

·数字中医药·

本文引用: 张茜, 王瑞, 魏皓月, 张硕, 黄延芹. 健脾消渴方干预2型糖尿病大鼠胰腺组织 lncRNA-miRNA-mRNA 转录网络分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1643-1652.

健脾消渴方干预2型糖尿病大鼠胰腺组织 lncRNA-miRNA-mRNA 转录网络分析

张茜¹, 王瑞¹, 魏皓月¹, 张硕¹, 黄延芹^{2*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011

[摘要] **目的** 研究2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)大鼠经健脾消渴方干预后其胰腺组织的长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)-微小RNA(microRNA, miRNA)-信使RNA(messenger RNA, mRNA)转录网络变化,从转录组学角度探讨健脾消渴方治疗T2DM的作用机制。**方法** 选用Wistar大鼠,建立T2DM模型。选取造模成功的大鼠给予健脾消渴方干预8周,行空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)测定和ELISA法检测空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、血清胰高血糖素(glucagon, GC)以评估疗效。取胰腺组织进行高通量测序,筛选差异表达的lncRNAs、miRNAs及mRNAs;利用生物信息学方法分析药物作用涉及的关键生物学过程和靶点通路。测序结果采用qRT-PCR法验证其准确性。最后构建lncRNA-miRNA-mRNA三元转录网络及蛋白互作网络。**结果** 健脾消渴方能降低T2DM大鼠FBG、GC水平,升高FINS。根据测序结果,筛选出模型大鼠有385个DE-lncRNAs和492个DE-mRNAs,健脾消渴方治疗后有354个DE-lncRNAs、590个DE-mRNAs和32个DE-miRNA。最终构建的ceRNA网络包含33个DE-lncRNAs、16个DE-miRNAs及87个DE-mRNAs。GO富集分析和KEGG通路分析显示药物干预的靶点可能涉及糖脂代谢等生物功能以及鞘脂代谢、脂肪细胞脂解的调节、FoxO信号通路、PI3K-Akt信号通路等。**结论** 健脾消渴方可能通过影响T2DM大鼠胰腺组织的lncRNA-miRNA-mRNA转录网络系统改善胰腺功能、调控血糖,转录网络涉及多条通路及多个生物学过程。

[关键词] 健脾消渴方;2型糖尿病;长链非编码RNA;微小RNA;竞争性内源RNA;中医药

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.09.015

Analysis of lncRNA-miRNA-mRNA transcription network of pancreatic tissue in type 2 diabetes mellitus rats intervened by Jianpi Xiaoke Formula

ZHANG Xi¹, WANG Rui¹, WEI Haoyue¹, ZHANG Shuo¹, HUANG Yanqin^{2*}

1. Shandong University of Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250014, China; 2. The Hospital of Shandong

University of Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250011, China

[Abstract] **Objective** To study the changes of the long noncoding RNA (lncRNA)-microRNA (miRNA)-messenger RNA (mRNA) transcription network of pancreatic tissue in type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats after intervention with Jianpi Xiaoke Formula (JPXKF), and to explore its mechanism of action in treating T2DM from the perspective of transcriptomics. **Methods** Wistar rats were selected to establish T2DM model. The rats with successful modeling were given JPXKF for 8 weeks. The fasting blood glucose (FBG) was measured, and fasting insulin (FINS) and serum glucagon (GC) were determined by ELISA to evaluate the curative

[收稿日期] 2023-04-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81974562, 81603613);泰山学者工程专项项目(tsqn202211354);济南市科技创新计划项目(202019029);钱秋海全国名老中医药专家传承工作室(国中医药人教函[2022]75号)。

[第一作者] 张茜,女,硕士,研究方向:中医药防治内分泌疾病。

[通信作者] *黄延芹,女,博士,副主任医师,硕士研究生导师, E-mail: dahuang79@126.com。

effects of JPXKF. Pancreatic tissue was taken for high-throughput sequencing to screen differentially expressed (DE) lncRNAs, miRNAs, and mRNAs. Bioinformatics methods were adopted to analyze the key biological processes and target pathways involved in drug action, and the results of sequencing were verified by qRT-PCR. Finally, the lncRNA-miRNA-mRNA ternary transcription network and protein interaction network were constructed. **Results** In T2DM rats, FBG and GC increased and FINS decreased, however, this damage can be reversed by JPXKF. According to the sequencing results, 385 DE-lncRNAs and 492 DE-mRNAs were screened out in model rats. A total of 354 DE-lncRNAs, 590 DE-mRNAs, and 32 DE-miRNAs were identified after treatment with JPXKF. A ceRNA network consisting of 33 DE-lncRNAs, 16 DE-miRNAs and 87 DE-mRNAs was eventually constructed. GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis showed that these targets of drug intervention may involve biological functions such as glucose and lipid metabolism, sphingolipid metabolism, regulation of adipocyte lipolysis, FoxO signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, and others. **Conclusion** JPXKF may improve pancreatic function and regulate blood glucose by affecting the lncRNA-miRNA-mRNA transcription network system in the pancreatic tissue of T2DM rats, and the transcription network involves multiple pathways and biological processes.

[**Keywords**] Jianpi Xiaoke Formula; type 2 diabetes mellitus; long noncoding RNA; microRNA; competing endogenous RNA; Chinese Medicine

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种多因素影响的慢性全身性代谢性疾病,以胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和(或)胰岛素分泌缺陷引起的以血糖水平升高为主要特征表现。T2DM 因其逐年攀升的患病率和死亡率已成为影响人类健康、生活与经济负担的重要原因,相关西医治疗在临床应用的收效上较为局限^[1]。健脾消渴方以中医经典书著《丹溪心法》中的消渴方为基,全方以黄芪为君药,以黄连、天花粉、生地黄、川牛膝、佩兰为佐使,六味药材共奏清热健脾、活血化瘀之功,其临床疗效已被证实^[2]。中药复方治疗疾病具有多组分、多靶点协同作用的特点,具体作用机制有待明确。本研究通过构建三元转录网络和蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,探究健脾消渴方的关键作用靶点和相关生物学过程。

长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是一类不具备蛋白质翻译功能且长度超过 200 个碱基的 RNA,越来越多的研究显示 lncRNA 的差异表达在 T2DM 的相关机制中至关重要^[3]。lncRNA 虽缺少可读框无法参与蛋白质翻译过程,但却具有微小 RNA(microRNA, miRNA)的特异性结合位点。lncRNA 充当“微小 RNA 海绵”吸附于 miRNA,通过减少 miRNA 与下游靶向 mRNA 的结合,进而影响靶基因的调控表达。这种 lncRNA-miRNA-mRNA 三元转录网络又称为竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)调控机制^[4]。lncRNA-miRNA-mRNA 三元转录网络在 T2DM 病理生理变化中扮演着重要角色,其相关药物作用靶点的筛选和作用机

