

# miR93 和 miR21 联合检测对 2 型糖尿病视网膜病变进展的预测价值

马宇<sup>1</sup>, 周利晓<sup>1</sup>, 刘意<sup>2</sup>, 武卫<sup>3</sup>

引用: 马宇, 周利晓, 刘意, 等. miR93 和 miR21 联合检测对 2 型糖尿病视网膜病变进展的预测价值. 国际眼科杂志 2019; 19(9): 1550-1553

基金项目: 河南省医学科技攻关计划 (No. 201503131, 2017T02045)

作者单位: <sup>1</sup>(450052) 中国河南省郑州市, 郑州大学第五附属医院眼科; <sup>2</sup>(451460) 中国河南省郑州市, 郑州铁路职业技术学院医学技术与工程学院; <sup>3</sup>(450000) 中国河南省郑州市, 郑州大学第二附属医院血库

作者简介: 马宇, 副主任医师, 研究方向: 眼科临床。

通讯作者: 周利晓, 博士, 主任医师, 研究方向: 眼科基础与临床. zhoulixiao@126.com

收稿日期: 2019-03-13 修回日期: 2019-08-12

## 摘要

目的: 分析血浆微小核糖核酸(miR)-93 和 miR21 联合检测对 2 型糖尿病视网膜病变(DR) 进展的预测价值。

方法: 选取本院 2013-06/2014-06 收治的 2 型 DR 患者 76 例, 根据随访结果, 将患者分成 DR 非进展组(34 例) 和 DR 进展组(42 例), 另选取 45 例健康体检者为对照组。检测三组血清中 miR93 和 miR21 水平的变化; 分析 DR 患者预后的独立危险因素; 分析其对患者预后的预测价值。

结果: DR 进展组患者血清中 miR93 和 miR21 水平明显高于 DR 非进展组和对照组(均  $P < 0.01$ ); 二者可作为影响 DR 患者病情进展的独立危险因素; 两者联合检测曲线下面积、特异度与敏感度均高于单独检测( $P < 0.05$ )。

结论: miR93 和 miR21 在 DR 患者血清中增高, 影响 DR 患者病情进展。

关键词: miR93; miR21; 2 型糖尿病; 视网膜病变; 预后

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.9.24

## Prediction of retinopathy in type 2 diabetes mellitus by combined detection of microRNA93 and microRNA21

Yu Ma<sup>1</sup>, Li-Xiao Zhou<sup>1</sup>, Yi Liu<sup>2</sup>, Wei Wu<sup>3</sup>

Foundation items: Henan Medical Science and Technology Program (No.201503131, 2017T02045)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China;

<sup>2</sup>School of Medical Technology and Engineering, Zhengzhou Railway Vocational and Technical College, Zhengzhou 451460, Henan Province, China; <sup>3</sup>Blood Bank, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Correspondence to: Li-Xiao Zhou. Department of Ophthalmology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zhoulixiao@126.com

Received: 2019-03-13 Accepted: 2019-08-12

## Abstract

• AIM: To analyze the predictive value of combined detection of plasma microRNA-93 (miR-93) and microRNA-21 (miR-21) in the progression of type 2 diabetic retinopathy (DR).

• METHODS: Totally 76 patients with type 2 diabetic retinopathy admitted to our hospital from June 2013 to June 2014 were divided into DR non-progressive group (34 cases) and DR progressive group (42 cases) according to the follow-up results, and 45 healthy people were selected as the control group. The serum levels of miR93 and miR21 in three groups were detected; the independent risk factors of prognosis in DR patients were analyzed; and the predictive value of miR93 and miR21 in DR patients was analyzed.

• RESULTS: The serum levels of miR93 and miR21 in DR progressive group were significantly higher than those in non-progressive group and control group (all  $P < 0.01$ ); both of them could be used as independent risk factors affecting the progress of DR patients; the area, specificity and sensitivity under the combined detection curve were higher than those of single detection ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: The serum levels of miR93 and miR21 are increased in DR patients, which can affect the progress of DR patients, and can be used as biomarkers for the diagnosis of DR.

