

· 临床研究 ·

长链非编码 RNA TUG1/MALAT1 在 2 型糖尿病患者外周血单个核细胞中的表达

李一卉¹, 孙璐², 戴程婷¹, 张国英³, 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 210009; ²镇江市第一人民医院内分泌科, 江苏 镇江 212002; ³南京市中西医结合医院检验科, 江苏 南京 210014

[摘要] 目的:探讨长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)牛磺酸上调基因1(taurine up-regulated 1, TUG1)和肺腺癌转移相关转录本1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)在2型糖尿病患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中的表达及临床意义。方法:采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测60例2型糖尿病患者(糖尿病组)及45例健康体检者(健康对照组)PBMC中lncRNA TUG1、MALAT1的表达水平,并分析空腹血糖、糖化血红蛋白及病程对其表达的影响。结果:qRT-PCR检测结果显示,lncRNA TUG1在2型糖尿病患者PBMC中的相对表达水平是健康对照组的6.25倍($P < 0.05$),lncRNA MALAT1在2型糖尿病患者PBMC中的相对表达水平是健康对照组的3.98倍($P < 0.05$);在2型糖尿病患者的PBMC中,lncRNA TUG1、MALAT1表达水平随着患者空腹血糖和糖化血红蛋白的升高而增加($P < 0.05$);同时,lncRNA TUG1、MALAT1表达水平也随着患者病程的延长而增加($P < 0.05$);ROC曲线示lncRNA TUG1的曲线下面积为0.898(95%CI:0.826~0.970, $P < 0.001$),lncRNA MALAT1的曲线下面积为0.715(95%CI:0.583~0.846, $P < 0.001$)。结论:2型糖尿病患者PBMC中的lncRNA TUG1、MALAT1表达升高,且与血糖水平及病程有关,lncRNA TUG1、MALAT1的表达水平或可作为诊断以及评估2型糖尿病患者病情的生物学标志物。

[关键词] 2型糖尿病;长链非编码RNA;外周血单个核细胞;TUG1;MALAT1**[中图分类号]** R587.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)04-534-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190412

Expression of long non-coding RNA TUG1/MALAT1 in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetic patients

Li Yihui¹, Sun Lu², Dai Chengting¹, Zhang Guoying³, Yuan Qingxin^{1*}¹Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029; ²Department of Endocrinology, Zhenjiang First People's Hospital, Zhenjiang 212002; ³Department of Clinical Laboratory, Nanjing Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing 210014, China

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to determine the change of long non-coding RNA (lncRNA) taurine up-regulated 1 (TUG1) and metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) in patients' peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with T2DM, expecting to find a biomarker in diagnosing T2DM. **Methods:** Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of lncRNA TUG1 and MALAT1 in 60 patients with type 2 diabetes (the diabetes group) and 45 healthy controls (the healthy control group). The effects of fasting blood glucose, glycated hemoglobin and the course of disease on lncRNA expression were analyzed. **Results:** The results of qRT-PCR showed that the relative expression level of lncRNA TUG1 in PBMC of T2DM patients was 6.25 times of the healthy control group ($P < 0.05$), and the relative expression level of lncRNA MALAT1 in PBMC of T2DM patients was 3.98 times of the healthy control group ($P < 0.05$); In PBMC of patients with type 2 diabetes, the expression level of lncRNA MALAT1 and TUG1 rised with the increasing of fasting blood glucose and glycated hemoglobin ($P < 0.05$); Meanwhile, the expression level of lncRNA TUG1 and MALAT1 also increased with the prolongation of the patient's disease course ($P < 0.05$); The

[基金项目] 国家自然科学基金(81570697)

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

ROC curve showed that the area under the curve of lncRNA TUG1 was 0.898(95% confidence interval 0.826-0.970, $P < 0.001$), and the area under the curve for lncRNA MALAT1 was 0.715(95% confidence interval 0.583-0.846, $P < 0.001$). **Conclusion:** The expression of lncRNA TUG1 and MALAT1 in PBMC of patients with T2MD was elevated, and it was related to blood glucose level and course of disease. The expression level of lncRNA TUG1 and MALAT1 may be used as a biomarker for diagnosis and evaluation of the condition of patients with T2MD.