制的明确仍是当前研究的热点^[5]。本文运用高通量测序技术筛选 T2DM 模型大鼠胰腺组织差异靶点,运用生物信息学方法探讨健脾消渴方对 T2DM 大鼠胰腺组织 lncRNA-miRNA-mRNA 转录网络的影响,以期对中药治疗 T2DM 提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 动物

选用 4 周龄的 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体质量(130±10) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2016-0006。大鼠饲养于山东中医药大学附属医院 SPF 级动物房。饲养环境温度(22±4)℃,湿度 50%~60%,通风,昼夜交替周期 12 h,自由进食饮水。该动物实验由山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准通过,伦理批准号 AWE-2019-001。

1.2 药材与主要试剂

黄芪、黄连、天花粉、生地黄、川牛膝及佩兰饮片均购自江阴天江药业公司;普通标准饲料(北京科澳协力公司);高糖高脂饲料(北京科澳协力公司);链脲佐菌素 STZ(美国默克公司);柠檬酸钠(天津致远公司);柠檬酸(天津鼎盛鑫公司);大鼠胰岛素试剂盒(武汉华美公司);胰高血糖素酶联免疫试剂盒(武汉华美公司);miRNasy Mini(德国 QIAGEN 生物公司);VAHTS Total RNA-seq(H/M/R)文库制备试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);PCR 引物(武汉赛维尔生物科技股份有限公司)。

1.3 主要仪器

稳豪型血糖仪及配套血糖试纸(美国强生公司);安捷伦生物分析仪 2100(美国安捷伦技术公司);Qubit®3.0 荧光仪(美国生命技术公司);Illumina NovaSeq 6000(美国因美娜公司);Veriti96 孔型梯度 PCR 仪(美国 ABI 公司);Nano Drop One 分光光度计;Multiskan GO1510 全波长酶标仪;Arktik Thermal Cycler 96 孔型 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.4 主要方法

1.4.1 健脾消渴方的制备 将黄芪、黄连、天花粉、生地黄、川牛膝和佩兰按 30:9:12:12:9:12 混合,在 600 mL 水中浸泡 30 min。用蒸馏水煮沸至 100 °C 持续 30 min,然后分离汤剂。再加入 400 mL 水,并根据相同的方法制备第二煎剂 15 min。将药液制备为以药物量计 1 g/mL 的浓缩液,存储至 4 °C 冰箱中备用。

1.4.2 T2DM 动物模型的建立及健脾消渴方的治疗

31 只大鼠随机选取 10 只作为对照组(C 组),给予常规饲料正常饲养。其余 21 只大鼠予高糖高脂饲料饲养 8 周,而后腹腔注射 35 mg/kg 链脲佐菌素构建 T2DM 动物模型。待 72 h 后行尾静脉血糖检测,空腹血糖连续 2 次 ≥ 16.7 mmol/L,代表模型成功建立。将造模成功的大鼠按随机数字表法分为 2 组:模型组(M 组, $n=10$)和健脾消渴方组(JPK 组, $n=11$)。C 组腹腔注射等量柠檬酸缓冲液(0.1 mmol/L, pH 4.5)以作对照。根据人与动物的剂量换算公式与已有研究结果, JPK 组于第 9~16 周灌胃予健脾消渴方[6.46 mg/(kg·d)], C 组与 M 组选用等量的生理盐水进行灌胃。经 8 周治疗后,解剖大鼠,取胰腺作进一步检查。

1.4.3 空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)及血清胰高血糖素(glucagon, GC)测定 分别于灌胃开始前后,禁食不禁水 12 h 后进行尾部采血,血糖仪测定治疗前后的 FBG。ELISA 法测定 FINS 及血清 GC, 计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)。HOMA-IR=FBG×FINS/22.5。上述实验内容均从各组中分别随机抽取 10 个样本进行测定。

1.4.4 高通量测序技术 从各组中分别随机抽取 3 份大鼠胰腺组织,应用 TRIzol 进行总 RNA 的提取,后续分离和纯化 RNA 严格按照试剂盒说明书进行。

使用 Nanodrop 检测总 RNA 纯度后,经 DNA 聚合酶 I 和核糖核酸酶 H 合成 cDNA,并在其末端添加“A”碱基进行末端修复。采用 PCR 对扩增产物进行纯化和浓缩,建立 cDNA 文库。Qubit®3.0 荧光分析仪定量文库中的 cDNA 浓度,使用 Fastx 工具包软件检测原始测序序列并对结果进行统计分析。同时,采用 seqtk 工具读取原始数据进行检测,根据预先设定的标准对其进行质量控制,并对参照基因组的特定读数进行标注,以便进行转录。差异性(differential expression, DE)-lncRNA 和 DE-mRNA 按照 $|\log_{2}FC| > 1, P < 0.05$ 的标准筛选, DE-miRNA 按照 $P < 0.05$ 的标准筛选^[9]。

1.5 JPXK 组大鼠胰腺 DE-lncRNAs 靶基因的预测

将 JPXK 组与 M 组筛选出 DE-lncRNAs,顺式预测与反式预测目的基因。顺式预测将 DE-lncRNAs 上下游 10 kb 左右的 mRNA 基因选为目的基因。反式预测基于互补序列配对原理,使用 BLAST 比对获得与 lncRNAs 互补的 mRNA。然后用 RNAplex 软件计算与 mRNA 互补的 lncRNAs 的热力学参数,并选择 $e \leq 30$ 的序列。将顺式预测和反式预测所得靶基因与 DE-lncRNA 导入 Cytoscape 构建靶基因网络,明确核心调控基因与核心 lncRNA。

1.6 JPXK 组大鼠胰腺 DE-lncRNA 和 DE-mRNA 的富集分析

为了阐明基因的生物学术功能和相关信号通路,我们使用 R 包 clusterProfiler 根据 GO 和 KEGG 数据库进行富集分析。将健脾消渴方干预的 JPXK 组的相关 DE-lncRNA 靶基因和 DE-mRNA 依次输入,使用 Fisher's 精确检验进行富集计算,对生物过程、细胞成分和分子功能进行 GO 和 KEGG 富集分析。具体原理是对 GO 和 KEGG 数据库条目中的差异表达基因进行注释映射,计算每个 GO 和通路条目中的基因数量,然后使用超几何分布检验进行统计。在通过多次假设检验校正计算出的 P 值后,将 $P < 0.05$ 作为阈值,筛选出满足该条件的 GO 和 KEGG 条目。依据 P 值进行排序,选择显著性最高的前 20 个 GO 条目与 KEGG 通路使用 ggplot2 绘制气泡图,分析可能涉及的主要生物过程与关键通路。

1.7 qRT-PCR 验证

将测序检测后的剩余样本进行 qRT-PCR 验证。随机分别从 3 组选取 3 个 DE-lncRNAs(NONRATT-

013183.2、NONRATT008447.2 和 NONRATT027846.2) 和 3 个 DE-mRNAs (Nnat, Lcat 和 trpm6)。严格按照试剂盒的操作程序进行试验,内参选用 GAPDH,比较基因的相对表达量选用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。上述六种引物序列如表 1 示。

