

分类号: R587.1

单位代码: 10159

密 级: 公开

学 号: 2017121215



中国医科大学

硕 士 学 位 论 文

(临床医学硕士专业学位)

中文题目: 2 型糖尿病患者血清 circ-0054633 与胰岛素抵抗相关性的研究

英文题目: Association between serum circ-0054633 and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus

论文作者: 王广亭

指导教师: 周一军 教授

学科专业: 内科学

完成时间: 2020 年 3 月

中国医科大学硕士学位论文

2 型糖尿病患者血清 circ-0054633 与胰岛素抵抗相关性的研究

Association between serum circ-0054633 and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus

论文作者 王广亭 指导教师 周一军教授

申请学位 医学硕士 培养单位 第四临床学院

专业学位类别 临床医学 专业学位领域 内科学

研究方向 内分泌与代谢病

论文起止时间 2018 年 12 月—2020 年 3 月

论文完成时间 2020 年 3 月

中国医科大学（辽宁）

2020 年 3 月

摘要

背景：糖尿病是一种代谢紊乱的世界性流行病^[1]，其中 2 型糖尿病（T2DM）占有所有糖尿病的 90-95%^[2]。T2DM 的发病机制尚未研究清楚，但人们普遍认为胰岛素抵抗（IR）是其主要的发病机制。研究 IR 的分子学机制，可以为 T2DM 的诊断和治疗提供新的靶点。Zhao Z 等人收集 6 名健康对照组和 6 名 T2DM 患者外周血中的 circRNA 进行微阵列分析，并进行了一项由 20 例正常病例、20 例糖耐量异常患者和 20 例 T2DM 患者组成的独立队列研究，在 T2DM 组中，共发现 489 个 circRNA 在两组之间有不同的表达，其中 78 个被上调，411 个被下调，circ-0054633 曲线下面积最大，提示外周血 circ-0054633 在 T2DM 患者中显著表达^[3]，近期发现 circ-0054633 对糖尿病前期及 T2DM 具有一定的诊断价值，具有作为二者血浆诊断标志物的潜力^[4]。

目的：本实验主要研究 T2DM 患者血清 circ-0054633 水平，探讨其与糖脂代谢及 IR 的关系，为临床上研究糖尿病的发病机制提供进一步理论依据。

研究方法：收集 T2DM 患者 30 例和非糖尿病患者 32 例的外周血标本，离心，用试剂盒提取 RNA、紫外分光光度计检测 RNA 的浓度及纯度，反转录后采用定量逆转录聚合酶链反应（qRT-PCR）技术，对 circ-0054633 进行验证研究，探讨差异表达的 circ-0054633 是否与 IR 存在相关性。

结果：1、糖尿病患者组与正常组患者相比，空腹血糖（FPG）、2 小时餐后血糖（2hBG）、糖化血红蛋白（HbA_{1c}）、胰岛素抵抗指数（HOMA-IR）、甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。2、糖尿病患者血清 circ-0054633 的表达水平显著高于对照组（ $P < 0.05$ ），差异有统计学意义。3、相关分析发现，血清 circ-0054633 的表达水平与 HbA_{1c}、TG、HOMA-IR 呈显著正相关（ $r = 0.358、0.286、0.434$ ， $P < 0.05$ ），血清 circ-0054633 的表达水平与 HDL-C 呈负相关（ $r = -0.165$ ， $P < 0.05$ ）。4、以血清 circ-0054633 为因变量，以 HDL-C、TG、FPG、2hBG、HbA_{1c}、HOMA-IR 为自变量，进行多元线性回归分析，结果显示 FPG、HOMA-IR 和 TG 与血清 circ-0054633 水平独立相关（ $P < 0.05$ ）。

结论：T2DM 患者血清 circ-0054633 表达水平升高，其升高程度可能与糖脂代谢紊乱及 IR 密切相关。

关键词： Circ-0054633； 2 型糖尿病； 胰岛素抵抗

Abstract

Background: Diabetes is a worldwide epidemic of metabolic disorders^[1], and type 2 diabetes(T2DM) accounts for 90-95% of all diabetes^[2].The pathogenesis of T2DM is not well understood, but insulin resistance(IR) is widely believed to be the main pathogenesis. Studying the molecular mechanism of IR can provide a new target for the diagnosis and treatment of T2DM. Zhao Z et al collected circRNA from the peripheral blood of 6 healthy controls and 6 T2DM patients for microarray analysis and conducted an independent cohort study of 20 normal cases, 20 patients with abnormal glucose tolerance and 20 T2DM patients. In the T2DM group, a total of 489 circRNA were found to be differentially expressed between the two groups, 78 upregulated and 411 downregulated, the largest area under the circ-0054633 curve, suggesting that peripheral blood circ-0054633 are significantly expressed in T2DM patients^[3]. Recently, it has been found that circ-0054633 has a certain diagnostic value for pre-diabetes and T2DM, and has the potential to be used as a diagnostic marker for both plasma^[4].

Objective: Serum circ-0054633 level of T2DM patients was studied in this experiment, its relationship with glycolipid metabolism and IR was discussed, provide further theoretical basis for clinical study of the pathogenesis of diabetes.

Methods: Peripheral blood samples were collected from 30 patients with T2DM and 32 patients with nondiabetic disease, centrifugal, kit was used to extract RNA, ultraviolet spectral index RNA concentration and purity, inspection and reverse transcription after using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT - PCR) technique, to validate the circ -0054633 study, to explore whether the circ -0054633 differentially expressed correlation with IR.

Results: 1. Compared with the normal group, there were statistically significant differences in fasting blood-glucose(FPG), 2 hours postprandial blood sugar (2hBG), glycosylated hemoglobin(HbA_{1c}), homeostatic model assessment for Insulin resistance index(HOMA-IR), triglyceride(TG) and high-density lipoprotein(HDL-C) in the diabetic group ($P < 0.05$). 2. The expression level of serum circ-0054633 in the diabetic patients was significantly higher than the control group ($P < 0.05$), with statistically significant differences. 3. Correlation analysis found that the expression level of serum circ-0054633

was significantly positively correlated with HbA_{1c}, TG and HOMA-IR ($r = 0.358, 0.286, 0.434, P < 0.05$), and the expression level of serum circ-0054633 was negatively correlated with HDL-C ($r = -0.165, P < 0.05$). 4. Multiple linear regression analysis was conducted with serum circ-0054633 as the dependent variable and HDL-C, TG, FPG, 2hBG, HbA_{1c}, HOMA-IR and serum circ-0054633 as independent variables. The results showed that FPG, HOMA-IR and TG were independently correlated with serum circ-0054633 ($P < 0.05$).

Conclusion: The level of serum circ-0054633 expression in patients with T2DM is increased, which may be closely related to glucose and lipid metabolism disorder and IR.

Key Words: Circ-0054633; Type 2 diabetes; Insulin resistance

英文缩略语

英文缩写	英文全称	中文全称
AT-1	Angiotensin -1	血管紧张素-1
BMI	Body mass index	体质指数
ceRNA	Competing for endogenous RNA	竞争内源性 RNA
circ RNA	Circular RNA	环状 RNA
e-circRNA	Exon RNA	外显子 RNA
FPG	Fasting blood-glucose	空腹血糖
GLP-1	Glucagon - like peptide -1	胰高血糖素样肽-1
2hBG	2 hours postprandial blood sugar	2 小时餐后血糖
HOMA-IR	Homeostatic model assessment for Insulin resistance index	胰岛素抵抗指数
HOMA- β	Unction of islet cells	胰岛 β 细胞功能
HDL-C	High-density lipoprotein	高密度脂蛋白胆固醇
HbA _{1c}	Glycosylated hemoglobin	糖化血红蛋白
IR	Insulin resistance	胰岛素抵抗
lncRNA	Long noncoding RNA	长链非编码 RNA
LDL-C	Low density lipoprotein-cholesterol	低密度脂蛋白胆固醇
miRNA	MicroRNA	微小 RNA
MAPK-ERK1/2	Mitogen-activated kinase pathway	有丝分裂原活化激酶
ncRNA	Noncoding RNA	非编码 RNA

