

## 2型糖尿病患者血浆 miR-144 水平 与吸烟状况的相关性研究\*

刘春兴<sup>1</sup>, 高永辉<sup>1</sup>, 汤在祥<sup>2</sup>

(1. 华东疗养院, 江苏无锡 214065; 2. 苏州大学医学部公共卫生学院, 江苏苏州 215001)

**摘要:**目的 探讨2型糖尿病(T2DM)患者血浆 miR-144 水平与吸烟的相关性。方法 在2018年1月~6月的体检人群中选择 T2DM 患者 70 例,按照吸烟情况分为不吸烟组 31 例、戒烟组 13 例和吸烟组 26 例。收集研究对象一般资料、饮酒史、吸烟史,检测空腹血糖(GLU)和糖化血红蛋白(HbA1c),采用定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测血浆 miR-144 含量,分析三组人群的检测结果,评价吸烟指数与血浆 miR-144 的关系。结果 三组人群中年龄、饮酒史、BMI、GLU、HbA1c 等比较,差异均无统计学意义( $F=0.184, P=0.791; \chi^2=0.321, P=0.611; F=0.348, P=0.849; F=0.266, P=0.914; F=0.005, P=0.171$ );吸烟组血浆 miR-144 水平( $2.14 \times 10^{-5} \pm 1.93 \times 10^{-5}$  nmol/L)高于不吸烟组( $1.15 \times 10^{-5} \pm 1.18 \times 10^{-5}$  nmol/L)( $t=5.632, P=0.021$ ),但与戒烟组差异无统计学意义( $t=0.8724, P=0.3883$ );戒烟组血浆 miR-144 水平( $1.5 \times 10^{-5} \pm 2.2 \times 10^{-5}$  nmol/L)与不吸烟组比较,差异无统计学意义( $t=1.179, P=0.2441$ );吸烟指数与血浆 miR-144 水平呈正相关( $r=0.915, P<0.001$ )。结论 吸烟导致 T2DM 患者血浆 miR-144 水平升高,血浆 miR-144 水平与吸烟指数呈正相关。

**关键词:** 2型糖尿病;吸烟指数;miR-144

中图分类号:R587.1;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)02-017-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.02.005

### Correlation between Plasma miR-144 Level and Smoking Status in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

LIU Chun-xing<sup>1</sup>, GAO Yong-hui<sup>1</sup>, TANG Zai-xiang<sup>2</sup> (1. Huadong Sanatorium, Jiangsu Wuxi 214065, China; 2. School of Public Health, Soochow University, Jiangsu Suzhou 215001, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the correlation between plasma miR-144 level and smoking in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** 70 patients with T2DM were selected from the physical examination population from January to June, 2018, and divided into non-smoking group (31 cases), smoking cessation group (13 cases) and smoking group (26 cases) according to smoking status. General information, drinking history and smoking history of the subjects were collected. Fasting blood glucose (GLU) and glycosylated hemoglobin (HbA1c) were detected. Plasma mir-144 content was detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** There were no significant differences in age, drinking history, BMI, GLU and HbA1c among the three groups ( $F=0.184, P=0.791; \chi^2=0.321, P=0.611; F=0.348, P=0.849; F=0.266, P=0.914; F=0.005, P=0.171$ ). Plasma miR-144 level ( $2.14 \times 10^{-5} \pm 1.93 \times 10^{-5}$  nmol/L) in smoking group was higher than that in non-smoking group ( $1.15 \times 10^{-5} \pm 1.18 \times 10^{-5}$  nmol/L), ( $t=2.271, P=0.0265$ ). But there was no significant difference between smoking and smoking cessation groups ( $t=0.8724, P=0.3883$ ). There was also no significant difference in plasma miR-144 between the smoking cessation group ( $1.5 \times 10^{-5} \pm 2.2 \times 10^{-5}$  nmol/L) and the non-smoking group ( $t=1.179, P=0.2441$ ). Smoking index was positively correlated with plasma miR-144 level ( $r=0.915, P<0.001$ ). **Conclusion** Smoking increased the plasma miR-144 level in T2DM patients, and the plasma miR-144 level was positively correlated with smoking index.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus; smoking index; miR-144

