

· 基础医学 ·

宫内发育迟缓新生小鼠胰腺发育转录组分析

袁逸¹, 戴程婷², 李一卉³, 王莉¹, 袁庆新^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029; ²解放军东部战区总医院病理科, 江苏 南京 210002; ³中国人民解放军东部战区空军医院内分泌科, 江苏 南京 210002

[摘要] 目的:通过全转录组测序比较宫内发育迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)新生鼠与正常新生鼠胰腺长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)及信使RNA(messenger RNA, mRNA)表达谱的差别,探讨IUGR胰岛发育障碍及发生成年糖尿病的潜在机制。方法:建立IUGR新生鼠及正常新生鼠模型,对两种小鼠胰腺进行全转录组测序,分别对lncRNA和mRNA数据进行基因本体论(gene ontology, GO)分析,基于京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)进行富集分析,全转录组数据联合分析后挑选与胰岛发育相关、表达差异高的lncRNA进行验证。结果:IUGR新生鼠和正常新生鼠差异表达lncRNA 294个,其中上调83个,下调211个;差异表达mRNA 2 000个,其中1 711个上调,289个下调。lncRNA靶基因及差异mRNA的GO显示:生物学途径(biological process, BP)均集中于细胞过程、生物调节及代谢过程;细胞组件(cellular component, CC)集中在细胞及器官等过程;分子功能(molecular function, MF)集中于整合、催化活性、转运活性等。KEGG富集分析显示差异表达的lncRNA靶基因及mRNA主要集中于PI3K-Akt通路、MAPK通路及Foxo通路上。对差异表达lncRNA Snhg12、Rian的验证显示,它们在IUGR鼠与正常鼠中存在明显表达差异,与测序结果一致,且受糖浓度调节。结论:本研究分析并部分验证了IUGR差异表达的lncRNA和mRNA,有助于进一步探讨IUGR新生鼠胰岛发育障碍及发生成年糖尿病的潜在机制及lncRNA在其中的作用。

[关键词] IUGR;胰腺发育;转录组测序;lncRNA;糖尿病

[中图分类号] R714.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)06-785-11

doi:10.7655/NYDXBNS20210601

Transcriptome analysis of pancreas development in intrauterine growth retardation neonatal mice

YUAN Yi¹, DAI Chengting², LI Yihui³, WANG Li¹, YUAN Qingxin^{1*}

¹Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009;

²Department of Pathology, Nanjing Jinling Hospital, Nanjing 210002; ³Department of Endocrinology, the Air Force Hospital From Eastern Theater of PLA, Nanjing 210002, China

[Abstract] **Objective:** This study compared the expression spectrum of long noncoding RNA (lncRNA) and messenger RNA (mRNA) in pancreatic tissue between intrauterine growth retardation (IUGR) and normal neonatal mice, and then explored the potential mechanism of islet developmental disorders in IUGR mice and development of diabetes later in their adulthood. **Methods:** IUGR and normal neonatal mice models were established, whole transcriptome sequencing in pancreas of two groups were performed, and then gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of gene and genomes (KEGG) enrichment analysis were conducted. To further analyse the whole transcriptome sequencing information, we selected several lncRNAs with high differential expression for validation, which were also reported to be involved in islet development. **Results:** Total 294 lncRNAs were differentially expressed between IUGR and normal neonatal mice, among which 83 were up-regulated and 211 were down-regulated. There were 2 000 differentially expressed mRNAs, of which 1 711 were up-regulated and 289 were down-regulated. The GO analysis of lncRNA target genes and differential mRNAs showed: biological pathways (BP) are concentrated in cellular processes, biological regulation and metabolic processes; cell components (CC) are concentrated in cell and organ processes; molecular function (MF) mainly focuses on integration, catalytic activity,

[基金项目] 国家自然科学基金(81570697, 81170715)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yqx@njmu.edu.cn

transportation activity, etc. KEGG enrichment analysis highlights the involvement of PI3K-Akt pathway, MAPK pathway and Foxo pathway. Through verified experiments, the selected lncRNA Snhg12 and Rian showed significant differences between IUGR mice and normal mice, which is consistent with the sequencing results, and the expression were regulated by glucose concentration. **Conclusion:** This study analyzed and partially verified the lncRNA and mRNA differentially expressed in IUGR, which is helpful to explore the potential mechanism of islet developmental disorders and later adult diabetes in mice born with IUGR, especially the role of lncRNAs.

[Key words] IUGR; pancreas development; transcriptome sequencing; lncRNA; diabetes

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(06): 785-795]

糖尿病是严重危害人类健康的疾病,其病因可以追溯到胚胎发育,宫内发育迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)是指胎儿出生体重低于胎龄平均体重的第10百分位数,是一种常见的产科并发症,IUGR与糖尿病、肥胖、高血压等代谢病的发生发展密切相关^[1-2]。我们前期研究发现,IUGR新生鼠胰重、体重、胰重/体重小于正常鼠,胰腺组织免疫荧光显示IUGR新生鼠胰岛面积明显减少,胰岛素染色减弱,胰岛较正常少且松散,成年后IUGR鼠表现出明显的胰岛素抵抗,甚至发生糖尿病^[3-6]。为明确IUGR鼠发生胰岛素抵抗及2型糖尿病的病因,我们对IUGR新生鼠进行测序及转录组分析。

表观遗传是指在基因序列不发生改变的情况下,基因表达发生改变^[7],并且可以持续影响后代^[8]。表观遗传可分为DNA甲基化、非编码RNA的影响、组蛋白的翻译后修饰、遗传印记等,其中长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)近年来备受关注。lncRNA是指转录本大于200 bp的RNA,具有典型的mRNA结构,位于细胞质或细胞核内,不具有编码蛋白的能力。Morán等^[9]在人胰岛细胞转录组中发现并且鉴定出了128条lncRNA,部分被证实参与胚胎胰腺发育。后来在小鼠胰腺中也发现调控胰岛发育的lncRNA^[10]。但目前相关研究不多,且具体机制仍不明确。

本研究通过孕期给予8%的低蛋白饲料构建IUGR小鼠模型,对IUGR及正常新生鼠胰腺组织进行高通量测序转录组分析,探寻IUGR新生鼠胰腺基因组表达差异,揭示相关lncRNA在IUGR糖尿病发病中的作用及影响,为糖尿病发病机制研究提供新思路及治疗方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8周龄C57BL/6小鼠购于南京医科大学动物中

心,饲养于南京医科大学峨眉岭动物房,小鼠适应环境1周后,傍晚以雌鼠:雄鼠=2:1进行合笼,次日清晨以阴道有精栓且涂片发现精子为确定妊娠。本研究经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准。

