

刘洁,温学娜,冯英,等. miR-335-5P 调控的 TGF- β 通路介导妊娠糖尿病小鼠胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 85-91.

Liu J, Wen XN, Feng Y, et al. Insulin resistance and islet β cell secretion mediated by the miR-335-5P-regulated TGF- β pathway in gestational diabetes mellitus mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 85-91.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.013

miR-335-5P 调控的 TGF- β 通路介导妊娠糖尿病小鼠胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌的实验研究

刘洁^{1*}, 温学娜², 冯英¹, 李元元¹, 刘永莉¹

(1. 石家庄市第四医院产科, 石家庄 050011; 2. 辛集市第一医院产科, 河北 辛集 052360)

【摘要】 目的 使用 miR-335-5P 和转化因子- β (TGF- β) 处理妊娠期糖尿病 (GDM) 小鼠, 明确 miR-335-5P 调控 TGF- β 通路参与促进胰岛 β 细胞分泌和增强胰岛素抵抗机制, 为治疗 GDM 患者开辟新道路。方法 SPF 级 Balb/c 小鼠以雌性和雄性小鼠 2:1 合笼饲养, 10 只正常妊娠小鼠作为空白组, 48 只成功构建 GDM 模型的小鼠作为 GDM 组并随机分成 A、B、C、D、E、F 组, 每组各 8 只小鼠。A 组 (模型组)、B 组 (模型组+溶媒)、C 组 (模型组+miR-335-5P 模拟物)、D 组 (模型组+miR-335-5P 抑制剂)、E 组 (模型组+si-TGF- β)、F 组 (模型组+miR-335-5P 抑制剂+si-TGF- β)。药物处理后行口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 检测空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FIRI), 计算稳态模型胰岛素抵抗指数 (IRI); 进行高血糖钳夹试验测定葡萄糖输注速率 (GIR), 估计胰岛 β 细胞功能; 采用 RT-qPCR、蛋白质印迹分析和 ELISA 胰岛素释放测定胰岛 β 细胞中 miR-335-5P、TGF- β 通路关键因子 mRNA 水平。结果 D、F 组 FBG、FIRI、IRI 低于给药前低于 C、E 组 ($P<0.05$); D、F 组 GIR、第一时相胰岛素、最大胰岛素高于给药前高于 C、E 组 ($P<0.05$); D、F 组 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 表达低于 C、E 组低于 A、B 组 ($P<0.05$); 在胰岛 β 细胞中检测到 miR-335-5P 表达时, TGF- β 、c-Myc 均有不同程度的表达; TGF- β 在胰岛 β 细胞胞质内表达, 且 D、F 组 TGF- β 表达高于 C、E 组高于 A、B 组 ($P<0.05$)。结论 miR-335-5P 可上调 GDM 小鼠 c-Myc 表达, 进一步激活 TGF- β 通路, 增强胰岛素抵抗并抑制胰岛 β 细胞分泌。

【关键词】 miR-335-5P; TGF- β 通路; 妊娠糖尿病; 胰岛素抵抗; 胰岛 β 细胞分泌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0085-07

Insulin resistance and islet β cell secretion mediated by the miR-335-5P-regulated TGF- β pathway in gestational diabetes mellitus mice

LIU Jie^{1*}, WEN Xuena², FENG Ying¹, LI Yuanyuan¹, LIU Yongli¹

(1. Department of Obstetrics, Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, China.
2. Department of Obstetrics, Xinji First Hospital, Xinji 052360)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism by which miR-335-5P regulates the transforming factor- β (TGF- β) pathway in promoting islet β cell secretion and enhancing insulin resistance in gestational diabetes mellitus (GDM) mice. **Methods** Specific pathogen free grade Balb/c mice were reared in cages at a female to male ratio of 2:1.

[基金项目] 河北省卫生和计划生育委员会项目 (20181064)。

[作者简介] 刘洁 (1981—) 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 妇产科。E-mail: liuliuhuaha@126.com

