

• 论 著 •

# 血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 联合检测对妊娠期糖尿病的诊断价值

兰 俊, 杨健睿, 张 军, 邢雪梅  
三二〇一医院医学检验科, 陕西汉中 723000

**摘要:**目的 探讨血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 对妊娠期糖尿病的诊断价值。方法 选择 2018 年 5—6 月该院收治的妊娠期糖尿病患者 10 例和妊娠 24~28 周的健康孕妇 10 例, 采用转录组测序技术 (RNA-seq) 分析血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 的相对表达水平。选择 2018 年 5 月至 2020 年 5 月该院收治的妊娠期糖尿病患者 100 例为观察组, 妊娠 24~28 周的健康孕妇 100 例为对照组。通过实时荧光定量 PCR 检测 2 组受试者血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 的相对表达水平。采用受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 分析血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 单独或联合检测对妊娠期糖尿病的诊断价值。结果 RNA-seq 检测结果显示, 10 例妊娠期糖尿病患者血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 的相对表达水平较 10 例健康孕妇高 8 倍以上。观察组血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 的相对表达水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 单独检测对妊娠期糖尿病的诊断灵敏度分别为 95%、97%、94%, 特异度分别为 95%、96%、95%, 血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 联合检测对妊娠期糖尿病的诊断灵敏度为 98%, 特异度为 93%, 准确性为 96%。结论 血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 可作为妊娠期糖尿病的潜在诊断标志物。

**关键词:** miR-16-5p; miR-17-5p; miR-330-3p; 妊娠期糖尿病

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.09.023 **中图法分类号:** R714.25

**文章编号:** 1673-4130(2021)09-1121-04 **文献标志码:** A

## Diagnostic value of combined detection of serum miR-16-5p, miR-17-5p and miR-330-3p in gestational diabetes mellitus

LAN Jun, YANG Jianrui, ZHANG Jun, XING Xuemei

Department of Clinical Laboratory, 3201 Hospital, Hanzhong, Shaanxi 723000, China

**Abstract: Objective** To investigate the diagnostic value of serum miR-16-5p, miR-17-5p and miR-330-3p in gestational diabetes mellitus. **Methods** From May to June 2018, 10 patients with gestational diabetes mellitus and 10 healthy pregnant women (24—28 weeks) were selected in the hospital. The relative expression levels of miR-16-5p, miR-17-5p and miR-330-3p in serum was analyzed by RNA-seq. Totally 100 patients with gestational diabetes mellitus from May 2018 to May 2020 were selected as observation group, and 100 healthy pregnant women (24—28 weeks) were selected as control group. The relative expression levels of miR-16-5p, miR-17-5p and miR-330-3p were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. Receiver operating characteristic curve (ROC curve) was used to analyze the diagnostic efficacy of single or combined detection of serum miR-16-5p, miR-17-5p and miR-330-3p in gestational diabetes mellitus. **Results** The results of RNA-seq showed that the relative expression levels of miR-16-5p, miR-17-5p and miR-330-3p in serum of 10 patients with gestational diabetes mellitus were more than 8 times higher than those of 10 healthy pregnant women. The relative expression levels of miR-16-5p, miR-17-5p and miR-330-3p in the observation group were higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The diagnostic sensitivity of single detection serum miR-16-5p, miR-17-5p and miR-330-3p for gestational diabetes mellitus was 95%, 97% and 94% respectively, and the specificity was 95%, 96% and 95% respectively. The sensitivity, specificity and accuracy of combined detection of serum miR-16-5p, miR-17-5p and miR-330-3p were 98%, 93% and 96%, respectively. **Conclusion** Serum miR-16-5p, miR-17-5p and miR-330-3p can be used as potential diagnostic markers of gestational diabetes mellitus.

**Key words:** miR-16-5p; miR-17-5p; miR-330-3p; gestational diabetes mellitus

**作者简介:** 兰俊, 男, 技师, 主要从事临床检验基础研究。

**本文引用格式:** 兰俊, 杨健睿, 张军, 等. 血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 联合检测对妊娠期糖尿病的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(9): 1121-1124.

