

2型糖尿病患者外周血 miRNA 表达谱差异研究*

郭宜晨¹, 鲁亚静², 钟伟传³, 陈雪艳³, 郭广洲³ (1. 北京大学深圳医院, 广东深圳 518036;

2. 深圳市梓健生物科技有限公司, 广东深圳 518000; 3. 深圳市龙华区人民医院, 广东深圳 518109)

摘要:目的 对2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者外周血血清 miRNA 差异表达分析, 为筛选出 T2DM 发生发展有关的 miRNA 分子标记物奠定基础, 从而为 T2DM 预防、早期诊断和治疗方案提供指导。方法 采用 Gene-ChipTM miRNA 4.0 Array 筛选3组受试者外周血血清(T2DM组、T1DM组、对照组)的差异 miRNA, 并对差异 miRNA 进行靶基因预测和靶基因信号通路富集分析(KEGG)。结果 T2DM组分别与对照组、T1DM组相比, hsa-miR-505-3p 和 hsa-miR-548an 均上调, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-3160-5p, hsa-miR-33a-5p, hsa-miR-572 和 hsa-miR-96-5p 均下调。通过靶基因预测和 Pathway 分析, 筛选出5个 miRNA (hsa-miR-505-3p, hsa-miR-548an, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-3160-5p, hsa-miR-33a-5p, hsa-miR-572 和 hsa-miR-96-5p)、7个基因(MTOR, SLC2A2, PRKCE, IRS2, IRS1, MAPK8, MAPK10)可能与2型糖尿病胰岛素抵抗相关。结论 该研究筛选出的5个 miRNA 和7个基因, 可为2型糖尿病胰岛素抵抗的研究提供理论基础。

关键词: 2型糖尿病; miRNA; GeneChipTM微小 RNA 4.0 Array; 胰岛素抵抗; KEGG

中图分类号: R587.1; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)06-005-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.06.002

Study on the Difference of Serum miRNA Expression Profile in Peripheral Blood of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

GUO Yi-chen¹, LU Ya-jing², ZHONG Wei-chuan³, CHEN Xue-yan³, GUO Guang-zhou³

(1. Shenzhen Hospital of Peking University, Guangdong Shenzhen 518036, China;

2. Shenzhen Zijian Biotechnology CO. LTD, Guangdong Shenzhen 518000, China;

3. the People's Hospital of Longhua District, Guangdong Shenzhen 518109, China)

Abstract: Objective Through analyzing the differential expression of serum miRNA in peripheral blood of type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients to lay a foundation for screening out miRNA molecular markers related to the occurrence and development of T2DM, so as to provide guidance for prevention, early diagnosis and treatment of T2DM. **Methods** Used Gene-ChipTM miRNA 4.0 Array to screen differential miRNA expression of three groups (T2DM group, the T1DM group, control group) peripheral blood serum, then predicted target gene, analyzed the target genes by KEGG pathway analysis. **Results** Compared with the control group and the T1DM group, both hsa-miR-505-3p and hsa-miR-548an were up-regulated in the T2DM group, while hsa-miR-296-3p, hsa-miR-3160-5p, hsa-miR-33a-5p, hsa-miR-572 and hsa-miR-96-5p were down-regulated. Through target gene prediction and pathway analysis, 5 miRNA (hsa-miR-505-3p, hsa-miR-548an, hsa-miR-3160-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-33a-5p) and 7 genes (MTOR, SLC2A2, PRKCE, IRS2, IRS1, MAPK8, MAPK10) were screened associated with insulin resistance in type 2 diabetes possibly. **Conclusion** Five miRNAs and seven genes were screened out, can provide a theoretical basis for the study of insulin resistance in type 2 diabetes.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; miRNA; genechipTM miRNA 4.0 array; insulin resistance; KEGG

糖尿病是当前威胁全球人类健康的最重要的非传染性疾病(noncommunicable diseases, NCD)之一。在我国患病人群中,以2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)为主(占90.0%以上)。目前, T2DM的病因和发病机制尚不明确,以胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)伴随胰岛β细胞功能减退为病理生理特征,常伴有多种并发症,对机体各器官组织造成伤害,若能在发病前通过检测某些指标对T2DM的患病风险进行预测,便可通过

