

## • 临床研究 •

## 糖尿病和糖尿病肾病患者血清 lncRNA GAS5/miR-21 的诊断效能

陈桐 范秋灵 崔靖彬 徐莉 汪旭 林冬芳 王力宁

**【摘要】 目的** 检测糖尿病(DM)和糖尿病肾病(DN)患者血清 lncRNA-生长停滞特异基因 5(lncRNA GAS5)和微小 RNA-21(miR-21)的表达变化,分析其与临床和病理指标的相关性,明确 lncRNA GAS5 和 miR-21 对 DM 和 DN 的诊断效能。**方法** 入组人群分为 3 组:DN 组(肾活检病理诊断明确,  $n=25$ , 男 14 例, 女 11 例)、DM 组(尿微量白蛋白/尿肌酐正常,  $n=10$ , 男 4 例, 女 6 例)和正常对照组(NC 组,  $n=9$ , 男 4 例, 女 5 例)。空腹采血,分离血清,实时荧光定量 PCR 法检测基因表达。应用  $t$  检验、Pearson、Spearman 检验及多元线性回归分析 lncRNA GAS5 及 miR-21 表达水平和各临床指标的相关性,单因素方差分析检验 lncRNA GAS5 及 miR-21 在不同分组中的差异性,用受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)评价 lncRNA GAS5 及 miR-21 在疾病中的诊断效能。所有数据采用 SPSS 20.0 统计,GraphPad 软件处理,  $P < 0.05$  视为差异有统计学意义。**结果** (1)DM 和 DN 患者血清 lncRNA GAS5 的表达水平均低于正常对照组,血清 miR-21 的表达水平均高于正常对照组,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。(2)DN 患者中,随着 24 h 尿蛋白量的逐渐增多,血清 lncRNA GAS5 的表达逐渐上调。随着肾活检病理分级的进展(IIb-III 期),血清 miR-21 的表达也上调( $P < 0.05$ )。(3)空腹血糖(FBG)和糖化血红蛋白(HbA1c)与血清 lncRNA GAS5 呈负相关( $P < 0.05$ ),并且 FBG 与血清 lncRNA GAS5 独立相关( $P < 0.05$ );尿微量白蛋白(MA)、总胆固醇(TC)、Scr、BUN 和 SBP 与血清 miR-21 水平呈正相关( $P < 0.05$ );血清白蛋白(ALB)和肾小球滤过率(eGFR)与血清 miR-21 水平呈负相关( $P < 0.05$ ),并且 ALB 与血清 miR-21 独立相关( $P < 0.05$ )。(4)血清 lncRNA GAS5、miR-21 及 lncRNA GAS5/miR-21“诊断标签”诊断 DM 的价值较好( $P < 0.05$ )。(5)血清 miR-21 及 lncRNA GAS5/miR-21“诊断标签”诊断 DN 的价值较好( $P < 0.05$ )。**结论** (1)血清 lncRNA GAS5 在 DM 中有较好的诊断效能。lncRNA GAS5/miR-21“诊断标签”诊断 DM 灵敏度 85.71%,特异度 88.89%,可以作为诊断 DM 的生物标志物。(2)血清 miR-21 表达水平可以作为 DM 和 DN 肾病的无创性诊断标志物。

**【关键词】** 糖尿病肾病; 糖尿病; 微小 RNA; lncRNA 生长停滞特异基因 5; miR-21; 诊断标签

**基金项目:**国家自然科学基金(81270808);辽宁省自然科学基金(201602821);辽宁省高等学校重大科技平台免疫皮肤病重点实验室自主创新课题基金(201303);沈阳市科技计划项目(F16-205-1-40)

**The efficiency of serum lncRNA GAS5/miR-21 as biomarkers in patients with diabetes and diabetic nephropathy** Chen Tong, Fan Qiuling, Cui Jingbin, Xu Li, Wang Xu, Lin Dongfang, Wang Lining. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: Fan Qiuling, Email: cmufql@163.com

**【Abstract】 Objective** To elucidate the efficiency lncRNA GAS5 and miR-21 as biomarkers in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. **Methods** The patients were divided into three

