

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.02.009

临床研究

2 型糖尿病肾阴虚证患者差异 lncRNA 的筛选及分析

张技¹, 韩玉萍^{1*}, 罗梅²

(1. 成都中医药大学基础医学院, 四川省成都市温江区柳台大道 1166 号, 611137; 2. 成都中医药大学附属医院)

摘要 目的 找出与 2 型糖尿病肾阴虚证发生、发展相关的 lncRNA, 并探讨其调控的作用机制。方法 采用 lncRNA/mRNA 芯片对 6 例 2 型糖尿病肾阴虚证患者和 4 例健康成人外周血进行基因表达谱检测, 两组数据对比得到差异 lncRNA, 再对差异 lncRNA 进行靶基因的预测, 并将靶基因与差异 mRNA 联合分析, 从中找出可能与 2 型糖尿病肾阴虚证发病相关的 lncRNA。结果 筛选出差异 lncRNA 275 条, 其中上调 lncRNA 数为 217 条, 下调 lncRNA 数为 58 条。采用顺式调控预测, 相关的差异 lncRNA 有 161 条; 采用反式调控预测, 相关的差异 lncRNA 有 107 条。在与差异 mRNA 数据中对比发现, 靶基因表达水平有改变的 lncRNA 7 条。结论 lncRNA AF116618、HMLincRNA880 与 2 型糖尿病肾阴虚证的发生、发展可能有着密切的关系, 有作为 2 型糖尿病肾阴虚证新的诊断标志物和药物靶点的可能。

关键词 2 型糖尿病; 肾阴虚; lncRNA; 靶基因

lncRNA (long non-coding RNA) 是一类 RNA 分子, 其转录本长度超过 200nt, 存在于细胞核或细胞质中, 由 RNA 聚合酶 II 催化生成, 不具有编码蛋白质的作用, 曾一度被认为是转录过程的副产物^[1-2]。目前研究已经证实, lncRNA 有着非常复杂的生物学功能, 广泛参与了许多重要的生命过程, 其表达的异常与糖尿病、癌症、免疫性疾病等多种疾病的发生、发展密切相关^[3-4]。糖尿病归属于中医学“消渴”范畴, 肾阴虚证是其常见证型之一^[5]。本研究通过对 2 型糖尿病肾阴虚证患者差异 lncRNA 进行筛选、分析, 找出与 2 型糖尿病肾阴虚证发生、发展相关的 lncRNA, 并对其调控作用机制进行探讨, 探寻疾病、证候诊断的生物学标志及潜在的药物靶点。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2014 年 1—10 月成都中医药大学第三附属医院 2 型糖尿病肾阴虚证住院患者 6 例设为研究组。患者均符合《中国 2 型糖尿病防治指南 (2010 版)》^[6] 诊断标准, 辨证标准参照《中药新

药临床研究指导原则 (试行)》^[7] 中肾阴虚证辨证标准, 3 位临床中医内科学副主任医师共同辨证; 无糖尿病严重并发症, 同时无其他系统器质性病变; 年龄 50~76 岁, 均为女性。选择同期在成都中医药大学第三附属医院体检的健康成人 4 例设为对照组, 年龄 45~70 岁, 均为女性; 经血常规、血生化、心电图、胸透等检查, 排除糖尿病及其他疾病, 并经 3 位临床中医内科学副主任医师共同辨证排除肾虚证。本研究获得成都中医药大学附属医院医学伦理委员会的批准, 受试者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

Trizol 试剂 (货号: 15596026, Invitrogen 公司); RNeasy mini Kit (250) (货号: 74106)、RNeasy micro Kit (50) (货号: 74004)、RNase-free DNase set (50) (货号: 79254), Qiagen GmbH 公司; Low Input Quick Amp Labeling Kit 单标 (货号: 5190-2305)、RNA Spike-In Kit 单标 (货号: 5188-5282)、Gene Expression Hybridization Kit (货号: 5188-5242)、Gene Expression Wash Buffer Kit (货号: 5188-5327), Agilent technologies 公司。

