

## 促炎性细胞因子对大鼠胰岛 $\beta$ 细胞 miR-29 家族及抗凋亡蛋白表达水平的影响

陈 玮,殷 荔,缪爱梅,倪世宁,朱子阳,刘倩琦\*

(南京医科大学附属南京儿童医院内分泌科,江苏 南京 210008)

**[摘要]** 目的:探讨促炎性细胞因子对胰岛 $\beta$ 细胞 miR-29 家族及抗凋亡蛋白水平的影响。方法:将大鼠胰岛细胞系 INS-1 细胞在加或不加促炎性细胞因子混合物(IL-1 $\beta$  10 ng/mL、TNF- $\alpha$  50 ng/mL、IFN- $\gamma$  50 ng/mL)的培养液中培养 24 h,设立对照组、促炎性细胞因子干预组。流式细胞仪测细胞凋亡,实时荧光定量 PCR 检测 INS-1 细胞 miR-29a/b/c 表达以及抗凋亡基因骨髓细胞白血病蛋白 1(myeloid cell leukemia 1, Mcl-1)mRNA、B 细胞淋巴瘤蛋白 2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2) mRNA 的表达水平,Western blot 技术检测 Mcl-1、Bcl-2 蛋白的表达情况。结果:①促炎性细胞因子干预的 INS-1 细胞 miR-29a/b 表达水平较正常对照组增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),miR-29c 表达水平较正常对照组有上升趋势,但无统计学差异( $P > 0.05$ );②促炎性细胞因子干预组 INS-1 细胞 Mcl-1 mRNA、Bcl-2 mRNA 表达水平较对照组减少,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );③促炎性细胞因子干预组 INS-1 细胞抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2 表达水平较正常对照组明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );④促炎性细胞因子干预组细胞凋亡率增高,与正常对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:促炎性细胞因子刺激处理的 INS-1 细胞 miR-29a/b 表达均上调,抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2 下调,凋亡率上升,推测促炎性细胞因子可能通过调节 miR-29 家族及抗凋亡蛋白的表达水平诱导胰岛  $\beta$  细胞凋亡,从而促进 1 型糖尿病的发生。

**[关键词]** 促炎性细胞因子;miR-29;抗凋亡蛋白;凋亡;1 型糖尿病

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)06-787-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150606

## Effects of pro-inflammatory cytokines on expression levels of miR-29 family and anti-apoptotic proteins in rat pancreatic $\beta$ cells

Chen Wei, Yin Li, Miao Aimei, Ni Shining, Zhu Ziyang, Liu Qianqi\*

(Department of Endocrinology, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of pro-inflammatory cytokines on expression levels of microRNA-29 (miR-29) family and anti-apoptotic proteins in rat islet  $\beta$  cells. **Methods:** INS-1 cells, which belong to rat islet cells, were incubated in the presence or absence of a pro-inflammatory cytokine mixture (IL-1 $\beta$  10 ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml and IFN- $\gamma$  50 ng/ml) for 24 h (the pro-inflammatory cytokine stimulated group and the control group). The function of INS-1 cells was evaluated by the glucose stimulating insulin releasing test. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expression levels of miR-29 family and myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) mRNA, B-cell lymphoma (Bcl-2) mRNA in INS-1 cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the protein expression levels of Mcl-1, Bcl-2 were detected by Western blot. **Results:** ①The miR-29a and miR-29b expression levels were significantly increased in INS-1 cells stimulated by pro-inflammatory cytokine mixture, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The expression level of miR-29c of the pro-inflammatory cytokine stimulated group was increased compared with the control group, but there was no statistical significance ( $P > 0.05$ ). ②The mRNA expression levels of Mcl-1 and Bcl-2 in the pro-inflammatory cytokine stimulated group were decreased with no statistical significance ( $P > 0.05$ ). ③In the pro-inflammatory cytokine stimulated group, the protein expression levels of Mcl-1 and Bcl-2 were downregulated, and the differences were statistically significant ( $P < 0.01$ ). ④Pro-inflammatory cytokine mixture stimulated INS-1 cells led to a significant increase in cell death, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Pro-inflammatory cytokines may downregulate the expressions of Mcl-1 and Bcl-2 through overexpressing miR-29 family, and then impact on apoptosis in pancreatic  $\beta$  cells, thereby trigger type 1 diabetes mellitus.

