

## 血浆外泌体miRNAs与妊娠期糖尿病的关系

叶志鑫<sup>1</sup>, 陈渡波<sup>2</sup>, 陈培松<sup>2</sup>, 林穗雯<sup>1</sup>, 黄晓晴<sup>1</sup>, 李诗琪<sup>1</sup>, 刘斌<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第一医院妇产科, 广东广州 510080; 2. 中山大学附属第一医院检验科, 广东广州 510080)

**摘要:**【目的】研究外泌体中糖尿病相关的微RNA(miRNA)在妊娠期糖尿病(GDM)孕妇血浆中的表达情况并探讨其与GDM发病机制的关系。【方法】本研究在基因表达汇编(GEO)数据库中检索到糖尿病相关的miRNAs芯片数据集,采用GEO2R筛选数据集中表达上调或下调的miRNAs,选取在2个或以上数据集中变化一致的miRNAs作为糖尿病相关的miRNAs。研究纳入孕龄在10~16周的单胎孕妇,随访至24~28周,根据口服葡萄糖耐量试验(OGTT)结果将其分为GDM组和正常糖耐量(NGT)组,采用实时定量RT-PCR检测两组孕妇在妊娠早期血浆外泌体中糖尿病相关miRNAs的表达情况,采用受试者工作特征(ROC)曲线检测miRNAs的早期预测效能。采用京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析揭示差异表达miRNAs的功能。【结果】从GEO数据库中下载的与糖尿病相关的芯片数据集包括GSE94649、GSE21321、GSE98043、GSE148961、GSE27645,分析发现10个与糖尿病有关的差异表达miRNAs,其中上调的有7个,下调的有3个。实时定量RT-PCR结果表明与NGT组相比,妊娠早期GDM孕妇血浆外泌体中hsa-miR-188-5p、hsa-miR-663a、hsa-miR-135a-5p和hsa-miR-4707-5p表达上调,4种miRNAs联合预测GDM的曲线下面积(AUC)为0.839(95% CI 0.724~0.954)。KEGG富集分析结果显示miR-135a-5p的靶基因参与胰岛素信号通路。【结论】GDM孕妇血浆外泌体中差异表达的miRNAs可作为GDM潜在的预测因子,其中上调的miR-135a-5p可能参与胰岛素信号通路的调控。

**关键词:**妊娠期糖尿病;microRNA;外泌体

中图分类号:R714.25

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2021)03-0381-11

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2021.0108

### Association of Plasma Exosomal miRNAs with Gestational Diabetes Mellitus

YE Zhi-xin<sup>1</sup>, CHEN Du-bo<sup>2</sup>, CHEN Pei-song<sup>2</sup>, LIN Sui-wen<sup>1</sup>, HUANG Xiao-qing<sup>1</sup>, LI Shi-qi<sup>1</sup>, LIU Bin<sup>1</sup>  
(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China.)

Correspondence to: LIU Bin, E-mail: liubn@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To investigate the expression of diabetes related microRNA (miRNA) in plasma exosomes of pregnant women complicated with gestational diabetes mellitus (GDM) and to study their association with the pathogenesis of GDM.【Methods】In this study, diabetes related miRNAs microarray data sets were searched through Gene Expression Omnibus (GEO) database, and screened by GEO2R to determine the candidate miRNAs. Differentially expressed miRNAs were selected if the change is consistent in more than one microarray data sets. Singleton pregnant women within 10-16 gestational weeks (gws) were included and their plasma was obtained for further analysis. In 24~28 gws, oral glucose tolerance tests (OGTT) were performed to diagnose GDM or normal glucose tolerance (NGT). Diabetes related miRNAs expression in plasmatic exosomes was compared between GDM and NGT groups by RT-PCR. Receiver operating characteristic (ROC) curve was applied to assess the predictive efficiency of miRNAs. Finally, Kyoto Encyclopedia of Genes and

收稿日期:2021-01-23

基金项目:国家自然科学基金(81771602);广东省自然科学基金(2017A030313826);中山大学5010临床医学研究项目(2016014)

作者简介:叶志鑫,硕士生,研究方向:妊娠期糖尿病,E-mail:yezhi8@mail2.sysu.edu.cn;刘斌,通信作者,副主任医师,研究方向:妊娠期糖尿病,E-mail:liubn@mail.sysu.edu.cn

Genomes (KEGG) pathway analysis was used to reveal the function of miRNAs.【Results】 Five diabetes related microarray datasets were downloaded from GEO database, including GSE94649, GSE21321, GSE98043, GSE148961 and GSE27645. Ten differentially expressed miRNAs were found, among which seven were up-regulated and three were down-regulated. RT-PCR results showed that, compared with NGT group, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-663a, hsa-miR-135a-5p and hsa-miR-4707-5p in plasma exosomes of GDM pregnant women were up-regulated. The area under the ROC curve (AUC) of these four miRNAs for GDM prediction was 0.839 (95%CI: 0.724~0.954). The target genes of miR-135a-5p were involved in insulin signaling pathways.【Conclusions】 Differentially expressed exosomal miRNAs in GDM plasma act as potential predictors of GDM. Among them, miR-135a-5p mainly participates in insulin signaling pathways.

**Key words:** gestational diabetes mellitus; microRNA; exosomes

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2021, 42(3): 381-391]

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 是妊娠期间首次发生或者确诊的糖耐量异常状态, 发病率逐年增高<sup>[1]</sup>, 对孕产妇和子代造成各种近期和远期不良影响<sup>[2]</sup>。早期筛查和及时干预对改善 GDM 母儿结局有重要意义<sup>[3-5]</sup>。外泌体 (exosomes) 可以携带微 RNA (microRNA, miRNA)、长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)、蛋白质等作用于受体细胞<sup>[6]</sup>, 在细胞间信号传递中发挥作用<sup>[7]</sup>, 具有成为疾病诊断和早期预测生物标记物的可能<sup>[8-9]</sup>。既往研究发现, 在不同妊娠阶段, GDM 与正常糖耐量 (normal glucose tolerance, NGT) 孕妇循环中外泌体的水平和生物活性均存在差异<sup>[10]</sup>, 但是外泌体内 miRNAs 的表达变化及与 GDM 发病机制间的关系尚未完全阐明。本研究拟采用生物信息学分析的方法寻找与糖尿病相关的 miRNAs, 探讨其在 GDM 患者血浆外泌体中的表达水平, 进而揭示外泌体 miRNAs 与 GDM 发生发展的关系并探讨其早期预测价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

