

## 2型糖尿病微血管并发症患者血清 miR-16, miR-126 和 miR-221 水平检测及临床意义\*

万淑君<sup>1,2</sup>, 王 成<sup>2</sup>, 王 静<sup>2</sup>, 牛冬梅<sup>2</sup>, 张春妮<sup>2</sup>, 汪俊军<sup>2</sup> (1. 江苏大学临床医学院, 江苏镇江 212013; 2. 中国人民解放军南京军区南京总医院临床检验科, 南京 210002)

**摘要:**目的 检测2型糖尿病(T2DM)及其微血管并发症患者(T2DMC)血清中 miR-16, miR-126 和 miR-221 水平, 分析其作为 T2DMC 潜在辅助诊断指标的潜能。方法 运用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测 55 例 T2DM 患者, 55 例 T2DMC 患者及 55 例健康对照血清中 miR-16, miR-126 和 miR-221 水平, 生化分析仪测定相关生化指标, ROC 曲线及逻辑回归分析三种血清 miRNAs 对 T2DM 及 T2DMC 的辅助诊断价值。结果 qRT-PCR 结果显示, 与健康对照组[miR-16 ( $14.35 \pm 1.00$ )  $\times 10^{-5}$ , miR-126 ( $11.75 \pm 1.47$ )  $\times 10^{-5}$  和 miR-221 ( $32.26 \pm 3.98$ )  $\times 10^{-5}$ ]相比, 三种 miRNAs 在 T2DM 患者[miR-16 ( $23.74 \pm 2.70$ )  $\times 10^{-5}$ , miR-126 ( $25.01 \pm 4.13$ )  $\times 10^{-5}$  和 miR-221 ( $84.76 \pm 11.79$ )  $\times 10^{-5}$ ]及 T2DMC 患者[miR-16 ( $43.74 \pm 9.61$ )  $\times 10^{-5}$ , miR-126 ( $17.66 \pm 2.20$ )  $\times 10^{-5}$  和 miR-221 ( $82.52 \pm 12.48$ )  $\times 10^{-5}$ ]血清中表达水平显著升高( $P$  均  $< 0.05$ ), 其中 miR-16 变化最为显著; 三种 miRNAs 用于 T2DM 诊断的 ROC 曲线下面积( $AUC_{ROC}$ )分别为 0.63(95%CI 0.53~0.74), 0.64(95%CI 0.54~0.74) 和 0.74(95%CI 0.65~0.83); 用于 T2DMC 诊断的 ROC 曲线下面积( $AUC_{ROC}$ )分别为 0.75(95%CI 0.66~0.84), 0.62(95%CI 0.52~0.73) 和 0.73(95%CI 0.64~0.83); 进一步逻辑回归分析结果显示, 这三种血清 miRNAs 是 T2DM 和 T2DMC 独立危险因素。结论 血清中高表达的 miR-16, miR-126 和 miR-221 是 T2DM 及 T2DMC 患者潜在的非侵入性辅助诊断标志物及独立危险因素。

**关键词:** 2型糖尿病; 微血管性并发症; 微小核糖核酸; 血清; 生物标志物

中图分类号: R587.2; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)05-009-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.003

### Study on Serum Levels of miR-16, miR-126 and miR-221 and Their Clinical Significance in Type 2 Diabetes Patients with or Without Microvascular Complications

WAN Shu-jun<sup>1,2</sup>, WANG Cheng<sup>2</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>, NIU Dong-mei<sup>2</sup>, ZHANG Chun-ni<sup>2</sup>, WANG Jun-jun<sup>2</sup>

(1. Jiangsu University School of Medicine, Jiangsu Zhenjiang 212013, China;

2. Department of Clinical Laboratory,

Nanjing General Hospital of Nanjing Military Commend, PLA, Nanjing 210002, China)

