

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.008

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.008

2型糖尿病患者血清 miR-374b 的表达及其潜在机制

师苹, 卢超, 郝丽美, 王培, 亢玉兰, 陈亚平, 丁玉芝, 杨伟然

(定州市人民医院内分泌科, 河北 保定 073000)

[摘要] 目的: 研究血清miR-374b作为2型糖尿病患者(type 2 diabetes mellitus, T2DM)潜在诊断指标的可能性, 并探究miR-374b在T2DM发病过程中潜在的分子机制。方法: 运用qRT-PCR技术, 检测30例T2DM患者及30例健康对照血清中miR-374b表达水平, 测定相关生化指标, 并且通过逻辑回归分析两组人群血清miR-374b对T2DM的辅助诊断价值。并且将miR-374b mimics转染进胰岛β细胞株MIN-6中, 通过qRT-PCR检测miR-374b对促凋亡基因Bax和抑凋亡基因Bcl-2的mRNA水平的影响。结果: qRT-PCR分析结果显示: 与健康对照组相比, miR-374b在T2DM患者的血清中水平显著升高($P<0.01$)。进一步逻辑回归分析结果显示在血清中miR-374b的表达水平是T2DM独立影响因素。细胞转染实验结果显示: miR-374b能显著促进促凋亡基因Bax的mRNA表达并且抑制抑凋亡基因Bcl-2的mRNA表达。结论: 血清miR-374b高表达是T2DM患者潜在的非侵入性辅助诊断标志物及独立危险因素。MiR-374b表达量升高会导致胰岛β细胞凋亡。

[关键词] 2型糖尿病患者; miR-374b; 胰岛β细胞; 荧光定量PCR

Expression of serum miR-374b expression in patients with type 2 diabetes mellitus and its potential mechanism

SHI Ping, LU Chao, HAO Limei, WANG Pei, KANG Yulan, CHEN Yaping, DING Yuzhi, YANG Weiran

(Department of Endocrinology, Dingzhou City People's Hospital, Baoding Hebei 073000, China)

Abstract **Objective:** To explore the possibility of miR-374b as a potential diagnostic indicator of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and the potential molecular mechanism of miR-374b in the pathogenesis of T2DM. **Methods:** Serum miR-374b expression level of 30 T2DM patients and 30 healthy controls was detected by qRT-PCR, biochemical analyzer was used to determine relevant biochemical indicators, and the auxiliary diagnostic value of serum miR-374b in the two groups was analyzed by logistic regression. Moreover, by transfecting miR-374b mimics into the pancreatic β-cell MIN-6, the effect of miR-374b mRNA levels on pro-apoptotic gene Bax and anti-apoptotic gene bcl-2 was detected by qRT-PCR. **Results:** qRT-PCR analysis showed that the serum miR-374b expression level in the T2DM patients was significantly higher than that of the healthy control group ($P<0.01$). Further logistic

收稿日期 (Date of reception): 2019-08-27

通信作者 (Corresponding author): 杨伟然, Email: wangpeinano3@sina.com

基金项目 (Foundation item): 2019年度河北省医学课题计划 (20191746)。This work was supported by Medical Research Program of Hebei Province in 2019, China (20191746).

regression analysis showed that the serum miR-374b expression level was an independent risk factor for T2DM. Cell experiments showed that miR-374b significantly promoted the expression of pro-apoptotic gene Bax mRNA and inhibited the mRNA expression of anti-apoptotic gene bcl-2. **Conclusion:** The high expression of miR-374b in serum is a potential non-invasive auxiliary diagnostic marker and an independent risk factor for T2DM patients. Increased expression of miR-374b leads to apoptosis of islet β -cell.

Keywords type 2 diabetes mellitus; miR-374b; pancreatic β -cell; qRT-PCR

在常见慢性代谢性疾病中, 2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种严重危害人类健康的疾病^[1], 发病机制尚不完全清楚。微小核糖核酸(miRNA)是一类长约22个核苷酸, 具有调控功能的非编码单链小核糖核酸分子, 主要通过完全或部分互补结合到靶mRNA的3'非编码区(non-coding region), 抑制其蛋白质翻译, 或介导靶mRNA降解, 在人体内主要功能是抑制翻译^[2]。在T2DM的发生和发展过程中, miRNA-126可受糖脂代谢的影响, 与血管内皮功能障碍密切相关^[3]; miRNA-29则与胰岛素抵抗的发生和发展有关^[4]; miRNA-335, miRNA-15a, miRNA-135a等可通过促进胰岛 β 细胞凋亡等机制对糖尿病及相关心血管并发症的发生发挥调节作用^[5]。MiR-374b的相关研究主要集中在胃癌、乳腺癌、肾脏疾病的信号转导通路的调控方面^[6-8]。近年来有研究^[9]发现: miR-374b可能通过与1型糖尿病易感基因的相互作用(或胰岛相关抗体易感基因), 参与对1型糖尿病发病通路的调控。本研究主要探讨miR-374b与T2MD的关系及潜在机制。