**[基金项目]** 南京市医药卫生科研课题(YKK12106)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: 18951769617@163.com

[Key words] pro-inflammatory cytokines; miR-29; antiapoptotic proteins; apoptosis; type1 diabete

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06): 787-792]

1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)以自身免疫性损伤引起胰岛 $\beta$ 细胞破坏导致胰岛素绝对缺乏为特征,在儿童及青少年中多见。T1DM的发生可能与某些原因所致的胰岛 $\beta$ 细胞凋亡异常增多有关<sup>[1]</sup>。研究表明促炎性细胞因子是T1DM胰岛 $\beta$ 细胞死亡的中介<sup>[2]</sup>。miRNAs是一类内源性非蛋白编码的长度约为20~25核苷酸的小分子RNA,主要通过结合靶基因mRNA的3'非翻译区(3'UTR)在转录后水平抑制转录或降解靶mRNA来对基因进行负性调控<sup>[3]</sup>。miRNAs在所有细胞中都能表达,并且参与细胞基本生命过程,如细胞分化、凋亡、增殖、死亡<sup>[4]</sup>,有关miRNA在胰腺发育、胰岛 $\beta$ 细胞功能、糖尿病发生中的作用近年亦有报道<sup>[5-6]</sup>。研究显示,miR-29与糖尿病及其并发症有密切关系<sup>[7-9]</sup>。本研究通过检测促炎性细胞因子刺激的胰岛细胞系INS-1细胞中miR-29的表达水平及抗凋亡蛋白Mcl-1、Bcl-2的表达,探讨促炎性细胞因子对miR-29及胰岛细胞凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

RPMI-1640培养基、胎牛血清、青-链霉素、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液、0.25%胰蛋白酶(Gibco公司,美国),二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、 $\beta$ -巯基乙醇、丙酮酸钠(Sigma公司,美国),IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ (Peprotech公司,美国)。INS-1细胞株为南京医科大学遗传代谢性疾病实验室所赠。流式凋亡检测试剂盒(BD公司,美国)。TRIzol(TaKaRa公司,日本)。Lipofectamine™ 2000、逆转录试剂盒TaqMan MicroRNA RT Kits、qPCR检测试剂盒TaqMan Universal Master Mix II、mRNA逆转录试剂盒High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits及mRNA qPCR检测试剂盒SYBR Select Master Mix PCR(Life Technologies公司,美国)。总蛋白提取试剂盒(南京凯基公司),BCA蛋白定量试剂盒、蛋白Marker(杭州碧云天公司),兔抗鼠Mcl-1单克隆抗体、兔抗鼠Bcl-2单克隆抗体、山羊抗兔-HRP抗体(Bioworld公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

INS-1细胞的培养液为改良RPMI-1640(含有10%胎牛血清、11.1 mmol/L葡萄糖及谷氨酰胺、50  $\mu$ mol/L  $\beta$ -巯基乙醇、0.11 g/L丙酮酸钠、1 mol/L HEPES、100 U/ml青霉素、100  $\mu$ g/ml链霉素)<sup>[10]</sup>,细胞贴壁生长,隔天换液,每5 d 1:3传代。

#### 1.2.2 细胞因子干预

INS-1细胞生长到对数生长期时,胰酶消化,培养液稀释,然后离心收集细胞,种植在6孔板中,每孔2 mL,密度为 $5 \times 10^5$ 个/mL,培养过夜;培养基中加或不加入促炎性细胞因子混合物(IL-1 $\beta$  10 ng/mL、TNF- $\alpha$  50 ng/mL、IFN- $\gamma$  50 ng/mL),37 $^{\circ}$ C培养箱培养24 h后,移出培养液,设立空白对照组、促炎性细胞因子诱导组,用于检测细胞凋亡、miR-29a-c,以及抗凋亡相关蛋白Mcl-1、Bcl-2的mRNA及蛋白水平表达。

