

# 1 型糖尿病患者血浆 microRNA-126 变化与内皮功能的相关性

何亚非, 黄婷, 刘艳霞, 彭佳欣, 栗夏连

(郑州大学第一附属医院内分泌科, 河南省郑州市 450052)

[关键词] microRNA-126; 1 型糖尿病; 内皮功能; 血管并发症

[摘要] **目的** 探讨 1 型糖尿病患者血浆 microRNA-126 表达水平的变化及其临床意义, 并分析 microRNA-126 与内皮功能的关系。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 47 例 1 型糖尿病患者及 50 例健康对照组人群血浆 microRNA-126 的表达水平, 酶联免疫吸附法检测人内皮型一氧化氮合酶(eNOS)含量, 分析血浆 microRNA-126 表达水平与人内皮型一氧化氮合酶含量的相关性。**结果** 与健康对照组相比, 1 型糖尿病组血浆 microRNA-126 表达水平明显下降( $P < 0.05$ ), 人内皮型一氧化氮合酶含量也明显下降( $P < 0.05$ )。相关分析显示血浆 microRNA-126 表达水平与人内皮型一氧化氮合酶含量呈明显正相关( $P < 0.05$ )。**结论** 1 型糖尿病患者血浆 microRNA-126 水平呈低表达, 而糖尿病患者常伴有内皮功能损伤, 提示 microRNA-126 的下调可能与内皮损伤有关。microRNA-126 可能通过介导内皮功能的损伤而参与 1 型糖尿病血管并发症的发生发展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## The Relationship Between Plasma Level of MicroRNA-126 and Endothelial Function in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus

HE Ya-Fei, HUANG Ting, LIU Yan-Xia, PENG Jia-Xin, and LI Xia-Lian

(Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[KEY WORDS] MicroRNA-126; Type 1 Diabetes Mellitus; Endothelial Function; Vascular Complication

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the clinical significance of microRNA-126 (miR-126) expression level in peripheral plasma from type 1 diabetic patients and the relationship between miR-126 expression level and the endothelial injury of type 1 diabetes mellitus. **Methods** The miR-126 expression level was investigated in plasma from 47 type 1 diabetic patients and 50 healthy matched controls by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR). The expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The relationship between miR-126 and the endothelial injury of type 1 diabetes mellitus was analyzed by correlation analysis. **Results** The miR-126 expression level was significantly decreased in the group of T1DM compared to control group. Also, the expression of eNOS was significantly decreased in the group of T1DM. MiR-126 was positively correlated with eNOS. **Conclusions** The expression level of miR-126 in peripheral plasma from type 1 diabetic patients was lower than that of the healthy controls. T1DM patients were often accompanied with endothelial dysfunction and vascular complications, so this indicated that the decreased expression of miR-126 was involved in the endothelial dysfunction of T1DM. MiR-126 may be mediated by endothelial injury and participate in the development and progression of diabetic vascular complications.

内皮功能障碍和所导致的血管病变已经被认为是多种疾病的病理基础, 包括糖尿病、高血压病等<sup>[1]</sup>。而 1 型糖尿病中致动脉粥样硬化危险因素发生率明显增加, 如长期高血糖、脂质代谢紊乱、血

压升高、肥胖等<sup>[2]</sup>。microRNA-126 (miR-126) 是内皮细胞特异性表达的 microRNA, 在内皮微颗粒中含量丰富。研究发现 2 型糖尿病患者内皮细胞 miR-126 表达下降, 但 1 型糖尿病 (type 1 diabetes melli-

[收稿日期] 2013-10-30

[基金项目] 河南省卫生厅省部共建项目 (201201015)