1.8 健脾消渴方治疗后的 DE-lncRNAs、DE-mRNAs 共表达分析与 lncRNA-miRNA-mRNA 转录网络的构建

对 JPXK 组 DE-lncRNAs 与 DE-mRNAs 进行 pearson 相关性检验,按 $r>0.9$ 、 $P<0.05$ 选取正相关表达的差异 DE-lncRNAs 与 DE-mRNAs 关系对。依据目标基因的表达值,对多样本重复数据(每组大于 3 个生物学重复)运用回归模型分析和种子序列匹配的方法学分析,计算健脾消渴方治疗后 miRNA 与 lncRNA、mRNA 相应的两两调控关系。基于 miRNA-mRNA、miRNA-lncRNA、lncRNA-mRNA 之间的相关性联系构建了具备 miRNA 海绵吸附作用特点的调控网络。将网络中 mRNA 导入在线工具 Metascape 数据库,对其进行 GO 与 KEGG 富集分析。

1.9 PPI 网络分析

为了进一步确定调节核心,我们将 ceRNA 网络中的 mRNA 提交至目前拥有最多生物与蛋白质以及广泛和多样化的 STRING(<https://stringdb.org/>)数据库,物种设置为“Rattus norvegicus”,将 0.4 设置为最小相互作用阈值,并隐藏了独立存在的节点。利用 Cytoscape v.3.8.2 进行可视化的节点网络分析,绘制 PPI 网络结构图。

1.10 统计分析

所有实验数据的统计分析均使用 SPSS 26.0 软件包进行,所有数据为计量资料。测量数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。组间比较先进行数据的正态性和方差齐性检验,符合条件者采用单因素方差分析检验(one-way Anova),组间比较采用 LSD 方法;不满足正态性分布或方差不齐性时,用非参数检验,两组比较采用秩和检验。当 $P<0.05$ 时,数据被认为具有显著差异性且有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠给药前后 FBG、FINS、GC 的测定

造模前,C 组、M 组、JPXK 组大鼠的空腹血糖测量数值均属于血糖正常范围以内。大鼠造模后连续两次测量结果 $FBG \geq 16.7$ mmol/L,提示 M 组、JPXK 组两组大鼠造模成功。给药前 M 组和 JPXK 组大鼠 FBG 较空白组均升高($P<0.05$);与治疗前相比,治疗后 JPXK 组 FBG 显著降低,相较于同时间点的 M 组明显下降($P<0.05$)。相较于 C 组,M 组的 GC、HOMA-IR 水平升高,FINS 水平下降($P<0.05$)。与 M 组比较,JPXK 组 GC、HOMA-IR 水平下降明显,FINS 水平升高($P<0.05$)。详见表 2。

2.2 DE-lncRNAs 与富集分析

测序结果发现大鼠造模成功后,筛选的 385 个 DE-lncRNAs 中有 181 个上调、204 个下调;经健脾消渴方干预后,大鼠胰腺组织有 354 个 DE-lncRNAs,其中 177 个上调,177 个下调(图 1A、图 1B)。对 JPXK 组与 M 组比较筛选后的 DE-lncRNAs 靶基因通过 GO 与 KEGG 数据库进行富集分析,结果发现

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
NONRATT013183.2	TCCCTTTTACTTCAAGCCA	GAAGTGGGAATACTACAACGC
NONRATT008447.2	TGACGGGACGCTACGAGGAA	ACGATGTCAAACATGCGGTG
NONRATT027846.2	GCCTTCCTAAAGTTTCCCAT	GCATCAGGAGGAGTCCACTCT
Nnat	AGCGGACTCCGAGACCACTA	AGCAGCACGCGGAAGATGTA
Lcat	GTTCCAGATCCGTGTCCT	TGTACTATTCATCCTGCTGCTGG
trpm6	CCCTGAGTAACCCACTGAGCAAG	TCTTCATTTCCATACTTGCCAC

表 2 各组大鼠 FBG、FINS、GC、HOMA-IR 水平比较

组别	n	治疗前 FBG(mmol/L)	治疗后 FBG(mmol/L)	FINS(miU/L)	GC(pg/L)	HOMA-IR
C 组	10	5.13±0.78	5.39±1.03 ^Δ	19.26±2.22	150.18±4.69	4.61±0.96
M 组	10	26.70±1.04	27.16±1.62*	13.39±1.58*	238.17±7.64*	16.22±2.54*
JPXK 组	10	26.91±1.28	19.40±1.82 [#]	15.73±1.49 ^Δ	200.69±6.55 ^Δ	13.80±1.84 ^Δ

注:与本组给药前比较,[#] $P<0.05$ 。与 C 组比较,^{*} $P<0.05$;与 M 组比较,^Δ $P<0.05$ 。

GO 功能的分子功能主要为核糖核酸酶活性和作用于 RNA 的催化活性;细胞成分以细胞器膜、内质网膜和吞噬泡的组成成分为主;RNA 代谢的各类调控、染色体分离的调控和脂质代谢过程是主要生物过程(图 1C);KEGG 通路富集分析主要涉及鞘脂代谢、Toll 样受体信号通路、脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、FoxO 信号通路、糖酵解相关代谢途径等通路(图 1D)。

2.3 DE-mRNAs 与富集分析

M 组大鼠相较于 C 组大鼠有 492 个 DE-mRNAs,其中 229 个上调,263 个下调;经健脾消渴方干预后,大鼠胰腺组织有 590 个 DE-mRNAs,其中 462 个上调,128 个下调。健脾消渴方干预后 DE-mRNAs 的 GO 功能富集的主要生物过程涉及对肽类激素的反应、糖脂代谢和血管发育等;细胞组成主要为锚定连接和脂滴等;分子功能包括糖胺聚糖结合等。由图可知,脂肪细胞脂解的调节、PPAR 信号通路、AMPK 信号通路、蛋白质消化吸收和 PI3K-Akt 信号通路

等是 KEGG 富集通路的主要分析结果。详见图 2。

2.4 差异表达基因的验证

采用 qRT-PCR 的方法对随机选择的 6 个 DE-lncRNAs 和 DE-mRNAs 验证测序结果。与测序结果相比,PCR 结果表明,各组之间 6 种 lncRNA 和 mRNA 的差异表达趋势在图 3 中基本一致。因此,将所有差异表达的基因均列入后续分析。

2.5 健脾消渴方治疗 T2DM 大鼠的 ceRNA 网络构建

按照 $P < 0.05$ 的标准筛选 JPXK 组的 miRNA 测序结果得到 32 个差异表达的 miRNAs。将上述差异表达的 lncRNA、miRNA 与 mRNA 建立相关 miRNA-mRNA、miRNA-lncRNA 关系对,结合呈正相关表达的 lncRNA-mRNA 建立有统计学意义的 miRNA 的海绵吸附作用的调控网络,得到由 87 个 mRNA,16 个 miRNA,33 个 lncRNA 构成的 ceRNA 网络(图 4)。其中 NONRATT027642.2 和 rno-miR-92a-1-5p 分别在 lncRNA 类别和 mRNA 类别中节点值最高。ceRNA 网络中 87 个 mRNA 的 GO 功能富集

