

妊娠期糖尿病妇女外周血 miR-29、miR-375 的表达及临床意义

李 伟¹, 蔡德鸿^{2*}

(¹南方医科大学研究生院, 广东 广州 510505; ²南方医科大学珠江医院内分泌科, 广东 广州 510507)

[摘要] 目的: 探讨广东省汉族妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)患者外周血 miR-29、miR-375 的表达情况及临床意义。方法: 选取 2012 年 12 月~2013 年 5 月在武警广东省总队医院就诊的 90 例 GDM 患者和糖耐量正常的孕妇, 分别作为 GDM 组和对照组, 检测血浆空腹胰岛素(fast insulin, FINS)及其外周血 miR-29、miR-375 的表达情况。结果: ①GDM 组及对照组的 FINS 分别为(15.67 ± 5.75)mIU/L 和(26.23 ± 10.89)mIU/L($P < 0.01$); ②GDM 组外周血 miR-29 表达量(25.16 ± 10.05)低于对照组(75.26 ± 13.43)($P < 0.05$); ③GDM 组外周血 miR-375 的表达量(65.18 ± 22.08)显著高于对照组(21.31 ± 9.56)($P < 0.05$)。结论: GDM 患者中 miR-29、miR-375 的异常表达与 GDM 易感性有一定相关。

[关键词] 妊娠期糖尿病; 外周血; miR-29; miR-375

[中图分类号] R714.256

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2014)03-334-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20140311

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是指妊娠期首次发生或发现的糖代谢异常, 是一种常见的妊娠并发症, 可引起孕产妇和围产儿并发症以及围生儿病死率增加, 但其发病机制尚未完全清楚^[1]。微 RNA(microRNA, miRNA)是一类长 19~23 nt 的非编码 RNA 分子, 已证实与多种人类疾病相关, 包括糖尿病、妊娠高血压综合征等^[2], 因此 miRNA 已成为相关疾病诊断、治疗、预防的新靶点, 但在 GDM 的诊治中, 未有证实 miRNA 作用的报道。本研究首次应用芯片杂交分析 GDM 患者外周血 miR-29、miR-375 的表达及临床意义, 为 GDM 发病机制研究提供可靠的理论依据。

1 对象和方法

1.1 对象

选择武警广东省总队医院 2012 年 12 月~2013 年 5 月住院分娩的 GDM 患者 90 例。GDM 的诊断标准: ①孕期 2 次空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG) ≥ 7.0 mmol/L 及或随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L 或者 75 g 葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)中, 空腹及服糖后 1、2、3 h 4 项血浆葡萄糖值中 2 项分别达到 5.3、10.0、8.6、7.8 mmol/L^[3], 另外选择 90 例糖耐量正常的孕妇作为对照组。两组

妇女无亲缘关系, 孕周和孕前体质指数(body mass index, BMI)比较无显著性差异。

全自动生化分析仪(Beckman 公司, 美国), 电化学发光法胰岛素检测仪(Beckman 公司, 美国), PCR 扩增仪(PE 公司, 美国), RNA 抽提试剂盒(AM1560)(Ambion 公司, 美国), TaqMan microRNA 反转录试剂盒、TaqMan microRNA Assay Kit (Applied Bio-systems 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及生化指标的检测

两组研究对象禁食 10 h 后采空腹血 8 ml, 其中 3 ml EDTA 抗凝后用于 RNA 的抽提; 另外 5 ml 用于检测 FPG 及空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)水平。

1.2.2 miR-29、miR-375 表达的检测

RNA 的提取: 抽取 EDTA 抗凝的实验对象静脉外周血 3 ml, 按试剂盒说明书步骤抽提 RNA, 收集 miRNA 测浓度后 -80℃ 冻存。

逆转录和 RT-PCR: 逆转录反应条件为 16℃ 30 min; 42℃ 30 min; 85℃ 5 min; 4℃ 5 min。RT-PCR 反应条件为 95℃ 10 min, 45 个循环的 95℃ 15 s; 60℃ 60 s。U6 SnRNA 作为内参照。采用 SDS 1.4 (Applied Biosystems 公司, 美国)软件计算 Ct 值。目的 miRNAs 相对表达量采用相对于 U6 SnRNA 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件进行统计学分析, 计量

[基金项目] 广东省医学科研基金(A2013452)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: caidehong@126.com

资料结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各临床参数

GDM 组 FINS 水平显著低于对照组 ($P < 0.01$, 表 1), 而 BMI、FPG 水平无明显差异($P > 0.05$)。

2.2 miR-29、miR-375 在外周血中的表达

统计结果显示,miR-29 在 GDM 组外周血中的相对表达量是 25.16 ± 10.05 , 低于对照组外周血中的相对表达量 75.26 ± 13.43 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2), 而 miR-375 在 GDM 组外周血中的相对表达量是 65.18 ± 22.08 , 明显高于对照组外周血中的相对表达量 21.31 ± 9.56 , 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 3)。

表 1 两组孕妇一般资料的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	孕周(周)	孕前 BMI	分娩前 BMI	FPG(mmol/L)	FINS(mIU/L)
GDM 组	90	28 ± 3.9	38.2 ± 1.2	20.9 ± 2.3	27.29 ± 2.53	5.25 ± 0.75	15.67 ± 5.75*
对照组	90	26 ± 3.8	39.2 ± 1.1	20.7 ± 1.9	27.91 ± 0.78	5.07 ± 0.39	26.23 ± 10.89

