

· 论 著 ·

外周血 miR-26a 与 2 型糖尿病及大血管病变的相关性

任妍, 张京玲

青岛大学第十一临床医学院 临沂市人民医院, 山东 临沂 276003

摘要: **目的** 探讨血浆微小核糖核酸(miR)-26a 与 2 型糖尿病(T2DM)及其大血管病变的关系。**方法** 选取 2017 年 10 月至 2018 年 6 月收治且诊断明确的 T2DM 患者 81 例为研究对象,按照是否合并大血管病变分为两组,即 T2DM 合并大血管病变(T2DM + CVD)组(患有脑梗死、心肌梗死或超声证实颈动脉或下肢动脉内膜增厚或斑块形成)42 例,与 T2DM 未合并大血管病变(T2DM)组 39 例。另选择同期 32 例健康查体者为对照(NC)组。用全自动生化分析仪检测各组血糖、血脂等指标,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)法检测血浆 miR-26a 表达水平,比较 miR-26a 在三组间表达水平的差异。**结果** 三组对象一般资料比较无统计学差异($P > 0.05$)。与 NC 组比,T2DM 组及 T2DM + CVD 组血清与糖化血红蛋白(HbA1c)、空腹血糖(FPG)、空腹 C 肽(FC-P)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)明显增高($P < 0.05$)。血浆 miR-26a 相对表达量三组间比较差异有统计意义($F = 34.81, P < 0.01$),且依 NC 组、T2DM 组、T2DM + CVD 组之序递升。Pearson 相关分析显示,miR-26a 与 HbA1c、LDL-C、TC 及 FPG 呈正相关($r = 0.469, 0.276, 0.244, 0.304, P < 0.05$),与 FC-P 及病程呈负相关($r = -0.473, -0.264, P < 0.05$),与年龄、体质指数、收缩压、舒张压、甘油三酯无相关。**结论** miR-26a 在 NC、T2DM、T2DM + CVD 组呈梯度升高,提示 miR-26a 与 T2DM 大血管病变密切相关,并且 miR-26a 表达水平可能受糖代谢调控。

关键词: 微小核糖核酸-26a; 大血管病变; 2 型糖尿病; 生化指标

中图分类号: R 587.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 8182(2019)03 - 0309 - 04

Associations of peripheral blood miR-26a with type 2 diabetes mellitus and macroangiopathy

REN Yan, ZHANG Jing-ling

Linyi People's Hospital, 11th Clinical Medical College of Qingdao University, Linyi, Shandong 276003, China

Corresponding Author: ZHANG Jing-ling, E-mail: jinglingzhang@126.com

Abstract: Objective To investigate the relationship between plasma microRNA-26a (miR-26a) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) and macroangiopathy. **Methods** Eighty-one T2DM patients confirmed and treated from October 2017 to June 2018 were selected as study subjects and divided into two groups according to whether they had macroangiopathy or not. The patients with macroangiopathy (cerebral infarction, myocardial infarction, or carotid artery or lower extremity intima thickening or plaque formation measured by arterial ultrasound) were divided into T2DM + CVD group ($n = 42$), and the patients without macroangiopathy were divided into DM group ($n = 39$). Thirty-two healthy people were selected as control (NC) group in the same period. The levels of blood glucose and blood lipid and the expression levels of miR-26a in plasma were detected respectively by automatic biochemical analyzer and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) to analyze the difference of miR-26a expression among three groups. **Results** There was no significant difference in general data among three groups (all $P > 0.05$). Compared with NC group, the serum levels of glycosylated hemoglobin (HbA1c), fasting blood glucose (FPG), fasting C-peptide (FC-P), C-reactive protein (CRP), total cholesterol (TC), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) significantly increased in T2DM group and T2DM + CVD group (all $P < 0.05$). There were significant differences among three groups in the relative expression of plasma miR-26a ($F = 34.81, P < 0.01$), and it was increased according to the sequence of NC group, T2DM group and T2DM + CVD group. Pearson correlation analysis showed that miR-26a was positively correlated with HbA1c, LDL-C, TC and FPG ($r = 0.469, 0.276, 0.244, 0.304, P < 0.05$) and was negatively correlated with FC-P and course of disease ($r = -0.473, -0.264, P < 0.05$), but not with age, body mass index (BMI), systolic pressure (SBP), diastolic pressure (DBP), and

triglyceride (TG). **Conclusion** The expression level of miR-26a increased gradually in the order of NC, T2DM and T2DM + CVD, suggesting that miR-26a is closely related to macroangiopathy in T2DM and may be regulated by glycometabolism.