1 对象与方法

1.1 对象

采用分层随机抽样方法, 选择2018年2月至2018年12月期间定州市人民医院收治的30例T2DM患者, 设为T2DM组。其中男22例, 女8例; 年龄35~70(50.5 ± 4.5)岁。选择同期收治的30例健康体检者, 设为健康对照组。其中男20例, 女10例; 年龄35~70(49.5 ± 5.0)岁。两组性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$)。

T2DM组纳入标准: 符合1999年世界卫生组织推荐的糖尿病诊断及分型标准; 空腹时, 静脉血浆葡萄糖 ≥ 7.0 mmol/L和/或75 g葡萄糖耐量检测(oral glucose tolerance test, OGTT)2 h血糖 ≥ 11.1 mmol/L或随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L。排除其他类型糖尿病、严重心血管类疾病及恶性肿瘤者。

健康对照组纳入标准: OGTT, TC, TG, HDLC, LDLC均在正常范围内。排除临床资料不完整的受试者。

1.2 方法

1.2.1 标本收集与保存

清晨采集两组受试者肘静脉血6 mL, 在室温下, 1 500 r/min离心5 min, 收取血清标本置于 -80 °C保存。小鼠胰岛 β 细胞(MIN-6细胞)购于上海纪宁细胞库。

1.2.2 主要试剂

胎牛血清、青霉素、链霉素、羟乙基哌嗪乙磺酸(hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid, HEPES)溶液、2-巯基乙醇购于美国HyClone公司。人淋巴细胞分离液购于美国GE Healthcare公司。MiRNA反转录试剂盒、荧光定量PCR检测试剂盒、内参照U6引物购于白天根生物化学科技(北京)有限公司。

1.2.3 血生化指标检测

取3.0 mL血清标本, 采用全自动生化分析仪检验空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG), 糖化血红蛋白(HbA1c), TC, TG, LDLC, HDLC水平。

1.2.4 MIN-6 细胞培养

使用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基在37 °C, 5% CO₂、饱和湿度条件下培养MIN-6细胞48 h。

1.2.5 细胞转染

将MIN-6细胞铺于6孔板, 约 5×10^5 个/孔, 待细胞生长至60%融合度时, 进行分组。分别转染NC-mimics, miR-374b mimics后, 在无血清的低糖培养基中培养24 h, 使细胞生长同步化, 然后用含 10^{-5} mol/L AngII的DMEM培养基培养72 h。以上实验步骤均严格按照转染试剂LipofectamineTM 2000试剂说明书进行。在光学显微镜下观察转染前MIN-6细胞呈梭形。将NC-mimics, miR-374b mimics转染MIN-6细胞6 h后, 在荧光显微镜下观察MIN-6细胞形态, 初步判断转染是否成功。将转染12 h的

MIN-6细胞消化成单细胞悬液。实验分为空白对照组、NC-mimics组和miR-374b mimics组。采用qRT-PCR检测各组转染后miR-374b的相对表达量。实验重复3次,取平均值。

1.2.6 qRT-PCR检测 miR-374b, Bax, Bcl-2的相对表达量

采用TRIzol法提取血清及MIN-6细胞总RNA,按照TRIzol试剂盒说明书进行。将提取到的总RNA按照反转录试剂盒说明书进行RNA反转录,合成cDNA。按照qRT-PCR试剂盒说明书进行PCR反应。以 β -actin为内参照,计算各组样本中miRNA-374b, Bax, Bcl-2的表达水平。实验重复3次,取平均值。

MiR-374b的测序PCR引物为正向5'-TCAGCGGATATAATACAACCTGC-3'和反向5'-TATCGTTGTTCTCCACTCCTTCAC-3'。Bax的测序PCR引物为正向5'-ATTGAGAAACGATTTGCCTACA-3'和反向5'-GGGAAATGGCTTATTCTCCTTTGCTT-3'。Bcl-2的测序PCR引物为正向5'-CACAAGAGGCCAAGGCTACCT-3'和反向5'-CAGGAAAGCAGGAAGTCTCAA-3'。

