Archive

BRIEF REPORT

The Association between rs4541843 Polymorphism in miR-182 and Diabetes Mellitus

Arezoo Abdi[1],
Maryam Peymani[2]

[1] MSc in Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

(Received July 1, 2019 ; Accepted April 5, 2020)

Abstract

Background and purpose: Diabetes Mellitus is one of the most common endocrine diseases. The prevalence of type 2 diabetes is higher than other types, accounting for 85-90% of all diabetic cases. The current research aimed at investigating the association between rs4541843 in miR-182 and type 2 diabetes.

Materials and methods: In this case-control study, healthy individuals (n=196) and type 2 diabetic patients (n=199) were randomly selected from a target population in Isfahan, Iran. The genotypes for the polymorphism were determined by PCR-RFLP method and the results were confirmed by sequencing. Then, the frequency of the genotypes and alleles were analyzed to determine the association between rs4541843 in miR-182 and the risk of type 2 diabetes, sex, and age at disease onset.

Results: The study showed no significant difference between different genotypes in healthy individuals and diabetic patients ($P<0.05$). Also, no significant association was found between different genotypes of this polymorphism and risk of diabetes considering GG genotype as the reference genotype ($P< 0.05$).

Conclusion: Due to the lack of association between the rs4541843 in miR-182 and risk of diabetes in this population, this polymorphism cannot be used to screen diabetic patients in the target population. Further studies are needed to evaluate the importance of this polymorphism in different populations.

Keywords: type 2 diabetes, polymorphism, miR-182

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (185): 137-142 (Persian).

*** Corresponding Author: Maryam Peymani -** Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
(E-mail: Peymani62_m@yahoo.com)

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 5th 2020

Archive of SID

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 185 خرداد سال 1399 (142-137)

ارتباط پلی مورفیسم rs4541843 در ژن کد کننده miR-182 با بروز دیابت نوع دو در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو

آرزو عبدی[1]
مریم پیمانی[2]

چکیده

سابقه و هدف: دیابت ملیتوس شایع‌ترین بیماری اندوکرین است. در بین انواع دیابت، شیوع دیابت نوع دو بیش‌تر بوده و 90-85 درصد از کل موارد دیابت را شامل می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs4541843 در miR-182 با دیابت نوع دو در جمعیت اصفهان انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد- شاهدی، 196 فرد سالم و199 فرد بیمار دیابتی نوع 2 به‌طور تصادفی از جمعیت مورد نظر انتخاب شدند. ژنوتیپ افراد برای پلی‌مورفیسم مورد نظر با روش PCR-RFLP تعیین و جهت تائید نتایج، تعدادی از نمونه‌ها سکانس شد. سپس فراوانی ژنوتیپ‌ها و به دنبال آن، فراوانی آلل‌ها به منظور به‌دست آوردن ارتباط این پلی‌مورفیسم با خطر ابتلا به دیابت نوع دو، جنس و سن بروز بیماری، آنالیز گردید.

یافته‌ها: اختلاف معناداری بین انواع ژنوتیپ‌ها در دو جمعیت سالم و بیمار وجود ندارد و ژنوتیپ‌های مختلف این پلی‌مورفیسم با در نظر گرفتن ژنوتیپ GG به عنوان ژنوتیپ مرجع، با خطر ابتلا به دیابت در سطح P<0/05 ارتباط معنی‌داری ندارند.

استنتاج: با توجه به عدم ارتباط پلی مورفیسم مورد نظر با خطر ابتلا به دیابت در این جمعیت، از این پلی مورفیسم نمی‌توان برای غربالگری بیماران دیابتی در جمعیت مورد نظر استفاده نمود. مطالعات بیش‌تر در زمینه ارزیابی اهمیت این پلی‌مورفیسم در جمعیت‌های مختلف ضروری است.

واژه های کلیدی: دیابت نوع دوم، پلی مورفیسم، miR-182

مقدمه

دیابت ملیتوس یک مشکل بهداشت جهانی است و تا سال 2030 تخمین زده می‌شود که450 میلیون نفر بیمار دیابتی وجود داشته باشد (3-1). به هر حال نیاز اساسی برای درک بهتر در زمینه مکانیسم‌های شروع و پیشرفت بیماری برای توسعه استراتژی‌های درمان دیابت ضروری به نظر می‌رسد (4). شناسایی بیومارکرهای اختصاصی از جمله miRNA ها که بتواند موجب تشخیص زود هنگام شود، انقلابی در درمان خواهد بود (3-1).