Ten normal pregnant mice were assigned to the blank group, and 48 mice were prepared as GDM model mice and divided into six groups for different drug treatments—groups A, B, C, D, E and F—with eight mice in each group. After drug treatment, fasting glucose (FBG) and fasting insulin (FIRI) were detected by the oral glucose tolerance test (OGTT), and the insulin resistance index (IRI) was calculated. The hyperinsulinemic-euglycemic clamp was used to determine the glucose infusion rate (GIR) and to estimate pancreatic islet β cell function. The levels of miR-335-5P and key islet β cell TGF- β pathway factor mRNAs and proteins were determined by RT-qPCR, western blot and ELISA analysis. **Results** After drug treatment, FBG, FIRI and IRI in groups D and F were decreased and were lower than respective values of groups C and E ($P<0.05$). GIR, first-phase insulin and maximum insulin in groups D and F were increased and were higher than respective values of groups C and E ($P<0.05$). The levels of miR-335-5P, TGF- β and c-Myc in groups D and F were lower than those of groups A, B, C and E ($P<0.05$). When miR-335-5P expression was detected in islet β cells, TGF- β and c-Myc were expressed at different levels. TGF- β was expressed in the cytoplasm of islet β cells, and the expression of TGF- β in groups D and F was higher than that in groups A, B, C and E ($P<0.05$). **Conclusions** miR-335-5P can up-regulate c-Myc expression in GDM mice, activate the TGF- β pathway, enhance insulin resistance and inhibit islet β -cell secretion.

[Keywords] miR-335-5P; TGF- β pathway; diabetes mellitus diabetes; insulin resistance; islet β cell secretion

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 指妊娠期首次发现的胰岛素相对、绝对缺乏或胰岛素抵抗引起的高血糖临床综合征, 我国发病率约 1%~5% 且呈逐年上升趋势^[1]。多数学者认为 GDM 与胰岛素抵抗有密切关系, 因妊娠期妇女本身存在葡萄糖相对不耐受。随着孕期增加、机体对胰岛素敏感性增强, 孕妇机体不能分泌足够胰岛素来满足机体需求而引起 GDM^[2-3]。GDM 患者体内异常的胰岛素抵抗作用可导致体内代谢和生理指标异常, 且对促进胰岛 β 细胞分泌具有显著作用。增强胰岛素抵抗作用、促进胰岛 β 细胞分泌是治疗 GDM 重要方向^[4]。miR-335-5P 抑制剂静脉给药可增强 GDM 胰岛抵抗作用, 可防止胰岛 β 细胞过度分泌^[5]。miR 作为小型非编码 RNA, 涉及转录抑制、靶向降解和基因沉默等生物过程^[6]。miR-335-5P 早被证实与人体胰岛素分泌指数呈显著负相关关系^[7]; 且有文献显示在 GDM 小鼠体内 miR-335-5P 呈高表达, 转化因子- β (transforming factor- β , TGF- β) 也呈高表达, 考虑两者具有协同促进作用^[8]。综合可得, miR-335-5P、TGF- β 可能与 GDM 发生和发展有关, 但目前对 TGF- β 增强机制及对 GDM 的影响尚存在争议。因此本研究就此展开报道, 以期探讨 miR-335-5P、TGF- β 与 GDM 胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌的关系, 现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Balb/c 小鼠 105 只, 雌性小鼠 70 只, 雄

性小鼠 35 只; 体重 20~25 g, 平均 (23.56 $\pm$ 2.54) kg, 6~8 周, 购于河北省中西医结合医药研究院 [SYXK (冀) 2020-006]。动物使用和处理符合中华人民共和国国家卫生研究院实验动物保护法和使用指导要求, 且通过河北省石家庄市医学动物伦理委员会批准 (IACUC20180105), 于河北医科大学 (实验动物公共服务平台) [SYXK (冀) 2020-002] 完成实验, 提供实验环境: 室温 18 $^{\circ}$ C~22 $^{\circ}$ C、湿度 45%~50%、12 h 明/12 h 暗、动物自由摄食饮水。以雌性和雄性小鼠以 2:1 于 18 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 温度、40%~70% 湿度系统中合笼饲养; 每天早晨 7 点对雌性小鼠进行阴栓检查, 发现阴栓即行阴超检查, 于光镜下观察精子, 精子和阴栓同时可见记为妊娠第 1 天; 持续观察 7 d, 7 d 内妊娠雌性小鼠 ($n=60$) 列为研究对象。实验过程中掌握熟练轻柔的操作技巧、经常观察小鼠状态、对废弃小鼠实施安乐死等, 严格遵守动物实验过程中的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

链脲佐菌素 (湖南汇百特生物科技有限公司, 国药准字 H20020475); 无义序列 NC (北京百奥莱博科技有限公司); miR-335-5P 模拟物、miR-335-5P 抑制剂、si-TGF- β 均购自上海科敏生物科技有限公司; 酶联免疫试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 注射用异戊巴比妥钠 (上海上药新亚药业有限公司, 国药准字 H31021725); 磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffer solution, PBS) 购于南京科佰生物科技有限公司; 饱和碳酸锂 (上海恒远生物科技有限公司); 4% 多聚甲醛 (上海立瑶生物有限公司); 二甲苯 (北京百奥莱博科技有限公司); 75% 乙醇、