• KEYWORDS: miR93; miR21; type 2 diabetes mellitus; retinopathy; prognosis

Citation: Ma Y, Zhou LX, Liu Y. Prediction of retinopathy in type 2 diabetes mellitus by combined detection of microRNA93 and microRNA21. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(9): 1550-1553

## 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病微血管病变的重要表现,是糖尿病患者致死致残的主要原因,临床常表现为视物模糊、视力下降、失明等,是中老年常见的致盲眼病,严重影响全球成千上万人的生活质量<sup>[1]</sup>。流行病学显示,在我国糖尿病病史 20a 的患者患病率几乎为 100%,其发病机制尚未明确,且临床无有效治愈方法,因此寻找 DR 发生早期诊断标志物并及时治疗是延缓其进展的关键所在<sup>[2]</sup>。微小核糖核酸(microRNA,

表1 三组一般资料和生化指标比较

指标	DR 进展组	DR 非进展组	对照组	$\chi^2/F/t$	<i>P</i>
性别(男/女,例)	27/15	18/16	23/22	1.736	0.419
年龄( $\bar{x}\pm s$ ,岁)	59.21±8.23	60.85±7.47	53.12±9.23	1.020	0.364
病程( $\bar{x}\pm s$ ,a)	14.37±8.75	10.25±4.74	-	0.547	0.585
BMI( $\bar{x}\pm s$ ,kg/m <sup>2</sup> )	22.75±2.51	22.36±2.41	22.93±2.84	0.470	0.626
FPG( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	9.25±1.56 <sup>b,d</sup>	7.17±0.83 <sup>b</sup>	4.76±0.69	180.71	<0.001
HbA1c( $\bar{x}\pm s$ ,%)	7.85±0.69 <sup>b,d</sup>	5.89±0.58 <sup>b</sup>	4.16±0.41	459.15	<0.001
TC( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	4.27±0.85	4.16±1.04	4.08±0.84	0.480	0.619
TG( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	1.51±0.39	1.48±0.42	1.47±0.51	0.060	0.940
LDL-C( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	3.23±0.51	3.18±0.52	3.13±0.46	0.440	0.643

注:对照组:健康体检者。<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组;<sup>d</sup>*P*<0.01 vs DR 非进展组。

miRNA)是在真核生物中发现的一类具有调控功能的小分子非编码单链RNA,其作为调控细胞功能的关键因子,参与炎症的发生与发展过程,大量研究表明诸多疾病患者血液中存在miRNAs的特异性表达,并与眼底肿瘤的发生和发展关系密切。miR93和miR21作为具有炎性作用的多功能分子,其异常表达参与了糖尿病、冠心病、血管内皮细胞损伤等诸多慢性低度炎症性疾病<sup>[3-4]</sup>。有学者研究发现,miR93和miR21在眼部疾病中异常表达,对眼部疾病的早期诊断具有高度特异度和敏感度<sup>[5]</sup>。但国内关于miR93和miR21联合检测在DR患者发病机制的参与和调控作用的报道较少,因此本研究通过检测DR患者血清中miR93和miR21的表达变化,探讨两指标联合检测在DR病变进展中的预测价值,为临床新的治疗提供理论依据。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 选取本院2013-06/2014-06收治的2型DR患者(T2DM)76例,其中男45例,女31例,年龄59.41±7.52岁,T2DM病程15.7±9.2a。入组标准:(1)符合WHO1999年T2DM诊断标准,符合DR国际临床分级标准<sup>[6]</sup>;(2)年龄≤80岁;(3)体质指数(BMI)≤24kg/m<sup>2</sup>者;(4)入院前无眼部外伤和手术史;(5)患者和家属知情同意并配合治疗者。排除标准:(1)合并严重肝肾功能不全者;(2)合并急慢性感染、风湿结缔组织疾病者;(3)合并其他恶性肿瘤者;(4)合并大血管和微血管病变者;(5)接受新生血管药物治疗及有眼部手术史者;(6)患者研究中途退出,导致临床数据缺失者。根据4a随访结果,依据DR有无进展,将患者分成DR非进展组(34例)和DR进展组(42例),另选取45例在我院健康体检者为对照组。本研究经医院伦理会知情批准及受试者同意。