براساس نتایج مطالعات، تعداد زیادی از miRNA ها در انسان‌های مبتلا به دیابت نوع دو در مقایسه با افراد کنترل اختلاف بیان نشان داده‌اند(5-3).

مولف مسئول: مریم پیمانی - شهرکرد: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه E-mail: Peymani62_m@yahoo.com
1. کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
2. استادیار، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
تاریخ دریافت : 1398/4/10 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/4/18 تاریخ تصویب : 1399/1/17

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 5th 2020

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 5th 2020

miR-182 در انسان در موقعیت 7q32.2 از طریق هدف قرار دادن FOXO3 و FOXO1 در بیماری‌های کلیوی و دیابت و سرطان نقش ایفا می‌کند(6-4).

چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP:single-nucleotide polymorphism) یک تنوع ژنتیکی بسیار شناخته شده در ژنوم انسان می‌باشد که به عنوان یک نشانگر مولکولی به منظور پیش‌بینی، تشخیص و درمان بیماری‌هایی هم‌چون دیابت معرفی می‌شود(7). محققان دریافته‌اند که SNP های موجود در miRNA و یا مرتبط با بیوژنز آن‌ها ممکن است در پاسخ‌های درمانی و پیش‌بینی بیماری‌ها موثر باشند و گاهی SNP در نواحی کناری توالی miRNA نیز می‌تواند در مکانیسم عمل miRNA نقش تنظیمی ایفا کند(8). اگرچه چندین مطالعه در زمینه بیان و عملکرد miR-182 در دیابت نوع دو انجام شده است، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه ارتباط پلی مورفیسم rs4541843 در 28 نوکلئوتید پایین دست توالی ژن miR-182 با دیابت نوع دو انجام نشده است. این پلی مورفیسم در ژنوم انسان روی لوکوس کروموزومی 7q32.2 قرار دارد و با تغییر نوکلئوتیدی A/G در این ناحیه همراه است(9). هدف مطالعه حاضر، بررسی ارتباط بین rs4541843 در 28 نوکلئوتید پایین دست توالی ژن با خطر بروز دیابت نوع دو در جمعیت اصفهان می‌باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه مورد- شاهدی، پس از تائید و تصویب کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شناسه IR.IAU.SHK.REC.1398.015، بر روی 199 بیمار دیابتی نوع 2 و 196 فرد سالم انجام پذیرفت (قابل ذکر است انتخاب این تعداد نمونه، براساس امکانات و دسترسی محدود به نمونه‌ها بوده است.). به افراد دیابتی مراجعه‌کننده به آزمایشگاه بیمارستان الزهرای اصفهان و شرکت‌کننده در مطالعه، آگاهی کافی داده شد و رضایت جهت انجام مطالعه اخذ گردید. خصوصیات افراد شرکت‌کننده در این مطالعه و خصوصیات کلینیکی مورد نظر در جمعیت بیماران به‌ترتیب در جدول‌های شماره 1 و 2 نمایش داده شده است.

جدول شماره 1: مشخصات جمعیت مورد مطالعه

مشخصات	گروه شاهد	گروه مبتلا به بیماری دیابت	سطح معنی‌داری
تعداد نمونه ها	196	199	----
مرد	62	68	0/999
زن	126	125	1/000
تعداد افرادی که اطلاعات جنسیت آن ها در دسترس نبود	8	6	----
دامنه سنی (برای افرادی که در هر گروه اطلاعات سنی آن ها در دسترس بود)	34-91 ۵۸/۷۶۷ ±11/75	89-30 ۵۹/۰۸ ±11/39	0/793

جدول شماره 2: توزیع متغیر های بالینی و بیوشیمیایی در بیماران دیابتی نوع 2 و افراد سالم

شاخص	افراد دیابتی نوع 2	افراد سالم
قند خون ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر)	189/80 ±5/395	83/07 ±8/90
کلسترول (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	211/76 ±44/65	188/01 ±38/55
تری گلیسیرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	250 ±20	160 ±37
هموگلوبین گلیکوزیله (درصد)	7/3 (6/72 -8)	5 (4/9 -5/2)

گروه کنترل از بین افراد سالم که معیارهای ابتلا به دیابت نداشتند و از لحاظ سن (5±) و جنس با گروه بیمار، همسان سازی شده بودند، به طور تصادفی انتخاب شدند. ابتلا به دیابت با معیار های سازمان جهانی بهداشت (WHO)، تعریف شده است (10).

