片数据分类分析，构建了包含 TGFβ1、MMP9、TIMP2 和 vimentin 的联合诊断标志物用于小管间质纤维化的诊断 [13]。

2.2 尿液上清

尿液上清中的炎症相关细胞因子是 CKD 重要的潜在诊断标志物。最近一项研究显示，在狼疮肾炎患者中，尿液单核细胞趋化蛋白 -1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 水平在复发时显著升高，而治疗缓解后水平显著下降 [14]。蛋白质芯片是筛查尿液细胞因子的高通量途径，我们既往通过建立蛋白质芯片对 CKD 患者尿液细胞因子进行检测，发现了差异表达的细胞因子。然而，由于细胞因子的丰度跨度大，在生物标志物的筛查过程中，蛋白质芯片并不能像 PCR 芯片一样提供足够高的敏感性 [15]。另一种高通量的蛋白标志物研究方法为二维凝胶电泳结合质谱分析 (2-D DIGE/MS)。尿液多肽 CKD273 标志物是近年来所发现的重要的蛋白质组学标志物，研究证实其可能有助于实现 CKD 早期诊断和预后监测，目前针对 CKD273 标志物的多中心验证研究正在进行当中 [16, 17]。

2.3 尿液EVs

尿液 EVs 是来自不同肾单位及尿液通路细胞的纳米级囊泡结构，其释放过程中可能装配了母细胞来源的胞浆蛋白、脂类和核酸，使得尿液 EVs 可能成为肾脏病“液体活检”诊断的新载体 [18–20]。根据 EVs 的大小和形成过程的不同，可以分为外泌体 (exosome)，微囊泡 (microvesicle) 和凋亡小体 (apoptotic bodies)[21]。尿液 exosome 的一项重要研究发表于 2010 年，该研究发现尿液 exosome 包含来自肾单位不同部位的 mRNA，提示尿液 exosome 可能成为肾脏疾病的新型诊断标志物 [22]。我们最近的研究显示，尿液中可分离来自足细胞的 exosome，且 exosome 中 CD2AP mRNA 水平与肾脏功能和纤维

化评分密切相关[23]。

除了 mRNA，EVs 还包含丰富的 miRNA 信息。我们及其他研究者的研究显示，exosome 及其装配的 miRNA 可以在多次反复冻融及长期储存的条件下保持稳定[24]。通过对 CKD 患者尿液 exosome 中肾脏纤维化相关 miRNA 的检测，发现 miR-29c 在 CKD 患者中显著下降，且与肾脏纤维化评分呈负相关[25]。Ben-Dov 等人对常染色体显性多囊肾疾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 和非多囊肾肾脏上皮细胞、尿液来源的 exosome 中 miRNA 进行筛查，发现 mir-1(4) 和 mir-133b(2) 成员在 ADPKD 发病中发挥重要作用并可能成为多囊肾的新型标志物[26]。在链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 诱导的糖尿病动物模型中，通过应用小 RNA 测序结合 qPCR 验证，Mohan 等人发现尿液 exosome 中 miR-451-5p 可能是糖尿病肾病早期、敏感的生物标志物[27]。Ramezani 等人最近应用 Affymetrix GeneChip miRNA 芯片和 qRT-PCR 发现微小病变 (minimal change disease, MCD) 和局灶节段性肾小球硬化 (focal segmental glomerulosclerosis, FSGS) 患者循环及尿液 miRNA 表达谱显著不同[28]。但是这些不同肾脏疾病中 EVs miRNA 的诊断价值仍有待进一步研究。

3 尿液基因转录标志物未来研究方向及挑战

众所周知，既往肾脏尿液标志物的研究主要集中于尿液蛋白质成分的分析，而基因转录物的诊断价值未受到足够的重视。尿液细胞及 EVs 的基因转录研究为 CKD 生物标志物提供了全新的方向，本部分将重点讨论未来尿液基因转录标志物研究的方向及挑战。

3.1 尿液基因转录标志物研究方法

尿液基因转录标志物的研究方法主要包括 RNA 测序，表达芯片及 qRT-PCR 技术。目前，表达芯片已经可以检测人 miRNA 数据库中 (miRBase) 超过 1 000 个成熟的 miRNA 序列，下一代测序技术 (next-generation sequencing, NGS) 也已经成为筛查差异表达 miRNA 的重要手段。以上两种方法所获得差异表达基因，可以通过 qRT-PCR 进行验证[29]。然而，这些检测方法在基因转录检测中各自的特点及结果的一致性值得关注。Nassirpour 等人报道在分析尿液低表达 miRNA 时，NGS 和 qRT-PCR 的检测结果存在很大的差异，miRNA 测序在检测低表达基因时，其敏感性和可靠性不及 qRT-PCR，然而 NGS 在检测 miRNA 不同转录本时有更优异的表现[30]。基因芯片亦可用于基因转录的筛查，然而其只适用于已知基因、已知序列的检测。

