

长链非编码 RNA MIAT 在 2 型糖尿病外周血单核细胞中的表达及相关性分析

耿佳¹, 刘芬², 曹莹^{1,3}, 邢远^{1,3}, 王雪梅^{1,2,3}

(1.西安医学院公共卫生学院卫生学教研室, 陕西 西安 710021;

2.新疆医科大学第一附属医院动物疾病模型研究重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830054;

3.陕西省公共安全医学防控研究中心, 陕西 西安 710021)

摘要:目的 研究 2 型糖尿病(T2DM)患者外周血单核细胞中长链非编码 RNA 心肌梗死相关转录本(MIAT)表达及其 T2DM 的相关性,评估了 lncRNA MIAT 作为 T2DM 生物标志物的潜在应用价值。**方法** 选取 2017 年 8 月~2018 年 2 月在新疆医科大学第一临床附属医院入院进行就诊的 100 例汉族 T2DM 患者作为 T2DM 组,另选 100 名健康受试者做对照组。分别收集临床资料和外周血,完成血生化指标的测定,用淋巴细胞分离液分离单核细胞,提取总 RNA,应用实时荧光定量 PCR 法检测 lncRNA MIAT 的表达。评价 lncRNA 作为 T2DM 生物标志物的诊断价值,分析相关危险因素。**结果** T2DM 组外周血单核细胞中 lncRNA MIAT 的 mRNA 水平高于对照组(1.90 ± 0.85 vs 1.11 ± 0.66),差异有统计学意义($P < 0.05$);受试者操作特征曲线分析显示,lncRNA MIAT 对 T2DM 具有良好的诊断价值($AUC=0.753$, $95\%CI:0.686 \sim 0.820$),多元回归分析显示 lncRNA MIAT 是 T2DM 的危险因素($OR=1.527$, $95\%CI=1.130 \sim 1.919$, $P=0.004$)。lncRNA MIAT 的表达与年龄、体重指数、低密度脂蛋白、总胆固醇、三油甘酯、空腹血糖、餐后 2h 血糖水平正相关,与性别、高血压、高密度脂蛋白水平负相关,其中具有显著相关性的是低密度脂蛋白($r=0.201$, $P<0.05$)、总胆固醇($r=0.221$, $P<0.05$)、空腹血糖($r=0.385$, $P<0.05$)、餐后 2h 血糖($r=0.342$, $P<0.05$)。**结论** 外周血单核细胞的 lncRNA MIAT 表达和 T2DM 正相关,MIAT 参与调控糖尿病的病理发生。

关键词: 2 型糖尿病;外周血单核细胞;长链非编码 RNA

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.12.002

文章编号:1006-1959(2021)12-0005-04

Expression and Correlation Analysis of Long-chain Non-coding RNAMIAT in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Type 2 Diabetes Mellitus

GENG Jia¹, LIU Fen², CAO Ying^{1,3}, XING Yuan^{1,3}, WANG Xue-mei^{1,2,3}

(1.Department of Hygiene, School of Public Health, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi, China;

2.The Key Laboratory of Animal Disease Model Research, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China;

3.Research Center for Medical Prevention and Control of Public Safety of Shaanxi Province, Xi'an 710021, Shaanxi, China)

Abstract: Objective To study the expression of long-chain non-coding RNA myocardial infarction-associated transcript (MIAT) in peripheral blood mononuclear cells of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its correlation with T2DM, and to evaluate the potential application value of lncRNA MIAT as a T2DM biomarker.**Methods** A total of 100 Han patients with T2DM who were admitted to the First Clinical Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University from August 2017 to February 2018 were selected as the T2DM group, and another 100 healthy subjects were selected as the control group. Collecting clinical data and peripheral blood separately, complete the determination of blood biochemical indicators, separate monocytes with lymphocyte separation fluid, extract total RNA, and use real-time fluorescent quantitative PCR to detect the expression of lncRNA MIAT. To evaluate the diagnostic value of lncRNA as a biomarker of T2DM, and analyze related risk factors.**Results** The mRNA level of lncRNA MIAT in peripheral blood mononuclear cells in the T2DM group was higher than that in the control group (1.90 ± 0.85 vs 1.11 ± 0.66), the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Receiver operating characteristic curve analysis showed that lncRNA MIAT has a good diagnostic value for T2DM ($AUC=0.753$, $95\%CI:0.686 \sim 0.820$). Multiple regression analysis showed that lncRNA MIAT was a risk factor for T2DM ($OR=1.527$, $95\%CI=1.130 \sim 1.919$, $P=0.004$). The expression of lncRNA MIAT was positively correlated with age, body mass index, low-density lipoprotein, total cholesterol, trioleylglycerol, fasting blood glucose, and 2h postprandial blood glucose level, and negatively correlated with gender, hypertension, and high-density lipoprotein level, which had significant correlation was low-density lipoprotein ($r=0.201$, $P<0.05$), total cholesterol ($r=0.221$, $P<0.05$), fasting blood glucose ($r=0.385$, $P<0.05$), and 2h postprandial blood glucose ($r=0.342$, $P<0.05$).**Conclusion** The expression of lncRNA MIAT in peripheral blood mononuclear cells is positively correlated with T2DM, and MIAT is involved in the regulation of the pathogenesis of diabetes.