از هر یک از افراد تحت مطالعه پس ازا ندازه‌گیری مقدار تری‌گلیسرید (TG)، قند خون ناشتا (FBS)، هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) و کلسترول سرم با روش‌های استاندارد آزمایشگاهی، به میزان 5 میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد. استخراج DNA ژنومی از سلول‌های گلبول سفید خون افراد مورد آزمایش با استفاده از کیت استخراج DNA (Genet bio، کره- K2000) و تعیین ژنوتیپ نمونه ها با استفاده از روش PCR-RFLP صورت گرفت. در ابتدا با استفاده از توالی پرایمر رفت 5'-CCAGTTCCCTCACTCCTCGAT-3' و توالی پرایمر برگشت 5'-TGGCAATGGTAGAACTCACACT-3' تکثیر نمونه‌ها انجام شد. مواد لازم جهت انجام واکنش PCR (دستگاه ترموسیکلر اپندرف) در حجم

www.SID.ir

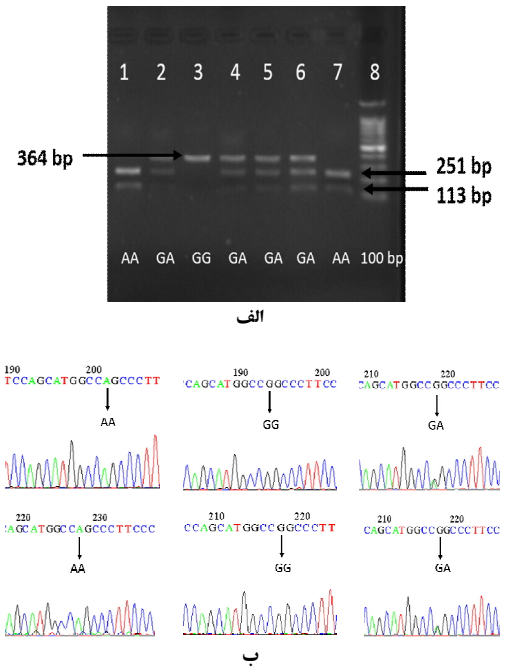
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 5th 2020

15 میکرولیتر شامل 1 میکرولیتر DNA ژنومی، 5 میکرولیتر آب دیونیزه، 7/5 میکرولیتر مستر میکس 2X (Ampliqon، دانمارک - A301803) و 0/75میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت (2 pmol) بود. مراحل انجام آزمایش با برنامه دمایی دناتوراسیون اولیه در 94 °C به مدت 5 دقیقه، 35 سیکل با برنامه 94°C برای 0/5 دقیقه، 62°C به مدت 1دقیقه، 72° C برای 0/5 دقیقه و در نهایت طویل سازی نهایی در دمای 72°C به مدت 7دقیقه انجام شد. RFLP بر روی محصولات PCR برای چند شکلی rs4541843 توسط آنزیم *MSCI* (Fermentas، آمریکا - ER1211) مطابق دستور شرکت تولیدکننده آنزیم انجام گرفت. سپس قطعات حاصل از RFLP بر روی ژل آگارز 1 درصد مشاهده گردید. به منظور مقایسه فراوانی آللی و ژنتیکی بین دو گروه بیمار و سالم آنالیز نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS *v*.23 با تست آماری رگرسیون لجستیک انجام شد و ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف مربوط به پلی‌مورفیسم مورد نظر با بروز بیماری دیابت در سطح کم‌تر از 0/05 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها و بحث

گروه سالم و بیمار در یک رده سنی قرار داشتند و اختلاف فراوانی نمونه‌های زن و مرد بین دو گروه سالم و بیمار و همچنین دامنه سنی دو جمعیت سالم و بیمار معنی‌دار نبود (جدول شماره 1). هر دو گروه کنترل و بیمار از نظر شرایط تعادل هاردی - واینبرگ با درجه آزادی یک، در حال تعادل بودند. پس از تعیین کیفیت DNA های استخراج شده و تکثیر آن‌ها، جهت تعیین ژنوتیپ هر یک از نمونه‌ها، محصولات PCR، تحت آنالیز با RFLP به وسیله آنزیم *MSCI* قرار گرفتند. قطعاتی با اندازه‌های 113 و 251 جفت باز نشان دهنده ژنوتیپ AA، قطعاتی با اندازه‌های 364، 113 و 251 جفت باز نشان‌دهنده ژنوتیپ GA و قطعاتی با اندازه‌های 364 جفت باز نشان‌دهنده ژنوتیپ GG بودند. همچنین نتایج حاصل از سکانس، ژنوتیپ‌های تعیین شده برای نمونه‌های مورد نظر را تائید نمود (تصویر شماره ۱–الف).