研究纳入 2019 年 1 月至 2020 年 3 月于中山大学附属第一医院产检, 且孕龄在 10~16 周的单胎孕妇。采集入组时的外周血, 分离血浆后冻存于 -80 °C 冰箱备用。排除标准为: ①孕前患 1 型或 2 型糖尿病; ② 双胞胎妊娠孕妇。入组孕妇随访至孕 24~28 周, 根据口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance tests, OGTT) 结果, 分为 GDM 组和 NGT 组。GDM 的诊断按 IADPSG 标准, 即孕妇在妊娠 24~28 周, 空腹 8 h 或以上行 75 g OGTT, 空腹及服糖后 1、

2 h 的血糖值分别为 5.1、10.0、8.5 mmol/L, 任何一点血糖值达到或超过上述标准即诊断为 GDM。本研究经中山大学附属第一医院伦理委员会审批 (伦审 [2017]253 号), 入组患者均签署知情同意书。

### 1.2 数据获取及表达分析

以“microRNA”、“miRNA”、“diabetes”和“Homo sapiens”为检索词从 GEO 数据库中 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 检索糖尿病相关的芯片数据集。采用 GEO2R 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) 分析各个数据集的差异表达 miRNAs, 以差异倍数 > 1.3 或 < -1.3,  $P < 0.05$  为筛选条件确定差异表达 miRNAs。对数据集中获得的差异表达 miRNAs 分别绘制火山图, 并运用 Venn Diagram 对各个数据集筛选得到的上调和下调的 miRNAs 分别取交集, 获得表达一致的上调或下调 miRNAs。

### 1.3 血浆外泌体的分离、鉴定和 miRNAs 提取

用超速离心法和外泌体提取试剂盒 ExoQuick plasma prep and exosome precipitation kit (EXOQ5 TM-1, System bioscience, USA) 从血浆中分离外泌体。超速离心法中, 血浆样本在 4 °C 条件下离心 2 000×g, 30 min; 12 000×g, 45 min; 110 000×g, 2 h; 110 000×g, 2 h 获得外泌体。采用透射电镜 (JEM-1400, JEOL Ltd., Japan) 观察外泌体的形态结构。采用蛋白质免疫印迹检测外泌体特异性标志蛋白 TSG101 (ab125011, Abcam, UK) 和 CD63 (25682-1-AP, Proteintech, USA)。采用 Nanosight NS300 (Malvern Instruments, UK) 对外泌体进行纳米颗粒追踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA)。

用 miRNeasy Mini Kit (No. 217004, QIAGEN, Germany) 提取外泌体 miRNA。在 miRNA 提取过程

中加入秀丽隐杆线虫 cel-miR-39-3p (Ribobio, China) 作为外参。使用 Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit (No.638313, Takara, Japan) 将 miRNA 逆转录成 cDNA, 用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH plus) (No.RR820A, Takara, Japan) 进行实时定量 RT-PCR 反应。miRNA 的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法进行计算。

#### 1.4 miRNAs 靶基因预测及功能富集分析

用 miRDB、Tarbase 8.0 和 TargetScan 7.2 三个数据库预测 miRNAs 的靶基因, 任意两个数据库能同时预测到的靶基因用 Cytoscape 软件进行可视化。以 Homo sapiens 为背景, 对预测得到的 miRNAs 靶基因进行京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路富集分析。

#### 1.5 统计学方法

采用 R 3.6.0 进行统计学分析。定量资料若服从正态分布则采用均数±标准差进行描述, 采用两独立样本 *t* 检验进行两组间均数比较。采用 Pearson 相关分析 miRNAs 表达与血糖血脂水平的相关关系。定性资料采用频率进行描述, 采用  $\chi^2$  检验进行独立的两组二分类变量的比较。采用 logistic 回归模型和受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线检验差异表达 miRNAs 对 GDM 的早期预测效能。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 研究对象基线资料

研究纳入 GDM 组 30 例和 NGT 组 30 例孕妇, 两组孕妇年龄、入组时及 OGTT 时的孕龄、体质量及 BMI 等基线资料的差异无统计学意义。GDM 组 OGTT 空腹、服糖后 1、2 h 血糖值和 HbA1c 均明显高于 NGT 组。两组新生儿性别及体质量的差异无统计学意义 (表 1)。

### 2.2 数据集及差异表达 miRNAs 的筛选

从 GEO 数据库中检索并下载了与糖尿病相关的 5 个芯片数据集 GSE94649、GSE21321、GSE98043、GSE148961、GSE27645。GSE94649 芯片数据集包括 6 例 1 型糖尿病和 6 例正常对照的血清标本; GSE21321 芯片数据集中包含 9 例 2 型糖尿病和 10 例正常对照的血浆标本; GSE98043 芯片数据集中包含 2 例妊娠期糖尿病和 2 例正常妊娠孕妇

的血浆标本; GSE148961 芯片数据集包含 18 例 2 型糖尿病和 12 例对照的血清标本; GSE27645 芯片数据集包含 12 例 2 型糖尿病和 8 例对照的外周血标本。

经过筛选, GSE94649 中分析得到的差异表达 miRNAs 中上调的有 48 个, 下调的有 18 个; GSE21321 中上调的有 11 个, 未得到下调的 miRNA; GSE98043 中上调的有 130 个, 下调的有 227 个; GSE148961 中上调的有 82 个, 下调的有 4 个; GSE27645 中下调的有 74 个, 未得到上调的 miRNA。各个数据集的差异表达 miRNAs 的分布情况见火山图 (图 1A)。

通过 Venn Diagram 将各个数据集的差异表达上调或下调的 miRNAs 分别取交集, 在两个数据集中表达一致的 miRNAs 共 10 个 (图 1B)。

### 2.3 外泌体的鉴定及 miRNAs 表达

分离得到 GDM 组和 NGT 组患者入组时的血浆外泌体, 透射电镜下可观察到外泌体呈中间略微凹陷的盘状结构 (图 2A)。蛋白质免疫印迹结果显示外泌体特异性标志蛋白 TSG101 和 CD63 呈阳性 (图 2B)。外泌体粒径集中在 100~200 nm 间, 平均粒径大小为 145.9 nm (图 2C)。

