

MiR-181b Expression Levels as Molecular Biomarker for Type 2 Diabetes

Seyed Mohsen Aghaei Zarch¹,
Mohamad Yahya Vahidi Mehrjardi²,
Emad Babakhanzadeh¹,
Majid Nazari¹,
Mehrdad Talebi¹,
Fahime Zeniali³,
Mohammadreza Dehghani⁴

¹ MSc Student in Human Genetics, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

² PhD of Molecular Genetics, Diabetes Research Centre, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

³ PhD Student in Nutrition, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Medical Genetics, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

(Received March 5, 2018 ; Accepted June 23, 2019)

Abstract

Background and purpose: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) as a progressive metabolic disorder is rising very fast around the world. Diagnosis of T2DM at early stages (prediabetic) is important in reducing the mortality associated with this disease. Several studies have shown that micro-RNAs play a major role in the pathogenesis of the T2DM. Because of the high stability of these regulatory RNA in body fluids and the availability of sensitive technology, such as Real-time PCR for detecting them, they can be used as epigenetic biomarker in the early diagnosis of T2DM. In this study, for the first time, miR-181 expression levels were investigated in patients with T2DM in Yazd province, Iran.

Materials and methods: In this experimental study, Real-time PCR was used to quantify expression levels of miR-181b in 90 individuals including T2DM patients (n=30), prediabetic (n=30), and healthy individuals (n=30).

Results: There were significant differences in miR-181b expression levels between the groups studied.

Conclusion: Reduced miR-181b expression levels in T2DM and pre-diabetic subjects compared to healthy individuals suggests that miR-181b could be used as a new epigenetic diagnostic marker for early diagnosis of T2DM.

Keywords: type 2 diabetes, miR-181b, biomarker

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(176): 195-201 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammadreza Dehghani - Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
(E-mail: dehghani.dr@gmail.com)

بیان miR-181b به عنوان یک بیومارکر مولکولی در دیابت نوع دو

سید محسن آقایی زارچ^۱

محمد یحیی وحیدی مهرجردی^۲

عماد باباخانزاده^۱

مجید نظری^۱

مهرداد طالبی اندواری^۱

فهیمه زینلی^۳

محمدرضا دهقانی^۴

چکیده

سابقه و هدف: شیوع دیابت نوع دو به عنوان یک اختلال متابولیک پیشرونده در سراسر جهان به سرعت زیادی در حال افزایش است. تشخیص این بیماری در مراحل اولیه (پیش دیابتی) نقش مهمی را در کاهش مرگ و میرهای مرتبط با این بیماری دارد. مطالعات نشان داده‌اند که میکرو RNA ها نقش مهمی در پاتوژنز دیابت نوع دو بازی می‌کنند. به دلیل پایداری این مولکول‌های تنظیمی در مایعات بدن و در دسترس بودن تکنولوژی حساس برای اندازه‌گیری آن‌ها، می‌توان از آن‌ها به عنوان بیومارکری ژنتیکی در تشخیص زودرس دیابت نوع دو استفاده نمود. در این مطالعه برای اولین بار به بررسی بیان miR-181b در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو در جمعیت یزد پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه برای سنجش میزان بیان miR-181b در ۳۰ فرد مبتلا به دیابت نوع دو، ۳۰ فرد پیش دیابتی و ۳۰ فرد سالم از روش Real-time PCR استفاده گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه تفاوت معنی‌داری در میزان بیان miR-181b در بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد.

استنتاج: بیان کاهش یافته miR-181b در افراد مبتلا به دیابت نوع دو و پیش دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم نشان‌دهنده این است که miR-181b پتانسیل استفاده به عنوان بیومارکر در دیابت نوع دو را دارا است.

واژه های کلیدی: دیابت نوع دو، miR-181b، بیومارکر

مقدمه

آینده هستند (۲). دیابت نوع دو می‌تواند اثرات ویران کننده ای بر روی عروق خونی داشته باشد که منجر به عوارض میکرو واسکولار نظیر رتینوپاتی، نوروپاتی و نوروپاتی و عوارض ماکروواسکولار نظیر سکته و پر فشاری خون شود (۳). در صورتیکه این عوارض درمان نشوند می‌توانند زندگی فرد را تهدید و کیفیت زندگی

