

miR-2467、miR-96-5p 在妊娠期糖尿病中的临床意义

胡丽芳 李岚 严倩

武汉市第五医院产科,湖北武汉 430050

摘要 目的:探讨微小核糖核酸-2467(miR-2467)、miR-96-5p在妊娠期糖尿病(GDM)中的临床意义。方法:纳入108例GDM住院患者作为GDM组,另选取同期产检的糖耐量正常孕妇82例为对照组。比较2组血清miR-2467、miR-96-5p相对表达量以及空腹血糖(FBG)、餐后2h血糖(2hPG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),分析miR-2467、miR-96-5p与上述血糖指标的相关性。采用Logistic多元回归模型分析GDM发生的危险因素,绘制受试者工作特征曲线,分析miR-2467、miR-96-5p评估GDM的曲线下面积(AUC)。结果:GDM组血清miR-2467表达、FBG、2hPG、HbA1c水平及HOMA-IR高于对照组,miR-96-5p表达低于对照组($P < 0.05$)。Pearson相关性分析显示血清miR-2467表达与FBG、2hPG、HbA1c、HOMA-IR呈正相关,血清miR-96-5p表达与上述4项指标呈负相关($P < 0.05$)。Logistic多元回归分析示孕早期BMI增长 $\geq 1.73 \text{ kg/m}^2$ 、孕中期BMI增长 $\geq 4.88 \text{ kg/m}^2$ 、糖尿病家族史、miR-2467 ≥ 3.44 是GDM发生的危险因素,miR-96-5p ≥ 1.95 是GDM发生的保护因素($P < 0.05$)。血清miR-2467联合miR-96-5p评估GDM的AUC为0.865,敏感度、特异度分别为91.50%、81.50%。结论:miR-2467、miR-96-5p与GDM患者血糖指标及HOMA-IR存在相关性,对评估GDM具有一定意义。

关键词 妊娠期糖尿病; miR-2467; miR-96-5p; 微小核糖核酸; 血糖; 胰岛素抵抗指数

中图分类号 R587.1 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20240207

Clinical significance of miR-2467 and miR-96-5p in gestational diabetes mellitus HU Li-fang, LI Lan, YAN Qian.

Department of Obstetrics, Wuhan Fifth Hospital, Hubei Wuhan 430050, China

Corresponding author: LI Lan, E-mail:2487969322@qq.com

Abstract Objective: To investigate the clinical significance of microRNA -2467 (miR-2467) and miR-96-5p in gestational diabetes mellitus (GDM). Methods: A total of 108 inpatients with GDM were included as the GDM group, and 82 pregnant women with normal glucose tolerance during prenatal examinations were included as the control group. The relative expression levels of miR-2467, miR-96-5p, fasting plasma glucose (FPG), 2-h postprandial blood glucose (2hPG), hemoglobin A1c (HbA1c) and homeostasis model assessment-insulin resistant index (HOMA-IR) were compared between the two groups, and the correlation between miR-2467, miR-96-5p and the above blood glucose indicators was analyzed. Logistic multivariate regression modeling was used to analyze the risk factors of GDM, and subject working characteristic curve was drawn to analyze the area under the curve (AUC) of miR-2467 and miR-96-5p to evaluate GDM. Results: The expression levels of serum miR-2467, FPG, 2hPG, HbA1c and HOMA-IR in GDM group were higher than those in control group, and the expression of miR-96-5p was lower than that in control group (all $P < 0.05$). Pearson linear correlation analysis showed that the expression of serum miR-2467 was positively correlated with FPG, 2hPG, HbA1c and HOMA-IR, and the expression of serum miR-96-5p was negatively correlated with the above 4 indicators of blood glucose (all $P < 0.05$). Logistic multiple regression analysis showed that the increase of BMI $\geq 1.73 \text{ kg/m}^2$ in early pregnancy, BMI increase $\geq 4.88 \text{ kg/m}^2$ in the second trimester, family history of diabetes and miR-2467 ≥ 3.44 were risk factors for GDM. miR-96-5p ≥ 1.95 was a protective factor for GDM ($P < 0.05$). The AUC of serum miR-2467 combined with miR-96-5p for evaluating GDM was 0.865, with sensitivity and specificity of 91.50%, and 81.50%, respectively. Conclusion: There is a correlation between miR-2467, miR-96-5p and blood glucose index and HOMA-IR in GDM, which has certain evaluation significance for GDM.