[Key words] T2DM;lncRNA;PBMC;TUG1;MALAT1

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(04): 534-538]

糖尿病是由遗传、免疫功能紊乱等因素诱发的严重危害人们身心健康的慢性代谢性疾病,其病因及发病机制复杂^[1]。随着研究的深入,基因组测序技术的进步,非编码RNA逐渐被人们所关注,越来越多的证据表明,非编码RNA在疾病发生与发展中起重要作用^[2-3]。其中长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是被广泛研究的一类。lncRNA 是一类不具有蛋白质编码功能且长度大于200个核苷酸的RNA分子^[4-5],不仅广泛参与细胞增殖、分化和发育^[6],还与肿瘤、血液以及代谢疾病等的病理进程相关^[7-9]。本研究通过分离人外周血单个核细胞并提取总RNA,运用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测正常人与2型糖尿病患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中牛磺酸上调基因1(taurine up-regulated 1, TUG1)和肺腺癌转移相关转录本1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)的表达量,探讨它们在2型糖尿病发生与发展中的意义。

1 对象和方法

1.1 对象

选择2017年3月—2018年3月在南京医科大学第一附属医院就诊且确诊为2型糖尿病的患者为糖尿病组,同时选择健康体检者为健康对照组。糖尿病组共60例,其中男35例,女25例,平均年龄(55.40 ± 3.72)岁;健康对照组共45例,其中男25例,女20例,平均年龄(54.00 ± 4.16)岁。糖尿病组及健康对照组之间性别、年龄、血压、胆固醇、体重指数(body mass index, BMI)等一般情况比较差异均无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

入组人群均排除合并传染性疾病(如肝炎、结核病等)、免疫系统疾病以及肿瘤等其他重大疾病。糖尿病组人群经葡萄糖耐量实验及糖化血红蛋白等检测结果确诊为2型糖尿病,健康对照组人

群葡萄糖耐量及糖化血红蛋白均在正常范围内。所有入组人群均签订在临床研究中使用时血液样本的知情同意书。

表1 入组人群的一般情况

Table 1 General information of the enrolled groups

一般情况	健康对照组	糖尿病组	P值
人数(例)	45	60	—
男/女(例)	25/30	35/25	0.733
年龄(岁)	55.40 ± 3.72	54.00 ± 4.16	0.841
收缩压(mmHg)	132.20 ± 17.52	135.40 ± 10.24	0.317
舒张压(mmHg)	79.00 ± 8.44	81.60 ± 10.30	0.529
胆固醇(mmol/L)	5.08 ± 0.09	4.97 ± 0.18	0.397
甘油三酯(mmol/L)	1.75 ± 0.14	1.49 ± 0.59	0.213
尿酸($\mu\text{mol/L}$)	272.00 ± 21.46	298.00 ± 42.82	0.483
促甲状腺激素(mU/L)	2.34 ± 0.78	2.52 ± 0.86	0.373
血红蛋白(g/L)	145.20 ± 11.33	147.20 ± 8.72	0.476
BMI(kg/m^2)	24.55 ± 3.08	24.32 ± 3.31	0.268

1.2 方法

1.2.1 标本收集与处理

采集研究对象空腹8 h以上静脉血2管(5 mL/管)。其中1管运用电化学法检测血清血糖、糖化血红蛋白等生化指标水平,另1管按照Ficoll淋巴细胞分离液(Sigma公司,美国)说明书提取外周血单个核细胞。

1.2.2 qRT-PCR反应

按照TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国)说明书提取PBMC总RNA,经DEPC水溶解后,采用Nano Drop分光光度仪检测总RNA浓度和纯度。采用Primer-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa公司,日本),按照说明书进行逆转录反应。采用SYBR Premix Ex Taq™(TaKaRa公司,日本)进行荧光定量PCR,实验步骤及条件参照试剂说明书。实验仪器为Applied Biosystems Stepone Plus型荧光定量PCR仪。根据GenBank提供的基