دیابت نوع دو از بیماری‌های متابولیکی پیشرونده است که شیوع آن در سراسر دنیا در حال افزایش است و تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۲۵ نزدیک به ۳۷۵ میلیون نفر به این بیماری مبتلا گردند (۱). همچنین نزدیک به ۷۹ میلیون نفر دارای نشانه هایی از مقاومت انسولینی و پیش دیابتی هستند که در خطر ابتلا به دیابت نوع دو در

E-mail: dehghani.dr@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد رضا دهقانی - یزد: میدان عالم، دانشگاه علوم پزشکی یزد، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۲. دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقاتی - درمانی دیابت، یزد، ایران

۳. دانشجوی دکتری تخصصی علوم تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۴. استادیار، گروه آموزشی ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۴/۲

هستند. نقش بیولوژیکی این خانواده در ابتدا به عنوان تسهیل کننده تمایز سلول های خونی شناخته شد (۱۲). میزان بیان miR-181a و miR-181b می تواند تحت تاثیر لوکمی/لنفوما و انواع تومورها قرار گیرد، که این مورد نشان دهنده ارتباط بین بدتنظیمی مسیر پیام رسانی NF-κB و کاهش بیان miR-181b است (۱۳). همچنین miR-181b یکی از میکرو RNA های مهار کننده مسیر پیام رسانی NF-κB در سلول های اندوتلیالی است. مشخص شده miR-181b با هدف گیری مستقیم importin α3 (پروتئینی که برای انتقال هسته ای NF-κB ضروری است)، نقش مهمی در مهار NF-κB و مهار التهاب ایفا می کند (۱۴). بنابراین هدف مطالعه حاضر، بررسی بیان miR-181b در افراد مبتلا به دیابت نوع دو، پیش دیابتی و افراد سالم برای ارائه راهکاری های جدید در تشخیص زودرس دیابت نوع دو و جلوگیری از بروز عوارض در جمعیت یزد به عنوان گروه پر خطر می باشد (۱۵).

مواد و روش ها

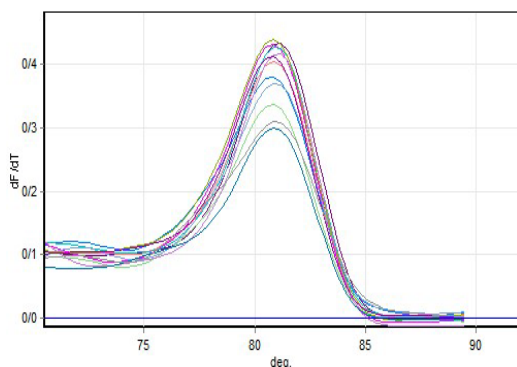
جمع آوری نمونه های بیماران و افراد سالم: در این مطالعه تجربی، از ۳۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو، ۳۰ فرد پیش دیابتی و ۳۰ فرد سالم به عنوان کنترل، ۵ میلی لیتر خون محیطی همراه با ضد انعقاد EDTA تهیه شده از آزمایشگاه تشخیص طبی مرکز تحقیقاتی - درمانی دیابت یزد جمع آوری شد. انتخاب بیماران با تشخیص فوق تخصص غدد انجام شد. معیارهای ورود به مطالعه شامل، سن بالای ۳۵ سال، فقدان عوارض میکرو و ماکروواسکولار نظیر رتینوپاتی، نفروپاتی، قطع عضو و عدم ابتلا به بیمارهای عفونی و عروق کرونر بود. اطلاعات دموگرافیک بیماران تحت مطالعه در جدول شماره ۱ آمده است. تشخیص بیماران مبتلا به دیابت نوع دو بر اساس معیاری های WHO به این صورت انجام گرفت: دیابت نوع دو: (۴۸ mmol/mol) $\geq$ ۶/۵٪ HbA1c، (۱۲۶ mg/dl) $\geq$ FBG، پیش دیابتی: میزان HbA1c بین (۳۹-۴۷ mmol/mol) ۶/۴٪ - ۵/۷٪، FBG بین (۶-۹ mmol/mol) ۱۲۶-۱۰۰.

را کاهش دهند. یکی از راه حل های این مشکل شناسایی افرادی است که در مرحله پیش دیابتی قرار دارند تا بتوان با تغییر الگوی زندگی آن ها یا مداخلات دارویی پیشرفت بیماری را به دیابت کاهش یا به تعویق انداخت. از این رو توسعه بیومارکرهای مولکولی برای تشخیص زودرس این بیماری ضروری است.