此外，数据的标准化是基因转录标志物研究中待解决的一个重要问题，尤其是对于来自不同研究手段获得的数据。美国国家标准与技术研究院发起的 External RNA Controls Consortium (ERCC, https://www.nist.gov/programs-projects/external-rna-controls-consortium) 目前已经建立了一套通用 RNA 标准品，用于不同平台数据的标准化。最近，Devonshire 等人发现 ERCC RNA 标准品可以为生物标志物研究中不同平台数据提供有效的标准化方法[31]。此外，由于尿液 RNA 的可降解性，RNA 检测数据的标准化显得尤为重要。Galichon 等人发现内参基因 GAPDH 和 UPK1A 在排除 RNA 降解效应方面，优于 18S 或 HPRT RNA[32]。因此，对于 miRNA 来说，内参基因的选择对于其相对表达水平的判断是一个重要的决定因素，仍需要进一步深入研究[29]。

因此，基因转录标志物的研究方法所面临的主要问题是不同平台的检测敏感性、特异性及数据的一致性。同时，建立基因表达水平研究统一的数据标准化方法，对于推进新发现生物标志物的验证研究具有重要意义。

3.2 尿液肾脏细胞特异性基因转录标志物

尽管既往研究发现一些尿液基因转录可能成为 CKD 无创诊断的标志物，但是这些尿液 RNA 的细胞来源不清楚，非肾脏细胞来源的 RNA 可能影响结果的判读。细胞内 RNA 的标志物研究，多数通过提取细胞沉渣的总 RNA 进行检测。因此，检测尿液肾脏细胞特异性 RNA 标志物可能进一步提高其诊断的敏感性、特异性及可靠性。未来可能通过尿液细胞特异性分选、生物信息学对高通量基因筛查数据的深度分析等方法，实现对尿液肾脏特异性细胞 RNA 的生物标志物研究。

尿液 EVs 来源于肾脏固有细胞及尿液通路细胞，其中包含了丰富的基因信息，成为研究肾脏生物标志物的新载体[33, 34]，但是目前尿液 EVs 生物标志物的研究主要是通过分离尿液总 EVs 提取 RNA 进行。目前，尚无法有效分离肾脏细胞特异性 EVs 用于标志物的检测。最近，随着单个 EVs 分离及单细胞测序技术的飞速发展，未来开展单个 EV 基因标志物检测可能具有更重要的诊断价值[34]。

3.3 基因转录标志物研究可能为理解CKD发生机制提供新思路

CKD 基因转录生物标志物的研究涉及大样本临床检测及动物模型分析，因此，差异基因的发现可能为理解 CKD 发生机制提供新的思路。Xu 等人发现容量灌注不足及肾脏内源性损伤导致的急性肾脏损伤，其尿液基因表达谱存在显著差异，对差异基因的深入分析可能为理解肾脏损伤过程的不同机制提供信息 [35]。 通过分析糖尿病肾病动物模型肾脏组织转录谱，Rubin 等人发现糖尿病肾病存在特异性的转录谱，这些基因与线粒体功能障碍、氧化应激密切相关，为理解糖尿病肾病发病机制提供了新的研究思路和依据 [36]。

EVs 的合成和分泌与疾病过程中微环境信号的改变密切相关，如细胞内钙离子浓度、氧化应激等 [37]。此外，EVs 装配的 RNA 并非被动的随机过程，某些 RNAs 在 EVs 内富集，受装配过程中特异性调节分子和微环境信号的影响 [38]。因此，研究 EVs 生物标志物，探讨其中特异性装配的 miRNA、mRNA 及其调节机制，可能为探讨 EVs 在 CKD 发生和发展中的作用机制提供新的线索。

4 结论

综上所述，尿液不同组分包含丰富的生物学信息，尤其是其中的 RNA 可能成为 CKD 新型诊断标志物，而尿液 EVs 中的 mRNA、miRNA 可能成为未来肾脏“液体活检”诊断研究的重要方向。尿液基因转录标志物不同检测方法的局限、数据的标准化及肾脏细胞 /EVs 特异性 RNA 的研究，可能是未来尿液基因转录标志物研究面临的主要挑战和研究方向。

参考文献

1 Zhang L, Wang F, Wang L, Wang W, Liu B, Liu J, Chen M, He Q, Liao Y, Yu X, Chen N, Zhang JE, Hu Z, Liu F, Hong D, Ma L, Liu H, Zhou X, Chen J, Pan L, Chen W, Wang W, Li X, Wang H. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey. Lancet 2012; 379: 815–822.

2 Cao YH, Lu LL, Zhang JD, Liu BC. Application of systems biology to the study of chronic kidney disease. Chin Med J (Engl) 2012; 125: 2603–2609.