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2017.12.005

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学附属第一医院肾内科

通信作者: 范秋灵, Email: cmufql@163.com

groups, diabetic nephropathy group (DN group proven by renal biopsy,  $n=25$ , 14 males and 11 females), diabetes group (DM group, with normal urine albumin creatinine ratio,  $n=10$ , 4 males and 6 females), and normal control group (NC group,  $n=9$ , 4 males and 5 females). The expressions of lncRNA GAS5 and miR-21 in serum samples were detected by real-time quantitative PCR. The correlation between serum lncRNA GAS5 and miR-21 expressions and the clinical parameters was analyzed by T-test, Pearson, Spearman test and multivariate linear regression analysis. Differences of lncRNA GAS5 and miR-21 in different groups were analyzed by one-way analysis of variance. The ROC curve was used to analyze the diagnostic efficacy of lncRNA GAS5 and miR-21 in diabetes and diabetic nephropathy. All data were analyzed by SPSS 20.0 and GraphPad software, with  $P < 0.05$  as considered statistically significant. **Results** (1) The expression of serum lncRNA GAS5 was significantly down-regulated and serum miR-21 was significantly up-regulated in both diabetes mellitus and diabetic nephropathy patients compared to the NC group all ( $P < 0.05$ ). (2) In DN patients, the expression of serum lncRNA GAS5 was gradually up-regulated along with the increment of 24 h urinary protein. The expression of serum miR-21 was gradually up-regulated along with renal biopsy stage IIb-III of DN ( $P < 0.05$ ). (3) FBG and HbA1c were all negatively correlated with serum lncRNA GAS5 ( $P < 0.05$ ), and FBG was independently correlated with serum lncRNA GAS5 ( $P < 0.05$ ). Urine microalbumin, Total cholesterol (TC), Scr, Urea and SBP were all positively correlated with serum miR-21 ( $P < 0.05$ ). Albumin (ALB) and estimated GFR (eGFR) were negatively correlated with serum miR-21 ( $P < 0.05$ ), and ALB was independently correlated with serum miR-21 ( $P < 0.05$ ). (4) The diagnostic efficiency of serum lncRNA GAS5, miR-21 and lncRNA GAS5/miR-21 as "diagnostic signature" for DM were was good ( $P < 0.05$ ). (5) The diagnostic efficiency of serum miR-21 and lncRNA GAS5/miR-21 as "diagnostic signature" for DN were was good ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** (1) Serum lncRNA GAS5 had good diagnostic efficiency in diabetes mellitus. The sensitivity of lncRNA GAS5/miR-21 for diagnosis of diabetes was 85.71%, and specificity was 88.89%. (2) The level of serum miR-21 can be used as a noninvasive diagnostic marker for diabetic nephropathy.

**【Key words】** Diabetic nephropathies; Diabetes mellitus; MicroRNA; lncRNA growth arrest specific transcript 5; miR-21; Diagnostic signature

**Fund programs:** National Natural Science Foundation of China (81270808); Natural Science Foundation of Liaoning Province of China (201602821); Liaoning Provincial Key Laboratory of Immunology Dermatology Key Laboratory of Independent Innovation Fund (201303); Shenyang Science and Technology Project (F16-205-1-40)

课题组前期研究证明,高糖诱导下系膜细胞与足细胞中微小RNA-21(miR-21)的表达上调,磷酸酶和张力蛋白同源物PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)的表达上调,导致系膜细胞肥大、增殖,抑制了系膜细胞和足细胞的自噬,引起细胞外基质(ECM)增加,足细胞损伤<sup>[1]</sup>。lncRNA生长停滞特异基因5(growth arrest-specific gene, GAS5)与miR-21存在互补区域<sup>[2]</sup>,可以与miR-21组成RNA诱导的沉默复合体<sup>[3]</sup>。因此miR-21与lncRNA GAS5的表达可能与糖尿病(DM)和糖尿病肾病(DN)的ECM增加、足细胞损伤过程相关。本文拟通过检测DM和DN患者血清lncRNA GAS5和miR-21的表达变化,分析

其与临床和病理指标的相关性,明确lncRNA GAS5和miR-21在DM和DN中的诊断效能。

## 对象与方法

### 一、研究对象

(1)DN组:2012年11月至2016年9月于中国医科大学附属第一医院肾内科行肾活检,根据2010年肾脏病理协会研究委员会发布的DN病理分型标准确诊为DN的患者( $n=25$ ,男14例,女11例,其中IIb型2例,III型19例,IV型4例),平均年龄( $44.08 \pm 10.49$ )岁。(2)DM组:按世界卫生组织(WHO)DM诊断标准确诊DM,且尿微量白蛋

表 1 PCR 引物

基因名	双向引物序列		退火温度(℃)	产物长度(bp)
$\beta$ -actin(H)	F:5' GTGGCCGAGGACTTTGATTG3'	R:5' CCTGTAACAACGCATCTCATATT3'	60	73
GAS5	F:5' GCAAGCCTAACTCAAGCCATT3'	R:5' CTCCACCATTTCAACTTCCAG3'	60	66
hsa-miR-191-5p	GSP:5' GGCAACGGAATCCCAAAAG3'	R:5' GTGCGTGTCTGGAGTCG3'	60	63
hsa-miR-21	GSP:5' GGGGGGTAGCTTATCAGACTG3'	R:5' CAGTGCCTGTCTGGAGT3'	60	66

注: GSP 是对应 miRNA 的特异引物, R 是与 RT 引物相匹配的引物

白/肌酐比率 (urine albumin creatinine ratio, UACR) < 30 mg/g 的 DM 患者 ( $n=10$ , 男 4 例, 女 6 例), 平均年龄 ( $52.40 \pm 11.03$ ) 岁。(3) 正常对照组 (NC) 组: 空腹血糖 (FBG)、餐后 2 h 血糖 (2hPG)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、Scr、尿微量白蛋白 (MA)、尿 Cr、尿蛋白均在正常范围内的健康对照者 ( $n=9$ , 男 4 例, 女 5 例), 平均年龄 ( $42.78 \pm 13.43$ ) 岁。(4) 排除标准: 排除患有肿瘤、心血管疾病、肝损伤、风湿免疫系统疾病、其他肾脏病等疾病者; 排除营养不良和服用 ACEI 或 ARB 类药物的患者。病例组和对照组的性别、吸烟史、血压等相匹配。

## 二、研究方法

1. 标本采集: 清晨空腹采取静脉非抗凝血 5 ml。外周非抗凝血在室温下放置 1 h 凝固,  $4^{\circ}\text{C}$  下离心 ( $1700 \times g$ , 10 min), 收集血清后再次离心 ( $2000 \times g$ , 10 min), 保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