**Abstract:** **Objective** To determine the serum levels of miR-16, miR-126 and miR-221 in type 2 diabetes (T2DM) patients with or without microvascular complications, and further evaluate their clinical significance. **Methods** The serum levels of miR-16, miR-126 and miR-221 were examined in 55 T2DM patients, 55 T2DM patients with microvascular complications and 55 healthy controls using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The levels of fasting blood glucose, triglycerides, cholesterol, high density lipoprotein, low density lipoprotein and others biochemical parameters were determined by biochemical analyzer, and the diagnostic usefulness of the three miRNAs for T2DM patients and patients with microvascular complications were assessed by ROC curve analysis and logistic regression analysis. **Results** Compared with healthy controls [miR-16 ( $14.35 \pm 1.00$ )  $\times 10^{-5}$ , miR-126 ( $11.75 \pm 1.47$ )  $\times 10^{-5}$  and miR-221 ( $32.26 \pm 3.98$ )  $\times 10^{-5}$ ], the miR-16, miR-126 and miR-221 expression were significantly increased in T2DM patients [miR-16 ( $23.74 \pm 2.70$ )  $\times 10^{-5}$ , miR-126 ( $25.01 \pm 4.13$ )  $\times 10^{-5}$  and miR-221 ( $84.76 \pm 11.79$ )  $\times 10^{-5}$ ] and T2DM patients with microvascular complications [miR-16 ( $43.74 \pm 9.61$ )  $\times 10^{-5}$ , miR-126 ( $17.66 \pm 2.20$ )  $\times 10^{-5}$  and miR-221 ( $82.52 \pm 12.48$ )  $\times 10^{-5}$ ]. The area under ROC curve ( $AUC_{ROC}$ ) of miR-16, miR-126 and miR-221 for T2DM patients were 0.63 (95%CI 0.53~0.74), 0.64 (95%CI 0.54~0.74) and 0.74 (95%CI 0.65~0.83), respectively. For T2DM patients with microvascular complications, the area under ROC curve were 0.75 (95%CI 0.66~0.84), 0.62 (95%CI 0.52~0.73) and 0.73 (95%CI 0.64~0.83), respectively. Furthermore, logistic regression revealed that the three miRNAs were novel independent risk factors for T2DM and T2DMC. **Conclusion** The levels of miR-16, miR-126 and miR-221 were significantly increased in the serum of T2DM patients with or without microvascular complications, and can be used as potential non-invasive biomarkers and risk factors for T2DM patients and T2DM patients

\* 基金项目: 国家自然科学基金(812711904, 81572074); 江苏省自然科学基金(BK20140730)。

作者简介: 万淑君(1990-), 女, 医学硕士研究生, 主要研究方向: miRNAs 与糖尿病微血管病变, E-mail: 834555205@qq.com。

通讯作者: 汪俊军(1966-), 男, 博士, 主任技师, 教授, E-mail: wangjj9202@163.com。

with microvascular complications.

**Keywords:** type 2 diabetes; microvascular complications; microRNA; serum; biomarkers

2型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM)是一种危害人类健康的常见慢性代谢性疾病,临床表现为高血糖、胰岛素抵抗和胰岛 $\beta$ 细胞功能损伤,发病机制目前尚不完全清楚。T2DM患者血糖长期控制不佳会诱发相关微血管病变(type 2 diabetes microvascular complications, T2DMC),包括糖尿病神经病变、视网膜病变和糖尿病肾病等,是导致T2DM患者失明、肾衰竭和非创伤性截肢等恶性致残、致死事件发生的首要原因,因此,T2DMC的早期诊断和监控对于延缓或预防恶性事件的发生具有重要意义,但目前临床尚缺乏T2DMC的有效诊断和预防血清生物标志。