随后, 在两组患者血浆外泌体中对上述分析得到的 10 个可能与糖尿病有关的差异表达 miRNAs 进行检测。实时定量 RT-PCR 中用到的 miRNAs 引物见表 2。由于芯片数据集分析结果中没有对 hsa-miR-520e-3p/5p 以及 hsa-let-7c-3p/5p 进行区分, 因此我们对 hsa-miR-520e-3p、hsa-miR-520e-5p 以及 hsa-let-7c-3p、hsa-let-7c-5p 同时进行了检测。结果显示, GDM 组孕妇血浆外泌体中 hsa-miR-188-5p ( $2.08 \pm 1.30$  vs.  $1.15 \pm 0.63$ ,  $t = 3.497$ ,  $P < 0.001$ )、hsa-miR-663a ( $2.17 \pm 1.14$  vs.  $1.16 \pm 0.80$ ,  $t = 3.956$ ,  $P < 0.001$ ) 和 hsa-miR-135a-5p ( $1.89 \pm 1.81$  vs.  $1.14 \pm 0.62$ ,  $t = 2.147$ ,  $P = 0.036$ ) 的表达高于 NGT 组, 与芯片数据集分析结果一致。在芯片数据集分析结果中 hsa-miR-4707-5p 在 1 型糖尿病和妊娠期糖尿病中表达下调, 但我们的研究表明 hsa-miR-4707-5p 在妊娠早期 GDM 患者血浆外泌体中的表达高于 NGT 组 ( $1.57 \pm 0.65$  vs.  $1.04 \pm 0.35$ ,  $t = 3.909$ ,  $P < 0.001$ ; 图 3)。我们的结果显示两组孕妇在妊娠早期血浆外泌体中 hsa-miR-320c、hsa-miR-320d、hsa-miR-520e-3p 和 hsa-miR-3135b 的表达差异没有统计学意义 (图 3)。此外, 我们未在

表1 研究对象基线资料。  
Table 1 Basal characteristics between GDM and NGT [( $\bar{x} \pm s$ ), n (%)]

	GDM (n=30)	NGT (n=30)	$t/\chi^2$	$P$
Age/years <sup>1)</sup>	33.63 ± 3.81	33.60 ± 3.70	0.034	0.973
Gestational age/weeks <sup>1)</sup>				
At enrolment	14.33 ± 1.27	14.37 ± 2.21	-0.062	0.950
At OGTT	26.63 ± 1.49	26.20 ± 1.36	1.125	0.265
At delivery	38.87 ± 1.19	39.03 ± 0.86	-0.596	0.554
Weight/kg <sup>1)</sup>				
Pregravid	55.17 ± 7.39	55.94 ± 8.61	-0.354	0.725
At enrolment	56.73 ± 7.52	58.15 ± 8.60	-0.631	0.531
At OGTT	62.75 ± 7.68	63.88 ± 7.68	-0.532	0.597
At delivery	65.73 ± 9.21	68.98 ± 7.99	-1.415	0.163
BMI/(kg/m <sup>2</sup> ) <sup>1)</sup>				
Pregravid	21.83 ± 2.29	21.85 ± 2.45	-0.032	0.974
At enrolment	22.45 ± 2.34	22.66 ± 2.47	-0.321	0.749
At OGTT	24.83 ± 2.28	24.88 ± 1.89	-0.098	0.923
At delivery	25.97 ± 2.80	26.96 ± 2.04	-1.502	0.139
OGTT glucose value/(mmol/L) <sup>1)</sup>				
Fasting	4.63 ± 0.47	4.21 ± 0.21	4.427	<0.001
1 h	9.89 ± 1.64	6.72 ± 1.22	8.509	<0.001
2 h	9.05 ± 1.31	5.99 ± 0.93	10.456	<0.001
HbA1c/% <sup>1)</sup>	5.11 ± 0.27	4.50 ± 0.23	9.355	<0.001
Multiparous <sup>2)</sup>	11 (37.9)	12 (44.4)	0.050	0.823
Cesarean section <sup>2)</sup>	13 (44.8)	11 (40.7)	0.001	0.969
Neonatal				
Male <sup>2)</sup>	12 (41.4)	18 (66.7)	2.650	0.104
Birth weight/kg <sup>1)</sup>	3.18 ± 0.39	3.15 ± 0.44	0.240	0.811

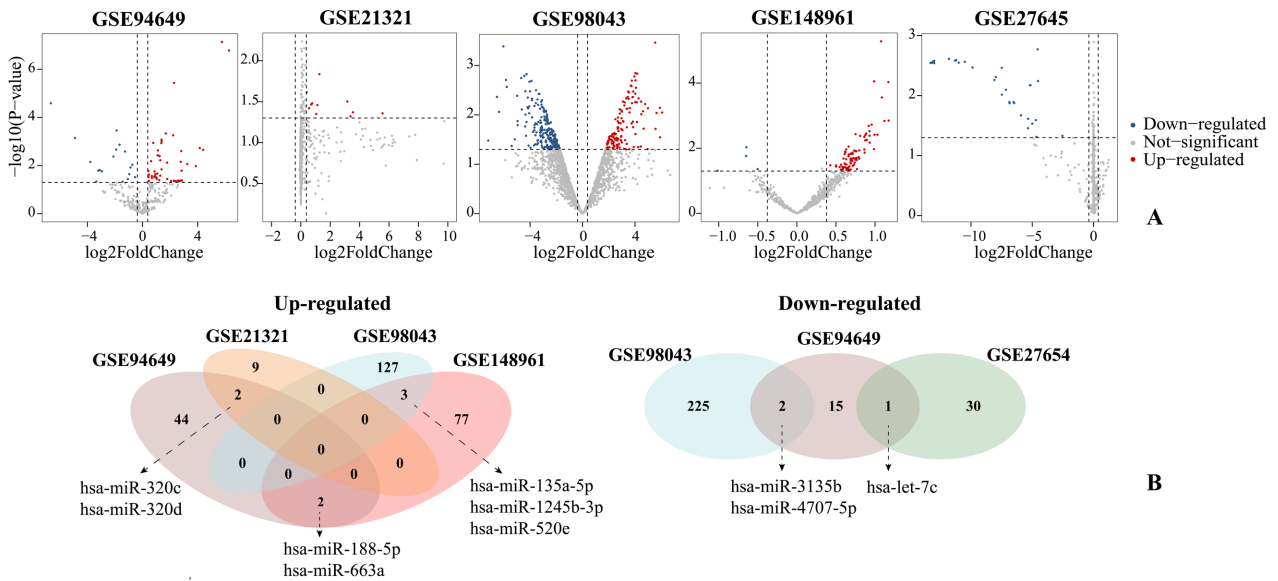
<sup>1)</sup>  $t$  test, test statistics is  $t$ ; <sup>2)</sup>  $\chi^2$  test, test statistics is  $\chi^2$ . GDM: gestational diabetes mellitus; NGT: normal glucose tolerance; OGTT: oral glucose tolerance test; BMI: body mass index; HbA1c: hemoglobin A1c.