对照组:孕鼠自受孕开始饲以标准繁殖饲料(蛋白含量为20%);IUGR组:孕鼠自受孕开始饲以低蛋白饲料(蛋白质含量为8%且等热量)至小鼠出生。

IUGR造模成功标准:新生小鼠出生体重低于孕周正常对照组体重的第十百分位或平均体重的2个标准差。

1.1.2 胰腺组织

将新生正常小鼠、IUGR小鼠取出,分别称重,将符合IUGR小鼠体重的小鼠取出,将小鼠麻醉、固定、剖开腹腔、取出胰腺组织,放于液氮中。新生正常小鼠、IUGR小鼠各3只。

1.2 方法

1.2.1 样本采集

按照TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国)说明书提取RNA,经DEPC水溶解后,按照Nano Drop分光光度仪测定RNA浓度和纯度。采用Primer-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa公司,日本)进行逆转录反应。

1.2.2 测序、质量评估

小鼠胰腺RNA提取及质检、基因检测及数据分析由广州基迪奥生物科技有限公司进行。用Illumina HiSeq™ 4000进行测序,并对数据样本进行过滤、质量评估,合格后进行数据分析。

1.2.3 生物信息学分析

通过Tophat对筛选出来的高质量样本比对核糖体RNA的reads,去除核糖体RNA对结果的干预。使用Cufflinks根据Tophat的比对结果来重构转录本,根据组装出来的转录本在参考基因组上的位置以及转录本长度 ≥ 200 bp且exon数目 ≥ 2 ,筛选出新的转录本并进行新lncRNA预测。对转录本进行定量分析,并根据 $FDR < 0.05$,且 $|\log_2 Fcl| > 1$ 计算两

组样本 LncRNA、mRNA 的表达差异。使用 RNA plex、LncRNA 与 mRNA 的表达量相关性 Pearson 相关系数分析等方法预测 LncRNA 靶基因及其功能,对 LncRNA 靶基因、mRNA 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 与京都基因与基因组百科全书数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEEG) 信号通路聚类分析。GO 富集结果包括:生物学途径 (biological process, BP)、细胞组件 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)。

1.2.4 qRT-PCR 反应

采用 SYBR Premix Ex Taq™ (TakaRa 公司, 日本)

将 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 进行差异 LncRNA 的验证。反应体系为模板 cDNA 2 μL, TB GreenPremix Ex Taq 10 μL, 荧光定量 PCR 参比染料 (ROX) 0.4 μL, 正义引物 (F Primer) 0.4 μL, 反义引物 (R primer) 0.4 μL, 灭菌 ddH₂O 6.8 μL。反应条件:预变性 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s 40 个循环。根据熔解曲线判断引物的特异性及扩增效率, 采用 2^{-ΔΔCt} 法对基因相对表达量进行分析。引物序列如表 1 所示。

1.2.5 MIN6 细胞培养

MIN6 细胞培养基的主要成分为高糖 DMEM 培养基、15% 胎牛血清 (FBS), 双抗 (100 U/mL 青霉素

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
β-Actin	TGAGCTGCGTTTTACACCCT	TTTGGGGGATGTTTGCTCCA
Snhg12	ACGGTCCCATCAAGACTGACTGAG	GGAAGTCCTCGATCACCAGA
Rian	CTAGAGAAGGAGGGACGATACA	GTCCCGTGTCACAATAGAAA

和 100 μg/mL 链霉素)、2.5 mmol/L β-巯基乙醇。细胞置于 5%CO₂、37 ℃ 的恒温培养箱中培养, 每天更换新鲜培养基, 细胞融合度达 80% 传代。

1.2.6 不同糖浓度刺激

选择无糖培养基, 利用葡萄糖粉配置 11.1、16.7、25.0、33.3 mmol/L 不同糖浓度的培养基; 将 MIN6 细胞接种于 6 孔培养板中, 待细胞贴壁后, 加入无糖低血清 (0.25%) 培养基培养 6~8 h 后, 分别加入不同糖浓度培养基 2 mL, 做好标记, 放入培养箱, 24 h 收取细胞并提取 RNA。

1.3 统计学方法

使用 SPSS21.0 软件分析实验结果, 基因表达量均以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LncRNA 的相关分析

2.1.1 LncRNA 总数与差异情况

在正常、IUGR 新生鼠中共鉴定出 30 426 个 LncRNA。两组中表达差异的 LncRNA 有 294 个, 其中上调 83 个, 下调 211 个。差异表达 LncRNA 的火山图和热图见图 1。表 2 显示了部分高差异表达的 LncRNA。

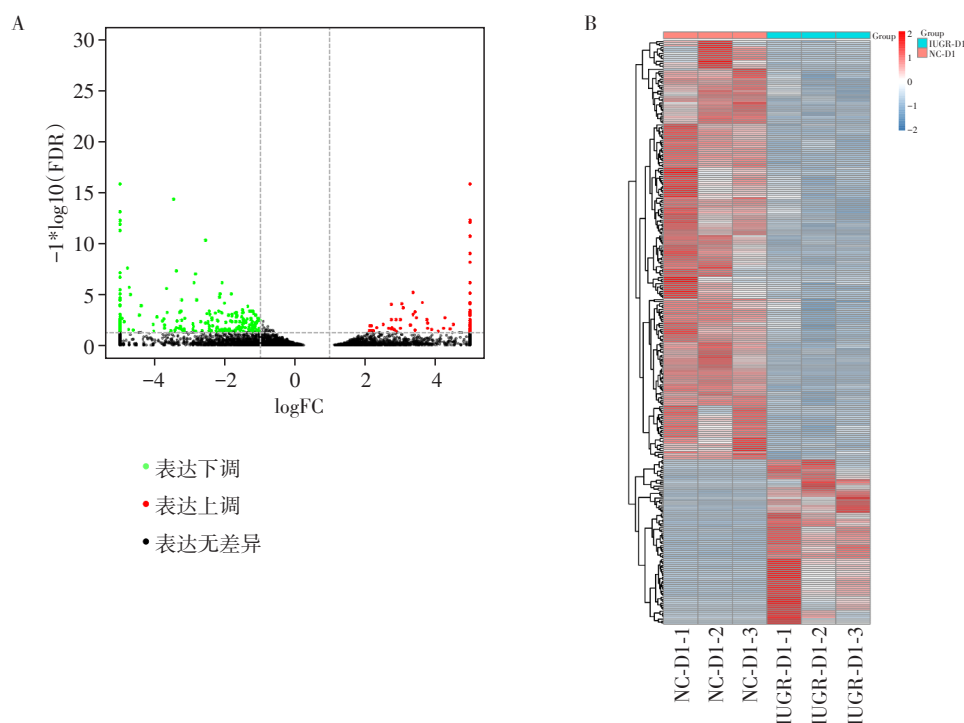
2.1.2 差异 LncRNA 靶基因 KEEG 信号通路与 GO 功能富集分析

