

The Association between rs4541843 Polymorphism in miR-182 and Diabetes Mellitus

Arezoo Abdi¹,
Maryam Peymani²

¹ MSc in Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

(Received July 1, 2019 ; Accepted April 5, 2020)

Abstract

Background and purpose: Diabetes Mellitus is one of the most common endocrine diseases. The prevalence of type 2 diabetes is higher than other types, accounting for 85-90% of all diabetic cases. The current research aimed at investigating the association between rs4541843 in miR-182 and type 2 diabetes.

Materials and methods: In this case-control study, healthy individuals (n=196) and type 2 diabetic patients (n=199) were randomly selected from a target population in Isfahan, Iran. The genotypes for the polymorphism were determined by PCR-RFLP method and the results were confirmed by sequencing. Then, the frequency of the genotypes and alleles were analyzed to determine the association between rs4541843 in miR-182 and the risk of type 2 diabetes, sex, and age at disease onset.

Results: The study showed no significant difference between different genotypes in healthy individuals and diabetic patients ($P < 0.05$). Also, no significant association was found between different genotypes of this polymorphism and risk of diabetes considering GG genotype as the reference genotype ($P < 0.05$).

Conclusion: Due to the lack of association between the rs4541843 in miR-182 and risk of diabetes in this population, this polymorphism cannot be used to screen diabetic patients in the target population. Further studies are needed to evaluate the importance of this polymorphism in different populations.

Keywords: type 2 diabetes, polymorphism, miR-182

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (185): 137-142 (Persian).

* Corresponding Author: Maryam Peymani - Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
(E-mail: Peymani62_m@yahoo.com)

ارتباط پلی مورفیسم rs4541843 در ژن کد کننده miR-182 با بروز دیابت نوع دو در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو

آرزو عبدی¹مریم پیمانی²

چکیده

سابقه و هدف: دیابت ملیتوس شایع ترین بیماری اندوکراین است. در بین انواع دیابت، شیوع دیابت نوع دو بیش تر بوده و 85-90 درصد از کل موارد دیابت را شامل می شود. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs4541843 در miR-182 با دیابت نوع دو در جمعیت اصفهان انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، 196 فرد سالم و 199 فرد بیمار دیابتی نوع 2 به طور تصادفی از جمعیت مورد نظر انتخاب شدند. ژنوتیپ افراد برای پلی مورفیسم مورد نظر با روش PCR-RFLP تعیین و جهت تأیید نتایج، تعدادی از نمونه ها سکانس شد. سپس فراوانی ژنوتیپ ها و به دنبال آن، فراوانی آلل ها به منظور به دست آوردن ارتباط این پلی مورفیسم با خطر ابتلا به دیابت نوع دو، جنس و سن بروز بیماری، آنالیز گردید.

یافته ها: اختلاف معناداری بین انواع ژنوتیپ ها در دو جمعیت سالم و بیمار وجود ندارد و ژنوتیپ های مختلف این پلی مورفیسم با در نظر گرفتن ژنوتیپ GG به عنوان ژنوتیپ مرجع، با خطر ابتلا به دیابت در سطح $P < 0/05$ ارتباط معنی داری ندارند.

استنتاج: با توجه به عدم ارتباط پلی مورفیسم مورد نظر با خطر ابتلا به دیابت در این جمعیت، از این پلی مورفیسم نمی توان برای غربالگری بیماران دیابتی در جمعیت مورد نظر استفاده نمود. مطالعات بیش تر در زمینه ارزیابی اهمیت این پلی مورفیسم در جمعیت های مختلف ضروری است.

واژه های کلیدی: دیابت نوع دوم، پلی مورفیسم، miR-182

مقدمه

جمله miRNA ها که بتواند موجب تشخیص زود هنگام شود، انقلابی در درمان خواهد بود (1-3). براساس نتایج مطالعات، تعداد زیادی از miRNA ها در انسان های مبتلا به دیابت نوع دو در مقایسه با افراد کنترل اختلاف بیان نشان داده اند (3-5).