妊娠早期孕妇血浆外泌体中检测到 hsa-miR-1245b-3p、hsa-miR-520e-5p、hsa-let-7c-3p 和 hsa-let-7c-5p 的表达。

#### 2.4 miRNAs 靶基因预测及功能富集分析

验证结果表明,与正常孕妇相比,随后发展为 GDM 的孕妇在妊娠早期血浆外泌体中 hsa-miR-188-5p、hsa-miR-663a、hsa-miR-135a-5p 和 hsa-miR-4707-5p 的表达上调。采用 miRDB、Tarbase 8.0 和 TargetScan 7.2 三个数据库预测这 4 个 miRNAs 的靶基因,任意两个数据库能同时预测到的靶基因纳入后续分析,预测结果显示 hsa-miR-188-5p 有 122 个潜在的靶基因,hsa-miR-663a 有 3 个潜

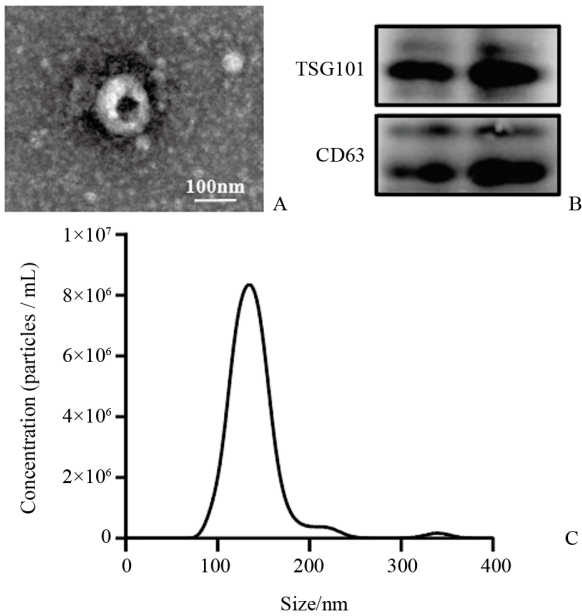
在的靶基因,hsa-miR-135a-5p 有 507 个潜在的靶基因,hsa-miR-4707-5p 有 55 个潜在的靶基因(图 4A)。对上述 4 个 miRNAs 的 687 个靶基因进行 KEGG 信号通路富集分析,选择了校正后  $P < 0.01$  的富集结果,包括 14 条信号通路(表 3),其中涉及的靶基因共 102 个(图 4B)。结果显示,miRNAs 的靶基因与胰岛素信号通路等通路有关,其中 miR-135a-5p 的靶基因 *IRS2*、*PIK3R2*、*AKT3* 等为胰岛素信号通路中的关键因子(表 4)。因此 miR-135a-5p 可能通过调控胰岛素信号通路在 GDM 的发展中发挥重要作用(图 5)。



A: Volcano plot of GSE94649, GSE21321, GSE98043, GSE148961 and GSE27645 microarray data. Red and blue spots represent differentially expressed miRNAs. Red represents up-regulated miRNAs and blue represents down-regulated miRNAs. B: Venn diagrams of up-regulated and down-regulated miRNAs in GSE94649, GSE21321, GSE98043, GSE148961 and GSE27645 microarray data.

图1 差异表达 miRNAs 火山图和韦恩图

Fig. 1 Volcano maps of differentiate expression miRNAs and Venn diagrams of microarray data



A: Under transmission electron microscope, the exosome had a characteristic morphology with central depression. B: The results of Western blotting showed that exosome specific markers TGS101 and CD63 were positive. C: NTA analysis showed that exosomes were about 145.9nm in diameter.

图2 血浆外泌体的特征

Fig. 2 Characteristics of plasma exosomes

表2 miRNA 实时定量 RT-PCR 引物

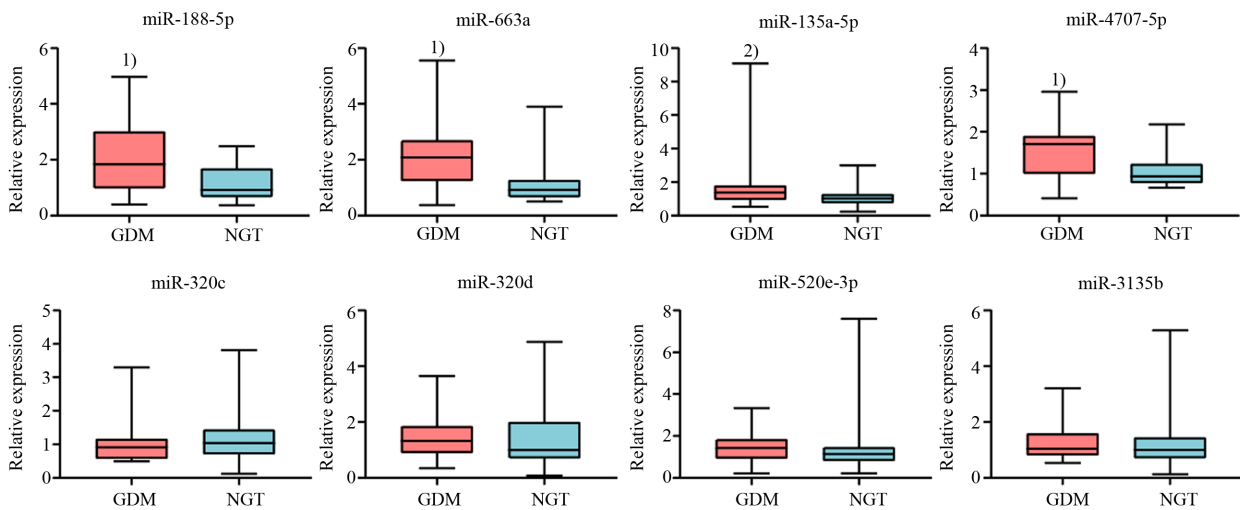
Table 2 Primer sequence for RT-PCR

miRNAs	Forward primer (5'-3')
hsa-miR-188-5p	CATCCCTTGCATGGTGGAG
hsa-miR-663a	AGGCGGGGCGCCGCGGGACCGC
hsa-miR-320c	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGT
hsa-miR-320d	AAAAGCTGGGTTGAGAGGA
hsa-miR-135a-5p	CCCTATGGCTTTTATTCTATGTG
hsa-miR-1245b-3p	CCTCAGATGATCTAAAGGCTATA
hsa-miR-520e-5p	CTCAAGATGGAAGCAGTTTCTG
hsa-miR-520e-3p	AAAGTGCTTCCTTTTGAGGG
hsa-miR-3135b	TATTGGAGCCAGTGCAGTGGT
hsa-miR-4707-5p	TATTCGCGCGGGCGGGTTCT
hsa-let-7c-3p	CTGTACAACCTTCTAGCTTTCC
hsa-let-7c-5p	TGAGGTAGTAGTTGTATGGTT

Universal anti-sense was used for reverse primer.