#### 1.2.3 凋亡检测

经上述分组处理24 h后,取两组细胞,吸上清液于离心管中,PBS冲洗,用不含EDTA的0.25%胰酶消化2 min,当细胞从6孔板底脱落,立即加入1 mL培养液终止消化,用吸管反复轻柔吹打,使细胞分散成细胞悬液,1 000 r/min离心10 min,按流式检测试剂盒说明书处理细胞后流式细胞仪分析细胞凋亡。

#### 1.2.4 实时荧光定量PCR检测细胞内miR-29a-c、Mcl-1 mRNA和Bcl-2 mRNA表达

细胞经上述处理24 h后,按照TRIzol说明书抽提总RNA,miRNA逆转录依据TaqMan MicroRNA RT Kit说明书冰上配制反转录体系,合成cDNA第一链,之后按照TaqMan Universal Master Mix II说明书在ABI 7500进行实时荧光定量-PCR:20  $\mu$ L反应体系(10  $\mu$ L Mix II,1  $\mu$ L 20 $\times$ miR-29探针,模板1.33  $\mu$ L)进行PCR扩增,95 $^{\circ}$ C预变性10 min后进入循环:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min(同时检测荧光),40个循环后在72 $^{\circ}$ C延伸10 min,同时用7500 Software v2.0.1软件收集数据。以U6snRNA为内参。mRNA逆转录按照High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits逆转录试剂盒进行,合成cDNA第一链,后按照SYBR Select Master Mix PCR试剂盒说明书在ABI 7500进行实时荧光定量PCR:20  $\mu$ L反应体系(10  $\mu$ L Mixture,10  $\mu$ mol/L引物,模板1.5  $\mu$ L),进行PCR扩增,95 $^{\circ}$ C预变性2 min后进入循环:循环

程序同上。以  $\beta$ -actin 为内参。根据 qRT-PCR 扩增曲线,由 7500 Software v2.0.1 软件得到每个 PCR 循环反应的阈值(cyclethreshold, Ct),即模板 cDNA 扩增达到某一荧光强度的循环次数。目的基因相对于内参基因的表达用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算和标准化。实验重复 3 次。引物序列见表 1,均由美国 Life Technologies 公司合成。

表 1 PCR 检测基因的引物序列

基因名称	产物大小(bp)	引物序列(5'→3')
$\beta$ -actin	211	正义:CCTCTATGCCAACACAGTGC 反义:GTACTCCTGCTTGCTGATCC
Mcl-1	183	正义:TTCCTCCCTGTGCTCTTCAC 反义:CAATCCCTGGTCACTGTGG
Bcl-2	157	正义:GAGAGAACAGGAGAGCCAGA 反义:GGATAGCAGCACAGGGTTTC

### 1.2.5 Western blot 检测 Mcl-1、Bcl-2 蛋白表达水平

按总蛋白提取试剂盒说明书提取 INS-1 细胞总蛋白,预冷 PBS 洗 2 遍,每孔加 60  $\mu$ L 裂解液,冰浴 30 min,细胞刮收集样本,4 $^{\circ}$ C 16 000 r/min 离心 15 min,取上清,以 BCA 法检测所提取蛋白浓度。取 20  $\mu$ L 煮沸后的蛋白样本经 10%SDS-PAGE 凝胶电

泳后,电转移到硝酸纤维素(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉溶液封闭 1 h 后,加入相应的 1:1 000 稀释的兔抗鼠 Mcl-1、Bcl-2 单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜后,加入 1:2 000 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,室温作用 1 h,TBST 洗膜后,ECL 曝光,显影,摄片。