NCL	Nocoding linear RNA	线性非编码 RNA
OGTT	Glucose tolerance test	葡萄糖耐量实验
PI3K-AKT	Nositol 3 kinase - protein kinase B	磷脂酰肌醇-3 激酶蛋白酶
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction	定量逆转录聚合酶链反应
T2DM	Type 2 diabetes mellitus	2 型糖尿病
TGF- β	Transforming growth factor	转化生长因子
TG	Triglyceride	甘油三酯
TC	Total cholesterol	总胆固醇
WHO	World Health Organization	世界卫生组织

目 录

摘要.....	III
Abstract.....	V
英文缩略语.....	VII
2 型糖尿病患者血清 circ-0054633 与胰岛素抵抗相关性的研究	
1 前言.....	1
2 材料和方法.....	3
2.1 外周血.....	3
2.2 主要试剂和仪器.....	3
2.2.1 主要试剂.....	3
2.2.2 主要仪器.....	3
2.3 实验方法.....	4
2.3.1 标本收集.....	4
2.3.2 实验室指标的采集.....	4
2.3.3 总 RNA 提取.....	4
2.3.4 RNA 质量检测.....	5
2.3.5 去除基因组 DNA 反应.....	5
2.3.6 反转录反应.....	5
2.3.7 逆转录 PCR (qRT-PCR)	6
2.3.8 统计学方法.....	7
3 结果.....	8
4 讨论.....	11
5 结论.....	13
本研究创新性的自我评价.....	14
参考文献.....	15
综 述.....	18
攻读学位期间取得的研究成果.....	28
致 谢.....	29
个人简历.....	30

2 型糖尿病患者血清 circ-0054633 与胰岛素抵抗相关性的研究

1 前言

T2DM 的患病率正逐年上升，到 2019 年全球估计有 4.25 亿糖尿病患者，T2DM 患者的数量达到了大流行的比例，需要极大的医疗资源^[5]。糖尿病的患病率正逐年上升，预估到 2045 年将有 6.29 亿糖尿病患者^[6]，约 90% 的患者为 T2DM^[7]。各种组织、器官长期受到高血糖的损害，将出现糖尿病的并发症^[8-9]，包括对心脏、血管、神经、眼、肾等器官损害，严重影响了患者的生活水平^[10]，导致了巨额医疗费用支出^[11]。故而糖尿病的早诊断、早治疗至关重要。

IR 是 T2DM、代谢综合征、心血管疾病和癌症总死亡率的独立危险因素^[12]。胰岛β细胞减少和功能障碍是 T2DM 的主要发病机制，其自我吞噬功能是胰岛β细胞的保护机制^[13]。在自噬相关基因的控制下，通过双层膜结构将被降解的底物包裹到自噬体中，然后运输到溶酶体进行膜融合。在溶酶体中，一系列水解酶消化细胞自身的蛋白质和细胞器支持胰岛β细胞的新陈代谢和器官更新^[14,15]。在生理学条件下，胰岛β细胞的自噬维持在较低的水平，保持细胞质、细胞器和蛋白质的循环，这有利于保护细胞并促进细胞存活。然而，缺陷或过度自噬会导致胰岛β细胞凋亡。例如，在小鼠胰岛β细胞中敲除 ATG7 后，小鼠糖耐量受损，血清胰岛素水平下降，细胞凋亡增加，胰岛β细胞增值减少^[16]。

CircRNA 是新发现的长链非编码 RNA (lncRNA)，由外显子和（或）内含子组成，因缺乏 3'端和 5'端，circRNA 比 微小 RNA (miRNA) 更稳定，故其有稳定性、进化保守性及组织、细胞特异性^[17]。作为 lncRNA 中的一部分，circRNA 普遍参与了细胞内 RNA 介导的调控机制，在转录方面以及转录后方面对基因的表达起到了调控作用。现发现 circRNA 与许多疾病的发生存在密切的关系，包括动脉粥样硬化性血管疾病、神经系统疾病、骨性关节炎、直肠癌、肝恶性肿瘤、胰腺癌等^[18-20]。新的研究发现，circRNA 可能对糖尿病的发生起到了调控作用^[3]。例如，circ-0054633 与妊娠期糖尿病密切相关，在妊娠中晚期发现血清 circ-0054633 表达升高，且与 2hBG 和 HbA_{1c} 呈正相关^[21]。

CircRNA 通过参与母体血清糖代谢的调控,进一步影响胎盘的表观遗传学的表达。对 T2DM 患者和健康对照组的研究表明,与健康对照组相比,T2DM 患者外周血中有 489 个差异表达的 circRNA,研究人员发现 circ-0054633 参与有丝分裂细胞周期阻滞和分子代谢^[22]。通过影响细胞代谢和细胞周期, circ-0054633 可能参与糖尿病的发病机制,可作为外周血 T2DM 诊断的标志。一些 circRNA 被证实能影响 miRNA 对基因的调控,可以作为 miRNA 的海绵体,并对亲本基因有转录、调节、翻译以及其它的一些功能^[23, 24]。

深入研究 circRNA 的结构和功能,可使我们更好地认识疾病的发生机制。其中 circ-0054633 对糖尿病前期及 T2DM 具有一定的诊断能力,具有作为二者血浆诊断标志物的潜力^[4]。目前文献未发现 circ-0054633 与 IR 存在相关性,本实验对 circ-0054633 进行验证研究,采用病例-对照研究设计,收集糖尿病患者和非糖尿病患者的外周血标本,采用 qRT-PCR 技术,探讨差异表达的 circ-0054633 与 IR 的相关性,为糖尿病的发病机制提供了新的思路和靶点。

2 材料和方法

2.1 外周血

患者血液标本由中国医科大学附属第四医院收集。按照实验要求确定入选标准、排除标准。入选标准为符合 1999 年 WHO（世界卫生组织）诊断标准的 T2DM 患者和非糖尿病患者。排除标准为肿瘤、严重肝肾疾患、急慢性炎症、自身免疫性疾病、应激状态、高血压及其他内分泌疾病等。本实验经过中国医科大学伦理委员会批准，血液样本的采集和流行病学资料的收集都经过研究人员签定知情同意书，符合医学伦理学的相关规定。

2.2 主要试剂和仪器

2.2.1 主要试剂

BIOD 游离 RNA 提取试剂盒（常州百代公司）

PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser（日本 TaKaRa 公司）

SYBR Premix Ex Taq II（日本 TaKaRa 公司）

无水乙醇（天津恒兴试剂）

DEPC 水（上海碧云天公司）

引物（大连 TaKaRa 公司设计合成）

2.2.2 主要仪器

超微量紫外分光分度计（德国 Implen 公司）

PCR 扩增仪（日本 TaKaRa 公司）

7500 Real-Time PCR System（美国 ABI 公司）

超净工作台（中国苏净集团）

制冰机（TP600，美国 SCOTSMAN）

低温高速离心机（德国 Sigma 公司）

电热恒温水箱（瑞士 Salvis）

超低温冰箱（日本 Sanyo 公司）

涡旋振荡器（美国 Scientific Industries 公司）

10 ul, 200 ul, 1000 ul 单道手动移液器（德国 Eppendorf 公司）

0.2 ml, 1.5 ml 无酶离心管（美国 Axygen 公司）

200 ul 八连管（美国 Axygen 公司）

2.3 实验方法

2.3.1 标本收集

以辽宁省沈阳市作为研究地点，采取病例—对照的研究方式。收集患者生化指标及一般资料包括：年龄、性别、体质指数（BMI）、病程、血压、血脂、血糖、胰岛素等，收集 T2DM 患者及健康对照组患者的外周血。病例按照性别、年龄（ ± 5 ）进行频数成组匹配，选取同期在体检中心体检的健康人群作为对照，最终纳入病例组 30 例，健康对照组 32 例，年龄范围在 51-74 岁。纳入实验组和对照组的患者均采集 EDTA 抗凝静脉血后于 2 h 内完成血液离心，使用普通离心机 3000 rpm 离心 20 min 后分离上清液于 -80 °C 保存。

2.3.2 实验室指标的采集

患者禁食 8-12 h 后，于次日清晨空腹抽取静脉血 5 ml，样本离心后进行血脂、血糖、空腹胰岛素、空腹 C 肽、HbA_{1c}、肾功能检测，口服 85 g 药用葡萄糖后抽血检测 2hBG。胰岛 β 细胞功能（HOMA- β ）评价：T2DM 组 = $0.27 \times \text{空腹 C 肽} / (\text{空腹血糖} - 3.5)$ ，健康对照组 = $0.27 \times \text{空腹 C 肽} / (\text{空腹血糖} - 3.5) + 50$ ；HOMA-IR = $\text{FPG} \times \text{空腹胰岛素} / 22.5$ 。FPG、2hPG 采用葡萄糖氧化酶法，HbA_{1c}采用高效液相色谱法，C 肽、胰岛素采用化学发光免疫法，总胆固醇（TC）、TG、HDL-C、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）和肌酐采用酶法测定。

