

## 非增殖性糖尿病视网膜病变患者血清 miR-29c 的表达及相关分析

吴心池<sup>1</sup>, 王尧<sup>2\*</sup>, 唐伟<sup>1</sup>, 朱琳<sup>1</sup>, 高远<sup>1</sup>

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

**[摘要]** 目的: 观察微小 RNA-29c(miR-29c)在非增殖性糖尿病视网膜病变(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)患者血清中的表达水平, 探讨其在糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)发病机制中的作用。方法: 选择 2 型糖尿病 NPDR 患者及无视网膜病变(non-diabetic retinopathy, NDR)患者各 30 例。收集血清样本, 应用荧光定量 PCR 方法检测血清 miR-29c 的相对表达水平。应用 PicTar、TargetScan 与 MiRanda 软件综合预测 miR-29c 的靶基因, 取三款软件的交集作为最终靶基因。结果: miR-29c 在 NPDR 患者血清中的表达量明显高于 NDR 组( $P < 0.05$ ), 其表达量与 HbA1c 呈显著正相关( $r=0.379, P < 0.05$ )。预测 miR-29c 靶基因集合富集在磷酸肌醇代谢、细胞因子及受体的相互作用、细胞外基质与受体信号作用通路中。结论: NPDR 患者血清 miR-29c 表达显著上调, miR-29c 可能通过调控细胞因子的相互作用、磷酸肌醇代谢等途径参与 DR 的发生发展。

**[关键词]** 微小 RNA-29c; 糖尿病视网膜病变; 血清

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)10-1401-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20151014

## Expression of serum miR-29c and its correlation analysis in patients with non-proliferative diabetic retinopathy

Wu Xinchu<sup>1</sup>, Wang Yao<sup>2\*</sup>, Tang Wei<sup>1</sup>, Zhu Lin<sup>1</sup>, Gao Yuan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Endocrinology, Jiangyin People's Hospital Affiliated to Southeast University, Jiangyin 214400;

<sup>2</sup>Department of Endocrinology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of serum miR-29c in the patients with non-proliferating diabetic retinopathy (NPDR) and explore the role of miR-29c in diabetic retinopathy (DR). **Methods:** Patients with NPDR ( $n=30$ ) and without DR ( $n=30$ ) were enrolled. Total RNAs including miRNA was extracted from serum samples. The levels of miR-29c were detected by quantitative Real-time PCR. PicTar, TargetScan and MiRanda were performed to comprehensively predict target genes of miR-29c, and the intersection of the three softwares was set as the final target genes. **Results:** The expression of serum miR-29c was significantly elevated in the NPDR group than that in the NDR group ( $P < 0.05$ ). Positive correlation between miR-29c expression and HbA1c level ( $r=0.379, P < 0.05$ ) was observed. The target genes of miR-29c were significantly enriched in inositol phosphate metabolism, interaction between cytokine and cytokine receptor, and ECM and receptor. **Conclusion:** The serum levels of miR-29c were significantly increased in the NPDR group. MiR-29c may play an important role in pathogenesis of DR by regulating cytokines interaction and inositol phosphate metabolism.

**[Key words]** microRNA; diabetic retinopathy; serum

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1401-1404]

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性非编码单链小分子 RNA, 主要通过翻译抑制或对靶 mRNA 的降解, 参与机体几乎所有生理、病理过程, 如细胞的生长、发育、增殖、分化和凋亡等<sup>[1]</sup>。研

究表明, 循环 miRNA 不仅能稳定存在, 还可随血液循环到达远隔器官和组织, 继而影响其功能, 是一种新的细胞-细胞之间相互作用的方式<sup>[2]</sup>。目前关于微小 RNA 与糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的研究已有报道。我们检索相关文献, 发现视网膜病变、miRNA-29(miR-29)与 DR 发病密切相关, 但 miR-29c 在 DR 患者血清中的表达

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81370920)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wang-ya0100@163.com

尚未有报道。结合前期芯片检测结果,本研究采用定量 PCR 检测 miR-29c 在非增殖性糖尿病视网膜病变 (non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR) 患者血清中的表达情况,分析其表达量与血糖血脂相关性,并探讨其在 DR 发病机制中的作用。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

