

2 型糖尿病发病进程中血清微小核糖核酸-103 表达的临床医学意义

王奕¹, 陈雪辉², 陈红兵¹

(1. 南京医科大学附属儿童医院检验科, 江苏 南京 210008; 2. 南京市中医院检验科, 江苏 南京 210001)

摘要:目的 探讨血清微小核糖核酸(miRNA)-103 在 2 型糖尿病(T2DM)前期、新诊断的 T2DM 以及糖尿病并发症患者中的表达水平及临床意义。方法 选取 70 例研究对象, 其中 20 例为糖耐量正常的个体(NGT 组), 18 例为糖调节受损患者(pre-diabetes 组), 18 例为新诊断的 T2DM 并无明显并发症患者(T2DM 组), 14 例为 T2DM 并发症患者(T2DM 伴并发症组)。所有诊断均符合美国糖尿病学会(ADA)糖尿病诊断与分型标准中的诊断标准。应用荧光定量实时 逆转录聚合酶链反应(PR-PCR)法评价各组受试者血清 miRNA-103 的表达水平。结果 Pre-diabetes 组、T2DM 组以及 T2DM 并发症组血清样本中 miRNA-103 水平显著高于 NGT 组($P < 0.05$); T2DM 组血清样本中 miRNA-103 水平显著高于 pre-diabetes 组($P < 0.05$), 而 miRNA-103 在 T2DM 伴并发症组与 T2DM 组血清中的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 血清 miRNA-103 有可能用于诊断及预测糖尿病的敏感的生物标志物, 对于鉴别高风险患者具有至关重要的意义。

关键词:糖调节受损; 2 型糖尿病; 糖尿病并发症; 微小核糖核酸-103

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.10.023

The clinical significance of expression level of serum microRNA-103 in the progression of type 2 diabetes mellitus

WANG Yi¹, CHEN Xuehui², CHEN Hongbing¹

(1. Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nanjing Hospital of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression levels of serum miRNA-103 in pre-diabetes, newly diagnosed type 2 diabetes mellitus without evident complications and type 2 diabetes mellitus with complications. Methods Selected 70 cases in this study, there were 20 healthy controls, 18 patients with impaired glucose regulation (pre-diabetes), 18 newly diagnosed type 2 diabetes mellitus without

通信作者: 陈红兵, 男, 主任检验师, 研究方向: 临床检验, E-mail: 115468172@qq.com

- [4] AKHTAR AJ, AKHTAR AA, PADDA MS. Cholelithiasis in African American and Hispanic patients: a comparison between painless presentation and classical biliary pain with regards to clinical manifestations and outcomes [J]. J Immigr Minor Health, 2014, 16(3): 373-376.
- [5] 苏坤, 马鸿祥, 周鸣清. 腹腔镜联合十二指肠镜一期治疗胆囊结石合并胆总管结石[J]. 安徽医药, 2013, 17(5): 799-800.
- [6] 刘金火, 吴建清, 何金鑫, 等. 腹腔镜胆总管探查联合胆道镜治疗胆囊结石合并胆总管结石 67 例临床体会[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2013, 20(6): 668-670.
- [7] YASUDA I, FUJITA N, MAGUCHI H, et al. Long-term outcomes after endoscopic sphincterotomy versus endoscopic papillary balloon dilation for bile duct stones[J]. Gastrointest Endosc, 2010, 72(6): 1185-1191.
- [8] ZHANG WJ, XU GF, WU GZ, et al. Laparoscopic exploration of common bile duct with primary closure versus T-tube drainage: a randomized clinical trial[J]. J Surg Res, 2009, 157(1): e1-e5.
- [9] 刘立川, 张峻, 刘伟. 腹腔镜胆总管探查术治疗老年胆总管结石[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(8): 1154-1156.
- [10] 彭沙沙, 黄汉飞, 段键, 等. 胆管结石继发胆总管结石行胆道探查一期缝合 125 例[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(8): 1126-1128.
- [11] OZKARDES AB, TOKAÇ M, DURLU EG, et al. Early versus delayed laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis: a prospective, randomized study[J]. Int Surg, 2014, 99(1): 56-61.
- [12] 董良鹏, 秦双, 闫争强, 等. 腹腔镜联合胆道镜治疗胆囊结石合并胆总管结石 59 例[J]. 中国现代普通外科进展, 2013, 16(6): 494-495.
- [13] 叶志东, 黄迪, 翁杰锋, 等. 80 岁以上超高龄胆总管结石患者应用腹腔镜与胆道镜双镜联合手术疗效与术后随访[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(2): 298-301.
- [14] 魏善武, 丁海波, 刘大林. 腹腔镜联合胆道镜在治疗胆囊结石并胆总管结石中的效果分析[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2014, 35(22): 3331-3333.
- [15] ZHANG HW, CHEN YJ, WU CH, et al. Laparoscopic common bile duct exploration with primary closure for management of cholelithiasis: a retrospective analysis and comparison with conventional T-tube drainage[J]. Am Surg, 2014, 80(2): 178-181.