2.3.3 总 RNA 提取

严格按照试剂盒要求提取总 RNA，具体步骤如下：

1) 用无 RNA 酶的 1.5 ml 离心管加入 200 ul 外周血样本，4 ul RNA Carrier 均匀混合，后滴入 300 ul 裂解液及 20 ul 消化液，震荡涡旋 10 s，充分混合均匀，56 °C 水浴 10 min 至完全裂解。

2) 滴入 1000 ul 无水乙醇溶液，轻轻上下颠倒混合均匀。

3) 将吸附柱放入收集管中，并把 760 ul 上述混合溶液置入吸附柱中，静置 2 min，12000 rpm 4 °C 离心 1 min，弃收集管内废液。

4) 把吸附柱放回至收集管中，并把剩余的 760 ul 溶液转移吸附柱中，重复操作步骤 3。

5) 把吸附柱放入收集管中, 加入 500 ul 洗涤液 A 溶液至吸附柱中, 12000 rpm 4 °C 离心 1 min, 舍弃收集管中废弃溶液。

6) 把吸附柱再次放入收集管中, 加入 500 ul 洗涤液 B 溶液于吸附柱中, 静置 2 min 后, 12000 rpm 4 °C 离心 1 min, 弃收集管内废液。

7) 把吸附柱放入收集管中, 12000 rpm 4 °C 离心 2 min, 舍弃残存的洗涤溶液。

8) 拿出吸附柱, 放在新的无 RNA 酶的 1.5 ml 离心管中, 加 30 ul 洗脱液, 静置 3 min, 12000 rpm 4 °C 离心 2 min, 收集 RNA 溶液。

2.3.4 RNA 质量检测

紫外吸收测定法的工作原理是使用 NanoDrop ND-100 测定方式, 测定对象是 RNA 浓度和纯度, 在研究人员进行测量前, 需要先用溶解 RNA 的 DEPC 水, 在滴加 1 ul DEPC 水的时候, 其要注意的是滴加 RNA 溶液至测量基座, 液滴会自动滴落在上下基座之中, 液柱逐步形成, 机器才能自动生成数据。在样本测定完成后, 需要研究人员用柔软的擦镜纸, 轻轻擦拭上下基座表面上的样本液, 在此基础上测定下一份样本。发现 RNA 溶液的 A260/A280 的比值的计算方式比较准确, 一旦比值超出这个范围, 提示 RNA 混有较多杂质或裂解, 符合要求的 RNA 样本可用于下一步的反转录。

2.3.5 去除基因组 DNA 反应

将收集的总 RNA 通过反转录生成对应的 cDNA, 要求试剂盒内各个组分置于冰上融化, 待各组分试剂完全融化后, 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒说明书进行如下反应:

1) 小心加入下列组分试剂:

2.0 ul	5×gDNA Eraser Buffer
1.0 ul	gDNA Eraser
X	总 RNA
总共为 10 ul	RNase Free dH ₂ O

2) 反应体系配置完成后, 混匀并短暂离心, 将离心管置于 PCR 仪, 反应条件为 42 °C 2 min, 4 °C 保存备用。

2.3.6 反转录反应

1) 要求试剂盒内各个组分置于冰上实验, 小心加入下列组分试剂:

10.0 ul	上述步骤的反应液
1.0 ul	PrimeScript RT Enzyme Mix 1
1.0 ul	RT Primer Mix
4.0 ul	5×PrimeScriptBuffer 2
4.0 ul	RNase Free dH ₂ O
20.0 ul	总量

2) 反应体系配置完成后, 混匀并短暂离心, 将离心管置于 PCR 仪, 反应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 保存备用。

3) 将上述 cDNA 放入 -80 °C 保存。

2.3.7 逆转录 PCR (qRT-PCR)

Circ-0054633 特异性引物以及内参 (GAPDH) 引物均由 TaKaRa 公司设计并合成, 序列如下 (表 1):

表 1 逆转录 PCR 引物序列

Tab1 Reverse transcription PCR reaction primer sequences

基因	Sequences(5'-3')
circ-0054633-F	TTGCTTTCTACACTTTCAGGTGAC
circ-0054633-R	GCTTTTGTCTGTAGTCAACCACCA
GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
GAPDH-R	GGGGTCGTTGATGGCAACA

1) 要求试剂盒内各个组分置于冰上融化, 待各组分试剂完全融化后, 进行反应体系的准备:

10.0 ul	TB Green Premix Taq II
0.8 ul	PCR Forward Primer
0.8 ul	PCR Reverse Primer
0.4 ul	ROX Reference Dye II

2.0 ul	RT 反应液 (cDNA 溶液)
6.0 ul	灭菌水
20.0 ul	总共

2) 使用 7500 Real-Time PCR 仪进行扩增反应, 程序设定如下:

95 °C	30 s 预变性反应
95 °C	5 s 变性 扩增 40 cycles
60 °C	34 s 退火、延伸

3) 每个样本重复三次实验, 每次实验设置三个复孔, 以 GAPDH 为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 circ-0054633 的相对表达量, 并比较组间的表达差异情况。

2.3.8 统计学方法

应用 Graphpad Prism 8.0 统计软件对数据进行分析并根据需要作图。其中满足正态分布的计量资料用均数±标准差 (Mean±SD) 的方式表示, 比较两独立样本组间差异采用 *t* 检验; 不符合正态分布的计量资料应采用中位数或四分位间距, 对两独立样本组间差异比较采用 Mann-Whitney U 秩和检验。 $P < 0.05$ 提示差异有统计学意义。

3 结果

一、糖尿病组和健康对照组临床资料分析发现：组间性别、年龄、空腹 C 肽、TC、LDL-C 间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，FPG、2hBG、HbA_{1c}、HOMA-IR、TG、HDL-C 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 2。

表 2 研究对象的基线资料及临床资料对比[Mean $\pm$ SD, 中位数(四分位间距)]

Tab2 Comparison of baseline and clinical data of study subjects[Mean $\pm$ SD, M (quartile)]

一般情况	健康对照组	糖尿病组	P 值
例数 (男/女)	32 (16/16)	30 (16/14)	—
年龄 (岁)	62.57 $\pm$ 11.45	63.15 $\pm$ 10.75	0.562
BMI (kg/m ²)	24.32 $\pm$ 0.66	25.43 $\pm$ 1.39	0.325
收缩压 (mmHg)	132 $\pm$ 9	135 $\pm$ 14	0.586
舒张压 (mmHg)	77 $\pm$ 4	81 $\pm$ 9	0.422
FPG (mmol/L)	5.20 $\pm$ 0.79	8.09 $\pm$ 2.67	< 0.05 *
2hBG (mmol/L)	6.05 $\pm$ 1.30	13.43 $\pm$ 3.57	< 0.05 *
HbA _{1c} (%)	5.11 $\pm$ 0.41	9.23 $\pm$ 2.22	< 0.05 *
HOMA- β	71.20 (62.91, 85.83)	62.34 (51.43, 71.22)	0.245
HOMA-IR	2.16 (2.02, 2.45)	2.90 (2.29, 3.58)	< 0.05 *
TG (mmol/L)	1.68 (1.52, 1.92)	1.96 (1.79, 2.23)	< 0.05 *
TC (mmol/L)	4.56 $\pm$ 0.81	5.15 $\pm$ 0.78	0.290
HDL-C (mmol/L)	1.43 $\pm$ 0.24	1.14 $\pm$ 0.22	< 0.05 *
LDL-C (mmol/L)	3.23 $\pm$ 0.77	3.19 $\pm$ 0.69	0.344
肌酐 (mmol/L)	56.8 $\pm$ 10.75	57.4 $\pm$ 11.46	0.520
空腹 C 肽 (nmol/L)	0.57 (0.40, 0.75)	0.53 (0.36, 0.77)	0.323