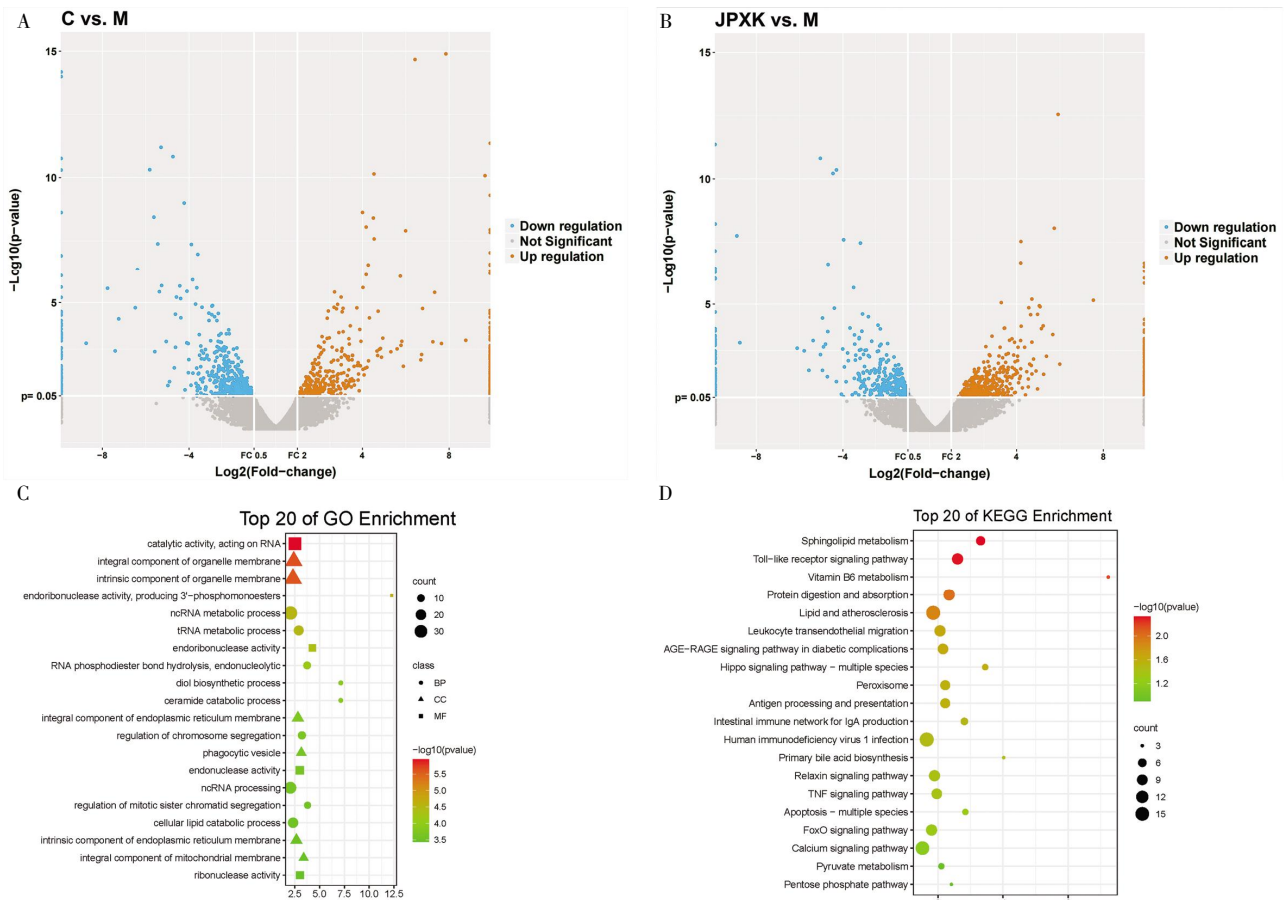


图 1 DE-lncRNAs 和功能富集分析

注:A. M 组和 C 组之间的 DE-lncRNAs 的火山图(红点代表上调 lncRNAs,蓝点代表下调 lncRNAs,灰色点代表无显著差异的 lncRNAs);B.差异分析的火山图 M 组和 JPXK 组之间的 DE-lncRNAs;C. M 组与 JPXK 组之间 DE-lncRNAs 的 GO 富集分析;D. M 组与 JPXK 组之间 DE-lncRNAs 的 KEGG 富集分析。