与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

表 2 两组外周血 miR-29 的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ΔCt	$\Delta \Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GDM 组	90	11.73 ± 9.55	13.48 ± 8.12	25.16 ± 10.05*
对照组	90	35.16 ± 17.15	36.27 ± 13.56	75.26 ± 13.43

与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

表 3 两组外周血 miR-375 的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ΔCt	$\Delta \Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GDM 组	90	29.45 ± 10.07	30.05 ± 12.15	65.18 ± 22.08*
对照组	90	15.26 ± 10.08	10.28 ± 9.55	21.31 ± 9.56

与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

GDM 是一种发病机制极其复杂的疾病, 不仅导致显性糖尿病危险性明显增加, 其子代新生儿期、儿童期智力发育受影响, 对母婴危害极大。而有关 GDM 的发病机制, 除遗传、免疫等因素外, 基因调控的异常无疑起着十分重要的作用。

miRNA 在细胞和器官发育中起着重要作用, 通过与特异的靶 mRNA 结合调控其降解或者抑制其翻译, 从而降低靶基因蛋白质的表达, 高糖、高脂等环境因素可通过影响 miRNA 的表达异常来促成糖尿病的发生和发展^[4]。2 型糖尿病模型大鼠应用雷米普利后出现多个 miRNA 的表达差异, 其中 miR-1、miR-30c 可能通过转录后水平参与胰腺功能的调解^[5]。在胰岛 β 细胞中首次发现两个新表达的 miRNA, 其中 miR-375 在 β 细胞生理学功能中发挥重要作用, 其通过控制肌营养素(myotrophin)的水平负性调节葡萄糖刺激的胰岛素分泌作用^[6]。miR-375 发现同样能够调节三磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1,

PDK1), 介导 PDK1 表达降低, 导致葡萄糖对胰岛素基因表达和 DNA 合成的刺激作用降低, 导致严重糖尿病的发生^[7]。miR-29 在血糖刺激的胰岛素分泌和胰岛素抵抗中起重要作用, 2 型糖尿病模型 GK 大鼠的 miR-29 的表达较正常动物明显升高^[8]。在鼠源脂肪组织 3T3-L1 细胞系中过表达 miR-29, 胰岛素激发的葡萄糖摄取受抑制; 高水平的 miR-29 导致细胞对胰岛素失敏, 和高血糖、高胰岛素引起的胰岛素失敏相仿^[9]。

然而研究发现, 人类血清中有近千种 miRNA, 其性质稳定, 易于检测, 有着疾病特异性, 可作为分子生物标志物有效地预测肿瘤等发病及预后^[10]。血清中 miR-29A 和 miR-222 表达水平较高的女性患 GDM 的危险显著降低, 血清 miR-29A 和 miR-222 可作为非侵入性生物标志物预测 GDM 的发展^[11]。在本研究中, GDM 患者血浆 FINS 水平明显低于正常妊娠妇女, 提示在 GDM 发生发展过程中, 胰岛 β 细胞功能下降, 导致胰岛素分泌减少, 但是何种机制导致 GDM 患者胰岛 β 细胞功能下降, 目前尚未得到证实。miRNA 参与糖尿病、乃至糖尿病肾病等慢性

并发症的发生发展已得到广泛证实,可通过影响胰岛素分泌、胰岛素抵抗、胰岛 β 细胞凋亡等来发挥这一作用^[12],但在GDM中的作用,至今尚未见报道。本研究发现,GDM患者外周血中有两种新的miRNA异常表达,即miR-29低表达及miR-375高表达,推测低水平的miR-29可能通过抑制胰岛 β 细胞的分化、成熟,进而影响胰岛素分泌功能,而高水平的miR-375则可能促进胰岛 β 细胞凋亡,两者相互作用,进而促成GDM患者胰岛 β 细胞数量及功能受限,导致GDM的发生发展,但其究竟是通过何种信号途径来发挥作用及靶基因的数量和功能尚未明了。与此同时,miR-29和miR-375的异常表达,是否由此提示其可用于GDM的诊治及筛查,均有待更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Schneider S, Bock C, Wetzel M, et al. The prevalence of gestational diabetes in advanced economies[J]. *J Perinat Med*, 2012, 40(5): 511-520
- [2] Lovis P, Gattesco S, Regazzi R. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs[J]. *Biol Chem*, 2008, 289(3): 305-312
- [3] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 妊娠合并糖尿病临床诊断与治疗推荐指南[J]. *中华妇产科杂志*, 2007, 42(6): 426-428
- [4] Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, et al. Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction[J]. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2728-2736
- [5] 袁俐, 姜声扬, 虞珏, 等. 雷米普利对2型糖尿病大鼠microRNA表达谱的影响[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(1): 45-49
- [6] Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, et al. Mir-375 maintains normal pancreatic alpha and beta-cell mass[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(14): 5813-5818
- [7] El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, et al. MiR-375 targets 3'-phosphoinositide dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta cells[J]. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2708-2717
- [8] He A, Zhu L, Gupta N, et al. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly upregulated in diabetes rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(1): 2785-2794
- [9] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 9(6): 654-659
- [10] 潘峰, 闻洋, 马士杰, 等. 血浆miRNA表达谱与胰腺癌的相关性研究[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(11): 1541-1544
- [11] Zhao C, Dong J, Jiang T, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): 23925-23935
- [12] Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, et al. MicroRNA-125a is overexpressed in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes[J]. *BMC Med Genomics*, 2009, 2(1): 54

[收稿日期] 2013-12-18

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
 审理情况。