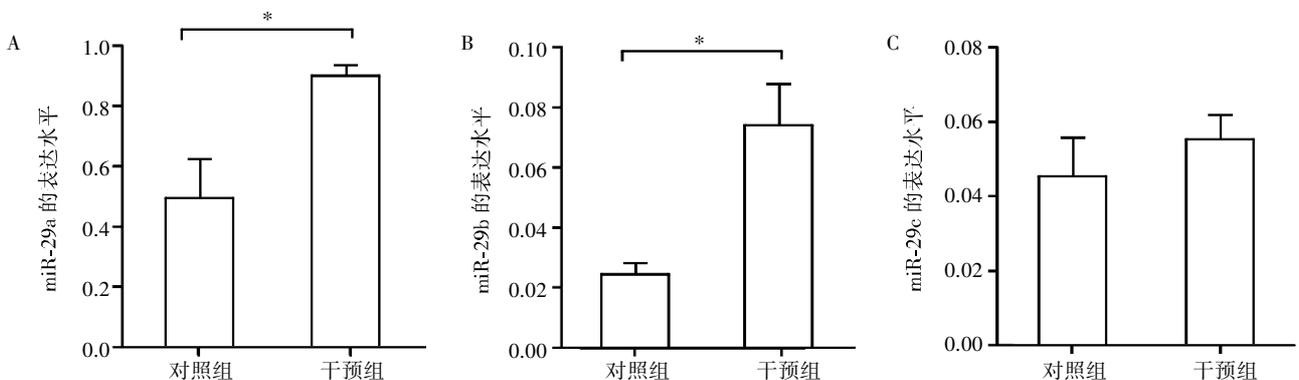
### 1.3 统计学方法

所有数据均采用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理分析,实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组数据间比较采用独立样本  $t$  检验。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组 INS-1 细胞的 miR-29a/b/c 表达水平

应用实时荧光定量 PCR 技术检测实验组以及对照组 INS-1 细胞中 miR-29 家族的相对表达量,每组设立 6 个复孔,实验重复 3 次。结果显示,促炎性细胞因子干预组 INS-1 细胞 miR-29a 的表达水平较正常对照组增加,差异有统计学意义( $P < 0.05, n = 6$ ,图 1A),miR-29b 表达水平较正常对照组增加,差异有统计学意义( $P < 0.05, n = 6$ ,图 1B);miR-29c 表达水平较正常对照组有上升趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05, n = 6$ ,图 1C)。



A: 两组 miR-29a 表达水平,与对照组比较, \* $P < 0.05 (n = 6)$ ; B: 两组 miR-29b 表达水平,与对照组比较, \* $P < 0.05 (n = 6)$ ; C: 两组 miR-29c 表达水平( $n = 6$ )。

图 1 两组 INS-1 细胞 miR-29a/b/c 的表达水平

Figure 1 The expression levels of miR-29a/b/c in INS-1 cells of the two groups

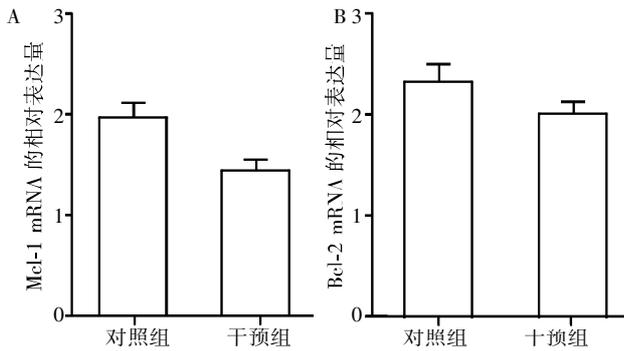
### 2.2 两组 INS-1 细胞 Mcl-1 mRNA、Bcl-2 mRNA 表达水平

应用实时荧光定量 PCR 技术检测实验组和对照组 INS-1 细胞中抗凋亡基因 Mcl-1 以及 Bcl-2 的相对表达量,每组设立 6 个复孔,实验重复 3 次。结果显示,促炎性细胞因子干预组 INS-1 细胞 Mcl-1 mRNA 以及 Bcl-2 mRNA 的表达水平较对照组有减少趋势,但差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ,

$n = 6$ ,图 2)。

### 2.3 两组 INS-1 细胞 Mcl-1、Bcl-2 蛋白表达水平

Western blot 法检测两组细胞中抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 Bcl-2 的相对表达量,以 GAPDH 为内参,设立 2 个电泳复孔,实验重复 3 次。结果显示,与对照组比较,促炎性细胞因子干预组 Mcl-1 及 Bcl-2 的表达量均明显减低,差异有统计学意义( $P < 0.01, n = 3$ ,图 3)。



