

利拉鲁肽治疗初诊断 2 型糖尿病患者血清 miR-375 的表达及胰岛功能的相关分析

胥娟¹, 王尧^{2*}, 唐伟¹, 朱琳¹, 高远¹

(¹东南大学医学院附属江阴医院内分泌科, 江苏 江阴 214400; ²东南大学附属中大医院内分泌科, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:探讨利拉鲁肽治疗初诊断 2 型糖尿病患者后血清 miR-375 表达水平的变化,并分析其与胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能变化的相关性。方法:30 例初诊 2 型糖尿病受试者使用利拉鲁肽治疗 12 周,分别测定治疗前后患者的口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)、胰岛素、C 肽、糖化血红蛋白(HbA1c)、体重、腰围、血压和血清 miR-375 表达水平。采用配对 t 检验及 Wilcoxon 配对符号秩检验进行数据分析。结果:利拉鲁肽治疗前后,患者血清中的 miR-375 表达量和 HbA1c 显著降低($P < 0.05$),胰岛素 0~30 min 曲线下面积、胰岛素 0~120 min 曲线下面积明显增加($P < 0.05$)。结论:利拉鲁肽治疗初诊断 2 型糖尿病后,胰岛 β 细胞功能的改善可能与血清中 miR-375 表达下调有关。

[关键词] miRNA-375; 糖尿病; 胰岛 β 细胞功能

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1590-04

doi:10.7655/NYDXBNS20151118

Expression of serum miR-375 and islet function of newly diagnosed type 2 diabetic patients with liraglutide treatment

Xu Juan¹, Wang Yao^{2*}, Tang Wei¹, Zhu Lin¹, Gao Yuan¹

(¹Department of Endocrinology, Jiangyin People's Hospital Affiliated to Southeast University, Jiangyin 214400; ²Department of Endocrinology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To explore miR-375 expression level changes of newly diagnosed patients with type 2 diabetic after liraglutide treatment, and analyze the relationship between insulin resistance and functional changes in pancreatic islet β cells. **Methods:** A total of 30 patients of newly diagnosed type 2 diabetes were selected to examine the oral glucose tolerance test (OGTT), insulin, C peptide, haemoglobin A1C (HbA1c), weight, waist circumference, blood pressure and miR-375 expression level changes in serum before and after 12 weeks of liraglutide treatment. Data analysis was performed using paired t test and Wilcoxon signed rank test. **Results:** MiR-375 expression and HbA1c were decreased after liraglutide treatment ($P < 0.05$). Areas under the curve of blood glucose 0-30 min and 0-120 min were significant increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** After liraglutide treatment, insulin resistance and functional changes in pancreatic islet β cells of diabetics were improved, it may be related to the decrease of miR-375 expression level in serum.

[Key words] miRNA-375; type 2 diabetes; islets function

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1590-1593]

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是由胰岛素分泌或作用缺陷而引发的糖、脂肪和蛋白质等代谢紊乱综合征,临床上以慢性高血糖为主要特点,其中 2 型糖尿病占糖尿病患者的 90%以上^[1]。微小 RNA(micro RNA, miRNA)是在 1993 年首次发现的长度只有

22~25 nt 的内源性单链非编码的 RNA 分子,其参与 2 型糖尿病等多种疾病的发生,对真核细胞的基因表达、细胞发育分化和个体发育等多方面起调控作用^[2],主要通过阻断靶基因翻译过程的启动、进行或降解靶 mRNA,进而下调靶基因的表达^[3]。目前研究发现,miR-375 在 2 型糖尿病患者胰岛组织中表达异常,可从胰岛素分泌、 β 细胞凋亡及增殖等多个方面调控胰岛功能。

[基金项目] 国家自然科学基金(81370920)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wang_yao100@163.com

