

miR-132 在糖尿病视网膜病变患者血浆中的表达及其临床意义

刘 茹¹, 陆晓和²

引用: 刘茹, 陆晓和. miR-132 在糖尿病视网膜病变患者血浆中的表达及其临床意义. 国际眼科杂志 2019;19(8):1415-1418

基金项目: 郴州市第一人民医院课题项目 (No.2014-009)

作者单位: ¹(423000) 中国湖南省郴州市第一人民医院眼科;

²(510282) 中国广东省广州市, 南方医科大学珠江医院眼科

作者简介: 刘茹, 毕业于南方医科大学, 博士, 副主任医师, 研究方向: 视网膜病。

通讯作者: 陆晓和, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 角膜病、白内障. luxh63@163.com

收稿日期: 2019-04-12 修回日期: 2019-07-16

摘要

目的: 分析 miR-132 在糖尿病视网膜病变 (DR) 患者血浆中的表达及与 DR 的关系。

方法: 前瞻性研究, 选取 2015-07/10 于我院确诊的 55 例糖尿病患者, 按 DR 国际临床分期标准将患者分为 5 组。背景期: 无明显视网膜病变组 13 例 (A 组); 非增殖期 (NPDR) 33 例, 包括: 轻度 NPDR 组 10 例 (B 组), 中度 NPDR 组 11 例 (C 组), 重度 NPDR 组 12 例 (D 组); 增殖期 (PDR) 9 例 (E 组)。另选取我院体检健康者 12 例作为健康对照组 (F 组)。应用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测不同分期 DR 患者外周血浆中 miR-132 的相对表达量, 并比较各组间差异。

结果: 除无明显视网膜病变组外, 其余各组 DR 患者与健康对照组相比, 血浆中 miR-132 的表达水平明显下降 ($P < 0.05$); 非增殖期组间、非增殖期与增殖期组间比较, miR-132 表达量无差异 ($P > 0.05$)。

结论: miR-132 在 NPDR 和 PDR 患者血浆内低表达, 可能成为 DR 治疗的生物标志物。

关键词: miR-132; 糖尿病视网膜病变; 血浆; 生物标志物

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.8.36

Expression and clinical significance of miR-132 in the plasma of patients with diabetic retinopathy

Ru Liu¹, Xiao-He Lu²

Foundation item: The First People's Hospital of Chenzhou (No. 2014-009)

¹Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou 423000, Hunan Province, China;

²Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xiao-He Lu. Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. luxh63@163.com

Received: 2019-04-12 Accepted: 2019-07-16

Abstract

• AIM: To analyze the expression and significance of miR-132 in the plasma of patients with diabetic retinopathy.

• METHODS: From July 2015 to October 2015, a total of 55 patients with diabetes who were treated in our hospital were divided into 5 groups according to diabetic retinopathy clinical staging international standard, including 13 cases of no obvious retinopathy as group A, 10 cases of mild NPDR as group B, 11 cases of moderate NPDR as group C, 12 cases of severe NPDR as group D and 9 cases of PDR as group E, at the same time, the other 12 healthy people were enrolled as control group F. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) technique was used to detect the relative expression of miR-132 in the plasma of 55 patients with different stages of diabetic retinopathy and the expression difference between different groups were compared.

• RESULTS: Compared with the healthy control group, the expression of miR-132 in the plasma was decreased in other groups ($P < 0.05$) except in the background of diabetic retinopathy, however, there was no significant difference between the NPDR groups and the PDR groups.

• CONCLUSION: The expression of miR-132 in the plasma of patients with DR was slightly lower in the non-proliferative and proliferative stage than in healthy subjects and background diabetic retinopathy. Furthermore, miR-132 may be a new biomarker for DR.

• KEYWORDS: miR-132; diabetic retinopathy; plasma; biomarker

Citation: Liu R, Lu XH. Expression and clinical significance of miR-132 in the plasma of patients with diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(8):1415-1418