妊娠期糖尿病是指任何程度的糖耐量不全,全世界的患病率正在增加,约 7% 的妊娠合并有糖尿病,其主要危险因素有先前的妊娠期糖尿病病史、孕妇年龄的增加和孕前肥胖等<sup>[1-2]</sup>。新近研究表明,微小 RNA (miRNA) 可作为多种疾病诊断、预后和治疗的生物标志物<sup>[3]</sup>。miRNA 在细胞内和细胞外以无细胞循环形式存在于多种不同的生物体液中,包括血清或血浆<sup>[4]</sup>。这些 miRNA 可以与蛋白质结合(无囊泡),也可以保留在膜状囊泡(如脱落的囊泡或外泌体)内部<sup>[5]</sup>。在许多疾病中,已发现 miRNA 在血液中异常表达,有证据表明,miRNA 在病理过程中,特别是包装在外泌体上的细胞间通讯中具有潜在作用<sup>[6]</sup>。本研究检测妊娠期糖尿病患者和妊娠 24~28 周的健康孕妇血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 3 种 miRNA 的相对表达水平,探讨血清 miRNA 对妊娠期糖尿病的诊断价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2018 年 5—6 月本院收治的妊娠期糖尿病患者 10 例(年龄 22~29 岁)和妊娠 24~28 周的健康孕妇 10 例(年龄 23~29 岁),抽取静脉血行转录组测序技术(RNA-seq)检测。选择 2018 年 5 月至 2020 年 5 月本院收治的妊娠期糖尿病患者 100 例为观察组,年龄 22~32 岁,平均(26.12±2.14)岁。妊娠期糖尿病患者纳入标准:(1)符合妊娠期糖尿病诊断标准<sup>[7]</sup>;(2)宫内单活胎;(3)初产妇;(4)孕妇资料完整;(5)空腹血糖 $\geq 5.1$  mmol/L 或餐后 1 h 血糖 $\geq 10.0$  mmol/L 或餐后 2 h 血糖 $\geq 8.5$  mmol/L。另选择同期本院体检的妊娠 24~28 周健康孕妇 100 例为对照组,年龄 22~33 岁,平均(27.26±3.02)岁。排除标准:(1)严重心、肝、肾损伤;(2)服用过内分泌药物;(3)患有肿瘤;(4)患有精神疾病。观察组与对照组年龄、孕周等一般资料比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究经本院伦理委员会审批,受试者均签署知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 RNA-seq 检测** 选取 10 例妊娠期糖尿病患者和 10 例健康孕妇清晨肘前静脉血 5 mL 后使用 Trizol 法提取总 RNA。RNA 标本被送至北京基因组研究所(中国深圳)进行商业性 RNA-Seq 检测和数据分析。使用 SOAPaligner/SOAP2 不匹配,将干净的读段映射到 Human 数据库。计算每个基因的纯净读数,然后将其标准化为每百万分之一读数(kbKM),该读数将读数数与基因相对表达水平相关联。

**1.2.2 RNA 提取与实时荧光定量 PCR 检测** 采集观察组和对照组孕妇的肘前静脉血 5 mL。使用北京润泽康生物科技股份有限公司的 miRNA 提取试剂盒(货号: CW0627)进行血清总 miRNA 的提取。通过广州鲁诚生物科技股份有限公司的 cDNA 合成试剂盒(货号:

11117831001)进行 cDNA 第一链的合成。使用北京依珊汇通科技有限公司的实时荧光定量 PCR 试剂盒(货号: DEM202-50T)进行实时荧光定量 PCR,检测 2 组受试者血清 miR-16-5p、miR-17-5p、miR-330-3p 的相对表达水平。以 U48 作为内参。3 个指标为同一批标本分批检测,去除极大值和极小值保留其余数据。

**1.3 统计学处理** 采用 PRISM7.0 软件进行统计分析,观察组和对照组血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 等计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验。应用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 单独或联合检测妊娠期糖尿病的诊断效能。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 RNA-seq 检测结果** RNA-seq 检测结果显示,10 例妊娠期糖尿病患者血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 的相对表达水平较 10 例健康孕妇高 8 倍以上。