在糖尿病病程中,β 细胞凋亡逐渐增加,机体胰岛素敏感性逐渐下降。英国糖尿病前瞻性研究(UKPDS)显示,患者确诊为糖尿病时,其β 细胞功能已受损 50%^[4-5],因此,在接受血糖达标治疗方案的同时,如何保护胰岛β 细胞,也是糖尿病治疗中的重要环节。胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)作为重要的肠促胰素,由人体摄取食物后远端小肠 L-细胞分泌。葡萄糖浓度升高时 GLP-1 会促进胰岛素分泌,并能抑制胰岛素拮抗胰高血糖素分泌的作用,为此 GLP-1 成为肠促胰素家族中葡萄糖依赖的降血糖因子,其对于 2 型糖尿病的治疗作用值得关注^[6]。利拉鲁肽为人 GLP-1 类似物,与天然 GLP-1 分子结构相比有一个氨基酸差异,并增加了一个 16 碳棕榈酰脂肪酸侧链,与天然人 GLP-1 有 95% 同源性。利拉鲁肽保留了天然 GLP-1 的功效,同时由于脂肪酸侧链的存在,其分子不易被 DPP-IV 降解,并能与白蛋白结合因而有较高的代谢稳定性,这是其半衰期长达 12~14 h 的分子基础。正是由于利拉鲁肽独特的分子结构,仅需每天 1 次注射就能起到良好的降糖作用^[7-8]。本研究检测 miR-375 在利拉鲁肽治疗初诊断 2 型糖尿病患者前后血清中的差异表达,分析其表达量与胰岛功能相关性,并探讨其保护胰岛β 细胞的功能是否与 miR-375 的表达异常有关。

1 对象与方法

1.1 对象

所有 30 例受试者均为 2014 年 1 月—2015 年 1 月在东南大学医学院附属江阴医院内分泌科就诊的初发 2 型糖尿病患者。所有研究对象应满足以下纳入标准:符合糖尿病诊断标准,年龄 30~70 岁,根据 1999 年 WHO 的 DM 诊断标准行 75 g 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)、糖化血红蛋白(glycated haemoglobin, HbA1c)7%~10%、体重指数(body mass index, BMI)20~35 kg/m²,且 3 个月内体重稳定(波动小于 10%)、育龄期妇女在研究期内避孕。同时排除合并有酮症酸中毒,非酮症高渗状态,糖尿病乳酸酸中毒,急慢性感染,肝肾疾病,风湿结缔组织病,心脑血管病,周围血管病变,严重骨质疏松或既往病理性骨折病史,严重胃肠道疾病,使用影响体重、胃肠功能、抗排斥药或其他试验药物,有胰腺炎病史、甘油三酯≥5.0 mmol/L 患者以及妊娠期妇女。本研究得到医院伦理委员会批准,所有标本的获取均得到研究对象同意,并签署知情同意书。使用无抗凝

剂干燥采血试管采集研究对象空腹静脉血 5 mL,在 30 min 内通过高速离心(4 000 r/min 离心 10 min 后 12 000 r/min 离心 15 min),完全去除细胞碎片,分装于无 RNA 酶(RNase free)离心管内,保存于-80℃ 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 治疗方案

初始用药(0 周):生活方式干预下利拉鲁肽 0.6 mg,每天 1 次皮下注射;用药 4 周后,继续生活方式干预下加量为 1.2 mg,每天 1 次皮下注射,此后如若出现低血糖事件,或频繁恶心、呕吐等胃肠道反应,可将剂量降到 0.6 mg,每天 1 次。

1.2.2 常规实验室指标检测

一般资料调查:由专人测量患者的身高、体重,并计算 BMI;血压测量方法为休息 15 min 后坐位测量右上臂肱动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP),取 3 次测量平均值。

实验室检查:空腹 10 h 后,用真空采血管抽取肘静脉血,血液离体 2 h 内检测完毕。全自动生化分析仪测定 OGTT、胰岛素(insulin, INS)和 C-肽。高压液相色谱法(BIO-RAD D10)测定 HbA1c。口服 75 g 葡萄糖后 30、120 min 采集静脉血,检测空腹和服糖后 30、120 min 的血糖(G₀、G₃₀、G₁₂₀),胰岛素(I₀、I₃₀、I₁₂₀)以及 C-肽(CP₀、CP₃₀、CP₁₂₀)。