[作者简介] 何亚非, 硕士研究生, E-mail 为 heyafei2007@163.com。黄婷, 硕士研究生。通讯作者栗夏连, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事内分泌代谢疾病的诊断和治疗, E-mail 为 xialianli@hotmail.com。

tus, T1DM)患者中 miR-126 表达水平尚未见报道。本研究检测 T1DM 患者血浆 miR-126 表达水平,并分析其与 T1DM 患者内皮损伤的关系,旨在探讨 T1DM 及其血管并发症发生发展的机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集 2012 年 3 月至 2013 年 3 月就诊于我院内分泌科 1 型糖尿病患者 47 例,其中伴有微血管病变者 12 例,大血管病变者 17 例;47 例中男 22 例,女 25 例,年龄  $29.3 \pm 2.4$  (13 ~ 54) 岁;其中被诊断为成人迟发性自身免疫性糖尿病 (latent autoimmune diabetes in adult, LADA) 者有 11 例;健康对照者 50 例,男 26 例,女 24 例,年龄  $31.2 \pm 1.1$  (16 ~ 41) 岁。

### 1.2 入组标准

1 型糖尿病组 (符合 ADA 的糖尿病诊断标准): ①FPG  $\geq 7.0$  mmol/L (126 mg/dL)。空腹状态定义为至少 8 ~ 12 个小时无任何热量摄入。②有糖尿病症状,并且任意时间血浆葡萄糖  $\geq 11.1$  mmol/L (200 mg/dL)。任意时间是指 1 日内任何时间,无论上一次进餐时间及食物摄入量。典型的糖尿病症状是多尿、多饮和难以解释的体重减轻。③OGTT 2 小时血浆葡萄糖 (PG)  $\geq 11.1$  mmol/L (200 mg/dL)。OGTT 采用 75 g 无水葡萄糖负荷。负荷上述标准之一的患者,在次日复诊仍符合 3 条标准之一者即诊断为糖尿病,且空腹 C-肽  $< 0.4$  nmol/L,谷氨酸脱羧酶抗体 (GAD-Ab) 阳性;健康对照组 (OGTT 结果为 FPG  $< 6.1$  mmol/L, 2 h PG  $< 7.8$  mmol/L,无糖尿病家族史,并排除可能存在的自身免疫性疾病)。排除标准:所有入组对象要求 BMI  $< 25$  kg/m<sup>2</sup>,无高血压病、多囊卵巢综合征、肺部疾病、肾病、肿瘤、白血病及血栓病史,均属非吸烟人群,无合并其他影响糖代谢的疾病,如甲亢、肢端肥大症、库欣综合征等。

### 1.3 临床指标的测定

由专人测量研究对象的身高、体重,并计算体质指数 (body mass index, BMI)。

### 1.4 血浆总 RNA 提取

收集 3 mL 新鲜 EDTA 抗凝血,室温下 3 kr/min 离心 10 min,将获得的上层血浆分装到几个冻存管中,储存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱,待标本收集完成后统一采用 Molecular Research Center 总 RNA 提取试剂盒 (TB-126) 提取血浆中游离总 RNA。