注：BMI：体重指数 Body mass index；FPG：空腹血糖 Fasting plasma glucose；2hPG：2h 餐后血糖 2 hours postprandial blood sugar；HbA_{1c}：糖化血红蛋白 Glycosylated hemoglobin；HOMA- β ：胰岛 β 细胞功能指数 Islet β cell function index；HOMA-IR：胰岛素抵抗指数

Homeostasis model assessment for insulin resistance index; TG : 甘油三酯 Triglyceride; TC : 总胆固醇 Total cholesterol; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇 High density lipoprotein-cholesterol; LDL-C : 低密度脂蛋白胆固醇 Low density lipoprotein-cholesterol; 与对照组比较, $P < 0.05$ *有统计学意义。

二、糖尿病患者血清 circ-0054633 的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$) , 差异有统计学意义, 见图 1。

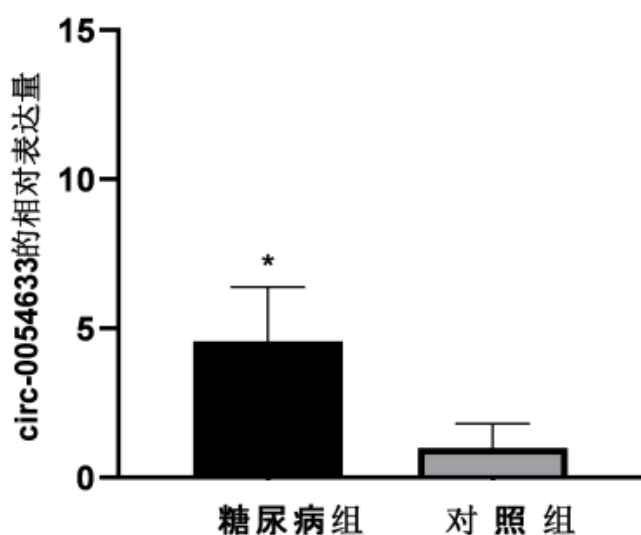


图 1 两组血浆中 circ-0054633 的相对表达量

Fig1 Relative expression levels of circ-0054633 in the plasma of the two groups

注: CircRNA: 环状 RNA circular RNA; 与对照组比较, * $P < 0.05$ 有统计学意义

三、相关分析发现，血清 circ-0054633 的表达水平与 HbA_{1c}、TG、HOMA-IR 呈显著正相关（ $r = 0.358$ 、 0.286 、 0.434 ， $P < 0.05$ ），血清 circ-0054633 的表达水平与 HDL-C 呈负相关（ $r = -0.165$ ， $P < 0.05$ ），与 HOMA- β 、TC、LDL-C、BMI 无相关性。

四、以血清 circ-0054633 为因变量，以 HDL-C、TG、FPG、2hBG、HbA_{1c}、HOMA-IR 为自变量，进行多元线性回归分析，结果显示 FPG、HOMA-IR、TG 与血清 circ-0054633 水平独立相关（ $P < 0.05$ ），见表 3。

表 3 以 circRNA 水平为因变量的多元线性回归分析

Tab3 Multivariate linear regression analysis with circRNA level as dependent variable

变量	未标准化系数		标准化系数		<i>P</i>
	B	标准误	Beta	<i>t</i>	
FPG	0.015	0.005	0.267	4.237	$<0.05^*$
HOMA-IR	0.142	0.068	0.234	3.802	$<0.05^*$
TG	0.160	0.085	0.153	2.664	$<0.05^*$

注：FPG：空腹血糖 Fasting plasma glucose；HOMA-IR：胰岛素抵抗指数 Homeostasis model assessment for insulin resistance index；TG：甘油三酯 Triglyceride； $P < 0.05^*$ 有统计学意义。

4 讨论

许多研究表明,持续的糖代谢和脂代谢紊乱是引起或加重胰岛 β 细胞功能障碍和 IR 的重要原因^[25]。IR 是 T2DM 发病的主要原因,主要表现为肌肉、脂肪组织等对胰岛素敏感度降低,使体内胰岛素的生物学效应较正常水平偏低,对葡萄糖的摄取减少和抑制肝脏葡萄糖输出作用减弱,多余部分的血糖不能在血液循环中有效的去除,进一步激发了胰岛素的释放,引起继发性高胰岛素综合症^[26]。胰腺 β 细胞是胰岛素的唯一来源,由于长期慢性刺激受损,例如肥胖,最终会导致胰腺 β 细胞产生的胰岛素逐渐减少,加速了糖尿病发展的进程^[27]。糖尿病长期存在的血糖升高,可致各种组织、器官,特别是眼、肾脏、心血管、神经系统的慢性损害或功能障碍^[28]。糖尿病对公众健康的影响很大程度取决于它的血管并发症,其微血管障碍包括视网膜、肾脏和神经病变,大血管病变包括缺血性心脏病、脑血管病及周围神经病的发展进程。糖尿病患者一部分有典型的多尿多饮多食及体重减轻的“三多一少”症状,而相当一部分患者因其临床表现不典型未被诊断,因此糖尿病患者早诊断、早治疗显得尤为重要^[29]。

Circ-0054633 是 circRNA 家族中的成员,其中 circRNA 没有 3'端的帽子结构和 5'端的多聚 A 尾,是连续封闭的共价环结合而成。CircRNA 对降解具有抗性,因它们对外切酶有抗性,其性质使 circRNA 在生物学标记方面优于线性非编码 RNA (NCL) ^[30]。到目前为止,近年来已经发现了 circRNA 的各种功能,以“miRNA 海绵体”是研究最多的。CircRNA 还参与了肿瘤的发生发展,例如, circHIPK3 参与了癌症的增殖、迁移和发展^[31]。同时我们发现 circ-0054633 与妊娠期糖尿病密切相关,在妊娠中晚期发现血清 circ-0054633 表达升高,与 2hPG 和 HbA_{1c} 升高相关^[21]。Zhao Z 等人发现 circ-0054633 在 T2DM 中存在高表达^[3], circ-0054633 可能参与糖尿病的发病机制,人们普遍认为 IR 是 T2DM 的主要发病机制,目前并没有相关文献报道 circ-0054633 是否与 IR 存在相关性,本实验就血清 circ-0054633 是否与 IR 存在相关性进行研究,为临床上糖尿病患者的发病机制提供进一步理论依据。

我们采取了病例一对照的研究方式收集 T2DM 患者和健康对照组的血液标本,严格按照实验步骤进行操作,从患者外周血中分离提取 RNA 后逆转录获得 cDNA,进行了 qRT-PCR 操作,验证了血清 circ-0054633 在 T2DM 患者较健康对照组患者中存在高表达,差异有统计学意义。T2DM 是常见内分泌代谢疾病,与血脂代谢

异常、肥胖等关系密切，本实验分析患者临床数据发现 T2DM 患者较健康对照组患者中的 FPG、2hBG、HbA_{1c}、HOMA-IR、TG、HDL-C 显著增高，差异有统计学意义，提示 T2DM 患者不单纯存在糖代谢障碍，亦合并脂代谢异常，其主要机制为人体血管壁和血液受脂质过氧化物产物的损伤和刺激，内膜屏障作用较弱，吞噬细胞和脂质更易浸润至内膜下，炎性细胞和血管平滑肌的迁移和生长，降解细胞外基质，进而加重糖尿病血管病变^[32]，两者相互作用对患者健康可造成严重威胁。因此在临床上我们治疗糖尿病患者高血糖的同时，需警惕是否存在脂代谢的异常，如有异常应及时加用降脂药物进行治疗，控制血脂代谢异常对降低糖尿病及心血管病的患病率具有重要意义。本研究并对 T2DM 患者和健康对照组患者的生化指标进行了相关分析，发现血清 circ-0054633 的表达水平与 HbA_{1c}、TG、HOMA-IR 呈显著正相关，与 HDL-C 呈负相关，与 HOMA- β 、TC、LDL-C、BMI 无相关性，说明血清 circ-0054633 的表达升高，与 HbA_{1c}、TG、HOMA-IR 的升高相关，同时与 HDL-C 的降低相关，血清 circ-0054633 与 HOMA- β 、TC、LDL-C、BMI 的表达并无明显关系。