3 Kopetschke K, Klocke J, Griessbach AS, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, Burmester GR, Enghard P, Riemekasten G. The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: new insights into potential biomarkers. Arthritis Res Ther 2015; 17: 94.

4 Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. J Am Soc Nephrol 2005; 16: 1733–1741.

5 Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Mouradian J, Schwartz JE, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. N Engl J Med 2001; 344: 947–954.

6 Szeto CC, Chow KM, Chung KY, Kwan BC, Leung CB, Li PK. The clinical course of peritoneal dialysis-related peritonitis caused by *Corynebacterium* species. Nephrol Dial Transplant 2005; 20: 2793–2796.

7 Szeto CC, Chow KM, Lai KB, Szeto CY, Chan RW, Kwan BC, Chung KY, Li PK, Lai FM. mRNA expression of target genes in the urinary sediment as a noninvasive prognostic indicator of CKD. Am J Kidney Dis 2006; 47: 578–586.

8 Zheng M, Lv LL, Cao YH, Zhang JD, Wu M, Ma KL, Phillips AO, Liu BC. Urinary mRNA markers of epithelial-mesenchymal transition correlate with progression of diabetic nephropathy. Clin Endocrinol (Oxf) 2012; 76: 657–664.

9 Zheng M, Lv LL, Ni J, Ni HF, Li Q, Ma KL, Liu BC. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. PLoS One 2011; 6: e20431.

10 Wang G, Tam LS, Kwan BC, Li EK, Chow KM, Luk CC, Li PK, Szeto CC. Expression of miR-146a and miR-155 in the urinary sediment of systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol 2012; 31: 435–440.

11 Zheng M, Lv LL, Cao YH, Liu H, Ni J, Dai HY, Liu D, Lei XD, Liu BC. A pilot trial assessing urinary gene expression profiling with an mRNA array for diabetic nephropathy. PLoS One 2012; 7: e34824.

12 Cao YH, Lv LL, Zhang X, Hu H, Ding LH, Yin D, Zhang YZ, Ni HF, Chen PS, Liu BC. Urinary vimentin mRNA as a potential novel biomarker of renal fibrosis. Am J Physiol Renal Physiol 2015; 309: F514–F522.

13 Zhou LT, Cao YH, Lv LL, Ma KL, Chen PS, Ni HF, Lei XD, Liu BC. Feature selection and classification of urinary mRNA microarray data by iterative random forest to diagnose renal fibrosis: a two-stage study. Sci Rep 2017; 7: 39832.

14 Alharazy S, Kong NC, Mohd M, Shah SA, Ba'in A, Abdul Gafor AH. Urine monocyte chemoattractant protein-1 and lupus nephritis disease activity: preliminary report of a prospective longitudinal study. Autoimmune Dis 2015; 2015: 962046.

15 Liu BC, Zhang L, Lv LL, Wang YL, Liu DG, Zhang XL. Application of antibody array technology in the analysis of urinary cytokine profiles in patients with chronic kidney disease. Am J Nephrol 2006; 26: 483–490.

16 Siwy J, Schanstra JP, Argiles A, Bakker SJ, Beige J, Boucek P,

Brand K, Delles C, Duranton F, Fernandez-Fernandez B, Jankowski ML, Al Khatib M, Kunt T, Lajer M, Lichtinghagen R, Lindhardt M, Maahs DM, Mischak H, Mullen W, Navis G, Noutsou M, Ortiz A, Persson F, Petrie JR, Roob JM, Rossing P, Ruggenenti P, Rychlik I, Serra AL, Snell-Bergeon J, Spasovski G, Stojceva-Taneva O, Trillini M, von der Leyen H, Winklhofer-Roob BM, Zurbig P, Jankowski J. Multicentre prospective validation of a urinary peptidome-based classifier for the diagnosis of type 2 diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2014; 29: 1563–1570.

17 Schanstra JP, Zurbig P, Alkhalaf A, Argiles A, Bakker SJ, Beige J, Bilo HJ, Chatzikyrkou C, Dakna M, Dawson J, Delles C, Haller H, Haubitz M, Husi H, Jankowski J, Jerums G, Kleefstra N, Kuznetsova T, Maahs DM, Menne J, Mullen W, Ortiz A, Persson F, Rossing P, Ruggenenti P, Rychlik I, Serra AL, Siwy J, Snell-Bergeon J, Spasovski G, Staessen JA, Vlahou A, Mischak H, Vanholder R. Diagnosis and prediction of CKD progression by assessment of urinary peptides. J Am Soc Nephrol 2015; 26: 1999–2010.

18 Gamez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borras FE. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. Front Immunol 2015; 6: 6.

19 Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen XM, Xu YM, Huang LF, Wang XZ. Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. ScientificWorldJournal 2015; 2015: 657086.