### 1.5 miR-126 表达的检测

miR-126 定量检测采用逆转录荧光定量聚合酶链反应方法,利用荧光信号的变化,实时监测 PCR 扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化,通过 Ct 值和标准曲线的分析,对起始模板进行定量分析,以 U6 为内参。(1)逆转录试剂盒 (编号 DRR037A, TaKaRa 公司,大连),在 Tpersonal PCR 仪 (Biometra 公司,德国)上进行逆转录。反应体系 10  $\mu\text{L}$ ,包括:提取总 RNA 按 1:1 稀释后取 2  $\mu\text{L}$ ,逆转录缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5  $\mu\text{L}$ , has-miR-126-3p RT Primer /U6-RT Primer 0.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:  $37^{\circ}\text{C}$  15 min;  $85^{\circ}\text{C}$  5 s;  $4^{\circ}\text{C}$  pause, 逆转录产物 (cDNA) 立即进行实时荧光定量 PCR 检测。(2)实时荧光定量 PCR 检测:采用荧光定量 PCR 试剂盒 (编号 DRR820A, TaKaRa 公司,大连)在 LightCycler 1.5 Real Time PCR 仪 (Roche 公司,德国)上进行 PCR 反应,每个 cDNA 样本同时检测 3 次,循环阈值 (CT 值) 取 3 次平均值。反应体系 20  $\mu\text{L}$ ,包括: SYBR premix Ex Taq TM II (2  $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ , PCR Forward Primer (5  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , PCR Reverse Primer (5  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 逆转录产物 2  $\mu\text{L}$ , 无 RNA 酶水补足至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件如下:预变性:  $95^{\circ}\text{C}$  30 s 1 个循环;扩增反应:  $95^{\circ}\text{C}$  5 s,  $55^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s, 45 个循环;融解曲线分析:  $95^{\circ}\text{C}$  0 s,  $65^{\circ}\text{C}$  15 s,  $95^{\circ}\text{C}$  0 s 0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ , 采集数据。(3)miR-126 相对含量计算方法:  $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{miR-126}} - \text{CT}_{\text{U6}}$ ,  $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} - \Delta\text{CT}_{\text{对照组}}$ ,  $-\Delta\Delta\text{CT} = -(\Delta\text{CT} - \Delta\text{CT}_{\text{对照组}})$ , 以  $\log_2 (-\Delta\Delta\text{CT})$  表示 miR-126 的相对含量。逆转录和荧光实时定量 PCR 检测所用引物由广州锐博公司提供,编号分别是: has-miR-126-3p RT primer: 15373. 60; has-miR-126-3p Forward primer: 9641. 02; miR-Reverse primer: 10239. 41; U6 RT Primer: 6092. 02; U6 Forward primer: 5131. 39; U6 Reverse primer: 6092. 02。

### 1.6 人内皮型一氧化氮合酶蛋白表达的检测

取全血 2 mL 置入 EDTA 抗凝管中, 3 kr/min 离心 10 min, 取其上层血浆, 采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定其血浆内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 水平。人一氧化氮合成酶 ELISA 试剂盒由北京永辉生物科技有限公司提供, 编号 E-11099, 批内差异 9%, 批间差异 11%, 线性范围 0.8 ~ 30  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$

表示,计量资料组间比较采用独立样本  $t$  检验。相关性检验采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料比较

两组年龄、性别、体质指数比较差异无显著性(表 1)。

表 1. 两组年龄、性别、BMI 比较

Table 1. Comparison of general data between the groups

分 组	年龄(岁)	男/女(例)	BMI(kg/m <sup>2</sup> )
对照组	31.2 ± 1.1	26/24	22.35 ± 0.82
1 型糖尿病组	29.3 ± 2.4	22/25	21.68 ± 0.73

### 2.2 两组中 miR-126 基因表达水平及 eNOS 含量比较

与健康对照组相比,miR-126 基因表达水平及 eNOS 含量在 T1DM 组中均明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;表 2、图 1 和图 2)。

### 2.3 相关分析

miR-126 CT 值与 eNOS 含量呈明显负相关,秩和相关系数  $r = -0.560, P < 0.001$ (图 3)。

表 2. 两组 miR-126 基因表达水平及 eNOS 含量比较

Table 2. The levels of miR-126 gene expression and eNOS content in the groups

变 量	对照组	1 型糖尿病组
miR-126	1.00(0.61 - 1.65)	0.35(0.18 - 0.68) <sup>a</sup>
eNOS(μmol/L)	20.12 ± 1.712	16.19 ± 1.589 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较。