### 2.5 外泌体 miRNAs 水平与血糖血脂的相关性

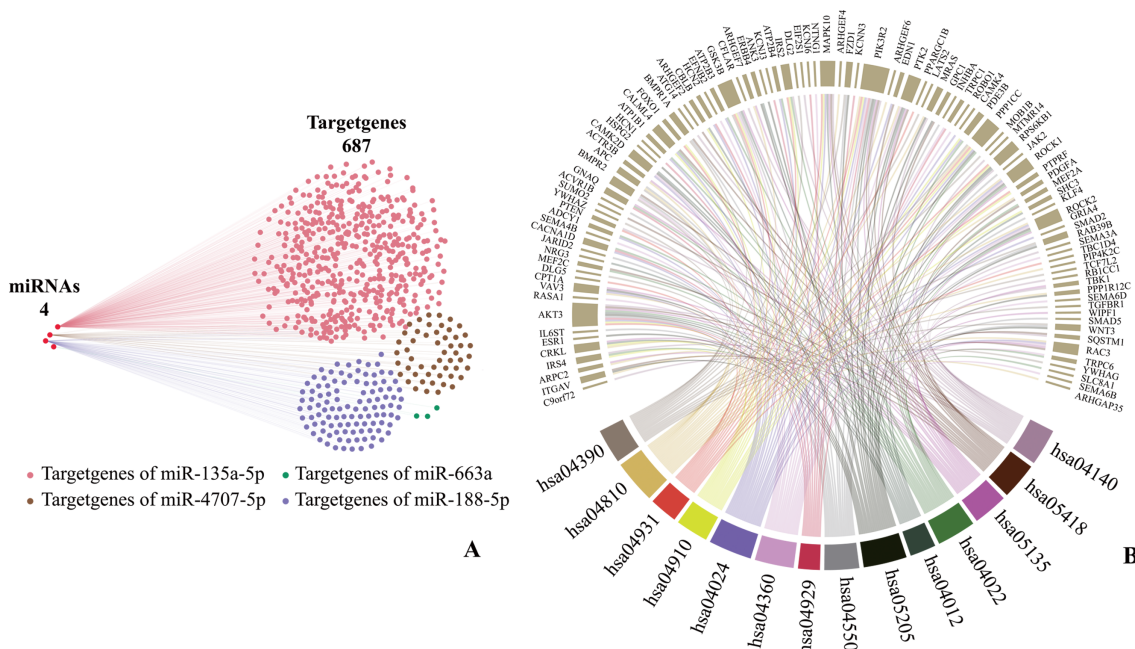
以外泌体 miRNAs 表达情况与入组时和 OGTT 时的血糖血脂水平进行相关性分析。结果显示 miR-188-5p 和 miR-663a 分别与入组时的甘油三酯水平呈正相关关系 ( $P < 0.05$ ), miR-188-5p, miR-663a 和 miR-4707-5p 分别与 OGTT 各时间点的血糖



Relative levels of plasma exosomal miRNAs ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) in GDM group ( $n=30$ ) and NGT group ( $n=30$ ). 1)  $P < 0.001$ ; 2)  $P < 0.05$ .

图3 孕妇早期血浆外泌体 miRNAs 表达水平的比较

Fig. 3 Relative levels of plasma exosome miRNAs in early pregnant women



A: Target genes of miR-135a-5p, miR-4707-5p, miR-663a and miR-188-5p. TargetScan7.2, miRDB and Tarbase8.0 were used to predict potential targets of miRNAs. Target gene that can be predicted by any two of three databases above was included in the analysis; B: KEGG analysis for the potential targets of miR-135a-5p, miR-4707-5p, miR-663a and miR-188-5p.

图4 miRNAs的靶基因预测及KEGG富集分析

Fig. 4 Target gene prediction and KEGG enrichment analysis of miRNAs

水平和HbA<sub>1c</sub>呈正相关关系( $P < 0.05$ ;表5,图6)。

### 2.6 外泌体 miRNA 对 GDM 的早期预测效能研究

为评估血浆外泌体 miRNA 对 GDM 的早期预测效能,我们进行了 ROC 曲线分析,结果显示,hsa-miR-188-5p 对应的曲线下面积(the area under the ROC curve, AUC)为 0.723 (95%CI, 0.593~0.854;

$P = 0.003$ ), hsa-miR-663a 对应的 AUC 为 0.790 (95%CI, 0.664~0.918;  $P < 0.001$ ), hsa-miR-135a-5p 对应的 AUC 为 0.656 (95%CI, 0.514~0.796;  $P = 0.038$ ), hsa-miR-4707-5p 对应的 AUC 为 0.727 (95%CI, 0.581~0.875;  $P = 0.002$ )。采用 logistic 回归方程构建基于 hsa-miR-188-5p、hsa-miR-663a、

表3 KEGG 富集分析结果  
Table 3 Results of KEGG analysis.

ID	Term	P Value	P.adjust	Count
hsa04140	Autophagy – animal	1.68E-05	0.00271	17
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	2.04E-05	0.00271	17
hsa05135	Yersinia infection	6.32E-05	0.00402	16
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	6.50E-05	0.00402	18
hsa04012	ErbB signaling pathway	8.47E-05	0.00402	12
hsa05205	Proteoglycans in cancer	0.000106	0.00402	20
hsa04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.000106	0.00402	16
hsa04929	GnRH secretion	0.000140	0.00462	10
hsa04360	Axon guidance	0.000197	0.00498	18
hsa04024	cAMP signaling pathway	0.000216	0.00498	20
hsa04910	Insulin signaling pathway	0.000222	0.00498	15
hsa04931	Insulin resistance	0.000227	0.00498	13
hsa04810	Regulation of actin cytoskeleton	0.000244	0.00498	20
hsa04390	Hippo signaling pathway	0.000316	0.00598	16

KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes

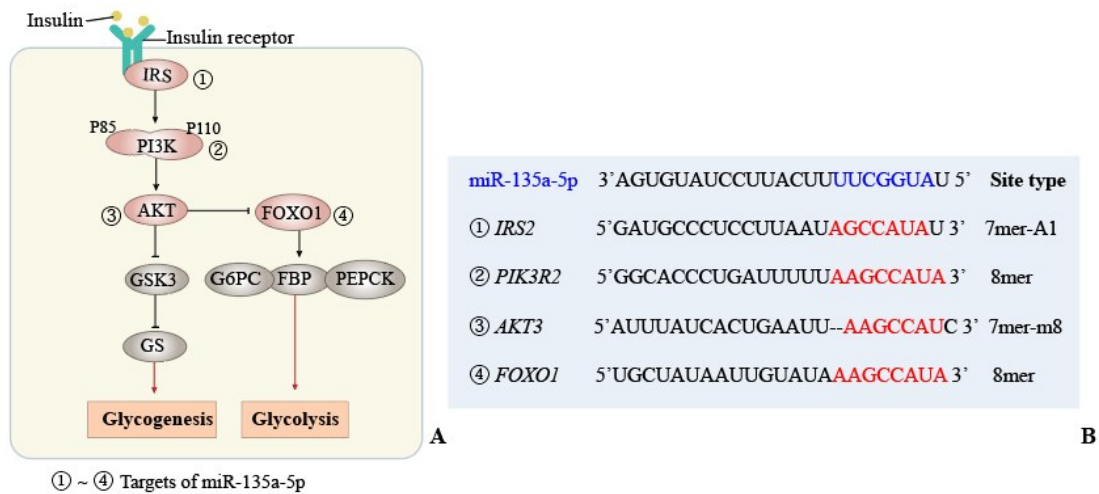
表4 参与胰岛素信号通路的 miRNAs 靶基因  
Table 4 Target genes of miRNAs participating in insulin signaling pathways