## 1.2 方法

**1.2.1 DR检测方法** 采用免散瞳眼底摄片法(免散瞳眼底照相机)进行视野眼底照片。由2名经验丰富未知患者信息的眼科医生分别进行读片。根据DR的国际临床分级标准,将DR按照严重程度分为2组:(1)非增殖性DR(NPDR),包括轻度、中度、重度的NPDR;(2)增殖性DR(PDR)。DR进展的定义为由较轻病情向较重病情发展;非进展表示基线和4a随访时患者的DR严重程度无明显进展。

**1.2.2 生物指标检测** 收集所有研究对象性别、年龄、BMI等一般资料。生化指标检测:收集所有患者入院后第2d晨起空腹静脉血5mL,对照组研究对象为体检时静脉

表2 各组血清中miR93和miR21表达量的变化  $\bar{x}\pm s$ 

组别	例数	miR93	miR21
DR 进展组	42	1.95±0.38 <sup>b,d</sup>	1.98±0.40 <sup>b,d</sup>
DR 非进展组	34	1.10±0.15	1.20±0.21
对照组	45	1.05±0.11	1.12±0.19
<i>F</i>		18.707	11.920
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:对照组:健康体检者。<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组;<sup>d</sup>*P*<0.01 vs DR 非进展组。

血,经离心后分离血清,采用免疫比浊法检测糖化血红蛋白(hemoglobin A1c,HbA1c)水平,采用全自动生化检验分析仪检测所有研究对象总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglycerin,TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)等血脂水平,采用血糖仪检测空腹血糖(fasting plasma glucose,FPG)水平。

**1.2.3 miRNA逆转录实时荧光定量PCR检测** 采用总RNA提取试剂Trizol从100μL血清中提取总RNA,在荧光定量PCR仪上进行实时荧光定量PCR反应,检测血清中miR93和miR21水平的变化。以U6 snRNA为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算miRNA相对表达量水平,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{U6}$ 。

统计学分析:全部数据采用SPSS20.0软件包进行分析,计数资料采用卡方检验,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,正态分布计量资料采用单因素方差分析,SNK-*q*法对组间进行两两比较,采用COX回归分析影响DR患者预后的独立危险因素;采用ROC曲线分析独立危险因素对患者预后的预测价值。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 三组一般资料和生化指标比较** 三组研究对象在年龄、性别、BMI方面比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05)。三组TC、TG、LDL-C等生化指标比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05),DR非进展组和DR进展组患者HbA1c及FPG水平较对照组明显升高,差异均有统计学意义(*P*<0.01),且DR进展组明显高于DR非进展组(*P*<0.01,表1)。

**2.2 各组血清中miR93和miR21表达量的变化** DR进展组患者血清中miR93和miR21水平较DR非进展组、对照组明显增高,差异有统计学意义(*P*<0.01);DR非进展组miR93和miR21水平略高于对照组,但差异无统计学意义(*P*>0.05,表2)。

**2.3 影响DR患者病变的独立危险因素** COX回归分析

表3 COX 回归分析影响 DR 患者病变的独立危险因素

指标	危险比(HR)	回归系数(B)	标准误(SE)	Wald	P	95%置信区间	
						上部	下部
性别	1.210	-0.039	0.089	0.178	0.648	1.324	0.692
年龄	1.037	-0.050	0.039	1.140	0.259	1.178	0.925
BMI	1.240	0.081	0.051	1.879	0.216	1.753	0.717
FPG	1.598	1.597	0.060	2.817	0.102	3.175	0.784
HbA1c	1.610	0.070	0.051	2.187	0.162	2.654	0.659
TC	1.731	0.097	0.049	3.240	0.071	2.772	0.750
TG	0.914	0.104	0.316	6.626	0.697	1.437	0.581
LDL-C	1.642	0.073	0.057	2.461	0.097	1.713	0.766
miR93	2.704	1.317	0.579	9.147	<0.001	4.625	2.026
miR21	2.052	0.728	0.358	8.416	<0.001	3.714	1.517