A: 两组 Mcl-1 mRNA 表达水平 ( $n = 6$ ); B: 两组 Bcl-2 mRNA 表达水平 ( $n = 6$ )。

图2 两组 INS-1 细胞 Mcl-1、Bcl-2 mRNA 表达水平

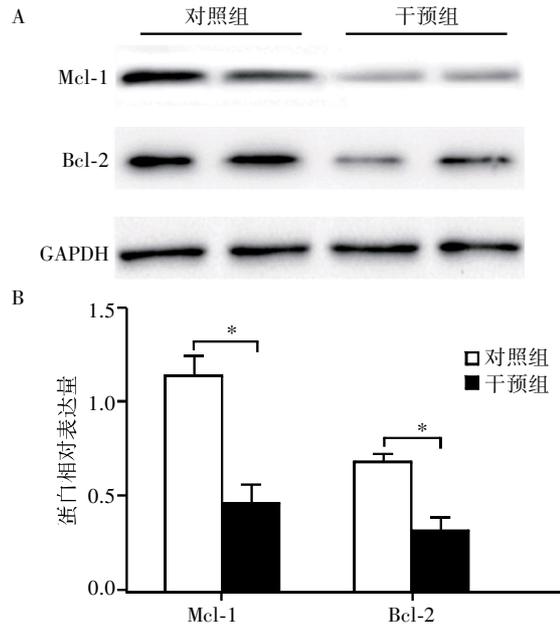
Figure 2 The mRNA expression levels of Mcl-1 and Bcl-2 in INS-1 cells of the two groups

### 2.4 两组 INS-1 细胞凋亡率比较

利用流式细胞仪检测两组细胞凋亡率, 每组细胞设立 6 个复孔, 实验重复 3 次。促炎性细胞因子干预组 INS-1 细胞凋亡率为  $(20.47 \pm 4.39)\%$ , 对照组细胞凋亡率为  $(8.32 \pm 1.34)\%$ 。与对照组相比, 干预组细胞凋亡率明显升高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05, n = 6$ , 图 4)。

## 3 讨论

遗传易感性和环境因素等共同作用导致胰岛  $\beta$  细胞凋亡, 形态和功能的破坏, 最终胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素的能力逐渐下降, 直至完全失去分泌功能, 造成胰岛素的绝对缺乏, 从而形成 T1DM。T1DM 的发病与自身免疫机制有关, 自身免疫 T 细胞介导的胰岛  $\beta$  细胞凋亡在 T1DM 发病中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。T1DM 患者的功能性胰岛细胞都存在不同程度的炎症破坏和自身免疫 T 细胞及单核细胞的浸润。大量证据表明细胞凋亡是 T1DM 胰岛  $\beta$  细胞死亡