LncRNA 与 mRNA 的调控包括 Antisense、Cis、

Trans 调控。Antisense 是指一部分反义 LncRNA 与正义链的 mRNA 结合而调控基因沉默、转录及 mRNA 稳定性。Cis 是指同一染色体上临近 mRNA 的转录激活与表达调控, 一般选取 LncRNA 上下游 10 kb 范围内的基因作为此 LncRNA 的 Cis 调控靶基因。Trans 是指 LncRNA 的功能与其共表达的蛋白编码基因相关, 通过样本间 LncRNA 与蛋白编码基因的表达量相关分析或共表达分析方法来预测其靶基因。

Antisense: 差异 LncRNA Antisense 靶基因 KEEG、GO 富集分析如图 2 所示, 按照 KEEG 信号通路富集分析中基因数量, 前 5 位分别是“metabolic pathway”(512 个基因)、“pathway in cancer”(206 个基因)、“MAPK signaling pathway”(167 个基因)、“PI3K-Akt signaling pathway”(158 个基因)、“Ras signaling pathway”(140 个基因)(图 2A)。按照 GO 分析基因表达数目可知, BP 中前 5 位的是“cellular process”“single-organism process”“biological regulation”“metabolicprocess”“response to stimulus”, CC 前 5 位是“cell”“cell part”“organelle”“membrane”“member part”, MF 前 5 位是“binding”“catalytic activity”“transporter activity”“molecular function regulator”“nucleic and binding transcription factor activity”(图 2B)。

Cis: 差异 LncRNA Cis 调控靶基因 GO、KEEG 富集分析如图 3 所示。按照 KEEG 信号通路富集分析中基因数量, 前 5 位分别是“metabolic pathway”(839



A: 差异表达 LncRNA 的火山图, 红色表示上调, 绿色表示下调, 黑色表示无差异; B: 差异表达 LncRNA 的热图, 横坐标表示样本, 纵坐标表示差异表达 LncRNA。

图1 IUGR、正常新生小鼠差异表达 LncRNA

Figure1 Differentially expressed LncRNAs between IUGR and normal neonatal mice

表2 部分差异上调或下调的 LncRNAs

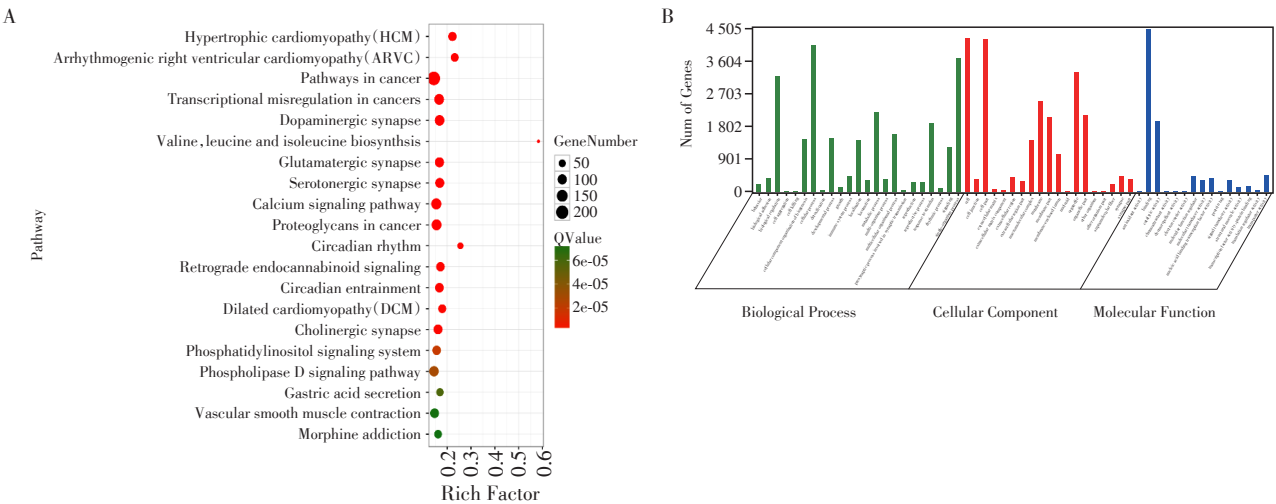
Table 2 Part differentially up- or down-regulated LncRNAs

ID	LncRNA 名称	Log ₂ (变化倍数)	P 值	上调或下调
ENSMUST00000148682	Tnks1bp1-205	12.133	< 0.001	上调
ENSMUST00000165584	Papola-207	11.671	< 0.001	上调
ENSMUST00000137591	Yars-204	11.292	< 0.001	上调
ENSMUST00000147816	Bptf-206	11.159	< 0.001	上调
ENSMUST00000212315	Zfp1-205	10.448	< 0.001	上调
ENSMUST00000218372	Ddx50-206	-11.004	< 0.001	下调
ENSMUST00000235411	Sec11c-208	-10.917	< 0.001	下调
ENSMUST00000209449	1300002E11Rik-205	-10.751	< 0.001	下调
ENSMUST00000207039	Homer2-203	-10.485	< 0.001	下调
ENSMUST00000150899	Pex5-207	-10.176	< 0.001	下调

个基因)、“pathway in cancer”(285 个基因)、“Endocytosis”(228 个基因)、“HTLV-1 infection”(181 个基因)、“Proteoglycans in cancer”(171 个基因)(图 3A)。按照 GO 分析基因表达数目可知,BP 中前 5 位是“cellular process”“single-organism process”“biological regulation”“metabolic process”“response to stimulus”,CC 前 5 位是“cell”“cell part”“organelle”“membrane”“organelle part”,MF 前 5 位是“binding”“catalytic activity”“transporter activity”“molecular func-