AW-CJ-4F 超净工作台, 苏静集团安泰有限公司; MDF-382E 超低温冰箱, 日本三洋电机株式会社

基金项目: 国家自然科学基金 (81202792)

* 通讯作者: 12722005@qq.com, (028) 61800220

社; 5415D 高速离心机, Eppendorf 公司; JY10001 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; NanoDrop ND-1000 紫外可见分光光度计, Nanodrop 公司; 2100 生物分析仪, Agilent technologies 公司; PTC-100 热循环仪, MJ 公司; G2545A 杂交炉、G2534A 杂交室、G2565CA 微阵列芯片扫描仪, Agilent technologies 公司。

1.3 标本的采集、RNA 的提取和纯化

用 EDTA 抗凝管抽取受试者肘静脉血 10 ml, 加入 RBC 裂解液 30 ml, 离心。弃上清液, 将下层沉淀细胞转入 1.5 ml EP 管中, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后, 加入 Trizol 试剂 2 ml, -80°C 保存。在室温条件下, 将样品 RNA 复温, 采用 Trizol 试剂抽提样本总 RNA。通过生物分析仪对抽提的总 RNA 进行电泳质检, 保证后续检测 RNA 样本质量合格。随后使用 RNeasy micro kit 和 RNase-Free DNase Set 纯化总 RNA。

1.4 芯片实验

本实验所用芯片为 Agilent Human lncRNA $4 \times 180\text{K}$ 表达谱芯片, 共有 10 个标本, 制作完成芯片 10 张。采用 Agilent 表达谱芯片配套试剂盒 Low Input Quick Amp Labeling Kit, 单标和标准操作流程对样品总 RNA 中的 mRNA 进行放大并标记, 用 RNeasy mini kit 纯化标记后的 cRNA。按照 Agilent 表达谱芯片配套提供的杂交标准流程和配套试剂盒 Gene Expression Hybridization Kit, 在滚动杂交炉中, 65°C 、10 r/min, 滚动杂交 17h, 杂交 cRNA 上样量为 $1.65 \mu\text{g}$, 并在洗缸中使用 Gene Expression Wash Buffer Kit 试剂洗片。完成杂交的芯片采用 Agilent 微阵列芯片扫描仪进行扫描, 软件设置 Dye

channel: Green, Scan resolution = $3 \mu\text{m}$, 20bit。此步骤由上海伯豪生物技术有限公司协助完成。

1.5 芯片数据的采集及分析方法

运用 Feature Extraction software 10.7 软件读取数据, 采用 Gene Spring Software 11.0 软件进行归一化处理, 所用算法为 Quantile, 从而筛选出差异 lncRNA。差异基因筛选参数: 倍数差异 (FC) 是待比较的两个标准化后的信号相除所得值; 显著性差异 P 值采用统计学 t 检验。提取差异 lncRNA 的序列, 通过序列对比对差异 lncRNA 初筛后, 再通过 RNAplex 进一步筛选, 以预测差异 lncRNA 可能调控的靶基因。将预测的靶基因联合差异 mRNA 数据, 筛选出更有价值的 lncRNA。

2 结果

2.1 两组受试者差异 lncRNA 筛选结果

差异基因筛选参数设置为: $\text{FC} \geq 2$ 或 ≤ 0.5 , 差异有统计学意义 $P \leq 0.05$, 并且每个探针点的 Flag 值/Call 值为 A 的至少在一组内不出现。分析发现, 两组差异 lncRNA 的数目为 275 条, 其中上调 lncRNA 数为 217 条, 下调 lncRNA 数为 58 条。由于差异 lncRNA 数量较多, 仅按照 FC 值排序, 列举前 15 位 lncRNA, 具体见表 1。同时, 运用上海生物芯片公司的 SAS 系统, 进行 Heatmap 分析, 以观察到不同样本同一基因的表达情况, 并根据基因表达情况验证样本分组情况。结果显示, 实验数据与实验分组相吻合。