Key words Gestational diabetes mellitus; miR-2467; miR-96-5p; microRNA; Blood glucose; Homeostasis model assessment-insulin resistant index

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 发病机制复杂,可能与胰岛素抵抗、遗传史、炎症因子、表观遗传学改变有关^[1,2]。表观遗传学可通过调节基因翻译与转录过程发挥作用,微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 能调控表观遗传学水平,参与糖脂代谢、炎症反应、肿瘤等生理、病理改变^[3]。动物实验提示 miR-96 异常表达与糖尿病小鼠的心肌纤维化密切相关,参与该病进展^[4]。miR-96-5p 是由 miR-96 前体 5 端的臂加工而来,可能也在糖尿病中发挥了调节作用。另有研究发现 miR-2467-3p/Twist1 信号通路可破坏上皮间质转化,参与糖尿病肾病的进展过程,这间接提示 miR-2467 可能与血糖异常所致的相关并发症有关^[5]。本研究分析 miR-2467、miR-96-5p 在 GDM 中的作用机制。

资料与方法

1. 一般资料:纳入武汉市第五医院 2018 年 5 月至 2021 年 5 月收治的 108 例 GDM 患者作为 GDM 组,另选取同期产检糖耐量正常孕妇 82 例为对照组。纳入标准:GDM 组:符合《妊娠合并糖尿病诊治指南(2014)》^[6]中关于 GDM 的诊断标准者,在孕 24~28 周经口服葡萄糖耐量试验证实为 GDM;单胎妊娠者;孕前无糖尿病、高血压等基础疾病史者。对照组:同期产检的糖耐量正常孕妇;单胎妊娠者;孕前无糖尿病、高血压等基础疾病史者。排除标准:同时伴有其他妊娠期合并症者、孕期有皮质激素使用史者、甲状腺疾病者、既往有多囊卵巢综合征病史者、肝肾等重要脏器受损者、精神失常、认知障碍者。本研究经医院伦理委员会批准,所有入组者均自愿签署同意书。

2. 血清 miR-2467、miR-96-5p 表达检测:2 组在产检时采集 3 mL 空腹肘静脉血,抗凝处理,存放低温冰箱待测。采用实时逆转录聚合酶链反应法 (quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 2 组血清 miR-2467、miR-96-5p 表达水平。主要仪器为紫外分光光度仪 (美国 Thermo 公司, Nanodrop 2000 型)、高速离心机 (美国 Sigma 公司, Sigma3-18K 型)、实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司, 7500FAST 型)。主要试剂为无水乙醇、二甲苯、氯仿、逆转录试剂、RNA 提取试剂,购自美国 Sigma 与 Bio-Red 公司。采用 RNA 提取试剂对样本总 RNA 进行提取,取血清 200 μ L 置于离心管,加入裂解液 900 μ L 充分混合,室温下

放置 10 min;加入氯仿 200 μ L 充分混合,室温下反应 5 min;在 4 $^{\circ}$ C 下离心 15 min, 12 000 转/min, 此时样品可见 3 层,其中上层无色水相即为 RNA,吸取 RNA 后移至 1.5 mL RNase-free 离心管内;加入 600 μ L 无水乙醇充分混合,置于吸附柱内,室温下反应 2 min,离心 30 s, 12 000 转/min,弃流出液;继续吸取上层水相液体 200 μ L,置于 1.5 mL RNase-free 离心管内,加入 600 μ L 无水乙醇,室温下反应 2 min,离心同上;加入蛋白液 700 μ L,离心 30 s, 12 000 转/min,弃流出液。取漂洗液 500 μ L,离心同上。再次离心 2 min, 12 000 转/min,转移吸附柱至离心管内,室温下放置 10 min,晾干。加入 RNase-free water 20 μ L,离心 2 min, 12 000 转/min,弃吸附柱,获取总 RNA。取少量 RNA 测定纯度、浓度,并进行逆转录反应,合成 cDNA,放置在 -20 $^{\circ}$ C 备用。针对样本行实时荧光定量 PCR 反应,条件为预变性:95 $^{\circ}$ C 5min;变性:95 $^{\circ}$ C 10s;退火与延伸:60 $^{\circ}$ C 50s,循环 45 次。上、下游引物序列:①miR-2467:5'-AGCAGAGGCAGAGAGGCTCAGG-3'、5'-CCTGAGCCTCTCTGCCTCTGCT-3';②miR-96-5p:5'-CCTTTGGCACTAGCACATTTTTG-3'、5'-ACGCAAATTCGTGAAGCGTT-3';③内参引物 U6:5'-CGCTTCGGCAGCACATACTA-3'、5'-CGCTTCACGAATTTTCGTGTCA-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示血清 miR-2467、miR-96-5p 相对表达水平。