miRNA	Targets in the insulin signaling pathway	
hsa-miR-135a-5p	<i>IRS2</i>	insulin receptor substrate 2
	<i>PIK3R2</i>	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2
	<i>AKT3</i>	AKT serine/threonine kinase 3
	<i>GSK3B</i>	glycogen synthase kinase 3 beta
	<i>PPP1CC</i>	protein phosphatase 1 catalytic subunit gamma
	<i>CALML4</i>	calmodulin like 4
	<i>PDE3B</i>	phosphodiesterase 3B
	<i>CBLB</i>	Cbl proto-oncogene B
	<i>FOXO1</i>	forkhead box O1
	<i>RPS6KB1</i>	ribosomal protein S6 kinase B1
	<i>PTPRF</i>	protein tyrosine phosphatase receptor type F
hsa-miR-188-5p	<i>IRS4</i>	insulin receptor substrate 4
	<i>CRKL</i>	CRK like proto-oncogene, adaptor protein
hsa-miR-4707-5p	<i>SHC3</i>	SHC adaptor protein 3
hsa-miR-663a	—	—

hsa-miR-135a-5p 和 hsa-miR-4707-5p 的联合预测模型,ROC 曲线分析结果显示,4 个 miRNAs 联合分析对应的 AUC 为 0.839 (95%CI, 0.724~0.954;  $P < 0.001$ ; 图 7),其灵敏度为 0.833,特异性为 0.833。

### 3 讨论

本研究旨在寻找早期预测妊娠期糖尿病的潜在生物标记物并探讨其与妊娠期糖尿病发病的关



A: The products of miR-135a-5p targeted genes *IRS2*, *PIK3R2*, *AKT3*, *FOXO3* in insulin signaling pathway; B: The 3' UTR sequences of targets predicted to miR-135a-5p were aligned. Seed region of miR-135a-5p is shown in blue, the binding site of target genes are shown in red.

图5 胰岛素信号通路中 miR-135a-5p 的靶基因

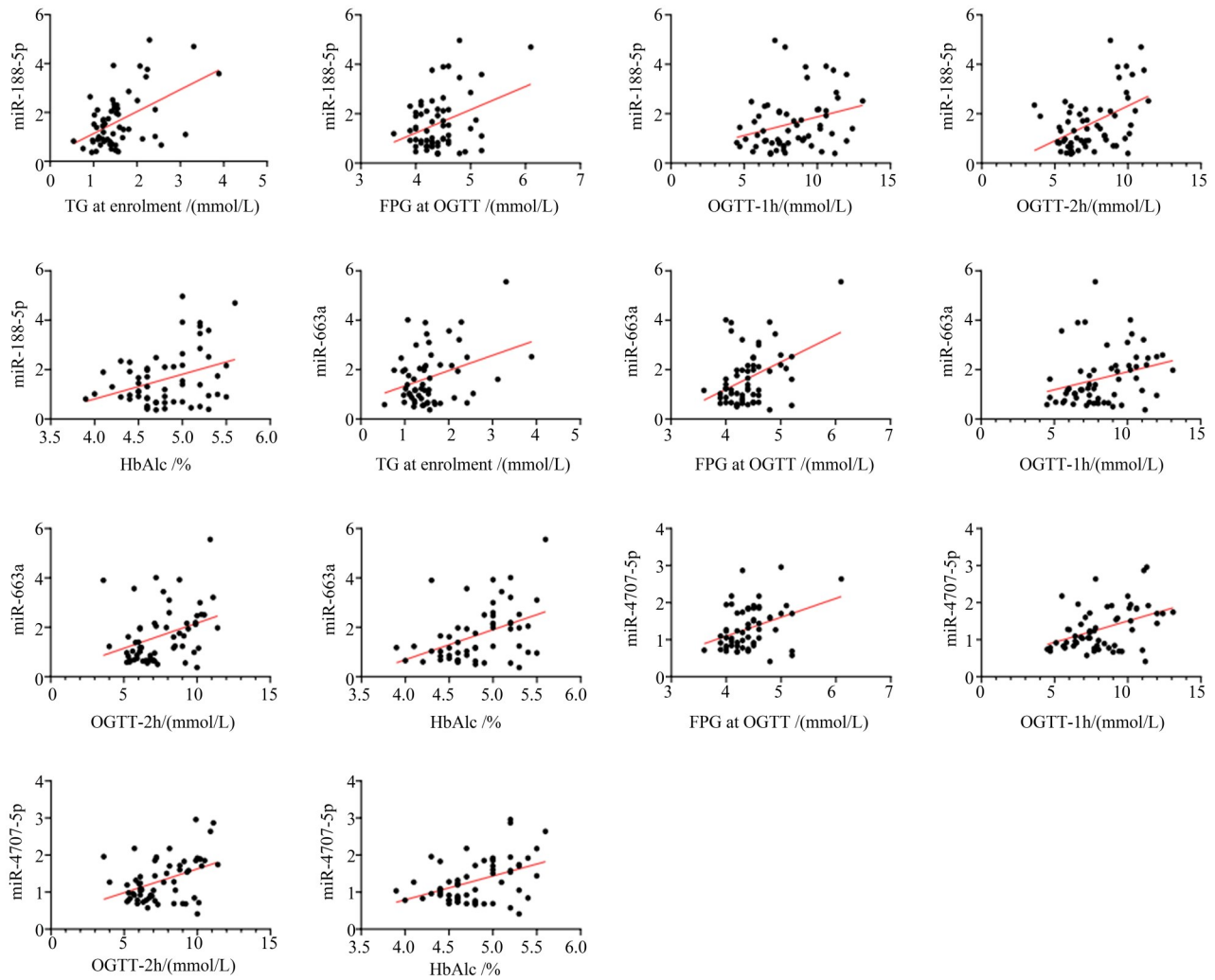
Fig. 5 The target genes of miR-135a-5p in insulin signaling pathway