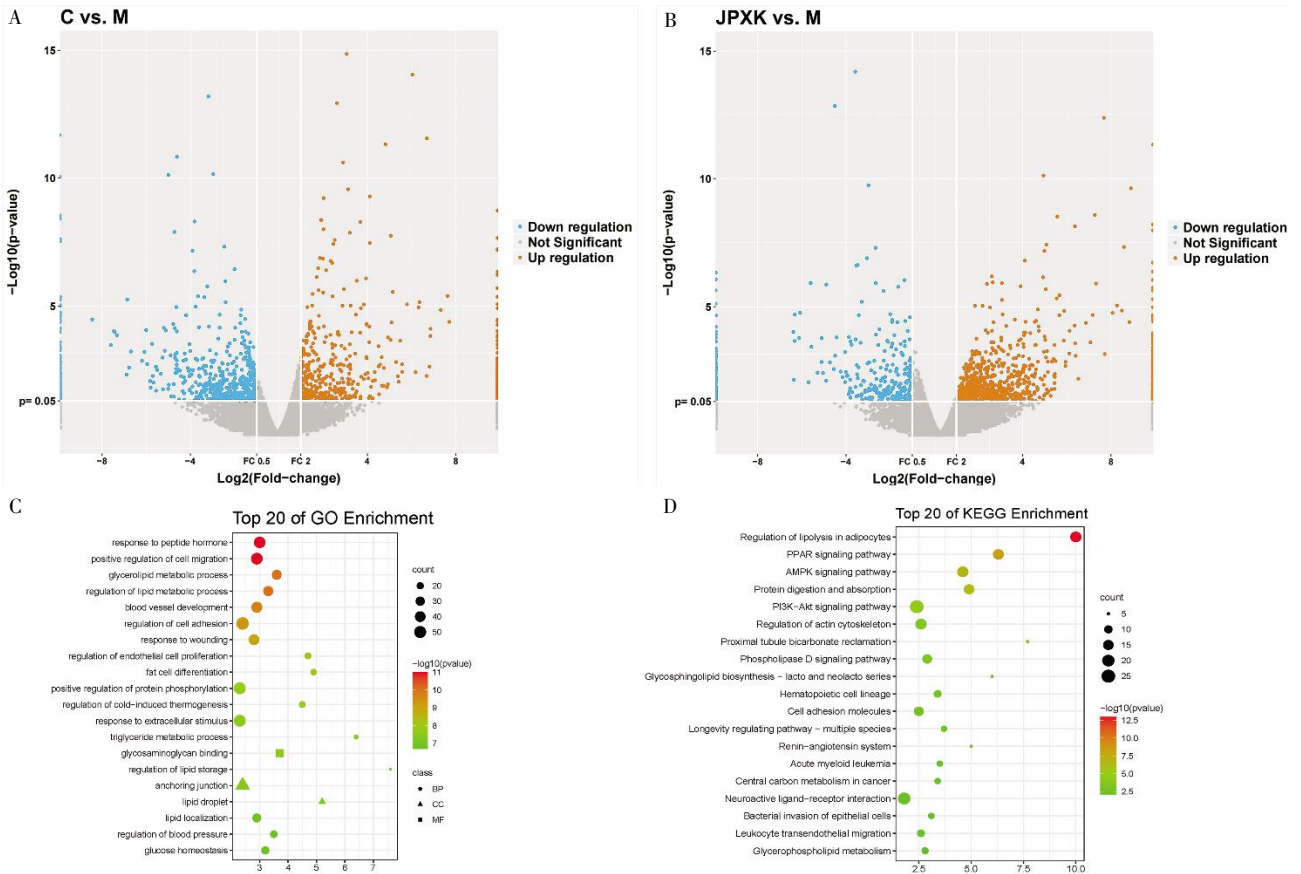


图 2 DE-mRNAs 和功能富集分析

注: A. M 组和 C 组之间的 DE-mRNAs 的火山图(红点代表上调 mRNAs, 蓝点代表下调 mRNAs, 灰色点代表无显著差异的 mRNAs); B. 差异分析的火山图 M 组和 JPXK 组之间的 DE-mRNAs; C. M 组与 JPXK 组之间 DE-mRNAs 的 GO 富集分析; D. M 组与 JPXK 组之间 DE-mRNAs 的 KEGG 富集分析。

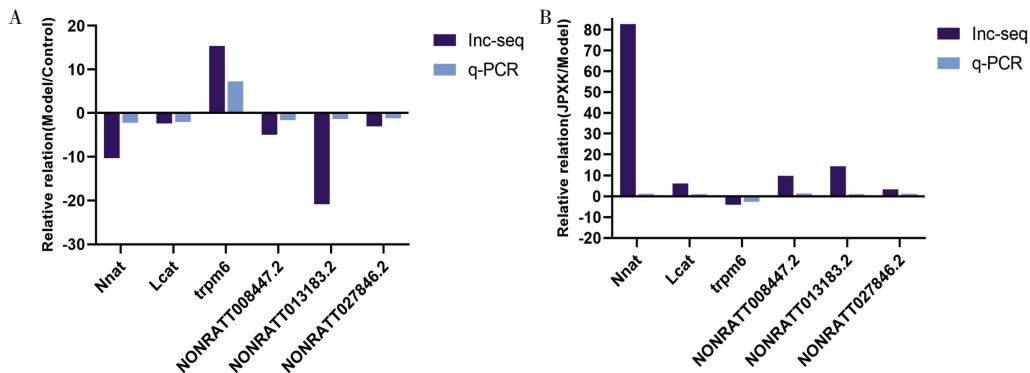


图 3 qRT-PCR 结果

注:将 3 个 DE-lncRNA 和 3 个 DE-mRNA 的 qRT-PCR 结果与测序结果进行比较。横坐标表示 lncRNA 和 mRNA 的名称,纵坐标表示相对关系。

的生物过程主要为脂肪细胞分化、蛋白酪氨酸/苏氨酸磷酸酶活性、棕色脂肪细胞分化和葡萄糖跨膜转运的正调控等。KEGG 富集通路主要为丙酸、丙酮酸、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、蛋白质消化吸收、酪氨酸代谢、IR、AMPK 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路等,详见图 5。其中丙酸代谢信号通路富集程度最高,故选取此通路绘制通路图,见图 6。有色节

点代表健脾消渴方治疗 T2DM 的差异靶标富集在该条通路上的靶点,靶点对于此通路发挥下调作用选取绿色显示,上调用红色表示。图 6 结果表明,健脾消渴方治疗 T2DM 差异靶点在本条通路中的数个位点均显示下调作用,由此可知健脾消渴方可能通过调控多条信号通路、干预一条通路中的多个靶点,进而影响了胰腺功能和 T2DM 的病情进展。