外界干预手段早期预防、降低患病风险。微RNA(miRNA)是一类内源性的具有调控转录后水平基因表达的非编码RNA,在T2DM患者胰岛细胞功能衰竭、IR及其引发的并发症的发生发展中起着重要的作用。因血清miRNA变化早于靶基因的变化、具有体液中的稳定性、细胞间的穿梭性以及组织来源特异性的特点,非常适合作为生物标志物用于疾病的预警和早期诊断^[1]。本研究以T2DM患者、1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus,

* 基金项目: 深圳市龙华区科技创新资金项目, 深龙华经促科计字(2017)2号, 项目编号: 20160831A1030200。

作者简介: 郭宜晨(1989—), 女, 硕士, 医师, 主要研究方向: 糖尿病发病机制及慢性并发症防治, E-mail: 13692186898@qq.com。

通讯作者: 郭广洲, 主任检验师, 从事医学免疫学和医学检验工作及研究, E-mail: 13692186898@163.com。

T1DM)患者、健康受试者外周血血清为研究对象,旨在为筛选出 T2DM 的 miRNA 分子标记物奠定基础,从而为 T2DM 的预防、早期诊断和治疗方案提供指导。

1 材料与方法

1.1 研究对象 所有受试者外周血血清(T2DM 患者 20 例、T1DM 患者 6 例、健康受试者 20 例)均来自北京大学深圳医院和深圳市龙华区人民医院,均签署了知情同意书,并通过医院伦理委员会的审核。T2DM 患者、T1DM 患者和健康受试者诊断分类依据 1999 年世界卫生组织规定糖尿病诊断及分型标准^[2]。

本研究中将所有受试者分为 3 组:T2DM 组 20 例,其中男性 14 例,女性 6 例,年龄 49.5 ± 12.9 岁;T1DM 组 6 例均为男性,年龄 24 ± 2.8 岁;健康受试组 20 例(对照组),其中男性 10 例,女性 10 例,年龄 50.5 ± 17.5 岁。每组每例取等体积血清制备混合样提取总 RNA 以及根据性别,每例取等体积血清制备混合样提取总 RNA。

1.2 主要试剂与仪器 GeneChip™ miRNA 4.0 Array, FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit, GeneChip™ Expression Hybridization Controls, GeneChip™ Hybridization Wash and Stain Kit 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, GeneChip Scanner 3000 7G, Fluidics Station, GeneChip Hybridization Oven 645 购自 affymetrix, GeneAmp PCR System 9700 购自 ABI, TC 型基因扩增仪(LifeECO)购自杭州博日科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血血清总 RNA 的获得:参照 TRIzol® LS Reagent 说明书提取各组样本外周血血清总 RNA。

1.3.2 miRNA 4.0 芯片分析:采用 GeneChip™ miRNA 4.0 Array 分析 3 组受试者外周血血清(T2DM 组、T1DM 组、对照组)miRNA 表达谱差异,并对差异 miRNA 进行靶基因预测和靶基因信号通路富集分析(KEGG)。

1.4 统计学及生物信息学分析 计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,差异基因筛选采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。生物信息学分析由中科普瑞完成,其自建的 microRNA 搜索引擎涉及 miRecords, miRTarBase, TarBase, DIANA-microT-CDS, EIMMo, MicroCosm, miRanda, miRDB, PicTar, PITA 和 TargetScan 数据库。