80%乙醇、95%乙醇、100%乙醇购于上海恒远生物科技有限公司;苏木素-伊红(Hematoxylin eosin, HE)染色液试剂盒购于迈瑞生物科技有限公司;中性树胶(南京科佰生物科技有限公司);鼠抗人TGF- β 多克隆抗体(上海田源生物技术有限公司);DAB显色试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司);羊抗鼠IgG(上海立瑶生物有限公司);柠檬酸钠缓冲液(长沙达尔锋生物科技有限公司);总RNA提取试剂盒(上海硕嘉生物科技有限公司);异丙醇(苏州骏宇化工有限公司);反转录试剂盒(山东佰仟化工有限公司);miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc引物均购自上海康润生物科技有限公司;琼脂糖(四川科伦药业有限公司);PCR反应液(北京索莱宝科技有限公司);RT-PCR扩增试剂盒购于Sigma;TRIzol裂解液购于迈瑞生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 建模及干预方法

①将60只妊娠小鼠分开喂养,随机分为空白组($n=10$)和GDM组($n=50$),禁食12 h后GDM组腹腔注射50 mg/kg链脲佐菌素(必要时用0.1 mol/L柠檬酸溶液稀释,15 min内完成),空白组注射等量柠檬酸溶液;4 h后投喂普通饲料,自由饮水;于妊娠18 d采用口服葡萄糖耐量试验(OGTT)测量空腹血糖(fasting blood sugar, FBG)、空腹胰岛素(FIRI)和胰岛素抵抗指数(IRI)。GDM组共得GDM模型小鼠48只,构建GDM小鼠成功标准:妊娠第18天妊娠小鼠FBG <5.1 mmol/L,且FIRI、IRI均升高;②将48只成功构建GDM模型的小鼠随机分成A、B、C、D、E、F组,每组各8只小鼠,A组(模型组)、B组(模型组+无义序列NC溶媒)、C组(模型组+miR-335-5P模拟物)、D组(模型组+miR-335-5P抑制剂)、E组(模型组+si-TGF- β)、F组(模型组+miR-335-5P抑制剂+si-TGF- β),均经尾静脉注射,注射后可正常饮食和饮水。

1.3.2 OGTT实验

妊娠第17天晚上禁食禁水8~10 h,次日晨抽取空腹尾静脉血后灌喂2.0 g/kg葡萄糖水溶液,并于服糖后0.5 h、1 h、2 h同法抽取尾静脉血,1000 r/min离心20 min进行血清分离并贮存于-80℃冰箱中;采用血糖仪和血糖试纸条测量血糖浓度,图谱记录口服葡萄糖耐量;放射免疫法测定FINS,仪器为I2000sk化学发光免疫分析仪(美国雅培生物有限公司);根据公式 $IRI = -\ln(1/FINS \times FPG)$ 计算

IRI,IRI越大,表明机体对胰岛素敏感度越低,胰岛素抵抗力越强。

1.3.3 高葡萄糖钳夹技术

妊娠第19天从GDM组中各选择4只小鼠共24只、空白组中选择5只小鼠进行高血糖钳夹技术:禁食4 h,经腹腔麻醉注射剂量为50 mg/kg戊巴比妥钠,固定和颈静脉插管;待小鼠状态稳定后通过尾尖收集血样50 μ L用于测定FBG和FINS;通过颈静脉插管注射初始剂量葡萄糖100 mg/kg后,连续注射20%葡萄糖溶液,每5 min监测血糖;调节葡萄糖输注速率(glucose infusion rate, GIR)使血糖维持于(14.0 $\pm$ 0.5) mmol/L;在血糖稳定后5个时间点获得平均GIR作为稳态GIR;收集初始剂量葡萄糖负荷后1~15 min内处于稳定状态的血液样品,确定第一时相胰岛素和最大胰岛素分泌;根据GIR值观察 β 细胞功能。

1.3.4 HE染色

妊娠第19天选择未经高血糖钳夹技术小鼠(GDM组中各4只小鼠共24只、空白组中5只小鼠)进行空气栓塞法处死,取小鼠胰岛组织用10%甲醛溶液固定,修剪,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋成块,切成5 μ m连续切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,苏木素染色,流水冲洗,1%盐酸溶液分化数秒,流水冲洗,伊红染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察HE染色结果。

