

血浆长链非编码 RNA MALAT1 水平与 2 型糖尿病的相关性

宋宁, 赵倩, 李香梅, 罗俊一, 赵强, 张雪鹤, 刘芬, 李晓梅, 杨毅宁

(新疆医科大学第一附属医院, 新疆乌鲁木齐市 830054)

[关键词] 2 型糖尿病; MALAT1; 危险因素

[摘要] 目的 探讨长链非编码 RNA MALAT1 在 2 型糖尿病患者血浆中的表达及其临床意义。方法 纳入新疆医科大学第一附属医院收治的 270 例患者, 136 例糖尿病患者为糖尿病组, 134 例相匹配的非糖尿病患者为对照组。采用实时荧光定量多聚酶链反应 (qRT-PCR) 检测血浆 MALAT1 的表达水平, 并分析 MALAT1 表达水平与临床病例特征的相关性。结果 糖尿病组患者吸烟史、饮酒史、入院血压水平、血脂水平均高于对照组 ($P < 0.05$), 且糖尿病组血浆 MALAT1 表达明显增高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。单因素 Logistic 回归分析发现血浆 MALAT1、空腹血糖、糖化血红蛋白、糖化血清蛋白、血脂水平、胱抑素 C 均与糖尿病有关 ($P < 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析结果发现 MALAT1 在血浆中的表达水平与糖尿病存在独立相关 ($P < 0.05$), 是对照组的 1.84 倍。结论 糖尿病患者血浆 MALAT1 表达显著增加, 是 2 型糖尿病发病的危险因素。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Correlation between plasma level of lncRNA MALAT1 and type 2 diabetes mellitus in relevant patients

SONG Ning, ZHAO Qian, LI Xiangmei, LUO Junyi, ZHAO Qiang, Zhang Xuehe, LIU Fen, LI Xiaomei, YANG Yining
(The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

[KEY WORDS] T2DM; MALAT1; risk factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the plasma expression of long non-coding RNA MALAT1 in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its clinical significance. **Methods** A total of 270 patients treated were divided into 2 groups: T2DM group ($n=136$) and control group ($n=134$). Expression levels of plasma MALAT1 were measured by qRT-PCR; then the relationship was analyzed in relevant patients between MALAT1 and clinical features. **Results** Compared with the control group, plasma MALAT1 expression was increased in T2DM group ($P < 0.05$). Univariate Logistic regression analysis found that plasma MALAT1, fasting blood glucose, glycosylated hemoglobin, glycosylated serum protein, lipid levels, and cystatin C (CysC) were all associated with diabetes ($P < 0.001$). Multivariate Logistic regression analysis showed that plasma MALAT1 expression was independently associated with diabetes ($P < 0.05$), which was 1.84 times that of the control group. **Conclusion** T2DM patients had obviously increased plasma level of MALAT1; MALAT1 was independently related to T2DM occurrence.

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一组以高血糖水平为特征的代谢紊乱综合征, 其复杂的发病机制涉及多种组织和器官, 是遗传易感性和环境因素之间的相互作用引起的。据 Lancet 上

发表的一项研究表明^[1], 到 2030 年全球糖尿病患者人数将增至 4.39 亿, 尤其是在发展中国家, 而 T2DM 占近 90% 的病例, 严重影响人类的生命健康和社会的发展。

[收稿日期] 2019-07-01

[修回日期] 2019-08-21

[基金项目] 自治区研究生科研创新项目 (XJ2019G186); 新疆医科大学研究生创新创业启动基金项目 (CXCXY2018026); 国家自然科学基金项目 (81660058, 81770363, U1503322); 自治区创新条件 (人才、基地) 建设专项 (科技创新基地建设计划-重点实验室建设) (2018D03029)

[作者简介] 宋宁, 博士研究生, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 starfirening@163.com。通信作者李晓梅, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为心血管基础与临床研究, E-mail 为 lixm505@163.com。通信作者杨毅宁, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为心血管基础与介入临床, E-mail 为 yangyn5126@163.com。