2.2 两组受试者差异 lncRNA 靶基因的预测

lncRNA 功能的发挥可能是通过调控 mRNA 来进行, 因此, 对 lncRNA 靶基因的预测对本研究有

表 1 2 型糖尿病肾阴虚证患者与正常人差异 lncRNA 表达情况 (前 15 位)

探针号	lncRNA	P 值	倍数差异 (FC)	表达情况
pl035923	ENST00000510592	0.000219	2.152665	上调
agiseq31771	AK124277	0.000455	2.172683	上调
pl095748	NR_002215	0.000567	2.365359	上调
pl075843	transcript_id "ENST00000441287.1"	0.000771	2.210746	上调
pl087242	uc004fao	0.000868	2.631433	上调
pl059968	HIV1373	0.001237	2.465234	上调
agiseq14036	ENST00000427439	0.001328	2.047803	上调
agiseq42526	TCONS_00004684	0.001768	2.125635	上调
agiseq15419	ENST00000447729	0.001890	2.288109	上调
pl076026	uc001zax	$8.69\text{E-}05$	0.465789	下调
CUST_4855_PI428631609	ENST00000432910	0.000852	0.328470	下调
pl047101	BC027461	0.001025	0.429210	下调
agiseq25221	TCONS_00022588	0.001464	0.488140	下调
pl022526	ENST00000427691	0.001792	0.438541	下调
pl044090	AL832624	0.002253	0.457378	下调

表 2 2 型糖尿病肾阴虚证患者与正常人差异 lncRNA 靶基因的预测结果 (前 10 位)

探针号	表达情况	顺式调控基因	反式调控基因
pl076026	下调	MIR4715、ATP10A	ATP10A
pl035923	上调		ARIH2OS、C2orf68、CCL5、CPT1A、DPH1、EFCAB2、ENTPD4、FOXK1、GREB1、GBP4、GNAI2、HES2、INMT、IRF1、LANCL3、LYZ/LRRC28、LIX1L、LAIR1、LRRC58、MFN1、NRDE2、PSMG4、RAB21、SHROOM1、SCNM1、TONSL、TBC1D24、WDR45、ZMAT3、ZNF91、ZNF543
pl054128	上调		CD96、FSIP2、KIAA1919、ZNF543、MFN1、FOXK1、RP11-47I22.4
pl104124	上调		SHISA9、XKR9
pl095748	上调	GRIK1、BACH1、GRIK1-AS2	
pl089082	上调		ERI1
CUST_4855_P1428631609	下调	LOC284757	
pl087242	上调	FGF13、FGF13-AS1	
pl047101	下调	LOC284757	NXN、KIAA0355、AL354898.1
pl059968	上调	TNR	AL590867.1、OPHN1、LPP、RP11-47I22.4、ATP9B、FSIP2、TNR、ABCC9、PCDH11X、BLOC1S6、C12orf55

表 3 2 型糖尿病肾阴虚证患者与正常人差异 lncRNA 靶基因、差异 mRNA 的联合分析

靶基因及表达情况	基因 (功能)	lncRNA 及表达情况
VWA1 (上调)	血管性假血友病因子控制域 1	ENST00000378821 (上调)
SLC4A1 (上调)	溶质载体家族 4 (质子偶联二价金属离子转运蛋白), 成员 1	AF113686 (上调)
SERPING1 (上调)	丝氨酸蛋白酶抑制剂肽酶, G 亚类 (C1 抑制剂), 成员 1	HMLincRNA880 (上调)
TSPAN5 (上调)	四跨膜蛋白 5	pl098639 (探针号) (下调)
SNCA (上调)	α -突触核蛋白	pl041833 (探针号) (上调)
SPON2 (下调)	脊椎 2	DA087369 (下调)
STRADB (上调)	属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 STE20 家族	AF116618 (上调)

