

Micro-26a 对沙格列汀治疗糖尿病伴非酒精性脂肪肝疗效的影响*

陈彦平¹, 张金苹²

(1. 北京市门头沟区中医医院 内分泌科, 北京 102300; 2. 中日友好医院 内分泌科, 北京 100029)

[摘要] 目的: 探究循环 miRNA-26a 水平对沙格列汀治疗糖尿病伴非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 疗效的影响。方法: 113 例 2 型糖尿病伴 NAFLD 患者, 采用沙格列汀治疗 6 个月; 以患者治疗 1 d 时的血清 miR-26a 相对表达中位数为临界值, 将患者分为 miR-26a 高表达组 ($n = 49$) 及 miR-26a 低表达组 ($n = 64$); 比较两组患者治疗前及治疗 6 个月时的空腹血糖 (FPG)、餐后 2 h 血糖 (2hPPG)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT)、总胆固醇 (TC) 及甘油三酯 (TG) 水平; 比较沙格列汀对两组患者 NAFLD 的治疗效果。结果: 治疗前两组患者血清 FPG、2hPPG、HbA1c、ALT、AST、GGT、TC 及 TG 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 治疗后两组患者血清 FPG、2hPPG、HbA1c、ALT、AST、GGT、TC 及 TG 水平均较治疗前显著降低 ($P < 0.05$), 但治疗后两组患者血清 FPG、2hPPG、HbA1c、ALT、AST、GGT、TC 及 TG 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 113 例患者治疗 NAFLD 的总有效率为 73.5%, miR-26a 高表达组治疗 NAFLD 的总有效率显著高于 miR-26a 低表达组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 高 miR-26a 表达的糖尿病伴 NAFLD 患者对沙格列汀治疗的敏感性更高。

[关键词] 微小 RNA; miR-26a; 糖尿病; 酒精性脂肪肝; 肝功能; 血糖; 血脂

[中图分类号] R587.2; R575.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)02-0235-04
DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.02.023

The Effect of Micro-26a Expression on Saxagliptin Treatment Efficacy on Patients with Type 2 Diabetes Mellitus with Non-alcoholic Fatty Liver Disease

CHEN Yanping¹, ZHANG Jinping²

(1. Endocrinology Department, Mentougou District Traditional Chinese Medicine Hospital, Beijing 102300, China;
2. Endocrinology Department, China-japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of circulating miRNA-26a on the efficacy of saxagliptin in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus (T2D) complicated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods:** A total of 113 T2D patients complicated with NAFLD admitted to the Mentougou district traditional Chinese medicine hospital from January 2015 to December 2017 were selected as the study subjects and treated with saxagliptin for 6 months. Based on the median relative expression of serum miR-26a as a critical value, patients were divided into miR-26a high expression group ($n = 49$) and low expression group ($n = 64$). The improvement of blood glucose, liver function and blood lipid level before/after treatment and the therapeutic effect of NAFLD were compared in the two groups. **Results:** The blood glucose levels in both groups had no significant difference ($P > 0.05$), but the treatment remarkably decreased blood glucose levels in both groups ($P < 0.05$).

*[基金项目]北京市科学技术委员会基金资助项目(2017YKSJ04)

网络出版时间:2019-02-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190228.2130.023.html>

Interestingly, the patients with high expression of miR-26a had more significant reduction in ALT, AST, GGT, TC and TG ($P < 0.05$). The total effective rate of miR-26a high expression group was 83.7%, while the total effective rate of low expression group was 65.6%, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Monitoring serum miR-26a expression may provide the basis for the evaluation of the therapeutic effect of saxagliptin on T2D patients complicated NAFLD.