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA)^[2]是指转录本长度>200 个核苷酸的 RNA 分子,几乎参与机体所有的生理病理进程,因其缺乏编码蛋白的能力,发挥作用主要依靠与相应的靶基因形成复合体,促进或抑制靶基因的降解、翻译等过程,在染色质修饰过程、转录及转录后进程等多种阶段中调控基因的表达。肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 归属于 lncRNA 家族,定位于人类 11q13 染色体上,长约 8 778 bp,属基因间转录本。在一项 T2DM db/db 小鼠模型试验^[3]中发现,利用 lncRNA 芯片技术发现 MALAT1 在模型小鼠中显著上调;同样,在高血糖刺激的內皮细胞模型中也证实,沉默 MALAT1 表达可降低高血糖所致的內皮细胞增殖,研究结果均为糖尿病相关功能障碍提供了一种新的治疗策略。Yan 等^[4]利用建立糖尿病小鼠模型,使用微阵列分析视网膜 lncRNA 表达谱,结果筛选及鉴定出大约有 303 个 lncRNA 异常表达,推测 lncRNA 可通过不同复杂途径参与糖尿病进程。

综上,本研究旨在探索 MALAT1 在 T2DM 患者血浆中的表达及意义,进一步揭示 MALAT1 在 T2DM 中的作用及其可能的分子机制,以期对 T2DM 早期诊断、治疗和预后提供新的思路。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取 2017 年 12 月至 2018 年 12 月在新疆医科大学第一附属医院内分泌科住院的患者 270 例,其中包括 136 例 T2DM 患者(糖尿病组)和 134 例非糖尿病患者(对照组)。目前 T2DM 的诊断标准参考 2010 年美国糖尿病协会报告^[5]:空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)水平高于或等于 7.0 mmol/L (126 mg/dL),或糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)高于或等于 6.5%。糖尿病组 136 例患者中,男性 98 例,女性 38 例,年龄 34~76 岁,平均(53.98±7.23)岁。对照组:选择与 T2DM 组患者性别、年龄及一般情况相匹配,且同一期间住院的无糖尿病患者。其中男性 98 例,女性 36 例,年龄 20~72 岁,平均(55.35±9.26)岁。两组均排除急性或慢性感染、恶性肿瘤、严重心脑血管疾病、免疫相关性疾病及严重肝肾功能损伤。所有研究对象均签署知情同意书,并经新疆医科大学伦理委员会批准。所有入选病例均于住院后第一天清晨采集外

周血液样本,用紫色含抗凝剂 EDTA 的采血管采集静脉血 4~5 mL,于 10 min 内室温下 3 000 r/min 离心 15 min,取上层血浆并立即置于-80℃冰箱,备用。

1.2 血浆总 RNA 提取

将离心所得上层血浆(约 500 μL)置于冰上融化;加入 1 mL Trizol (Thermo Fisher Scientific 公司,美国),涡旋器涡旋、混匀,静置 5 min;加入 200 μL 氯仿,涡旋器涡旋、混匀,静置 10 min;4℃ 12 000 g 离心 15 min,留取上清液并转移至一个新的无 RNA 酶的 1.5 mL Ep 管中;分别加入与上清液等体积的异丙醇(约 500 μL),涡旋器涡旋、混匀,室温静置 5 min,然后 4℃ 12 000 g 离心 10 min;吸出 Ep 管内液体,可见管底白色沉淀;然后加入 1 mL 75% 乙醇(用 1 mL 焦碳酸二乙酯 DEPC 水配置),4℃ 7 500 g 离心 5 min;将乙醇吸出(避免吸出沉淀),并于超净台中风干约 5 min 后加入 20 μL 无 RNA 酶超纯水,充分溶解 RNA。用分光光度计(Thermo scientific 公司,美国)测定总 RNA 浓度及纯度(若测定 RNA OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值在 1.8~2.0 之间,可用于反转录反应),后储存于-80℃备用。

1.3 qRT-PCR

提取血浆总 RNA,反转录反应参照天根反转录试剂盒说明(TIAN GEN BIOTECH)进行操作,即在 20 μL 体系中,使用 1 μg 总 RNA 进行互补脱氧核糖核酸(cDNA)的合成。qRT-PCR 反应使用 2×SYBR Green PCR Master Mix (ABI Power SYBR Green, 美国)进行,即在 20 μL 体系中,取 2 μL cDNA 作为模板,上下游引物浓度 0.5 μmol/L,进行扩增。各样本结果均用 GAPDH 标化,每个待测样本设置 3 个重复样,根据目标基因设计合成相应上下游引物进行 PCR 扩增。GAPDH 上游引物 5'-ACCACAGTC-CATGCCATCACTGCCACCCA-3',下游引物 5'-CCTC-CGACGCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'; MALAT1 上游引物 5'-GCTGGAGCAGCTAGCATGTG-3',下游引物 5'-AGGCTCCGCTGTCCTACATT-3';反应在实时荧光定量 PCR 仪(Applied Bio systems 公司,美国)上进行。三次独立实验后得到的数据运用公式 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行分析。

