

雷米普利对 2 型糖尿病大鼠 microRNA 表达谱的影响

袁 俐^{1*}, 姜声扬¹, 虞 珏¹, 任亚丽¹, 徐文平¹, 孙 明², 德 伟²

(¹南通体臣卫生学校内科学教研室, 江苏 南通 226007; ²南京医科大学分子生物教研室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 建立链脲霉素(streptozocin, STZ)+高糖高脂饮食诱导 2 型糖尿病大鼠模型, 并以血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI) 药物雷米普利处理, 筛查用雷米普利后 2 型糖尿病大鼠胰腺组织 microRNA(miRNA) 表达的变化, 并进行实时定量 PCR 验证芯片结果, 寻找与 2 型糖尿病功能改善相关的 miRNA。方法: STZ(40 mg/kg)腹腔注射+高脂高糖饲料喂饲健康雄性 SD 大鼠, 测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 成模后 1 周, 雷米普利 50 mg/(kg·d)灌胃 28 d。实验结束后, 取胰腺组织常规抽提总 RNA, miRNA 芯片检测 miRNA 表达谱的改变。结果: 2 型糖尿病大鼠经雷米普利处理后, miRNA 表达谱中出现明显差异表达(1.5 倍以上)的 miRNA 共有 27 个, 其中 20 个表达上调, 7 个表达下调。结论: 在 2 型糖尿病大鼠模型中, 用雷米普利处理后部分胰腺 miRNA 的表达发生明显变化, 提示 miR-1、miR-30c 可能参与胰腺功能改善的调节。

[关键词] 2 型糖尿病; 雷米普利; miRNA

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-045-05

Expression changes of microRNAs in 2 type diabetes' rats treated with ramipril

YUAN Li^{1*}, JIANG Sheng-yang¹, YU Jue¹, REN Ya-li¹, XU Wen-ping¹, SUN Ming², DE Wei²

(¹Department of Internal Medicine, Nantong Tichen's Health School, Nantong 226007; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression pattern of microRNA (miRNA) in pancreas of 2 type diabetes rats treated with ramipril by miRNA array technique. **Methods:** Male Spmgue-Dawley (SD) rats were injected in peritoneal with streptozocin (40 mg/kg) and fed with high sugar and fat for 1 weeks, then treated with ramipril [50 mg/(kg·d)] for 28 days. When the rats were sacrificed, total RNA was extracted from myocardium and the differential expressions of miRNA were detected by miRNA array. **Results:** Contrast to control group rats, the expression level of 27 miRNAs changed significantly in ramipril group rats, 20 of them was up-regulated and the other 7 were down-regulated. **Conclusion:** The expression profile of miRNA changes in pancreas of 2 type diabetes rats treated with ramipril, which implies that those changed miRNAs may play an important role in improvement of pancreas function in SD rats.

[Key words] 2 type diabetes; ramipril; miRNA

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 045-049]

我国糖尿病尤其是 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的发病率呈显著升高趋势, 但糖尿病的发病机制尚未完全阐明, 在预防和治疗方面也仍不完善。雷米普利是第二代非巯基长效血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI), 该药在血浆与组织中(心、肾、血管、胰腺等)对血管紧张素转化酶(angiotensin-conversion enzyme, ACE)有高度亲和性与结合力。近年来大规

模临床试验中证实: 雷米普利除降压作用明显外, 还具有逆转左室肥厚、肾保护、增加胰岛素敏感性、改善代谢异常、减少 2 型糖尿病新发生率、保护胰岛功能等作用^[1], 因此, 雷米普利对糖尿病的病情改善有一定的意义。miRNAs 是一类长为 19~23 nt 的非编码的 RNA 分子, 广泛存在于植物与动物中^[2]。目前实验数据证实 miRNA 与多种人类疾病有关, 包括多种癌症、艾滋病、冠心病等, 因此 miRNA 已成为相关疾病治疗的新的靶位点, 而且 miRNA 将成为疾病诊断、预防和治疗的重要工具^[3]。本研究利用 miRNA 芯片及实时定量 PCR 技术研究在 2 型糖