因序列,设计引物,由上海Invitrogen公司设计及合成,具体序列详见表2。根据待测标本的 C_t 值,采用相对定量法,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表明PBMC中各基因表达的变化倍数。

表2 PCR引物序列

Table 2 PCR primer sequences

引物名称	序列(5'→3')
β -actin上游引物	TCACCCACACTGTGCCATCTACGA
β -actin下游引物	CAGCGGAACCGCTCATTTGCCAATG
TUG1上游引物	CTGGACCTGGAACCCCAAAG
TUG1下游引物	GGTAGTGCTTGCTCAGTCGT
MALAT1上游引物	AAGATGAGGGTGTTTACG
MALAT1下游引物	AAGCCTTCTGCCTTAGTT

1.3 统计学方法

应用SPSS17.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法。此外,采用ROC曲线法对2型糖尿病的预测/诊断价值进行分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

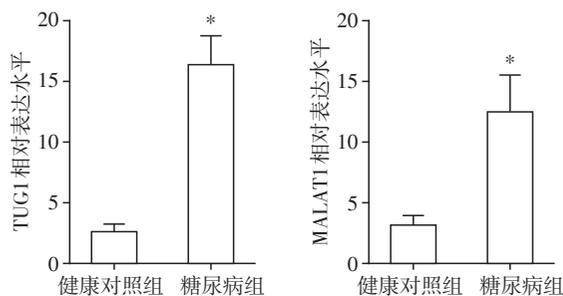
2 结果

2.1 糖尿病组与健康对照组间lncRNA TUG1、MALAT1表达水平的比较

采用qRT-PCR技术检测60例糖尿病患者以及45例健康体检者PBMC中lncRNA TUG1、MALAT1的表达情况。结果显示:糖尿病组PBMC中的lncRNA TUG1水平显著高于健康对照组,为正常水平的6.25倍,差异有统计学意义($P < 0.05$);lncRNA MALAT1水平显著高于健康对照组,为正常水平的3.98倍,差异有统计学意义($P < 0.05$,图1)。

2.2 糖尿病患者PBMC中lncRNA TUG1、MALAT1表达水平的比较

根据糖尿病患者空腹血糖控制情况,将糖尿病

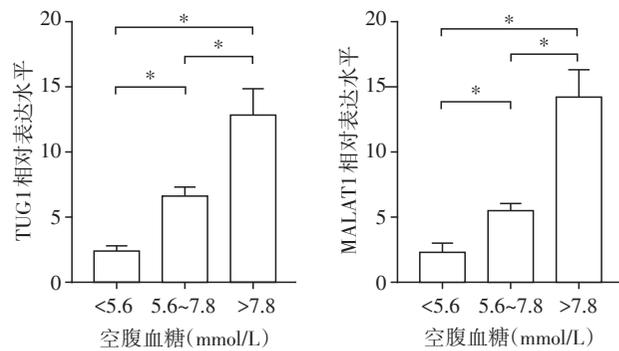


与健康对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图1 两组PBMC中TUG1和MALAT1的相对表达量

Figure 1 Relative expression levels of TUG1 and MALAT1 in two groups of PBMC

组分为3个亚组:空腹血糖 < 5.6 mmol/L,空腹血糖 $5.6 \sim 7.8$ mmol/L,空腹血糖 > 7.8 mmol/L;qRT-PCR结果显示:随着糖尿病患者空腹血糖升高,lncRNA TUG1和MALAT1在PBMC中的表达增加,两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图2)。