Key words: microRNA-26a; Macroangiopathy; Type 2 diabetes mellitus; Biochemical indexes

Fund program: Shandong Medical and Health Science and Technology Development Plan Project (2016WS0228)

2 型糖尿病 (T2DM) 是一种慢性血糖升高的代谢性疾病,其特征是胰岛素抵抗和高血糖导致的胰岛 β 细胞功能障碍,病因和发病机制尚未完全阐明。糖尿病大血管并发症是患者病情恶化甚至死亡的主因,其发展缓慢,起病隐匿,不易早期诊断及治疗,一旦发生将很难逆转,已成为威胁人类健康的一大类疾病。糖尿病血管病变的基本病理基础为动脉粥样硬化及血管平滑肌细胞和成纤维细胞大量增殖所致的动脉中膜、外膜不规则增厚、纤维化和钙化。目前可用于治疗 T2DM 血管病变的药物治疗效果甚微,对这种代谢紊乱的理解尚不完全^[1]。

微小核糖核酸 (miRNA) 是约 22 个核苷酸的内源性非编码 RNA,其通过与核糖核苷酸 (mRNA) 的 3' 非翻译区 (3'-UTR) 结合而在靶基因的转录后抑制中起关键作用^[2]。然而 miRNA 除了靶向负调控 mRNA 水平的典型调控机制外还有 7 种非典型调控机制^[3]:如 miRNA 的前体 (pri-RNA) 可以进入细胞质被核糖体识别为 mRNA 编码调节肽等。2008 年有研究发现 miRNA 也存在于循环血液中,能从外周血检测到,而且稳定性与重复性均较强^[4]。

近年来研究表明 miRNA 可能参与糖尿病发生及其心血管并发症的调控^[5]。最近研究证实 miR-26a 为人类胰岛 β 细胞中富集度最高的 miRNA^[6],并且最新证据显示 miR-26a 的过表达可改善 T2DM 小鼠中的 β 细胞功能障碍^[7]。但 miR-26a 与 T2DM 及其大血管病变相关性的临床研究,国内外未见相关报道。本研究通过分析健康对照者、T2DM 伴或不伴大血管病变患者血浆中 miR-26a 表达水平的差异,探讨 miR-26a 与 T2DM 及其大血管病变的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 10 月至 2018 年 6 月,于本院内分泌科就诊的 T2DM 患者 81 例,均符合 1999 年世界卫生组织糖尿病诊断标准,按照是否合并大血管病变分为两组,即 T2DM 合并大血管病变 (T2DM + CVD) 组 (患有脑梗死、心肌梗死或动脉超声证实颈动脉或下肢动脉内膜增厚或斑块形成) 42 例,与 T2DM 未合并大血管病变 (T2DM) 组,39 例。另选择本院体检中心选择 32 名健康者为对照 (NC)

组,NC 组满足空腹血糖 (FPG) < 6.1 mmol/L,及餐后 2 小时血糖 (2hPG) < 7.8 mmol/L。排除标准: I 型糖尿病、特殊类型糖尿病或伴有糖尿病急性并发症;肥胖 ($BMI \geq 25$ kg/m²)、高血压病、恶性肿瘤、肾病等慢性病;自身免疫性疾病、合并其他影响糖代谢疾病 (如甲状腺功能亢进症、肢端肥大症、库欣综合征等);急性代谢异常综合征或其他应激情况;妊娠、哺乳;吸烟。所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 一般指标检测 测量患者身高、体重、腰围、腹围及血压,计算 BMI。禁食 12 h,取清晨静脉血,采用罗氏公司全自动生化分析仪,严格按照仪器及试剂说明书,检测以下指标。(1) 血糖指标: FPG、2hPG、糖化血红蛋白 (HbA1c); (2) 血脂指标: 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC); (3) 胰岛功能指标: 空腹 C 肽 (FC-P)。