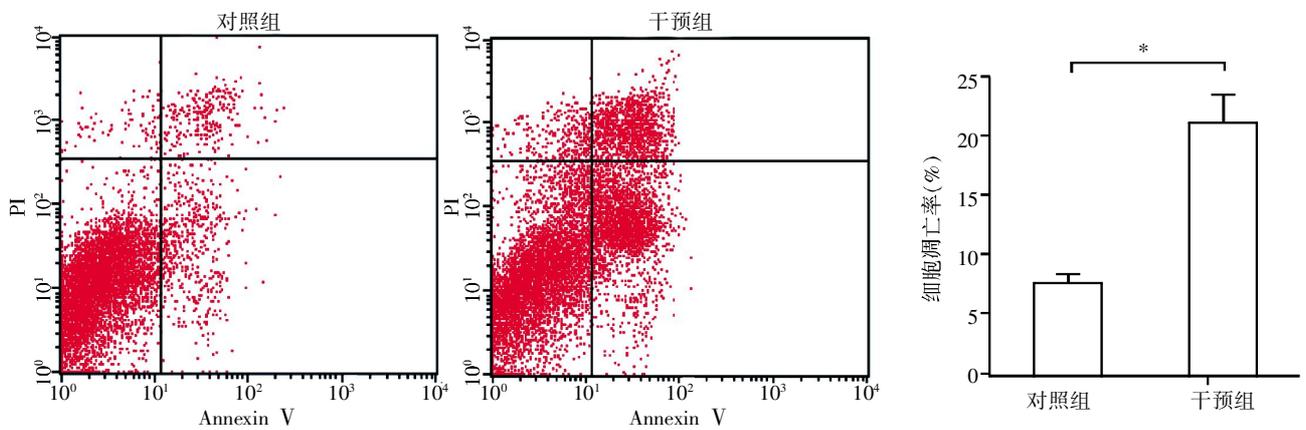


A: Western blot 检测结果; B: 定量放射密度测定法蛋白定量分析结果, 与对照组比较,  $*P < 0.01 (n = 3)$ 。

图3 Western blot 检测对照组和促炎性细胞因子干预组 INS-1 细胞的 Mcl-1、Bcl-2 的蛋白表达水平

Figure 3 The protein expression levels of Mcl-1 and Bcl-2 of the pro-inflammatory cytokine stimulated group and the control group

的主要形式, 这是由于胰岛  $\beta$  细胞特殊的显型导致其对凋亡性刺激特别敏感<sup>[12]</sup>。T 细胞非特异性免疫反应产生的 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  等细胞因子通过一氧化氮 (nitrogen monoxide, NO) 介导使胰岛  $\beta$  细胞发生凋亡, 在 T1DM 胰岛  $\beta$  细胞最初的破坏中起着重要作用<sup>[13-14]</sup>。促炎性细胞因子致胰岛  $\beta$  细胞凋亡的具体机制目前尚不明确。有研究表明其可能通过催化 NO 合成<sup>[15]</sup>、诱导 FAS/FASL 系统活化<sup>[16]</sup>、促进氧自由基的合成<sup>[17]</sup>诱导胰岛细胞凋亡, 而有关促炎性细胞因



与对照组比较,  $*P < 0.05 (n=6)$ 。

图4 对照组及促炎性细胞因子干预组细胞凋亡率的变化

Figure 4 The effect of pro-inflammatory cytokines on apoptosis of INS-1 cells

子影响胰岛 β 细胞 miRNA 表达水平、诱导凋亡方面的研究甚少。

近年来,miRNA 的作用引人注目。miRNA 在所有细胞中都能表达,并且参与细胞基本生命过程,如细胞分化、凋亡、增殖、死亡等,在内分泌代谢性疾病的发生、发展中起重要作用。研究发现参与 T1DM 发生、胰岛 β 细胞凋亡及胰岛素合成分泌有关的 miRNA 有 miR-21<sup>[18]</sup>、miR-146<sup>[19]</sup>、miR-375<sup>[20]</sup>、miR-25<sup>[21]</sup>等。而 miR-29 家族与糖尿病相关的研究较少,近来 Roggli 等<sup>[22]</sup>在糖尿病前期 NOD 鼠胰腺组织中发现 miR-29a/b/c 水平增高,miR-29a/b/c 高表达的 MIN6 细胞及分离的胰岛细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌(glucose stimulated insulin secretion, GSIS)减低,转录因子 Onecut2 水平降低,β 细胞胰岛素分泌抑制剂水平增高,miR-29 水平与 T1DM 初级阶段促炎性细胞因子诱导的 β 细胞功能紊乱有关。He<sup>[23]</sup>、Pandey<sup>[24]</sup>等发现在糖尿病鼠的效应器官组织(如肌肉、