着非常重要意义。采用顺式调控预测 (cis 预测), 相关的差异 lncRNA 有 161 条; 采用反式调控预测 (trans 预测), 相关的差异 lncRNA 有 107 条。根据 FC 值排序, 居于前 10 位的 lncRNA 及其可能调控的靶基因详见表 2。

2.3 两组受试者差异 lncRNA、mRNA 表达谱的联合分析

两组样本在芯片数据的采集中, 获得差异 lncRNA 的同时, 还可获得差异 mRNA。本芯片检测共获得差异 mRNA 107 条。将预测出的差异 lncRNA 靶基因, 与两组间实际存在的差异 mRNA 做对比, 找到表达量有改变的靶基因, 即差异 mRNA, 从而筛选出更有价值的差异 lncRNA。通过上述对比分析, 我们获得了 7 条差异 lncRNA 及其对应的靶基因, 详见表 3。

3 讨论

在 2 型糖尿病肾阴虚证患者与正常人差异 lncRNA 及相关靶基因的预测中, 我们得到了海量的数据。在将靶基因与差异 mRNA 进行联合分析时, 我们发现了 7 条差异 lncRNA 及其对应的靶基因表达水平有改变。通过对 7 个靶基因功能的分

析, 推测 lncRNA AF116618 和 HMLincRNA880 可能与 2 型糖尿病肾阴虚证的发生、发展有着密切关系。

STRADB 是 lncRNA AF116618 对应的靶基因。STRADB 基因定位于 2q33.1, 含有 12 个外显子, 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 STE20 家族^[1]。STRADB 蛋白的组成较为复杂, 包括丝氨酸/苏氨酸激酶 11 活性、调节细胞极性和能量代谢激酶活性^[1]。该蛋白可以调节激酶由细胞核转移至细胞浆中, 进而对调节 G1 期细胞周期阻滞发挥重要作用^[2]。此外, STRADB 蛋白还可和凋亡蛋白 X 染色体连锁抑制剂相互作用, 并且通过 JNK1 信号通路, 使加强其抗凋亡的活性^[3]。现有研究发现, AMPK 的活化对体内的糖、脂代谢均有重要的调节作用, 且具有抑制胰岛素抵抗的作用^[4]。2 型糖尿病肾阴虚证患者中 lncRNA AF116618 显著升高, 可能通过影响 STRADB 基因表达, 进而抑制 AMPK 信号通路, 使细胞、机体的能量供应受阻。因此, lncRNA AF116618 与 2 型糖尿病肾阴虚证的发生、发展可能密切相关。

SERPING1 是 HMLincRNA880 的靶基因。SERPING1 基因定位于 11q12.1, 含有 8 个外显

子^[13]。该基因可能在调节补体激活、血液凝固、纤溶、激肽的生成等生理途径中有重要的作用^[16-17]。该基因编码高度糖基化的血浆蛋白,含有 500 个氨基酸残基,可参与补体级联反应,并可抑制 C1r 和 C1s 的活化,从而起到调节补体活化的作用。该蛋白可与 E. coli stcE 结合而定位于细胞膜上,避免细菌受到补体介导的裂解^[13]。2 型糖尿病肾阴虚证患者 HmlncRNA880 表达水平的增高可能引起靶基因 SERPING1 表达水平的改变,进而影响编码蛋白含量及补体系统激活,导致机体免疫应答的发生。研究发现,糖尿病及其并发症的发生与免疫系统的过度活化相关^[19-20]。因此,在 2 型糖尿病肾阴虚证发生、发展中, HmlncRNA880 可能通过靶基因 SERPING1 而发挥作用。