**2.2 观察组与对照组血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 的相对表达水平比较** 观察组血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 的相对表达水平均高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 观察组与对照组血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 的相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	miR-16-5p	miR-17-5p	miR-330-3p
观察组	100	28.12±5.39 <sup>a</sup>	84.41±21.54 <sup>a</sup>	6.54±0.95 <sup>a</sup>
对照组	100	2.84±5.34	8.85±2.59	0.70±0.06

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

**2.3 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 单独检测对妊娠期糖尿病的诊断价值** 以病理结果患有妊娠期糖尿病的孕妇作为真阳性,未患有妊娠期糖尿病的孕妇为真阴性。ROC 曲线结果显示,miR-16-5p 单独检测诊断妊娠期糖尿病的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.95±0.02(95%CI:0.910 5~0.983 5, $P<0.001$ ),当 miR-16-5p 的阳性临界值为 8.842 时,其灵敏度为 95%,特异度为 95%。miR-17-5p 单独检测诊断妊娠期糖尿病的 AUC 为 0.97±0.01(95%CI:0.944 6~0.992 2, $P<0.001$ ),当 miR-17-5p 阳性临界值为 36.000 时,其灵敏度为 97%,特异度为 96%。miR-330-3p 单独检测诊断妊娠期糖尿病的 AUC 为 0.94±0.02(95%CI:0.915 1~0.983 7, $P<0.001$ ),当 miR-330-3p 的阳性临界值为 2.916 时,其灵敏度为 94%,特异度为 95%。见表 2。

**2.4 血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 联合检测对妊娠期糖尿病的诊断价值** 以 miR-16-5p 的阳性临界值为 8.842、miR-17-5p 的阳性临界值为

36.000、miR-330-3p 的阳性临界值为 2.916 作为诊断标准进行联合诊断,三者满足其中之一为阳性定义为联合诊断阳性,反之则为联合诊断阴性。血清 miR-

16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 联合检测诊断妊娠期糖尿病的灵敏度为 98%,特异度为 93%,准确性为 96%。见表 3。

表 2 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 单独检测对妊娠期糖尿病的诊断效能

指标	最佳临界值	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数	AUC( $\bar{x} \pm s$ )	P	95%CI
miR-16-5p	8.842	95	95	0.90	0.95±0.02	<0.001	0.910 5~0.983 5
miR-17-5p	36.000	97	96	0.93	0.97±0.01	<0.001	0.944 6~0.992 2
miR-330-3p	2.916	94	95	0.89	0.94±0.02	<0.001	0.915 1~0.983 7

表 3 血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 联合检测对妊娠期糖尿病的诊断四格表(n)

联合诊断	病理结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	98	2	100
阴性	7	93	100
合计	100	100	200

### 3 讨 论

$\beta$  细胞对外周胰岛素抵抗的适应能力不足,是妊娠中晚期的特征,可能也是妊娠期糖尿病的主要原因,但对这种失败的分子机制研究尚不明确<sup>[6,8]</sup>。在正常妊娠期间,与  $\beta$  细胞肥大和(或)增生相关的胰岛素分泌的补偿性增加可维持葡萄糖稳态,推测胎盘激素等几种分子在这些适应性改变中起着核心作用,促进  $\beta$  细胞必需的基因表达变化,从而满足补偿要求<sup>[9-10]</sup>。此外,这种补偿现象涉及在这些信号分子下游起作用的几种特定的  $\beta$  细胞因子,如转录因子 MafA 和(或)PDX1,它们的表达增强使  $\beta$  细胞表型得以维持<sup>[11]</sup>。