1.4 实验室指标

嘱所有检查对象隔夜禁食 12 h,次日清晨空腹静脉采血。采用高效液相色谱法(全自动糖化分析仪 VARIANT II,美国伯乐公司)测定 HbA1c。应用 AU5821(美国贝克曼库尔特公司)全生化分析仪测定各项生化指标,包括 FPG、HbA1c、糖化血清蛋白

(glycated serum protein, GSP)、胱抑素 C(cystatin C, CysC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)。

1.5 统计学分析

采用 Stata 统计学软件进行临床相关性分析, Graph Pad 软件进行作图。用 $\bar{x} \pm s$ 或四分位间距描述计量资料, 两组间比较采用 t 检验; 用率(%)描述计数资料, 两组间比较采用 χ^2 检验。采用单因素及多因素 Logistic 回归分析不同危险因素与 T2DM 的

相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较

两组患者基本资料比较, 年龄、性别、体质指数(body mass index, BMI)相匹配, 差异均无统计学意义($P > 0.05$, 表 1)。由于糖尿病的发病机制复杂, 两组中是否合并吸烟史、饮酒史及入院收缩压(SBP)、舒张压(DBP)及血脂水平差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。

表 1. 两组患者一般资料比较

Table 1. Comparison of general data between T2DM group and control group

一般资料	对照组 ($n=134$)	糖尿病组 ($n=136$)	$t/Z/\chi^2$	P
年龄(岁)	53.98 \pm 7.23	55.35 \pm 9.26	-1.3516	0.18
男性[例(%)]	98(73.13)	98(72.06)	0.039	0.84
吸烟史[例(%)]	33(24.63)	62(45.59)	13.0042	<0.001
饮酒史[例(%)]	34(25.37)	51(37.50)	4.6017	0.032
BMI(kg/m ²)	24.2 \pm 3.2	24.6 \pm 2.9	1.076	0.28
SBP(mmHg)	118.77 \pm 14.24	128.29 \pm 18.83	-4.68	<0.001
DBP(mmHg)	75.43 \pm 10.54	78.78 \pm 12.28	-2.40	0.017
TG(mmol/L)	1.15(0.89~1.40)	1.68(1.10~2.47)	6.161	<0.001
TC(mmol/L)	4.05 \pm 0.72	4.41 \pm 1.09	-3.16	0.0018
LDLC(mmol/L)	2.57 \pm 0.62	2.79 \pm 0.84	3.33	<0.001
HDLC(mmol/L)	1.18 \pm 0.29	1.054 \pm 0.33	-2.41	0.016

2.2 血浆中 MALAT1 表达水平

与对照组比较, 糖尿病组患者血浆 MALAT1 表达水平显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 1)。

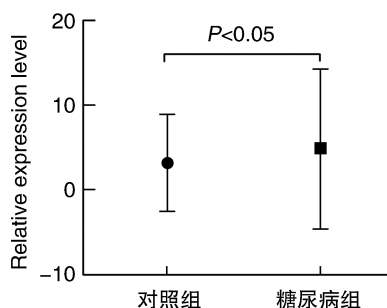


图 1. qRT-PCR 分析两组患者血浆 MALAT1 表达水平

Figure 1. MALAT1 relative expression in plasma of two groups by qRT-PCR

2.3 空腹血糖、糖化血红蛋白、糖化血清蛋白和胱抑素 C 水平

糖尿病组 FPG、HbA1c 和 GSP 的水平均高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 两组间 CysC 水平差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 2)。

表 2. 两组空腹血糖、糖化血红蛋白、糖化血清蛋白和胱抑素 C 水平比较

Table 2. Comparison of FPG, GSP, HbA1c and CysC between the two groups

指标	对照组 ($n=134$)	糖尿病组 ($n=136$)	t	P
FPG(mmol/L)	5.61 \pm 1.46	9.56 \pm 3.04	-13.59	<0.001
HbA1c(%)	5.75 \pm 0.67	8.54 \pm 1.82	-5.68	<0.001
GSP(mmol/L)	2.29 \pm 0.37	3.10 \pm 0.69	-11.98	<0.001
CysC(mg/L)	0.73 \pm 0.16	0.82 \pm 0.56	-1.80	0.074