表5 外泌体 miRNAs 水平与血糖血脂的相关性分析

Table 5 The Correlation between exosomal miRNAs and blood glucose and lipid

	miR-188-5p		miR-663a		miR-135a-5p		miR-4707-5p	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Correlation data at enrolment								
Weight	0.004	0.976	0.147	0.292	-0.218	0.116	0.148	0.290
BMI	0.062	0.662	0.213	0.129	-0.298	0.032	0.196	0.164
TG	0.497	<0.001	0.346	0.008	-0.056	0.675	0.247	0.062
CHOL	0.180	0.176	0.147	0.270	0.132	0.324	0.132	0.324
HDL	-0.045	0.739	-0.102	0.448	0.205	0.123	-0.130	0.332
LDL	0.183	0.169	0.222	0.094	0.034	0.801	0.210	0.113
FPG	-0.141	0.284	-0.075	0.570	-0.075	0.570	-0.061	0.643
Correlation data at OGTT								
Weight	0.018	0.897	0.158	0.259	-0.166	0.234	0.177	0.205
BMI	0.106	0.453	0.260	0.063	-0.253	0.070	0.265	0.058
TG	0.243	0.062	0.180	0.169	-0.034	0.796	0.096	0.466
CHOL	0.042	0.752	-0.015	0.907	0.057	0.666	0.078	0.555
HDL	-0.107	0.416	-0.231	0.075	0.106	0.422	-0.185	0.158
LDL	-0.007	0.955	0.011	0.935	0.023	0.864	0.097	0.459
FPG	0.352	0.006	0.418	0.001	-0.084	0.522	0.365	0.004
OGTT-1h	0.290	0.024	0.284	0.028	0.240	0.065	0.423	0.001
OGTT-2h	0.484	<0.001	0.355	0.005	0.249	0.055	0.421	0.001
HbA1c	0.354	0.006	0.436	<0.001	0.206	0.114	0.436	<0.001

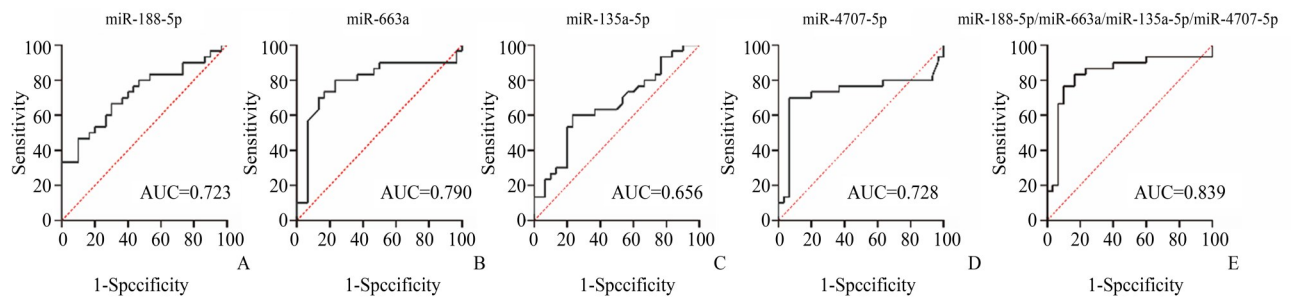
BMI: body mass index; TG: triglyceride; CHOL: cholesterol; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; FPG: fasting plasma glucose; OGTT: oral glucose tolerance test; HbA1c: hemoglobin A1c.



Scatter plots show the correlation between miRNAs and clinical indicators. Only data with  $P < 0.05$  is shown.

图6 外泌体miRNA水平与临床指标的散点图

Fig. 6 Scatter plots of exosomal miRNA levels and clinical indicators



ROC curve analysis of differential expression miRNAs in predicting GDM. A: miR-188-5p; B: miR-663a; C: miR-135a-5p; D: miR-4707-5p; E: miRNA-based model was established with high predicted accuracy for GDM (AUC = 0.839) based on four candidate differentially expressed miRNAs.

图7 ROC曲线分析miRNAs表达水平对妊娠期糖尿病的预测效能

Fig. 7 The predicted performance of miRNAs expression evaluated with ROC analysis

系。我们基于生物信息学分析方法找到10个可能与糖尿病相关的miRNAs并在孕妇早期血浆外泌体中进行了检测,研究发现随后发展为GDM的孕

妇在早期血浆外泌体中 hsa-miR-188-5p、hsa-miR-663a、hsa-miR-135a-5p 和 hsa-miR-4707-5p 的表达高于正常妊娠女性,以 logistic 回归方程构

建基于 miR-188-5p、miR-663a、miR-135a-5p 和 miR-4707-5p 的联合预测模型,ROC 曲线分析结果显示 AUC 为 0.839,具有较好的预测效能。KEGG 通路富集分析结果显示 miR-135a-5p 可能通过调控胰岛素信号通路影响 GDM 的发生发展。

外泌体是具有双层膜结构的囊泡状小体,妊娠第 6 周即可在孕妇外周血中发现胎盘来源的外泌体<sup>[11]</sup>。Gillet 等发现,GDM 孕妇早期血清细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)中 miR-132-3p、miR-1323 等 10 个 miRNAs 水平显著高于 NGT 孕妇,差异 miRNAs 的靶基因参与滋养细胞的增殖/分化、胰岛素分泌调节和葡萄糖代谢<sup>[12]</sup>。然而,该研究仅纳入既往报道的与 GDM 或胎盘功能异常相关的 17 个 miRNAs。本研究通过数据检索,纳入 1 型糖尿病、2 型糖尿病和 GDM 患者血浆 miRNAs 研究的芯片数据集,筛选在两个或以上数据集中表达一致的差异 miRNAs 并采用孕妇血浆外泌体进行验证,纳入 miRNAs 数据较为全面,有利于发现新的早期预测因子。

我们发现的差异 miRNAs 可能通过调控胰岛素信号通路影响 GDM 发生发展。研究表明 miR-135a 在糖尿病患者骨骼肌<sup>[13]</sup>和糖尿病肾病<sup>[14]</sup>中表达上调。骨骼肌中 miR-135a 通过靶向抑制 IRS2 使胰岛素信号通路下调,并且在 db/db 小鼠模型中,miR-135a 敲低能增加骨骼肌 IRS2 和 p-AKT 水平,改善糖代谢<sup>[13]</sup>。糖尿病肾病中高表达的 miR-135a-5p 靶向 sirt1 参与 SMAD3 信号通路从而改善 TGF $\beta$ 1 介导的肾纤维化<sup>[14]</sup>。此外,miR-135a-5p 可以通过靶向 Apc 激活 Wnt/b-catenin 信号,抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化和成脂<sup>[15]</sup>。