[**Key words**] micro RNA; miR-26a; diabetes; alcoholic fatty liver disease; liver function; blood glucose; blood fat

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一组以肝脏脂肪变性和异位脂肪为特征的肝脏疾病,主要病理特征为甘油三酯(triglyceride, TG)为主的脂质积聚在没有摄入过量酒精的患者肝细胞内^[1]。在我国,随着肥胖率的上升,人口年龄的增长和体力活动的减少,NAFLD的患病率呈上升趋势。有研究表明,2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2D)患者中,NAFLD的患病率明显增加,NAFLD的严重程度与T2D严重程度呈正相关^[2-3]。微小RNA(MicroRNA, miRNA)是一种由18~25个核苷酸组成的小的非编码RNA分子,在信使RNA表达中具有转录后调节作用,研究发现miRNA参与了细胞的分裂、生长等生物学过程。在NAFLD患者的血清中,已经发现了如miR-34a、miR-26a等一系列miRNA的异常表达,在动物实验中miR-26a在减弱NAFLD发展中的起着重要的作用,过量表达miR-26a小鼠的肝脏质量、肝脏TG沉积和血清谷丙转氨酶(Alanine Transaminase, ALT)水平均较对照小鼠显著降低^[4-5]。沙格列汀是治疗糖尿病伴NAFLD的主要药物之一,其在控制患者血糖的同时,还可以通过影响肝脏脂质代谢而改善患者肝功能^[6],为阐明不同水平miR-26a对沙格列汀治疗糖尿病伴NAFLD的影响,本研究对不同miR-26a表达水平的2型糖尿病伴NAFLD患者给予沙格列汀治疗,观察治疗前后的部分血糖及血脂指标,报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2015年1月~2017年12月收治的113例2型糖尿病伴NAFLD患者,男64例、女49例,49~71岁、平均(57.3±6.8)岁,体质指数(31.3±2.9)kg/m²;所有患者均有多饮、多尿、多食和消瘦、疲乏无力等典型糖尿病症状,均符合美国糖尿病学会颁布的2016年糖尿病诊断标准^[7]:FPG≥1260mg/L,糖耐量餐后实验血糖≥200g/L,

HbA1c≥6.5%,高血糖典型症状或高血糖危象或任意时间血浆葡萄糖≥200g/L。2011年中华医学会NAFLD诊断标准^[8]:无饮酒史或饮酒折合乙醇量<140g/周(女性<70g/周),除外病毒性肝炎、药物性肝病等可导致脂肪肝的特定疾病,肝活检组织学改变符合脂肪性肝病或肝脏影像学表现符合弥漫性脂肪肝无其他可解释原因。排除严重心、肝等脏器功能衰竭、酒精性及其他明确原因造成的脂肪肝患者,排除恶性肿瘤及对沙格列汀过敏患者。所有患者或家属均签署知情同意书,本研究由医院伦理委员会批准实施。

1.2 方法

113例患者口服沙格列汀(中美上海施贵宝制药有限公司,国药准字J20110029)进行治疗(5mg,1次/d),疗程6个月。患者于服药1d后抽取外周静脉血2mL,将含有血液的试管以45~60°的角度在4℃的温度下放置1h,然后3000r/min离心5min,获得上清液,提取血清总RNA,逆转录合成cDNA后行Real-time PCR检测miR-26a水平,以U6为内参。miR-26a上游引物序列为5'-AAG-GAGAACCCGTAGATCCG-3',miR-26a下游引物序列为5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3';U6上游引物序列为5'-GCGCGTCGTGAAGCGTTC-3',U6下游引物序列为5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'。反应条件:95℃预变性3min,95℃15s,55℃20s,72℃20s,83.5℃15s共40个循环;最后95℃15s,60℃1min,95℃15s,重复3次实验。以2^{-ΔΔCT}值法进行相对定量分析。以患者血清miR-26a相对表达中位数为临界值,将113例患者分为miR-26a高表达组(n=49)及miR-26a低表达组(n=64),两组患者年龄、性别、病程等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.3 观察指标

比较两组患者治疗前及治疗6个月时的空腹血糖(fasting blood-glucose, FPG)、餐后2h血糖(2h-postprandial blood glucose, 2hPPG)、糖化血红

蛋白 (glycosylated hemoglobin, HbA1c)、谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST)、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyl transpeptidase, GGT)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 及 TG 水平; 比较沙格列汀对两组患者 NAFLD 的治疗效果。NAFLD 疗效评价: 显效为患者临床症状减轻或消失, B 超检查显示脂肪肝的征象有明显的减轻, 患者肝功能恢复正常, 血脂下降超过 30%; 有效为患者临床症状减轻, B 超检查显示脂肪肝的征象有减轻, 患者肝功能有改善, 血脂下降超过 10%; 无效为患者临床症状无变化, 总有效 = 显效 + 有效。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 计量