1.3.5 免疫组织化学法

取得“1.3.4”中样品于10%甲醛溶液中进行固定,脱水,用石蜡包埋,切成4 μ m连续切片,依次脱蜡、修复、梯度乙醇水化、PBS漂洗、内源性过氧化物酶活性消除;滴加小鼠抗人TGF- β 多克隆抗体(浓度1:100)4℃孵育过夜,PBS漂洗;滴加即用型生物素化二抗37℃孵育30 min,PBS漂洗;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育20 min,PBS漂洗,经DAB显色、苏木素复染、脱水、透明、封片,用于观察TGF- β 表达。判定标准:由两名具有执业资格的病理科医生采用双盲法对结果进行判断和分析,染色强度:0分为不着色,1分为淡黄色,2分为深黄色,3分为棕黄色;阳性细胞百分率:0分为阳性细胞百分率0%~5%,1分为阳性细胞率5%~25%,2分为阳性细胞率26%~50%,3分为阳性细胞率51%~75%,4分为阳性细胞百分率>75%;两项之和进行综合判定: ≤ 3 分为阴性,>3分为阳性。

1.3.6 RT-PCR 法

采用总 RNA 提取试剂盒提取血液总 RNA,总 RNA 逆转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板参照引物和探针序列进行扩增,反应条件为:95℃ 预变性 120 s,95℃ 变性 30 s,72℃ 退火延伸 15 s,35 次循环。根据扩增曲线读取循环数(Ct),基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$,以 β -actin 和 GAPDH 为内参照,计算 GDM 小鼠血清中 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 含量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 Snk-*q* 检验;采用非参数检验 Mann-Whitney 法检验分级资料;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 OGTT 实验指标比较

空白组给药前后 FBG、FIRI、IRI 均低于 GDM 组 (*P*<0.05);给药前,GDM 各组 FBG、FIRI、IRI 比较 *P*>0.05;给药后,A、B 组 FBG、FIRI、IRI 与给药前比较 *P*>0.05,D、F 组 FBG、FIRI、IRI 低于给药前低于 C、E 组 (*P*<0.05);见表 1。

2.2 各组胰岛 β 细胞功能比较

空白组给药前后 GIR、第一时相胰岛素、最大胰

岛素均高于 GDM 组 (*P*<0.05);给药前,GDM 组 GIR、第一时相胰岛素、最大胰岛素比较 *P*>0.05;给药后,A、B 组 GIR、第一时相胰岛素、最大胰岛素与给药前比较 *P*>0.05,D、F 组 GIR、第一时相胰岛素、最大胰岛素高于给药前高于 C、E 组 (*P*<0.05),C、E 组 GIR、第一时相胰岛素、最大胰岛素低于给药前 (*P*<0.05);见表 2。

2.3 各组胰岛 β 细胞中 miR-335-5P、TGF- β 通路关键因子表达水平

空白组胰岛 β 细胞中 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 表达低于 GDM 组 (*P*<0.05);C、E 组 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 表达升高,D、F 组 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 表达下降;且 D、F 组 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 表达低于 C、E 组低于 A、B 组 (*P*<0.05);见图 1。

2.4 miR-335-5P 与 TGF- β 、c-Myc 关系

TGF- β 在胰岛 β 细胞胞质内表达、为棕黄色,c-Myc 在胰岛 β 细胞胞质或细胞膜内表达、可显示为黑色颗粒,在胰岛 β 细胞中检测到 miR-335-5P 表达时,TGF- β 、c-Myc 均有不同程度表达,见图 2。D、F 组 TGF- β 表达高于 C、E 组高于 A、B 组 (*P*<0.05),见图 3、图 4。

表 1 各组 OGTT 实验指标比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of OGTT experimental indexes among groups

组别 Groups	例数 <i>n</i>	空腹血糖 (mmol/L)		空腹胰岛素 (mIU/L)		胰岛素抵抗指数	
		FBG		FIRI		IRI	
		给药前 Before	给药后 After	给药前 Before	给药后 After	给药前 Before	给药后 After
空白组 Blank group	10	2.63±0.41	2.58±0.36	19.11±6.63	18.44±5.21	2.43±0.65	2.41±0.74
A 组 Group A	8	5.43±1.54	5.51±1.69	26.68±8.46	27.32±7.54	6.21±2.30	6.30±2.18
B 组 Group B	8	5.55±1.62	5.49±1.73	25.71±9.97	26.01±8.66	6.18±2.26	6.28±2.24
C 组 Group C	8	5.34±1.60	8.21±2.65 ^{①②④}	24.88±9.63	40.52±12.67 ^{①②④}	6.24±2.34	4.15±1.41 ^{①②④}
D 组 Group D	8	5.60±1.46	3.11±0.42 ^{①②③⑤}	25.93±9.89	20.20±4.33 ^{①②③⑤}	6.30±2.18	3.05±0.06 ^{①②③⑤}
E 组 Group E	8	5.62±1.55	8.33±2.53 ^{①②④}	26.35±8.57	41.36±13.68 ^{①②④}	6.23±2.41	4.22±1.23 ^{①②④}
F 组 Group F	8	5.51±1.44	5.36±1.01 ^{①②③④⑤}	26.42±8.84	25.16±7.60 ^{①②③④⑤}	6.34±2.27	3.66±0.68 ^{①②③④⑤}