1.2.2 外周血实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 法检测血浆 miR-26a 相对定量 应用 miRcute miRNA 分离提取试剂盒 (编号 DP503, 中国北京天根生化科技),取空腹血浆 3 ml,严格按试剂盒说明操作,提取 25 μ l 总 RNA,提取后 -80 $^{\circ}$ C 保存。使用 miRcute miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒 (编号 QP016, GeneCopoeia) 反转录合成 cDNA。反应体系 25 μ l,其中提取总 RNA 1 μ l, 2.5 U/ μ l Poly A Polymerase 1 μ l, RTase Mix 1 μ l, 5 \times PAP/RT Buffer 5 μ l, 无 RNA 酶水补足至 25 μ l,进行逆转录,反应条件为: 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 85 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。逆转录产物 (cDNA) 立即进行 RT-PCR 检测。采用 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒 (中国北京天根生化科技),取 2 μ l 合成的 cDNA 作为模板,按说明书配制反应体系 20 μ l,使用 Applied Biosystems 7500 实时进行实时 PCR 分析,每个 cDNA 样本同时检测 3 次,循环阈值 (CT 值) 3 次取平均值。RT-PCR 反应条件为: 按照 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C, 10 s, 60 $^{\circ}$ C, 20 s, 72 $^{\circ}$ C, 10 s 反应 40 个循环。hsa-miR-26a 引物及内参 U48 购自 GeneCopoeia。血浆 miRNAs 的相对表达量具体计算方法为目的基因的 CT 值减去 U48 的 CT 值,然后再进行 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值运算。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计数资料采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布的计数资料,行对数变换后符合正态分布三组间比较采用单因素方差分析和协方差分析,及两两比较的 LSD-*t* 检验;miR-26a 与各指标的相关关系应用 Pearson 相关分析。以 $P < 0.05$ 为检验标准。

2 结果

2.1 三组基线资料及生化指标比较 三组性别、年龄、BMI、收缩压、舒张压比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 NC 组比,T2DM 组及 T2DM + CVD 组血清 HbA1c、FPG、FC-P、TC、LDL-C 明显增高 ($P < 0.05$);与 T2DM 组比较,T2DM + CVD 组血清 HbA1c 减低

($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 三组血浆 miR-26a 相对表达量比较 NC 组、T2DM 组、T2DM + CVD 组的 miR-26a 相对表达量分别为 7.5 ± 11.7 、 54.0 ± 85.5 、 101.3 ± 114.3 ,取对数转换后符合正态分布,分别为 0.13 ± 0.94 、 1.04 ± 0.89 、 1.72 ± 0.53 。三组间比较差异有统计意义 ($F = 34.81, P < 0.01$),且依 NC 组、T2DM 组、T2DM + CVD 组之序,血浆 miR-26a 相对表达量递升。

2.3 miR-26a 与各指标的相关性分析 Pearson 相关性分析结果显示,miR-26a 表达水平与 HbA1c、FPG、TC、LDL-C 呈正相关 ($r = 0.469, 0.304, 0.244, 0.276, P < 0.05$),与病程及 FC-P 呈负相关 ($r = -0.264, -0.473, P < 0.05$),与年龄、BMI、SBP、DBP、TG 无相关。见表 2。

表 1 三组基线资料及生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	男/女(例)	年龄(岁)	病程(年)	BMI(kg/m ²)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	HbA1c(%)
NC 组	32	14/18	47.8 ± 8.3	-	22.1 ± 1.9	116.8 ± 9.0	75.4 ± 8.6	5.3 ± 0.5
T2DM 组	39	21/18	48.0 ± 9.4	5.2 ± 4.3	22.6 ± 2.2	119.4 ± 11.2	78.8 ± 7.9	11.4 ± 2.1*
T2DM + CVD 组	42	17/25	49.5 ± 10.0	5.9 ± 6.0	22.1 ± 4.3	122.2 ± 14.0	78.3 ± 8.1	10.5 ± 2.0**

组别	例数	FPG(mmol/L)	FC-P(ng/ml)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	Scr(μmol/L)
NC 组	32	5.3 ± 0.5	2.6 ± 0.7	1.0 ± 0.4	4.1 ± 0.7	1.4 ± 0.3	2.5 ± 0.6	59.0 ± 11.6
T2DM 组	39	11.1 ± 4.0*	0.9 ± 0.7*	1.7 ± 1.2	5.3 ± 1.3*	1.1 ± 0.2	3.2 ± 1.0*	59.3 ± 14.8
T2DM + CVD 组	42	10.3 ± 3.2*	1.0 ± 0.7*	1.9 ± 2.2*	5.3 ± 1.6*	1.4 ± 1.6	3.2 ± 0.8*	53.4 ± 10.6