دیابت ملیتوس یک مشکل بهداشت جهانی است و تا سال 2030 تخمین زده می شود که 450 میلیون نفر بیمار دیابتی وجود داشته باشد (1-3). به هر حال نیاز اساسی برای درک بهتر در زمینه مکانیسم های شروع و پیشرفت بیماری برای توسعه استراتژی های درمان دیابت ضروری به نظر می رسد (4). شناسایی بیومارکرهای اختصاصی از

E-mail: Peymani62_m@yahoo.com

مؤلف مسئول: مریم پیمانی - شهر کرد: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد، دانشکده علوم پایه

1. کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران

2. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران

تاریخ دریافت: 1398/4/10 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/4/18 تاریخ تصویب: 1399/1/17

افراد شرکت کننده در این مطالعه و خصوصیات کلینیکی مورد نظر در جمعیت بیماران به ترتیب در جدول‌های شماره 1 و 2 نمایش داده شده است.

جدول شماره 1: مشخصات جمعیت مورد مطالعه

مشخصات	گروه شاهد	گروه مبتلا به بیماری دیابت	سطح معنی‌داری
تعداد نمونه‌ها	196	199	----
مرد	62	68	0/999
زن	126	125	1/000
تعداد افرادی که اطلاعات جنسیت آن‌ها در دسترس نبود	8	6	----
دانه سنی (برای افرادی که در هر گروه اطلاعات سنی آن‌ها در دسترس بود)	34-91	89-30	0/793
آن‌ها در دسترس بود	58۸۷۶۷ ± 11/75	5۹۰۰۸ ± 11/39	

جدول شماره 2: توزیع متغیرهای بالینی و بیوشیمیایی در بیماران دیابتی نوع 2 و افراد سالم

شاخص	افراد دیابتی نوع 2	افراد سالم
قند خون ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر)	189/80 ± 5/395	83/07 ± 8/90
کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر)	211/76 ± 44/65	188/01 ± 38/55
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	250 ± 20	160 ± 37
هموگلوبین گلیکوزیله (درصد)	7/3 (6/72 - 8)	5 (4/9 - 5/2)

گروه کنترل از بین افراد سالم که معیارهای ابتلا به دیابت نداشتند و از لحاظ سن (5±) و جنس با گروه بیمار، همسان سازی شده بودند، به طور تصادفی انتخاب شدند. ابتلا به دیابت با معیارهای سازمان جهانی بهداشت (WHO)، تعریف شده است (10).

از هر یک از افراد تحت مطالعه پس از اندازه‌گیری مقدار تری گلیسرید (TG)، قند خون ناشتا (FBS)، هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) و کلسترول سرم با روش‌های استاندارد آزمایشگاهی، به میزان 5 میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد. استخراج DNA ژنومی از سلول‌های گلبول سفید خون افراد مورد آزمایش با استفاده از کیت استخراج DNA (Genet bio، کره - K2000) و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها با استفاده از روش PCR-RFLP صورت گرفت. در ابتدا با استفاده از توالی پرایمر رفت برگشت 5'-TGGCAATGGTAGAACTCACACT-3' و 5'-CCAGTTCCTCACTCCTCGAT-3' و توالی پرایمر تکثیر نمونه‌ها انجام شد. مواد لازم جهت انجام واکنش PCR (دستگاه ترموسیکلر اپندرف) در حجم

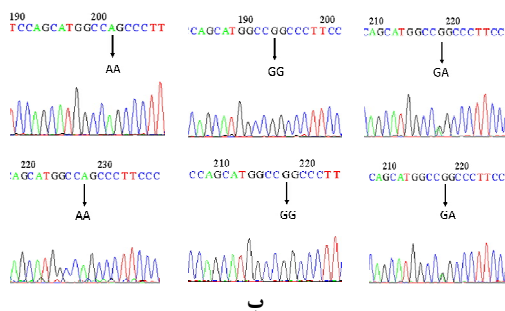
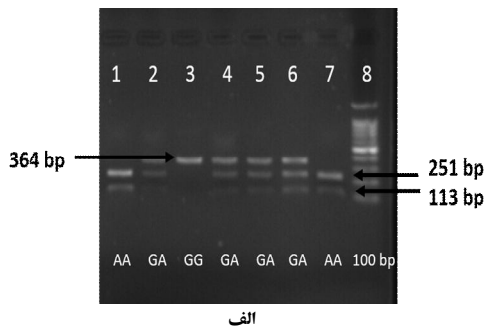
miR-182 در انسان در موقعیت 7q32.2 از طریق هدف قرار دادن FOXO1 و FOXO3 در بیماری‌های کلیوی و دیابت و سرطان نقش ایفا می‌کند (4-6).

چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP: single-nucleotide polymorphism) یک تنوع ژنتیکی بسیار شناخته شده در ژنوم انسان می‌باشد که به عنوان یک نشانگر مولکولی به منظور پیش‌بینی، تشخیص و درمان بیماری‌هایی هم‌چون دیابت معرفی می‌شود (7). محققان دریافته‌اند که SNP‌های موجود در miRNA و یا مرتبط با بیورژن آن‌ها ممکن است در پاسخ‌های درمانی و پیش‌بینی بیماری‌ها موثر باشند و گاهی SNP در نواحی کناری توالی miRNA نیز می‌تواند در مکانیسم عمل miRNA نقش تنظیمی ایفا کند (8). اگرچه چندین مطالعه در زمینه بیان و عملکرد miR-182 در دیابت نوع دو انجام شده است، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه ارتباط پلی مورفیسم rs4541843 در 28 نوکلئوتید پایین دست توالی ژن miR-182 با دیابت نوع دو انجام نشده است. این پلی مورفیسم در ژنوم انسان روی لوکوس کروموزومی 7q32.2 قرار دارد و با تغییر نوکلئوتیدی A/G در این ناحیه همراه است (9). هدف مطالعه حاضر، بررسی ارتباط بین rs4541843 در 28 نوکلئوتید پایین دست توالی ژن با خطر بروز دیابت نوع دو در جمعیت اصفهان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی، پس از تأیید و تصویب کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شناسه IR.IAU.SHK.REC.1398.015، بر روی 199 بیمار دیابتی نوع 2 و 196 فرد سالم انجام پذیرفت (قابل ذکر است انتخاب این تعداد نمونه، براساس امکانات و دسترسی محدود به نمونه‌ها بوده است). به افراد دیابتی مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان الزهرا اصفهان و شرکت کننده در مطالعه، آگاهی کافی داده شد و رضایت جهت انجام مطالعه اخذ گردید. خصوصیات

جفت باز نشان دهنده ژنوتیپ GG بودند. همچنین نتایج حاصل از سکانس، ژنوتیپ‌های تعیین شده برای نمونه‌های مورد نظر را تأیید نمود (تصویر شماره ۱-الف).



تصویر شماره 1: الف: نتیجه الکتروفورز تعدادی از محصولات PCR تیمار شده با آنزیم MscI. ب: نتیجه سکانس تعدادی از نمونه‌ها جهت تأیید نتایج هضم آنزیمی

15 میکرولیتر شامل 1 میکرولیتر DNA ژنومی، 5 میکرولیتر آب دیونیزه، 7/5 میکرولیتر مستر میکس 2X (Ampliqon، دانمارک - A301803) و 0/75 میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت (2 pmol) بود. مراحل انجام آزمایش با برنامه دمایی دناتوراسیون اولیه در 94 °C به مدت 5 دقیقه، 35 سیکل با برنامه 94 °C برای 0/5 دقیقه، 62 °C به مدت 1 دقیقه، 72 °C برای 0/5 دقیقه و در نهایت طولی سازی نهایی در دمای 72 °C به مدت 7 دقیقه انجام شد. RFLP بر روی محصولات PCR برای چند شکلی rs4541843 توسط آنزیم MSCI (Fermentas، آمریکا - ER1211) مطابق دستور شرکت تولید کننده آنزیم انجام گرفت. سپس قطعات حاصل از RFLP بر روی ژل آگارز 1 درصد مشاهده گردید. به منظور مقایسه فراوانی آللی و ژنتیکی بین دو گروه بیمار و سالم آنالیز نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS v.23 با تست آماری رگرسیون لجستیک انجام شد و ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف مربوط به پلی مورفیسم مورد نظر با بروز بیماری دیابت در سطح کم‌تر از 0/05 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها و بحث