1.2.3 胰岛功能监测

用 Matsuda 胰岛素敏感性指数(Matsuda ISI)评估胰岛素敏感性,计算公式 $10\,000/\sqrt{(G_0 \times I_0) \times (\bar{G} \times \bar{I})}$,其中 \bar{G} 和 \bar{I} 分别为 OGTT 中血糖和胰岛素水平的平均值,式中血糖单位 mg/dL,胰岛素单位 mU/L。胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)计算公式为胰岛素(mU/L)×血糖(mmol/L)/22.5。胰岛素 0~30 min 曲线下面积(AUC_{ins0-30})与血糖 0~30 min 曲线下面积(AUC_{glu0-30})的比值作为胰岛早时相分泌功能指标(INSR₃₀),AUC_{ins0-120}/AUC_{glu0-120} 的比值作为胰岛全部释放功能指标(INSR₁₂₀)。校正后胰岛素敏感性治疗后,计算处理指数 DI₃₀= Matsuda ISI×INSR₃₀,DI₁₂₀= Matsuda ISI×INSR₁₂₀。}

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 miR-375 表达

采用 Plasma/Serum Exosome Kit(42800, Norgen 公司,美国)试剂提取样品总 RNA,详细操作参见 Norgen 试剂盒提取说明书。提取包括 miRNA 在内的总 RNA,置-80℃ 冰箱保存备用。

逆转录反应体系 5 μL,包括变性的总 RNA 2.5 μL,

RT primer (2 μmol/L) 0.5 μL (上海生工), dNTP (10 mmol/L each) 0.25 μL, 5 × RT buffer 1.0 μL, RNase inhibitor (40 U/μL) 0.25 μL, M-MLV (200 U/μL) 0.5 μL。反应条件: 70°C 10 min, 42°C 60 min 反转录, 70°C 15 min。所得 cDNA -20°C 保存备用。定量 PCR 反应体系 20 μL, 包括: Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 10.0 μL, ROX 0.4 μL, ddH₂O 8.3 μL, Primer mix (10 μmol/L) 0.8 μL, RT product 0.5 μL。循环条件: 95°C 5 s; 60°C 30 min, 95°C 5 s; 65°C 5 s; 95°C 5 min, 共 40 个循环。所有的 PCR 反应均行 3 个复孔, 循环阈值 (Cq 值) 取 3 次平均值。逆转录及 PCR 引物见表 1。选择 miR-16 作为内参基因。miR-375 的相对表达量用 2^{-ΔCq} 表示, ΔCq = Cq_{miR375} - Cq_{miR16}。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件, 计量资料采用均数 ±

标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。正态分布资料治疗前后比较采用配对 *t* 检验; 非正态分布资料治疗前后比较采用 Wilcoxon 配对符号秩检验, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料和检测指标的比较

30 例入选人群平均年龄 (49.80 ± 9.23) 岁, 男 18 例, 女 12 例。治疗后的体重、HbA1c、G₀、G₃₀、G₁₂₀ 明显低于治疗前 ($P < 0.01$), INS₀、INS₃₀、INS₁₂₀、CP₀、CP₃₀、CP₁₂₀ 较治疗前明显升高 ($P < 0.01$, 表 2)。

治疗后 Matsuda 胰岛素敏感性指数 (Matsuda ISI) 较治疗前降低 ($P < 0.01$), 治疗后胰岛素 0~30 min 曲线下面积 (INSR₃₀)、胰岛素 0~120 min 曲线下面积 (INSR₁₂₀) 较治疗前明显增加 ($P < 0.01$)。治疗后 DI₃₀、DI₁₂₀ 较治疗前明显增加 ($P < 0.01$, 表 2)。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

miRNA	引物类型	引物序列 (5'→3')
miR-375	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACTCACGC
	Forward primer	CCAGCGTGTTCGTTTCGTTTC
	Reversed prime	AGCAGGGTCCGAGGTATTC
miR-16	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACCGCCAA
	Forward primer	TGGCGTAGCAGCACGTAAT
	Reversed prime	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT

表 2 治疗前后一般临床特点比较

Table 2 Chinal characteristics of patients before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

指标	治疗前	治疗后	P 值
HbA1c (%)	7.73 ± 0.65	6.53 ± 0.34	<0.001
体重 (kg)	70.41 ± 10.96	68.08 ± 10.72	<0.001
G ₀ (mmol/L)	7.82 ± 1.91	6.14 ± 0.47	<0.001
G ₃₀ (mmol/L)	13.29 ± 3.18	10.36 ± 1.60	<0.001
G ₁₂₀ (mmol/L)	16.73 ± 2.88	12.05 ± 2.42	<0.001
INS ₀ (μU/mL)	5.07 ± 2.76	8.42 ± 2.37	<0.001
INS ₃₀ (μU/mL)	14.85 ± 6.56	23.14 ± 9.38	<0.001
INS ₁₂₀ (μU/mL)	33.60 ± 20.74	46.73 ± 18.48	<0.001
CP ₀ (pmol/L)	0.68 ± 0.23	1.33 ± 0.27	<0.001
CP ₃₀ (pmol/L)	1.19 ± 0.44	2.04 ± 0.42	<0.001
CP ₁₂₀ (pmol/L)	2.41 ± 0.96	3.44 ± 0.70	<0.001
INSR ₃₀	1.02 ± 0.52	1.93 ± 0.63	<0.001
INSR ₁₂₀	1.60 ± 0.95	2.93 ± 0.98	<0.001
Matsuda ISI	7.86 ± 3.81	5.47 ± 2.02	<0.001
DI ₃₀	4.11 ± 0.75	7.83 ± 1.43	0.001
DI ₁₂₀	11.29 ± 2.06	13.51 ± 2.47	<0.001

2.2 实时荧光定量 PCR 检测结果

治疗前血清 miR-375 均表现为特异性扩增, Cq 值小于 35, 熔解曲线均为单峰。治疗后血清 miR-

375 相对表达量结果呈非正态分布, 选用采用 Wilcoxon 配对符号秩检验, 结果发现治疗后患者血清中 miR-375 的表达量明显下调, 与治疗前相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

3 讨论

2 型糖尿病是一种复杂的代谢性疾病, 以胰岛素抵抗和 β 细胞功能减退为主要特征。延缓或阻止 β 细胞凋亡是防治糖尿病的重点。体外研究证实, 利拉鲁肽可以抑制白细胞介素 1β 诱导的 β 细

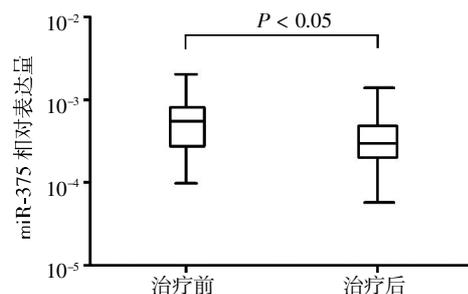


图 1 利拉鲁肽治疗前后血清 miR-375 表达水平比较
Figure 1 Comparison of serum miR-375 expression levels before and after liraglutide treatment

胞凋亡,诱导人胰岛细胞增殖^[9]。动物研究发现利拉鲁肽可促进糖尿病小鼠胰岛 β 细胞增殖^[10],并且利拉鲁肽可以改善边缘胰岛细胞移植小鼠移植物的植入和功能,使移植 48 h 后的 β 细胞凋亡减少^[11]。