2 结果

2.1 GeneChip™ miRNA 4.0 Array 筛选结果 GeneChip™ miRNA 4.0 Array 扫描数据经标准化

后计算标准信号值的变化倍数(FC),差异 miRNA 筛选条件为 t 检验, $P < 0.05$ 且 $|FC| > 1.1$ 。

T1DM 组与对照组相比,T1DM 患者血清中有 23 个 miRNA 上调和 37 个 miRNA 下调且具有统计学差异;T2DM 组与对照组相比,T2DM 患者血清中有 18 个 miRNA 上调和 23 个 miRNA 下调且具有统计学差异;T2DM 组与 T1DM 组相比,T2DM 患者血清中有 23 个 miRNA 上调和 18 个 miRNA 下调且具有统计学差异。其中 T2DM 组分别与对照组、T1DM 组相比,hsa-miR-505-3p 和 hsa-miR-548an 均上调,hsa-miR-296-3p, hsa-miR-3160-5p, hsa-miR-33a-5p, hsa-miR-572 和 hsa-miR-96-5p 均下调;T2DM 组、T1DM 组分别与对照组相比,hsa-miR-3168, hsa-miR-499a-5p, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-6775-3p 和 hsa-miR-6819-3p 均上调,hsa-miR-1229-5p, hsa-miR-513c-3p, hsa-miR-670-3p 和 hsa-miR-7112-5p 均下调,见表 1。

2.2 差异 miRNA 的靶基因预测 对有别于 T1DM 组和对照组的 7 个 miRNA(hsa-miR-505-3p, hsa-miR-548an, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-3160-5p, hsa-miR-33a-5p, hsa-miR-572 和 hsa-miR-96-5p)进行相关靶基因预测,预测结果共有 2 318 个不同的靶基因。上述 7 个 miRNA 预测到靶基因数依次为 247, 1185, 123, 431, 196, 14 和 453 个。与胰岛素抵抗和 T2DM 相关的差异表达 miRNAs 靶基因,见表 2。

2.3 靶基因信号通路富集分析 利用 KEGG 数据库对靶基因进行 Pathway 分析,与胰岛素抵抗相关的基因共计 30 个。其中 MTOR, SLC2A2, PRKCE, IRS2, IRS1, MAPK8, MAPK10 7 个基因亦与 2 型糖尿病有关,见表 3。

3 讨论 T2DM 的发生是多基因作用的结果,胰岛素抵抗贯穿其发生发展全过程。本研究通过 Pathway 分析,筛选出 7 个基因可能与 T2DM 胰岛素抵抗相关。其中 MTOR, IRS2, IRS1, MAPK8 与 T2DM 胰岛素抵抗的关系已有一些文献报道证实^[3~9],而 SLC2A2, MAPK10, PRKCE 这 3 个基因与 T2DM 胰岛素抵抗的关系的研究未见相关报道证实。SLC2A2 基因编码 GLUT2 蛋白,IR-HepG2 细胞 GLUT1 和 GLUT2 表达量上调可加速葡萄糖转运进入肝细胞中并增加糖原合成来增强 IR-HepG2 细胞的胰岛素敏感性^[10]。MAPK10 基因又称 JNK3 基因,选择性的在脑、睾丸和胰腺 β 细胞中表达。Raddatz 等^[11]的研究发现 PRKCE 可改善饮食引起的糖耐量受损。差异表达 miRNA 中 hsa-miR-572 经 qRT-PCR 检测结

表 1 差异表达 miRNA

miRNA 类别	FC(P<0.05)		
	T2DM vs Control	T1DM vs Control	T2DM vs T1DM
hsa-miR-3168	1.284 070 ↑	1.232 352 ↑	-
hsa-miR-499a-5p	1.317 170 ↑	1.378 903 ↑	-
hsa-miR-520a-3p	1.151 188 ↑	1.369 489 ↑	-
hsa-miR-6775-3p	1.189 477 ↑	1.242 487 ↑	-
hsa-miR-6819-3p	1.366 888 ↑	1.447 304 ↑	-
hsa-miR-548an	1.159 950 ↑	-	1.150 063 ↑
hsa-miR-505-3p	1.132 160 ↑	-	1.215 350 ↑
hsa-miR-1229-5p	0.760 276 ↓	0.758 168 ↓	-
hsa-miR-513c-3p	0.850 260 ↓	0.798 513 ↓	-
hsa-miR-670-3p	0.854 714 ↓	1.124 654 ↑	-
hsa-miR-7112-5p	0.812 476 ↓	0.806 378 ↓	-
hsa-miR-296-3p	0.678 408 ↓	-	0.721 758 ↓
hsa-miR-3160-5p	0.834 256 ↓	-	0.793 623 ↓
hsa-miR-33a-5p	0.809 657 ↓	-	0.697 763 ↓
hsa-miR-572	0.668 034 ↓	-	0.801 460 ↓
hsa-miR-96-5p	0.762 865 ↓	-	0.748 184 ↓