[基金项目] 南通市科技局基金资助(K2009017)

*通讯作者, E-mail: yli1234@sohu.com

糖尿病大鼠模型中应用雷米普利后 miRNA 表达谱的变化,筛查与胰腺功能改善相关的 miRNA,为进一步研究其在糖尿病发病机制及胰腺功能改善中的作用奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 8 周雄性 SD 大鼠 30 只,体重(200 ± 10) g,清洁级,由南通大学实验动物中心提供。实验动物适应饲养 1 周后,随机分组,10 只为正常对照组,其余 20 只一次性腹腔注射,链脲霉素(streptozocin, STZ) 40 mg/kg(Sigma 公司,美国),同时加喂高糖高脂半合成高热量饲料(基础饲料加 20%猪油、5%蛋黄、20%蔗糖)。正常对照组一次性腹腔注射等量柠檬酸缓冲液后喂饲正常饲料,自由饮水与摄食。测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为糖尿病成模组(共 16 只),血糖测定用美国强生公司稳豪倍易型血糖仪。

1.2 方法

1.2.1 雷米普利处理糖尿病模型大鼠

将已成模的 2 型糖尿病大鼠随机分为两组,8 只为实验组,雷米普利(Pharma SpA 生产,北京安万特制药有限公司包装,批号:20070105)50 mg/(kg·d)灌胃,8 只为成模对照组,生理盐水灌胃 1 次/d,共 28 d。实验期间继续高糖高脂半合成高热量饲料饮食,保持室温 18~20℃,湿度 69%,12 h 交替照明,大鼠自由饮水,进食,保持垫料干燥。

1.2.2 miRNA 表达谱芯片检测

将对照组与雷米普利实验组大鼠引颈处死,分离胰腺后,迅速在液氮中冷冻。用 Tripure LS Reagent 提取大鼠胰腺总 RNA,利用 RNAeasy Mini Kit 纯化总 RNA,由上海康成生物工程有限公司进行芯片检测。用 TRIzol 试剂按照说明书抽提大鼠胰腺组织总 RNA,并利用紫外吸收测定法和变性琼脂糖凝胶电泳进行质量检测。采用 miRCURY™ Array Labelling Kit 试剂盒按说明书对 miRNA 进行标记。采用 RNeasy Mini Kit 试剂盒按说明书对标记样品进行浓缩。采用 miRCURY™ Array Microarray Kit 和 Hybridization Chamber II 试剂盒按说明书进行 miRNA 芯片杂交。使用 Gene-pix 4000B 进行图像扫描,用 635 nm 激发。图像存成 TIF 文件,使用 Genepix Pro 6.0 分析数据。模型组标准值与正常组标准值相比高于 1.5 倍或低于 0.67 倍即认为存在显著性上调或下调趋势。

1.2.3 实时定量 PCR 验证芯片结果

根据芯片的数据,各选取其中 3 条表达上调和下调最明显的 miRNA 进行了实时定量 PCR 再次验证,内参照 miRNA 选择 snRNA U6。PCR 反应条件为:95℃ 10 s;95℃ 5 s、60℃ 34 s 重复 40 个循环,在 PCR 反应体系中,加入过量 SYBR 荧光染料试剂(TaKaRa 公司,日本),每循环 1 次就收集 1 个荧光强度数据,建立实时扩增曲线,其产物荧光强度与其表达量,即模板中目的基因的丰度呈正相关。

1.2.4 靶基因预测

应用生物信息学软件(Pictar、TargetScan、Microcosm Targets)进行差异表达的 miRNA 靶基因的预测,取至少 2 个软件以上预测得到且得分较高的基因作为候选靶基因。

1.3 统计学方法

各组数据的组间比较用 *t* 检验统计,统计分析在 SPSS10.0 软件上进行。

2 结果

2.1 糖尿病模型组血糖变化

实验前,正常大鼠与糖尿病组大鼠血糖差异无统计学意义($P > 0.05$, $n = 30$),STZ+高糖高脂饲料培养后 4 周,糖尿病组与正常组随机血糖均值分别是(24.7 ± 2.2)、(7.23 ± 0.27) mmol/L,糖尿病组与正常组差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 雷米普利实验组血糖变化