(收稿日期: 2016-09-30, 修回日期: 2016-12-11)

evident complications and 14 type 2 diabetes mellitus with complications. They were diagnosed according to American Diabetes Association diagnostic criteria. Serum miRNA-103 expression was assessed by quantitative polymerase chain reaction. **Results** We found a significant increase of serum miRNA-103 expression between pre-diabetes as well as diabetic patients when both compared with controls and between diabetic patients compared to pre-diabetes ($P < 0.05$). There was no significant difference for serum miRNA-103 expression level between diabetic patients with complications and diabetic patients without evident complications ($P > 0.05$). **Conclusions** Serum miRNA-103 expression can be a good biomarker for diagnosis and prediction of pre-diabetes and type 2 diabetes mellitus as well as for better identification of a high risk form of diabetes.

Key words: Impaired glucose regulation; Type 2 diabetes mellitus; Diabetic complications; miRNA-103

2型糖尿病(T2DM)是一种慢性代谢性疾病,其主要病理特征是胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能减退^[1]。国际糖尿病联盟统计显示2013年全球糖尿病患者约3.82亿人,中国的成人糖尿病患者已超1亿,居世界首位,其中90%~95%为T2DM患者^[2]。对糖尿病进行预防和治疗以降低糖尿病发生率,已成为全球共同关注的问题。近年来研究发现多种微小核糖核酸(miRNAs)参与许多代谢过程包括胰腺的发育、胰岛素的生成与分泌以及血糖稳态^[3]。而且,miRNAs存在人类血清中,且在不同的健康个体中表达稳定、一致,检测结果可重复性良好,因此疾病特异性miRNAs可作为一类新的血清生物标志物^[4]。研究已证实,miRNAs是癌症、心血管疾病、神经以及退行性疾病的潜在生物标志物^[5]。有研究发现,在肥胖小鼠中miRNA-103表达上调,相反沉默miRNA-103,糖代谢和胰岛素敏感性得到改善,miRNA-103是通过靶向微囊蛋白1在调控胰岛素敏感性中起到重要的作用^[6]。本研究通过对不同阶段T2DM患者血清miRNA-103的表达进行检测,初步探讨该miRNA在T2DM发病过程中的表达与临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2014年2—12月就诊于南京市中医院50例糖代谢异常患者及20例健康个体。所有诊断均符合美国糖尿病学会(ADA)指南糖尿病诊断与分型标准中的诊断标准^[7]。(1)糖耐量正常的个体组(NGT组)20例,男11例,女9例;口服葡萄糖耐量试验(OGTT)结果为空腹血糖(FPG) $< 5.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 且口服葡萄糖2 h后血糖浓度(2 h PG) $< 7.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。(2)糖调节受损患者组(pre-diabetes组)18例,男9例,女9例,包括空腹血糖受损(IFG)、糖耐量受损(IGT)以及IFG合IGT三种状态。FPG受损患者OGTT结果为FPG $5.6 \sim 6.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 且2 h PG $< 7.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; IGT患者OGTT结果为FPG $\leq 5.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 且2 h PG $7.8 \sim 11.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; IFG合IGT患者OGTT结果为