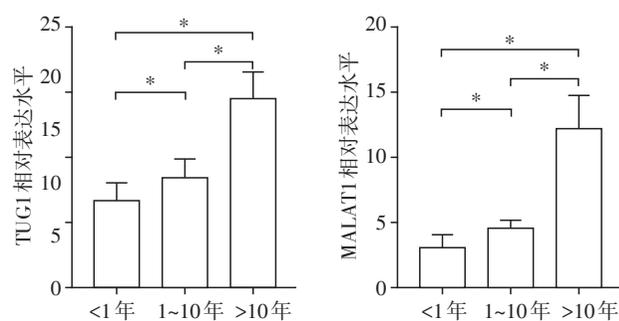


两组比较,* $P < 0.05$ 。

图2 糖尿病组中不同空腹血糖水平患者的PBMC中TUG1和MALAT1的相对表达量

Figure 2 Relative expression levels of TUG1 and MALAT1 in PBMC of patients with different fasting blood glucose levels in the diabetic group

根据糖尿病患者的病程,将糖尿病组分为3个亚组:病程 < 1 年,病程 $1 \sim 10$ 年,病程 > 10 年;qRT-PCR结果显示:随着糖尿病患者病程的延长,lncRNA TUG1和MALAT1在PBMC中的表达增加,两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图3)。



两组比较,* $P < 0.05$ 。

图3 糖尿病组中不同病程患者的PBMC中TUG1和MALAT1的相对表达量

Figure 3 Relative expression levels of TUG1 and MALAT1 in PBMC of patients with different disease duration in the diabetic group

根据糖尿病患者糖化血红蛋白(HbA1c)水平,将糖尿病组分为2个亚组:HbA1c $\leq 6.5\%$,HbA1c $> 6.5\%$;qRT-PCR结果显示:随着糖尿病患者HbA1c

水平升高, lncRNA TUG1 和 MALAT1 在 PBMC 中的表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图4)。

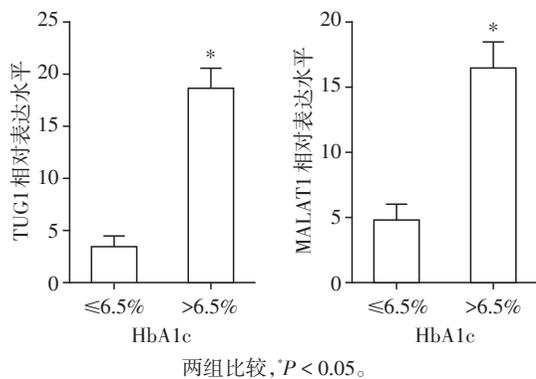


图4 糖尿病组中不同糖化血红蛋白水平患者的PBMC中TUG1和MALAT1的相对表达量

Figure 4 Relative expression levels of TUG1 and MALAT1 in PBMC of patients with different HbA1c levels in the diabetic group

2.3 评估 lncRNA TUG1 和 MALAT1 作为 2 型糖尿病生物学标志物的诊断价值

制作入组人群的受试者工作特征曲线即 ROC 曲线, lncRNA TUG1 的曲线下面积为 0.898, 95%CI 为 0.826~0.970 ($P < 0.001$), 灵敏度和特异度分别为 71.4% 和 81.3%, 约登指数为 0.527 (图5); lncRNA MALAT1 的曲线下面积为 0.715, 95%CI 为 0.583~0.846 ($P < 0.001$), 灵敏度和特异度分别为 93.9% 和 48.3%, 约登指数为 0.422 (图6)。