治疗前,雷米普利实验组与糖尿病模型对照组血糖均值分别是(25.1 ± 1.4)、(24.2 ± 2.7) mmol/L,无显著差异。治疗 4 周后血糖均值分别是:(24.0 ± 1.8)、(27.0 ± 1.3) mmol/L,治疗前后自身比较,对照组血糖显著升高,治疗前后差异显著($P < 0.05$),实验组前后比较差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 雷米普利处理后 miRNA 表达变化

通过 miRNA 芯片对雷米普利处理组和对照组大鼠胰腺 RNA 进行 miRNA 表达谱的分析,发现和对照组相比,雷米普利处理组胰腺组织中出现明显差异表达(1.5 倍及以上)的 miRNA 共有 27 个,其中上调 20 个,下调 7 个(图 1,表 1,表 2)

2.4 差异表达的 miRNAs 的定量 PCR 结果

为证实 microRNA 芯片的准确性,选取了 6 个 miRNA(显著上调的 miR-1、miR-761、miR-208,显著下调的 miR-30c、miR-451、miR-338)进行了定量 PCR 验证分析。结果显示 miR-1、miR-761、miR-208、miR-30c、miR-451 在雷米普利组较模型组表达的改

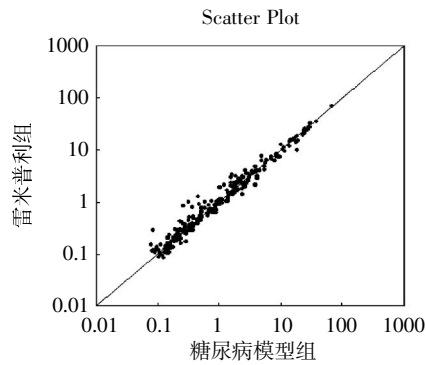


图 1 雷米普利组与糖尿病模型组的胰腺组织 MicroRNA 芯片散点图

Figure 1 Chip scatter of microRNA of pancreatic tissues in ramipril group and diabetic model group

表 1 雷米普利组和对照组相比表达上调的 miRNA

Table 1 Upregulated miRNA in ramipril group compared to the control group

miRNA 名称	雷米普利组/对照组 miRNA 上调倍数
rno-miR-1	3.464813039
rno-miR-761	3.237795214
rno-miR-208	3.157618383
rno-miR-340-3p	2.682462163
rno-miR-300-3p	2.172058386
rno-miR-130b	2.055318617
rno-miR-434	1.913172449
rno-miR-122	1.896529243
rno-miR-184	1.891148983
rno-miR-29a	1.804766555
rno-miR-500	1.778077430
rno-miR-615	1.771137546
rno-miR-323	1.704727092
rno-miR-214	1.637381710
rno-miR-212	1.599501113
rno-miR-133b	1.570860603
rno-miR-298	1.513322947
rno-miR-381	1.512032749
rno-miR-361	1.503276570
rno-miR-551b	1.502345340

变与芯片相一致,而 miR-338 的定量 PCR 结果与芯片有一定的差异(图 2)。

2.5 miRNA 靶基因预测结果

选择雷米普利组表达上调和下调差异最大的 rno-miR-1、rno-miR-30c 进行靶基因的预测,通过生物信息学软件 (Pictar、TargetScan、Microcosm Targets) 对其进行靶基因的预测。为了减少假阳性率,挑选出至少在两个软件中且得分较高的基因作为其可能的靶基因,分别选出 6 个基因(表 3)。

表 2 雷米普利组和对照组相比表达下调的 miRNA

Table 2 Down-regulated miRNA in ramipril group compared to the control group

miRNA 名称	雷米普利组/对照组 miRNA 下调倍数
rno-miR-30c	0.521177520
rno-miR-451	0.546636677
rno-miR-338	0.573126969
rno-miR-144	0.587373733
rno-miR-582	0.659850129
rno-miR-203	0.660083753
rno-miR-210	0.666604897