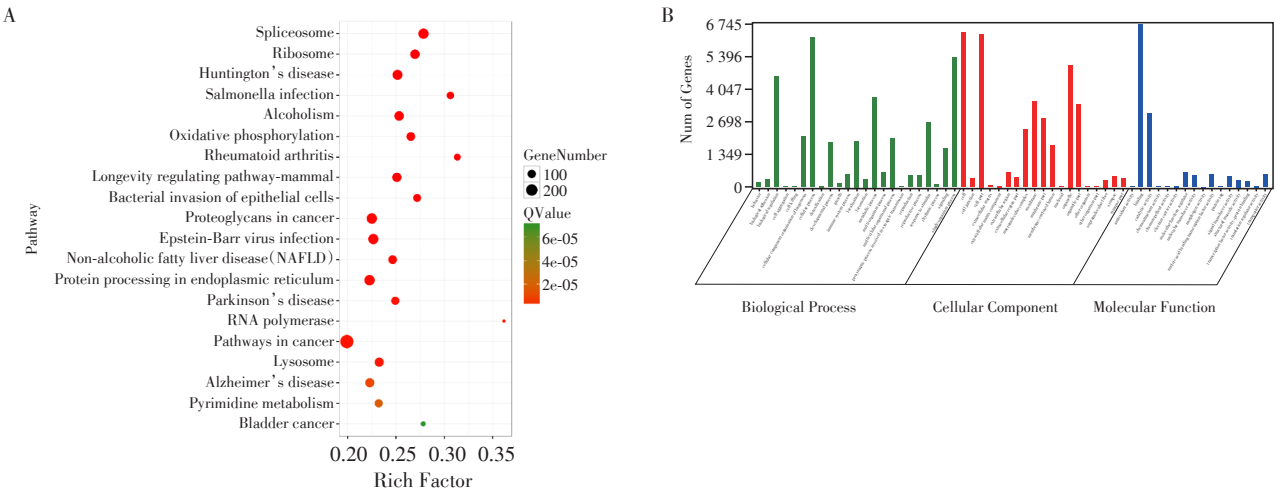
tion regulator”“nucleic and binding transcription factor activity”(图 3B)。

Trans: 差异 LncRNA Trans 调控靶基因 GO、KEEG 富集分析如图 4 所示。按照 KEEG 信号通路富集分析中基因数量,前 5 位分别是“pathway in cancer”(260 个基因)、“Neuroactive ligand-receptor interaction”(173 个基因)、“HTLV-1 infection”(166 个基因)、“cAMP signaling pathway”(157 个基因)、“Adrenergic signaling in cardiomyocytes”(138 个基因)



A: 差异 LncRNA Antisense 作用靶基因 KEEG 分析,纵轴表示通路名称,横轴表示富集指数,富集指数越大,表示富集程度越大,点的大小表示富集在此通路中差异表达的基因个数,点的颜色代表不同的 P 值;B: 差异 LncRNAs Antisense 作用靶基因的 GO 富集分析,图中横轴表示 GO 富集条目,纵轴表示基因数。

图2 差异 LncRNA Antisense 作用靶基因 KEEG 和 GO 富集分析
Figure 2 The KEEG and GO enrichment analysis of differentially expressed LncRNA antisense target genes



A: 差异 LncRNA Cis 作用靶基因 KEEG 分析;B: 差异 LncRNAs Cis 作用靶基因 GO 分析。

图3 差异 LncRNA Cis 作用靶基因 KEEG、GO 富集分析
Figure 3 The KEEG and GO enrichment analysis of differentially expressed LncRNA Cis target genes

(图4A)。按照GO分析基因表达数目可知:BP中前5位是“cellular process”“single-organism process”“biological regulation”“metabolic process”“response to stimulus”,CC前5位是“cell”“cell part”“organelle”“membrane”“membrane part”,MF前5位是“binding”“catalytic activity”“transporter activity”“molecular transducer activity”“signal transducer activity”(图4B)。

2.2 mRNA 相关分析

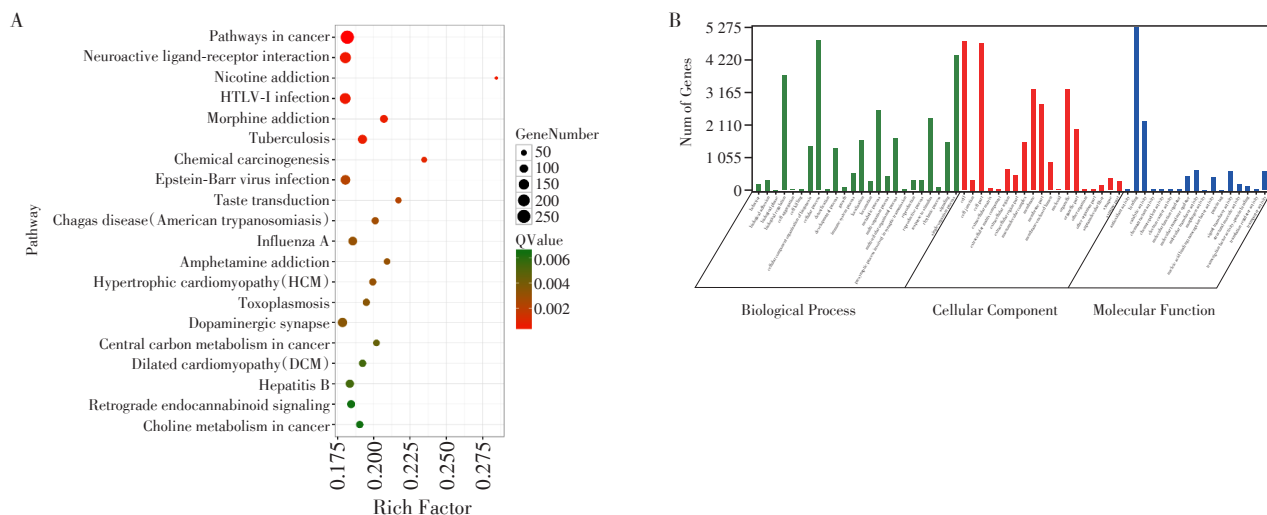
2.2.1 mRNA 表达差异情况

在正常、IUGR 新生鼠中共检测出 66 652 个

mRNA,2 000 个差异表达 mRNA,其中 1 711 个上调,289 个下调,部分差异表达 mRNA 如表 3 所示。

2.2.2 差异 mRNA GO 功能与 KEEG 信号通路富集分析

mRNA 差异表达 KEEG 和 GO 信号通路富集分析见图 5。按照 KEEG 信号通路富集分析中基因数量比,前 5 位分别是“PI3K-Akt signaling pathway”(111 个基因)、“Endocytosis”(104 个基因)“MAPK signaling pathway”(100 个基因)、“Rap1 signaling pathway”(86 个基因)、“FoxO signaling pathway”(64



A: 差异 LncRNA Trans 作用靶基因 KEEG 分析; B: 差异 LncRNAs Trans 作用靶基因 GO 分析。

图4 差异 LncRNA Trans 作用靶基因 KEEG 和 GO 富集分析

Figure 4 The KEEG and GO enrichment analysis of differentially expressed LncRNA Trans target genes