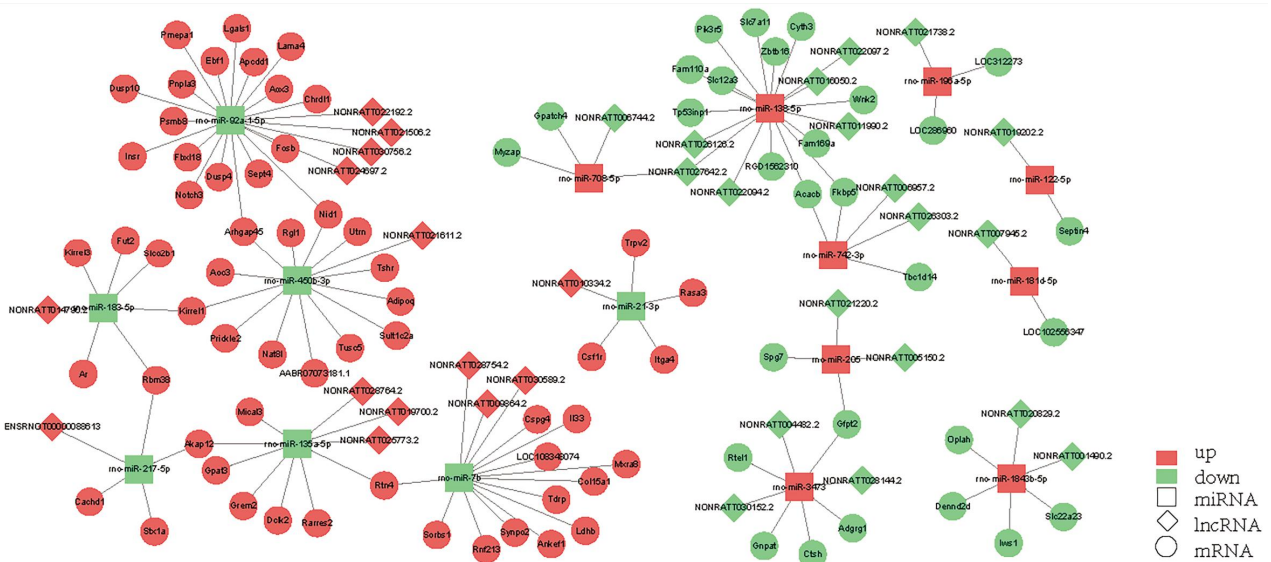


图4 lncRNA-miRNA-mRNA 转录网络

注:方形代表 miRNA;菱形代表 lncRNA;圆圈代表 mRNA。红色代表表达上调,绿色代表表达下调。线条表明这两个基因之间存在靶向调节关系。

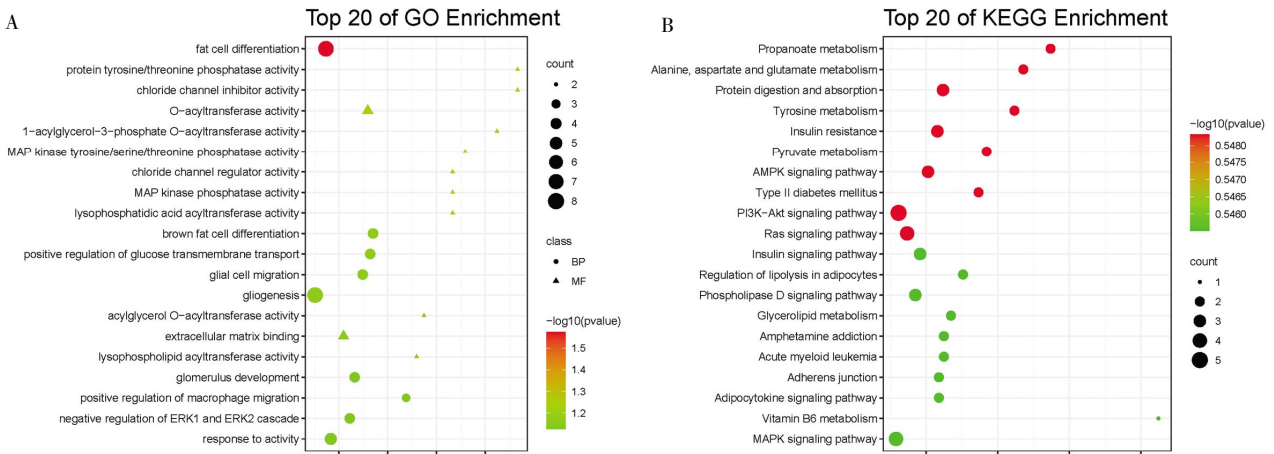


图5 ceRNA 网络中 mRNAs 功能富集分析

注:A. mRNAs 的 GO 富集分析;B. mRNAs 的 KEGG 富集分析。

2.6 PPI 网络分析与构建

为显示各个靶点之间的关联性,将 ceRNA 网络中 mRNA 基因数据导入 STRING 数据库进行 PPI 分析和调试。分析过程中将互动分数设定为高可信度,借助 Cytoscape 3.7.2 软件运用节点网络分析的可视化处理获取 PPI 网络图。mRNA 之间的相互关系如图 7 所示。由图 7 可知,PPI 网络图共 82 个节点,30 条关系路线边组成,PPI 富集 P 值为 0.000163, Degree 值变大则连接线段也随之增粗。

3 讨论

根据病因病机和临床表现特点,T2DM 应属于中医学“消渴病”,又称为“消中”“热中”“脾瘕”和“消瘕”等,历代医家多持“阴虚燥热”为传统立论依据。

在当前社会经济环境与饮食等因素的影响下,T2DM 肥胖患者比例在患病人群基数中逐年升高,近代医家又从脏腑和气血津液等方面丰富和发展了消渴病的病机理论和相关辨证要点,尤其强调了“健脾”之法的重要地位^[7-8]。课题组结合临床实践治疗 T2DM 脾虚血瘀证的诊治,创立健脾消渴方。方中重用黄芪为君,健益脾气,使气充以助运化;臣以黄连、生地黄和天花粉清热解渴与滋养阴液并重,有清脾胃伏火而不伤阴之妙;佩兰芳香化湿,可佐君药黄芪醒脾开胃、分清化浊;辅以川牛膝补益肝肾、活血祛瘀,培补先天肾阴以滋后天之脾,使邪去正复。临床研究表明,健脾消渴方在控制患者血糖水平、提高 FINS、降低 IR 等方面疗效显著^[9-10]。