糖尿病是一种全球范围内高发的慢性代谢性疾病,目前我国约有 1.14 亿糖尿病患者,其中 90% 以上是 2 型糖尿病(T2DM)。吸烟是导致糖尿病心血管并发症死亡的重要原因之一<sup>[1]</sup>,但其机制尚不明确。

微小核糖核酸(miRNA)能通过结合靶基因

mRNA 3'末端非翻译区来调节基因的表达,可作为分子标志物,辅助多种疾病诊断。有研究表明,微小核糖核酸-144(miR-144)与 T2DM 胰岛素抵抗相关,能够通过抑制胰岛素受体底物 1 的表达来影响胰岛素信号通路<sup>[2]</sup>。本研究通过检测血浆 miR-144 水平,比较不同吸烟指数下的 T2DM 患

\* 基金项目:国家自然科学基金(81773541)。

作者简介:刘春兴(1979—),男,华东疗养院副主任技师,主要从事检验医学方面研究工作, E-mail: zns04liu@163.com。

通讯作者:汤在祥,男,苏州大学医学部公共卫生学院副教授,主要从事卫生统计学理论与方法,医疗大数据分析研究工作, E-mail: tangzx@suda.edu.cn。

者血浆 miR-144 水平,探讨吸烟对糖尿病患者血浆 miR-144 水平的影响,为进一步研究吸烟对糖尿病影响的机制提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 在2018年1~6月到华东疗养院体检的人群中选择 T2DM 患者 70 例为研究对象,男性 59 人,女性 11 人;其中不吸烟组 31 例,戒烟组 13 例,吸烟组 26 例;纳入标准:T2DM 符合 WHO 1999 年诊断标准;排除标准:1 型糖尿病患者,糖尿病急性并发症、感染及手术等应激情况;严重肝肾功能不全和其他系统疾病。

1.2 研究方法 入选对象均由专业人员进行调查询问吸烟状况,包括开始吸烟年龄、吸烟年限、平均每日吸烟支数及戒烟年限,计算吸烟指数,计算公式为:吸烟指数=平均每日吸烟支数×吸烟年数。

研究对象空腹 8~12 h,于次日清晨采集静脉血,其中 5 ml 于常规血清管中,2 ml 于 EDTA 抗凝管中,颠倒混匀 8 次,于 1 h 内送检验科,20℃ 2 000 r/min 离心 10 min 分离血浆和血清。使用贝克曼全自动生化仪 AU5400 检测血清葡萄糖 (GLU)、日本东曹 G8 全自动血红蛋白检测仪检测血浆糖化血红蛋白 (HbA1c)。

采用定量反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法检测血浆 miR-144:操作如下:使用宝生物的 RNAiso PLUS 试剂来提取血浆 RNA。取 100  $\mu$ l 血浆,加入 1 ml RNAiso PLUS 试剂,涡旋混匀后加入 200  $\mu$ l 氯仿再次涡旋混匀,室温放置 5 min 后 12 000 g 离心 15 min,取上清加入等体积异丙醇,−20℃ 放置 2 h 后 12 000 g 4℃ 离心 15 min,去上清,以 1 ml 75 ml/dl 乙醇 (DEPC 水配制) 洗涤沉淀后以 10  $\mu$ l DEPC 水溶解沉淀。

采用吉玛探针法 Hairpin-it miRNAs qRT-PCR 定量试剂盒对 RNA 逆转录,同时取试剂盒中的标准品溶解后稀释至  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  和  $10^{-8}$  nmol/L 后逆转录。使用 QPCR 方法检测各浓度对应的 Ct 值,以浓度对数为横坐标, Ct 值为纵坐标,绘制标准曲线,根据标准曲线计算各样本血浆中 miR-144 浓度。