Key words: Type 2 diabetes mellitus; Peripheral blood mononuclear cells; Long non-coding RNA

据估计,全世界年龄在 20~79 岁人群中,有 4.15 亿是糖尿病患者,每年约有 500 万人死于糖尿

基金项目:1.国家自然科学基金地区基金项目(编号:81760083);2.国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81900408);3.陕西省教育厅重点科学研究计划项目(编号:20JS137);4.西安医学院大学生创新创业训练计划项目(编号:省级:S201911840043;校级:121519067)

作者简介:耿佳(1997.12-),男,陕西山阳县人,本科

通讯作者:王雪梅(1983.2-),女,新疆库尔勒人,博士,副教授,主要从事心血管病学发病机制研究

病及其并发症,糖尿病相关疾病的医疗费用估计为 6730 亿美元。此外,截止 2025 年,糖尿病患者将增至 5.6 亿,约占全球人口的 7%。现阶段临床上主要通过综合治疗控制血糖,但是大多数 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者的血糖控制并不理想,易造成心、脑、肾等系统出现并发症,疾病预后较差,病死率较高^[1]。当前医学认知认为 T2DM 是由于多种遗传易感因素、环境和行为因素的相互作用所导致的,各种因素如何发挥作用有待进一步阐

明^[2]。空腹血浆葡萄糖(fasting blood-glucose, FBS)和口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)是糖尿病诊断的“金标准”^[3]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是长度大于200个核苷酸的非编码RNA。研究表明^[4], lncRNA在剂量补偿效应、表观遗传调控、细胞周期调控和细胞分化调控等众多生命活动中发挥重要作用,作为遗传易感因素,从基因水平转录调节或转录后调节能量代谢,成为遗传学研究热点。同时,人体2型糖尿病相关的许多单核苷酸多态性位点都是坐落在lncRNA区域内,其中长链非编码RNA心肌梗死相关转录本(myocardial infarction-associated transcript, MIAT)在急性心梗和T2DM及其并发症中的表达都存在显著差异^[5]。不同于mRNA, lncRNA作为生物标志物有自身的优势,其本身就是功能分子,其的表达水平能更好地反映疾病状态,其表达模式高度特异,提示其表达状态可以被用于某些疾病的精细分期或分类。因此,本研究从基因水平分析lncRNA MIAT与临床指标之间的联系,作为T2DM诊断标志物的价值及参与调控T2DM的机制,为T2DM的寻找新的生物诊断和治疗靶点,提供有价值的理论基础和实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2017年8月~2018年2月在新疆医科大学第一临床附属医院入院进行就诊的100例汉族T2DM患者作为T2DM组。纳入标准:依据2013年中国糖尿病防治指南公布的2型糖尿病诊断标准:空腹血浆葡萄糖 ≥ 7.0 mmol/L或口服糖耐量实验(OGTT)后2h血糖 ≥ 11.1 mmol/L或既往有确切糖尿病病史、正在使用降糖药物或胰岛素者。排除标准:①其他特殊类型糖尿病;②恶性肿瘤;③慢性炎症等相关疾病;④严重的心肝肺肾等疾病;⑤自身免疫性疾病。选择同期在该院进行就诊的汉族

非T2DM患者作为对照组,共100例。纳入标准:空腹血浆葡萄糖 < 6.1 mmol/L和OGTT后2h血糖 < 7.8 mmol/L。排除标准:①既往诊断为2型糖尿病;②合并其他内分泌疾病;③恶性肿瘤;④急、慢性感染及严重传染性疾病患者;⑤严重的心肝肺肾等疾病;⑥自身免疫性疾病。所有研究对象均为无血缘关系并且在新疆地区长久居住的常住人口,排除了环境差异而引起的基因变异。本研究方案经新疆医科大学第一附属医院医学伦理委员会批准,研究对象均自愿签署书面知情同意书。