FPG $5.6 \sim 6.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 且2 h PG $7.8 \sim 11.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。(3)新诊断的T2DM并无明显的并发症组18例,男9例,女9例。OGTT结果为FPG $\geq 7.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和(或)2 h PG $\geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。(4)T2DM并发症组14例,男8例,女6例。符合糖尿病诊断标准,并出现微血管病变包括糖尿病性神经病(完全神经性检查)、糖尿病性肾病(尿微量蛋白检测评价)。每组个体都进行体质指数(BMI)计算, BMI = 体质量(kg)/身高(m^2)。健康个体无T2DM家族史,其年龄、性别与pre-diabetes组、糖尿病患者组以及2型糖尿病并发症组均相匹配。本研究获医院医学伦理委员会批准,患者或近亲属对研究方案签署知情同意书。

排除标准:具有肝硬化、恶性肿瘤、传染病、炎症、支气管哮喘、心血管疾病或者非糖尿病性肾病等疾病者未被列入本研究。

1.2 方法

1.2.1 生化指标的测定 所有受试者OGTT前1 d晚餐后禁食至少8 h, OGTT具体指受试者于空腹及口服75 g无水葡萄糖后2 h分别抽取静脉血,采用葡萄糖氧化酶法测定FPG和2 h PG。血清三酰甘油(TG)和总胆固醇(TC)采用酶法测定。

1.2.2 血清总RNA提取 四组人群空腹血清分离1 mL存储于 -80°C 冰箱,按照miRNeasy Kit总RNA提取试剂盒(QIAGEN, Valencia, CA)的说明书提取血清中游离总RNA。

1.2.3 血清miRNA-103表达水平的检测 受试者空腹血清miRNA-103的表达水平采用实时定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测,按照RT-PCR检测试剂盒说明书操作,以非编码小RNA RNU6B作为内部参照。患者空腹,穿刺肘静脉采集外周血,收集血清放入无RNA酶的1.5 mL EP管中于 -80°C 冰箱冻存。以mirVana试剂盒(Ambion公司)从500 μL 血清中提取总RNA最终溶解体积为100 μL 。以TaqMan MicroRNA Assay试剂盒(ABI公司)将20 ng血清RNA逆转录至cDNA后

进行 qPCR 反应。温度设置为:起始模板变性 95 ℃ 10 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火/延伸 1 min,共 40 循环。每例样本均重复 3 次取平均值为最终结果。

1.3 统计学方法 所得数据采用 SPSS16.0 软件包进行统计分析。以 miRNA-103 与内参 RNU6B 之间阈值循环数之差(ΔCt)表示 miRNA-103 的表达水平,以 one-way ANOVA + LSD-*t* 检验分析四组研究对象间 RNA 浓度以及年龄、性别、BMI 血糖及血脂等指标的差异。采用 Pearson 相关分析评价血清 miRNA-103 表达与代谢参数的相关性结果。所有统计分析均为双侧, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较 四组研究对象在性别、年龄、BMI 方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。OGTT 结果显示,与 NGT 组相比,pre-diabetes 组和 T2DM 组的 FPG 和 2 h PG 差异有统计学意义;T2DM 并发症组与 T2DM 组间 FPG 和 2 h PG 差异无统计学意义。TG 水平在 NGT 组、Pre-diabetes 组和 T2DM 组呈显著增高的趋势($P < 0.01$),T2DM 并发症组与 T2DM 组间 TG 水平差异无统计学意义,而各组间 TC 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 四组间血清总 RNA 浓度比较 提取的总 RNA 浓度在四组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 四组间血清 miRNA-103 表达水平的比较 与 NGT 组相比,Pre-diabetes 组、T2DM 组以及 T2DM 并发症组 miRNA-103 表达水平显著上调($P < 0.05$);T2DM 组血清样本中 miRNA-103 表达水平显著高于 pre-diabetes 组($P < 0.05$);而 T2DM 组与 T2DM 并发症组间血清样本中 miRNA-103 表达水平差异无统计学意义($P = 0.34$)。见表 2。