2.4 单因素及多因素 Logistic 回归分析

以糖尿病为因变量(有=1,无=0),以吸烟史、饮酒史、SBP、DBP、TC、TG、LDLC、GSP、HbA1c、冠心病史及血浆 MALAT1 的表达为自变量,赋值后进行单因素非条件 Logistic 回归分析显示,血浆 MALAT1、吸烟、饮酒、血脂水平(TC、TG、LDLC)、FPG、HbA1c、GSP、CysC 为糖尿病的危险因素,风险分别为对照组的 1.82 倍、2.56 倍、1.76 倍、1.54 倍、2.71 倍、1.49 倍、2.47 倍、11.2 倍、29.22 倍、4.11 倍($P<0.05$,表 3)。调整年龄、性别后,进一步行多因素 Logistic 回归分析结果显示,血浆 MALAT1 的高表达是糖尿病的危险因素,风险是对照组的 1.84 倍($P<0.05$,表 4)。

表 3. 糖尿病危险因素的单因素 Logistic 回归分析

Table 3. Univariate Logistic regression analysis of risk factors for T2DM

变量	OR (95% CI)	P
MALAT1	1.82 (1.12 ~ 2.94)	0.015
吸烟史	2.56 (1.52 ~ 4.30)	<0.001
饮酒史	1.76 (1.05 ~ 2.97)	0.033
SBP	1.03 (1.02 ~ 1.05)	<0.001
DBP	1.02 (1.01 ~ 1.04)	0.019
TC	1.54 (1.17 ~ 2.04)	0.003
TG	2.71 (1.84 ~ 4.00)	<0.001
LDLC	1.49 (1.07 ~ 2.08)	0.018
FPG	2.47 (2.00 ~ 3.04)	<0.001
HbA1c	11.2 (3.18 ~ 39.52)	<0.001
GSP	29.22 (13.03 ~ 65.53)	<0.001
CysC	4.11 (1.06 ~ 15.99)	0.041
冠心病史	3.69 (1.52 ~ 8.93)	0.004

表 4. 糖尿病危险因素的多因素 Logistic 回归分析

Table 4. Multivariate Logistic regression analysis of risk factors for T2DM

变量	OR (95% CI)	P
MALAT1	1.84 (1.05 ~ 3.25)	0.034
吸烟史	2.17 (1.18 ~ 3.96)	0.012
SBP	1.06 (1.03 ~ 1.08)	<0.001
DBP	0.95 (0.92 ~ 0.99)	0.013
TG	2.62 (1.74 ~ 3.95)	<0.001
冠心病史	2.67 (1.01 ~ 7.10)	0.048

3 讨论

根据我国 2010 年全国糖尿病流行病学调查,我

国糖尿病患病率已高达 11.6%,其中 T2DM 在 90% 以上,而且具有糖尿病高危因素的人群基数较大,使得糖尿病的防治工作面临严峻的形势。当前临床上针对糖尿病的诊断主要依靠空腹血糖和餐后血糖等指标,但血糖的干扰因素较多,易受患者饮食及身体状态等混杂因素的影响。且目前临床上对于“金标本”的胰岛组织标本极难获得,因此若循环 lncRNA 能够作为临床标记物应用,这对于 T2DM 患者评估将更为有价值。目前,lncRNA 已被证实广泛参与细胞增殖、分化、周期调控及凋亡等众多生物进程中^[6-9],不仅其表达水平与特定的细胞类型相关,而且其作用靶点和作用方式均具有高度的特异性^[10],已逐步成为疾病诊断及预测的特异生物标志物。

lncRNA 是一类因缺乏开放阅读框而无编码蛋白能力的 RNA,长度超过 200 nt,具有表观遗传调控、调控剪切及转录、发挥内源性 Sponge 作用等多方面的功能^[11]。目前,lncRNA 在肿瘤等领域的研究方兴未艾^[12],但关于 lncRNA 与 T2DM 发生机制的研究仍处于萌芽阶段。Cunnington 等^[13]研究发现 lncRNA ANRIL 与糖尿病的关系与其多态性有关,证实糖尿病相关风险变体是 rs10811661-T 和 rs2383208-A。lncRNA IGF-2AS 表达于父源等位基因,是一个 IGF-2 的反义印迹基因,在高浓度葡萄糖刺激胰岛 β 细胞的模型^[14]中,研究人员发现 IGF-2AS 表达量上调,提示血糖浓度可能是影响 IGF-2AS 基因表达的重要调节因子。同样,在 14 号染色体 14q32.28 上的一个完整印记区域(SNP rs941576),Wallace 等^[15]也发现此糖尿病易感区恰巧定位于母系表达的非编码 RNA MEG3 的第 6 内含子内,表明 MEG3 的表达量可能与糖尿病发病密切相关。