资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间数据比较采用 t 检验。计数资料采用例数 (%) 表示, 数据比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 FPG、2hPPG 及 HbA1c 水平

治疗前两组患者血清 FPG、2hPPG 及 HbA1c 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 治疗后两组患者血清 FPG、2hPPG、HbA1c 水平均较治疗前显著降低 ($P < 0.05$), 但治疗后两组患者血清 FPG、2hPPG、HbA1c 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 治疗前后两组患者血清 FPG、2hPPG 及 HbA1c 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The effect of saxagliptin on the levels of FDG, 2hPPG and HbA1c

指标	miR-26a 高表达组 (n = 49)		miR-26a 低表达组 (n = 64)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
FPG (mmol/L)	9.58 \pm 2.01	6.21 \pm 1.32 ⁽¹⁾	9.47 \pm 1.99	6.19 \pm 1.26 ⁽¹⁾
2hPPG (mmol/L)	15.02 \pm 1.93	9.03 \pm 0.90 ⁽¹⁾	14.92 \pm 1.83	8.91 \pm 0.88 ⁽¹⁾
HbA1c (%)	8.33 \pm 0.68	6.11 \pm 0.49 ⁽¹⁾	8.18 \pm 0.61	6.09 \pm 0.47 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与治疗前比较, $P < 0.05$

2.2 血清 ALT、AST、GGT、TC 及 TG 水平

治疗前两组患者血清 ALT、AST、GGT、TC 及 TG 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 治疗后两组患者血清 ALT、AST、GGT、TC 及 TG 水平均

较治疗前显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但治疗后两组患者血清 ALT、AST、GGT、TC 及 TG 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 治疗前后两组患者肝功能及血脂指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 The effect of saxagliptin on the levels of ALT, AST, GGT, TC and TG

指标	miR-26a 高表达组 (n = 49)		miR-26a 低表达组 (n = 64)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
ALT (U/L)	35.64 \pm 20.02	17.14 \pm 4.53 ⁽¹⁾	36.44 \pm 21.20	24.03 \pm 4.61 ⁽¹⁾
AST (U/L)	28.02 \pm 11.02	19.87 \pm 8.43 ⁽¹⁾	27.96 \pm 11.56	23.97 \pm 9.72 ⁽¹⁾
GGT (U/L)	55.01 \pm 29.23	27.13 \pm 17.13 ⁽¹⁾	54.52 \pm 31.14	34.12 \pm 16.98 ⁽¹⁾
TC (mmol/L)	5.35 \pm 0.72	4.10 \pm 0.68 ⁽¹⁾	5.41 \pm 0.63	4.91 \pm 0.59 ⁽¹⁾
TG (mmol/L)	3.12 \pm 0.30	1.09 \pm 0.29 ⁽¹⁾	3.06 \pm 0.35	1.34 \pm 0.31 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与治疗前比较, $P < 0.05$

2.3 疗效

113 例患者治疗 NAFLD 的总有效率为 73.5%, miR-26a 高表达组治疗 NAFLD 的总有效率 83.7%, miR-26a 低表达组治疗 NAFLD 的总有效率为 65.6%, 两组患者 NAFLD 疗效比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 两组患者 NAFLD 疗效比较 (n, %)

Tab.3 The therapeutic effect of saxagliptin on NAFLD

疗效	miR-26a 高表达组 (n = 49)	miR-26a 低表达组 (n = 64)
显效	25 (51.0)	24 (37.5)
有效	16 (32.7)	18 (28.1)
无效	8 (16.3)	22 (34.3)
总有效	41 (83.7)	42 (65.6)

3 讨论

近十年来,人们对 miRNA 在包括 NAFLD 在内的多种疾病的诊断和疗效评估价值方面的兴趣日益浓厚^[9-10]。在 NAFLD 的相关研究中,已经检测了 NAFLD 中的 miRNA 表达模式,并且已经提出了几种 miRNAs 作为这种疾病的预测因子^[11]。既然 miRNA 可能作为 NAFLD 的预测指标,那么 miRNA 的表达水平可能也制约着 NAFLD 患者对药物的反应性。因此,本研究探究了 miR-26a 差异表达的糖尿病伴 NAFLD 患者对沙格列汀的临床敏感性,结果发现,miR-26a 的差异表达并不会影响糖尿病患者的血糖控制($P > 0.05$),但是沙格列汀在 miR-26a 表达较高的患者取得了更好的 NAFLD 治疗疗效($P < 0.05$),提示 miR-26a 作为沙格列汀的疗效具有一定的指示作用。