2. 实时荧光定量 PCR 法检测基因表达: 采用 Trizol 法进行总 RNA 提取, 反转录分别合成用于检测 lncRNA 和 microRNA 的 cDNA。将所有 cDNA 样品分别配置实时定量 PCR 反应体系并进行 PCR 反应, PCR 引物见表 1, 待测基因分别以内参 ( $\beta$ -actin、hsa-miR-191-5p) 校正, 数据采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法进行分析。

## 三、统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 用 Pearson、Spearman 检验及多元线性回归分析 NC 组、DM 组及 DN 组各临床指标的相关性, 用逻辑回归和受试者工作特征 (ROC) 曲线下面积分析 lncRNA GAS5、miR-21 及 lncRNA GAS5/miR-21 “诊断标签”在 DM 及 DN 中的诊断效能。所有数据采用 SPSS 20.0 统计, GraphPad 软件处理, 双尾检验相关性分析,  $P < 0.05$  视为差异有统计学意义。

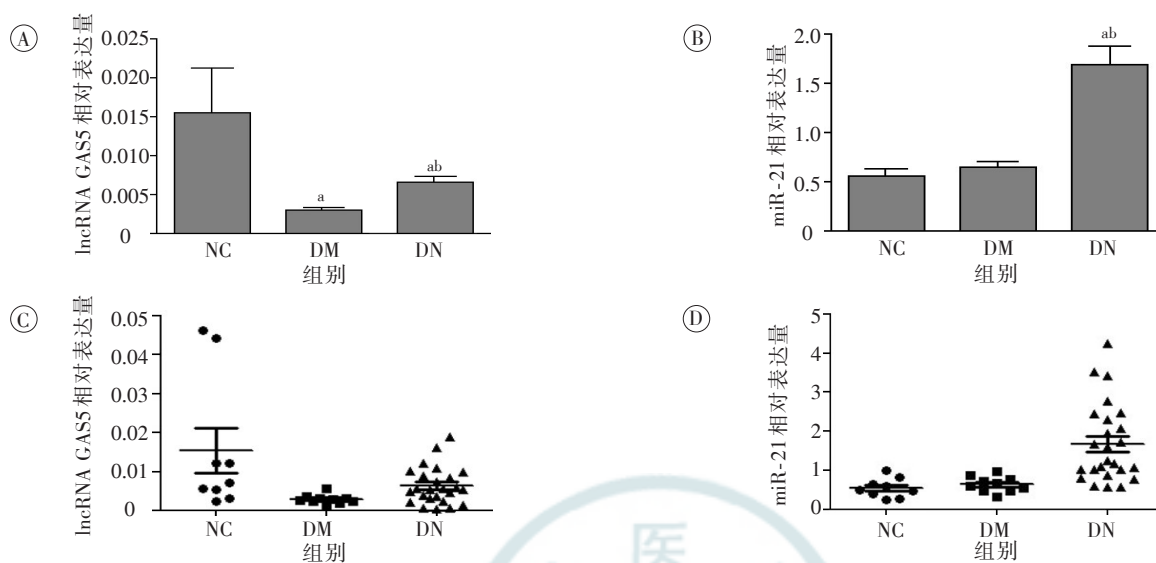
## 结 果

1. 血清 lncRNA GAS5 及 miR-21 的表达变化: DN 组和 DM 组患者血清 lncRNA GAS5 的表达均低于 NC 组, lncRNA GAS5 在 DM 组下调最明显, 3 组间两两比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。而 DN 组和 DM 组患者血清 miR-21 的表达均高于 NC 组, miR-21 在 DN 组上调最明显, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 见图 1。

2. 血清 lncRNA GAS5 及 miR-21 与临床和病理指标相关性的分层分析: DN 患者中, 随着 24 h 尿蛋白量的增加, 血清 lncRNA GAS5 的水平逐渐增高 ( $P=0.028$ )。随着肾活检病理分级的进展 (IIb-III 期), 血清 miR-21 的水平增高 ( $P=0.038$ )。血清 lncRNA GAS5 及 miR-21 的表达变化与患者的年龄、糖化血红蛋白及 CKD 分期无显著相关性, 见图 2, 表 2。

3. 血清 lncRNA GAS5 及 miR-21 与临床和病理指标的相关性分析: FBG ( $r=-0.381$ ,  $P=0.011$ )、HbA1c ( $r=-0.366$ ,  $P=0.001$ ) 与血清 lncRNA GAS5 水平呈负相关; TC ( $r=0.400$ ,  $P=0.007$ )、尿 MA ( $r=0.692$ ,  $P < 0.001$ )、Scr ( $r=0.506$ ,  $P < 0.001$ )、BUN ( $r=0.516$ ,  $P < 0.001$ )、SBP ( $r=0.431$ ,  $P=0.003$ ) 与血清 miR-21 水平呈正相关; ALB ( $r=-0.510$ ,  $P < 0.001$ )、eGFR ( $r=-0.536$ ,  $P < 0.001$ ) 与血清 miR-21 水平呈负相关, 见图 3。经逐步法回归分析, 结果显示, ALB ( $\beta=-0.054$ ,  $P < 0.001$ ) 与血清 miR-21 独立相关, FBG ( $\beta=-0.001$ ,  $P=0.022$ ) 与血清 lncRNA GAS5 独立相关。