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最严重和最为常见的微血管并发症之一。世界卫生组织公布, DR 是全世界导致视力缺损和失明的第二大原因, 已成为眼底病基础和临床研究领域的难点和热点, 探究 DR 的发病机制及预防策略具有重要的临床意义。

miRNAs 可参与肿瘤形成、炎症反应、细胞增殖和凋亡、糖尿病和心血管疾病等多种病理生理过程。miRNAs

也存在于人的循环血液系统中,能够从外周血检测,而且稳定性与重复性相对较好^[1]。与 mRNA 不同的是,miRNAs 在体液中相对稳定,甚至能抵御 RNA 酶的消化作用^[2-3]。这一特性使外周血 miRNAs 检测有望成为恶性肿瘤及其它疾病新的非创伤性的标记物^[4-5]。在对 DR 的研究中,视网膜组织标本很难获得,为病理检查和病理分析带来很大困难,因此如果外周血 miRNAs 检测能够作为标记物应用于临床,这对于 DR 患者将具有更为显著的临床意义^[6-7]。临床上,miRNAs 在玻璃体液和房水中也可以检测到特异性的表达^[8-9],Hirota 等^[8]研究表明,与新生血管化和纤维化有关的几种 miRNAs 在 DR 患者玻璃体液中的表达明显高于黄斑裂孔患者。这就使得 miRNAs 在玻璃体和房水中的表达差异可以提示某种疾病,为临床提供一种诊断和预后的分子生物学标志。Wu 等^[10]在链霉素注射 10wk 后成功建立糖尿病大鼠模型,并在糖尿病大鼠模型的视网膜内发现有 11 中 microRNAs 明显升高,包括 miR-182、miR-96、miR-183、miR-211、miR-204、miR-124、miR-135b、miR-592、miR-190b、miR-363、miR-29c-5p,并且有 6 种 MicroRNAs 显著降低,包括 miR-10b、miR-10a、miR-219-2-3p、miR-144、miR-338、miR-199a-3p。同时惊喜地发现,部分 microRNAs 在视网膜内表达量的变化与 DR 的发展一致,这就表明 microRNAs 调节与 DR 之间有某种联系。

microRNA-132 (miR-132) 是马克斯普朗克学会 Lagos-Quintana 等^[11]2002 年在小鼠神经组织中首次发现的,有研究表明^[12],miR-132 与胃癌的预后密切相关。最近 Marler 等^[13]通过体外和体内实验发现经由 miR-132 与 p250GAP 途径,脑源性神经营养因子促进小鼠胚胎视网膜神经节细胞的生长。临床上,我们发现处于同一阶段的糖尿病视网膜视神经病变,预后可能截然不同,提示我们可能视网膜神经节细胞损伤程度不同,这就迫切需要一种分子生物学标志能够提示这种凋亡。已有研究表明^[14],miR-132 在 DR 大鼠血管内皮细胞中表达水平升高,那么在 DR 患者循环体液中 miR-132 的表达情况,目前尚不清楚。本研究通过探讨 miR-132 在不同分期 DR 患者血浆中的表达变化,有助于揭示 miRNA-132 与 DR 发展的关系,以期对 DR 寻求新的生物标志物。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2015-07/10 于我院内分泌科确诊的 55 例糖尿病患者,并由眼科医师专人行眼底散瞳检查和荧光素血管造影 (fluorescein angiography, FFA) 检查,所有患者抽血前均未接受过眼部治疗。糖尿病诊断标准^[15]:空腹血糖 >7.0mmol/L 或者 OGTT 2h 血糖 >11.1mmol/L 和糖化血红蛋白 >6.5%。按 DR 国际临床分期标准将患者分为 5 组:背景期:无明显视网膜病变组 13 例 (A 组);非增殖期 (non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR) 33 例,包括轻度 NPDR 组 10 例 (B 组),中度 NPDR 组 11 例 (C 组),重度 NPDR 组 12 例 (D 组);增殖期 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 9 例 (E 组)。另选取我院体检健康者 12 例作为阴性对照组 (F 组)。排除标准:眼部手术史,伴有严重高血压病、严重高血脂症、恶性肿瘤、肺部疾病及自身免疫性疾病患者,合并其他影响糖代谢的疾病 (如甲状腺功能亢进等),急性代谢紊乱综合征,严重心脑血管疾病及外伤等。所有研究对象的年龄及是否规范控

制血糖差异无统计学意义 ($P>0.05$)。本次研究经郴州市第一人民医院伦理委员会批准,所有研究对象均为自愿参加本次试验,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 资料收集 由专人收集研究对象的一般资料,包括:性别、年龄、既往史、个人史、糖尿病持续时间、血糖、糖尿病并发症、用药史。