肝脏、脂肪等)中 miR-29 表达上调,故推测 miR-29 与糖尿病的发生亦相关。

已知 miRNA 通过对下游靶基因蛋白表达水平的调控行使其生物学功能,目前研究表明它们常通过识别并结合靶基因 3'UTR 上的位点,起到降解靶 mRNA 或抑制靶基因翻译的作用。本研究利用 miRBase、TargetScan 5.2 及 Pictar 程序预测了 miR-29 可能的靶基因,结果发现大鼠 miR-29b 开始的 9 个碱基与 Mcl-1 的 3'UTR 的碱基完全互补配对(表 2),miR-29a 开始的部分碱基与 Mcl-1 的 3'UTR 的碱基亦完全互补配对(表 3),而 miR-29 家族之间的前 9 个碱基基本相同<sup>[25]</sup>(表 4),结合 miRNA 的作用原理,我们推测 Mcl-1 可能是 miR-29 的靶基因之一。Mcl-1 是 Bcl-2 蛋白家族(Bcl-2、Bcl-2a1、Bcl-xl、Mcl-1、Bim 等)的抗凋亡成员,Allaghat 等<sup>[26]</sup>发现在促炎性细胞因子诱导的胰岛 β 细胞凋亡的早期即发生 Mcl-1 的下调,早于其他抗凋亡因子如

表 2 大鼠 miR-29b 靶基因的生物信息学预测

Table 2 The putative miR-29b binding site derived from the Mcl-1 3'UTR

名称	序列
rno-miR-29b	3'UUGUGACUAAAGUUUACCCACGAU5'
Mcl-1 3' UTR 2152~2179 位点	5'GCUAGAGUCUUAACCAUGGUGCUAUUCA3'

表 3 大鼠 miR-29a 靶基因的生物信息学预测

Table 3 The putative rno-miR-29a binding site derived from the Mcl-1 3'UTR

名称	序列
rno-miR-29a	3'AUUGGCUA-AAGU-CUACCCACGAU 5'
Mcl-1 3' UTR 951~974 位点	5'AGACTAATCTTTACCACGGTGCTA 3'

表 4 大鼠 miR-29 的序列

Table 4 The sequence of miR-29

miRNA 名称	保守序列(5'→3')
rno-mir-29a	54-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-75
rno-mir-29b	52-UAGCACCAUUGAAAUCAGUGUU-74
rno-mir-29c	54-UAGCACCAUUGAAAUCGGUUA-75

Bcl-2 和 Bcl-xl, Mcl-1 可能是连接 miR-29 和细胞凋亡的重要因子。

本研究通过促炎性细胞因子混合物(IL-1β 10 ng/mL、TNF-α 50 ng/mL、IFN-γ 50 ng/mL)刺激大鼠胰岛细胞系 INS-1 细胞,发现与对照组相比,miR-29a/b 表达水平明显增高,Mcl-1 mRNA、Bcl-2 mRNA 表达水平有减少趋势,虽然无统计学意义,但 Mcl-1、Bcl-2 蛋白表达水平明显下调,细胞凋亡率增高。故细胞因子可能通过上调 miR-29a/b,作用于

Mcl-1 mRNA 的 3'UTR,在转录后水平抑制其蛋白表达,导致胰岛 β 细胞凋亡增多而引起胰岛 β 细胞数量减少,以致胰岛素分泌减少,从而促进 T1DM 的发生。

促炎性细胞因子在 T1DM 的发生发展中发挥重要作用,而 miRNA 几乎参与一切重要生命活动和大多数疾病的发病过程<sup>[27]</sup>,研究二者之间的相互作用及 miR-29 在糖尿病胰岛细胞中的异常表达对了解糖尿病发生的可能机制及治疗途径有重要意义,本研究结果为发现干预糖尿病的新靶点提供了依据。未来需进一步验证 miR-29 与 Mcl-1 之间的分子作用机制,如抑制 miR-29 表达以检测其对 Mcl-1 表达水平的影响,以证明其间的相互作用,阐明诱导凋亡的具体途径,为 T1DM 的防治提供线索和靶标。