表 2 各组间血清总 RNA、miRNA-103 表达水平的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	总 RNA/mg · L ⁻¹	miRNA-103 表达水平
NGT 组	20	21.3 ± 3.61	0.66 ± 0.14
pre-diabetes 组	18	22.5 ± 2.91	1.32 ± 0.24 ^a
T2DM 组	18	22.9 ± 3.82	2.49 ± 0.52 ^{ab}
T2DM 并发症组	14	23.2 ± 3.06	2.69 ± 0.31 ^{ab}

注:与 NGT 组比较,^a $P < 0.05$;与 pre-diabetes 组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 所有组受试者血清 miRNA-103 表达水平与其代谢参数的相关性分析 血清 miRNA-103 表达水平与受试者 FPG、2 h PG 及 TG 呈现显著性正相关。见表 3。

表 3 血清 miRNA-103 表达水平与受试者代谢参数的相关性分析

项目	与血清 miRNA-103 表达水平比较	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
FPG	0.71	<0.05
2 h PG	0.82	<0.01
TG	0.70	<0.05
TC	0.15	>0.05

3 讨论

miRNAs 是一类平均长度约 22 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA 小分子,主要通过结合在靶基因信使 RNA 的 3'非翻译区,加快信使 RNA 的降解或有效抑制信使 RNA 翻译成靶基因而发挥作用^[7]。近些年,miRNAs 已成为生命科学研究领域鼓舞人心的焦点。已有大量表明,miRNAs 通过调控靶基因的表达参与许多的生物学过程包括细胞发育和分化、凋亡、应激与免疫反应,在肿瘤、代谢紊乱等人类疾病的产生和发展过程中起到重要的作用^[8]。而且 miRNAs 也在血糖稳态和 T2DM 发病机制中起到至关重要的作用。因此 miRNAs 可能有助于糖尿病的发生与发展。而且人类基因组被预

表 1 各组研究对象的临床资料比较

组别	年龄/ (岁, $\bar{x} \pm s$)	性别/例		FPG / (mmol · L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)	2 h PG / (mmol · L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)	TG / (mmol · L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)	TC / (mmol · L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)	BMI / (kg · m ⁻² , $\bar{x} \pm s$)
		男	女					
NGT 组	44.8 ± 3.6	11	9	4.83 ± 0.74	5.00 ± 0.94	1.58 ± 0.07	4.26 ± 0.34	23.0 ± 3.5
pre-diabetes 组	46.3 ± 2.8	9	9	6.39 ± 1.03	9.13 ± 1.55	1.78 ± 0.66	4.36 ± 0.23	22.9 ± 3.8
T2DM 组	48.3 ± 5.6	9	9	8.55 ± 1.28	13.66 ± 1.78	2.12 ± 0.95	4.44 ± 0.20	24.2 ± 4.6
T2DM 并发症组	49.4 ± 7.3	8	6	8.89 ± 1.26	16.04 ± 2.27	2.24 ± 0.75	4.47 ± 0.15	25.4 ± 5.6
<i>P</i> 值	>0.05	>0.05		<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

测能够编码超过 1 000 个 miRNAs,而 miRNA 被相信可调控约 30% 的人类基因。因此,研究 miRNA 自身比研究其大量的靶基因更为容易。已有一些研究证实糖尿病及其并发症患者的一些靶组织如脑、眼睛、神经以及肾脏等出现某些 miRNAs 调节功能紊乱。近年研究表明 miRNA 存在于人类外周血中,且表达水平稳定。miRNA-103 作为 miRNAs 家族中重要的一员,参与调控胰岛素敏感性和血糖稳态。因此本文研究外周血循环 miRNA-103 在 T2DM 患者发病过程中的临床意义。