1.3 统计学处理

采用GraphPadPrism5进行统计学分析。正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,相关性分析采用Spearman检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血生化指标

T2DM组的FPG, HbA1c及TG显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),而LDL-C显著高于健康对照组, HDL-C则显著低于健康对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$,表1)。

2.2 血清中 miR-374b 水平

T2DM组血清中miR-374b的表达(3.17 ± 1.56)显著高于健康对照组(1.45 ± 0.33),差异有统计学意义($t=5.908, P<0.001$)。

2.3 逻辑回归分析

当以健康对照人群作为二分类变量时,单因素逻辑回归分析结果显示:miR-374b是T2DM的独立危险因素($OR=6.5, 95\%CI: 2.1\sim 33.7, P<0.001$)。进一步使用年龄、性别、BMI、血压及吸烟等因素进行校正,采用多因素回归分析发现:当以健康对照人为参考变量时,miR-374b依旧是T2DM的独立危险因素($OR=4.8, 95\%CI: 1.0\sim 25.9, P<0.001$)。

2.4 相关性分析

对患者血清中miR-374b的表达水平及其他生化指标的相关性分析结果显示:miR-374b与FPG, TG及LDL-C呈正相关,与HDL-C呈负相关(表2)。

表1 两组血生化指标检测结果比较($n=30, \bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of blood biochemical index test results between the two groups ($n=30, \bar{x}\pm s$)

组别	FPG/(mmol·L ⁻¹)	HbA1c/%	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDLC/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
健康对照组	4.7 \pm 0.3	5.6 \pm 0.5	4.6 \pm 0.6	1.2 \pm 0.4	2.4 \pm 0.7	1.5 \pm 0.2
T2DM组	9.4 \pm 3.1	10.2 \pm 2.9	4.5 \pm 0.7	2.1 \pm 1.4	3.1 \pm 1.2	1.0 \pm 0.3
t	8.266	10.333	0.594	3.386	2.760	7.596
P	<0.001	<0.001	0.555	0.001	0.008	<0.001

表2 MiR-374b与血生化指标相关性分析结果

Table 2 Correlation analysis results of miR-374b and blood biochemical indicators

参数	FPG	TC	TG	HDL-C	LDL-C
r	0.142	0.091	0.130	-0.235	0.152
P	<0.01	0.389	0.036	<0.01	0.041

2.5 细胞转染实验结果

光学显微镜下可见转染前MIN-6细胞呈梭形(图1)。将NC-mimics, miR-374b mimics转染MIN-6细胞6 h后, 荧光显微镜下观察MIN-6细胞形态(图2), 可见细胞内有点状分布的荧光, 初步确认转染反应条件适当, 转染成功。qRT-PCR检测各组转染后miR-374b的相对表达量, 结果显示: 空白对照组、NC-mimics组、miR-374b mimics组miR-374b的相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 , 1.00 ± 0.01 和 2.15 ± 0.12 。

2.6 MiR-374b 对 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响

转染miR-374b的MIN-6细胞中Bax mRNA表达水平明显高于NC-mimics组, Bcl-2 mRNA表达水平明显低于对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 图3)。

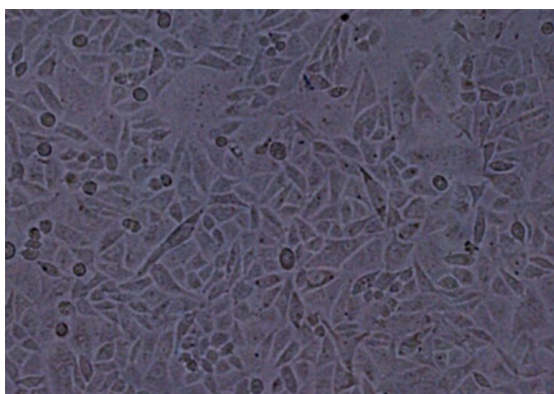


图1 光学显微镜下转染前MIN-6细胞形态($\times 20$)

Figure 1 Morphology of MIN-6 cells before transfection under a light microscope ($\times 20$)

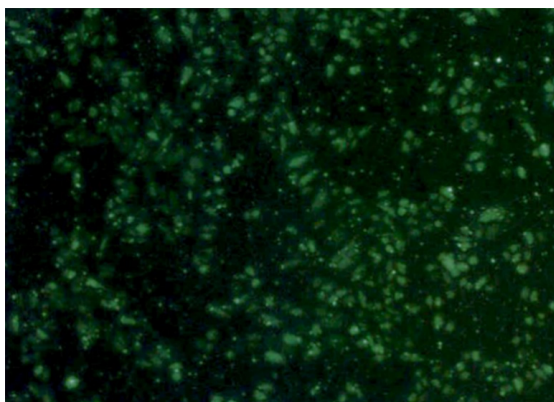


图2 荧光显微镜下转染后MIN-6细胞形态($\times 20$)