## [参考文献]

- [1] Krijnen PA, Simsek S, Niessen HW. Apoptosis in diabetes [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(12): 1387–1388
- [2] Grunnet LG, Mandrup-Poulsen T. Cytokines and type 1 diabetes: a numbers game [J]. *Diabetes*, 2011, 60(3): 697–699
- [3] Chavali S, Bruhn S, Tiemann K, et al. MicroRNAs act complementarily to regulate disease-related mRNA modules in human diseases [J]. *RNA*, 2013, 19(11): 1552–1562
- [4] Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis [J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(Suppl): R40–R44
- [5] Mao Y, Mohan R, Zhang S, et al. MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes [J]. *Pharmacol Res*, 2013, 75(1): 37–47
- [6] Fernandez-Valverde SL, Taft RJ, Mattick JS. MicroRNAs in beta-cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications [J]. *Diabetes*, 2011, 60(7): 1825–1831
- [7] He A, Zhu L, Gupta N, et al. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(11): 2785–2794
- [8] Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, et al. MicroRNA-125a is over-expressed in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes [J]. *Bmc Med Genomics*, 2009, 2(1): 54
- [9] Pandey AK, Verma G, Vig S, et al. miR-29a levels are elevated in the db/db mice liver and its overexpression leads to attenuation of insulin action on PEPCK gene expression in HepG2 cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 332(1-2): 125–133
- [10] Gjoni E, Brioschi L, Cinque A, et al. Glucolipototoxicity impairs ceramide flow from the endoplasmic reticulum to the golgi apparatus in INS-1 beta-cells [J]. *Plos One*, 2014, 9(10): e110875
- [11] Kikodze N, Pantsulaia I, Rekhviashvili K, et al. Cytokines and T regulatory cells in the pathogenesis of type 1 diabetes [J]. *Georgian Med News*, 2013(222): 29–35
- [12] Tunali M, Ataoglu T, Celik I. Apoptosis: an underlying factor for accelerated periodontal disease associated with diabetes in rats [J]. *Clin Oral Investig*, 2014, 18(7): 1825–1833
- [13] Pflieger C, Schloot NC, Brendel MD, et al. Circulating cytokines are associated with human islet graft function in type 1 diabetes [J]. *Clin Immunol*, 2011, 138(2): 154–161
- [14] Xiao J, Li J, Cai L, et al. Cytokines and diabetes research [J]. *J Diabetes Res*, 2014, 2014: 920613
- [15] Lee SH, Kang SM, Ko SC, et al. Octaphloretol A, a novel phenolic compound isolated from *Ishige foliacea*, protects against streptozotocin-induced pancreatic beta cell damage by reducing oxidative stress and apoptosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59: 643–649
- [16] Hamad AR, Arcara K, Uddin S, et al. The potential of Fas ligand (apoptosis-inducing molecule) as an unconventional therapeutic target in type 1 diabetes [J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 196
- [17] Lopez-Lopez JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, et al. Type 1 diabetes-induced hyper-responsiveness to 5-hydroxytryptamine in rat pulmonary arteries via oxidative stress and induction of cyclooxygenase-2 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 338(1): 400–407
- [18] Zhong X, Chung AC, Chen HY, et al. miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2013, 56(3): 663–674
- [19] Yang M, Ye L, Wang B, et al. Decreased miR-146 expression in peripheral blood mononuclear cells is correlated with ongoing islet autoimmunity in type 1 diabetes patients [J]. *J Diabetes*, 2015, 7(2): 158–165
- [20] Li X. MiR-375, a microRNA related to diabetes [J]. *Gene*, 2014, 533(1): 1–4
- [21] Nielsen LB, Wang C, Sorensen K, et al. Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 896362
- [22] Roggli E, Gattesco S, Caille D, et al. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic beta-cell dysfunction in prediabetic NOD mice [J]. *Diabetes*, 2012, 61(7): 1742–1751
- [23] He A, Zhu L, Gupta N, et al. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(11): 2785–2794
- [24] Pandey AK, Verma G, Vig S, et al. miR-29a levels are elevated in the db/db mice liver and its overexpression leads to attenuation of insulin action on PEPCK gene expression in HepG2 cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 332(1-2): 125–133
- [25] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis [J]. *Oncogene*, 2007, 26(42): 6133–6140
- [26] Allagnat F, Cunha D, Moore F, et al. Mcl-1 downregulation by pro-inflammatory cytokines and palmitate is an early event contributing to beta-cell apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(2): 328–337
- [27] Nicolas FE, Lopez-Martinez AF. MicroRNAs in human diseases [J]. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 2010, 4(3): 142–154