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类长约22个核苷酸的非编码单链小核糖核酸分子,在转录后水平调控靶基因的表达<sup>[1]</sup>。大量研究显示,miRNA在T2DM和T2DMC的发生发展过程中也发挥重要作用。最新研究发现,人血清中也存在大量稳定、丰富表达的miRNAs, T2DM患者血清中多种miRNAs的表达量发生显著变化。我们前期研究发现miR-342-5p和miR423-5p在T2DM及其微血管病变患者血清中显著升高<sup>[2]</sup>,提示血清miRNAs有可能作为T2DM及其微血管并发症的新型标志物。文献报道显示,miR-16, miR-126和miR-221与T2DM患者内皮细胞损伤和相关炎症反应密切相关<sup>[3,4]</sup>。其中miR-126和miR-221在血管内皮细胞中含量丰富,且在细胞功能调节、迁移、再生等生理过程中发挥重要作用<sup>[4]</sup>,可反映T2DM患者血管内皮功能状况的损伤情况,但上述miRNAs在T2DM和T2DMC患者血清中的变化情况尚不清楚,缺乏系统的临床样本研究,其对T2DMC临床诊断价值有待深入探讨。据此,本研究检测了T2DM及T2DMC患者血清中miR-16, miR-126和miR-221的表达水平,并结合患者临床资料,探讨其作为T2DMC生物标志物的可能性,为T2DM及其微血管并发症的诊断和发病机制探讨提供新的思路。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 收集2013年9月~2015年3月在南京军区南京总医院内分泌科就诊的T2DM和T2DMC患者各55例。其中T2DM患者中女性20例,男性35例,年龄19~74岁,平均年龄 $49.9 \pm 11.8$ 岁, BMI( $\text{kg}/\text{m}^2$ )  $25.0 \pm 4.4$ , 收缩压(mmHg)  $135.4 \pm 18.0$ , 舒张压(mmHg)  $82.3 \pm 10.0$ , 病程(年)  $2.0 \pm 2.7$ ; T2DMC患者中女性12例,男性43例,年龄24~93岁,平均年龄 $51.7 \pm 13.7$ 岁,

BMI( $\text{kg}/\text{m}^2$ )  $25.2 \pm 3.0$ , 收缩压(mmHg)  $135.6 \pm 13.9$ , 舒张压(mmHg)  $82.6 \pm 10.9$ , 病程(年)  $5.0 \pm 4.3$ 。T2DM按照世界卫生组织制定的标准入选:即空腹血糖 $\geq 7.0$  mmol/L和/或75 g OGTT 2 h血糖 $\geq 11.1$  mmol/L和/或糖化血红蛋白(HbA1c) $\geq 6.5\%$ ;患者排除标准:在近一个月内使用过降糖药物治疗、有严重肝脏疾病、慢性肾功能不全、患有其他内分泌疾病及最近一个月内做过大型外科手术患者。T2DMC纳入标准为:患有T2DM并被确诊有糖尿病肾病或/和糖尿病神经病变或/和糖尿病视网膜病变的患者。对照组随机选择与病例组性别年龄匹配的55例我院体检健康人群,其中女性18例、男性37例,年龄34~88岁,平均年龄 $49.3 \pm 17.1$ 岁, BMI( $\text{kg}/\text{m}^2$ )  $23.7 \pm 2.0$ , 收缩压(mmHg)  $121.5 \pm 6.5$ , 舒张压(mmHg)  $77.9 \pm 4.5$ 。

1.2 仪器及试剂 罗氏LightCycler<sup>®</sup>480II实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪(罗氏公司);2720型PCR仪(美国ABI公司);WH-851型涡旋仪(南京大学);1612-1型高速离心机(上海医疗器械公司);高速冷冻离心机(Eppendorf公司);SAS67120型超纯水机(Millipore公司);7600型全自动生化分析仪(日本Hitachi公司);HLC-723GB全自动分析仪(日本TOSOH公司);miRNA测定用TaqMan探针(美国ABI公司);酸性水饱和酚(美国Sigma公司);分析纯级别氯仿、异丙醇、无水乙醇(上海化学试剂公司);DEPC水(美国Sigma公司);miRNA逆转录试剂盒、qRT-PCR检测试剂盒(大连TaKaRa公司);人工合成的miRNA成熟体(Invitrogen公司);空腹血糖(FPG)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)检测试剂(英国Randox公司);低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)检测试剂(日本第一化学株式会社);HbA1c检测试剂(日本TOSOH公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 标本收集与保存:采集110例患者入院时(未经治疗)及55例健康对照组空腹静脉血5 ml,室温1500 g,离心5 min,收取血清标本置于-80℃保存。

1.3.2 生化指标测定:血清FPG, TC, TG, LDL-C, HDL-C检测采用7600型全自动生化分析仪及各自检测试剂盒进行测定,结果按给定临床参考值判定。