对获得的 T2DM 患者和健康对照组的实验数据进行多重线性回归分析，结果显示 FPG、HOMA-IR、TG 与血清 circ-0054633 的表达水平独立相关，以上实验结果均提示人体的血清 circ-0054633 介导了糖类代谢的调节，影响血糖的水平，参与了糖尿病的发病过程。证实了 circ-0054633 与 IR 可能存在相关性，为糖尿病机制的进一步研究起到一定作用。因本研究样本量较少，研究结果可能存在偏差，同时来源具有局限性，仅能代表外周血标本，而人类胰岛 β 细胞是否有相应表达仍需进一步验证。本研究证实了 circ-0054633 与 T2DM 中 IR 可能存在相关性，后续研究还需要考虑其与其他类型糖尿病和其他组织、细胞中的表达水平，验证其他组织、细胞中 circ-0054633 是否与 IR 存在相关性。

综上所述，血清 circ-0054633 的表达水平在 T2DM 患者体内升高，且血清 circ-0054633 的表达水平可能与糖脂代谢紊乱、IR 水平密切相关，血清 circ-0054633 可能对 IR 和 T2DM 的发生和发展起到促进作用，深入研究血清 circ-0054633 与代谢的关系，有助于为 T2DM 的治疗提供新的药物靶点。

5 结论

T2DM 患者血清 circ-0054633 表达水平升高, 其升高程度可能与糖脂代谢紊乱及 IR 密切相关。

本研究创新性的自我评价

既往研究中可发现 circRNA 对糖尿病的诊断提供特异性诊断指标，目前文献未发现 circRNA 与 IR 存在相关性，本研究为验证 circ-0054633 与糖尿病相关性报道，证实了 circ-0054633 可能与 IR 存在相关性，具有一定的创新性。我们的研究成果有望为研究糖尿病的机制提供进一步理论与实验依据。

参考文献

- [1] Zatalia SR, Sanusi H. The role of antioxidants in the pathophysiology, complications, and management of diabetes mellitus[J]. Acta Med Indones 2013,45(2): 141-147.
- [2] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. Diabetes Care 2009,32:S62-S67.
- [3] Zhao Z, Li X, Jian D et al. Hsa_circ_0054633 in peripheral blood can be used as a diagnostic biomarker of pre-diabetes and type 2 diabetes mellitus[J]. Acta diabetol 2017,54(3):237-245.
- [4] Long Pan, Weishuai Lian, Xiaojun Zhang et al. Human circular RNA-0054633 regulates high glucose-induced vascular endothelial cell dysfunction through the microRNA-218/roundabout 1 and microRNA-218/heme oxygenase-1 axes[J]. International Journal Of Molecular Medicine 2018,42(1): 597-606.
- [5] Hu W, Ding Y, Li Q et al. Transient receptor potential vanilloid 4 channels as therapeutic targets in diabetes and diabetes-related complications[J]. Diabetes Investig 2020,4.
- [6] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract 2018,138:271-281.
- [7] Wang L, Gao P, Zhang M et al. Prevalence and Ethnic Pattern of Diabetes and Prediabetes in China in 2013[J]. JAMA 2017,317(24):2515-2523.
- [8] Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications[J]. Physiol Rev 2013,93(3):137-188.
- [9] Lotfy M, Adeghate J, Kalasz H et al. Chronic Complications of Diabetes Mellitus: A Mini Review[J]. Curr Diabetes Rev 2017,13(1):3-10.
- [10] Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ et al. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence[J]. Diabetologia 2019,62(1):3-16.
- [11] Disease GBD, Injury I, Prevalence C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet 2018,392(10159):1789-1858.
- [12] Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988[J]. Nutrition 1997,13(1):64-66.
- [13] Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working[J]. Trends Genet

- 2008,24(12): 604–612.
- [14] Esclatine A, Chaumorce M, Codogno P. Macroautophagy signaling and regulation[J]. Curr Top Microbiol Immunol 2009,335: 33–70.
- [15] Klionsky D J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions[J]. Journal of Cell Science 2005,118(1): 7–18.
- [16] Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. The role of autophagy in pancreatic beta-cell and diabetes[J]. Autophagy 2009,5(2): 280–282.
- [17] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. Nature 2013,495(744):333-338.
- [18] Luliw WJ. Circular RNA(circRNA) in Alzheimer’s disease(AD)[J]. Front Genet 2013,4(12):307.
- [19] Liu Q, Zhang X, Hu X et al. Circular RNA related to the chondrocyte ECM regulates MMP13 Expression by functioning as a MiR-136‘Sponge’ in human cartilage degradation[J]. Scientific reports 2016,6:22572.
- [20] Holdt LM, Stahringer A, Sass K et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in human[J]. Nat Commun 2016,7:12429.
- [21] Wu H, Wu H, Zhu Y et al. Hsa_circRNA_0054633 is highly expressed in gestational diabetes mellitus and closely related to glycosylation index[J]. Clinical Epigenetics 2019,11(1):22.
- [22] Qin F, Zhang Z. Progress in studies on JNK signaling pathway and autophagy[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2015,40(9):1035–1038.
- [23] Memczak S, Jens M, Elafsinioti A et al. Circular mas are a large class of animal mas with regulatory potency[J]. Nature 2013,495(7441):333-338.
- [24] Hansen TB, Jensen TI, Clausen B et al. Natural rna circles function as efficient microrna sponges[J]. Nature 2013,495(7441):384-388.
- [25] 强丹, 白云贤, 牛旭东, 等. 空腹血糖及血脂与胰岛素抵抗关系的研究[J]. 宁夏医科大学学报 2013,35(11):1237-1239,1243.
- [26] Elnaem MH, Mohamed MHN, Huri HZ et al. Statin therapy prescribing for patients with type 2 diabetes mellitus: a review of current evidence and challenges[J]. J Pharm Bioallied Sci 2017,9(2).
- [27] Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes[J]. J Clin Invest 2006,116: 1802–1812.
- [28] Blair M. Diabetes mellitus review[J]. Urol Nurs 2016,36(1):27-36.
- [29] 史恒川. 生化检验与常规检验对糖尿病诊断的效果差异性分析[J]. 中国实用医药

2018,13(34):93-94.

- [30] Huang M, Zhong Z, Lv M et al. Comprehensive analysis of differentially expressed profiles of lncRNAs and circRNAs with associated co-expression and ceRNA networks in bladder carcinoma[J]. Oncotarget 2016,7(30): 47186–47200.
- [31] Zeng K, Chen X, Xu M et al. CircHIPK3 promotes colorectal cancer growth and metastasis by sponging miR-7[J]. Cell Death Dis 2018,9(4):417.
- [32] 马尧, 姜维娜, 江红. 2 型糖尿病伴高脂血症患者氧化应激反应与血脂代谢紊乱的关系研究 [J]. 临床和实验医学志 2017,16(17):1102-1104.

综 述

环状 RNA 与糖尿病的关系研究进展

2 型糖尿病（T2DM）的发病机制目前尚未明确，但人们普遍认为其主要发病机制为胰岛素抵抗（IR）。IR 目前存在两个著名假说，分别为炎症假说和信号转导假说，以及其他可能导致 IR 的原因。

一、炎症假说

其中肥胖导致 IR 是全世界 2 型糖尿病发病的一个主要原因^[1]，既往研究表明肥胖与 IR 密切相关，但其 IR 与肥胖及相关并发症的分子机制研究尚未清楚。大量证据表明，肥胖与脂肪组织的慢性炎症相关，慢性脂肪组织的炎症可能导致促炎因子的升高^[2]。肥胖不仅与脂肪组织的增加有关，而且与脂肪组织中浸润的大量巨噬细胞增加相关^[3,4]。这些巨噬细胞通过分泌多种炎症因子，被认为是目前慢性低度炎症的一个重要原因^[5]。

二、信号转导假说

研究表明血浆蛋白酶活性增高与饮食引起的肥胖、IR 和慢性炎症相关^[3-9]，Badeanlou 等人报道称与饮食相关的 IR 需要蛋白酶激活受体-2 信号转导通路的应答^[3]。Talukdar 等人研究发现中性粒细胞来源的弹性蛋白酶（丝氨酸蛋白酶）的激活参与了高脂饮食诱导的 IR，这说明蛋白酶在肥胖诱导的 IR 和 T2DM 中起着关键性作用^[4]。胰高血糖素样肽-1（GLP-1）是肠上皮细胞分泌的一种多肽类激素，其分泌与激素、神经和营养物质的刺激相关^[10]。这种激素最常见的作用是依据血糖浓度促进胰岛素的释放，进而协助调节血糖^[11-13]。一直有报道称胰岛素刺激 GLP-1 的释放是通过刺激磷脂酰肌醇-3 激酶（PI3K）-蛋白激酶 B（AKT）和有丝分裂原活化激酶（MAPK）-ERK1/2 通路^[14]。