4. 血清 lncRNA GAS5 及 miR-21 水平对 DM 的诊断价值: lncRNA GAS5 曲线下面积  $AUC=0.7302$  (95% CI: 0.540 ~ 0.9173),  $P=0.035$ , 临界值为 0.0056, 灵敏度为 62.86%, 特异度为 77.78%; miR-21 曲线下面积  $AUC=0.8397$  (95% CI: 0.7111 ~ 0.9682),  $P=0.002$ , 临界值为 0.6600, 灵敏度为



注: A、B 显示平均表达量,与 NC 组比较,  $^aP < 0.05$ ; 与 DM 组比较,  $^bP < 0.01$ ; C、D 显示表达分布; DN: 糖尿病肾病组; DM: 糖尿病组; NC: 正常对照组

图 1 lncRNA GAS5 及 miR-21 在正常对照组、糖尿病组、糖尿病肾病组血清中的表达变化(实时荧光定量 PCR)

表 2 DN 患者血清中 lncRNA GAS5 及 miR-21 与临床和病理指标相关性分层分析

项目	例数(%)	lncRNA GAS5		miR-21	
		$\bar{x} \pm s$	P	$\bar{x} \pm s$	P
24 h 尿蛋白量					
24 h 尿蛋白量 < 3.5 g	5(20)	0.0041±0.0039	0.028	1.3480±0.7113	0.552
3.5 g ≤ 24 h 尿蛋白量 < 8.0 g	15(60)	0.0057±0.0035		1.6787±1.0842	
24 h 尿蛋白量 ≥ 8.0 g	5(20)	0.0112±0.0063		2.0620±1.0655	
CKD 分期					
CKD 1 期	8(32)	0.0043±0.0027	0.238	1.5900±1.1534	0.941
CKD 2 期	8(32)	0.0067±0.0036		1.7713±1.1409	
CKD 3~4 期	9(36)	0.0082±0.0064		1.7044±0.8474	
糖化血红蛋白					
糖化血红蛋白 ≤ 6.5 mmol/L	8(32)	0.0084±0.0069	0.185	1.4350±1.1556	0.398
糖化血红蛋白 > 6.5 mmol/L	17(68)	0.0056±0.0031		1.8088±1.0521	
肾活检病理分级					
IIb 型	2(8)	0.0054±0.0008	0.820	0.5700±0	0.038
III 型	19(76)	0.0069±0.0052		1.9658±1.0006	
IV 型	4(16)	0.0054±0.0039		0.9350±0.1240	
年龄					
< 40 岁	10(40)	0.0054±0.0053	0.564	1.5570±0.9658	0.874
40~<50 岁	4(16)	0.0063±0.0027		1.7500±0.8292	
50~<60 岁	11(44)	0.0076±0.0049		1.7873±1.1640	

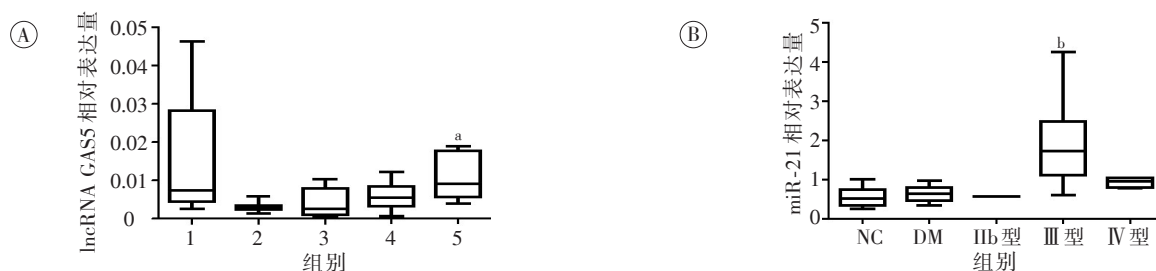
77.14%, 特异度为 77.78%, 见图 4。

5. 血清 lncRNA GAS5 及 miR-21 对 DN 的诊断价值: 血清 lncRNA GAS5 诊断 DN 的效能较差, ROC 曲线下面积无统计学意义。血清 miR-21 诊断 DN 的价值较好, miR-21 曲线下面积  $AUC = 0.9179$  (95%  $CI$ : 0.8390 ~ 0.9962),  $P < 0.001$ , 临界