miRNA 是内源性的 19~24 nt 小非编码 RNA,在基因表达的调节中起重要作用。有研究评估了血清 miRNA 在糖尿病中的表达,表明 miRNA 为该组慢性代谢疾病的早期生物标志物<sup>[12]</sup>。事实上,血清中的 miRNA 与  $\beta$  细胞的质量、功能及免疫系统的稳态有关,其无疑是糖尿病发病机制的主要参与者<sup>[11]</sup>。关于妊娠期糖尿病,缺乏定义血清 miRNA 的表达和诊断用途的数据,对 miRNA 功能的理解可以提高对妊娠期糖尿病的病因和病理生理的了解,可比目前的方法更早地诊断妊娠期糖尿病。在本研究中,通过 RNA-seq 检测 10 例妊娠期糖尿病患者和 10 例妊娠 24~28 周的健康孕妇中的 miRNA 相对表达水平,发现妊娠期糖尿病患者血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 的相对表达水平较健康孕妇高 8 倍以上。miR-16-5p 直接靶向血管内皮生长因子 A,该物质已被广泛报道为妊娠期糖尿病的关键介质,并参与内皮细胞的内源性血管生成<sup>[13]</sup>。糖尿病的巨噬细胞条件培养基降低 p21Cip1 和 p27Kip1 的表达,增加 miR-

17-5p 的表达并诱导平滑肌细胞增殖,表明 miR-17-5p 在糖尿病患者的血管并发症中起关键作用<sup>[14]</sup>。SE-BASTIANI 等<sup>[15]</sup> 研究发现,血清 miR-330-3p 可能通过下调 AGTR2 表达来抑制胰腺内分泌或胰腺  $\beta$  细胞新生,从而引起高代谢需求期间内分泌腺再生能力的缺陷。

本研究结果显示,观察组患者血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 的相对表达水平均高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。实际上,通过与 mRNA 非翻译区域中的部分互补位点进行碱基配对,miRNA 可以负调控这些分子的表达和翻译,是基因表达调控的关键因素<sup>[12]</sup>。在本研究中,血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 单独检测诊断妊娠期糖尿病的灵敏度分别为 95%、97%、94%,特异度分别为 95%、96%、95%。血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 联合检测诊断妊娠期糖尿病的灵敏度为 98%,特异度为 93%,准确性为 96%。每个 miRNA 都可能调节多个基因,而一个 miRNA 可以靶向单个基因<sup>[16]</sup>。有研究证明,miRNA 在健康和糖尿病条件下及怀孕期间的  $\beta$  细胞代偿过程中都参与  $\beta$  细胞功能和分化的多方面<sup>[17]</sup>。

综上所述,血清 miR-16-5p、miR-17-5p 和 miR-330-3p 可能参与妊娠期糖尿病的发生、发展。

### 参考文献

- [1] STRUTZ J, CVITIC S, HACKL H, et al. Gestational diabetes alters microRNA signatures in human feto-placental endothelial cells depending on fetal sex[J]. Clin Sci, 2018, 132(22): 2437-2449.
- [2] STIRM L, HUYPENS P, SASS S, et al. Maternal whole blood cell miRNA-340 is elevated in gestational diabetes and inversely regulated by glucose and insulin[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1-12.
- [3] GILLET V, OUELLET A, STEPANOV Y, et al. miRNA profiles in extracellular vesicles from serum early in pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(11): 5157-5169.
- [4] NAIR S, JAYABALAN N, GUANZON D, et al. Human placental exosomes in gestational diabetes mellitus carry a specific set of miRNAs associated with skeletal muscle in-