注:给药后,与 A 组比较,^①*P*<0.05;与 B 组比较,^②*P*<0.05;与 C 组比较,^③*P*<0.05;与 D 组比较,^④*P*<0.05;与 E 组比较,^⑤*P*<0.05。
Note. After administration, Compared with group A, ^①*P*<0.05. Compared with group B, ^②*P*<0.05. Compared with group C, ^③*P*<0.05. Compared with group D, ^④*P*<0.05. Compared with group E, ^⑤*P*<0.05.

表 2 各组胰岛 β 细胞功能比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of islet β cell function in each group

组别 Groups	例数 <i>n</i>	葡萄糖输注速率 mg/(kg·min)		第一时相胰岛素 (ng/mL)		最大胰岛素 (ng/mL)	
		GIR		First-phase insulin		Maximum insulin	
		给药前 Before	给药后 After	给药前 Before	给药后 After	给药前 Before	给药后 After
空白组 Blank group	5	30.54±12.36	30.10±15.45	18.26±5.64	18.51±5.14	202.43±50.65	203.61±49.87
A 组 Group A	4	20.11±13.02	19.89±12.04	11.13±3.21	10.65±3.36	126.32±32.30	128.32±32.61
B 组 Group B	4	20.43±12.65	20.14±11.58	10.79±3.55	11.06±3.43	128.63±30.54	126.74±30.87
C 组 Group C	4	19.86±12.87	13.02±8.54 ^{①②④}	11.26±3.31	6.24±2.16 ^{①②④}	126.51±29.87	100.30±12.35 ^{①②④}
D 组 Group D	4	20.33±13.13	28.63±14.21 ^{①②③⑤}	11.22±3.54	17.68±4.21 ^{①②③⑤}	126.74±30.51	193.54±35.30 ^{①②③⑤}
E 组 Group E	4	20.14±12.25	13.32±8.36 ^{①②④}	10.87±3.20	6.13±2.30 ^{①②④}	127.69±32.13	104.15±11.36 ^{①②④}
F 组 Group F	4	19.87±12.36	21.49±10.72 ^{①②③④⑤}	11.16±3.18	15.09±3.54 ^{①②③④⑤}	126.59±33.06	178.62±15.78 ^{①②③④⑤}

注:给药后,与 A 组比较,^①*P*<0.05;与 B 组比较,^②*P*<0.05;与 C 组比较,^③*P*<0.05;与 D 组比较,^④*P*<0.05;与 E 组比较,^⑤*P*<0.05。
Note. After administration, Compared with group A, ^①*P*<0.05. Compared with group B, ^②*P*<0.05. Compared with group C, ^③*P*<0.05. Compared with group D, ^④*P*<0.05. Compared with group E, ^⑤*P*<0.05.