收集 2014 年 5 月至 2015 年 5 月在东南大学医学院附属江阴医院内分泌科住院的 2 型糖尿病 (T2DM) 患者纳入研究。所有入组患者排除:①合并酮症酸中毒、急慢性感染、肝肾疾病、风湿结缔组织病、心脑血管病、周围血管病变及肿瘤患者;②合并白内障、青光眼等其他眼部疾患的患者。由同一眼科医师检查眼底并行荧光素眼底血管造影检查 (FFA)。根据 FFA 结果将患者分为糖尿病无视网膜病变组 (NDR 组);男 12 例,女 18 例,年龄 45~70 岁,平均(59 ± 7)岁,糖尿病视网膜病变非增殖期组 (NPDR 组),男 11 例,女 19 例,年龄 46~73 岁,平均(58 ± 8)岁。两组患者年龄、性别、BMI 等一般资料匹配。本研究得到江阴市人民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。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 血样制备

无抗凝剂干燥试管采取空腹静脉血 5 mL,30 min 内高速离心分离(4 000 r/min 离心 10 min 后 12 000 r/min 离心 15 min),取上清分装于 EP 管中,-80℃保存。

#### 1.2.2 一般资料和生化检测

专人测量患者的血压,并测身高、体重,计算体重指数(BMI)。空腹 10 h 后,用真空采血管抽取肘静脉血,全自动生化分析仪测定甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、肾功能(BUN、CR)、肝功能(AST、ALT)、空腹血糖(FPG)。留隔夜晨尿检测尿

微量白蛋白(U-ALB)。糖化血红蛋白(HbA1c)采用高效液相色谱法测定。动脉硬化检测装置(BP-203RPEIII,OMRON 公司,日本)测踝肱指数(ABI)、脉搏波传导速度(PWV)。

#### 1.2.3 总 miRNA 提取

采用 Plasma/Serum Exosome Kit (Norgen, 42800, 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℃保存备用。

#### 1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测

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。SYBR Premix Ex Taq II、dNTP、RNase Inhibitor、M-MLV (TaKaRa 公司,日本)。反应条件:70℃ 10 min,42℃ 60 min,70℃ 15 min。所得 cDNA -20℃保存备用。定量 PCR 反应体系 20 μL,包括:SYBR Premix Ex Taq II 10.0 μL,ROX 0.4 μL,ddH<sub>2</sub>O 8.3 μL,Primer mix (10 μmol/L)0.8 μL,RT product 0.5 μL。循环条件:95℃ 2 min;95℃ 5 s;60℃ 30 s,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-29c 的相对表达量用  $2^{-\Delta Cq}$  表示, $\Delta Cq = Cq_{miR29c} - Cq_{miR16}$ 。

### 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,其中不符合正态分布者选用两独立样本比较的 Mann-Whitney U 检验。计量资料组间比较采用独立样本 t 检验,计数资料采用卡方检验。相关性检验采用 Pearson 相关分析。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

两组间的年龄、性别、BMI、糖尿病病程、血压、

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

miRNA	引物类型	引物序列(5'→3')
miR-29c	逆转录	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACTAACCG
	上游	CCAGCGTGTAGCACCATT
	下游	AGCAGGGTCCGAGGTATT
miR-16	逆转录	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCGCCAA
	上游	TGGCGTAGCAGCACGTAAT
	下游	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT

U-ALB、FBG、ABI、PWV 相比差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), NPDR 组的 TG、TC、HbA1c 明显高于 NDR 组 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

### 2.2 实时荧光定量 PCR 结果

两组血清 miR-29c 均表现为特异性扩增, Cq 值小于 35, 溶解曲线均为单峰。NPDR 患者血清中 miR-29c 的表达量明显上调, 与 NDR 组相比差异有统计学意义 ( $Z$  值为: -4.45, 双侧  $P$  均  $< 0.05$ , 图 1)。

### 2.3 血清 miR-29c 的表达量与血糖、血脂等的相关性分析

所有研究对象 ( $n=60$  例) 中的相关性分析显示, 血清 miR-29c 的相对表达量与 TG、TC、HDL-C、LDL-C、FBG 皆无显著相关性 ( $P > 0.05$ ), 与 HbA1c 值显著正相关 ( $r=0.379, P < 0.01$ ), 显示随 HbA1c 升高, 血清 miR-29c 的表达量显著增加 (表 3)。

表 2 研究对象的基本资料

Table 2 Clinical characteristics of study population ( $\bar{x} \pm s$ )