1.3 统计学方法 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,连续性数值资料采用平均数与标准差表示 ( $\bar{x} \pm s$ ),组间比较采用 *t* 检验,定性资料采用卡方检验比较组间差异,相关性检验通过 Pearson 分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同吸烟组别人口学基线比较 见表 1。三组人群中年龄、饮酒史、BMI、GLU、HbA1c 等结果两两比较,差异均无统计学意义 ( $F = 0.184$ ,  $P =$

$0.791$ ;  $\chi^2 = 0.321$ ,  $P = 0.611$ ;  $F = 0.348$ ,  $P = 0.849$ ;  $F = 0.266$ ,  $P = 0.914$ ;  $F = 0.005$ ,  $P = 0.171$ ),仅性别分布存在差异,在戒烟组和吸烟组女性人数均为 0。

表 1 不同吸烟组别一般资料比较

项 目	不吸烟组 ( <i>n</i> =31)	戒烟组 ( <i>n</i> =13)	吸烟组 ( <i>n</i> =26)	<i>P</i>
性别(男/女)	20/11	13/0	26/0	<0.001
年龄(岁)	55.13±11.24	56.38±10.45	54.13±8.42	0.791
饮酒史(有/无)	9/22	3/10	6/20	0.611
BMI(kg/m <sup>2</sup> ·1.73)	26.24±3.16	26.42±1.89	27.39±3.49	0.849
GLU(mmol/L)	8.72±1.47	8.34±1.35	8.63±1.79	0.914
HbA1c(%)	7.29±0.91	7.27±1.18	7.26±1.76	0.171

## 2.2 不同吸烟组别血浆 miR-144 水平的比较

见图 1。不吸烟组,戒烟组和吸烟组血浆 miR-144 水平分别为  $1.15 \times 10^{-5} \pm 1.18 \times 10^{-5}$ ,  $1.5 \times 10^{-5} \pm 2.2 \times 10^{-5}$ , 和  $2.14 \times 10^{-5} \pm 1.93 \times 10^{-5}$  nmol/L。吸烟组高于不吸烟组,差异有统计学意义 ( $t = 5.632$ ,  $P = 0.0210$ ),但与戒烟组比较差异无统计学意义 ( $t = 0.8724$ ,  $P = 0.3883$ );戒烟组血浆 miR-144 水平与不吸烟组差异无统计学意义 ( $t = 1.179$ ,  $P = 0.2441$ )。

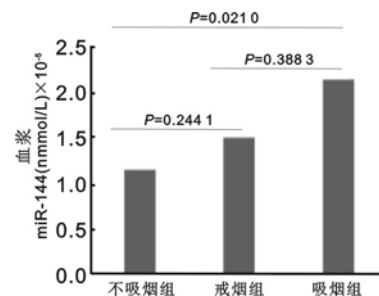


图 1 不同吸烟组别血浆 miR-144 水平比较

2.3 吸烟指数和血浆 miR-144 水平的相关性分析 采用公式计算吸烟指数,并与血浆 miR-144 水平进行相关性分析,结果(图 2)表明吸烟指数和血浆 miR-144 水平呈紧密相关,相关系数  $r = 0.814$ ,差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。

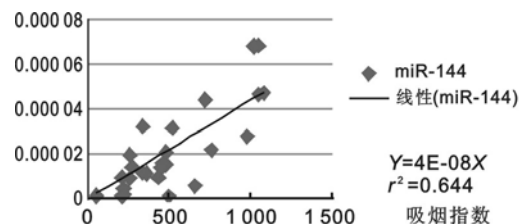


图 2 血浆 miR-144 水平与吸烟指数的线性相关性

3 讨论 MiRNA 是一类大约由 22 个核苷酸组成的非编码 RNA,作为近年来研究热点,miRNA 在转录后水平和翻译水平调控靶基因表达,从而参与调控生长、发育、疾病发生发展等多项生理功能。