Figure 2 Morphology of MIN-6 cells after transfection under fluorescence microscope ($\times 20$)

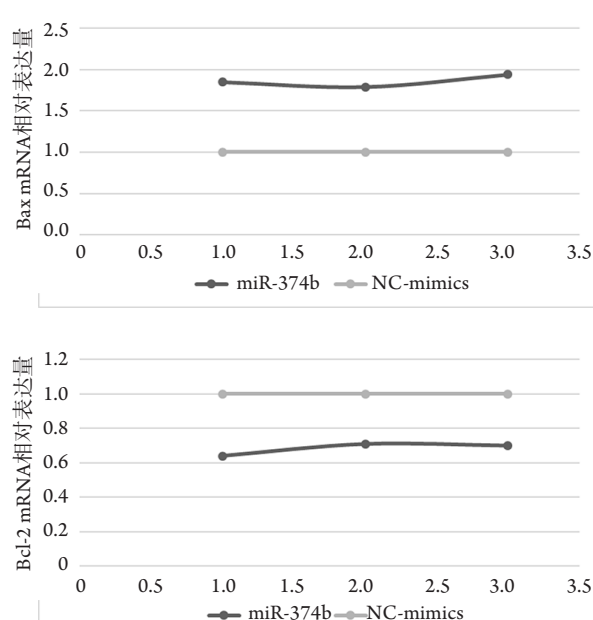


图3 MiR-374b对促凋亡基因Bax和抑凋亡基因Bcl-2的mRNA水平的影响($P<0.05$; $n=3$)

Figure 3 Effects of miR-374b on mRNA levels of pro-apoptotic gene Bax and anti-apoptotic gene Bcl-2 ($P<0.05$; $n=3$)

3 讨论

T2DM为临床常见代谢性疾病, 其特征主要表现为高血糖, 发病机制较为复杂, 包括胰岛素抵抗性的 β 细胞衰竭^[10]。T2DM发病机制主要涉及胰岛素抵抗及胰岛素分泌缺陷^[11]。此外遗传、环境、糖脂代谢以及内皮细胞功能障碍等对于糖尿病的发生发展也发挥重要作用, 是导致血管病变主要的危险因素^[12]。绝大多数的糖尿病并发症若不及时治疗, 不仅会降低患者的生活质量, 还有可能危及生命。然而, 目前尚无一种完全有效的治疗方式, 因此糖尿病的潜在发病机制是目前研究的热点。伴随分子生物学的发展, 从分子水平探讨糖尿病的产生机制, 寻找相关的治疗靶点将具有广阔的研究前景。

越来越多的证据^[13-16]显示: 多种miRNA参与糖尿病的发生发展过程。有研究^[17]通过对胰岛素靶器官进行一系列的miRNA性能分析发现: 肝中的miRNA-195和miRNA-103, 脂肪组织中的miRNA-222和miRNA-27a, 肌肉中的miRNA-10b均与机体葡萄糖代谢有关。对miRNA的深入研究有益于更好地了解T2DM的发病机制, 同时也为

T2DM及其并发症的预防、治疗提供了新的思路。

目前, miR-374b的研究方法已相对成熟, 但其与糖尿病之间的关系研究尚处于起步阶段。近年来有研究^[9]发现: miR-374b可能通过与1型糖尿病易感基因的相互作用(或胰岛相关抗体易感基因), 参与对1型糖尿病发病通路的调控。本研究首先对比T2MD患者与健康人群血清中miR-374b水平的差异, 结果显示: T2MD患者血清中miR-374b的表达水平明显高于对照组。血清或血浆miRNAs具有稳定、无创、检测方便等多项特性, 将极可能成为预测、诊断和监控T2DM发生、发展的一种全新的生物标志物。本研究的结论也为临床监控T2DM的发生、发展提供了客观依据。进一步研究发现: miR-374b与血糖、血脂的代谢密切相关, 说明miR-374b和脂代谢/脂代谢相关生理病理过程都有着某些紧密的关联, 并且有参与T2DM的发生、发展的可能性。