值为 0.9900, 灵敏度为 76.00%, 特异度为 94.74%, 见图 5。

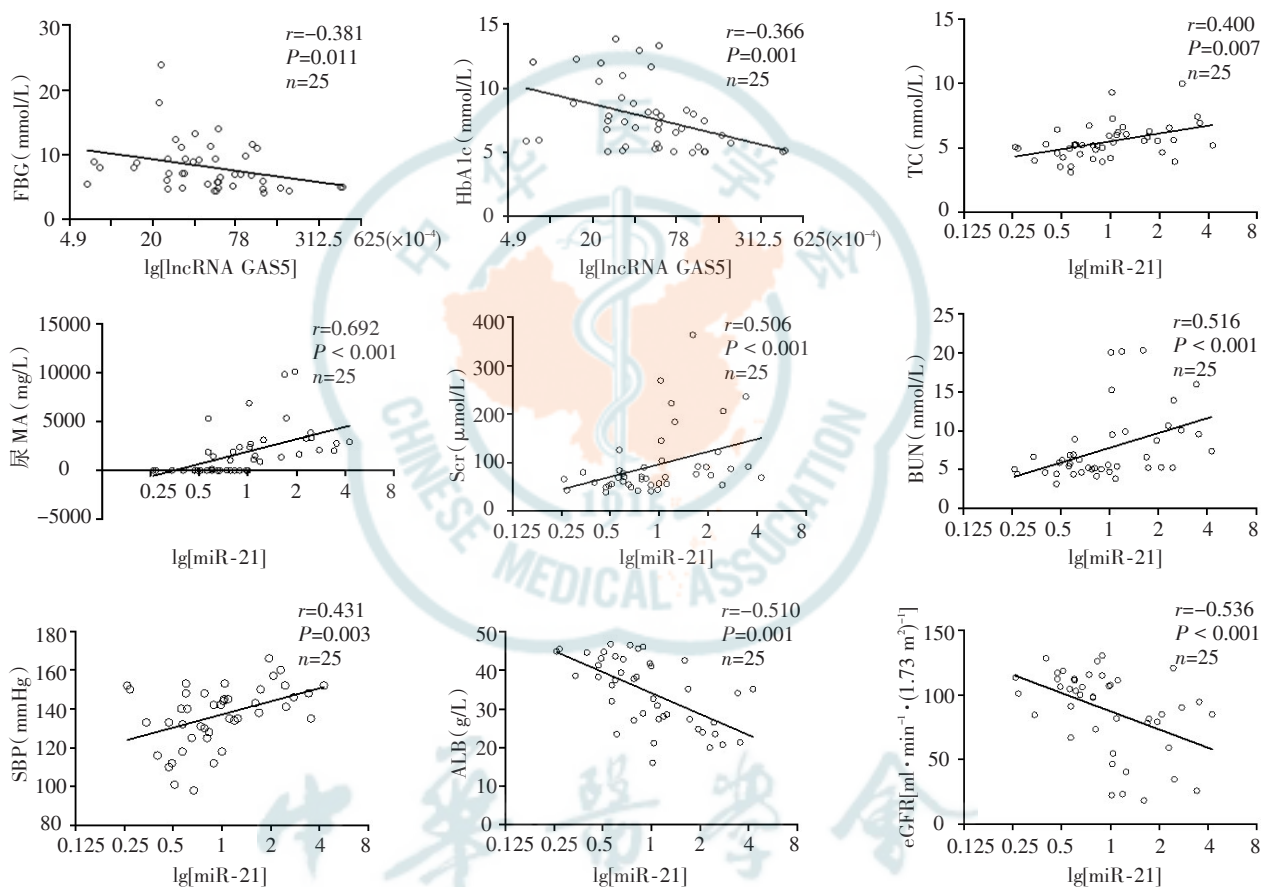
6. “诊断标签”在 DM 及 DN 中的诊断效能: 考虑到单一血清指标诊断效能的有限性, 我们使用逻辑回归对入组人群的血清 lncRNA GAS5 及 miR-21 进行分析, 利用回归系数建立一个“诊断





注: A: 血清 lncRNA GAS5 水平; 1: 正常对照组; 2: 糖尿病组; 3: 24 h 尿蛋白量 < 3.5 g 组; 4: 3.5 g ≤ 24 h 尿蛋白量 < 8.0 g 组; 5: 24 h 尿蛋白量 ≥ 8.0 g 组; 与组 4 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; B: 血清 miR-21 在不同肾活检病理分级的表达差异, 与 IIb 型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 糖尿病肾病患者血清 lncRNA GAS5 及 miR-21 在不同临床标准分组下的差异表达 (实时荧光定量 PCR)

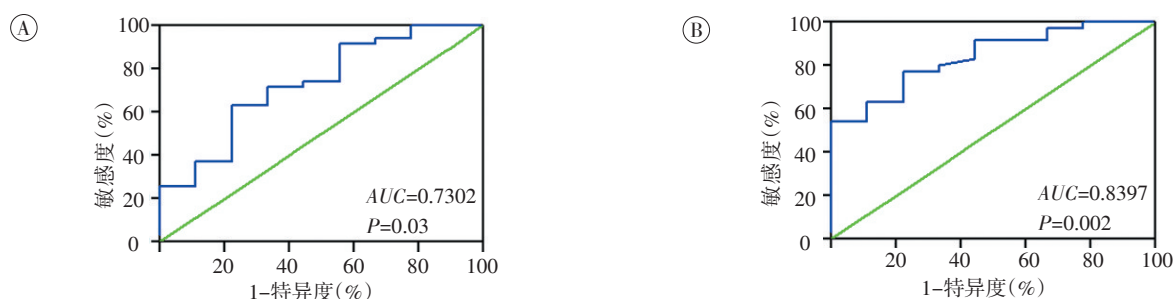


注: FBG: 空腹血糖; HbA1c: 糖化血红蛋白; 尿 MA: 尿微量白蛋白; ALB: 白蛋白; eGFR: 估算肾小球滤过率; TC: 总胆固醇

图 3 血清 lncRNA GAS5 和 miR-21 与临床及病理指标的相关性分析

标签”模型, 此模型将血清 lncRNA GAS5 及 miR-21 进行有效地融合。DM “诊断标签” =  $8.188 \times \lg[\text{miR-21}] - 3.779 \times \lg[\text{lncRNA GAS5}] - 6.008$ ; DN “诊断标签” =  $10.571 \times \lg[\text{miR-21}] - 0.33 \times \lg[\text{lncRNA GAS5}] - 0.287$ 。结果显示, (1) 正常对照组 (中位数:  $-0.0999$ ,  $IQR: -2.4386 \sim 0.7888$ )、DM 人群组 (中位数:  $2.9100$ ,  $IQR: 1.6430 \sim 4.9640$ ) 的“诊断标签”的水平差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 其曲线下面积  $AUC = 0.8984$  ( $95\% CI: 0.7653 \sim 1.0320$ ),  $P <$