表3 部分差异上调或下调的 mRNA

Table 3 Differentially up- or down-regulated mRNAs

ID	mRNA 名称	Log ₂ (变化倍数)	P 值	上调或下调
ENSMUST00000000033	Igf2	14.860	< 0.001	上调
ENSMUST00000051122	Zg16	14.609	< 0.001	上调
TCONS_00033289	Vdac2	13.239	< 0.001	上调
ENSMUST00000180288	Hist1h2br	12.978	< 0.001	上调
ENSMUST00000079056	Anb2	8.697	0.031	上调
ENSMUST00000101581	Cacna2d1	-7.437	0.047	下调
ENSMUST000001531166	Fgfr2	-8.966	0.003	下调
TCONS_00093844	Gna12	-11.994	< 0.001	下调
ENSMUST00000105934	Ins2	-1.188	0.003	下调
ENSMUST00000029240	Slc2a2	-2.126	< 0.001	下调

个基因)(图5A)。按照GO分析基因表达数目可知:BP中前5位是“cellular process”“biological regulation”“metabolic process”“response to simullus”“developmental process”,CC前5位是“cell”“cell part”“organelle”“organelle part”“membrane”,MF前五5位是“binding”“catalytic activity”“molecular function regulator”“nucleic and binding transcription factor activity”“molecular function regulator”(图5B)。

2.3 LncRNA-mRNA 共表达网络

对差异 Lnc RNA 和差异 mRNA 关系均进行了 Antisense、Cis、Trans 作用分析,具体关系如图6~8所示,图中红色表示差异表达 LncRNA,绿色表示差异表达 mRNA。在3种作用关系中,差异 LncRNA 与差异 mRNA 在 Trans 作用上相关性强,作用丰富。

2.4 差异表达基因验证

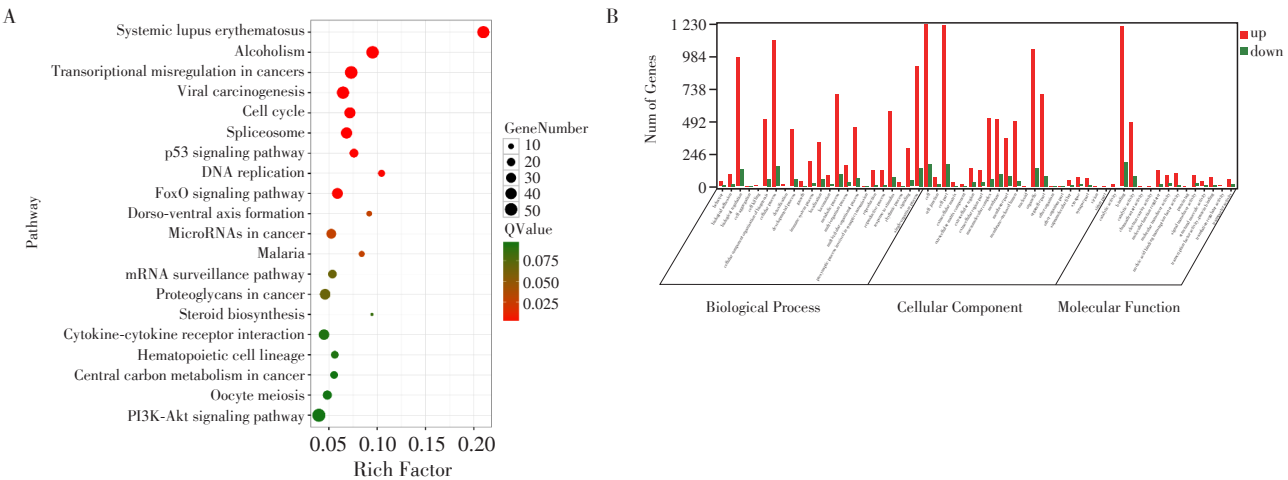
通过对差异表达 LncRNA 及其作用分析,高差

异表达 LncRNA 如表4所示,从中挑选了差异表达且与生长发育相关的 LncRNA Snhg12、LncRNA Rian 在 IUGR、正常新生小鼠中进行验证,表达结果如图9所示,与测序结果一致。

为验证基因与糖尿病相关性,我们测定了 MIN6 细胞在不同糖浓度下基因表达情况(图10)。LncRNA Snhg12 在低糖浓度(5.0、11.1、16.7 mmol/L)、高糖浓度(33.3 mmol/L)下表达量较正常糖浓度增加;LncRNA Rian 在低糖浓度(5、11.1、16.7 mmol/L)、高糖浓度(33.3 mmol/L)下表达量较正常糖浓度下降,即 Lnc RNA Snhg12、Rian 表达受糖浓度调控。

3 讨论

IUGR 作为产科并发症,产后及成年后可引起糖尿病、心血管疾病等一系列代谢病,在鼠^[5,11]、人^[12]及其他灵长类动物^[13-14]中均有验证,但 IUGR 引起糖耐



A: 差异表达mRNA的KEEG富集分析图,图中纵轴表示通路名称,横轴表示富集指数,富集指数越大,表示富集程度越大,点的大小表示富集在此通路中差异表达的基因个数,点的颜色代表不同的P值;B: 差异表达mRNA的GO富集分析图,GO富集分析中横轴表示GO富集条目,纵轴表示基因数。

图5 IUGR、正常新生小鼠差异表达mRNAs KEEG和GO富集分析图
Figure 5 The KEEG and GO enrichment analysis of differentially expressed mRNAs

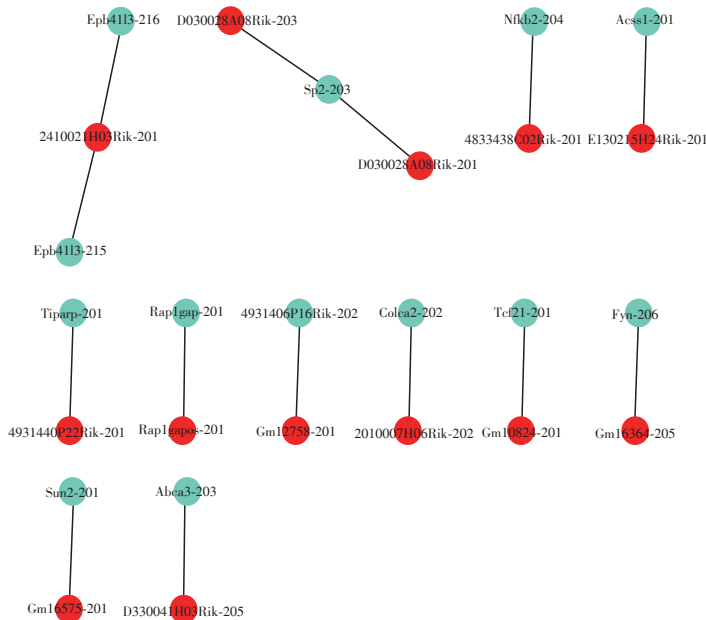


图6 差异LncRNA与差异mRNA的Antisense作用图
Figure 6 The Antisense between differentially expressed LncRNA and mRNA