lncRNA MALAT1 最早于 2003 年在人的非小细胞肺癌^[16]中发现,定位于 11q13 染色体上,长度约 8 778 bp,其核内富集且在全长范围内高度保守。很多研究^[17-18]已证实,在糖尿病及其并发症的发生发展进程中,MALAT1 与 mRNA 之间拥有共同的 miRNA 应答元件,通过竞争性结合 miR-145 和 miR-125,发挥“海绵分子”作用抑制靶 mRNA 表达,从而最终导致糖尿病的发生。同样在本研究中,在临床水平发现,与对照组比较,糖尿病组患者血浆 MALAT1 的表达明显增高。患者吸烟史、饮酒史、入院血压水平、血脂水平、GSP、HbA1c、冠心病史及血浆 MALAT1 的表达是糖尿病的危险因素。

总之,本研究发现糖尿病患者 MALAT1 表达水平在血浆中显著上调,可能与糖尿病的发生发展紧

密相关,可作为潜在的诊断和评估糖尿病风险的新颖生物标志物。但由于我们临床病例数有限,在后续的探索中仍需大样本量的验证,其具体机制也还需细胞及动物水平、在体及离体水平的实验进一步明确证实。

[参考文献]

- [1] Nolan C J, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management[J]. *Lancet*, 2011, 378(9786): 169-181.
- [2] Li J, Xuan Z, Liu C. Long non-coding RNAs and complex human diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 18790-18808.
- [3] Tarun P, Anuradha D, Zeljko B, et al. Microarray analysis of long noncoding RNAs in the heart and plasma of type 2 diabetic db/db mice[J]. *FASEB J*, 2018, 32(1): 580.
- [4] Yan B, Tao ZF, Li XM, et al. Aberrant expression of long noncoding RNAs in early diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(2): 941.
- [5] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2010[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(Suppl 1): S11-S61.
- [6] Narasimhan A, Chinnaiyan M, Karundevi B. Ferulic acid regulates hepatic GLUT2 gene expression in high fat and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 761: 391-397.
- [7] Flack JR, Ross GP, Cheung NW. GCK monogenic diabetes and gestational diabetes: possible diagnosis on clinical grounds[J]. *Diabet Med*, 2015, 32(12): 1596-1601.
- [8] Allahdini M, Kamalidehghan B, Akbari L, et al. Prevalence of the rs7903146C>T polymorphism inTCF7L2gene for prediction of type 2 diabetes risk among Iranians of different ethnicities[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9(1): 5835-5841.
- [9] Esteller, Manel. Non-coding RNAs in human disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(12): 861-874.
- [10] Liu Y, Zhao M. LnCaNet: Pan-cancer co-expression network for human lncRNA and cancer genes[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(10): 1595-1597.
- [11] Yang Y, Cai Y, Wu G, et al. Plasma long non-coding RNA, CoroMarker, a novel biomarker for diagnosis of coronary artery disease[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129: 675-685.
- [12] Gibb EA, Vucic EA, Enfield KSS, et al. Human cancer long non-coding RNA transcriptomes [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25915.
- [13] Cunnington MS, Santibanez Koref M, Mayosi BM, et al. Chromosome 9p21 SNPs associated with multiple disease phenotypes correlate with ANRIL expression [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(4): e1000899.
- [14] Mutskov V, Felsenfeld G. The human insulin gene is part of a large open chromatin domain specific for human islets [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(41): 17419-17424.
- [15] Wallace C, Smyth DJ, Maisuria-Armer M, et al. The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes [J]. *Nat Genet*, 2009, 42(1): 68-71.
- [16] Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22: 8031-8041.
- [17] Liu B, Qiang L, Wang GD, et al. LncRNA MALAT1 facilitates high glucose induced endothelial to mesenchymal transition and fibrosis via targeting miR-145/ZEB2 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(8): 3478-3486.
- [18] Liu P, Jia SB, Shi JM, et al. LncRNA MALAT1 promotes neovascularization in diabetic retinopathy through regulating miR-125b/VE-cadherin axis [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5). Doi: 10.1042/BSR20181469.

(此文编辑 许雪梅)