本研究显示,利拉鲁肽治疗 12 周后,均能够有效控制血糖,显著降低体重,改善胰岛 β 细胞功能,同时血清 miR-375 表达水平较治疗前明显下降,提示其胰岛 β 细胞功能改善与 miRNA 有关。本研究的局限性在于样本量较少,在利拉鲁肽治疗同时未设立对照组,整个试验的干预周期相对较短。另外由于本研究属于临床病例对照研究,只能确定利拉鲁肽的治疗与 miR-375 的表达变化具有相关性,而无法确定利拉鲁肽是否通过 miR-375 的表达下调引起了糖尿病患者血糖、糖化血红蛋白、体重及胰岛素敏感性指数的改善。但毋庸置疑,miR-375 的表达水平在利拉鲁肽治疗糖尿病的过程中发生了变化,因此它可以作为利拉鲁肽治疗糖尿病的一种生物效应指标。另根据文献报道,miR-375 参与调控葡萄糖引起的胰岛素分泌^[12],它通过负调节的方式调节葡萄糖刺激的胰岛素表达,其过表达抑制胰岛素分泌;若通过 miRNAs 抑制剂抑制体内内源性 miR-375 表达,则会导致胰岛素分泌增强。控制神经递质儿茶酚胺释放的基因 myotrophin (Mtpn),被认为是 miR-375 的一种靶基因。与 miR-375 的过度表达相似,通过基因敲除技术敲除 Mtpn 同样可以导致胰岛素分泌降低。此外,miR-375 能够直接结合 Mtpn 的 3'UTR,且 miR-375 表达增强可引起 Mtpn 表达降低。所以,可以推测 Mtpn 是 miR-375 作用的直接靶点。

血清 miRNA 标本易获取,其具有很高的灵敏度和稳定性^[13],是一种理想的生物标记物。由于 miRNA 的异常改变早于蛋白质表达,在 2 型糖尿病尚未出现血糖升高、胰岛功能降低等机体变化时,miRNA 的表达异常可能就已出现。本研究提示了血清 miRNA 的检测可能成为一种有效筛查 2 型糖尿病易感性及早期诊断的生物学指标。

总之,利拉鲁肽作为一种长效人 GLP-1 类似物可以有效改善糖尿病患者胰岛 β 细胞功能和血糖控制,同时显著减少患者体重,改善胰岛素抵抗等心血管危险因素。利拉鲁肽治疗初诊断 2 型糖尿病后,改善胰岛素抵抗及保护胰岛 β 细胞功能可能与血清中 miR-375 表达下调有关。

[参考文献]

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12): 1090-1101
- [2] Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA [J]. *Trends Genet*, 2006, 22(3): 165-173
- [3] Kong YW, Cannell IG, de Moor CH, et al. The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(26): 8866-8871
- [4] Del Prato S, Marchetti P. Beta- and alpha-cell dysfunction in type 2 diabetes [J]. *Horm Metab Res*, 2004, 36(11-12): 775-781
- [5] Anon UK. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years, therapy of type II diabetes: a progressive disease [J]. *Diabetes*, 1995, 44(11): 1249-1258
- [6] Meier JJ, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in biology and pathology [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2005, 21(2): 91-117
- [7] Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, et al. Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(9): 1664-1669
- [8] Agerso H, Jensen LB, Elbrond B, et al. The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men [J]. *Diabetologia*, 2002, 45(2): 195-202
- [9] Bregenhov S, Møldrup A, Blume N, et al. The long-acting glucagon-like peptide-1 analogue, liraglutide, inhibits beta-cell apoptosis *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(2): 577-584
- [10] Rolin B, Larben MO, Goffredsen CF, et al. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 283(6): E745-E752
- [11] Merani S, Tmang W, Emamaullee JA, et al. Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide 1 analog, improves glucose homeostasis in marginal mass islet transplantation in mice [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(9): 4322-4328
- [12] Poy MN, Ehasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion [J]. *Nature*, 2004, 432(7014): 226-230
- [13] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1006