1.2.2 试验方法 抽取所有研究对象肘静脉空腹全血 5mL,按照 Tiangen miRNA 提取试剂盒进行操作提取 RNA,并检测 RNA 纯度,miRNA-132 逆转录应用加尾方法, U6 应用普通逆转录方法逆转录通用引物: 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG (T) 24N (A, G, C) - 3'。PCR 下游引物: 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'; miRNA-132 上游引物: 5'-TAACAGTCTACAGCCATGGTTCG-3'。U6 上游引物: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'; U6 下游引物: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'。引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。采用 SYBR Green I 染料法进行荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测,PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5min, 1 个循环;95℃ 变性 10s, 60℃ 退火 20s, 60℃ 延伸 20s, 共 40 个循环,测量 miR-132 和 U6 的相对表达量。

统计学分析:应用 SPSS20.0 软件对各组数据进行分析。所有数据均采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,先对资料进行正态分布和方差齐性检验,结果符合正态分布和方差齐性,两组间比较用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多个样本均数间两两比较采用 SNK-*q* 法,各因素与血浆中 miR-132 含量的关系采用多因素回归分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本资料 DR 各组与健康对照组在男女构成比例方面,差异有统计学意义 ($P=0.049$);各组在年龄、是否规范治疗方面比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);各组间糖尿病病程比较,差异有统计学意义 ($P=0.010$),糖尿病病程越长,DR 越重 (表 1)。

2.2 PCR 产物熔解曲线 熔解曲线分析结果显示熔解曲线形成单一峰,表明无非特异性产物和引物二聚体形成,引物的特异性良好 (图 1)。

2.3 miR-132 在各组患者血浆中的表达及与临床资料的关系 与健康对照组相比,除无明显视网膜病变组外,其余各组 DR 患者血浆 miR-132 的表达水平均明显下降,差异有统计学意义 ($P<0.05$);非增殖期各组间、非增殖期与增殖期组间比较,miR-132 表达量差异均无统计学意义 ($P>0.05$,图 2)。本试验收集患者年龄、性别、糖尿病病程、是否规范治疗作为影响患者血浆 miR-132 表达的因素。对以上因素与血浆中 miR-132 含量的关系进行分析,结果发现以上因素均与血浆 miR-132 表达无相关性 ($P>0.05$)。

3 讨论

目前,miRNAs 表达量的检测方法主要有 4 种:实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)、miRNA 芯片微阵列、分子探针技术、直接测序技术。其中 qRT-PCR 较其他方法特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确,更适合分析体液中得到的 miRNAs。本研究中我们采用 qRT-PCR 方法检测糖尿病患者血浆中 miR-132 的相对表达水平,且 PCR 熔解

表 1 糖尿病视网膜病变患者和健康对照组的临床特征

分期	例数	性别(例,%)		年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	病程($\bar{x}\pm s$,a)	是否规范治疗(例,%)	
		男	女			是	否
背景期组	13	5(39)	8(61)	55.2±3.12	3.9±2.7	4(31)	9(69)
轻度 NPDR 组	10	4(40)	6(60)	56.1±5.8	5.8±3.7	7(70)	3(30)
中度 NPDR 组	11	3(27)	8(73)	59.3±8.9	8.9±4.8	6(55)	5(45)
重度 NPDR 组	12	4(33)	8(67)	63.1±11.8	12.6±5.5	4(33)	8(67)
PDR 组	9	2(22)	7(78)	63±16.1	16.2±4.6	3(33)	6(67)
健康对照组	12	6(50)	6(50)	57.4±4.7	0	-	-
<i>P</i>		0.049		0.327	0.010	0.526	