میکرو RNA ها مولکول های تنظیمی کوچکی با طول ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتید هستند و فاکتور مرکزی در تنظیم پسا رونویسی در حیوانات و گیاهان به حساب می آیند. میکرو RNA ها به ناحیه غیر ترجمه شونده 3' (3'-UTR) در مولکول های هدف یعنی mRNA ها متصل می شوند و با افزایش سرعت تجزیه یا مهار ترجمه آن ها، به صورت منفی بیان آن ها را تنظیم می نمایند (۴). میکرو RNA ها در بافت ها و مایعات بدن از قبیل سرم، خون، اوره و بزاق وجود دارند (۵). این مولکول ها در خون محیطی پایدار بوده و از فعالیت RNase حفظ می شوند و می توانیم آن ها را با روش های نظیر Real-time PCR اندازه گیری کنیم (۶). علاوه بر این مطالعات متعددی نقش این مولکول ها را در فرآیندهای متابولیکی و سایر مکانیسم های درگیر در دیابت نوع دو نشان داده اند (۷-۹)، بنابراین این مولکول ها پتانسیل استفاده به عنوان بیومارکر در تشخیص زودرس دیابت نوع دو را دارند. مهم ترین مشخصه دیابت نوع دو مقاومت انسولینی است. این حالت قبل از آن که تغییرات گلیسمی نظیر افزایش قند ناشتا و HbA1c ایجاد شود، به وجود می آید و می تواند بیش از یک دهه قبل از بروز دیابت در فرد وجود داشته باشد (۱۰). در اندوتلیوم عروقی فعال شدن NF-κB (Nuclear Factor-κB)، منجر به بیان ژن های پیش التهابی، نظیر ژن های کد کننده سیتوکین ها و مولکول های اتصال می گردد که همگی نقش مهمی در التهاب و پاسخ ایمنی بازی می کنند، در نتیجه اختلال سلول های اندوتلیالی می تواند با ایجاد محیط التهابی، نقش مهمی در توسعه مقاومت انسولینی و دیابت داشته باشد (۱۱). miR-181b از اعضای خانواده miR-181 است و miR-181a/c/d از اعضای دیگر این خانواده

جدول شماره ۱: اطلاعات دموگرافیک گروههای تحت مطالعه. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده اند.

parameter	Healthy (n = 30)	Pre-diabetes (n= 30)	T2DM (n = 30)	سطح معنی داری
Age (years)	53.5 $\pm$ 7.2	56.7 $\pm$ 7	55.4 $\pm$ 5.3	P= .332
FBG (mg/dl)	90.1 $\pm$ 9.4	108.8 $\pm$ 8.5	191.1 $\pm$ 59.24	P< .001
HbA1c	5.1 $\pm$.24	6.4 $\pm$.28	8.62 $\pm$ 1.74	P< .001
Triglycerides (mg/dl)	118.11 $\pm$ 30.84	136.82 $\pm$ 50.34	206.1 $\pm$ 87.12	P< .001
cholesterol (mg/dl)	147.61 $\pm$ 21.21	174.75 $\pm$ 44.72	189.5 $\pm$ 53.85	P= .004
HDL	43.11 $\pm$ 10.6	39.9 $\pm$ 9.5	35.31 $\pm$ 10.9	P= .012



تصویر شماره ۱: منحنی ذوب miR-181b

آنالیز آماری داده‌ها: تمامی داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. داده‌ها با نرم‌افزار Prism 7 تجزیه و تحلیل شدند. بررسی نرمالیت داده‌ها با استفاده از آزمون اسمیرنوف-کولمیکروف (K-S) انجام گرفت. تفاوت آماری مقادیر miR-181b بین افراد مبتلا به دیابت، پیش دیابتی و گروه کنترل از طریق آزمون one-way ANOVA بررسی شد. از آزمون توکی (Tukey) برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. مقدار P کم‌تر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها و بحث

در مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی بیان miR-181b در افراد پیش دیابتی، دیابت نوع دو و افراد سالم در جمعیت یزد پرداخته شد. بیان miR-181b در خون کامل افراد مبتلا به دیابت نوع دو، پیش-دیابتی و گروه کنترل با استفاده از روش qPCR سنجیده شد و با ژن کنترل داخلی SNORD نرمالیزه شد.