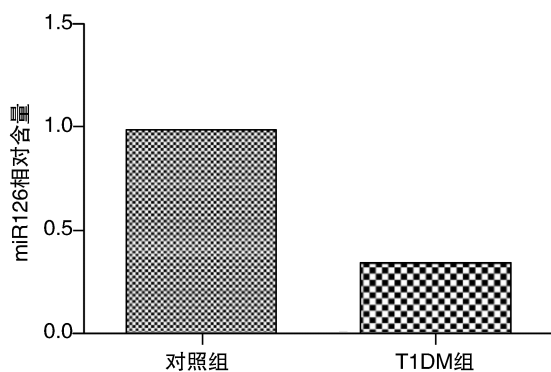


图 1. 两组 miR-126 基因表达水平含量比较

Figure 1. Comparison of relative miR-126 level between two groups

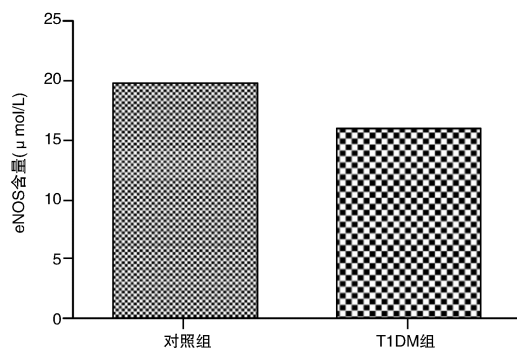


图 2. 两组 eNOS 含量比较

Figure 2. Comparison of eNOS content between two groups

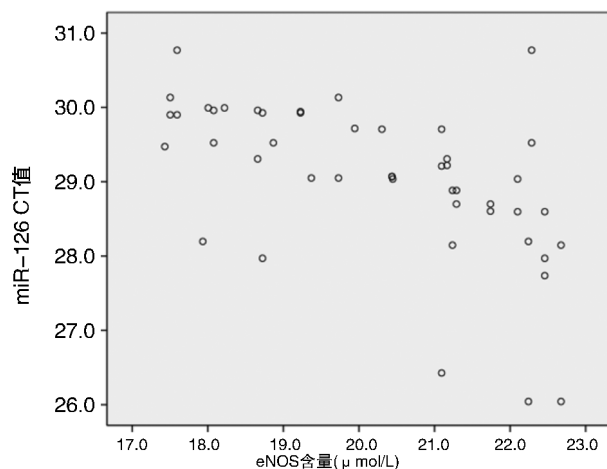


图 3. miR-126 基因表达水平与 eNOS 含量相关性分析

Figure 3. Correlation analysis of miR-126 gene expression and eNOS content

## 3 讨论

microRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,它们在动植物中参与转录后基因表达调控。已有研究表明 miRNA 可以参与血管形成及内皮修复<sup>[3]</sup>。国内外研究学者发现 miR-126 在 2 型糖尿病及其并发症中表达下调<sup>[4,5]</sup>。但目前关于 miR-126 在 1 型糖尿病患者中的作用尚未见报道。本研究发现 1 型糖尿病患者血浆 miR-126 表达水平明显下降,而 miR-126 是一种内皮细胞特异性高表达的 miRNA<sup>[6]</sup>,其表达下降与内皮细胞损伤及血管病变有关。本研究中 47 例 1 型糖尿病患者中伴有微血管病变者 12 例,伴有大血管病变者 17 例,与之前的研究结果<sup>[4,7]</sup>一致。

NO 是血管结构中一种重要的保护性分子,而血管性 NO 大部分是由 eNOS 催化合成的。血管性

NO 可以通过刺激可溶性鸟苷酸环化酶和增加平滑肌细胞中 cGMP 水平而舒张所有类型的血管<sup>[8]</sup>。eNOS 表达水平与内皮功能密切相关,在内皮祖细胞中,脂蛋白可以通过抑制 eNOS 的表达损伤内皮祖细胞的功能<sup>[9]</sup>,另外,eNOS 的表达水平在多种心血管疾病中均发生改变,例如动脉粥样硬化、糖尿病和高血压病<sup>[10]</sup>等。本研究发现 1 型糖尿病组 eNOS 表达含量明显下降,提示 1 型糖尿病患者可伴随严重的内皮功能紊乱。Joshi 等<sup>[11]</sup>研究发现体外环境下,高血糖和氧化应激可以迅速引起内皮功能障碍,但是在糖尿病早期阶段内皮依赖性舒张功能可以维持正常。在诱导的 6 周的 T1DM 小鼠中,尽管氧化应激水平增加,但是由于 eNOS 表达增加,进而引起 NO 合成增加,因此内皮依赖性舒张功能可以维持正常水平。由此可见,在糖尿病初期阶段,eNOS 表达水平可代偿性的增加,起到一种保护作用,但长期的高血糖状态可导致 eNOS 表达失代偿。