1.2 血生化指标的测定 采集两组清晨空腹抽取静脉血5 ml,全血样本在室温下保存30 min,以使血液凝固。样品在4℃下3000 r/min离心10 min分离血清,用全自动生化分析仪应用标准试剂盒检测包括FPG、餐后2h血糖、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、尿酸、肌酐、尿素等生化指标。生化指标均由新疆医科大学第一附属医院检验中心统一测定。

1.3 外周血RNA提取和反转录 将3~5 ml肝素抗凝全血样品以3500 r/min离心10 min,用淋巴细胞分离液(Solarbio, 中国)分离单核细胞,将分离出来的单核细胞用4℃预冷的D-Hanks缓冲液冲洗2次,离心沉淀后加入1 ml细胞裂解液(Trizol, Invitrogen, USA),置于冰上反复轻轻吹打细胞至混匀。常规方法提取细胞总RNA,按照试剂说明将RNA逆转录合成cDNA(Thermo, USA)。

1.4 实时荧光定量PCR法检测lncRNA的表达 检测lncRNA MIAT的编号、lncRNA的位置和扩增引物见表1。按照SYBR GREEN试剂盒(Applied Biosystems, USA)说明书,应用实时荧光定量PCR仪(500 HT Fast real-time PCR system, BIO-RAD, USA)进行实时荧光定量反应测定相关RNA分子的表达。

表1 选取的T2DM相关lncRNAs分子的位置和实时荧光定量反应的引物序列

基因名称	基因编号	染色体位置	引物序列(5'-3')
MIAT	NR_003491.2	chr22:27,042,392-27,072,440	Forward: GGAGGCATCTAAGCTGAGCTGTG
			Reverse: CGGCACCATGTCCATGTCTC
Gapdh			Forward: GCAAATTCATGGCACCCT
			Reverse: TCGCCCCACTTGATTTTG

1.5 统计学方法 采用IBM SPSS 22.0统计软件进行统计分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料用(n)和($\%$)表示,做 χ^2 检验。连续型变量的比较采用独立样本 t 检验。采用实时荧光定量PCR的数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法, ΔCT =目的基因CT值-内参基因CT值, $\Delta\Delta CT$ =T2DM组 ΔCT 值-对照组 ΔCT 值。相关性检验采用Spearman法检测,ROC曲线法分析其作为诊断标志物的价值。多变量Logistic回归分析

MIAT与T2DM的关系,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 两组性别、年龄、体重指数、舒张压、尿素、肌酐和尿酸比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);两组高血压、收缩压、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、空腹血糖和餐后2h血糖比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 两组一般资料比较 $[\bar{x}\pm s, n(\%)]$

项目	对照组($n=100$)	T2DM组($n=100$)	统计值	P
年龄(岁)	53.47 \pm 7.39	54.88 \pm 9.44	1.176	0.253 ^a
性别	51(51.00)	56(56.00)	0.502	0.478 ^b
高血压	15(15.00)	35(35.00)	10.667	0.001 ^b
体重指数	24.57 \pm 2.96	24.70 \pm 2.16	0.360	0.719 ^a
收缩压(mmHg)	118.74 \pm 15.12	128.01 \pm 18.71	3.272	0.000 ^a
舒张压(mmHg)	75.25 \pm 12.05	78.61 \pm 12.10	2.656	0.004 ^a
总胆固醇(mmol/L)	3.86 \pm 0.48	4.38 \pm 0.99	4.771	0.000 ^a
甘油三酯(mmol/L)	1.06 \pm 0.27	2.08 \pm 1.63	6.158	0.000 ^a
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.18 \pm 0.22	1.05 \pm 0.32	-3.440	0.003 ^a
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.46 \pm 0.44	2.82 \pm 0.84	3.815	0.000 ^a
尿素(mmol/L)	5.18 \pm 1.44	5.31 \pm 1.38	0.309	0.489 ^a
肌酐(μ mol/L)	62.99 \pm 12.77	63.62 \pm 15.30	0.313	0.801 ^a
尿酸(μ mol/L)	295.50 \pm 54.79	306.05 \pm 91.50	0.989	0.354 ^a
空腹血糖(mmol/L)	4.92 \pm 0.53	9.35 \pm 2.79	15.614	0.000 ^a
餐后2h血糖(mmol/L)	6.55 \pm 1.20	9.68 \pm 1.66	15.245	0.006 ^a

注:^a代表连续型变量的比较采用独立样本 t 检验,^b代表计数资料用 χ^2 检验

2.2 外周血中 lncRNA MIAT 的表达 通过检测 lncRNA MIAT 在 T2DM 组和对照组的表达发现,在糖尿病患者的外周血中 MIAT 的表达显著升高,差异表达倍数是 (1.90 ± 0.85) vs (1.11 ± 0.66) ($P=0.004$)。