表中“-”表示该组未检出该 miRNA 或检出但不具有统计学差异,“↓”表示该 miRNA 在该组下调,“↑”表示该 miRNA 在该组上调。

表 2 与胰岛素抵抗和 2 型糖尿病相关的差异表达 miRNAs 靶基因

差异表达 miRNA	靶基因
hsa-miR-505-3p	IRS1,IRS2,MAPK8,MLXIP,PRKAG2
hsa-miR-548an	SLC2A2,CPT1A,GSK3B,GYS1,PTPN11,PRKAB2,PTPN1,PPARGC1A,PPP1R3D,SOCS4,TRIB3
hsa-miR-296-3p	PRKAG1
hsa-miR-3160-5p	MAPK10,CREB3L1,CACNA1G,PPARGC1B,PRKAA2,PPARGC1A,PPP1CC,RPS6KB1
hsa-miR-33a-5p	MAPK8,CPT1A,MLXIP,RPS6KA3
hsa-miR-572	—
hsa-miR-96-5p	IRS1,MTOR,PRKCE,CREB3L2,CD36,FOXO1,OGT,RPS6KA6,TRIB3

表 3 Pathway 分析与胰岛素抵抗和 2 型糖尿病相关的差异基因

ID	涉及的下调基因
04931 胰岛素抵抗	IRS1,IRS2,MTOR,MAPK8,MAPK10,PRKCE,SLC2A2,CREB3L1,CREB3L2,CPT1A,CD36,FOXO1,GYS1,GSK3B,MLXIP,OGT,PPARGC1B,PTPN11,PRKAB2,PRKAG1,PRKAA2,PRKAG2,PTPN1,PPARGC1A,PPP1R3D,PPP1CC,RPS6KA6,RPS6KA3,RPS6KB1,TRIB3
04930 2 型糖尿病	IRS1,IRS2,MTOR,MAPK8,MAPK10,PRKCE,SLC2A2,CACNA1G,SOCS4

果在 T2DM、糖尿病前期和健康对照组中下调^[12],与本研究中的结果一致,但靶基因中未预测到与 T2DM 胰岛素抵抗有关的基因。与正常组、模型组比较,二甲双胍组 rno-miR-96-5p 上调,与本研究中的结果一致^[13],靶基因预测中的 MTOR,PRKCE,IRS1 与 T2DM 胰岛素抵抗有关。而有关 hsa-miR-505-3p,hsa-miR-548an,hsa-miR-296-3p,hsa-miR-3160-5p 和 hsa-miR-33a-5p 的研究未见相关报道。本研究中筛选出的 7 个 miRNA(hsa-miR-505-3p, hsa-miR-548an, hsa-miR-3160-5p, hsa-miR-33a-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-572 和

hsa-miR-96-5p), 7 个基因(MTOR, SLC2A2, PRKCE,IRS2,IRS1,MAPK8,MAPK10)可能与 T2DM 胰岛素抵抗相关,进而为 T2DM 胰岛素抵抗的相关研究提供理论基础。但通过芯片筛选出的差异表达 miRNA 仍需后期的 qRT-PCR 验证,是否对 T2DM 胰岛素抵抗具有指示作用,作为其标志物,有待验证。筛选出的靶基因是否对 T2DM 胰岛素抵抗具有预测价值,亦需要后期体内外实验和临床研究进一步验证。

参考文献:

[1] Camussi G,Deregibus MC,Bruno S,et al. Exosomes/

- microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication[J]. *Kidney International*, 2010, 78(9): 838-848.
- [2] 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.
- [3] 张颖, 郝进. mTORComplex1-S6K1 信号通路在 2 型糖尿病发生发展中的作用[J]. *重庆医学*, 2012, 41(31): 3333-3335.
- Zhao Y, Hao J. mTOR complex1-S6K1 signaling pathway plays a role in the development of type 2 diabetes[J]. *Chongqing Medicine*, 2012, 41(31): 3333-3335.
- [4] 牛燕媚, 苑红, 张宁, 等. mTOR/S6K1 信号通路 与胰岛素抵抗的关系及有氧运动对其影响的研究 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2010, 26(4): 399-403, III.
- Niu YM, Wan H, Zhang N, et al. The relationship between mTOR/S6K1 signaling pathway and insulin resistance and the study of aerobic exercise on this pathway[J]. *Chin J Appl Physiol*, 2010, 26(4): 399-403, III.
- [5] 张先慧, 胡照娟, 张艳红, 等. 辛开苦降方对初发 2 型糖尿病 KK 小鼠肝脏胰岛素抵抗及 IRS-2/PI3K 通路的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(5): 1774-1779.
- Zhang XH, Hu ZJ, Zhang YH, et al. Effects of Xinkai Kujiang formula on hepatic insulin resistance and the IRS2/PI3K pathway in KK mice with incipient type 2 diabetes mellitus[J]. *CJTCMP*, 2015, 30(5): 1774-1779.
- [6] 吴莉娟, 孙文, 吴丽丽, 等. 积雪草醇提物对 2 型糖尿病 ZDF 大鼠肝脏胰岛素抵抗的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10): 88-94.
- Wu LJ, Sun W, Wu LL, et al. Effect of centella asiatica alcohol extract on hepatic insulin resistance of Zucker fatty diabetes rats[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2017, 23(10): 88-94.
- [7] Um SH, Frigerio F, Watanabe M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity[J]. *Nature*, 2004, 431(75): 200-205.
- [8] 牛燕媚, 刘彦辉, 李慧阁, 等. 胰岛素受体底物蛋白 1 及其丝氨酸磷酸化活性在胰岛素抵抗发生中的作用 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(2): 136-140.
- Niu YM, Liu YH, Li HG, et al. The study of the role of IRS1 and its serine phosphorylation activity in pathogenesis of insulin resistance[J]. *Chinese Journal of Diabetes*, 2012, 20(2): 136-140.
- [9] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance[J]. *Nature*, 2002, 420(6913): 333-336.
- [10] 黎宇, 罗新新, 严奉东, 等. 葛根上调肝胰岛素抵抗 HepG2 细胞 OB-R, IRS2, GLUT1 和 GLUT2 蛋白 调节糖代谢的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(10): 1939-1944.
- Li Y, Luo XX, Yan FD, et al. Puerariae lobatae radix elevated expression levels of OB-R, IRS2, GLUT1 and GLUT2 to regulate glucose metabolism in insulin-resistance HepG2 cells[J]. *China Journal of Chinese Medicine*, 2017, 42(10): 1939-1944.
- [11] Raddatz K, Turner N, Frangioudakis G, et al. Time-dependent effects of Prkce deletion on glucose homeostasis and hepatic lipid metabolism on dietary lipid oversupply in mice[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(6): 1447-1456.
- [12] 晏少颖. 糖尿病前期和 2 型糖尿病患者血浆中差异表达 microRNAs 的筛选及临床诊断价值研究[D]. 贵州: 贵州医科大学, 2016.
- Yan SY. The research on differentially expressed plasma microRNAs screening in prediabetes and type 2 diabetes and clinical diagnostic value[D]. Guizhou: Guizhou Medical University, 2016.
- [13] 许光远. 辅助降糖颗粒与二甲双胍联合用药对 ZDF 大鼠胰岛素抵抗的作用及机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- Xu GY. Effect and mechanism of adjuvant glucose-lowering granule combined with metformin on insulin resistance in ZDF rats[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2017.