相关分析显示,在 T1DM 患者血浆中,miR-126CT 值与 eNOS 呈明显负相关,而 CT 值越大,miR-126 含量越少,因此 miR-126 表达水平与 eNOS 含量呈明显正相关,这提示 miR-126 是一种内皮功能保护性因素。研究发现 miR-126 表达水平的下降可以介导糖尿病患者的内皮损伤,损伤的机制可能是通过抑制 eNOS 而降低一氧化氮(nitric oxide, NO)的生物活性,或者通过降低 p65 蛋白的巯基亚硝基化作用而激活 NF- $\kappa$ B 的表达,进而降低蛋白质的巯基亚硝基化作用<sup>[12,13]</sup>。Zernecke 等<sup>[14]</sup>研究发现内皮凋亡小体中所含的 miR-126 可以通过 SDF-1/CXCR4 途径发挥减少内皮损伤及抗动脉粥样硬化作用。这与本研究的结果一致,进一步提示 miR-126 可能通过调节 eNOS 的表达而参与糖尿病内皮损伤及血管并发症的发生。

总之,本研究发现,miR-126 在 1 型糖尿病患者血浆中表达水平下降,并且与内皮功能损伤有关。但 miR-126 损伤内皮进而引起糖尿病血管并发症的具体机制尚不清楚,需要进一步深入研究。同时,糖尿病患者中致内皮损伤的危险因素很多,本研究中未进行一一研究,仍需要进行大规模的临床回归分析研究。

#### [参考文献]

[1] Steppan J, Nyhan D, Berkowitz D E. Development of novel

arginase inhibitors for therapy of endothelial dysfunction [J]. *Front Immunol*, 2013, 278(4): 1-6.

[2] Schwab KO, Doerfer J, Krebs A, et al. Early atherosclerosis in childhood type 1 diabetes: role of raised systolic blood pressure in the absence of dyslipidaemia [J]. *Eur J Pediatr*, 2007, 166(6): 541-548.

[3] Shantikumar S, Caporali A, Emanuelli C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications [J]. *Cardiovasc Research*, 2012, 93(4): 583-593.

[4] Zampetaki A, Kiechl Res S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes novelty and significance [J]. *Circ Res*, 2010, 107(6): 810-817.

[5] 卢佩颖,谷卫,陈岳明. 2 型糖尿病患者血清 miR-126 表达的临床意义 [J]. *心脑血管病防治*, 2012, 12(1): 10-11.

[6] Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2): 272-284.

[7] Meng S, Cao JT, Zhong B, et al. Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients, impairs their functional properties, via target gene Spred-1 [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(1): 64-72.

[8] Kusche-Vihrog K, Urbanova K, Blanqué A, et al. C-reactive protein makes human endothelium stiff and tight [J]. *Hypertension*, 2011, 57(2): 231-237.

[9] 张凯,李爽,许选选,等. 脂蛋白(a)通过抑制内皮型一氧化氮合酶表达损伤内皮祖细胞 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(3): 210.

[10] Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation [J]. *Vascul Pharmacol*, 2008, 49(4): 134-140.

[11] Joshi A, Woodman OL. Increased nitric oxide activity compensates for increased oxidative stress to maintain endothelial function in rat aorta in early type 1 diabetes [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2012, 385(11): 1083-094.

[12] Wang X, Liu W, Wu Y, et al. C-reactive protein reduces protein S-nitrosylation in endothelial cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 375(1-2): 131-138.

[13] Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease from marvel to menace [J]. *Circulation*, 2006, 113(13): 1708-714.

[14] Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection [J]. *Sci Signal*, 2009, 2(100): ra81.

(此文编辑 李小玲)