lncRNA 在 DNA 复制、DNA 转录、RNA 翻译和

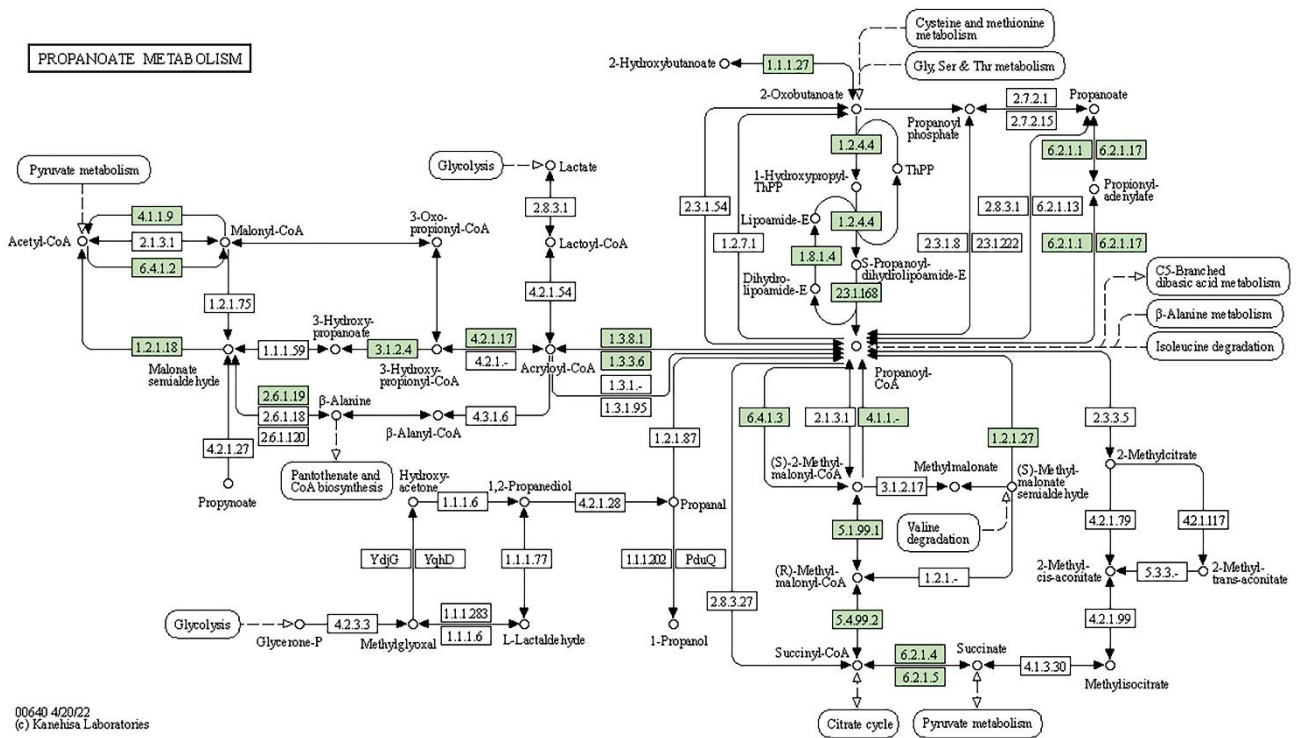


图 6 丙酸代谢信号通路图

注:绿色表示靶点对于此通路发挥下调作用,红色表示上调。

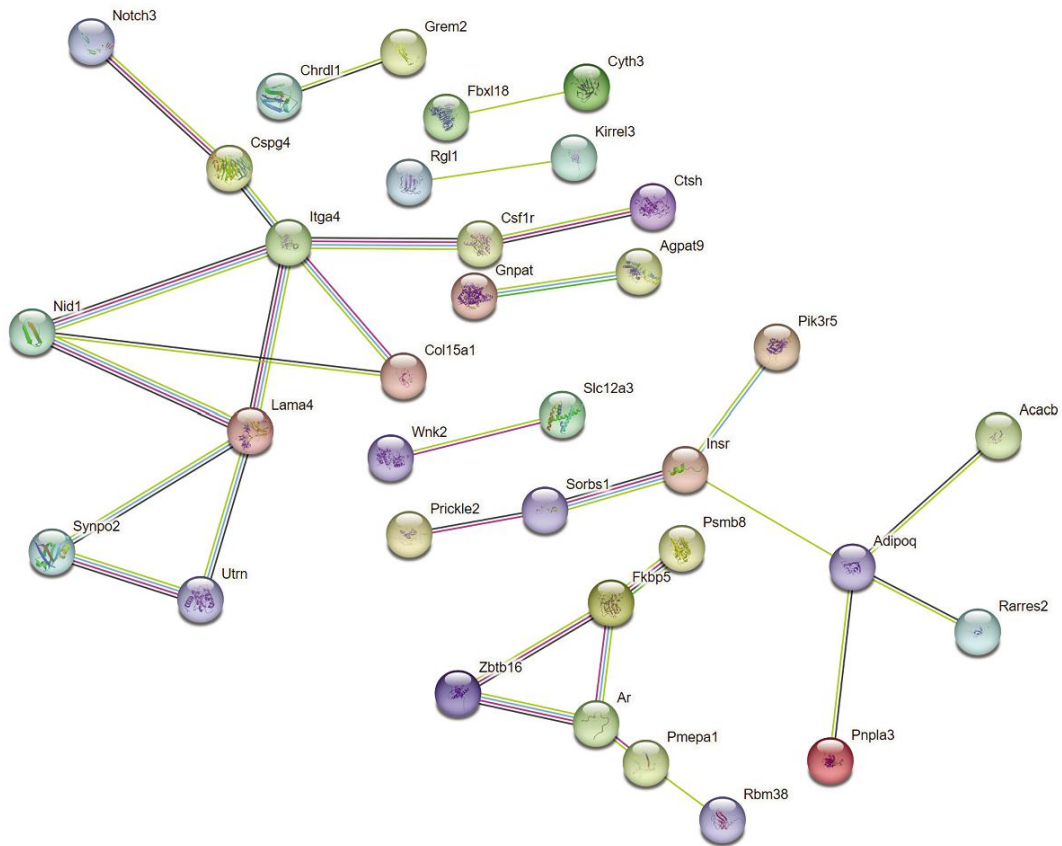


图 7 ceRNA 网络中 mRNAs 的 PPI 网络图

RNA 剪接等基因调控过程中起着重要作用^[11]。lncRNA 通过修饰调节转录过程在 T2DM 中发挥作用,还可通过多种信号通路直接上调或下调炎症因

子的表达影响胰岛 β 细胞的氧化应激或凋亡^[12]。基于高通量测序探讨整个转录组水平的药物靶向作用位点已广泛运用于定位中医证候特征性标志物和中

药疗效机制的研究中,有助于针对中药复方药物复杂性特点阐明作用机制。目前,尚未见健脾消渴方对 T2DM 大鼠胰腺组织 ceRNA 网络的相关研究报道。本研究结果表明,健脾消渴方具有降低 FBG、GC 和提升 FINS 的作用,显著改善胰岛素分泌。此外,还发现了 354 个差异表达的 lncRNAs 和 590 个差异表达的 mRNAs,可能涉及健脾消渴方治疗 T2DM 的作用机制。本研究基于高通量测序结果与生物信息学分析构建健脾消渴方干预的 T2DM 大鼠胰腺 lncRNA-miRNA-mRNA 三元转录网络,进一步探究健脾消渴方多靶点协同治疗 T2DM 的作用机制。

本研究发现 T2DM 模型大鼠经健脾消渴方干预后有 354 个 DE-lncRNAs(上调 DE-lncRNAs177个、下调 DE-lncRNAs177 个)。mRNA 作为 lncRNA 分子功能的下游效应器,从健脾消渴方干预后的结果中筛选出共 590 个 DE-mRNAs,其中 462 个上调、128 个下调。为证明测序结果的准确性,本研究挑选了 6 个与 T2DM 病情进展密切相关的 lncRNA 与 mRNA 进行验证。通过对 DE-lncRNAs 及 DE-mRNAs 的潜在功能进一步的 GO 和 KEGG 通路富集分析,预测结果表明健脾消渴方抗 T2DM 的作用机制主要涉及细胞器膜的组成、RNA 代谢的各类调控和糖脂代谢等生物功能以及鞘脂代谢、脂肪细胞脂解的调节、Toll 样受体信号通路、PPAR 信号通路、AMPK 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、FoxO 信号通路、PI3K-Akt 信号通路和糖酵解相关代谢途径。

线粒体和内质网是与血糖水平调控相关的两种重要细胞器,二者共享结构和功能通信以维持细胞环境稳态^[13-14]。线粒体相关内质网膜(mitochondria-associated membranes, MAM)是两种细胞器之间密切的接触区域,在细胞信号传导、代谢物运输和细胞凋亡等各种细胞过程中起着重要作用,其中就包括参与胰岛素相关信号通路^[13-14]。研究表明,MAM 可能是胰岛素信号传导的关键调节剂,参与人体不同组织的 IR^[14]。脂质代谢异常也是 T2DM 病情进展的关键因素之一,有 72%~85%的 T2DM 患者存在脂质代谢紊乱并主要表现为脂蛋白异常和甘油三酯(triglyceride, TGs)增加、脂蛋白动力学改变^[15-16]。在大多数 T2DM 患者中,极低密度脂蛋白、高密度脂蛋白等脂蛋白代谢异常通常与 IR 有关,脂蛋白脂肪酶、胆固醇酯转移蛋白和肝脂肪酶的活性受其影响^[17]。上述报道表明细胞器膜的组成和糖脂代谢等生物功

能具有改善 IR 和恢复胰岛素分泌的作用,也验证了本研究的准确性。同时 KEGG 富集显示鞘脂代谢与脂肪细胞脂解调节等信号通路,或与健脾消渴方治疗 T2DM 相关,关于健脾消渴方对 T2DM 患者脂质代谢的具体机制作用值得进一步研究。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)信号通路是影响胰腺内免疫稳态的经典通路,TLR 是控制炎症和免疫反应的关键调节因子,在炎症介导的 IR 的发病机制中具有重要作用。研究表明单核和巨噬细胞通过该信号通路激活 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎细胞因子不利于葡萄糖摄取和脂肪酸代谢,激活 I κ B 激酶- β 和 c-Jun 氨基末端激酶减少胰岛素受体底物,在过分驱动的代谢变化中导致 IR 的发生^[18-20]。