1.3.3 血清RNA提取及实时荧光定量PCR:血清RNA采用课题组前期建立和优化的酸性苯酚-

氯仿一步抽提法进行, RNA 提取后溶于 22  $\mu$ l DEPC 水保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  待用。血清 miRNA 逆转录反应总体系为 10  $\mu$ l, 包括 DEPC 处理过的 ddH<sub>2</sub>O 3.5  $\mu$ l, 5 $\times$ AMV 缓冲液 2  $\mu$ l, dNTP 1  $\mu$ l, AMV 逆转录酶 0.5  $\mu$ l, 探针及上、下游引物共 1  $\mu$ l, RNA 2  $\mu$ l。逆转录反应参数:  $16^{\circ}\text{C}$  30 min,  $42^{\circ}\text{C}$  30 min,  $85^{\circ}\text{C}$  5 min,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。qRT-PCR 总反应体系为 20  $\mu$ l, 包括 ddH<sub>2</sub>O 14.77  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2  $\mu$ l, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.2  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu$ l, Taq 聚合酶 0.3  $\mu$ l, miRNA 检测引物及探针 0.33  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l。qRT-PCR 反应参数为:  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  15 s;  $60^{\circ}\text{C}$  1 min(收集荧光), 共 40 个循环。每个样本每个 miRNA 检测设置 3 个复孔, 结果取均值。同时, 以 DEPC 处理的不含 cDNA 模板的 ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照。由于血清 miRNA 定量尚缺乏合适、通用内参基因, 因此在本研究中, 我们在 RNA 提取过程中加入 20  $\mu$ l  $10^6$  fmol/L 的人工合成的外源植物 miRNA (MIR2911, 序列为 5'-GGCCGGGG-GACGGGCGUGGA-3') 作为外参用于校正 RNA 提取效率和误差, 并将待测 miRNA 与 MIR2911 同时进行检测, 扩增结束后根据扩增曲线设定统一的阈值, 并用仪器自带 SDS 2.0 分析软件对扩增曲线进行分析, 获得待测 miRNA 和外参 MIR2911 的 Ct 值。根据待测 miRNA 和 MIR2911 的 Ct 值计算出待测样本及对照中血清 miR-16, miR-126

和 miR-221 的相对表达量, 计算公式为  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , 其中  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{待测miRNA}} - \text{Ct}_{\text{MIR2911}}$ 。

1.4 统计学分析 数据分析采用 SPSS 16.0 软件进行。计量资料采用卡方检验, 正态分布的数据组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 非正态分布的数据采用非参数 Mann-Whitney U 检验, miRNA 表达水平以均值 $\pm$ 标准误( $\bar{x} \pm \text{SE}$ )表示, 其他指标以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。绘制 ROC 曲线以分析 miR-16, miR-126 和 miR-221 对 T2DM 及 T2DMC 的诊断意义, 并检测其敏感度和特异度。用逻辑回归分析三种 miRNAs 是否为 T2DMC 的独立危险因素。用 Spearman 秩相关分析以上血清 miRNAs 与其他生化指标的相关性。

## 2 结果

2.1 临床资料及血生化指标测定结果 见表 1。本项目共纳入 110 例患者及 55 例对照组, 患者年龄、性别与对照无统计学差异, 但两组患者 BMI、舒张压和收缩压则显著高于健康对照组 ( $P < 0.05$ )。同时, 生化指标测定结果显示, 两组糖尿病患者血糖指标包括 FPG, HbA<sub>1c</sub>, TG 显著高于健康对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), T2DMC 患者 LDL-C 显著高于正常对照组, 而两组患者 HDL-C 则显著低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 糖尿病及糖尿病微血管并发症患者血生化测定结果 ( $n=55$ )

变 量	健康对照	T2DM	$P^a$	T2DMC	$P^a$	$P^b$
FPG(mmol/L)	4.9(0.5)	9.3(3.8)	$<0.001$	9.3(3.5)	$<0.001$	0.988
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.4(0.4)	9.7(2.9)	0.002	10.3(2.6)	$<0.001$	0.266
TC(mmol/L)	4.4(0.5)	4.6(0.9)	0.124	4.7(1.1)	0.105	0.826
TG(mmol/L)	1.0(0.3)	2.4(1.9)	$<0.001$	1.9(1.6)	$<0.001$	0.128
LDL-C(mmol/L)	2.5(0.6)	2.8(0.8)	0.065	3.0(0.9)	0.002	0.204
HDL-C(mmol/L)	1.4(0.3)	1.0(0.2)	$<0.001$	1.0(0.2)	$<0.001$	0.418