2.3 评价 MIAT 作 T2DM 生物标志物的价值 通过 ROC 曲线分析,MIAT 的 AUC 为 0.753 (95% CI=0.689~0.817) 见图 1,MIAT 的最佳临界点的是 0.950,相应的灵敏度是 0.970,特异度是 0.470,95% CI=0.686~0.820。进行多变量 Logistic 回归分析,进一步验证 MIAT 是 T2DM 的危险因素 [$OR=1.527$,95% CI=1.130~1.919],见表 3。进一步检测了 lncRNA MIAT 表达与糖尿病危险因素、血糖水平指标之间的相关性。Spearman 相关性分析结果表明,lncRNA MIAT 的变化与高血压、低密度脂蛋白

(LDL)、总胆固醇、甘油三酯、空腹血糖、糖耐量呈正相关($P<0.05$),见表 4。

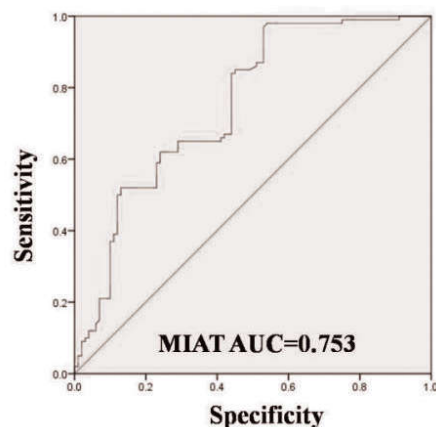


图1 lncRNA MIAT 的曲线下面积

表3 多元回归分析糖尿病患病危险因素

项目	B	S.E.	Wald	P	OR	95% CI	
						Low	High
MIAT	0.387	0.135	8.216	0.007	1.527	1.130	1.919
年龄	0.041	0.023	3.173	0.075	1.041	0.996	1.089
高血压	0.647	0.319	4.121	0.042	1.909	1.023	3.564
总胆固醇	0.570	1.307	0.190	0.663	1.768	0.136	22.918
甘油三酯	1.931	0.575	11.259	0.001	6.893	2.232	21.289
高密度脂蛋白	-0.994	1.258	0.625	0.429	0.370	0.031	4.354
低密度脂蛋白	-0.294	1.381	0.045	0.831	0.745	0.050	11.156

表4 糖尿病人外周血单核细胞中 MIAT 的表达和糖尿病危险因素、血糖参数的相关性

项目	MIAT		项目	MIAT	
	r	P		r	P
糖尿病危险因素			低密度脂蛋白	0.201	0.004
年龄	0.132	0.062	总胆固醇	0.221	0.002
性别	-0.041	0.565	甘油三酯	0.274	<0.001

表4(续)

项目	MIAT		项目	MIAT	
	<i>r</i>	<i>P</i>		<i>r</i>	<i>P</i>
体重指数	0.035	0.626	血糖参数		
高血压	-0.219	0.002	空腹血糖	0.385	<0.001
高密度脂蛋白	-0.037	0.608	餐后2h血糖	0.342	<0.001

3 讨论

T2DM 是一组以血糖浓度升高为特征的代谢紊乱^[6]。本研究中 T2DM 组 lncRNA MIAT 对照组表达较增加($P<0.05$),表明 lncRNA MIAT 对于 T2DM 有一定的诊断价值。近年来,lncRNA 作为 T2DM 的生物标志物和新的干预治疗靶点研究是新的追踪热点^[7,8]。lncRNA 生物标志物在循环水平上较传统的蛋白质生物标志物更稳定,检测灵敏度更高^[9,10]。可用 qRT-PCR 检测 RNA 的微量表达,作为疾病诊断的辅助指标^[11]。

心肌梗死相关转录本 lncRNA MIAT 位于人 22 号染色体上,是 T2DM 的敏感部位,MIAT 水平与 T2DM 呈正相关^[9]。高糖血症能够导致内皮细胞 MIAT 表达水平增加,STZ 诱导的糖尿病小鼠模型中 MIAT 和 NF- κ Bp-p65 表达增加^[12]。体外实验显示 MIAT 敲除能够缓解糖尿病诱导的视网膜的新血管形成,血管渗漏和炎症^[13]。本研究与既往研究结果一致,MIAT 与糖尿病发病呈正相关,且进一步探讨了其相关性和诊断价值。通常根据 ROC 中的 AUC 数值、特异性和敏感性数值来判断检测指标是否具有诊断价值,尽管研究中 MIAT 的 AUC 值是 0.753,但也是具有巨大潜力和价值的诊断标志物(0.7~0.8 良好;0.6~0.7 有效)^[14,15]。糖尿病患者外周血单核细胞中 MIAT 的表达和脂代谢、总胆固醇、甘油三酯、血糖参数与 MIAT 的表达呈正相关,且具有显著差异性,提示 MIAT 的表达和脂质代谢与血糖水平密切相关。