表4 miR93 和 miR21 单独与联合检测对 DR 进展的预测价值

指标	特异度(%)	敏感性(%)	曲线下面积
miR93	81	89	0.883(0.813~0.950)
miR21	71	90	0.845(0.769~0.914)
miR93+miR21	87	92	0.946(0.857~0.993)

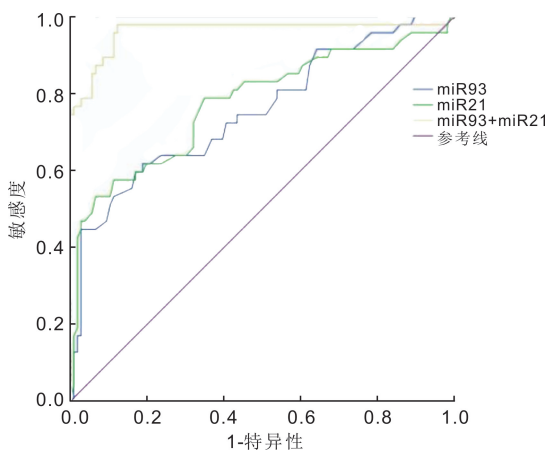


图1 miR93 和 miR21 单独与联合检测预测 DR 进展的 ROC 曲线。

结果显示,患者血清 miR93 和 miR21 水平是 DR 进展的独立危险因素(表3)。

2.4 miR93 和 miR21 单独与联合检测评估 DR 预后的价值 ROC 曲线分析结果显示,miR93 和 miR21 联合检测曲线下面积、特异度与敏感度均高于单独检测,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表4,图1)。

### 3 讨论

DR 是糖代谢异常造成的眼部疾病,在我国随着糖尿病发病率的提高,DR 的发生率与致盲率也呈上升趋势,其发病率是一般人群的 25 倍,DR 可造成黄斑水肿、玻璃体出血,导致患者视力下降、视物变形,严重威胁着患者生存质量<sup>[7-8]</sup>。目前 DR 发病机制尚未完全明确,诸多学者认为与自然免疫和炎症损伤密切相关。

近年来炎症反应与血管病变间的关系已成为临床学者关注的重点,miR93 和 miR21 作为炎症反应的调节因子,在 DR 病情进展中,可能与患者血管内皮功能障碍和血管综合征的发生有关<sup>[9]</sup>。在 PDR 中,与血管生成和纤维化相关的几个小 RNA 的表达显著较高<sup>[10]</sup>。miR93

和 miR21 参与糖尿病微血管病变的发生机制,国外有学者通过动物实验模型发现<sup>[11-12]</sup>,在 DR 大鼠模型中内皮细胞的 miR93 和 miR21 表达显著高于对照组,其可进一步激活炎症介质通路,促进血管炎症的发生,其可通过诱导细胞分化和调节炎症反应参与 DR 的进展<sup>[13]</sup>,有研究显示,miR93 和 miR21 参与糖尿病微血管病变的发生发展,且不同病变程度患者其表达量不尽相同<sup>[14]</sup>。血浆中 miR-93 在 DR 患者中异常高表达,并与 DR 患者的增生膜活力及进展相关<sup>[15]</sup>,miR93 发挥作用的机制可能为其靶基因血管内皮生长因子 A,在血管生成及维持毛细血管完整性方面具有重要意义<sup>[16]</sup>。又有资料显示,miR93 可通过抑制整合素  $\beta$ -8 的表达,进一步证实其在病变组织血管生成和肿瘤生长等方面的作用<sup>[17]</sup>。有研究表明 miR-21 的表达与病程、HbA1c、FPG 和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)呈正相关。多元线性回归分析证实,病程、HbA1c、FPG 和 HOMA-IR 均是影响血浆 miR-21 表达的主要因素<sup>[18]</sup>,提示 miR-21 可能参与到糖代谢过程之中。

本研究结果显示,DR 进展组患者血清中 miR93 和 miR21 水平明显高于 DR 非进展组与对照组,说明血清中 miR93 和 miR21 在 DR 患者中异常高表达,并与 DR 进展具有明显相关性。本研究通过 COX 回归分析结果显示,患者血清 miR93 和 miR21 水平是影响 DR 患者病情进展的独立危险因素。为明确 miR93 和 miR21 对 DR 进展的预测价值,本研究绘制了 ROC 曲线,结果显示 miR93 和 miR21 联合检测曲线下面积(0.946)、特异度(95%)及敏感度(96%)均高于单独检测,这提示 miR93 和 miR21 联合检测可明显提高对 DR 进展的预测价值。