3. 血糖指标检测:经血糖分析仪 (上海益联医学仪器发展有限公司, GLM-77 型) 检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 以及餐后 2 h 血糖 (2h postprandial blood glucose, 2hPG), 经糖化血红蛋白 (hemoglobin A1c, HbA1c) 分析仪 (上海涵飞医疗器械有限公司, YH30 型) 测定 HbA1c。胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment-insulin resistant index, HOMA-IR) = FBG \times FINS/22.5。

4. 统计学分析:采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,行 t 检验,计数资料用百分数 (%) 表示,行 χ^2 检验。利用 Pearson 法分析 miR-2467、miR-96-5p 与血糖指标、HOMA-IR 的相关性。经 Logistic 多元回归模型分析 GDM 发生的危险因素,绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic curve, ROC) 曲线分析 miR-2467、miR-96-5p 评估 GDM 的曲线下面积 (area under curve, AUC)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 一般资料比较:2 组年龄、孕周、体重指数

(body mass index, BMI)、不良妊娠史、孕次、产次比较,差异无统计学意义(P 均 >0.05),GDM组孕早期、孕中期 BMI 增长以及糖尿病家族史占比高于对照组(P 均 <0.05),见表1。

表1 2组一般资料比较

项目	GDM组($n=108$)	对照组($n=82$)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	28.13 \pm 3.87	27.94 \pm 4.75	0.304	0.762
孕周(周, $\bar{x} \pm s$)	26.34 \pm 1.12	26.29 \pm 1.08	0.309	0.757
BMI(kg/m^2 , $\bar{x} \pm s$)				
孕前	23.06 \pm 1.28	22.75 \pm 1.06	1.778	0.077
孕早期	2.01 \pm 0.82	1.35 \pm 0.61	6.115	<0.001
孕中期	5.30 \pm 1.01	4.32 \pm 1.15	6.238	<0.001
糖尿病家族史[例(%)]	25(23.15)	7(8.54)	7.105	0.008
不良妊娠史[例(%)]	16(14.81)	9(10.98)	0.601	0.438
孕次[例(%)]				
1~2次	83(76.85)	70(85.37)	2.155	0.142
≥ 3 次	25(23.15)	12(14.63)		
产次[例(%)]				
1~2次	89(82.41)	73(89.02)	1.624	0.203
≥ 3 次	19(17.59)	9(10.98)		

表2 2组血清 miR-2467、miR-96-5p 表达及血糖指标、HOMA-IR 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例	miR-2467	miR-96-5p	FBG(mmol/L)	2hPG(mmol/L)	HbA1c(%)	HOMA-IR
GDM组	108	4.86 \pm 1.14	1.43 \pm 0.42	5.18 \pm 0.47	8.87 \pm 1.23	6.71 \pm 1.25	1.38 \pm 0.13
对照组	82	1.56 \pm 0.40	2.64 \pm 0.57	4.85 \pm 0.24	6.09 \pm 1.16	4.58 \pm 1.10	0.84 \pm 0.22
t 值		25.055	16.849	5.807	15.812	12.244	21.120
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3. GDM组 miR-2467、miR-96-5p 表达与血糖指标、HOMA-IR 的相关性: Pearson 相关分析显示,血清 miR-2467 表达与 FBG、2hPG、HbA1c、HOMA-IR 呈正相关,血清 miR-96-5p 表达与 FBG、2hPG、HbA1c、HOMA-IR 呈负相关(P 均 <0.05),见表3。

表3 GDM组 miR-2467、miR-96-5p 表达与血糖指标、HOMA-IR 的相关性

指标	miR-2467		miR-96-5p	
	r 值	P 值	r 值	P 值
FBG	0.416	0.019	-0.571	0.000
2hPG	0.712	0.000	-0.628	0.000
HbA1c	0.689	0.000	-0.430	0.013
HOMA-IR	0.538	0.000	-0.686	0.000