综上所述,在疾病的病理发生中 lncRNA 分子发挥着重要的作用,探讨其在疾病病理发生中的调节作用机制,对于疾病的干预和治疗有着重要的意义。对 lncRNAs 的进一步研究将促进心血管疾病发病机制的认识。在这项实验研究中,探讨了 MIAT 在全血样本的外周血单核细胞的表达,还未检测血清中 MIAT 的表达,两者表达和作用途径是否相同有待进一步探明。PBMCS 中的 lncRNA MIAT 可能是诊断 AMI 的有效生物标志物,探讨其调控机制可能成为 T2DM 治疗的一个潜在应用方向。

参考文献:

- [1]中华医学会糖尿病学分会.中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J].中国实用内科杂志,2018,38(4):292-344.
- [2]Banerjee A,Singh J.Remodeling adipose tissue inflammasome for type 2 diabetes mellitus treatment:Current perspective and translational strategies[J].Bioeng Transl Med,2019,5(2):e10150.
- [3]Laakso M.Biomarkers for type 2 diabetes [J].Mol Metab,2019,27S(Suppl):S139-S146.

- [4]de Gonzalo-Calvo D,Kenneweg F,Bang C,et al.Circulating Long Noncoding RNAs in Personalized Medicine:Response to Pioglitazone Therapy in Type 2 Diabetes[J].J Am Coll Cardiol,68(25):2914-2916.
- [5]Leung A,Natarajan R.Long Noncoding RNAs in Diabetes and Diabetic Complications [J].Antioxid Redox Signal,2018,29(11):1064-1073.
- [6]Chihara A,Tanaka A,Morimoto T,et al.Differences in lipid metabolism between anagliptin and sitagliptin in patients with type 2 diabetes on statin therapy:a secondary analysis of the REASON trial[J].Cardiovasc Diabetol,2019,18(1):158.
- [7]Feng T,Li K,Zheng P,et al.Weighted Gene Coexpression Network Analysis Identified MicroRNA Coexpression Modules and Related Pathways in Type 2 Diabetes Mellitus [J].Oxid Med Cell Longev,2019(2019):9567641.
- [8]Zhang L,Li R,He J,et al.Co-expression analysis among microRNAs,long non-coding RNAs,and messenger RNAs to understand the pathogenesis and progression of diabetic kidney disease at the genetic level[J].Methods,2017(124):46-56.
- [9]Sathishkumar C,Prabu P,Mohan V,et al.Linking a role of lncRNAs(long non-coding RNAs)with insulin resistance,accelerated senescence,and inflammation in patients with type 2 diabetes [J].Hum Genomics,2018,12(1):41.
- [10]Goyal N,Kesharwani D,Datta M.Lnc-ing non-coding RNAs with metabolism and diabetes:roles of lncRNAs [J].Cell Mol Life Sci,2018,75(10):1827-1837.
- [11]Shaker OG,Abdelaleem OO,Mahmoud RH,et al.Diagnostic and prognostic role of serum miR-20b,miR-17-3p,HOTAIR, and MALAT1 in diabetic retinopathy[J].IUBMB Life,2019,71(3):310-320.
- [12]Xia C,Liang S,He Z,et al.Metformin,a first-line drug for type 2 diabetes mellitus,disrupts the MALAT1/miR-142-3p sponge to decrease invasion and migration in cervical cancer cells[J].Eur J Pharmacol,2018(830):59-67.
- [13]Wang XM,Li XM,Song N,et al.Long non-coding RNAs H19,MALAT1 and MIAT as potential novel biomarkers for diagnosis of acute myocardial infarction [J].Biomed Pharmacother,2019(118):109208.
- [14]Sun G,Li Y,Ji Z.Up-regulation of MIAT aggravates the atherosclerotic damage in atherosclerosis mice through the activation of PI3K/Akt signaling pathway [J].Drug Deliv,2019,26(1):641-649.
- [15]Yan B,Tao ZF,Li XM,et al.Aberrant expression of long non-coding RNAs in early diabetic retinopathy [J].Invest Ophthalmol Vis Sci,2014,55(2):941-951.

收稿日期:2020-12-17;修回日期:2021-01-15

编辑/宋伟