$0.001$ , 当临界值为  $1.1010$  时显示出最好的准确性 (灵敏度为  $85.71\%$ , 特异度为  $88.89\%$ )。其中, 正常对照组中超临界值的占  $20\%$ , 而 DM 人群中低于临界值的占  $15\%$ , 因此 lncRNA/miRNA “诊断标签”可以很好地区分正常人群和 DM 人群。(2) DN 组 (中位数:  $1.3270$ ,  $IQR: 0.1526 \sim 4.5550$ )、非 DN 组 (中位数:  $-2.0690$ ,  $IQR: -3.0150 \sim -0.5718$ ) 的“诊断标签”水平差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 其曲线下面积  $AUC = 0.9158$  ( $95\% CI: 0.8365 \sim$



注: A: 血清 lncRNA GAS 的 ROC 曲线; B: 血清 miR-21 的 ROC 曲线

图 4 血清 lncRNA GAS 及 miR-21 诊断 DM 的受试者工作特征曲线

0.9951),  $P < 0.001$ ; 临界值为  $-0.4523$  时显示出最好的准确性 (灵敏度为 88.00%, 特异度为 84.21%)。其中, 非 DN 组中超出临界值的占 16%, 而 DN 组中低于临界值的占 12%, 因此

lncRNA/miRNA “诊断标签”可以很好地区分 DN 人群和非 DN 人群, 见图 6。

## 讨 论

DN 作为 DM 一个主要的晚期并发症, 发生于大约 40% 的 DM 患者, 至少 1/2 的 2 型 DM 和 1/3 的 1 型 DM 患者合并不同程度的肾功能不全, 因此 DM 是目前导致 CKD 及 ESRD 的最主要原因<sup>[4]</sup>。DN 典型的病理特征表现为早期系膜细胞的过度增殖、ECM 积聚和弥漫性肾小球基底膜增厚, 最终导致肾小球硬化和肾间质纤维化<sup>[5]</sup>。DN 是一种复杂的多基因疾病, 其中, 系膜细胞的过度增殖

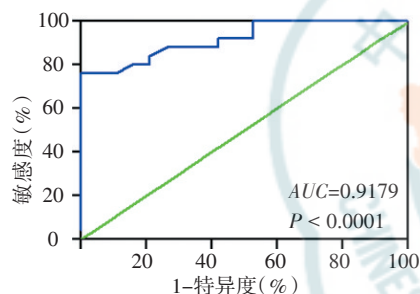
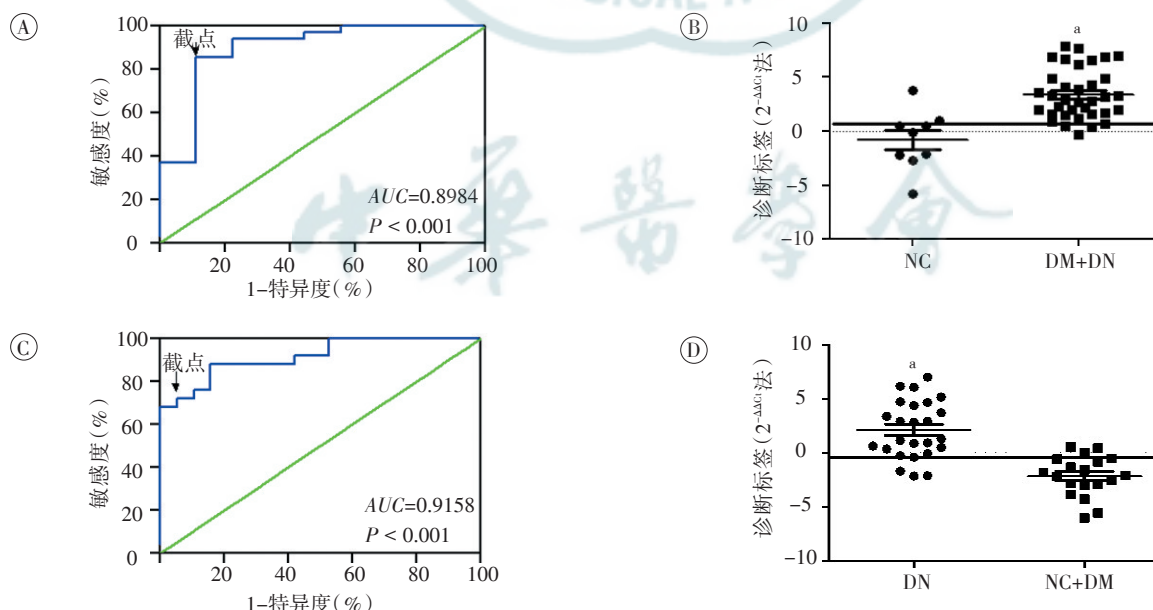