بررسی توزیع فراوانی آللی در دو گروه سالم و بیمار براساس جدول شماره 3 نشان داد که آلل A به عنوان آلل ریسک در هر دو گروه، دارای کم‌ترین فراوانی می‌باشد (به ترتیب 43/8 و 44/23 درصد). فراوانی آللی و ژنوتیپی در دو گروه بیمار و سالم دارای تفاوت معنی‌دار نبود و هیچ یک از ژنوتیپ‌های مشاهده شده این پلی مورفیسم نسبت به ژنوتیپ GG به عنوان ژنوتیپ مرجع، در این جمعیت با خطر ابتلا به دیابت در سطح $P < 0/05$ ارتباط معناداری نداشت. همچنین ارتباط معنی‌داری در سطح $P < 0/05$ بین فراوانی ژنوتیپ‌ها با سن بروز دیابت (جدول شماره 4) و در جمعیت‌های زنان و مردان بیمار به تفکیک جنسیت وجود نداشت (جدول شماره 5).

گروه سالم و بیمار در یک رده سنی قرار داشتند و اختلاف فراوانی نمونه‌های زن و مرد بین دو گروه سالم و بیمار و همچنین دامنه سنی دو جمعیت سالم و بیمار معنی‌دار نبود (جدول شماره 1). هر دو گروه کنترل و بیمار از نظر شرایط تعادل هاردی-واینبرگ با درجه آزادی یک، در حال تعادل بودند. پس از تعیین کیفیت DNA های استخراج شده و تکثیر آن‌ها، جهت تعیین ژنوتیپ هر یک از نمونه‌ها، محصولات PCR، تحت آنالیز RFLP به وسیله آنزیم MSCI قرار گرفتند. قطعاتی با اندازه‌های 113 و 251 جفت باز نشان دهنده ژنوتیپ AA، قطعاتی با اندازه‌های 364، 113 و 251 جفت باز نشان دهنده ژنوتیپ GA و قطعاتی با اندازه‌های 364

تاکنون مطالعات مختلفی به اهمیت نقش miR-182 در بروز دیابت و عوارض این بیماری در انسان و موش اشاره داشته‌اند (4, 7, 11-18). نتایج بررسی پایگاه داده dbSNP نیز نشان داد که به صورت میانگین، فراوانی عمومی آللی برای آلل A در پلی مورفیسم rs4541843 در جمعیت‌های مختلف، به صورت متفاوتی گزارش شده است (9). فراوانی آلل A در مطالعه حاضر نیز، 48/5 درصد به دست آمد که این تفاوت‌ها و شباهت‌ها در گزارشات را می‌توان به تفاوت‌ها و شباهت‌های قومیتی و نژادی جمعیت‌های مورد مطالعه نسبت داد.

این مطالعه گزارشی برای قبول و یا رد ارتباط بین پلی مورفیسم در 28 نوکلئوتید پایین دست توالی ژن miR-182 و خطر بروز دیابت نوع 2 در جمعیت اصفهان و کاربرد آن در علم پزشکی برای تعیین ژنوتیپ افراد و بررسی پرخطر بودن آن‌ها برای ابتلا به دیابت است و از آنجایی که ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد با مطالعات پیش‌تر در سایر جوامع می‌توان به نتیجه جامع‌تری در جهت غربالگری دست یافت.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهر کرد می‌باشد و از تمام افرادی که در جمع‌آوری نمونه‌های خون در این مطالعه یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

References

- Chien HY, Lee TP, Chen CY, Chiu YH, Lin YC, Lee LS, et al. Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications. *J Chin Med Assoc* 2015; 78(4): 204-211.
- Tang X, Tang G, Özcan S. Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779(11): 697-701.
- Poirier C, Desgagné V, Guérin R, Bouchard L. Micronas in pregnancy and gestational

جدول شماره 3: ارتباط پلی مورفیسم G>A rs4541843 و خطر بروز بیماری دیابت

سطح معنی‌داری	OR (95% CI)	کنترل تعداد (درصد)	بیمار تعداد (درصد)	ژنوتیپ
-	1	(316)62	(2915)58	GG
0/472	1/18 (0/751 - 1/855)	(49)96	(5327)106	AG
0/958	0/985 (0/550 - 1/762)	(194)38	(17/58)35	AA
-	1	(56/12)220	(55/77)222	آلل
0/923	1/014 (0/766 - 1/434)	(43/88)172	(44/23)176	A

Ratio; CI, confidence interval.