综上所述, lncRNA AF116618 可能通过靶基因 STRADB 抑制 AMPK 信号通路,使细胞、机体能量供应受阻,进而引起 2 型糖尿病肾阴虚证的发生、发展。HmlncRNA880 可能通过靶基因 SERPING1 影响补体系统激活,引起机体免疫应答,从而导致 2 型糖尿病肾阴虚证的发生、发展。lncRNA AF116618、HmlncRNA880 可能是 2 型糖尿病肾阴虚证诊断、治疗中的潜在靶点。但由于实验样本量偏少、靶基因及相应蛋白的表达水平尚未检测,这都需要在后续实验中进一步验证及探讨,以明确相关 lncRNA 在 2 型糖尿病肾阴虚证中的分子机制。

参考文献

- [1] KIM ED, SUNG S. Long noncoding RNA: unveiling hidden layer of gene regulatory networks [J]. Trends Plant Sci, 2012, 17(1): 16-21.
- [2] NIAZI F, VALADKHAM S. Computational analysis of functional long noncoding RNAs reveals lack of peptide-coding capacity and with 3' UTRs [J]. RNA, 2012, 18(4): 825-843.
- [3] LEE JT. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs [J]. Science, 2012, 338(6113): 1435-1439.
- [4] 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.
- [5] KITAGAWA M, KOTAKE Y, OHHATA T. Long non-coding RNAs involved in cancer development and cell fate determination [J]. Curr Drug Targets, 2012, 13(13): 1616-1621.
- [6] PENG X, GRALINSKI L, ARMOUR CD, et al. Unique signatures of long noncoding RNA expression in response to virus infection and altered innate immune signaling [J].

MBiol, 2010, 1(5): e00206-e00210.

- [7] 朱文锋. 中医诊断学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005: 169-175.
- [8] 中华医学会糖尿病分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2010 版) [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2011: 57-59.
- [9] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 388.
- [10] HILLIER LW, GRAVES TA, FULTON LA, et al. Generation and annotation of the DNA sequences of human chromosomes 2 and 4 [J]. Nature, 2005, 434(7034): 724-731.
- [11] BOUDEAU J, MIRANDA-SAAVEDRA D, BARTON GJ, et al. Emerging roles of pseudokinases [J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(9): 443-452.
- [12] BOUDEAU J, BAAS AF, DEAK M, et al. MO25alpha/beta interact with STRAD alpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm [J]. EMBO J, 2003, 22(19): 5102-5114.
- [13] SANNA MG, DA SILVA CORREIA J, LUO Y, et al. ILPIP, a novel anti-apoptotic protein that enhances XIAP-mediated activation of JNK1 and protection against apoptosis [J]. J Biol Chem, 2002, 277(34): 30454-30462.
- [14] FERDAOSSI M, ABDELLI S, YANG JY, et al. Exendin-4 protects beta-cells from interleukin-1 beta-induced apoptosis by interfering with the c-Jun NH2-terminal kinase pathway [J]. Diabetes, 2008, 57(5): 1205-1215.
- [15] DAVIS AE 3rd, WHITEHEAD AS, HARRISON RA, et al. Human inhibitor of the first component of complement, C1: characterization of cDNA clones and localization of the gene to chromosome 11 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(10): 3161-3165.
- [16] STEINER UC, KELLER M, SCHMID P, et al. Mutational spectrum of the SERPING1 gene in Swiss patients with hereditary angioedema [J]. Clin Exp Immunol, 2017, 188(3): 430-436.
- [17] ROSSI V, BALLY I, ANCELET S, et al. Functional characterization of the recombinant human C1 inhibitor serpin domain: insights into heparin binding [J]. J Immunol, 2010, 184(9): 4982-4989.
- [18] LAMARK T, INGEBRIGTSEN M, BJORNSTAD C, et al. Expression of active human C1 inhibitor serpin domain in Escherichia coli [J]. Protein Expr Purif, 2001, 22(2): 349-358.
- [19] 林晓仪, 郭颖. 核因子- κ B 对 TNF- α 诱导的脂肪细胞葡萄糖转运蛋白 4 表达的影响 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(1): 21-25.
- [20] 王水秀, 马云清. NF- κ B 在 2 型糖尿病中的发病机制 [J]. 赤峰学院学报, 2012, 28(1): 49-51.