三、其他可能导致 IR 的原因

研究表明甲状腺功能减退、维生素 D 的缺乏和吸烟与 IR 存在相关性，发现在明显的甲状腺功能减退患者中存在 IR，可以推测糖异生水平的降低、葡萄糖转运蛋白易位的受损、糖原合成的降低和肌肉氧化能力的降低可能被认为是 IR 的潜在机制^[15]。一些研究发现维生素 D 的缺乏与 IR 的发病密切相关，而补充维生素 D 能改善胰岛素的敏感性，研究表明在葡萄糖刺激的胰岛素分泌期间，1, 25-二羟维生素 D 通过 r 型电压门控钙通道在调节钙内流中发挥作用，从而调节β细胞分泌胰

胰岛素的能力^[16]。王继旺等人进行了吸烟与 IR 关系的实验研究, 研究结果表明, 吸烟明显减少大鼠对葡萄糖的利用, 诱导及加重了大鼠的 IR^[17]。

CircRNA 是一种新发现的内源性长链非编码 RNA (lncRNA), 长度大于 200 个核苷酸, 其结构为环形共价键结合而成, 在哺乳动物中参与了基因调控的表达^[18], 最近研究表明, circRNA 在各种生物调节过程中起关键作用^[19]。CircRNA 最初被认识是无功能的拼接错误^[20], 但通过最近高通量测序技术, 生物信息学的快速发展, 新出现的证据表明, circRNA 可能作为微小 RNA (miRNA) 的海绵体、剪接和转录调节因子, 在许多病理生理和生理过程中发挥关键作用, 我们还发现 circRNA 在疾病的发生发展中起到了重要的作用, 其中越来越多的 circRNA 被证实各种癌症的基因调控、癌变和发病机制中起着重要作用, 包括胰腺癌^[21]、乳腺癌^[22]、咽喉癌^[23]、以及心血管系统疾病^[24]和糖尿病等。

胰腺癌是恶性度最高的肿瘤, 它威胁了越来越多患者的生活质量, 胰腺癌最致命的特点是没有明显的临床症状, 胰腺癌的这一特征是癌症死亡率高的一个普遍原因。胰腺癌对化学治疗不敏感, 使患者不能获得满意的治疗效果^[25]。据报道相当多的 miRNA 可以有效的抗肿瘤治疗, 提示治疗性 miRNA 应用的可能性^[26]。近来研究表明 miRNA 在胰腺癌中的异常表达, 影响了胰腺癌细胞增殖、凋亡和细胞周期阶段, 通过操纵不同的分子机制和信号通路^[27], 例如, 肿瘤腺病毒引入的 miR-126 和 miR-34a 的共表达在胰腺癌靶向治疗中得到了探索^[26]。以前的文献表明, circRNA 可能是潜在的肿瘤靶点。胰腺导管癌的 circRNA 表达特征失调, 使得 circRNA 可能参与胰腺导管癌的发生和发展^[28]。成簇的 circRNA 在胰腺导管癌的组织细胞中较健康对照组存在高表达, 这为胰腺导管癌的治疗开辟了更多可能, 也为胰腺导管癌的生物治疗开辟了前所未有的道路^[29]。

乳腺癌威胁着全世界数以百万人的健康, 2012 年, 根据国际癌症研究机构的数据, 乳腺癌是第二大常见的癌症, 仅次于肺癌, 乳腺癌一直是世界各地导致女性高死亡率的最常见癌症^[30]。Wang 等人发现 circ-000911/miR-449a 通路在乳腺癌发生中起调节作用^[31], 同时通过对基因芯片 GSE76608 的分析, has_circ_0001098 (circRNA-BARD1) 被检测到在乳腺癌中高表达。Circ-BARD1 的过表达可抑制细胞增殖, 阻断细胞周期, 增强细胞凋亡, 进一步揭示了 TCDD/circRNA-BARD1/miR-3942-3p/BARD1 轴在肿瘤进展中的作用^[22]。少数几个 circRNA 被认为在乳腺癌调控中起着重要作用, 在乳腺癌细胞中, hsa_circ_006054、hsa_circ_100219、hsa_circ_0001982 和 hsa_circ_406697 高表达, 而 hsa_circ_0011946 被下调^[32, 33]。结

果表明, circRNA_Foxo3 可以通过抑制 MDM2 促进 p53, 进而引起细胞凋亡。此外, Tang 等人发现 circ_0001982 通过降低 miR-143 的表达诱导乳腺癌细胞癌变^[33]。

下咽鳞状细胞癌是最常见的头颈部鳞状细胞癌之一, 其特点是早期临床症状不典型, 同时淋巴结转移早、分化程度差, 是一种侵袭性肿瘤, 起源于上消化道的上皮细胞, 占有头颈部鳞状细胞癌的 5%-15%^[34]。现代综合治疗策略的发展, 早期的下咽鳞状细胞癌患者的 5 年生存率高达 70%^[35], 然而, 大多数的下咽鳞状细胞癌被诊断已经是晚期阶段, 5 年生存率约仅有 35%^[36,37]且易复发。体外实验表明, circMATR3 在下咽鳞状细胞癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭中起着至关重要的作用。他们还预测了 circMATR3 可能通过充当 miRNA 的海绵体, 调节癌症相关途径在下咽鳞状细胞癌中发挥致癌作用。因此, circMATR3 的表达增加可能是下咽鳞状细胞癌患者的一种新的预后指标和治疗靶点^[23]。

几十年来, 心血管系统疾病是世界范围内发病率和死亡率的主要原因之一, 仍然是全球主要的医疗负担^[38]。第一个特征性保护心脏相关的 circRNA 为 HRCR, 它的海绵体为 miR-223-5p^[39]。在小鼠中, 过表达的 HRCR 通过降低海绵体 miR-223-5p, HRCR 水平降低了异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚, 这是一种有害的 miRNA, 可通过凋亡诱导因子抑制心肌肥厚。CircFoxo3 通过相互作用和抑制抗衰老蛋白 ID-1、转录因子 E2F1 和抗应激蛋白 FAK 和 HIF1a 的功能, 促进了心肌细胞衰老^[40]。CircANRI 通过与必需核糖体成分 PES1 的作用抑制血管平滑肌细胞和巨噬细胞中核糖体的生物过程, 从而导致核仁细胞死亡, 代表了治疗动脉粥样硬化的潜在治疗靶点^[41]。

CircRNA 的生物学功能:

1. 竞争性调控 miRNA: 外显子 RNA (e-circRNA) 是由外显子构成, 大多包含 miRNA 的结合位点。2011 年 Salmena 等人提出了竞争内源性 RNA (ceRNA) 的假说^[42], 经由竞争性结合 miRNA 调控 miRNA 靶基因的表达, 从而发挥生物学效应。

2. 作为翻译模板: 近来发现 circRNA 包含无限的开放阅读框, 能够有效的翻译蛋白质在无细胞翻译系统的大肠杆菌中^[43], 其类似于聚合酶链反应中的滚环扩增^[44]。

3. 调控基因转录: 近期研究表明, circRNA 通过调控基因转录水平进而影响基因水平的表达。

4. 调控 RNA 结合蛋白: MiRNA 是核苷酸长度为 20-30 的非编码 RNA 之一, 主要参与通过把 miRNA 降解或被抑制的蛋白翻译调控基因表达^[45]。大多数蛋白质编码转录(> 60%)被认为是由 miRNA 调控的^[46,47]。