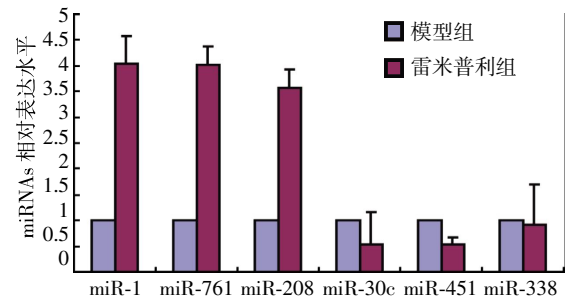


图 2 差异 miRNAs 实时定量 PCR 验证结果

Figure 2 Real-time quantitative PCR validation results of aberrant expressed miRNAs

3 讨论

T2DM 是由多种因素引起,病因比较复杂,其中主要与胰岛 B 细胞功能异常和凋亡以及胰岛素抵抗有关,有研究显示,细胞增殖分化相关因子基因的转录、翻译在 2 型糖尿病胰腺中多呈下降趋势,同时出现代谢、免疫、分化、凋亡等基因转录的异常^[4]。已经证实胰岛中存在肾素-血管紧张素系统 (renin-angio tensin system, RAS) 系统,并对胰岛有一定的损伤作用,与糖尿病的发生有关,长期高血糖、高血脂可以上调 RAS 系统活性,增加氧化应激反应,减少胰岛素分泌,这些特点可以被 ACEI 减少氧化应激反应来阻断,同时还可以减少胰腺炎症与纤维化的过程.保护胰岛功能,防治糖尿病发生^[5-10],长期(24 周)应用雷米普利能减少胰岛功能萎缩以及纤维组织增生来防治胰岛功能的破坏,雷米普利能使 T2DM 血糖回归至正常水平的患者比例显著高于安慰剂组(RR=1.16, 95%CI: 1.07~1.27, $P < 0.01$)^[11-14]。本研究结果显示,尽管雷米普利没有显著降低糖尿病大鼠血糖的作用,但从实验组与对照组治疗的前后血糖值比较显示,实验组血糖值治疗前后无显著差异,提示雷米普利可能通过阻断 RAS 系统来阻止高糖高脂饮食对胰岛功能的进一步损害,对胰岛功能

表 3 rno-miR-1、rno-miR-30c 靶基因预测结果
Table 3 Prediction results of target genes of rno-miR-1 and rno-miR-30c

miRNA 名称	预测的靶基因	靶基因全称
rno-miR-1	BDNF	brain-derived neurotrophic factor
	POGK	Pogo transposable element with KRAB domain
	SERP1	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1
	TNKS2	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2
	MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated
	FOXP1	forkhead box P1
rno-miR-30c	CELSR3	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3
	MKRN3	makorin, ring finger protein, 3
	TNRC6	trinucleotide repeat containing 6A
	LHX8	LIM homeobox 8
	RUNX2	runt-related transcription factor 2
	TWF1	twinfilin, actin-binding protein, homolog 1

具有一定保护作用。国外已有文献报道发现 miRNA 与 β 细胞的生成,胰岛素抵抗,糖尿病及其并发症密切相关^[15-16]。而本研究的 miRNA 芯片显示,T2DM 模型大鼠应用雷米普利后出现了 27 个 miRNA 的表达差异,其中 miR-1、miR-30c 可能通过在转录后水平影响其靶基因的表达与功能的行使从而参与胰腺功能的调节。尽管这些表达上调或下调的 miRNA 与糖尿病的发生、病情的改善的关系未见报道,但一系列研究表明 miRNA 在细胞生长和凋亡,血细胞分化,胰岛素分泌,胚胎后期发育等过程中发挥重要作用。而雷米普利处理后引起的大鼠血糖的改变是否会影响 miRNA 的表达国内外尚无明确报道,将在以后的实验中进一步研究。对于糖尿病模型大鼠经雷米普利处理后胰腺组织 miRNA 差异表达基因的分析,可能有助于发现新的参与糖尿病形成,胰岛细胞生长、分化、凋亡、分泌等的调节因子,从而促进人类对糖尿病发病机制的理解。