(下转第 136 页)

reserve infertility were randomized into a treatment group (33 cases) and a control group (35 cases). The treatment group was given oral *Kuntai Jiaonang*, 2.0 g each time, 3 times each day. The control group was given oral dehydroepiandrosterone, 25 mg each time, 3 times each day. The course in both groups was 3 menstrual cycles. During treatment, patients' medication, side effect and pregnancy were examined. At the end of treatment, follow-up was carried out for 4 cycles of in vitro fertilization and embryo transfer. Patients' serum levels of basal follicle stimulate hormone (FSH), basal estradiol (E_2), luteinizing hormone (LH) and follicular stage anti-Müllerian hormone (AMH), as well as basal antral follicle number (AFC), clinical pregnancy rate of in vitro fertilization and embryo transfer during follow-up and periodic clinical pregnancy rate were compared between two groups before and after treatment.

Results Compared between patients in two groups before and after treatment, there were no significant differences in levels of FSH, E_2 , LH and AFC ($P > 0.05$). In the treatment group, 5 patients did not go through in vitro fertilization and embryo transfer. The clinical pregnancy was 5 cases in the treatment group, and 9 cases in the control group. In the first cycle, the clinical pregnancy was 3 of 17 cases in the treatment group, and 1 of 21 cases in the control group. In the second cycle, the clinical pregnancy was 1 of 9 cases in the treatment group, and 2 of 20 cases in the control group. In the third cycle, one of two patients in the treatment group, and 4 of 6 patients in the control group were pregnant. In the forth cycle, there was no transfer patient in the treatment group, and the pregnancy in the control group was 2 of 2 cases. During the research, some patients in the control group had facial acne. No side effect was found in the treatment group. **Conclusion** The improvement of ovarian reserve function and clinical pregnancy rate in patients with hypofunction of ovarian reserve infertility by *Kuntai Jiaonang* was equivalent to that by dehydroepiandrosterone. Moreover, *Kuntai Jiaonang* seems to be safe.

Keywords hypofunction of ovarian reserve; infertility; pregnancy outcome; *Kuntai Jiaonang*; dehydroepiandrosterone

(收稿日期: 2017-07-10; 修回日期: 2017-09-12)

编辑: 叶 晨

(上接第 127 页)

Screening and Analysis of Differential lncRNA in Patients with Type 2 Diabetes with Kidney-yin Deficiency Syndrome

ZHANG Ji¹, HAN Yuping¹, LUO Mei²

(1. School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 611137; 2. Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To find the long non coding RNA (lncRNA) related to 2 diabetes with kidney-yin deficiency syndrome and to explore the regulatory mechanism. **Methods** Gene expression profiles detection was made by lncRNA/mRNA chip to test the peripheral blood of 6 patients with type 2 diabetes with kidney-yin deficiency syndrome and 4 healthy adults. The differential lncRNA was obtained by comparing data of two groups. Prediction of target genes was made in differential lncRNA. Pooled analysis was conducted on the target genes and differential lncRNA to find lncRNA which might be related to onset of type 2 diabetes with kidney-yin deficiency syndrome. **Results** Two hundred and seventy-five differential lncRNAs were screened out. Among them, there were 217 up-regulating lncRNAs and 58 down-regulating lncRNAs. By cis-acting prediction, there were 161 related differential lncRNAs. By trans-acting prediction, there were 107 related differential lncRNAs. It was found by comparing with differential RNA data that target genes expression levels changed in 7 lncRNAs. **Conclusion** lncRNA AF116618 and HMLincRNA880 seem to have close relation to onset and development of type 2 diabetes with kidney-yin deficiency syndrome, and they might be new diagnostic markers and drug targets of type 2 diabetes with kidney-yin deficiency syndrome.

Keywords type 2 diabetes; kidney-yin deficiency; lncRNA; target gene

(收稿日期: 2017-07-07; 修回日期: 2017-10-17)

编辑: 邓 媛]