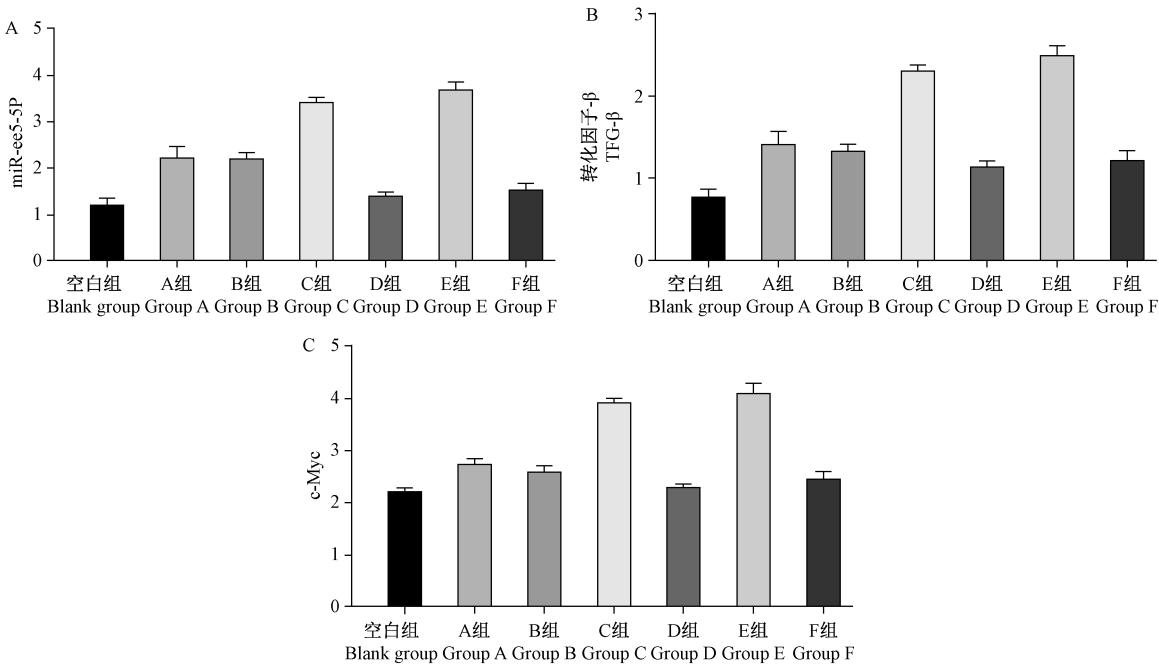


图 1 各组胰岛 β 细胞中 miR-335-5P、TGF-β 通路关键因子表达水平
Figure 1 Expression level of miR-335-5P and TGF - β key factors in islet β cells of each group

3 讨论

目前,关于 GDM 发病机制主要归纳为:孕妇妊娠期间分泌孕激素、糖皮质激素、胎盘生乳素等具有胰岛素抵抗作用的激素;且随着孕周增加含量随之升高,造成体内肝、肌肉等组织对胰岛素敏感性下降,若无法补偿胰岛素抵抗的增加,可引起体内

高胰岛素和高血糖,进而发展为 GDM^[9]。GDM 可导致孕妇血糖、脂肪、蛋白质代谢功能紊乱,发生巨大儿、羊水过多、自然流产、胎儿畸形、死胎、死产、新生儿低血糖、高胆红素血症、孕妇酮症酸中毒等,对母婴危害较大^[10]。基于 GDM 发病机制,最新研究认为胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌与该病发生和发展关系密切。

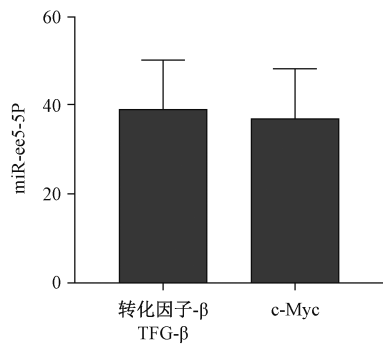


图 2 miR-335-5P 与 TGF-β、c-Myc 关系
Figure 2 Relationship between miR-335-5P, TGF-β and c-Mycall

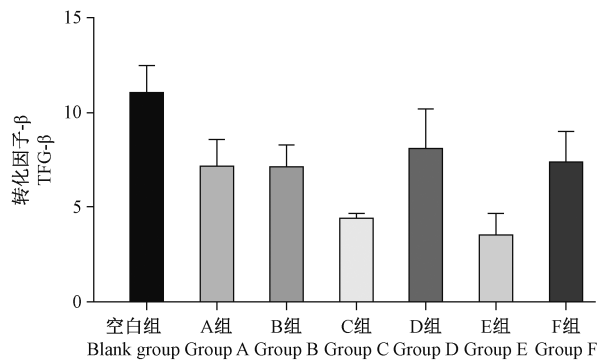
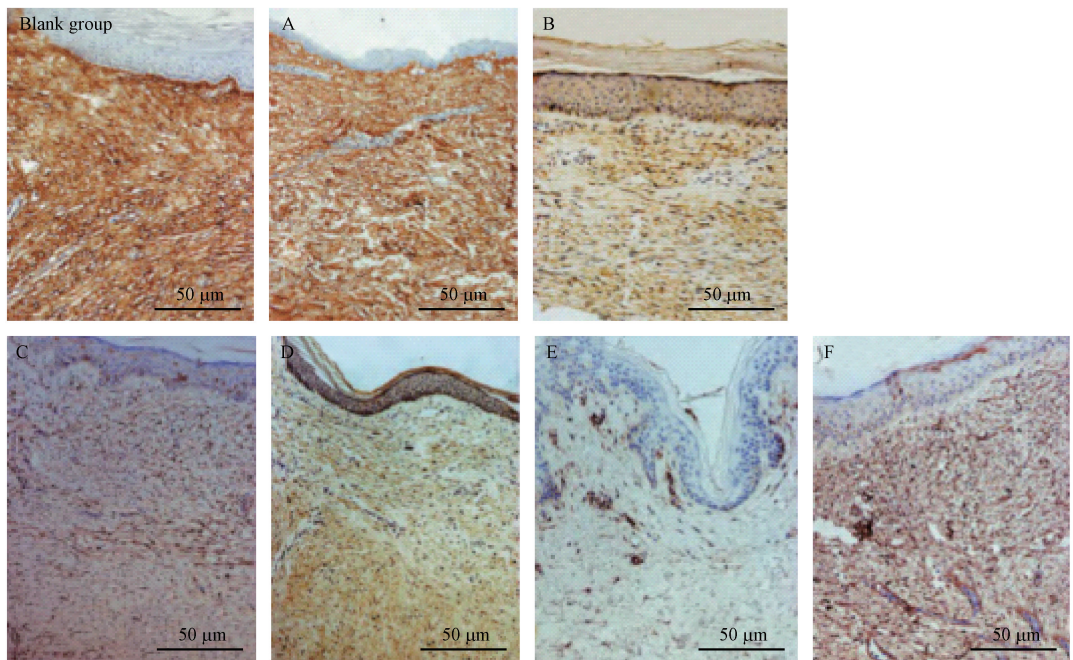