许多针对 miRNA 的研究主要集中在肿瘤的诊断及预后<sup>[3]</sup>。在肿瘤发生的机制方面,miR-144 能够通过调节 E2F8<sup>[4]</sup>, ARID1A<sup>[5]</sup> 和 ZFX<sup>[6]</sup> 等基因调控肿瘤细胞增殖、迁移和分化。除了肿瘤相关研究,miR-144 能够通过抑制 ABCA1 蛋白的表达,调控胆固醇代谢及血浆高密度脂蛋白水平<sup>[7]</sup>; miR-144 缺失会上调 Rac-1 介导的氧化应激信号来限制缺血心肌保护<sup>[8]</sup>。在糖尿病方面,miR-144 能够通过抑制胰岛素受体底物 1 表达,来破坏胰岛素信号通路。

流行病学研究表明,吸烟是促进 T2DM 发生的重要危险因素<sup>[9]</sup>,但机制并不明确,是否通过升高 miR-144 造成影响还属未知。本研究采用绝对定量的方法检测血浆 miR-144 水平,发现吸烟指数与 T2DM 患者血浆 miR-144 水平呈正相关。同时本研究也存在一定的局限性,女性均明显少于男性;吸烟组的样本数相对较少,且存在部分戒烟超过 5 年的样本,这可能与近年来国家禁烟宣传与人民健康意识的提高有关。

综上所述,吸烟导致 T2DM 患者血浆 miR-144 水平上升,抑制胰岛素受体底物 1 表达,会导致胰岛素信号通路受损,从而引起胰岛素抵抗。因此控制吸烟对 T2DM 的防治有着至关重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] HOU Xuhong, QIU Jieyuzhen, CHEN Peizhu, et al. Cigarette smoking is associated with a lower prevalence of newly diagnosed diabetes screened by OGTT than non-smoking in Chinese men with normal weight [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0149234.
- [2] KAROLINA D S, ARMUGAM A, TAVINTHARAN S, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus [J]. Plos One, 2011, 6(8): e22839.
- [3] 贾亚旭, 王成, 张春妮. 血清 miR-193a-3p, miR-337-5p 和 miR-483-5p 在食管鳞状细胞癌诊断和预后中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2): 5-9.  
JIA Yaxu, WANG Cheng, ZHANG Chunni, et al. Application of serum miR-193a-3p, miR-337-5p and miR-483-5p in the diagnosis and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma [J]. J Mod Lab Med, 2017, 32(2): 5-9.
- [4] SUN Jing, SHI Run, ZHAO Sha, et al. E2F8, a direct target of miR-144, promotes papillary thyroid cancer progression via regulating cell cycle [J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2017, 36(1): 40.
- [5] WEN Xiao, LOU Ning, RUAN Hailong, et al. Mir-144-3p promotes cell proliferation, metastasis, sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma by downregulating ARID1A [J]. Cellular Physiology & Biochemistry, 2017, 43(6): 2420-2433.
- [6] AKIYOSHI S, FUKAGAWA T, UEO H, et al. Clinical significance of miR-144-ZFX axis in disseminated tumour cells in bone marrow in gastric cancer cases [J]. British Journal of Cancer, 2012, 107(8): 1345-1353.
- [7] RAMIREZ C M, ROTLLAN N, VLASSOV A V, et al. Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144 [J]. Circulation Research, 2013, 112(12): 1592-1601.
- [8] WANG Xiaohong, ZHU Hongyan, ZHANG Xiaowei, et al. Loss of the miR-144/451 cluster impairs ischemic preconditioning-mediated cardioprotection by targeting Rac-1 [J]. Cardiovascular Research, 2012, 94(2): 379-390.
- [9] LIU Gang, LI Yanping, HU Yang, et al. Influence of lifestyle on incident cardiovascular disease and mortality in patients with diabetes mellitus [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(25): 2867-2876.