图 5 诊断 DN 血清 miR-21 的受试者工作特征曲线



注: DN+DM: 糖尿病组和糖尿病肾病组; NC+DM: 正常对照组和糖尿病组; ROC: 受试者工作特征曲线; A、B 是应用糖尿病人群 (DM+DN) 和正常对照组 (NC) 的逻辑回归模型得出的 “诊断标签” 而产生的; B: 与 NC 组相比, 糖尿病人群的特征明显更高 ( $P < 0.001$ ), 图中的连续水平线表示最高精度的临界值为 1.101; C、D: 使用应用于 DN 和非 DN 人群 (DM+NC) 的逻辑回归模型得出的 “诊断标签” 而产生的; D: 与非 DN 组相比, DN 组的特征明显更高 ( $P < 0.001$ ), 图中的连续水平线表示最高精度的临界值为  $-0.4523$

图 6 “诊断标签”的受试者工作特征曲线

在 DN 发生发展中起重要作用。

表观遗传学通常定义为在 DNA 序列不发生变化的情况下基因表达发生的可遗传改变,主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)调控<sup>[6]</sup>,解释了基因与环境之间的相互作用。微小 RNA(microRNAs, miRNA)是一种单链的小分子非编码 RNA(18~25 个核苷酸),它们通过与 3'UTR(非编码区域)碱基互补配对,导致 mRNA 的退化降解或者翻译抑制<sup>[4]</sup>。研究表明 miRNA 可以调节细胞的大多数生理过程,并且因其在血清、血浆和尿液等体液中表达稳定,且在多种恶劣条件(如极端 pH、反复冻融等)下仍然高度稳定,可作为疾病诊断的生物标志物<sup>[7]</sup>。miR-21 作为致癌基因已被证明在多种肿瘤中上调。此外,miRNA 还参与代谢相关疾病的发病,如 miR-21 通过 PTEN/AKT、TGF- $\beta$ /Smad 和 MMP-S/TIMPS 信号途径参与 DN 的发病<sup>[8]</sup>。

本研究结果显示,与 NC 组相比,血清 miR-21 的表达水平在 DM 组和 DN 组中上调,DN 组是 DM 组的 2.60 倍,DN 组是 NC 组的 1.17 倍,且随着 DN 病理分级的进展,血清 miR-21 的表达逐渐上调( $P < 0.05$ )。血清 miR-21 表达水平与尿微量白蛋白水平、Scr、BUN 呈正相关,与血清白蛋白呈负相关,并且血清 miR-21 水平是血清白蛋白水平的独立危险因素,提示 DM 状态下 miR-21 的过表达,可能促进了 DN 病理改变的加重,导致尿蛋白增加,血清白蛋白降低,肾功能下降,提示 DN 发生的可能性。虽然 miR-21 升高可导致许多潜在疾病发生,但本研究在病例选取及分组设定上已经排除 miR-21 过表达对其他疾病的影响。

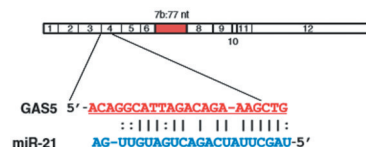
ROC 曲线显示血清 miR-21 达到 0.6600(临界值)时诊断 DM 的灵敏度和特异度较高,而当 miR-21 达到 0.9900 时诊断 DN 的特异度更高,提示血清 miR-21 表达水平可以作为 DM 和 DN 的无创性诊断标志物,预测 DM 和 DN 的发生。

lncRNAs 为长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA<sup>[2]</sup>,占全部 ncRNA 的 80%~90%<sup>[9]</sup>。lncRNA 调节基因功能的途径多种多样,最为重要的一种方式便是通过碱基互补配对与靶基因结合来直接调节靶基因的转录翻译或间接调节靶基因上游或下游基因的转录翻译<sup>[10]</sup>。lncRNA 的表达在不同疾病、组织及发育阶段中存在时空特异性、序

列特异性、细胞及组织特异性。lncRNA 通常具有二级结构,在包括血液、尿液等体液中的表达相对稳定,这使得 lncRNA 成为新型的分子诊断标志物或药物治疗靶点。lncRNA GAS5 最初被发现在生长停滞的细胞中积累,在 1988 年被首次分离,因其在生长停滞细胞中优先表达,被视为新的肿瘤抑制基因<sup>[11-12]</sup>。2015 年有文献首次报道循环 lncRNA GAS5 与 DM 有明显的相关性,通过 96 例受试者验证得出,DM 患者血清中 lncRNA GAS5 的表达水平下调,并且 Hb1Ac > 5.9 mmol/L 时 lncRNA GAS5 的表达水平显著下降,ROC 分析显示与健康人相比,lncRNA GAS5 的临界值不超过 10 ng/ $\mu$ l 时患 DM 的概率增加 12 倍,但其机制尚未完全阐明<sup>[13]</sup>。

本研究结果显示,血清 lncRNA GAS5 在 DM 组、DN 组的表达较 NC 组显著下调。空腹血糖、糖化血红蛋白与血清 lncRNA GAS5 呈负相关,且血清 lncRNA GAS5 是空腹血糖的独立保护因素,提示 lncRNA GAS5 表达下调可能促进了高血糖的发生。ROC 曲线下的面积表明血清 lncRNA GAS5 在 DM 中有较好的诊断效能,可以预测 DM 的发生,但在诊断 DN 方面特异度较低。