临床资料	NPDR 组	NDR 组	$P$ 值
年龄 (岁)	58.20 ± 8.43	58.63 ± 7.40	0.83
性别 (男/女)	11/19	12/18	0.07
病程 (年)	10.27 ± 3.25	10.53 ± 2.90	0.74
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.88 ± 2.11	22.73 ± 4.15	0.18
SBP (mmHg)	139.90 ± 17.82	134.93 ± 14.22	0.24
DBP (mmHg)	82.13 ± 8.87	82.20 ± 9.73	0.98
TG (mmol/L)	2.31 ± 1.50	1.53 ± 0.90	0.02
TC (mmol/L)	5.40 ± 1.23	4.62 ± 0.99	0.01
LDL-C (mmol/L)	1.81 ± 0.65	2.20 ± 2.65	0.43
HDL-C (mmol/L)	1.41 ± 0.23	1.40 ± 0.27	0.82
HbA1c (%)	9.41 ± 1.60	8.52 ± 0.91	0.01
U-ALB (mg/L)	77.10 ± 66.01	53.79 ± 64.44	0.17
FBG (mmol/L)	9.45 ± 3.70	9.95 ± 3.39	0.59
ABI (左)	1.10 ± 0.10	1.09 ± 0.09	0.67
ABI (右)	1.11 ± 0.11	1.08 ± 0.10	0.62
PWV (左) (cm/s)	1 636.13 ± 248.27	1 565.47 ± 208.47	0.24
PWV (右) (cm/s)	1 624.40 ± 243.16	1 556.40 ± 256.31	0.30

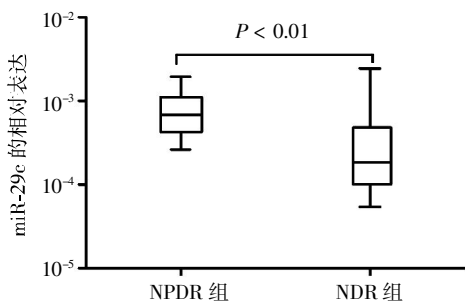


图 1 两组血清 miR-29c 表达水平比较

Figure 1 Comparison of relative expression of serum miR-29c between the NPDR and the NDR group

### 2.4 生物信息学分析

应用互联网 miRNA 靶基因预测软件 Pictar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>)、Targetscan (<http://www.targetscan.org/>)、MiRanda (<http://www.microna.org/>) 在线服务站点搜索 miR-29c 的预测靶基因。发现 miR-29c 预测靶基因集合显著富集在磷酸肌醇代谢、细胞因子及受体的相互作用、趋化因子信号转导通路、细胞外基质与受体信号作用通路等 (表 4)。

表 3 血清 miR-29c 的相对表达量与 HbA1c、血脂的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of relative expression of serum miR-29c and hemoglobinA1c, lipid profile

	TG	TC	LDL-C	HDL-C	HbA1c	FBG	
miR-29c 的 $r$ 值	0.127	0.040	-0.003	0.036	0.379	0.066	
$2^{-\Delta Cq}$ 值	$P$ 值	0.359	0.775	0.984	0.798	0.005	0.635

表 4 miR-29c 调控的靶基因及相关信号通路预测

Table 4 Prediction of target genes and signaling pathways regulated by miR-29c

靶基因	信号通路
PIK3CA	磷酸肌醇代谢
AKT2、PIK3CA	Erb 信号通路
TNFSF4、PIK3CA、IL11、20、18R1	细胞因子及受体的相互作用
AKT2、ADCY5、CXCL5	趋化因子信号转导通路
COL6A3、LAMA2	细胞外基质受体相互作用
AKT2、PRKCI、CASK	紧密连接
AKT2、PIK3CA、IL20、IL11	JAK-STAT 信号通路
CLDN1、PIK3CA	白细胞跨内皮迁移
AKT2、PIK3CA、PRKCI、TSC1	胰岛素信号通路
AKT2、PIK3CA	神经营养因子信号通路

### 3 讨论

DR 是糖尿病 (DM) 最为常见和严重的微血管并发症之一, 初诊断 T2DM 的患者 DR 发生率就可达 12.4%, 病程 15 年或更长者视网膜病变的危险性达 78%<sup>[3]</sup>, 在发达国家已成为有劳动力人群致盲的首要原因, 但目前缺乏有效的早期诊治方法。深入了解 DR 潜在的分子学发病机制, 寻找新的诊治靶点迫在眉睫。目前 miR-29 在 DR 发病中的作用被越来越多的研究证实。

miR-29 家族包括 miR-29a、miR-29b、miR-29c, 位于染色体 7q32 和 1q23, 其序列高度相似, 且 seed 部分序列完全一致, 其靶基因有较大范围重叠<sup>[4]</sup>。研究发现 miR-29 与糖尿病大血管、微血管病变密切相关<sup>[5]</sup>。Long 等<sup>[6]</sup>发现敲除糖尿病 db/db 小鼠的 miR-29c 基因可减少糖尿病小鼠的蛋白尿, 延缓肾脏病变的进展。Peng 等<sup>[5]</sup>则发现糖尿病患者尿 miR-