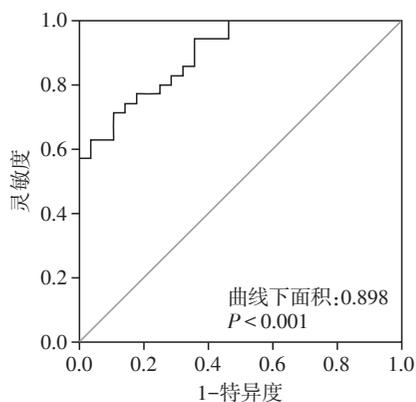


图5 lncRNA TUG1作为2型糖尿病生物学标志物的诊断价值

Figure 5 Diagnostic value of lncRNA TUG1 as a biomarker for type 2 diabetes

3 讨论

糖尿病是一组由于胰岛素分泌绝对或相对不足而引起的以高血糖为特征的慢性代谢性疾病^[1,10]。其

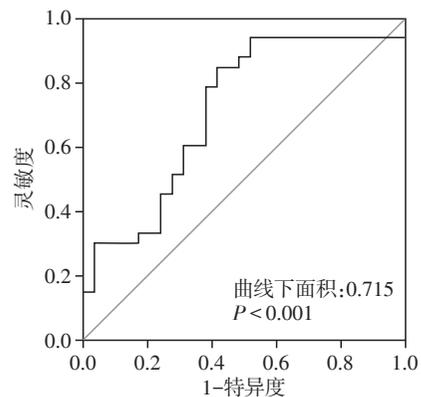


图6 lncRNA MALAT1作为2型糖尿病生物学标志物的诊断价值

Figure 6 Diagnostic value of lncRNA MALAT1 as a biomarker for type 2 diabetes

发病的原因复杂, 具体机制仍在不断研究中。根据国际糖尿病联合会 (IDF) 2015 年的统计显示, 全球有 4.1 亿糖尿病患者, 随着糖尿病病程的延长, 患者血糖控制的不佳, 各种并发症随之而来。因此, 对糖尿病的诊断变得十分重要。随着全基因组研究的发展, 更多的疾病检测指标不再局限于血液、尿液等生化指标, 对基因的分析变得更为重要^[11]。2012 年 Morán 等^[12]利用流式细胞仪分析并鉴定出的 1 128 条 lncRNA, 同时发现这些 lncRNA 具有高度的胰岛细胞特异性和时间特异性, 仅表达于成熟胰岛细胞中。本研究主要检测 lncRNA TUG1 和 MALAT1 在健康人群及 2 型糖尿病患者 PBMC 中的表达情况。

lncRNA TUG1 在人类位于 22 号染色体, 最早发现于新生小鼠的视网膜细胞^[13], 受牛磺酸刺激上调的 lncRNA TUG1, 并与多梳抑制蛋白复合物 (polycomb repressor complex) 相互作用, 在转录表观遗传中发挥作用。最新研究表明, 在糖尿病肾病小鼠体内, TUG1 的表达下调, 且能调控线粒体生物学功能^[14]。本研究发现 lncRNA TUG1 的表达受血糖影响, 2 型糖尿病患者的 PBMC 中, TUG1 的表达显著高于正常健康人 ($P < 0.05$), 并且 2 型糖尿病患者血糖控制程度的不同也影响其表达, 随着空腹血糖及糖化血红蛋白的升高, PBMC 中 TUG1 的表达也增高; 对患者病程进行分析, 我们发现随着患者病程的延长, PBMC 中 TUG1 的表达明显增加; 为了验证 TUG1 是否能作为 2 型糖尿病诊断及病情评估的生物学标志物, 我们进行了 ROC 曲线分析, 曲线下面积为 0.898, 95%CI 为 0.826~0.970 ($P < 0.001$), 灵敏度和特异度分别为 71.4% 和 81.3%, 结果表明 TUG1