图 3 TGF-β 阳性表达图
Figure 3 TGF - β positive expression



注：A、B、C、D、E、F 分别表示为 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组、F 组。
图 4 免疫组织化学染色图
Note. A, B, C, D, E and F were expressed as group A, B, C, D, E and F, respectively.
Figure 4 Immunohistochemical staining

早有研究证实,TGF-β 信号可调控细胞增殖、分化、凋亡及胚胎发育等,而 TGF-β 信号通路的精准调控对疾病治疗具有积极意义^[11]。有研究指出在胰岛细胞损伤应答过程中,miR-335-5P 与 TGF-β 信号通路间存在一定交叉对话,提示 miR-335-5P 可能对调控 TGF-β 有一定价值^[12]。张琳^[13]的研究指出,miR-335-5P 通过与胰岛表皮因子竞争结合位点抑制胰岛 α 细胞糖化,由此激活各种细胞因子引起的 TGF-β 信号通路,从而阻断其分泌胰高血糖素。miR-335-5P 现已广泛应用于各种疾病治疗,且在肝

癌、乳腺癌等多种肿瘤疾病中均有应用。本研究结果显示,miR-335-5P 上调,可提高 FBG、FIRI、IRI 水平,进一步减少胰岛素分泌,这与赵茜等^[14]的研究结果较为一致。探讨 miR-335-5P 作用机制,考虑其临床有效性与激活 TGF-β 信号转导通路,提高 c-Myc 表达有关。c-Myc 是近年来发现的一个新的 TGF-β 信号调控因子;且在多篇研究中已指出 c-Myc 可提高 TGF-β 稳定性,促进其信号传递和靶基因转录^[15-16];石永英等^[17]文献指出 c-Myc 可提高 TGF-β 对癌细胞增殖、分化抑制作用。综合文献可

得,探讨 c-Myc、TGF-β 表达水平可提高对机体分化和死亡情况预测价值。另 Tagoma 等^[18]在研究中已表明,miR-335-5P 对减少胰岛素信号传导及脂质代谢相关基因有重要价值;Wang 等^[19]发现 miR-335-5P 表达较高组,胰岛素表达下降;Osorio-Yanez 等^[20]将 miR-335-5P 作用于人胰岛细胞,发现其能特异性阻断炎症因子介导的信号转导通路,而激活 TGF-β 通路信号。这些发现与本研究结果一致,提示 miR-335-5P 可提高 TGF-β 表达。为进一步证实 miR-335-5P 与 TGF-β 之间的关系,本文对其相对表达量进行探讨分析,得在胰岛 β 细胞中 miR-335-5P 表达时,TGF-β、c-Myc 均有不同程度表达,且 miR-335-5P 上调时 TGF-β、c-Myc 表达也升高。而当 TGF-β、c-Myc 和 miR-335-5P 均呈高表达时,发现胰岛 β 细胞中液泡和有序细胞减少,提示 TGF-β、miR-335-5P 对 GDM 小鼠葡萄糖耐量和胰岛素抵抗改善具有促进作用。

综上,miR-335-5P 通过激活 TGF-β 信号通路对 GDM 胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌产生积极作用,可为 GDM 治疗提供临床依据。但由于本实验受时间限制,且实验主要涉及动物有待探索更多研究对象作进一步研究。

参考文献:

[1] Erath H, Herath R, Wickremasinghe R. Gestational diabetes mellitus and risk of type 2 diabetes 10 years after the index pregnancy in Sri Lankan women—A community based retrospective cohort study [J]. PLoS One, 2017, 12 (6): e0179647.