沙格列汀是用于治疗成人 2 型糖尿病的二肽酰基肽酶(dipeptidyl peptidase, DPP-4)抑制剂,主要作用于肠降血糖素系统,其作用位点包括葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(gastric inhibitory peptides, GIP)和胰高血糖素样肽-1(glucagon-1, GLP-1)。GLP-1 和 GIP 响应于食物摄取,从肠中的细胞分泌,并通过不同的受体作用于胰腺 β -细胞,以葡萄糖依赖性方式刺激胰岛素的释放,GLP-1 还以葡萄糖依赖性方式抑制胰腺 α 细胞的胰高血糖素分泌,调节胃排空,并作用于中枢神经系统以减少食物摄入^[12]。近年来的研究表明 DPP-4 抑制剂可在控制血糖的同时,改善患者的血脂和肝功能^[13],这些发现与本研究中沙格列汀治疗下患者 ALT、AST、GGT、TC 及 TG 改善相一致。DPP-4 抑制剂可能通过影响肝脏脂质代谢来减少脂肪合成,而肝脏脂质代谢异常是 NAFLD 的重要原因。

目前的研究发现 TG 代谢异常是诱发 NAFLD 的关键,而 miR-26a 家族是控制 TG 等脂质代谢的重要 miRNA 家族^[14]。miR-26a 的基因组位点定位于编码 C-末端结构域 RNA 聚合酶 II 多肽 A 小磷酸酶家族的蛋白质的基因的内含子中,在动物实验中发现,miR-26a 的表达下调可造成调节脂肪生成的关键蛋白胰岛素诱导基因 1 过度表达,造成脂肪酸过度合成和 TG 的积累^[15],说明 miR-26a 在脂质代谢过程中发挥着重要的调节作用,在本研究中也发现了 miR-26a 高表达的患者经沙格列汀治疗后血脂指标 TC、TG 的改善更明显($P < 0.05$),说明

miR-26a 激活造成脂质代谢改善可能是沙格列汀治疗 NAFLD 的重要机制之一。

综上所述,本研究发现 miR-26a 表达并不影响沙格列汀的血糖改善功能,高 miR-26a 表达的糖尿病伴 NAFLD 患者对沙格列汀治疗的敏感性更高,可获得更明显的肝功能和血脂指标改善,血清 miR-26a 表达监测有作为沙格列汀治疗糖尿病伴非酒精性脂肪肝患者疗效早期预测的生物标记物的潜力。

4 参考文献

- [1] SU Q, KUMAR V, SUD N, et al. MicroRNAs in the pathogenesis and treatment of progressive liver injury in NAFLD and liver fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 3(3): 159 - 165.
- [2] CHALASANI N, YOUNOSSEI Z, LAVINE J E, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association [J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 2005 - 2023.
- [3] WILLIAMS C D, STENGEL J, ASIKE M I, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(1): 124 - 131.
- [4] YAMADA H, SUZUKI K, ICHINO N, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 424: 99 - 103.
- [5] CERMELLI S, RUGGIERI A, MARRERO J A, et al. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23937.
- [6] LIU Y, ZHANG Z, CHEN R, et al. Therapeutic effect of saxagliptin in rat models of nonalcoholic fatty liver and type 2 diabetes [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2014, 34(6): 862 - 868.
- [7] MALMSTROM H, WALLDIUS G, CARLSSON S, et al. Elevations of metabolic risk factors 20 years or more before diagnosis of type 2 diabetes-experience from the AMORIS study [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 8(7): e24937.
- [8] KAMADA Y, ONO M, HYOGO H, et al. Use of Mac-2 binding protein as a biomarker for nonalcoholic fatty liver disease diagnosis [J]. *Hepatol Commun*, 2017, 1(8): 780 - 791.

(下转第 248 页)