既往研究表明,高脂饮食诱导的 GDM 小鼠模型中,miR-188-5p 的表达显著高于正常小鼠<sup>[16]</sup>。此外,miR-188-5p 在糖尿病肾病尿液外泌体中表达显著升高<sup>[17]</sup>。miR-663 在早发性子痫前期胎盘表达上调,进而在 HTR-8/SVneo 滋养层细胞中发现 miR-663 可抑制肾脏肾素原 mRNA 和蛋白的表达<sup>[18]</sup>。我们的研究发现,miR-4707-5p 在 GDM 孕

妇血浆外泌体中高表达,与既往芯片数据集分析结果不一致。主要原因是研究人群、检测标本和检测方法的不同,而 miR-4707-5p 与糖代谢异常的关系尚不清楚。

我们的研究中 hsa-miR-320c、hsa-miR-320d、hsa-miR-520e 和 hsa-let-7c 在血浆外泌体中无法检出,或在 GDM 和 NGT 两组表达差异无统计学意义。既往研究表明,这些 miRNAs 与糖尿病的关系存在一定争议。Liu 等研究表明 1 型糖尿病患者中 miR-320c 表达升高且与  $\beta$  细胞损伤有关<sup>[19]</sup>,但 Ding 等<sup>[20]</sup>发现,2 型糖尿病患者血清中 miR-320c、miR-320d 表达下调。Capobianco 等<sup>[21]</sup>指出,肥胖患者内脏脂肪组织中 miR-520e 下调,与脂肪对葡萄糖的摄取有关。let-7 与糖尿病的关系尚有争议。Garavelli 等<sup>[22]</sup>研究发现,let-7c 在 1 型糖尿病中表达上调,但 Brennan 等<sup>[23]</sup>的研究发现 let-7 在糖尿病患者颈动脉斑块和糖尿病 *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠中降低。hsa-miR-3135b、hsa-miR-1245b-3p 与糖尿病的关系尚不明确。

本研究发现 10-16 周孕妇血浆外泌体 miRNAs 与妊娠期糖脂代谢水平相关。但本研究未对孕前、孕晚期和产后的血浆外泌体进行检测,无法明确相关的外泌体 miRNAs 在围产期的动态变化情况。母体血浆外泌体 hsa-miR-188-5p、hsa-miR-663a、hsa-miR-135a-5p 和 hsa-miR-4707-5p 对 GDM 具有一定的早期预测价值,进一步研究可进行大样本、多中心临床研究,以明确 miRNAs 的阳性、阴性预测值、敏感度和特异度并且建立标准化的外泌体分离、保存方法以满足其作为 GDM 早期筛查标志物的要求。

综上所述,妊娠早期 GDM 孕妇血浆外泌体内表达上调的 hsa-miR-188-5p、hsa-miR-663a、hsa-miR-135a-5p 和 hsa-miR-4707-5p 具备成为 GDM 早期预测潜在生物标志物的可能。其中,miR-135a-5p 可能通过抑制胰岛素信号通路中的分子等途径与 GDM 的发生相关。

## 参考文献

- [1] McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, et al. Gestational diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 47.
- [2] Saravanan P. Gestational diabetes: opportunities for improving maternal and child health [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, 8(9): 793–800.
- [3] ACOG Practice Bulletin No. 190: Gestational diabetes mellitus [J]. *Obstet Gynecol*, 2018, 131(2): e49–e64.
- [4] Koivusalo SB, Rönö K, Klemetti MM, et al. Gestational diabetes mellitus can be prevented by lifestyle intervention: the finnish gestational diabetes prevention study (RADIEL): a randomized controlled trial [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(1): 24–30.
- [5] Wang C, Wei Y, Zhang X, et al. A randomized clinical trial of exercise during pregnancy to prevent gestational diabetes mellitus and improve pregnancy outcome in overweight and obese pregnant women [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2017, 216(4): 340–351.
- [6] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487–514.
- [7] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 9–17.
- [8] Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, et al. Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia: potential role of exosomal microRNAs across gestation [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, 102(9): 3182–3194.
- [9] Magayr TA, Song X, Streets AJ, et al. Global microRNA profiling in human urinary exosomes reveals novel disease biomarkers and cellular pathways for autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2020, 98(2): 420–435.
- [10] Salomon C, Scholz-Romero K, Sarker S, et al. Gestational diabetes mellitus is associated with changes in the concentration and bioactivity of placenta-derived exosomes in maternal circulation across gestation [J]. *Diabetes*, 2016, 65(3): 598–609.
- [11] Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy [J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 204.
- [12] 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.
- [13] Agarwal P, Srivastava R, Srivastava AK, et al. miR-135a targets IRS2 and regulates insulin signaling and glucose uptake in the diabetic gastrocnemius skeletal muscle [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(8): 1294–1303.
- [14] Zhang J, Zhang L, Zha D, et al. Inhibition of miRNA-135a-5p ameliorates TGF- $\beta$ 1-induced human renal fibrosis by targeting SIRT1 in diabetic nephropathy [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(3): 1063–1073.
- [15] Chen C, Peng Y, Peng Y, et al. miR-135a-5p inhibits 3T3-L1 adipogenesis through activation of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 52(3): 311–320.
- [16] Xiao Y, Chen W, Chen R, et al. Exosomal microRNA expression profiling analysis of the effects of lycium barbarum polysaccharide on gestational diabetes mellitus mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 2953502.
- [17] Lee WC, Li LC, Ng HY, et al. Urinary exosomal microRNA signatures in nephrotic, biopsy-proven diabetic nephropathy [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(4): 1220.
- [18] Wang Y, Lumbers ER, Arthurs AL, et al. Regulation of the human placental (pro)renin receptor–prorenin–angiotensin system by microRNAs [J]. *Mol Hum Reprod*, 2018, 24(9): 453–464.
- [19] Liu L, Yan J, Xu H, et al. Two novel microRNA biomarkers related to  $\beta$ -cell damage and their potential values for early diagnosis of type 1 diabetes [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(4): 1320–1329.
- [20] Ding L, Ai D, Wu R, et al. Identification of the differential expression of serum microRNA in type 2 diabetes [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80(3): 461–465.
- [21] Capobianco V, Nardelli C, Ferrigno M, et al. miRNA and protein expression profiles of visceral adipose tissue reveal miR-141/YWHAG and miR-520e/RAB11A as two potential miRNA/protein target pairs associated with severe obesity [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(6): 3358–3369.
- [22] Garavelli S, Bruzzaniti S, Tagliabue E, et al. Blood co-circulating extracellular microRNAs and immune cell subsets associate with type 1 diabetes severity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 477.
- [23] Brennan E, Wang B, McClelland A, et al. Protective effect of let-7 miRNA family in regulating inflammation in diabetes-associated atherosclerosis [J]. *Diabetes*, 2017, 66(8): 2266–2277.

(编辑 祁方昉)