تصویر شماره 1: الف: نتیجه الکتروفورز تعدادی از محصولات PCR تیمار شده با آنزیم MscI .ب: نتیجه سکانس تعدادی از نمونه ها جهت تائید نتایج هضم آنزیمی

بررسی توزیع فراوانی آللی در دو گروه سالم و بیمار براساس جدول شماره 3 نشان داد که آلل A به عنوان آلل ریسک در هر دو گروه، دارای کم‌ترین فراوانی می‌باشد (به ترتیب 43/8 و 44/23 درصد). فراوانی آللی و ژنوتیپی در دو گروه بیمار و سالم دارای تفاوت معنی‌دار نبود و هیچ یک از ژنوتیپ‌های مشاهده شده این پلی‌مورفیسم نسبت به ژنوتیپ GG به عنوان ژنوتیپ مرجع، در این جمعیت با خطر ابتلا به دیابت در سطح P<0/05 ارتباط معناداری نداشت. همچنین ارتباط معنی‌داری در سطح P<0/05 بین فراوانی ژنوتیپ‌ها با سن بروز دیابت (جدول شماره 4) و در جمعیت‌های زنان و مردان بیمار به تفکیک جنسیت وجود نداشت (جدول شماره 5).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 5th 2020

جدول شماره 3: ارتباط پلی مورفیسم rs4541843 G>A و خطر بروز بیماری دیابت

rs4541843	بیمار تعداد (درصد)	کنترل تعداد (درصد)	OR (95% CI)	سطح معنی‌داری
ژنوتیپ				
GG	(29/15)58	(31/6)62	1	-
AG	(53/27)106	(49)96	1/18 (0/751 - 1/855)	0/472
AA	(17/58)35	(19/4)38	0/985 (0/550 - 1/762)	0/958
آلل				
G	(55/77)222	(56/12)220	1	-
A	(44/23)176	(43/88)172	1/014 (0/766 - 1/434)	0/923

Ratio; CI, confidence interval.

جدول شماره 4: ارتباط پلی مورفیسم rs4541843 G>A با سن بروز بیماری دیابت (در جمعیت بیمار برای افرادی که اطلاعات سن آن ها در دسترس بود)

rs4541843	50 > تعداد (درصد)	50 < تعداد (درصد)	OR (95% CI)	سطح معنی‌داری
ژنوتیپ				
GG	(26)9	(31)11	1	-
AG	(48)17	(50)15	0/882 (0/278 - 2/803)	0/822
AA	(26)9	(29)9	1/222(0/341 - 4/381)	0/758
آلل				
G	(50)35	(53)37	1	-
A	(50)35	(47)33	0/892 (0/460 - 1/731)	0/735

جدول شماره 5: ارتباط فراوانی ژنوتیپ های پلی مورفیسم rs4541843 G>A با بروز بیماری دیابت به تفکیک جنسیت

rs4541843	بیمار تعداد (درصد)	کنترل تعداد (درصد)	OR (95% CI)	سطح معنی‌داری
ژنوتیپ (زنان)				
GG	(29)36	(31)39		-
AG	(52)65	(52)66	0/862 (0/437 - 1/698)	0/667
AA	(19)24	(17)21	0/808(0/385 - 1/694)	0/572
ژنوتیپ (مردان)				
GG	(31)21	(31)19	1	-
AG	(59)38	(45)28	2/262 (0/866 - 5/906)	0/096
AA	(10)9	(24)15	1/842 (0/655 - 5/178)	0/247

تاکنون مطالعات مختلفی به اهمیت نقش miR-182 در بروز دیابت و عوارض این بیماری در انسان و موش اشاره داشته‌اند (4، 7، 18-11). نتایج بررسی پایگاه داده dbSNP نیز نشان داد که به صورت میانگین، فراوانی عمومی آللی برای آلل A در پلی‌مورفیسم rs4541843 در جمعیت های مختلف، به صورت متفاوتی گزارش شده است (9). فراوانی آلل A در مطالعه حاضر نیز، 48/5 درصد به‌دست آمد که این تفاوت ها و شباهت ها در گزارشات را می‌توان به تفاوت‌ها و شباهت‌های قومیتی و نژادی جمعیت‌های مورد مطالعه نسبت داد.