为进一步探讨miR-374b在细胞水平影响T2DM的相关机制, 本研究将miR-374b的模拟物转染入胰岛β细胞中, 并与阴性对照相比较。结果显示: 转染miR-374b模拟物的胰岛β细胞中, 细胞凋亡基因Bax mRNA的表达明显增加, 与之相反, 抗凋亡基因Bcl-2的mRNA的表达明显受到抑制。说明miR-374b促进胰岛β细胞的凋亡。

综上所述, 本研究初步证实miR-374b在T2DM中的高表达可能会成为其潜在的、非侵入性的生物标志物; miR-374b的高表达会导致胰岛β细胞凋亡。关于miR-374b对胰岛β细胞凋亡作用的具体机制将是未来研究的方向。

参考文献

- Zimmet P, Shi Z, El-Osta A, et al. Epidemic T2DM, early development and epigenetics: implications of the Chinese Famine[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(12): 738-746.
- Lee MW, Lee M, Oh KJ. Adipose tissue-derived signatures for obesity and type 2 diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(6): E854.
- Giannella A, Radu CM, Franco L, et al. Circulating levels and characterization of microparticles in patients with different degrees of glucose tolerance[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2017, 16(1): 118.
- Melnik BC. Milk: an epigenetic amplifier of FTO-mediated transcription? Implications for Western diseases[J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 385.
- Ghai V, Kim TK, Etheridge A, et al. Extracellular vesicle encapsulated microRNAs in patients with type 2 diabetes are affected by metformin treatment[J]. *J Clin Med*. 2019, 8(5): E617.
- Yin Z, Ma T, Yan J, et al. LncRNA MAGI2-AS3 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration by targeting the miR-374b-5p/SMG1 signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18825-18836.
- Xia N, Tan WF, Peng QZ, et al. MiR-374b reduces cell proliferation and cell invasion of cervical cancer through regulating FOXM1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(2): 513-521.
- Li H, Liang J, Qin F, et al. MiR-374b-5p-FOXP1 feedback loop regulates cell migration, epithelial-mesenchymal transition and chemosensitivity in ovarian cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 554-560.
- 尹丛丛. 一型糖尿病血清miRNAs的生物标志物研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2016.
YIN Congcong. Study on biomarkers of serum miRNAs in type 1 diabetes[D]. Qingdao: Qingdao University, 2016.
- 覃宁玲, 盛德乔. miRNA-375与糖尿病关系的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(3): 716-718.
QIN Ningling, SHENG Deqiao. Research progress on the relationship between miRNA-375 and diabetes[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2016, 36(3): 716-718.
- 张秀华, 曹式丽. 糖尿病肾病的发病机制研究进展[J]. *医学综述*, 2019, 25(6): 1212-1216.
ZHANG Xiuhua, CAO Shili. Research progress in pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Medical Recapitulate*, 2019, 25(6): 1212-1216.
- Ghai V, Baxter D, Wu X, et al. Circulating RNAs as predictive markers for the progression of type 2 diabetes[J]. *J Cell Mol Med*. 2019, 23(4): 2753-2768.
- Yu CY, Yang CY, Rui ZL. MicroRNA-125b-5p improves pancreatic β-cell function through inhibiting JNK signaling pathway by targeting DACT1 in mice with type 2 diabetes mellitus[J]. *Life Sci*. 2019, 1(224): 67-75.
- Yang S, Chen X, Yang M, et al. The variant at TGFBRAP1 is significantly associated with type 2 diabetes mellitus and affects diabetes-related miRNA expression[J]. *J Cell Mol Med*. 2019, 23(1): 83-92.
- Yao Y, Li Q, Wang W, et al. Glucagon-like peptide-1 modulates cholesterol homeostasis by suppressing the miR-19b-induced downregulation of ABCA1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(2): 679-693.

16. Jaeger A, Zollinger L, Saely CH, et al. Circulating microRNAs -192 and -194 are associated with the presence and incidence of diabetes mellitus[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14274.
17. Tiwari J, Gupta G, de Jesus Andreoli Pinto T, et al. Role of microRNAs (miRNAs) in the pathophysiology of diabetes mellitus[J]. *Panminerva Med*, 2018, 60(1): 25-28.

本文引用: 师苹, 卢超, 郝丽美, 王培, 亢玉兰, 陈亚平, 丁玉芝, 杨伟然. 2型糖尿病患者血清miR-374b的表达及其潜在机制[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(9): 2270-2275. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.008

Cite this article as: SHI Ping, LU Chao, HAO Limei, WANG Pei, KANG Yulan, CHEN Yaping, DING Yuzhi, YANG Weiran. Expression of serum miR-374b expression in patients with type 2 diabetes mellitus and its potential mechanism[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(9): 2270-2275. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.008