注:  $^a$ 代表 T2DM, T2DMC 组与对照组比较;  $^b$ 代表 T2DMC 组与 T2DM 组比较。

## 2.2 血清 miR-16, miR-126 和 miR-221 检测

qRT-PCR 检测结果显示, 与健康对照组相比, T2DM 及 T2DMC 患者 miR-16, miR-126 和 miR-

221 血清中含量显著升高, 其中 miR-16 在 T2DM 微血管并发症患者组中变化更为显著, 且与 T2DM 组也存在显著差异, 结果见表 2。

表 2 糖尿病及糖尿病微血管并发症患者三种血清 miRNA 表达水平\* ( $n=55$ )

变量	健康对照	T2DM	U	$P^a$	T2DMC	U	$P^a$	U	$P^b$
miR-16	14.35 $\pm$ 2.00	23.74 $\pm$ 2.70	1 106	0.015	43.74 $\pm$ 9.61	761.5	$<0.000 1$	1 158	0.034
miR-126	11.75 $\pm$ 1.47	25.01 $\pm$ 4.13	1 086	0.01	17.66 $\pm$ 2.20	1 138	0.025	1 409	0.537
miR-221	32.26 $\pm$ 3.98	84.76 $\pm$ 11.79	781	$<0.000 1$	82.52 $\pm$ 12.48	809.5	$<0.000 1$	1 447	0.698

注: \* 为相对于加入的外参 MIR2911 含量( $\times 10^{-5}$ );  $^a$ 代表 T2DM, T2DMC 组与对照组比较;  $^b$ 代表 T2DMC 组与 T2DM 组比较。

2.3 ROC 曲线分析 为探讨 miR-16, miR-126 和 miR-221 对 T2DM 及 T2DMC 患者辅助诊断价值, 我们绘制了三种 miRNAs 的 ROC 曲线, 结果

显示, 三种 miRNAs 用于 T2DM 诊断的 ROC 曲线下面积 ( $\text{AUC}_{\text{ROC}}$ ) 分别为 0.63 (95% CI 0.53 ~ 0.74), 0.64 (95% CI 0.54 ~ 0.74) 和 0.74 (95% CI

0.65~0.83);用于 T2DMC 诊断的  $AUC_{ROC}$  分别为 0.75(95%CI 0.66~0.84), 0.62(95%CI 0.52~0.73) 和 0.73(95%CI 0.64~0.83)。其中, miR-16 用于区分 T2DM 及 T2DMC 的 ROC 曲线下面积为 0.62(95%CI 0.51~0.72), 提示三种 miRNAs 对 T2DM 及 T2DMC 患者具备一定的辅助诊断价值, 其中 miR-16 还存在鉴别诊断潜能。

2.4 逻辑回归分析 为进一步探讨三种血清 miRNAs 对于 T2DM 及 T2DMC 的临床价值, 我们运用单因素和多因素逻辑回归分析血清 miR-

表 3

三种血清 miRNAs 单因素及多因素逻辑回归分析

miRNA		miR-16		miR-126		miR-221	
		OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	P
单因素分析	T2DM	7.1(1.9~26.1)	0.003	5.4(1.4~20.1)	0.013	10.7(3.0~38.7)	<0.001
	T2DMC	18.0(5.0~64.5)	<0.001	2.3(0.7~11.8)	0.126	9.9(2.7~35.9)	<0.001
多因素分析	T2DM					18.5(3.5~97.3)	0.001
	T2DMC	14.5(3.2~65.1)	<0.001			4.7(1.0~21.6)	0.045

注:表中二分类参考变量为健康对照组。

2.5 相关性分析 对三种血清 miRNAs 的水平和其他生化指标相关性分析结果显示, miR-16 和 miR-221 与 FPG 呈显著正相关, 与 HDL-C 呈显著负相关, 而 miR-221 还与 TG 和 LDL-C 呈显著正

NA 与 T2DM 及 T2DMC 的关系。单因素分析结果显示, 当以健康对照为二分类参考变量时, 三种 miRNAs 均是 T2DM 和 T2DMC 独立危险因素。进一步多因素回归分析校正年龄、性别、BMI、血压及吸烟等因素后发现, 当以健康对照为参考变量时, miR-221 是 T2DM 的独立危险因素, miR-16 和 miR-221 是 T2DMC 的独立危险因素, 提示上述 miRNAs 可能参与 T2DM 和 T2DMC 的发生、发展, 逻辑回归分析结果见表 3。