همچنان که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است، بیان miR-181b در افراد پیش دیابتی (fold change = ۰/۳۴ $\pm$ ۰/۱۲) نسبت به افراد سالم

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی: از کیت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر (آلفا-کلاسیک، اصفهان، ایران) برای سنجش پروفایل های بیوشیمیایی (لیپیدی، قندی) استفاده شد (جدول شماره ۱).

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج Total RNA که شامل میکرو RNA و RNA طویل می‌باشد با استفاده از کیت GeneAll (General Biosystems, Seoul, Korea) طبق دستورالعمل انجام گرفت، ارزیابی بازده و کیفیت RNA به طور مستقیم در دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher Scientific) ارزیابی شد. سپس عمل سنتز cDNA با استفاده از کیت بن میر (بن یاخته، تهران، ایران) صورت گرفت.

واکنش Real-Time PCR برای بررسی بیان میکرو RNA: این عمل با استفاده از BONmiR QPCR Kit (بن یاخته، تهران، ایران) انجام گرفت. پرایمرهای مورد نظر از شرکت بن یاخته تهیه شد (جدول شماره ۲). واکنش Real-Time PCR در دستگاه Rotor Gene 6000 (Corbett, Concorde, NSW, Australia) انجام شد. مقدار نسبی میکرو RNA بر اساس متد $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (livak) محاسبه گردید.

جدول شماره ۲: پرایمر های اولیگونوکلئوتیدی

ژن هدف	توالی پرایمر
miR-181b	Forward: 5'-CAACATTCATTGCTGTCG -3' Reverse*
SNORD 47	Forward: 5'-ATCACTGTAAAACCGTTCCA -3' Reverse*

*: پرایمر reverse از شرکت بن یاخته خریداری شد.

آنالیز منحنی ذوب: اختصاصیت واکنش PCR با ایجاد آنالیز منحنی ذوب و سپس ژل الکتروفورزیس تایید گردید (نمودار شماره ۱).

به میزان قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. علاوه بر این نقش miR-181b در کاردیومیوپاتی دیابتی نیز مشخص شده است. Jiang و همکاران با مطالعه فیبروبلاست های قلبی تیمار شده با آئزوتنسن II نشان دادند که بیان miR-181b کاهش می یابد، که این مورد نشان دهنده نقش احتمالی miR-181b در فیروزه شدن قلب می باشد (۲۰).

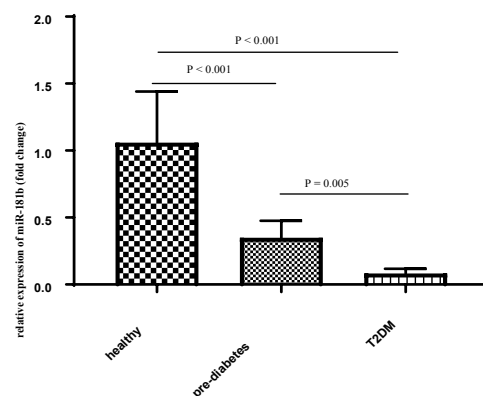
در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۷ توسط Copier و همکاران (۲۱) بر روی مدل حیوانی کاردیومیوپاتی دیابتی صورت گرفت مشخص شد که بیان miR-181b در موش های مبتلا نسبت به گروه کنترل کاهش می یابد و پتانسیل استفاده به عنوان یک بیومارکر تشخیصی در کاردیومیوپاتی دیابتی را دارا است.

در مطالعه حاضر کاهش بیان miR-181b در دیابت نوع دو، نسبت به گروه پیش دیابتی و افراد سالم و نیز کاهش آن در افراد پیش دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم، می تواند نشان دهنده نقش احتمالی این میکرو RNA در پیشرفت بیماری باشد و پتانسیل استفاده به عنوان بیومارکر تشخیصی در دیابت نوع دو را دارا می باشد. با این حال بدلیل عدم آنالیز رونوشت ژن های هدف و پائین بودن تعداد نمونه ها، یافته های این آزمایش باید با احتیاط تفسیر گردد. در نتیجه مطالعات بیش تری برای رسیدن به نقش دقیق این میکرو RNA در پاتوژنز دیابت نوع دو نیاز است.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد با کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1396.237 می باشد که با همکاری دانشگاه علوم پزشکی یزد انجام شده است، بدین وسیله از مسئولین مربوطه قدردانی می شود. همچنین از پرسنل مرکز تحقیقاتی درمانی دیابت یزد و دانشکده پزشکی یزد قدردانی می شود.