این مطالعه گزارشی برای قبول و یا رد ارتباط بین پلی‌مورفیسم در 28 نوکلئوتید پایین دست توالی ژن miR-182 و خطر بروز دیابت نوع 2 در جمعیت اصفهان و کاربرد آن در علم پزشکی برای تعیین ژنوتیپ افراد و بررسی پر خطر بودن آن ها برای ابتلا به دیابت است و از آن‌جایی که ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد با مطالعات بیش‌تر در سایر جوامع می‌توان به نتیجه جامع‌تری در جهت غربال‌گری دست یافت.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد می‌باشد و از تمام افرادی که در جمع‌آوری نمونه‌های خون در این مطالعه یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

References

1. Chien HY, Lee TP, Chen CY, Chiu YH, Lin YC, Lee LS, et al. Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications. J Chin Med Assoc 2015; 78(4): 204-211.
2. Tang X, Tang G, Özcan S. Role of microRNAs in diabetes. Biochim Biophys Acta 2008; 1779(11): 697-701.
3. Poirier C, Desgagné V, Guérin R, Bouchard L. Micrornas in pregnancy and gestational diabetes mellitus: emerging role in maternal metabolic regulation. Curr Diab Rep 2017; 17(5): 35.
4. Hudson MB, Rahnert JA, Zheng B, Woodworth-Hobbs ME, Franch HA, Russ Price S .miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol 2014; 307(4): C314-C319.
5. Rome S. Are extracellular microRNAs involved

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 5th 2020

in type 2 diabetes and related pathologies? Clin Biochem 2013; 46(10-11): 937-945.

6. Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. J Biol Che 2009; 284: 23204-23216.
7. Yu H, Liu Y, Bai L, Kijlstra A, Yang P. Predisposition to Behçet's disease and VKH syndrome by genetic variants of miR-182. J Mol Med (Berl) 2014; 92(9): 961-967.
8. Hu Z, Shu Y, Chen Y, Chen J, Dong J, Liu Y, et al. Genetic Polymorphisms in the Precursor MicroRNA Flanking Region and Non–Small Cell Lung Cancer Survival. Am J Respir Crit Care Med 2011; 183(5): 641-648.
9. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res 2001; 29(1): 308-311.
10. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1 diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 1998; 15(7): 539-553.
11. Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. PloS One 2011; 6(8): e22839.
12. Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. Rna 2006; 12(9): 1626-1632.
13. Zhou J, Meng Y, Tian S, Chen J, Liu M, Zhuo M, et al. Comparative MicroRNA expression profiles of cynomolgus monkeys, rat, and human reveal that miR-182 is involved in T2D pathogenic processes. J Diabetes Res 2014; 2014: 760397.
14. Wang Y, Zhao X, Wu X, Dai Y, Chen P, Xie L. microRNA-182 mediates Sirt1-induced diabetic corneal nerve regeneration. Diabetes 2016; 65(7): 2020-2031.
15. Zhang D, Li Y, Yao X, Wang H, Zhao L, Jiang H, et al. miR-182 regulates metabolic homeostasis by modulating glucose utilization in muscle. Cell Rep 2016; 16(3): 757-768.
16. Gross D, Van den Heuvel A, Birnbaum M. The role of Fox142O in the regulation of metabolism. Oncogene 2008; 27(16): 2320.
17. Melkman Zehavi T, Oren R, Kredo Russo S, Shapira T, Mandelbaum AD, Rivkin N, et al. miRNAs control insulin content in pancreatic β cells via downregulation of transcriptional repressors. EMBO J 2011; 30(5): 835-845.
18. Jeon T-I, Esquejo RM, Roqueta-Rivera M, Phelan PE, Moon Y-A, Govindarajan SS, et al. An SREBP-responsive microRNA operon contributes to a regulatory loop for intracellular lipid homeostasis. Cell Metab 2013; 18(1): 51-61.

www.SID.ir