量异常的具体机制目前仍不明确。本研究通过高通量测序对IUGR的转录组进行分析,旨在探究LncRNA在IUGR胰岛发育及成年发生2型糖尿病中的作用。

随着RNA组学的发展,LncRNA被认为是参与胰岛发育、糖尿病及其并发症以及IUGR发病过程中的新型调节因子。H19下调导致IUGR胎盘绒毛膜外滋养细胞迁移和侵袭减少^[12]。LncRNA NEAT1通过激活Akt/mTOR信号通路促进小鼠肾系膜细胞

的增殖和纤维化,加速糖尿病肾病进程^[15]。LncRNA MALAT1通过抑制microRNA let-7f、激活KLF5促进肾足突细胞损伤,加重糖尿病肾病^[16]。在人^[9]和小鼠^[10]中均发现LncRNA可能参与胰腺发育和胰岛β细胞分化。LncRNA MEG3在人、小鼠中具有高度同源性,全基因组关联研究(GAWS)发现MEG3是与糖尿病易感性相关的LncRNA,在2型糖尿病患者胰岛中表达显著下调。通过在MIN6细胞中干扰Meg3,发现Meg3通过促进Rad21/Smc3/Sin3α的表

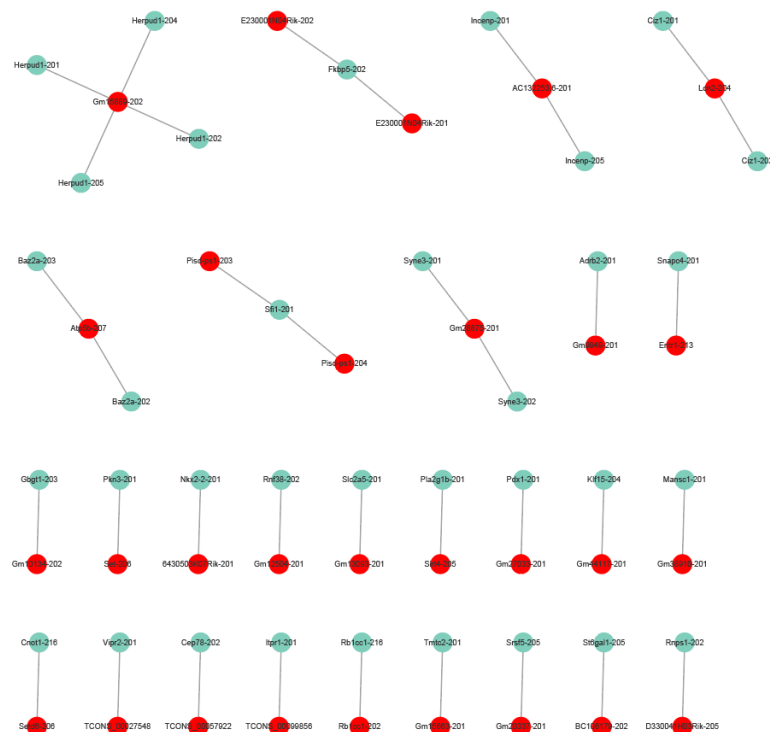


图7 差异LncRNA与差异mRNA的 Cis作用图

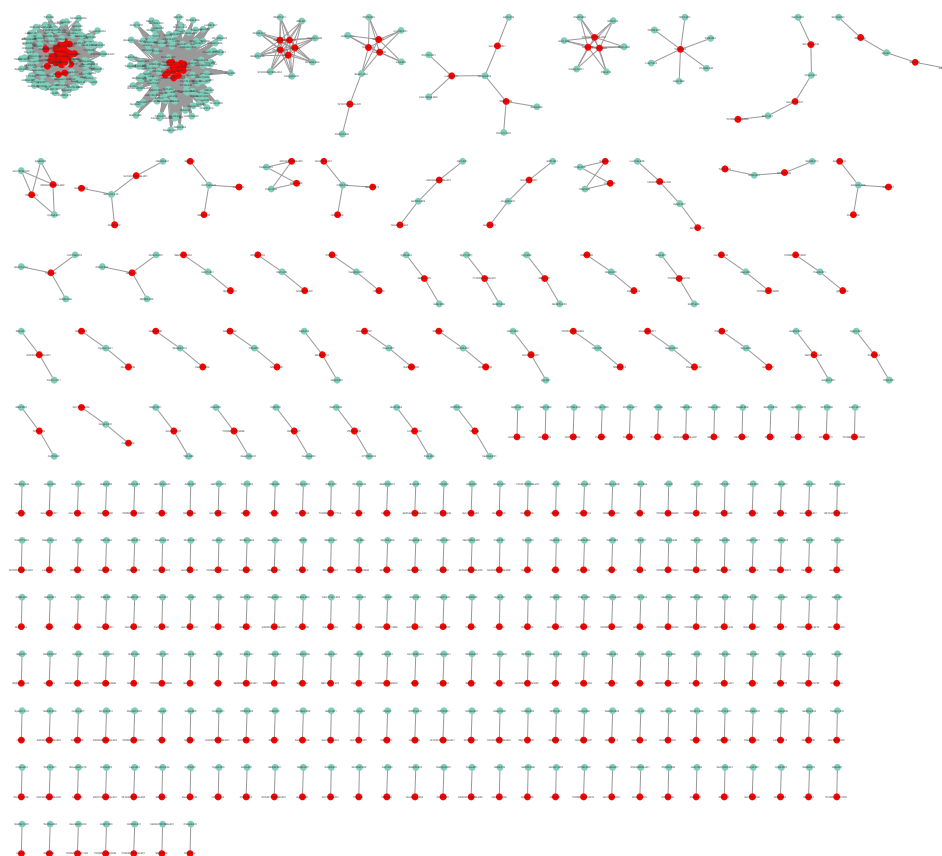


图8 差异表达LncRNA与差异表达mRNA的Trans作用图

Figure 8 The Trans between differentially expressed LncRNAs and mRNAs

表4 高差异表达LncRNA
Table 4 LncRNAs with high differential expression

ID	LncRNA 名称	Log ₂ (变化倍数)	P 值	上调或下调
ENSMUST00000134140	Mir17hg-201	1.432 959	0.036 008	上调
ENSMUST00000133125	F630028O10Rik-201	1.711 151	0.009 188	上调
ENSMUST00000232301	Snhg12-210	1.717 600	0.040 116	上调
ENSMUST00000127263	2610035D17Rik-201	-1.715 160	0.000 213	下调
ENSMUST00000238751	Rian-267	-2.556 950	0.001 146	下调
ENSMUST00000180951	D130017N08Rik-202	-1.584 960	0.000 436	下调