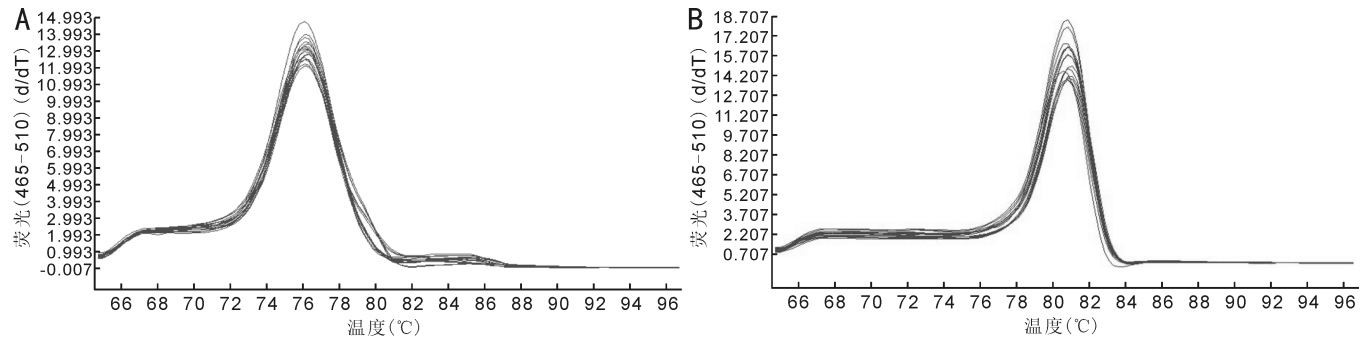


图 1 miR-132 与 U6 熔解曲线 A:miR-132;B:U6。

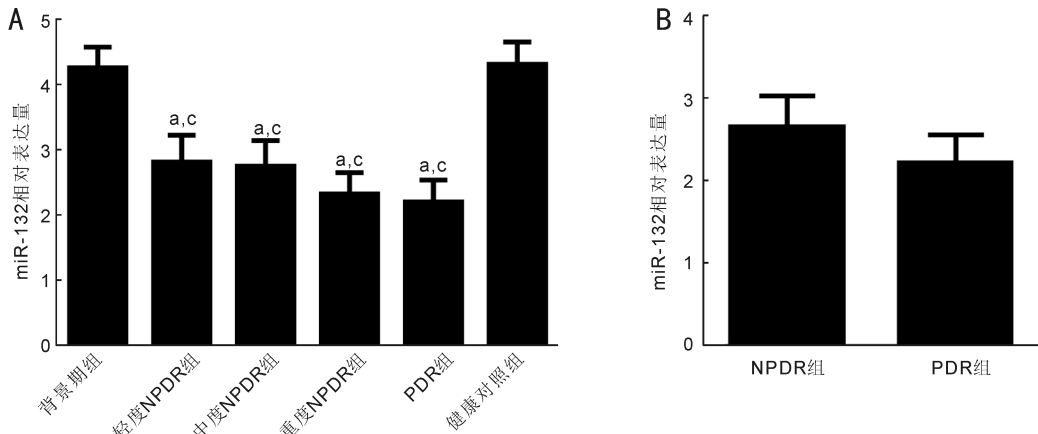


图 2 miR-132 在各组患者血浆中的表达 A:miR-132 在各组患者血浆中的表达;B:miR-132 在 NPDR 与 PDR 两组的表达。^a*P*<0.05 vs 健康对照组;^b*P*<0.05 vs 背景期 DR。

曲线为单一波峰,说明 miR-132 引物的设计和反应条件的优化均较好,另外我们在试验中有效地避免了 RNA 酶的污染,同时采用 U6 作为内参,提示本试验的数据具有较高的可信度。

miRNAs 的自身结构比较特殊,目前应用较多的有两种检测方法:茎环法和加尾法,在原理上存在差异。两种方法的反转录引物设计原则不同,而 PCR 扩增引物的设计原则是相同的,也遵守常规 PCR 的引物设计原则。这两种方法的思路不同,导致引物设计和试验方法上的差异。二者各有优缺点,茎环法引物设计较困难,大量检测成本高,但其特异性、灵敏度高于加尾法;而加尾法引物设计相对简单,操作容易。本试验中,最初设计用茎环法,但是在预试验中发现,茎环法 PCR 结果中,水的 PCR 产物中出现目的条带,提示我们存在污染可能性,后改为加尾法进行 miRNAs 的 qRT-PCR 试验。

miRNAs 一般在细胞间隙内发挥生物学作用,但在人类生物体液,如血清、血浆、尿液、唾液、泪液、房水和玻璃

体中也能检测到稳定的 miRNAs^[16],体液中的 miRNAs 不仅是在标准状态下稳定,而且在经受冷冻、pH 剧烈变化、长时间放置室温下都不会发生改变^[3],因此人们设想把它作为人类疾病病理学的分子标记来进行研究,并且在很多疾病中已经报道了循环中的 miRNAs 表达谱,包括糖尿病疾病^[17-19]。miR-132 在糖尿病大鼠的视网膜血管内皮细胞中表达上调^[14],而在 DR 患者外周血循环中 miR-132 的表达情况,尚未见相关文献报道。