综上所述,miR93 和 miR21 在 DR 进展期患者血清中水平异常增高,是影响 DR 患者病情进展的独立危险因素,两者联合检测可明显提高对 DR 患者病情的预测价值。

### 参考文献

- Gargeya R, Leng T. Automated Identification of Diabetic Retinopathy Using Deep Learning. *Ophthalmology* 2017;124(7):962-969
- Gulshan V, Peng L, Coram M, et al. Development and Validation of a Deep Learning Algorithm for Detection of Diabetic Retinopathy in Retinal Fundus Photographs. *JAMA* 2016;316(22):2402

- 3 陈淑惠,孟倩丽,张敏,等. 2型糖尿病视网膜病变与糖尿病其他并发症的相关性. 国际眼科杂志 2016;16(2):309-312
- 4 时美红,丁加伟. 血清 Apelin、Chemerin 及 Fetuin-A 联合检测用于糖尿病肾病早期诊断的敏感性与特异度分析. 河北医科大学学报 2018;39(4):454-458
- 5 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版). 中国糖尿病杂志 2014;30(10):893-942
- 6 Freiberg FJ, Maximilian P, Juliana W, et al. Optical coherence tomography angiography of the foveal avascular zone in diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016; 254 ( 6 ): 1051-1058
- 7 Mei XY, Zhou LY, Zhang TY, et al. Scutellaria barbata attenuates diabetic retinopathy by preventing retinal inflammation and the decreased expression of tight junction protein. *Int J Ophthalmol* 2017; 10 ( 6 ): 870-877
- 8 Motawi TK, Mahdy SG, El-Sawalhi MM, et al. Serum Levels of Chemerin, Apelin, Vaspin and Omentin-1 in Obese Type 2 Diabetic Egyptian Patients with Coronary Artery Stenosis. *Can J Physiol Pharmacol* 2017;96(1):38
- 9 杨波,杨孟雪,高琳,等. 血清 Chemerin 水平与 2 型糖尿病合并大血管病变及腰身比的相关性研究. 中国糖尿病杂志 2016;24(4):304-308
- 10 Hirota K, Keino H, Inoue M, et al. Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253(3):335-342
- 11 Xiong SQ, Jiang HB, Xu HZ, et al. Effect of pyridone agent on blood-retinal barrier in diabetic mice. *Int J Ophthalmol* 2017; 10 ( 6 ): 890-895
- 12 Tălu S, Călugăru DM, Lupașcu CA, et al. Characterisation of human non-proliferative diabetic retinopathy using the fractal analysis. *Int J Ophthalmol* 2015;8(4):770-776
- 13 范玉娟,李雪松,张钰,等. 2 型糖尿病患者颈动脉粥样硬化与血清 Apelin 水平的关系. 临床内科杂志 2016;33(10):695-696
- 14 Jiang Q, Lv XM, Yuan Y, et al. Plasma miR-21 expression: an indicator for the severity of Type 2 diabetes with diabetic retinopathy. *Biosci Rep* 2017;37(2):1-10
- 15 李雷,唐平. 糖尿病视网膜病变患者血浆中 miR-21、miR-93 的水平变化及临床意义. 山东医药 2018;58(45):43-46
- 16 Novakova V, Sandhu GS, Dragomir-Daescu D, et al. Apelinergic system in endothelial cells and its role in angiogenesis in myocardial ischemia. *Vascul Pharmacol* 2016;76:1-10
- 17 İnci S, Aksan G, Doğan P. Chemerin as an independent predictor of cardiovascular event risk. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2016;7(2):57-68
- 18 Chen Q, Qiu F, Zhou K, et al. Pathogenic Role of microRNA-21 in Diabetic Retinopathy Through Downregulation of PPAR $\alpha$ . *Diabetes* 2017; 66(6):db161246