29a 的表达量不仅与尿白蛋白排泄率相关,还与颈动脉内膜中层厚度相关。本研究为了平衡糖尿病肾病、糖尿病大血管病变这些因素对 miR-29c 表达量的影响,所有入组患者血肌酐水平均在正常范围, U-ALB<200 mg/L,排除心脑血管病变者,剔除颈动脉、下肢动脉有狭窄者,且两组患者 U-ALB、ABI 及 PWV 无统计学差异。

本研究发现 NPDR 患者血清 miR-29c 的表达明显上调,与 Wu 等<sup>[7]</sup>动物模型研究结果相符,他们发现 miR-29c 在 STZ 诱导的糖尿病大鼠视网膜组织中的表达显著上调,且表达量随病程发展逐渐上升,进一步通过靶基因预测软件分析,miR-29c 可能靶向血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。VEGF 则是目前所知最强的血管生成因子和血管渗漏因子,能特异性地刺激血管内皮细胞增殖,参与新生血管形成,还能破坏血-视网膜屏障,加剧视网膜病变的发展<sup>[8]</sup>。血清 miR-29 与 DR 的相关性近期也有了报道。Hirota 等<sup>[9]</sup>发现增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)患者血清中的 miR-29a 表达明显上调,并推测其与血管新生有关。本研究则表明血清 miR-29c 与 NPDR 发病相关。下一步我们拟研究 DR 患者血清 VEGF 与 miR-29c 的表达量有无相关性。

本研究还发现血清 miR-29c 的表达量与 HbA1c 具有显著的正相关性。糖代谢紊乱是产生 DR 的根本原因,HbA1c 是 DR 发病的独立危险因素,本研究结果提示 miR-29c 可能通过调控糖代谢途径参与了 DR 的发生发展。靶基因预测也提示 miR-29c 通过调控磷酸肌醇代谢、胰岛素信号通路等参与了血糖代谢。至于 TG、TC 等血脂指标,我们未发现与 miR-29c 的表达量有相关性。目前虽有研究发现 miR-29 在脂肪细胞中高表达,但尚未见其与脂肪代谢相关的文献报道。

总之本研究首次证实 miR-29c 在 NPDR 患者血清中高表达,其表达量与 HbA1c 呈正相关,可能通过调控糖代谢、细胞因子及受体的相互作用、细胞外基质生成等途径参与 DR 的发病。本研究的局限性在于样本量偏小,下一步拟扩大样本量动态检测

miR-29c 在健康人群、DM、NPDR、PDR 患者血清中的表达情况,并以体外细胞学实验直接验证 miR-29c 可能调控的靶基因作用的信号通路及靶点,进一步明确其在 DR 发病机制中的作用,为 DR 新的诊治靶点提供理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA[J]. Trends Genet, 2006, 22(3): 165-173
- [2] Chen X, Liang H, Zhang J, et al. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication[J]. Trends Cell Biol, 2012, 22(3): 125-132
- [3] Ding J, Zou Y, Liu N, et al. Strategies of digital fundus photography for screening diabetic retinopathy in a diabetic population in urban China [J]. Ophthalmic Epidemiol, 2012, 19(6): 414-419
- [4] Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, et al. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury [J]. Physiol Genomics, 2012, 44(4): 237-244
- [5] Peng H, Zhong M, Zhao W, et al. Urinary miR-29 correlates with albuminuria and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes patients [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82607
- [6] Long J, Wang Y, Wang W, et al. MicroRNA-29c is a signature microRNA under high glucose conditions that targets Sprouty homolog 1, and its *in vivo* knockdown prevents progression of diabetic nephropathy [J]. J Biol Chem, 2011, 286(13): 11837-11848
- [7] Wu JH, Gao Y, Ren AJ, et al. Altered microRNA expression profiles in retinas with diabetic retinopathy [J]. Ophthalmic Res, 2012, 47(4): 195-201
- [8] Behl T, Kotwani A. Exploring the various aspects of the pathological role of vascular endothelial growth factor(VEGF) in diabetic retinopathy [J]. Pharmacol Res, 2015, 99: 137-148
- [9] Hirota K, Keino H, Inoue M, et al. Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2015, 253(3): 335-342

[收稿日期] 2015-06-06