课题组前期研究发现,健脾消渴方可通过 AMPK/mTOR 信号通路提高胰岛 β 细胞功能^[21],这与本研究 KEGG 通路富集结果一致。此外,进一步的富集分析显示,构建的该 ceRNA 调控网络与脂肪细胞分化、葡萄糖跨膜转运的正调控、丙酸代谢和丙酮酸代谢等多种生物途径有关。同时,网络中的 mRNA 相关 PPI 网络分析结果也显示出较强的相互作用关系。本文研究结果也印证了中药通过体内的整体作用网络实现对 T2DM 治疗的学术观点。丙酸是一种短链脂肪酸,通过诱导饱腹激素减少食物摄入量及抑制与脂肪酸合成相关的基因表达限制肝脏中脂质的积累^[22]。研究表明,T2DM 患者肠道微生物群以及血清中丙酸生产较常人有所增加;体外实验中丙酸处理还可诱导脂肪细胞自噬,并抑制 mTOR 信号传导,故丙酸代谢异常引起丙酸积累可能会影响胰岛素敏感性^[23]。健脾消渴方可能通过改善丙酸代谢防止脂肪细胞过分自噬及肝脏脂肪变性,防止 T2DM 发生进一步恶化。本研究亦显示该网络中节点值最高的 NONRATT027642.2 和 rno-miR-92a-1-5p 可能是健脾消渴方干预 ceRNA 海绵靶向调控下游因子的关键,进而参与丙酸代谢和糖脂代谢等信号通路,影响 T2DM 的进展过程。但针对 NONRATT027642.2 和 rno-miR-92a-1-5p 有关的 ceRNA 轴仍需进一步的实验验证。

综上所述,本研究以 T2DM 大鼠为研究对象,以健脾消渴方对胰腺组织 lncRNA 及 mRNA 表达谱的影响为基础构建 lncRNA-miRNA-mRNA 三元转录网络。这些差异基因作为潜在的药物作用靶点能够影响多条信号通路发挥治疗 T2DM 的作用,为以后的研究提供了理论基础和方向。

参考文献

- [1] 李红, 谭年花, 陈斌, 等. 中医体质类型与2型糖尿病相关性的系统评价[J]. 中医药导报, 2021, 27(11): 211-216.
- [2] 安文蓉, 徐云生, 黄延芹. 基于数据挖掘的健脾消渴方治疗2型糖尿病临床特点与规律分析[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(2): 191-194.
- [3] GONZALEZ-MORO I, SANTIN I. Long non-coding RNA-regulated pathways in pancreatic beta cells: Their role in diabetes[J]. International Review of Cell and Molecular Biology, 2021, 359: 325-355.
- [4] YANG F, CHEN Y, XUE Z, et al. High-throughput sequencing and exploration of the lncRNA-circRNA-miRNA-mRNA network in type 2 diabetes mellitus[J]. Biomed Research International, 2020, 2020: 8162524-8162536.
- [5] MATBOLI M, KAMEL M M, ESSAWY N, et al. Identification of novel insulin resistance related ceRNA network in T2DM and its potential editing by CRISPR/Cas9[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(15): 8129-8144.
- [6] HUANG Y, LI J, CHEN S, et al. Identification of potential therapeutic targets and pathways of Liraglutide against type 2 diabetes mellitus (T2DM) based on long non-coding RNA (lncRNA) sequencing[J]. Medical Science Monitor, 2020, 26: e922210-e922222.
- [7] 王尧尧. 中医从脾论治消渴病研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(17): 137-140.
- [8] DOU Z, XIA Y, ZHANG J, et al. Syndrome differentiation and treatment regularity in traditional chinese medicine for type 2 diabetes: A text mining analysis[J]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 728032-728042.
- [9] 马英琦. 健脾消渴方治疗2型糖尿病疗效观察及调节胰岛β细胞自噬实验研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
- [10] 罗丹, 黄杰, 房国伟, 等. 基于“肠-胰轴”的健脾消渴方对代谢综合征患者胰岛β细胞功能的影响研究[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(8): 1118-1123.
- [11] BRIDGES M C, DAULAGALA A C, KOURTIDIS A. LNCcation: lncRNA localization and function[J]. Journal of Cell Biology, 2021, 220(2): e202009045-e202009061.
- [12] HUANG L, HU X. Molecular mechanisms and functions of lncRNAs in the inflammatory reaction of diabetes mellitus[J]. International Journal of Endocrinology, 2021, 2021: 2550399-2550412.
- [13] LEE J H, LEE J. Endoplasmic reticulum (ER) stress and its role in pancreatic beta-cell dysfunction and senescence in type 2 diabetes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(9): 4843-4864.
- [14] BEAULANT A, DIA M, PILLOT B, et al. Endoplasmic reticulum-mitochondria miscommunication is an early and causal trigger of hepatic insulin resistance and steatosis[J]. Journal of Hepatology, 2022, 77(3): 710-722.
- [15] ATHYROS V G, DOUMAS M, IMPRIALOS K P, et al. Diabetes and lipid metabolism[J]. Hormones (Athens), 2018, 17(1): 61-67.
- [16] KANE J P, PULLINGER C R, GOLDFINE I D, et al. Dyslipidemia and diabetes mellitus: Role of lipoprotein species and interrelated pathways of lipid metabolism in diabetes mellitus[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2021, 61: 21-27.
- [17] WOLKOWICZ P, WHITE C R, ANANTHARAMAIAH G M. Apolipoprotein mimetic peptides: An emerging therapy against diabetic inflammation and dyslipidemia[J]. Biomolecules, 2021, 11(5): 627-635.
- [18] MORAES-VIEIRA P M, YORE M M, SONTHEIMER-PHELPS A, et al. Retinol binding protein 4 primes the NLRP3 inflammasome by signaling through Toll-like receptors 2 and 4[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(49): 31309-31318.
- [19] ROGERO M M, CALDER P C. Obesity, Inflammation, Toll-Like receptor 4 and fatty acids[J]. Nutrients, 2018, 10(4):432-450.
- [20] MOHAMMAD S, THIEMERMANN C. Role of metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 594150.
- [21] 安文蓉. 健脾消渴方治疗T2DM临床观察及通过AMPK/mTOR通路调节胰岛β细胞功能的实验研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- [22] ALHABEED H, ALFAIZ A, KUTBI E, et al. Gut hormones in health and obesity: The upcoming role of short chain fatty acids[J]. Nutrients, 2021, 13(2): 481-500.
- [23] JIA Z, CHEN X, CHEN J, et al. ACS3 in brown fat drives propionate catabolism and its deficiency leads to autophagy and systemic metabolic dysfunction[J]. Clinical and Translational Medicine, 2022, 12(2): e665-e687.

(本文编辑 苏维)