相关, 进一步提示三种 miRNAs 可能参与了糖尿病及其微血管病变的发生、发展, 相关性分析结果见表 4。

表 4

三种血清 miRNA 与血生化指标相关性分析结果( $n=165$ )

检测指标	R/P	FPG	TC	TG	HDL-C	LDL-C
miR-16	R	0.212	-0.047	0.081	-0.288	0.073
	P	0.006	0.546	0.301	<0.001	0.35
miR-126	R	0.139	0.136	0.13	-0.098	0.106
	P	0.075	0.081	0.096	0.208	0.176
miR-221	R	0.220	0.082	0.159	-0.271	0.171
	P	0.004	0.297	0.041	<0.001	0.028

3 讨论 大量研究显示, 血清/血浆中 miRNAs 由于稳定、无创性和检测方便等特点<sup>[5]</sup>, 有可能成为预测、诊断和监控 T2DM 发生、发展新生物标志, 但有关 T2DM 微血管并发症患者血清中 miRNAs 的动态变化及临床价值尚缺乏系统的分析, 血清 miRNAs 作为 T2DMC 诊断标志物的研究才刚刚起步。本研究集中于与 T2DM 血管内皮细胞和炎症相关的特异 miRNAs, 包括 miR-16, miR-221 和 miR-126, 采用 qRT-PCR 技术检测上述 miRNAs 在 T2DM 及其微血管并发症患者血清中的含量变化情况, 并结合患者临床资料进行统计学分析。结果表明, 3 种 miRNAs 在 T2DM 和 T2DMC 患者血清中显著升高, 且与多种血生化指标具有较高的相关性, 是 T2DMC 潜在的独立危险因素, 可作为 T2DMC 患者新的辅助诊断标志物。

目前, T2DM 微血管并发症缺乏有效的早期诊断和监控血清学标志物。一些新的蛋白指标如 C 反应蛋白、胰高血糖素肽-1 等被认为是 T2DM

的潜在生物标志, 但均不能有效的预测其发生、发展<sup>[6]</sup>。相关研究报道, 与糖尿病微血管并发症发病相关的晚期糖基化终末产物, 炎症因子及高水平氧化应激等是 T2DMC 潜在危险因素, 然而其致病机制仍不明确<sup>[7]</sup>。最新研究表明, 细胞外 miRNAs 在血液中十分稳定, 有可能成为 T2DM 的诊断标志, 并参与疾病的发生、发展<sup>[4]</sup>。Zampetaki 等<sup>[8]</sup>首先发现 T2DM 患者血浆中存在一组降低的 miRNAs, 能区分 T2DM 患者和正常对照, 并且 T2DM 患者血浆中升高的 miR-126 与后期疾病发展密切相关。另有研究表明, 循环 miR-126 将可能成为预测 T2DM 高危患者的非侵入性诊断指标<sup>[6]</sup>。另一项研究发现, 与糖尿病前期患者及糖耐量正常的糖尿病高危患者相比, 糖尿病有关的 7 个 miRNAs 在新发糖尿病患者中要明显增高<sup>[9]</sup>。血清中异常表达的 miRNAs 还与脂代谢、异常肥胖有关<sup>[10]</sup>。我们的研究显示, miR-16 和 miR-221 与多种血脂指标显著相关, 同时, 三种血清 miRNAs

也是 T2DM, T2DMC 的独立危险因素, 提示 miRNAs 与脂代谢或脂代谢相关生理病理过程密切相关, 并可能参与 T2DM 及 T2DMC 的发生、发展。