4. GDM 发生的 Logistic 多元回归分析: 采用 Logistic 多元回归模型对相关变量行量化赋值,其中孕早期、孕中期 BMI 增长以及血清 miR-2467、miR-96-5p 表达均以 GDM 组与对照组之间的均值为界赋值。结果提示孕早期 BMI 增长 $\geq 1.73\text{kg}/\text{m}^2$ 、孕中期 BMI 增长 $\geq 4.88\text{kg}/\text{m}^2$ 、糖尿病家族史、miR-2467 ≥ 3.44 是 GDM 发生的危险因素,miR-96-5p ≥ 1.95 是 GDM 发生的保护因素(P 均 <0.05),见表

2. 血清 miR-2467、miR-96-5p 表达及血糖指标、HOMA-IR 比较: GDM 组血清 miR-2467 表达、FBG、2hPG、HbA1c 水平及 HOMA-IR 高于对照组,miR-96-5p 表达低于对照组(P 均 <0.05),见表2。

4。

5. 血清 miR-2467、miR-96-5p 表达评估 GDM 的价值分析: 血清 miR-2467、miR-96-5p 表达评估 GDM 的 AUC 分别为 0.798、0.792,两者联合评估的 AUC 为 0.865,敏感为 91.5%,特异度为 81.5%,见表5、见图1。

讨论

近年来,大量研究提示 miRNA 与糖尿病的发生有关,它对胰岛的 β 细胞增殖、凋亡、存活等均有调控作用,而胰岛的 β 功能异常与 GDM 发生存在关联^[7]。

本研究提示 GDM 组血清 miR-2467 表达较对照组高,而 miR-96-5p 表达下调。miR-2467 是 miRNA 的重要成员^[8],其表达与核转录因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 信号通路激活有关^[9]。而 NF- κB 信号通路所介导的炎症反应参与了 GDM 进展过程,该通路一旦被激活,则会通过正反馈机制促进炎症介质释放,增强引起胰岛素抵抗相关炎症介质的

表4 GDM发生的 Logistic 多元回归分析

变量	量化赋值	β 值	SE 值	P 值	OR 值(95% CI)
孕早期 BMI 增长	$<1.73\text{kg}/\text{m}^2 = 0, \geq 1.73\text{kg}/\text{m}^2 = 1$	1.378	0.454	0.002	3.968(1.629 ~ 9.665)
孕中期 BMI 增长	$<4.88\text{kg}/\text{m}^2 = 0, \geq 4.88\text{kg}/\text{m}^2 = 1$	1.399	0.366	0.000	4.052(1.978 ~ 8.301)
糖尿病家族史	无 = 0, 有 = 1	1.120	0.512	0.029	3.066(1.125 ~ 8.356)
miR-2467	$<3.44 = 0, \geq 3.44 = 1$	1.000	0.287	0.000	2.718(1.548 ~ 4.772)
miR-96-5p	$<1.95 = 0, \geq 1.95 = 1$	-0.040	0.011	0.000	0.961(0.940 ~ 0.982)

表5 血清 miR-2467、miR-96-5p 表达评估 GDM 的价值分析

指标	AUC	标准误	P 值	95% CI	最佳界值	敏感度(%)	特异度(%)
miR-2467	0.798	0.034	$P < 0.001$	0.732 ~ 0.864	3.873	67.59	84.15
miR-96-5p	0.792	0.032	$P < 0.001$	0.729 ~ 0.856	2.193	69.44	74.39
miR-2467 联合 miR-96-5p	0.865	0.028	$P < 0.001$	0.809 ~ 0.920	0.617	91.50	81.50