[参考文献]

[1] Tikellis C, Wookey PJ, Candido R, et al. Improved islet morphology after blockade of the renin-angiotensin system in the ZDF rat[J]. Diabetes, 2004, 53(4): 989-997

[2] Kenneth SK. MicroRNAs and cellular phenotypy[J]. cell, 2010, 143(1): 21-26

[3] Novina CD, Chabner BA. RNA-directed therapy: the next step in the miRNA revolution [J]. Oneologist, 2008, 13(1): 1-3

[4] Kengne AP, Sobngwi E, Chalmers J. Multiple risk factor interventions and inflammatory biomarkers in high risk individuals with type 2 diabetes[J/OL]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, [Epub ahead of print]

[5] Chu KY, Lau T, Carlsson PO, et al. AT1 receptor block-

ade improves β -cell function and glucose tolerance in mouse model of type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2006, 55(2): 367-374

[6] Farmer JA. Effect of ramipril on the incidence of diabetes [J]. N Engl J Med, 2006, 355(15): 1551-1562

[7] Boyko EJ, Gerstein HC, Mohan V, et al. Effects of ethnicity on diabetes incidence and prevention: results of the diabetes reduction assessment with ramipril and rosiglitazone medication (DREAM) trial [J]. Diabet Med, 2010, 27(11): 1226-1232

[8] Al-Mallah M, Khawaja O, Sinno M. Do angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers prevent diabetes mellitus? A meta-analysis [J]. Cardiol, 2010, 17(5): 448-456

[9] Ramracheya RD, Muller DS, Wu Y, et al. Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans [J]. Diabetologia, 2006 49(2): 321-331

[10] Chu KY, Leung PS. Angiotensin II type 1 receptor antagonism mediates uncoupling protein 2-driven oxidative stress and ameliorates pancreatic islet beta-cell function in young Type 2 diabetic mice [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(7): 869-878

[11] Chan P, Liu IM, Tzeng TF, et al. Mechanism for blockade of angiotensin subtype 1 receptors to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Diabetes, 2007, 9(1): 39-49

[12] Ko SH, Kwon HS, Kim SR, et al. Ramipril treatment suppresses islet fibrosis in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(1): 114-122

[13] Chu KY, Lau T, Carlsson PO, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes [J].

- Diabetes, 2006, 55(2): 367-374
- [14] Shao J, Iwashita N, Ikeda F, et al. Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in db/db mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 344(4): 1224 - 1233
- [15] Fernandez-Valverde LS, Taft JR, Mattick SJ. Perspectives in diabetes: microRNAs in β -Cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications [J]. Diabetes, 2011, 60(7): 1825-1831
- [16] Joglekar MV, Parekh VS, Hardikar AA. Islet-specific microRNAs in pancreas development, regeneration and diabetes [J]. Indian J Exp Biol, 2011, 49(6): 401-408
- [收稿日期] 2011-06-29

《南京医科大学学报(社会科学版)》简介

《南京医科大学学报(社会科学版)》于 2000 年底创刊, 2011 年改版为双月刊, 是江苏省教育厅主管, 南京医科大学主办的社科类期刊。十年来一直秉承为我国医疗卫生事业服务的办刊宗旨, 为卫生事业改革、医院管理、医学法学、生命伦理学、医学教育等领域提供学术交流的平台。《南京医科大学学报(社会科学版)》为《中国核心期刊(遴选)数据库》全文收录期刊、《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊、《万方数据库—数字化期刊群》入编期刊, 连续两届荣获全国理工农医院校优秀社科学报, 2011 年更荣获全国理工农医院校优秀编辑团队的称号。2012 年全新推出, 欢迎投稿, 欢迎订阅!

地 址: 江苏省南京市汉中路 140 号 2 号楼 352 室
电 话: 025-86862862, 86862036
邮 箱: nyxb_sh@njmu.edu.cn
网 址: <http://jnmn.njmu.edu.cn/aumn/ch/index.aspx>