注:与 NC 组比较,* $P < 0.05$;与 T2DM 组比较,** $P < 0.05$ 。

表 2 miR-26a 与各指标的相关性分析

miR-26a	病程	HbA1c	FC-P	FPG	TC	LDL-C
<i>r</i> 值	-0.264	0.469	-0.473	0.304	0.244	0.276
<i>P</i> 值	0.020	0.000	0.000	0.001	0.011	0.004

3 讨论

糖尿病大血管病变是指主动脉、冠状动脉、颈动脉以及下肢动脉等血管发生粥样硬化,其中心脑血管疾病是糖尿病的主要死亡原因。内皮细胞、巨噬细胞^[9]和平滑肌细胞是动脉粥样硬化发展的关键因素。内皮功能障碍是动脉粥样硬化发病机制中的关键步骤。异常表达的 miRNA 通常参与内皮细胞功能的调节。miR-126 是一种内皮细胞特异性表达的 miRNA,其表达水平下降可介导糖尿病患者内皮损伤^[10]。miR-106 通过靶向高迁移率族蛋白 1 (HMGB1)抑制高血糖诱导的血管内皮细胞功能障碍^[11]。最新研究发现 miR-939^[12]、miR-29b^[13]可调节血管平滑肌细胞增殖和分化。Icli 等^[14]研究发现 miR-26a 高表达可以诱导糖尿病小鼠中的血管生成,促进伤口愈合。本研究显示与健康对照组相比,T2DM 患者血浆中 miR-26a 显著上调,相关性分析发现 miR-26a 表达与 FPG 及 HbA1c 呈正相关,与 FC-P

呈负相关,提示高葡萄糖可诱导 miR-26a 表达。这与之前研究是一致的,Chen 等^[15]发现 miR-26a-5p 增加葡萄糖摄取,并表明细胞外葡萄糖浓度增加与 miR-26a-5p 表达之间存在正反馈回路。Bai 等^[16]研究发现,miR-26a 高表达不仅可以促进干细胞向胰岛素细胞分化,并且可以直接靶向抑制张力蛋白同源磷酸酶 (PTEN) 表达,从而改善 T2DM 小鼠中的 β 细胞功能障碍。由此可以推断,miR-26a 表达水平与血糖相关,糖尿病患者 miR-26a 上调可能是机体的代偿机制调节的结果。

本研究还发现 T2DM 大血管病变组 miR-26a 表达水平显著高于 T2DM 未合并大血管病变组。在糖尿病患者血浆中 miR-26a 主要来源于内皮细胞^[17],在内皮细胞中,高表达的 miR-26a,通过直接靶向动脉粥样硬化小鼠中的瞬时受体电势 6 (TRPC6) 来阻止内皮细胞凋亡^[18]。miR-26a 还可通过与 SMAD1 3'-非翻译区结合抑制内皮细胞中的骨形态发生蛋白 (BMPs)/SMAD1 信号传导途径,在体外和体内促进内皮细胞增殖、迁移和血管生成^[19]。并且,研究显示 miR-26a 通过 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 途径促进脑梗死后脑微血管内皮细胞 (BMECs) 的血管生成^[20]。然而,亦有报告显示 miR-26a 的异位表达抑制内皮细

胞增殖、迁移和血管生成^[19]。miR-26a 不仅参与调节内皮细胞的功能,对平滑肌细胞也具有明显的靶向调节。Leeper 等^[21]发现 miRNA-26a 过表达促进人主动脉血管平滑肌细胞 (VSMCs) 增殖。然而,miR-26a 对 VSMC 功能的影响与 Tan 等^[22]发现的结果相反,后者表明 miR-26a 的上调抑制了 VSMCs 的增殖和迁移,并减少了动脉内膜增生。Wu 等^[23]发现,miR-26a 通过靶向结缔组织生长因子 (CTGF) 在体外阻止血管平滑肌细胞钙化。因此,异常表达的血浆 miR-26a 可能参与了 T2DM 大血管病变的发生发展,miR-26a 有望成为诊断糖尿病血管病变的生物标志物。