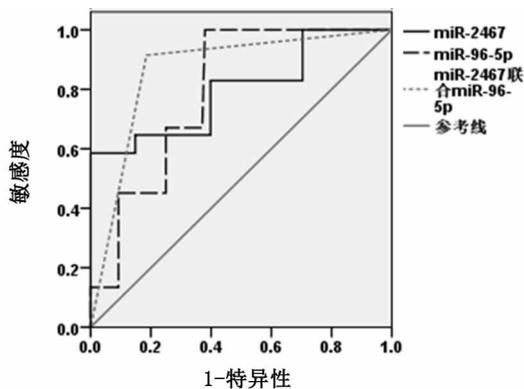


图1 血清 miR-2467、miR-96-5p 表达评估 GDM 的 ROC 曲线

参考文献

- 1 吴杭玉,叶梅,张宜生. 妊娠期糖尿病的研究进展[J]. 浙江医学, 2018,40(13):1512-1515.
- 2 Lu W, Hu C. Molecular biomarkers for gestational diabetes mellitus and postpartum diabetes [J]. Chin Med J, 2022, 135 (16): 1940-1951.
- 3 周晓婷,吴巧珍,徐瑞,等. 血浆 miRNA-190 及 miRNA-197 联合检测可辅助诊断肺血栓栓塞症[J]. 内科急危重症杂志,2021,27(5):397-400.
- 4 张羽飞,李厚忠,张欣,等. 糖尿病小鼠心脏组织 miRNA 分析及靶基因检测[J]. 中国公共卫生,2014,30(8):1042-1046.
- 5 Xu Y, Ouyang CH, Lyu DY, et al. Diabetic nephropathy exacerbates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) via miR-2467-3p/Twist1 pathway-Science Direct [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125 (2020):109920.
- 6 中华医学会妇产科学分会产科学组,中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病诊治指南(2014)[J]. 中华围产医学杂志,2014,17(8):537-545.
- 7 福文婷,陈丽霞,黎美金,等. 妊娠期糖尿病患者胎盘来源外泌体 miRNA 表达分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2020,36(1):90-92.
- 8 Duan Z, Wei S, Liu Y. Circ_0074027 contributes to non-small cell lung cancer progression through positively modulating RHOA via sequestering miR-2467-3p[J]. J Bioenerg Biomembr, 2021, 53 (25): 223-233.
- 9 Zhou F, Wang W, Xing Y, et al. NF- κ B target microRNAs and their target genes in TNF α -stimulated HeLa Cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1839 (4): 344-354.
- 10 Zhang W, Zhao X, Li L. Downregulation of circ_0001578 promotes gestational diabetes mellitus by inducing placental inflammation via the NF- κ B and JNKs pathways[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 657802.
- 11 Yu X, Liu Z, Fang J, et al. miR-96-5p: A potential diagnostic marker for gestational diabetes mellitus [J]. Medicine, 2021, 100 (21): e25808.
- 12 Yang ZM, Chen LH, Hong M, et al. Serum microRNA profiling and bioinformatics analysis of patients with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population [J]. Mol Med Rep, 2017, 15 (4): 2143-2153.
- 13 Zhang YK, Wang CY, Lu JW, et al. Targeting of miR-96-5p by catalpol ameliorates oxidative stress and hepatic steatosis in LDLr $^{-/-}$ Mice via p66shc/Cytochrome C cascade[J]. Soc Sci Electron Publishing, 2020, 12(3):2049-2069.
- 14 Li L, Wang S, Li HY, et al. microRNA-96 protects pancreatic β -cell function by targeting PAK1 in gestational diabetes mellitus [J]. Biofactors, 2018, 44 (6): 539-547.

(2021-10-18 收稿 2023-07-27 修回)

表达,削弱胰岛素功能的敏感性,导致 GDM 的发生与进展^[10]。miR-96-5p 在糖尿病中发挥了重要的调控作用,miR-96-5p 表达下调与胰岛素抵抗存在关联,其表达降低可能通过影响胰岛素抵抗,参与糖尿病发生与进展^[11]。miR-96-5p 还可与生长停滞特异基因 5 相互作用,并对蛋白激酶 C 进行靶向调节,影响糖尿病患者的病情^[12]。

本研究发现血清 miR-2467、miR-96-5p 表达与 FBG、2hPG、HbA1c、HOMA-IR 有相关性,进一步提示两者表达与 GDM 患者的病情有关。有报道 miR-96-5p 表达上调能减轻糖尿病诱导的肝脏氧化应激反应^[13],这表明 miR-96-5p 对糖尿病患者有保护作用。本研究提示 miR-2467 表达增高是 GDM 发生的危险因素,而 miR-96-5p 表达增高对 GDM 发生有预防作用,且两者对 GDM 评估有一定价值,特异度与准确率较高。Li 等^[14]发现 miR-96 对 p21 活化激酶 1、 β 细胞功能以及胰岛素分泌有调节作用,可能通过上述调节功能,在 GDM 中发挥作用。而 miR-96-5p 经 miR-96 前体 5 端的臂加工而成,间接推测其表达可能也与 β 细胞功能、胰岛素分泌有关。