CircRNA 与糖尿病并发症

CircRNA 与糖尿病并发症研究较少, 本文仅对 miRNA 与糖尿病肾病和糖尿病视网膜病变进行阐述, 肾脏不仅可以维持水和电解质的稳态, 还通过肾素-血管紧张素系统调控血压^[45], miRNA 也对上述作用起到了调节功能。MiR-155 被发现是血管紧张素-1 (AT-1) 的作用靶点, 是肾素-血管紧张素系统非常重要的组成原件^[48]。MiR-192 通过抑制钠钾泵来维持体液平衡, 此外, 钠和钾的增加导致 miR-192 表达的调节, 进而负反馈抑制 WNK1 调节血压^[49]。MiR-9 和 miR-374 通过调节钙离子中紧密连接蛋白-14 影响肾脏的吸收功能。一些综述、临床前期和临床研究已经深入论证和探讨了各种 miRNA 在糖尿病肾病的进展、诊断和治疗中的重要作用。MiR-192 是报道的第一个在糖尿病肾病中发挥作用的特异性 miRNA, 从那时起, 大量的研究表明, 各种 miRNA 影响不同的分子和信号通路, 导致肾病。2016 年 Kato^[50]等人发现, 在糖尿病小鼠的肾脏中, 一个 lncRNA 上约 40 个的 miRNA 巨簇被上调, 表达糖尿病肾病的进展。导致肾脏纤维化的主要原因是持续高血糖导致晚期糖基化代谢水平, 氧化应激, 炎症细胞因子和纤维化的因素包括转化生长因子 (TGF- β)^[51]。上述因素和通路均可改变肾脏中不同 miRNA 的表达。Assmann^[52]等人在最近一项包括 27 项研究的系统综述中发现, 151 种特异性 miRNA 中, 有 6 种 miR-21-5p、miR-29a-3p、miR-126-3p、miR-192-5p、miR-214-3p 和 miR-342-3p 在大多数研究中经常被发现。在过去的十年中, miRNA 在糖尿病肾病中的作用得到了广泛的研究和论述, 揭示了一些参与糖尿病肾病发展和进展的显著 miRNA。

糖尿病视网膜病变是糖尿病的主要并发症, 是不可逆性失明的主要原因, 占全球流行率的 34.6%^[53]。糖尿病视网膜病变的复杂病理生理学变化, 包括视网膜的全部功能, 受损的神经元活动和视网膜血管的生成, 并逐渐导致神经变性、神经炎症和明显的血管并发症^[54]。最近关于糖尿病视网膜病变指出视网膜早期神经元的丢失早于视网膜血管的改变^[55,56]。新近研究表明 miRNA 导致了视网膜微血管内皮细胞的功能障碍, Yong Zeng 等人认为 miR-29b-3p/SIRT1 的失调是糖尿病视网膜病变的是一种潜在机制, 其可能潜在是糖尿病视网膜病变的治疗靶点^[57]。我

们在 e-circRNA 中发现的 miR-15a 能产生胰腺β细胞，这些 e-circRNA 运输 miR-15a 到视网膜细胞中，从而参与了 T2DM 视网膜病变的发病机制^[58]。

IR 是 T2DM、代谢综合征、心血管疾病和总癌症死亡率的独立危险因素。IR 与 miRNA 可能有临床相关性，并可能在 10-20 年后提前发病^[59]。量化 IR 可用于调查流行病学研究，进而影响临床干预、IR 的临床过程。多篇文章报道 circ-0054633 在糖尿病的发生发展中起重要作用，并参与了 T2DM 及其相关并发症的致病及进展的调控。本研究论文表明 circ-0054633 与 IR 可能存在相关性，尚需要进一步研究 circRNA 中的一个基因或几个基因可能通过调控 IR 进而影响糖尿病的发生。

综上所述，在生物信息学快速发展和高通量测序技术不断革新的基础上，近年来发现 circRNA 在糖尿病发生过程中起着较为重要的作用，深入研究 circRNA 的结构和功能可使我们更好的了解糖尿病的发病机制，提高糖尿病的预防和诊断水平。

参考文献

- [1] Meigs JB. Impact of insulin resistance on risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome[J]. Diabetes Care 2007,30(5):1219–1225.
- [2] Engin A. The pathogenesis of obesity-associated adipose tissue inflammation[J]. Adv Exp Med Biol 2017,960:221–245.
- [3] Badeanlou L, Furlan-Freguia C, Yang G et al. Tissue factor-protease-activated receptor 2 signaling promotes diet-induced obesity and adipose inflammation[J]. Nat Med 2011,17(11):1490-1497.
- [4] Talukdar S , Oh DY , Bandyopadhyay G et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase[J]. Nat Med 2012,18(9):1407–1412.
- [5] Mansuy-Aubert V, Zhou QL, Xie X et al. Imbalance between neutrophil elastase and its inhibitor alpha1-antitrypsin in obesity alters insulin sensitivity, inflammation, and energy expenditure[J]. Cell Metab 2013,17(4):534–548.

- [6] Piras B, Ferrarotti I, Lara B et al. Clinical phenotypes of Italian and Spanish patients with alpha1-antitrypsin deficiency[J]. Eur Respir J 2013,42(1):54–64.
- [7] Sandström CS, Ohlsson B, Melander O et al. An association between Type 2 diabetes and alpha-antitrypsin deficiency[J]. Diabet Med 2008,25 (11):1370–1373.
- [8] Fleixo-Lima G. Mechanistic evidence in support of alpha1-antitrypsin as a therapeutic approach for type 1 diabetes[J]. J Diabetes Sci Technol 2014,8(6):1193–1203.
- [9] Mazor R, Schmid-Schönbein GW. Proteolytic receptor cleavage in the pathogenesis of blood rheology and co-morbidities in metabolic syndrome. Early forms of autodigestion[J]. Biorheology 2015,52(5-6):337–52.
- [10] Filippello A, Urbano F, Di Mauro S et al. Chronic Exposure to Palmitate Impairs Insulin Signaling in an Intestinal L-cell Line: A Possible Shift from GLP-1 to Glucagon Production[J]. Int J Mol Sci 2018,19(12):1-20.
- [11] Meier JJ, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1(GLP-1) in biology and pathology[J]. Diabetes Metab Res Rev 2005,21(2): 91–117.
- [12] Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ et al. Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration[J]. J Clin Endocrinol Metab 1964,24: 1076–1082.
- [13] Drucker DJ. The biology of incretin hormones[J]. Cell Metab 2006,3(3): 153–165.
- [14] Lim G E, Huang G J, Flora N et al. Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell[J]. Endocrinology 2009,150(2): 580–591.
- [15] Guzel S, Seven A, Guzel EC et al. Visfatin, Leptin, and TNF-a: Interrelated Adipokines in Insulin-Resistant Clinical and Subclinical Hypothyroidism[J]. Endocrine Research 2013,38(3): 184-194.
- [16] Kjalarsdottir L, Tersey SA, Vishwanath M et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D enhances glucose-stimulated insulin secretion in mouse and human islets: a role for transcriptional regulation of voltage-gated calcium channels by the vitamin D receptor[J]. J Steroid Biochem Mol Biol 2019,185:17-26.

- [17] 王继旺, 张素华, 汪志红, 等. 吸烟与胰岛素抵抗关系的实验研究[J]. 中国糖尿病杂志 2007,15(1):52-55.
- [18] M emczak S, Jens M, Elefsinioti A et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. Nature 2013,495(7441): 333-338.
- [19] Bach DH, Lee SK, Sood AK. Circular RNAs in cancer[J]. Mol Ther Nucleic Acids 2019,16: 118-129.
- [20] Cocquerelle C, Mascrez B, Hétiuin D et al. Mis-splicing yields circular rna molecules[J]. The FASEB Journal 1993,7(1):155-160.
- [21] An Y, Cai H, Zhang Y et al. CircZMYM2 competed endogenously with miR-335-5p to regulate JMJD2C in pancreatic cancer[J]. Cellular Physiology and Biochemistry 2018,51(5):2224-2236.
- [22] Zhao J, Zou H, Han C et al. Circular RNA BARD1 (Hsa_circ_0001098) overexpression in breast cancer cells with TCDD treatment could promote cell apoptosis via miR-3942/BARD1 axis[J]. Cell Cycle 2018,17(24):2731-2744.
- [23] Wang Z, Wei P, Wei D et al. Effect of up-regulation of circMATR3 on the proliferation, metastasis, progression and survival of hypopharyngeal carcinoma[J]. J Cell Mol Med 2020:1-11.
- [24] Lim TB, Lavenniah A, Foo RS. Circles in the heart and cardiovascular system[J]. Cardiovasc Res 2019,116(2): 269-278.
- [25] Yu G, Jia B, Cheng Y et al. MicroRNA-429 sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine through regulation of PDCD4[J]. Am J Transl Res 2017,9(11):5048-5055.
- [26] Feng SD, Mao Z, Liu C et al. Simultaneous overexpression of miR-126 and miR-34a induces a superior antitumor efficacy in pancreatic adenocarcinoma[J]. Onco Targets Ther 2017,10:5591-5604.
- [27] Gao ZQ, Wang JF, Chen DH et al. Long non-coding RNA GAS5 antagonizes the chemoresistance of pancreatic cancer cells through down-regulation of miR-181c-5p[J]. Biomed Pharmacother 2018,97:809-817.