本研究发现 miR-132 在健康人和无明显 DR 患者血浆内表达量相对较高,在非增殖期和增殖期 DR 患者体内 miR-132 表达量降低,这提示在 DR 发展过程中,miR-132 有可能也起了保护视网膜神经节细胞作用,从而阻止 DR 的发展,当 miR-132 下降时,可能提示病变进展,但随着 DR 程度加重,miR-132 表达量差异无统计学意义。而 Kovacs 等^[14]研究表明,miR-132 在 DR 大鼠血管内皮细胞中表达水平升高,与我们的试验结果不一致,分析原因本次试验检测的是视网膜神经节细胞,而 Kovacs 等检测的

是 miR-132 在 DR 大鼠视网膜血管内皮细胞中的表达情况,这可能是导致结果差异的原因;本次试验中发现 miR-132 含量在糖尿病视网膜病变患者血浆内含量相对较低,导致循环荧光域值(CT值)较大,PCR 结果可能存在误差,因此后续试验需要进一步更为精确的检测方法。有研究表明,在 DR 中 MAPK1/3 信号通路对视网膜血管损伤和视网膜神经节细胞中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的释放有关键调节作用^[20]。同时,MAPK3/1 与 DR 病变的发生、发展密切相关,与视网膜神经节细胞凋亡有关。而 miR-132 对小鼠胚胎视网膜神经节细胞的生长有促进作用^[13]。那么 miR-132 与 MAPK1/3 信号通路在 DR 发展中的具体作用及对视网膜神经节细胞的保护作用机制,我们将通过对高糖诱导的视网膜神经节细胞进行进一步的深入研究。

参考文献

- 1 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. *Cell Res* 2008;18:997-1006
- 2 Gilad S, Meiri E, Yogev Y, *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008;3(9):e3148
- 3 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(30):10513-10518
- 4 Huang Z, Huang D, Ni S, *et al.* Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010;127(1):118-126
- 5 Jackson DB. Serum-based microRNAs: are we blinded by potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(1):E5
- 6 Satari M, Aghadavod E, Mirhosseini N, *et al.* The effects of microRNAs in activating neovascularization pathways in diabetic retinopathy. *J Cell Biochem* 2019;120(6):9514-9521
- 7 Liang Z, Gao KP, Wang YX, *et al.* RNA sequencing identified specific circulating miRNA biomarkers for early detection of diabetes retinopathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2018;315(3):E374-E385

- 8 Hirota K, Keino H, Inoue M, *et al.* Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253(3):335-342
- 9 Dunmire JJ, Lagouros E, Bouhenni RA, *et al.* MicroRNA in aqueous humor from patients with cataract. *Exp Eye Res* 2013;108:68-71
- 10 Wu JH, Gao Y, Ren AJ, *et al.* Altered microRNA expression profiles in retinas with diabetic retinopathy. *Ophthalmol Res* 2012;47:195-201
- 11 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, *et al.* Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002;12:735-739
- 12 Liu X, Yu H, Cai H, *et al.* The expression and clinical significance of miR-132 in gastric cancer patients. *Diagn Pathol* 2014;9:57
- 13 Marler KJ, Suetterlin P, Dopplapudi A, *et al.* BDNF promotes axon branching of retinal ganglion cells via miRNA-132 and p250GAP. *J Neurosci* 2014;34(3):969-979
- 14 Kovacs B, Lumayag S, Cowan C, *et al.* MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(7):4402-4409
- 15 Kerner W, Brückel J, German Diabetes Association. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014;122(7):384-386
- 16 Andreeva K, Cooper NG. MicroRNAs in the Neural Retina. *Int J Genomics* 2014;2014:165897
- 17 Qing S, Yuan S, Yun C, *et al.* Serum miRNA biomarkers serve as a fingerprint for proliferative diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem* 2014;34(5):1733-1740
- 18 Pinazo-Durán MD, Zanón-Moreno V, Lleó-Perez A, *et al.* Genetic systems for a new approach to risk of progression of diabetic retinopathy. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2016;91(5):209-216
- 19 Pastukh N, Meerson A, Kalish D, *et al.* Serum miR-122 levels correlate with diabetic retinopathy. *Clin Exp Med* 2019;19(2):255-260
- 20 Hu J, Li T, Du S, *et al.* The MAPK signaling pathway mediates the GPR91-dependent release of VEGF from RGC-5 cells. *Int J Mol Med* 2015;36(1):130-138