生物信息学预测 miRNA-103 可通过作用于乙酰辅酶 A 和糖脂代谢途径中的多个 mRNA 靶标^[9],提示 miRNA-103 可能参与糖脂类代谢的调节。Trajkovski 等^[6]研究报道 miRNA-103 在糖尿病密切相关的非酒精脂肪肝病患者、酒精性脂肪肝病患者以及非酒精性脂肪性肝炎患者的肝活检组织中表达水平明显较高。而且,miRNA-103 的表达与胰岛素抵抗指数呈正相关。最新研究报道 miRNA-103 在非酒精脂肪肝病患者血清中高表达,且与胰岛素抵抗指数以及总胆固醇均呈正相关^[10]。最近研究糖尿病患者组织 miRNA 差异表达谱表明 T2DM 患者肌肉、脂肪、肝脏以及胰腺组织中 miRNA-103 表达上调^[11-12]。严美花^[13]研究发现,与妊娠正常组相比,妊娠糖尿病组血清 miRNA-103 表达水平明显上调。因此本文检测了健康个体、糖尿病前期、初诊糖尿病未有并发症以及糖尿病伴有并发症患者血清 miRNA-103 的表达情况。本研究发现,尽管初诊糖尿病组与糖尿病伴明显并发症组血清 miRNA-103 表达水平差异无统计学意义,但发现糖调节受损组、初诊糖尿病组以及糖尿病伴并发症组血清 miRNA-103 表达水平明显高于对照组,且初诊糖尿病组以及糖尿病伴并发症组血清 miRNA-103 表达水平也明显高于糖调节受损组。而且血清 miRNA-103 表达水平与受试者空腹血糖和餐后 2 h 血糖水平呈现显著性正相关。这说明 miRNA-103 在糖尿病发生中起一定作用。徐倩等^[14]报道在以胰岛素抵抗为主的超重或肥胖 T2DM 患者血清中 miRNA-103 表达明显高于正常人群,且与胰岛素抵抗敏感指数呈正相关,从而认为是胰岛素抵抗的独立影响因素,这进一步提示 miRNA-103 可能通过影响胰岛素敏感性而参与糖尿病发生发展。进一步研究发现 miRNA-103 过表达能够诱导正常小鼠发生糖耐量受损,而高表达的 miRNA-103 导致血糖升高的可

能机制是通过下调靶向微囊蛋白 1 表达,影响胰岛素信号通路的传导,使胰岛素敏感性下降,导致胰岛素抵抗^[6]。这些研究报道充分表明 miRNA-103 与糖尿病的发生密切相关,但具体机制有待研究。

综上所述,血清 miRNA-103 有可能用于诊断及预测糖尿病的敏感的生物标志物,对于鉴别高风险患者具有至关重要的意义。但目前对于环境、遗传、疾病等因素如何影响 miRNA-103 的表达以及 miRNA-103 在糖尿病相关代谢性疾病中表达异常的调控机制都还有待进一步研究。

参考文献

- [1] ASHCROFT FM, RORSMAN P. Diabetes Mellitus and the beta Cell; The Last Ten Years[J]. Cell, 2012, 148(6): 1160-1171.
- [2] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959.
- [3] TANG X, TANG G, ÖZCAN S. Role of microRNAs in diabetes[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2008, 1779(11): 697-701.
- [4] OUCHI N, KIHARA S, ARITA Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages[J]. Circulation, 2001, 103(8): 1057-1063.
- [5] CHEN X, BA Y, MA LJ, et al. Characterization of microRNAs in serum; a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Research, 2008, 18(10): 997-1006.
- [6] TRAJKOVSKI M, HAUSER J, SOUTSCHEK J, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity[J]. Nature, 2011, 474(7353): 649-653.
- [7] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2011, 34(Suppl 1): S62-S69.
- [8] HE L, HANNON GJ. MicroRNAs; Small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nature Reviews Genetics, 2004, 5(7): 522-531.
- [9] FLYNT AS, LAI EC. Biological principles of microRNA-mediated regulation; shared themes amid diversity[J]. Nature Reviews Genetics, 2008, 9(11): 831-842.
- [10] 冯起平, 李云峰, 孟雁, 等. miRNA 的研究进展[J]. 生命科学, 2003, 15(4): 193-199.
- [11] XU Q, LI Y, SHANG YF, et al. miRNA-103; Molecular link between insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(2): 511-516.
- [12] ZHU H, LEUNG SW. Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes; a meta-analysis of controlled profiling studies[J]. Diabetologia, 2015, 58(5): 900-911.
- [13] 严美花. 女性糖代谢异常的机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [14] 徐倩, 李盈, 高珊, 等. microRNAs103 和 107 与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2015, 23(1): 37-39.

(收稿日期: 2016-10-16, 修回日期: 2017-02-15)