- [28] Qu S, Song W, Yang X et al. Microarray expression profile of circular RNAs in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Genom Data* 2015,5:385-387.
- [29] Li H, Hao X, Wang H et al. Circular RNA Expression Profile of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Revealed by Microarray[J]. *Cell Physiol Bchem* 2016,40(6):1334-1344.
- [30] Van Schooneveld E, Wildiers H, Vergote I et al. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management[J]. *Breast Cancer Res* 2015,17:21.
- [31] Wang H, Xiao Y, Wu L et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals the regulatory role of the circRNA-000911/miR-449a pathway in breast carcinogenesis[J]. *Int J Oncol* 2018,52(3):743-754.
- [32] Zhou J, Zhang WW, Peng F et al. Downregulation of hsa_circ_0011946 suppresses the migration and invasion of the breast cancer cell line MCF-7 by targeting RFC3[J]. *Cancer Manag Res* 2018,10:535-544.
- [33] Tang YY, Zhao P, Zou TN et al. Circular RNA hsa_circ_0001982 promotes breast cancer cell carcinogenesis through decreasing miR-143[J]. *DNA Cell Biol* 2017,36(11):901-908.
- [34] Zhou J, Li Y, Wei D et al. Overall survival with and without laryngeal function preservation in 580 patients with hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep* 2015,34(6):3196-3202.
- [35] Takes RP, Strojan P, Silver CE et al. Current trends in initial management of hypopharyngeal cancer: the declining use of open surgery[J]. *Head Neck* 2012,34(2):270-281.
- [36] Kuo P, Chen MM, Decker RH et al. Hypopharyngeal cancer incidence, treatment, and survival: temporal trends in the United States[J]. *Laryngoscope* 2014,124(9):2064-2069.
- [37] Petersen JF, Timmermans AJ, van Dijk BAC et al. Trends in treatment, incidence and survival of hypopharynx cancer: a 20-year population-based study in the Netherlands[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2018,275(1):181-189.
- [38] de Mestral C, Stringhini S. Socioeconomic status and cardiovascular disease: an update[J]. *Curr Cardiol Rep* 2017,19(11):115.

- [39] Wang K, Long B, Liu F et al. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223[J]. *Eur Heart J* 2016,37(33):2602–2611.
- [40] Du WW, Yang W, Chen Y et al. Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses[J]. *Eur Heart J* 2017, 38(18):1402-1412.
- [41] Holdt LM, Stahringer A, Sass K et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans[J]. *Nat Commun* 2016,7:12429.
- [42] Salmena L, Poliseno L, Tay Y et al. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language[J]? *Cell* 2011,146(3):353-358.
- [43] Abe N, Hiroshima M, Maruyama H et al. Rolling circle amplification in a prokaryotic translation system using small circular RNA[J]. *Angew Chem Int Ed* 2013,52(27):7004–7008.
- [44] Fire A, Xu SQ. Rolling replication of short DNA circles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995,92 (10): 4641–4645.
- [45] Sankrityayan H, Kulkarni YA, Gaikwad AB. Diabetic nephropathy: The regulatory interplay between epigenetics and microRNAs[J]. *Pharmacol Res* 2019,141:574–585.
- [46] Dugaard I, Hansen TB. Biogenesis and function of ago-associated RNAs[J]. *Trends Genet* 2017, 33(3) :208–219.
- [47] M Ha, VN Kim. Regulation of microRNA biogenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014,15(8) : 509–524.
- [48] Zheng L, Xu CC, Chen WD et al. MicroRNA-155 regulates angiotensin II type 1 receptor expression and phenotypic differentiation in vascular adventitial fibroblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2010,400 (4) :483–488.
- [49] Elvira-Matelot E, Zhou XO, Farman N et al. Regulation of WNK1 expression by miR-192 and aldosterone[J]. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21 (10) :1724–1731.

- [50] Kato M, Wang M, Chen Z et al. An endoplasmic reticulum stress-regulated lncRNA hosting a microRNA megacluster induces early features of diabetic nephropathy[J]. Nat Commun 2016,7: 12864.
- [51] Hagiwara S, McClelland A, Kantharidis P. MicroRNA in diabetic nephropathy:renin angiotensin, aGE/RAGE, and oxidative stress pathway[J]. J Diabetes Res 2013,2013:173783.
- [52] Assmann TS, Recamonde-Mendoza M, de Souza BM et al. MicroRNAs and diabetic kidney disease: systematic review and bioinformatic analysis[J]. Mol Cell Endocrinol 2018,477:90-102.
- [53] Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy[J]. Diabetes Care 2012,35(3):556–564.
- [54] Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies[J]. JCI Insight 2017,2 (14):1-13.
- [55] Chhablani J, Sharma A, Goud A et al. Neurodegeneration in type 2 diabetes: evidence from spectral-domain optical coherence tomography[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015,56(11): 6333 –6338.
- [56] Kim K, Kim ES, Kim DG et al. Progressive retinal neurodegeneration and microvascular change in diabetic retinopathy: longitudinal study using OCT angiography[J]. Acta Diabetol 2019,56(12): 1275–1282.
- [57] Zeng Y, Cui Z, Liu J et al. MicroRNA-29b-3p Promotes Human Retinal Microvascular Endothelial Cell Apoptosis via Blocking SIRT1 in Diabetic Retinopathy[J]. Original published 2020,10:1621.
- [58] Kamalden TA, Macgregor-Das AM, Kannan SM et al. Exosomal MicroRNA-15a Transfer from the Pancreas Augments Diabetic Complications by Inducing Oxidative Stress[J]. Antioxid Redox Signal 2017,27(13):913-930.
- [59] Borai A, Livingstone C, Kaddam I et al. Selection of the appropriate method for the assessment of insulin resistance[J]. BMC Med Res Methodol 2011,11:158.

攻读学位期间取得的研究成果

一、发表论文

1. 王广亭, 方迎昕, 邹运, 黄少华, 王墨飞, 周一军. 发热-颈前疼痛-甲状腺肿大[J]. 中华医学杂志 2019,99(10):787-789.
2. Yingxin Fang, Yun Zou, **Guangting Wang**, Shaohua Huang, Yanjun Zhou, Yijun Zhou. lnc TINCR induced by NOD1 mediates inflammatory response in 3T3-L1 adipocytes Gene[J]. Gene 2019,698:150-156.

致 谢

时光匆匆，三年时间转眼过去，研究生生活马上要告一段落，回想三年间在中国医科大学附属第四医院的学习、生活和工作的那些日子，心中感慨万千，硕士期间，有快乐和欣喜，也有一个个难题，每当回想起来，那些难熬的日子也是自己进步最大的日子，衷心感谢研究生导师、师姐、师妹们和临床老师的对我的帮助，使我的研究生生活变得丰富多彩。

非常感谢我的导师周一军教授三年来对我的悉心教导，在临床、科研方面对我的培养，周老师严谨的科研态度，开阔的研究视野，丰富的专业知识，对我产生了潜移默化的影响，使我受益匪浅。在本研究课题的选题、设计、实施，以及毕业论文的撰写和修改过程中，周老师为我们倾注了心血。他学习上孜孜不倦让我知道了医生这个职业任重道远。谨在此，向我的研究生导师表达了无限的敬意和最真挚的感谢，您严谨的科研态度以及对医学事业的追求，始终使我学习的榜样。

由衷感谢我的师姐李春丽、方迎昕，师妹周艳君、王楠、李梦颖、同门黄少华、邹运及研究生院老师李子政、初怡老师的支持和鼓励。

感谢内分泌科全体老师，感谢你们的帮助。

最后衷心感谢我的爸爸和妈妈，感谢他们的不辞辛劳，对我求学道路的关心和爱护，感谢你们一直以来对我的支持和帮助，做我的的强大后盾。

王广亭

2020年5月10日