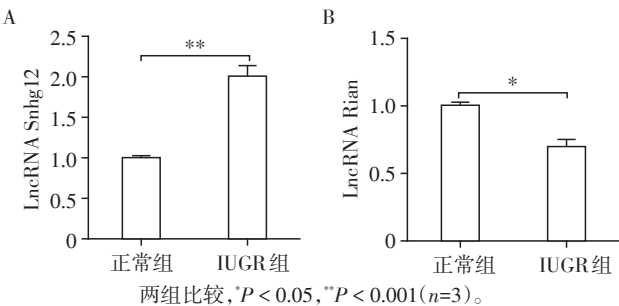
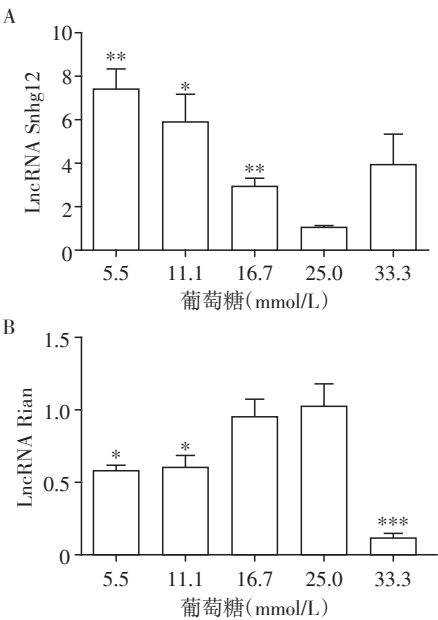


图9 LncRNA Snhg12(A)、LncRNA Rian(B)在IUGR、正常新生小鼠中的表达

Figure 9 The expression of LncRNA Snhg12(A) and LncRNA Rian(B) between IUGR and normal neonatal mice



与糖浓度 25.0 mmol/L 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图10 不同糖浓度下MIN6细胞中LncRNA Snhg12(A)、LncRNA Rian(B)的表达

Figure 10 The expression of LncRNA Snhg12(A) and LncRNA Rian(B) in response to various glucose concentrations in MIN6 cells

达,使胰岛素合成关键转录因子 MafA 表达下调,从而减少胰岛素合成及分泌^[17]。本课题组前期研究

亦发现了 LncRNA Lncpint 在小鼠胰岛中高表达,促进胰岛素合成和分泌,维持胰岛β细胞功能^[18]; LncRNA TUG1 在小鼠胰腺中低表达,是小鼠发生 2 型糖尿病的重要原因^[19]。本研究在 IUGR 小鼠中也发现了 LncRNA TUG1 表达下调, LncRNA TUG1 在细胞核中通过绑定 PRC2 的催化亚基 EZH2,介导 EZH2 结合于 Hes1 的启动子区,影响 H3K27me3 的水平,抑制 HES1 的转录表达,维持胰岛β细胞的功能。为深入全面探讨 LncRNA 在 IUGR 胰腺发育中的作用及机制,对 IUGR 新生鼠胰腺进行全转录组测序及分析。

LncRNA 靶基因和差异 mRNA GO 分析中, BP 均集中于细胞过程、生物调节及代谢过程, CC 集中在细胞及器官等过程, MF 集中于整合、催化活性、转运活性等。这些功能及成分中的基因均可对 IUGR 胰岛发育及糖尿病产生影响,例如能量代谢、碳水化合物代谢、脂质代谢等的变化及一些离子通道转运体的变化,这与 Rashid 等^[20]关于 IUGR 发生 2 型糖尿病的相关转录分析一致。

差异 LncRNA 靶基因 KEEG 分析及差异 mRNA KEEG 分析表明, PI3K-Akt、Foxo、MAPK 通路在 IUGR 新生鼠中存在明显表达差异。PI3k-Akt 在增殖、分化、凋亡、葡萄糖代谢等方面均有重要作用,在胰岛β细胞中 PI3K/Akt 的激活可以促进胰岛素的分泌^[21],胰岛β细胞中 Akt 的过表达和持续激活可以促进细胞增殖^[22],而 Akt 的抑制也会导致胰岛素分泌减少^[23]。Foxo 可被活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 激活,从而在多种细胞过程如细胞增殖、葡萄糖代谢、细胞周期控制、氧化应激反应等中发挥作用。在人类 IUGR 胎儿^[24-25]和 IUGR 鼠^[26]中均存在氧化应激和 ROS 物质的增加。ROS 可以通过抑制 MAPK 通路引起细胞死亡的细胞内通路^[27], MAPK 通路可以通过 ERK1/2 促进孕鼠胰岛增殖等^[28]。因而这些通路均可能成为 IUGR 鼠胰腺发育异常及成年发生 2 型糖尿病的可能机制。

经过对差异 LncRNA 及其靶基因、差异 mRNA 的 GO 和 KEGG 分析,发现 LncRNA Snhg12、Rian 可能分别通过 MAPK、PI3K/AKT 通路影响胰腺发育及增殖。LncRNA Snhg12 在多种癌症增殖迁移中发挥作用, Cao 等^[29]指出 LncRNA Snhg12 通过与 miRNA-320b 的海绵化作用促进胰腺癌细胞增殖、迁移; LncRNA Snhg12 通过激活 SIRT1/FOXO3a 抑制自噬和氧化应激改善脑缺血灌注^[30]。LncRNA Rian 在细胞增殖凋亡中发挥重要作用,研究表明 Rian 的过表达会减少细胞凋亡^[31];也可以通过 PI3K/AKT 影响细胞增殖^[32]。本研究对 LncRNA Snhg12 及 Rian 在 IUGR 新生鼠胰腺中进行了验证,其表达结果与测序结果一致。通过在 MIN6 细胞中进行不同糖浓度刺激实验,结果表明 LncRNA Snhg12、Rian 表达受糖浓度影响,其可能在 IUGR 发生糖尿病的过程中发挥作用。测序结果也预测了 LncRNA Snhg12 可能会影响 Trna1ap 的表达,从而影响胰岛发育及糖尿病发生; LncRNA Rian 可能通过影响 Sky 的表达发挥作用,具体机制仍需进一步研究。