众所周知 miRNA 可以调控多种蛋白质编码基因,但很少知道 miRNA 是否也可以调控 lncRNA。通过 RNA22 program 软件(<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>)<sup>[12]</sup>,我们得知 GAS5 的外显子 4 衍生的序列含有 miR-21 结合位点,使 GAS5 具有与 miR-21 的互补区域(图 7),因此 lncRNA GAS5 理论上可以与 miR-21 组成 RNA 诱导的沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC),从而形成一个相互抑制的调节环路<sup>[3]</sup>。已有研究显示乳腺肿瘤患者标本中的 miR-21 和 lncRNA GAS5 表达呈负相关,lncRNA GAS5 作为 miR-21 的负向调控因子调控软骨细胞存活,参与骨关节炎的发生<sup>[14]</sup>。lncRNA GAS5 作为 miR-21 的竞争性



注:lncRNA GAS5(顶部)由 12 个外显子组成,其中外显子 4 中存在推测出的结合位点

图 7 lncRNA GAS5 和 miR-21 的结合位点



内源性 RNA, 导致 PI3K/Akt/mTOR 信号通路异常活化, 而 PTEN 作为 miR-21 的内源性靶标和重要的胰岛素信号通路抑制剂被去阻遏, 进而表达增加<sup>[3,9]</sup>, 促进系膜细胞肥大、增殖、抑制系膜细胞和足细胞自噬, 引起 ECM 积聚, 足细胞损伤<sup>[1]</sup>。本研究中 lncRNA GAS5 在血清中表达下调, miR-21 表达水平上调, 提示二者可能存在负向调控, 课题组将在细胞实验中进一步验证两者的相关性。

lncRNA GAS5 和 miR-21 的血清表达水平分别显示适度的诊断效能, 结合 lncRNA GAS5 和 miR-21 的“诊断标签”诊断 DM 的 AUC 增加至 0.8984, 灵敏性增加至 85.71%, 特异性增加至 88.89%, 提示该“诊断标签”较单独血清 lncRNA GAS5 和 miR-21 提高了诊断 DM 的效能, 然而对 DN 的诊断, 单独血清 miR-21 水平的诊断效能最高。

血清 lncRNA GAS5、miR-21 和结合 lncRNA GAS5/miR-21 的“诊断标签”在诊断 DM 和 DN 中均具有较好的诊断效能。尽管在诊断 DM 方面, 与血糖等标志物相比在检测方法上无明显优势, 但通过求得临界值, lncRNA GAS5 和 lncRNA GAS5/miR-21 “诊断标签”的表达水平可以提示有无 DM 及 DN 发生的可能性, 因此它们有望作为一种新的无创性生物标志物, 用于监测 DM 和 DN 的发生和进展。

### 参 考 文 献

- [1] Lu X, Fan Q, Xu L, et al. Ursolic acid attenuates diabetic mesangial cell injury through the up-regulation of autophagy via miRNA - 21/PTEN/Akt/mTOR suppression[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117400. DOI: 10.1371/journal.pone.0117400.
- [2] Li X, Wu Z, Fu X, et al. lncRNAs: insights into their function and mechanics in underlying disorders[J]. Mutat Res Rev Mutat Res, 2014, 762: 1 - 21. DOI: 10.1016/j.mrrev.2014.04.002.
- [3] Zhang Z, Zhu Z, Watabe K, et al. Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21[J]. Cell Death Differ, 2013, 20(11): 1558-1568. DOI: 10.1038/cdd.2013.110.
- [4] Song YX, Yue ZY, Wang ZN, et al. MicroRNA - 148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 1. DOI: 10.1186/1476-4598-10-1.
- [5] Mourtada - Maarabouni M, Williams GT. Role of GAS5 noncoding RNA in mediating the effects of rapamycin and its analogues on mantle cell lymphoma cells[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2014, 14(6): 468 - 473. DOI: 10.1016/j.clml.2014.02.011.
- [6] Jurkowski TP, Ravichandran M, Stepper P. Synthetic epigenetics - towards intelligent control of epigenetic states and cell identity[J]. Clin Epigenetics, 2015, 7: 18. DOI: 10.1186/s13148-015-0044-x.
- [7] Han L, Ma P, Liu SM, et al. Circulating long noncoding RNA GAS5 as a potential biomarker in breast cancer for assessing the surgical effects[J]. Tumour Biol, 2016, 37(5): 6847 - 6854. DOI: 10.1007/s13277-015-4568-7.
- [8] 赵雯雯, 涂晓文. MiR - 21 及其信号通路在糖尿病肾病中的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, (8): 747 - 749. DOI: 10.3969/j.issn.1009-587X.2014.08.036.
- [9] 王婷梅, 曲丽娜, 李莹辉. lncRNA 的结构、功能及其与疾病的关系[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(07): 659-666.
- [10] Yoon JH, Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA[J]. J Mol Biol, 2013, 425(19): 3723-3730. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.11.024.
- [11] Williams GT, Farzaneh F. Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer? [J] Nat Rev Cancer, 2012, 19(12): 84-88. DOI: 10.1038/nrc3195.
- [12] Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells[J]. Cell, 1988, 54(6): 787-793.
- [13] Carter G, Miladinovic B, Patel AA, et al. Circulating long noncoding RNA GAS5 levels are correlated to prevalence of type 2 diabetes mellitus[J]. BBA Clin, 2015, 4: 102-107. DOI: 10.1016/j.bbacli.2015.09.001.
- [14] Song J, Ahn C, Chun CH, et al. A long non-coding RNA, GAS5, plays a critical role in the regulation of miR-21 during osteoarthritis[J]. J Orthop Res, 2014, 32(12): 1628-1635. DOI: 10.1002/jor.22718.

(收稿日期: 2017-06-14)

(本文编辑: 王欣)