miRNAs 在 T2DM 患者血清中的升高机制仍不明确。但近期研究表明, miRNAs 能被各种细胞主动或被动分泌, 并以微囊泡, Ago 蛋白复合物或 HDL 的形式运输至受体细胞并发挥生物学功能<sup>[11]</sup>。基于上述研究结果, 我们猜测 miR-16, miR-221 和 miR-126 在 T2DM 及其微血管并发症的发展过程中可能来自特定细胞的分泌或释放, 对于血清 miRNAs 的检测将会给我们提供有关 T2DM 并发症器官的生理病理状态。有研究显示, T2DM 肢体缺血患者循环血液中 miR-16 的含量增高, 其血液 miR-16 水平与血管重建术后狭窄呈正相关, 有望成为肢体缺血患者血管重建术后的预后指标<sup>[12]</sup>, 并且在胰岛素抵抗过程中, miR-16 含量降低<sup>[13]</sup>; 高糖可刺激 miR-221 在人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 及乳房动脉中高表达<sup>[14]</sup>, 与 T2DM 内皮细胞再生密切相关, 且升高的 miR-221 能够促进 T2DM 血管内膜增厚, 加速糖尿病心血管疾病的发生<sup>[15]</sup>; 同样 T2DM 患者血液中 miR-126 表达量增加, 可抑制其靶组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶 Suv39h1 作用<sup>[16]</sup>。这与本实验研究结果相一致, 我们研究显示, miR-16 和 miR-221 均与血糖水平呈显著正相关, 提示可能来自于血糖刺激相关细胞的分泌, 但以上 3 种 miRNAs 在 T2DM 及其微血管并发症中的具体作用机制目前尚不清楚, 需要进一步深入研究。

综上所述, 本研究初步证实了 miR-16, miR-221 和 miR-126 在 T2DM 及其微血管并发症中的含量升高, 可成为其潜在的非侵入性生物标志。下一步我们将扩大样本数量, 进一步观察以上 3 种血清 miRNAs 的含量变化, 并通过细胞、动物试验研究其作用机制, 以期 T2DM 及其微血管并发症的诊治提供新思路。

#### 参考文献:

- [1] Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization[J]. Diabetes Care, 2014, 37(5): 1375-1383.
- [2] 蔡加炉, 王 成, 牛冬梅, 等. 2 型糖尿病及其微血管并发症患者血清 miR-342-5p 和 miR-423-5p 水平测定及临床意义[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(1): 24-28.
- [3] Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA-503 and the extended microRNA-16 family in angiogenesis [J]. Trends Cardiovasc Med, 2011, 21(6): 162-166.
- [4] Beltrami C, Angelini TG, Emanuelli C. Noncoding RNAs in diabetes vascular complications[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 89(PtA): 42-50.
- [5] Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 9(9): 513-521.
- [6] Zhang T, Li L, Shang Q, et al. Circulating miR-126 is a potential biomarker to predict the onset of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 463(1/2): 60-63.
- [7] Wang C, Niu DM, Hu J, et al. Elevated serum beta2-glycoprotein-I-lipoprotein (a) complexes levels are associated with the presence and complications in type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2013, 100(2): 250-256.
- [8] Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes[J]. Circ Res, 2010, 107(6): 810-817.
- [9] Kong L, Zhu J, Han W, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study[J]. Acta Diabetol, 2011, 48(1): 61-69.
- [10] Pescador N, Perez-Barba M, Ibarra JM, et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77251.
- [11] 蔡加炉, 王 成, 汪俊军. 循环微小核糖核酸与 2 型糖尿病的关系[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 5-7, 12.
- [12] Cai JL, Wang C, Wang JJ. Relationship between circulating miRNA and type 2 diabetes[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(3): 5-7, 12.
- [13] Spinetti G, Fortunato O, Caporali A, et al. MicroRNA-15a and microRNA-16 impair human circulating proangiogenic cell functions and are increased in the proangiogenic cells and serum of patients with critical limb ischemia[J]. Circ Res, 2013, 112(2): 335-346.
- [14] Lee DE, Brown JL, Rosa ME, et al. MicroRNA-16 is downregulated during insulin resistance and controls skeletal muscle protein accretion[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(8): 1775-1787.
- [15] Li Y, Song YH, Li F, et al. MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 381(1): 81-83.
- [16] Coleman CB, Lightell DJ, Moss SC, et al. Elevation of miR-221 and -222 in the internal mammary arteries of diabetic subjects and normalization with metformin[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 374(1/2): 125-129.
- [17] Liu Y, Gao GQ, Yang C, et al. The role of circulating microRNA-126 (miR-126): a novel biomarker for screening prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(6): 10567-10577.

收稿日期: 2016-06-06

修回日期: 2016-06-26