(fold change = $1/05 \pm 0/38$) به میزان قابل ملاحظه ای کاهش یافت ($P < 0/001$)، همچنین بیان miR-181b در گروه دیابت نوع دو (fold change = $0/08 \pm 0/03$) به میزان بیش تری کاهش یافت. علاوه بر این نتایج، کاهش معنی دار بین گروه پیش دیابتی و گروه دیابت نیز نشان دادند ($P = 0/005$).



تصویر شماره ۳: میزان بیان miR-181b در خون محیطی در گروه کنترل (n=30)، پیش دیابتی (n=30)، دیابت نوع دو (n=30).

یکی از دلایل انتخاب miR-181b در این مطالعه، نقش ضد التهابی و درگیری آن در مقاومت انسولینی است که در مطالعات مختلفی به آن اشاره شده است. فسفریلاسیون Akt فرآیندهای بیولوژیکی متعددی نظیر مسیر پیام رسانی انسولین را تنظیم می نماید، به طوری که بد تنظیمی فسفریلاسیون Akt در دیابت دیده می شود (۱۶). فعالیت کامل Akt به فسفریلاسیون ریشه های Thr308 و Ser473 بستگی دارد که بوسیله فسفاتازی به نام PHLPP2 مهار می گردد (۱۷). در مطالعه ای که توسط Sun و همکاران (۱۸) انجام گرفت مشخص شد که miR-181b با هدف گیری PHLPP2 اندوتلیالی موجب بهبود پیام رسانی انسولین و التهاب اندوتلیالی می گردد. در طرف دیگر Tomé-Carneiro (۱۹) نشان داد که میزان miR-181b در افراد دیابتی که یک سال مصرف روزانه رزوراترول (یک داروی ضد التهابی) را داشتند

References

1. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 103(2): 137-149.
2. Natarajan R, Putta S, Kato M. MicroRNAs and diabetic complications. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 2012; 5(4): 413-422.
3. Mohammadi K, Woodward M, Hirakawa Y, Zoungas S, Colagiuri S, Hamet P, et al. Microvascular and macrovascular disease and risk for major peripheral arterial disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2016; 39(10): 1796-1803.
4. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 87: 3-14.
5. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; 56(11): 1733-1741.
6. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(30): 10513-10518.
7. Heneghan H, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(5): E846-E850.
8. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010; 107(6): 810-817.
9. Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PloS One* 2011; 6(8): e22839.
10. Ohn JH, Kwak SH, Cho YM, Lim S, Jang HC, Park KS, et al. 10-Year trajectory of β -cell function and insulin sensitivity in the development of type 2 diabetes: a community-based prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016; 4(1): 27-34.
11. Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(16): 5308-5319.
12. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303(5654): 83-86.
13. Zhu FX, Wu HL, Chen JX, Han B, Guo YF. Dysregulation of microRNA181b and TIMP3 is functionally involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Cell Physiol* 2019; 234(10): 18963-18969.
14. Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, et al. MicroRNA-181b regulates NF- κ B-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest* 2012; 122(6): 1973-1990.
15. Lotfi MH, Saadati H, Afzali M. Prevalence of diabetes in people aged ≥ 30 years: the results of screen-ing program of Yazd Province, Iran, in 2012. *J Res Health Sci* 2013; 14(1): 88-92.
16. Vasudevan KM, Garraway LA. AKT signaling in physiology and disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 347: 105-133.

17. Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 2005; 18(1): 13-24.
18. Sun X, Lin J, Zhang Y, Kang S, Belkin N, Wara AK, et al. MicroRNA-181b improves glucose homeostasis and insulin sensitivity by regulating endothelial function in white adipose tissue. *Circ Res* 2016; 118(5): 810-821.
19. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, Dávalos A, Gil-Zamorano J, González M, et al. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol Res* 2013; 72: 69-82.
20. Jiang X, Ning Q, Wang J. Angiotensin II induced differentially expressed microRNAs in adult rat cardiac fibroblasts. *J Physiol Sci* 2013; 63(1): 31-38.
21. Copier CU, León L, Fernández M, Contador D, Calligaris SD. Circulating miR-19b and miR-181b are potential biomarkers for diabetic cardiomyopathy. *Scientific Reports* 2017; 7(1): 13514.