[2] 张宁娟,李华萍. 妊娠期糖尿病胰岛素分泌模式与胰岛功能评估的探讨 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34 (11): 1261-1266.

[3] 吴莲,张婷. 胰岛素对不同孕周妊娠期糖尿病患者血糖水平及妊娠结局的影响 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2017, 9 (8): 39-41,46.

[4] 刘丽丽. 妊娠糖尿病患者胰岛素抵抗及胰岛 β 细胞功能状态变化 [J]. 中国实用医刊, 2017, 44 (2): 30-33.

[5] Pheiffer C, Dias S, Rheeder P, et al. Decreased expression of circulating miR-20a-5p in south african women with gestational diabetes mellitus [J]. Mol Diagn Ther, 2018, 22 (3): 345-352.

[6] 孙晓兰,陈敏. 2 型糖尿病不同尿白蛋白排泄率患者血清中 miR-342-5p、miR-423-5p 的表达量及临床意义 [J]. 海南医学院学报, 2017, 23 (1): 62-65.

[7] Sebastiani G, Guarino E, Grieco GE, et al. Circulating

microRNA (miRNA) expression profiling in plasma of patients with gestational diabetes mellitus reveals upregulation of miRNA miR-330-3p [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2017, 13 (8): 345-348.

[8] 彭麒麟,耿建国,邹大威,等. 糖肾宁对高糖培养的小鼠系膜细胞 TGF-β1 和 P38MAPK 表达的影响 [J]. 环球中医药, 2017, 10 (3): 265-269.

[9] 侯艳萍,王丽. 妊娠期糖尿病患者孕期体质指数、血清游离脂肪酸与胰岛素抵抗之间的关系 [J]. 中国妇幼保健, 2018, 33 (3): 518-520.

[10] 李小勤,钱增堃,朱文娟,等. 胰岛素和胰岛素样生长因子与肿瘤的相关性研究进展 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34 (1): 77-79.

[11] Tang XW, Qin QX. miR-335-5P induces insulin resistance and pancreatic islet β-cell secretion in gestational diabetes mellitus mice through VASH1-mediated TGF-β signaling pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (5): 6654-6666.

[12] 梁师钢,姚丽君,王玉梅. TRB3 在糖尿病肾病中的表达及调控 Notch 信号通路对人肾小管上皮细胞增殖凋亡的实验研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2018, 19 (4): 292-295,378.

[13] 张琳. TGF-β1/Smad 信号通路在糖尿病大鼠心肌组织中的表达变化及干预研究 [D]. 天津:天津医科大学, 2012.

[14] 赵茜,张巧. 新诊断 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗指数、空腹甘油三酯及葡萄糖简易指数、空腹血糖/空腹胰岛素与正常血糖高胰岛素钳夹试验的一致性分析 [J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25 (12): 1083-1085.

[15] 王宁,朴成哲,孟晓娜. Runx3 和 c-Myc 蛋白在 TGF-β 抑制 MG-63 细胞增殖中作用 [J]. 解剖科学进展, 2018, 24 (1): 65-68.

[16] Lekva T, Michelsen AE, Aukrust P, et al. Leptin and adiponectin as predictors of cardiovascular risk after gestational diabetes mellitus [J]. Cardiovasc Diabetol, 2017, 16 (1): 5.

[17] 石永英,卢俊江,陈广原,等. p15 与 c-Myc 在 TGF-β1 诱导的大鼠心肌细胞肥大中的表达及与 TGF/Smad 信号通路的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26 (3): 245-252.

[18] Tagoma A, Alnek K, Kirss A, et al. MicroRNA profiling of second trimester maternal plasma shows upregulation of miR-195-5p in patients with gestational diabetes [J]. Gene, 2018, 672: 137-142.

[19] Wang Y, Yang T, Zhang Z, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes migration and invasion by acting as a ceRNA of miR-335-5P in osteosarcoma cells [J]. Cancer Sci, 2017, 108 (5): 859-867.

[20] Osorio-Yanez C, Qiu C, Gelaye B. Risk of gestational diabetes mellitus in relation to maternal dietary calcium intake [J]. Public Health Nutr, 2017, 20 (6): 1082-1089.