对2型糖尿病的诊断及病情评估具有较高的灵敏度和特异度。

我们研究的另一条 lncRNA 为 MALAT1, 是在细胞核内表达的一个 lncRNA, 位于人类 11 号染色体, 参与组成核糖核蛋白复合物的分子支架^[15]。MALAT1 最开始作为肿瘤基因的转录调控因子被发现^[16], 可以调控肿瘤的增殖与转移。近期研究发现 MALAT1 与糖尿病并发症的发生相关。例如, MALAT1 在糖尿病肾病的造模小鼠肾脏内高表达^[17], 在糖尿病性胃轻瘫患者的胃黏膜细胞中, 也检测出 MALAT1 的表达上调^[18], 同时亦有证据表明 MALAT1 表达增加会引起糖尿病患者心功能不全^[19]; 本研究发现, MALAT1 在 2 型糖尿病患者的 PBMC 中显著性高表达 ($P < 0.05$), 并且随着空腹血糖及糖化血红蛋白的升高, MALAT1 在 PBMC 中的表达量随之增加 ($P < 0.05$); 对不同病程患者的分析中, MALAT1 的表达也随着病程延长而增加; 在 ROC 曲线分析中, MALAT1 的曲线下面积为 0.715, 95% CI 为 0.583~0.846 ($P < 0.001$), 灵敏度和特异度分别为 93.9% 和 48.3%, 表明 MALAT1 对于 2 型糖尿病的诊断及病情评估具有很高的灵敏度, 特异度尚不明显。

综上所述, 本研究发现了 TUG1 及 MALAT1 在 2 型糖尿病患者 PBMC 中的差异表达, 具有成为 2 型糖尿病诊断及病情评估标志物的潜在可能, 这一发现也为 2 型糖尿病的治疗带来新的思路及方向, 其与糖尿病的具体关系及机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Imam K. Clinical features, diagnostic criteria and pathogenesis of diabetes mellitus[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 771:340-355
- [2] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease[J]. *Cell*, 2013, 152(6):1298-1307
- [3] Kazemzadeh M, Safaralizadeh R, Orang AV. LncRNAs: emerging players in gene regulation and disease pathogenesis[J]. *J Genet*, 2015, 94(4):771-784
- [4] Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression[J]. *Genome Res*, 2012, 22(9):1775-1789
- [5] Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, discovery, and classification of lncRNAs[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1008:1-46
- [6] Yu Y, Zhang M, Liu J, et al. Long non-coding RNA PVT1 promotes cell proliferation and migration by silencing ANGPTL4 expression in cholangiocarcinoma[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 13:503-513
- [7] Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(1):7-21
- [8] Huang JZ, Chen M, Chen D, et al. A peptide encoded by a putative lncRNA HOXB-AS3 suppresses colon cancer growth[J]. *Mol Cell*, 2017, 68(1):171-184
- [9] Delas MJ, Sabin LR, Dolzhenko E, et al. lncRNA requirements for mouse acute myeloid leukemia and normal differentiation[J]. *Elife*, 2017, 6:e25607
- [10] Rhodes CJ. Type 2 diabetes—a matter of beta-cell life and death?[J]. *Science*, 2005, 307(5708):380-384
- [11] 李伟, 蔡德鸿. 妊娠期糖尿病妇女外周血 miR-29、miR-375 的表达及临床意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(3):334-336
- [12] Moran I, Akerman I, van de Bunt M, et al. Human beta 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
- [13] Young TL, Matsuda T, Cepko CL. The noncoding RNA taurine upregulated gene 1 is required for differentiation of the murine retina[J]. *Curr Biol*, 2005, 15(6):501-512
- [14] Long J, Badal SS, Ye Z, et al. Long noncoding RNA Tug1 regulates mitochondrial bioenergetics in diabetic nephropathy[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(11):4205-4218
- [15] Zhang X, Hamblin MH, Yin KJ. The long noncoding RNA Malat1: Its physiological and pathophysiological functions[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(12):1705-1714
- [16] Gutschner T, Hammerle M, Eissmann M, et al. The non-coding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(3):1180-1189
- [17] Hu M, Wang R, Li X, et al. LncRNA MALAT1 is dysregulated in diabetic nephropathy and involved in high glucose-induced podocyte injury via its interplay with beta-catenin[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(11):2732-2747
- [18] Gong Y, Zhu Y, Zhu B, et al. LncRNA MALAT1 is up-regulated in diabetic gastroparesis and involved in high-glucose-induced cellular processes in human gastric smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(2):401-406
- [19] Zhang M, Gu H, Chen J, et al. Involvement of long noncoding RNA MALAT1 in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 202:753-755

[收稿日期] 2018-11-05