- sulin sensitivity[J]. *Clin Sci*, 2018, 132(22):2451-2467.
- [5] POIRIER C, DESGAGNÉ V, GUÉRIN R, et al. microRNAs in pregnancy and gestational diabetes mellitus: emerging role in maternal metabolic regulation[J]. *Curr Diab Rep*, 2017, 17(5):35-45.
- [6] LI L, WANG S, LI H, et al. microRNA-96 protects pancreatic  $\beta$ -cell function by targeting PAK1 in gestational diabetes mellitus[J]. *Biofactors*, 2018, 44(6):539-547.
- [7] LEARY J, PETTITT D J, JOVANOVIĆ L. Gestational diabetes guidelines in a HAPO world[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2010, 24(4):673-685.
- [8] WANG P, WANG H, LI C, et al. Dysregulation of microRNA-657 influences inflammatory response via targeting interleukin-37 in gestational diabetes mellitus[J]. *J Cellul Physiol*, 2019, 234(5):7141-7148.
- [9] YAN L, FENG J, CHENG F, et al. Circular RNA expression profiles in placental villi from women with gestational diabetes mellitus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(4):743-750.
- [10] CHEN S H, LIU X N, PENG Y. microRNA-351 eases insulin resistance and liver gluconeogenesis via the PI3K/AKT pathway by inhibiting FLOT2 in mice of gestational diabetes mellitus [J]. *J Cellul Mol Med*, 2019, 23(9):5895-5906.
- [11] HOUSHMAND-OEREGAARD A, SCHRÖLKAMP M, KELSTRUP L, et al. Increased expression of microRNA-15a and microRNA-15b in skeletal muscle from adult offspring of women with diabetes in pregnancy[J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(10):1763-1771.
- [12] IBARRA A, VEGA-GUEDES B, BRITO-CASILLAS Y, et al. Diabetes in pregnancy and microRNAs: promises and limitations in their clinical application[J]. *Non Coding RNA*, 2018, 4(4):32-40.
- [13] DUAN Y R, CHEN B P, CHEN F, et al. Exosomal microRNA-16-5p from human urine-derived stem cells ameliorates diabetic nephropathy through protection of podocyte[J]. *J Cellul Mol Med*, 2019, 6(9):1-16.
- [14] KWON D N, CHANG B S, KIM J H. MicroRNA dysregulation in liver and pancreas of CMP-Neu5Ac hydroxylase null mice disrupts insulin/PI3K-AKT signaling [J]. *BioMed Res Int*, 2014, 8(1):1-12.
- [15] SEBASTIANI G, GUARINO E, GRIECO G E, 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*, 2017, 8(12):345-349.
- [16] WANG X, LI W, MA L, et al. Investigation of miRNA-binding site variants and risk of gestational diabetes mellitus in Chinese pregnant women[J]. *Acta diabetol*, 2017, 54(3):309-316.
- [17] SEBASTIANI G, VALENTINI M, GRIECO G E, et al. microRNA expression profiles of human iPSCs differentiation into insulin-producing cells[J]. *Acta diabetol*, 2017, 54(3):265-281.
- (收稿日期:2020-09-26 修回日期:2021-01-21)
- (上接第 1120 页)
- [13] 曹悦鞍, 盛晓燕, 李丽华, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者血清 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 水平及其与血压的关系[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(12):101-104.
- [14] ELSAID H H, ELGOHARY M N, ELSHABRAWY A M. Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3 a novel adipokine, protect against diabetes mellitus in young adult Egyptians[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(1):434-438.
- [15] LI D, WU Y, TIAN P, et al. Adipokine CTRP-5 as a potential novel inflammatory biomarker in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Medicine*, 2015, 94(36):1503-1507.
- [16] REMELS A H V, GOSKER H R, SCHRAUWEN P, et al. TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype; implications for cachexia[J]. *FASEB J*, 2010, 24(12):5052-5062.
- [17] MANDALIYA H, JONES M, OLDMEADOW C, et al. Prognostic biomarkers in stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC): neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte to monocyte ratio (LMR), platelet to lymphocyte ratio (PLR) and advanced lung cancer inflammation index (ALI) [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2019, 8(6):886-894.
- [18] LI W, TAO L, LU M, et al. Prognostic role of platelet to lymphocyte ratio in pancreatic cancers: a meta-analysis including 3 028 patients[J]. *Medicine*, 2018, 97(8):9616-9620.
- [19] YURTDAS M, YAYLALI Y T, KAYA Y, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio may predict subclinical atherosclerosis in patients with psoriasis[J]. *Echocardiography*, 2014, 31(9):1095-1104.
- [20] OZYILMAZ S, AKGUL O, UYAREL H, et al. The importance of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Rev Port Cardiol*, 2017, 36(4):239-246.
- [21] SAKURAI K, CHUBACHI S, IRIE H, et al. Clinical utility of blood neutrophil-lymphocyte ratio in Japanese COPD patients[J]. *BMC Pulm Med*, 2018, 18(1):65-69.
- [22] BOZKUS F, DIKMEN N, SAMUR A, et al. Does the neutrophil-to-lymphocyte ratio have any importance between subjects with obstructive sleep apnea syndrome with obesity and without obesity [J]. *Tuberk Toraks*, 2018, 66(1):8-15.
- (收稿日期:2020-07-18 修回日期:2021-01-10)