جدول شماره 4: ارتباط پلی مورفیسم G>A rs4541843 با سن بروز بیماری دیابت (در جمعیت بیمار برای افرادی که اطلاعات سن آن‌ها در دسترس بود)

سطح معنی‌داری	OR (95% CI)	50< تعداد (درصد)	50> تعداد (درصد)	ژنوتیپ
-	1	(31)11	(26)9	GG
0/822	0/882 (0/278 - 2/803)	(50)15	(48)17	AG
0/758	1/222 (0/341 - 4/381)	(29)9	(26)9	AA
-	1	(53)37	(50)35	آلل
0/735	0/892 (0/460 - 1/731)	(47)33	(50)35	A

جدول شماره 5: ارتباط فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم G>A rs4541843 با بروز بیماری دیابت به تفکیک جنسیت

سطح معنی‌داری	OR (95% CI)	کنترل تعداد (درصد)	بیمار تعداد (درصد)	ژنوتیپ (نژاد)
-	1	(31)39	(29)36	GG
0/667	0/862 (0/437 - 1/698)	(52)66	(52)65	AG
0/572	0/808 (0/385 - 1/694)	(17)21	(19)24	AA
-	1	(31)19	(31)21	ژنوتیپ (مردان)
0/096	2/262 (0/866 - 5/906)	(45)28	(59)38	GG
0/247	1/842 (0/655 - 5/178)	(24)15	(10)9	AG
				AA

- diabetes mellitus: emerging role in maternal metabolic regulation. *Curr Diab Rep* 2017; 17(5): 35.
- Hudson MB, Rahnert JA, Zheng B, Woodworth-Hobbs ME, Franch HA, Russ Price S. miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 307(4): C314-C319.
- Rome S. Are extracellular microRNAs involved

- in type 2 diabetes and related pathologies? *Clin Biochem* 2013; 46(10-11): 937-945.
6. Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 23204-23216.
 7. Yu H, Liu Y, Bai L, Kijlstra A, Yang P. Predisposition to Behçet's disease and VKH syndrome by genetic variants of miR-182. *J Mol Med (Berl)* 2014; 92(9): 961-967.
 8. Hu Z, Shu Y, Chen Y, Chen J, Dong J, Liu Y, et al. Genetic Polymorphisms in the Precursor MicroRNA Flanking Region and Non-Small Cell Lung Cancer Survival. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(5): 641-648.
 9. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(1): 308-311.
 10. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1 diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15(7): 539-553.
 11. 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.
 12. Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *Rna* 2006; 12(9): 1626-1632.
 13. Zhou J, Meng Y, Tian S, Chen J, Liu M, Zhuo M, et al. Comparative MicroRNA expression profiles of cynomolgus monkeys, rat, and human reveal that miR-182 is involved in T2D pathogenic processes. *J Diabetes Res* 2014; 2014: 760397.
 14. Wang Y, Zhao X, Wu X, Dai Y, Chen P, Xie L. microRNA-182 mediates Sirt1-induced diabetic corneal nerve regeneration. *Diabetes* 2016; 65(7): 2020-2031.
 15. Zhang D, Li Y, Yao X, Wang H, Zhao L, Jiang H, et al. miR-182 regulates metabolic homeostasis by modulating glucose utilization in muscle. *Cell Rep* 2016; 16(3): 757-768.
 16. Gross D, Van den Heuvel A, Birnbaum M. The role of FoxO1 in the regulation of metabolism. *Oncogene* 2008; 27(16): 2320.
 17. Melkman Zehavi T, Oren R, Kredo Russo S, Shapira T, Mandelbaum AD, Rivkin N, et al. miRNAs control insulin content in pancreatic β cells via downregulation of transcriptional repressors. *EMBO J* 2011; 30(5): 835-845.
 18. Jeon T-I, Esquejo RM, Roqueta-Rivera M, Phelan PE, Moon Y-A, Govindarajan SS, et al. An SREBP-responsive microRNA operon contributes to a regulatory loop for intracellular lipid homeostasis. *Cell Metab* 2013; 18(1): 51-61.