20 Zhang W, Zhou X, Zhang H, Yao Q, Liu Y, Dong Z. Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases. Am J Physiol Renal Physiol 2016; 311: F844–F851.

21 Fang DY, King HW, Li JY, Gleadle JM. Exosomes and the kidney: blaming the messenger. Nephrology (Carlton) 2013; 18: 1–10.

22 Miranda KC, Bond DT, McKee M, Skog J, Paunescu TG, Da Silva N, Brown D, Russo LM. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. Kidney Int 2010; 78: 191–199.

23 Lv LL, Cao YH, Pan MM, Liu H, Tang RN, Ma KL, Chen PS, Liu BC. CD2AP mRNA in urinary exosome as biomarker of kidney disease. Clin Chim Acta 2014; 428: 26–31.

24 Lv LL, Cao Y, Liu D, Xu M, Liu H, Tang RN, Ma KL, Liu BC. Isolation and quantification of microRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. Int J Biol Sci 2013; 9: 1021–1031.

25 Lv LL, Cao YH, Ni HF, Xu M, Liu D, Liu H, Chen PS, Liu BC. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. Am J Physiol Renal Physiol 2013; 305: F1220–F1227.

26 Ben-Dov IZ, Tan YC, Morozov P, Wilson PD, Rennert H, Blumenfeld JD, Tuschl T. Urine microRNA as potential biomarkers of autosomal dominant polycystic kidney disease progression: description of miRNA profiles at baseline. PLoS One 2014; 9: e86856.

27 Mohan A, Singh RS, Kumari M, Garg D, Upadhyay A, Ecelbarger CM, Tripathy S, Tiwari S. Urinary exosomal microRNA- 451-5p is a potential early biomarker of diabetic nephropathy in rats. PLoS One 2016; 11: e0154055.

28 Ramezani A, Devaney JM, Cohen S, Wing MR, Scott R, Knoblach S, Singhal R, Howard L, Kopp JB, Raj DS. Circulating and urinary microRNA profile in focal segmental glomerulosclerosis: a pilot study. Eur J Clin Invest 2015; 45: 394–404.

29 Schwarzenbach H. Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer. Breast Cancer Res 2013; 15: 211.

30 Nassirpour R, Mathur S, Gosink MM, Li Y, Shoieb AM, Wood J, O'Neil SP, Homer BL, Whiteley LO. Identification of tubular injury microRNA biomarkers in urine: comparison of next-generation sequencing and qPCR-based profiling platforms. BMC Genomics 2014; 15: 485.

31 Devonshire AS, Elaswarapu R, Foy CA. Evaluation of external RNA controls for the standardisation of gene expression biomarker measurements. BMC Genomics 2010; 11: 662.

32 Galichon P, Amrouche L, Hertig A, Brocheriou I, Rabant M, Xu-Dubois YC, Ouali N, Dahan K, Morin L, Terzi F, Rondeau E, Anglicheau D. Urinary mRNA for the diagnosis of renal allograft rejection: The issue of normalization. Am J Transplant 2016; 16(10): 3033–3040.

33 van Balkom BW, Pisitkun T, Verhaar MC, Knepper MA. Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. Kidney Int 2011; 80: 1138–1145.

34 Hill AF, Pegtel DM, Lambertz U, Leonardi T, O'Driscoll L, Pluchino S, Ter-Ovanesyan D, Nolte-'t Hoen EN. ISEV position paper: extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics. J Extracell Vesicles 2013; 2: doi: 10.3402/jev.v2i0.22859.

35 Xu K, Rosenstiel P, Paragas N, Hinze C, Gao X, Huai Shen T, Werth M, Forster C, Deng R, Bruck E, Boles RW, Tornato A, Gopal T, Jones M, Konig J, Stauber J, D'Agati V, Erdjument-Bromage H, Saggi S, Wagener G, Schmidt-Ott KM, Tatonetti N, Tempst P, Oliver JA, Guarnieri P, Barasch J. Unique transcriptional programs identify subtypes of AKI. J Am Soc Nephrol 2017; 28(6): 1729–1740.

36 Rubin A, Salzberg AC, Imamura Y, Grivitishvilli A, Tombran-Tink J. Identification of novel targets of diabetic nephropathy and PEDF peptide treatment using RNA-seq. BMC Genomics 2016; 17: 936.

37 Ismail N, Wang Y, Dakhlallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, Shah P, Wisler J, Eubank TD, Tridandapani S, Paulaitis ME, Piper MG, Marsh CB. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. Blood 2013; 121: 984–995.

38 Papadopoulos T, Belliere J, Bascands JL, Neau E, Klein J, Schanstra JP. miRNAs in urine: a mirror image of kidney disease? Expert Rev Mol Diagn 2015; 15: 361–374.