综上所述,本研究发现 miR-26a 在 T2DM 患者中表达上调,且大血管病变患者中 miR-26a 的表达量显著高于单纯 T2DM 患者,miR-26a 的表达水平受 FPG 等诸多因素影响。拮抗或恢复 miRNA 功能已被确定为对其他疾病的有吸引力的干预措施:第一个针对丙型肝炎病毒的 miRNA 抑制剂目前处于临床试验阶段^[24],用于癌症治疗的 miRNA 模拟物也已进入临床。本研究为 T2DM 及其大血管病变的诊治提供了一定的参考。

参考文献

- [1] George MM, Copeland KC. Current treatment options for type 2 diabetes mellitus in youth: today's realities and lessons from the TODAY study[J]. *Curr Diab Rep*, 2013, 13(1): 72-80.
- [2] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 175-205.
- [3] Dragomir MP, Knutsen E, Calin GA. SnapShot: Unconventional miRNA functions[J]. *Cell*, 2018, 174(4): 1038.
- [4] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1006.
- [5] Stepień E, Durak-Kozica M, Kamińska A, et al. Circulating ectosomes: Determination of angiogenic microRNAs in type 2 diabetes [J]. *Theranostics*, 2018, 8(14): 3874-3890.
- [6] Filios SR, Shalev A. β -cell microRNAs: small but powerful[J]. *Diabetes*, 2015, 64(11): 3631-3644.
- [7] Song Y, Jin D, Jiang X, et al. Overexpression of microRNA-26a protects against deficient β -cell function via targeting phosphatase with tensin homology in mouse models of type 2 diabetes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1312-1316.
- [8] Menghini R, Casagrande V, Marino A, et al. MiR-216a: a link between endothelial dysfunction and autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1029.
- [9] Zhi H, Wu JP, Lu LM, et al. Decabromodiphenyl ether (BDE-209) enhances foam cell formation in human macrophages via augmenting Toll-like receptor 4-dependent lipid uptake [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 121: 367-373.
- [10] Jansen F, Yang X, Hoelscher M, et al. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles [J]. *Circulation*, 2013, 128(18): 2026-2038.
- [11] Liu R, Luo Q, You W, et al. MicroRNA-106 attenuates hyperglycemia-induced vascular endothelial cell dysfunction by targeting HMGB1 [J]. *Gene*, 2018, 677: 142-148.
- [12] Mao YY, Wang JQ, Guo XX, et al. Circ-SATB2 upregulates STIM1 expression and regulates vascular smooth muscle cell proliferation and differentiation through miR-939 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(1): 119-125.
- [13] Sun QR, Zhang X, Fang K. Phenotype of vascular smooth muscle cells (VSMCs) is regulated by miR-29b by targeting sirtuin 1 [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 6599-6607.
- [14] Icli B, Nabzdyk CS, Lujan-Hernandez J, et al. Regulation of impaired angiogenesis in diabetic dermal wound healing by microRNA-26a [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91: 151-159.
- [15] Chen B, Liu Y, Jin X, et al. MicroRNA-26a regulates glucose metabolism by direct targeting PDHX in colorectal cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 443.
- [16] Bai C, Gao Y, Li X, et al. MicroRNAs can effectively induce formation of insulin-producing cells from mesenchymal stem cells [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(12): 3457-3468.
- [17] Jansen F, Wang H, Przybilla D, et al. Vascular endothelial microparticles-incorporated microRNAs are altered in patients with diabetes mellitus [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15: 49.
- [18] Zhang Y, Qin W, Zhang L, et al. MicroRNA-26a prevents endothelial cell apoptosis by directly targeting TRPC6 in the setting of atherosclerosis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9401.
- [19] Icli B, Wara AK, Moslehi J, et al. MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling [J]. *Circ Res*, 2013, 113(11): 1231-1241.
- [20] Liang Z, Chi YJ, Lin GQ, et al. MiRNA-26a promotes angiogenesis in a rat model of cerebral infarction via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11): 3485-3492.
- [21] Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, et al. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(4): 1035-1043.
- [22] Tan J, Yang L, Liu C, et al. MicroRNA-26a targets MAPK6 to inhibit smooth muscle cell proliferation and vein graft neointimal hyperplasia [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46602.
- [23] Wu W, Shang YQ, Dai SL, et al. MiR-26a regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro through targeting CTGF [J]. *Bratisk Lek Listy*, 2017, 118(8): 499-503.
- [24] Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(18): 1685-1694.