本研究通过对 IUGR 新生小鼠及正常新生小鼠转录组差异表达基因分析,筛选出了差异 LncRNA 及 mRNA,并通过 GO、KEGG 分析提出了 IUGR 鼠胰岛发育障碍和成年 2 型糖尿病发生的可能机制。未来将针对差异表达明显的 LncRNA 在 IUGR 胰岛发育异常过程中的机制及功能进行进一步研究。

[参考文献]

- [1] BIANCO-MIOTTO T, CRAIG J M, GASSER Y P, et al. Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond [J]. *J Dev Orig Health Dis*, 2017, 8(5): 513-519
- [2] LAW C M, SHIELL A W, NEWSOME C A, et al. Fetal, infant, and childhood growth and adult blood pressure: a longitudinal study from birth to 22 years of age [J]. *Circulation*, 2002, 105(9): 1088-1092
- [3] YUAN Q X, JY Z, TENG L P, et al. Intrauterine growth retardation leads to the functional change of insulin secretion in the newborn rats [J]. *Horm Metab Res*, 2010, 42(7): 491-495
- [4] YUAN Q, CHEN L, LIU C, et al. Postnatal pancreatic islet β cell function and insulin sensitivity at different stages of lifetime in rats born with intrauterine growth retardation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25167
- [5] LI Y, DAI C, YUAN Y, et al. The mechanisms of LncRNA Tug1 in islet dysfunction in a mouse model of intrauterine growth retardation [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(8): 1129-1138
- [6] 戴程婷, 逸 袁, 李一卉, 等. 宫内发育迟缓新生大鼠胰 WFS1 的表达变化及其可能作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(5): 658-662
- [7] HENIKOFF S, GREALLY J M. Epigenetics, cellular memory and gene regulation [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(14): R644-R648
- [8] BERNSTEIN B E, MEISSNER A, LANDER E S. The mammalian epigenome [J]. *Cell*, 2007, 128(4): 669-681
- [9] MORÁN I, AKERMAN I, VAN DE BUNT M, et al. Human β cell transcriptome analysis uncovers lncRNAs that are tissue-specific, dynamically regulated, and abnormally expressed in type 2 diabetes [J]. *Cell Metab*, 2012, 16(4): 435-448
- [10] KNOLL M, LODISH H F, SUN L. Long non-coding RNAs as regulators of the endocrine system [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(3): 151-160
- [11] GATFORD K L, SIMMONS R A, DE BLASIO M J, et al. Review: placental programming of postnatal diabetes and impaired insulin action after IUGR [J]. *Placenta*, 2010, 31(Suppl): S60-S65
- [12] ZUCKERWISE L, LI J, LU L, et al. H19 long noncoding RNA alters trophoblast cell migration and invasion by regulating T β R3 in placenta with fetal growth restriction [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 38398-38407
- [13] MACKO A R, YATES D T, CHEN X, et al. Adrenal demedullation and oxygen supplementation independently increase glucose-stimulated insulin concentrations in fetal sheep with intrauterine growth restriction [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(5): 2104-2115
- [14] SHEN L, ZHANG S, LI Q, et al. The landscape of non-coding RNA in an adult pig model of intrauterine growth restriction [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5): 1764-1778
- [15] HUANG S, XU Y, GE X, et al. Long noncoding RNA NEAT1 accelerates the proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy through activating Akt/mTOR signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11200-11207
- [16] ZHANG H, YAN Y, HU Q, et al. LncRNA MALAT1/microRNA let-7f/KLF5 axis regulates podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. *Life Sci*, 2021, 266: 118794
- [17] WANG N, ZHU Y, XIE M, et al. Long noncoding RNA meg3 regulates Maf expression in mouse beta cells by inactivating rad21, Smc3 or sin3 α [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(5): 2031-2043
- [18] ZHU Y, LI Y, DAI C, et al. Inhibition of lincpint expression affects insulin secretion and apoptosis in mouse pancreatic β cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 104: 171-179

- [19] YIN D D, ZHANG E B, YOU L H, et al. Downregulation of lncRNA TUG1 affects apoptosis and insulin secretion in mouse pancreatic β cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(5):1892-1904
- [20] RASHID C S, LIEN Y C, BANSAL A, et al. Transcriptomic analysis reveals novel mechanisms mediating islet dysfunction in the intrauterine growth-restricted rat [J]. *Endocrinology*, FEB, 2018, 159(2):2017-00888
- [21] GEORGIA S, BHUSHAN A. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(7):963-968
- [22] BERNAL-MIZRACHI E, WEN W, STAHLHUT S, et al. Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB α induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(11):1631-1638
- [23] BERNAL-MIZRACHI E, FATRAI S, JOHNSON J D, et al. Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(7):928-936
- [24] ZYGULA A, KOSINSKI P, WROCZYNSKI P, et al. Oxidative stress markers differ in two placental dysfunction pathologies: Pregnancy-Induced hypertension and intrauterine growth restriction [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:1323891
- [25] NAHA R, ANEES A, CHAKRABARTY S, et al. Placental mitochondrial DNA mutations and copy numbers in intrauterine growth restricted(IUGR)pregnancy [J]. *Mitochondrion*, 2020, 55:85-94
- [26] RAINS M E, MUNCIE C B, PANG Y, et al. Oxidative stress and neurodevelopmental outcomes in rat offspring with intrauterine growth restriction induced by reduced uterine perfusion [J]. *Brain Sci*, 2021, 11(1):78
- [27] SIVITZ W A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(4):537-577
- [28] AMARAL M E, DA C H, ANHÊ G F, et al. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy [J]. *J Endocrinol*, 2004, 183(3):469-476
- [29] CAO W, ZHOU G. LncRNA SNHG12 contributes proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by absorbing miRNA-320b [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(6):BSR20200805
- [30] WU Y, HUANG Y, CAI J, et al. LncRNA SNHG12 improves cerebral ischemic-reperfusion injury by activating SIRT1/FOXO3a pathway through inhibition of autophagy and oxidative stress [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2020, 17(4):394-401
- [31] YAO P, LI Y L, CHEN Y, et al. Overexpression of long non-coding RNA Rian attenuates cell apoptosis from cerebral ischemia-reperfusion injury via Rian/miR-144-3p/GATA3 signaling [J]. *Gene*, 2020, 737:144411
- [32] ZHONG L, JIA J, YE G. Rian/miR-210-3p/Nfkb1 feedback loop promotes Hypoxia-Induced cell apoptosis in myocardial infarction through deactivating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2020, 76(2):207-215

[收稿日期] 2020-12-01