·论　　著·　　DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2024.15.008

1 型糖尿病患儿血清 miRNA-29 和 TRAF3 水平及临床意义*

李　侠[1]，高　宇[1]，李　江[2]，王建忠[1△]

秦皇岛市妇幼保健院：1. 儿科；2. 儿童保健科，河北秦皇岛 066000

摘　要：目的　探讨 1 型糖尿病（T1DM）患儿血清微小 RNA-29（miRNA-29）和肿瘤坏死因子受体相关因子 3（TRAF3）水平及临床意义。**方法**　选取 2021 年 6 月至 2023 年 1 月该院收治的 78 例 T1DM 患儿作为观察组，另选取同期 60 例健康儿童作为对照组。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测两组血清 miRNA-29 水平，采用酶联免疫吸附试验检测两组血清白细胞介素 6（IL-6）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、干扰素 γ（IFN-γ）、TRAF3 水平。采用多因素 Logistic 回归分析儿童 T1DM 发生的危险因素；绘制受试者工作特征（ROC）曲线分析 miRNA-29 和 TRAF3 辅助诊断儿童 T1DM 的价值，并计算曲线下面积（AUC）。**结果**　观察组 IL-6、TNF-α、IFN-γ、miRNA-29 和 TRAF3 水平均高于对照组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。T1DM 患儿血清 miRNA-29 和 TRAF3 与 IL-6、TNF-α、IFN-γ 均呈正相关（$P<0.05$）。T1DM 患儿血清 miRNA-29 与 TRAF3 呈正相关（$P<0.05$）。多因素 Logistic 回归分析结果显示，IL-6、TNF-α、IFN-γ、miRNA-29 和 TRAF3 水平升高均为儿童 T1DM 发生的独立危险因素（$P<0.05$）。ROC 曲线分析结果显示，miRNA-29 和 TRAF3 辅助诊断儿童 T1DM 的 AUC 分别为 0.866、0.798，均高于 IL-6（0.601）、TNF-α（0.687）、IFN-γ（0.572）。**结论**　miRNA-29、TRAF3 可能通过介导炎症损伤而参与 T1DM 的发生，二者有助于儿童 T1DM 的辅助诊断。

关键词：儿童；　1 型糖尿病；　微小 RNA-29；　肿瘤坏死因子受体相关因子 3；　辅助诊断

中图法分类号：R587.1；R446.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9455(2024)15-2177-04

Levels and clinical significance of serum miRNA-29 and TRAF3 in children with type 1 diabetes mellitus*

LI Xia[1]，*GAO Yu*[1]，*LI Jiang*[2]，*WANG Jianzhong*[1△]

1. *Department of Pediatrics*；2. *Department of Child Health*，*Qinhuangdao Maternal and Child Health Hospital*，*Qinhuangdao*，*Hebei* 066000，*China*

Abstract：Objective　To investigate the levels and clinical significance of serum microrNA-29 (miRNA-29) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3) in children with type 1 diabetes mellitus (T1DM). **Methods**　A total of 78 children with T1DM admitted to the hospital from June 2021 to January 2023 were selected as the observation group，and 60 healthy children during the same period were selected as the control group. The levels of serum miRNA-29 in the two groups were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. The levels of serum interleukin-6 (IL-6)，tumor necrosis factor-α (TNF-α)，interferon-γ (IFN-γ) and TRAF3 in the two groups were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Multivariate Logistic regression was used to analyze the risk factors of T1DM in children. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to analyze the value of miRNA-29 and TRAF3 in the auxiliary diagnosis of T1DM in children，and the area under the curve (AUC) was calculated. **Results**　The levels of IL-6，TNF-α，IFN-γ，miRNA-29 and TRAF3 in the observation group were higher than those in the control group，and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Serum miRNA-29 and TRAF3 were positively correlated with IL-6，TNF-α，and IFN-γ in children with T1DM ($P<0.05$). Serum miRNA-29 was positively correlated with TRAF3 in children with T1DM ($P<0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that the increase of IL-6，TNF-α，IFN-γ，miRNA-29 and TRAF3 levels were independent risk factors for T1DM in children ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that the AUC of miRNA-29 and TRAF3 in the auxiliary diagnosis of T1DM in children were 0.866 and 0.798 respectively，which were higher than those of IL-6 (0.601)，TNF-α (0.687)，and IFN-γ (0.572). **Conclusion**　miRNA-29 and TRAF3 may be involved in the development of T1DM by mediating inflammatory injury，and both of them are helpful for the auxiliary diagnosis of T1DM in children.

*　**基金项目：**秦皇岛市科学技术研究与发展计划（2021011A095）。

作者简介：李侠，女，主治医师，主要从事儿童 1 型糖尿病方面的研究。　△　**通信作者**，E-mail：18833569305@163.com。

Key words：children； type 1 diabetes； microRNA-29； tumor necrosis factor receptor-associated factor 3； auxiliary diagnosis mellitus

1 型糖尿病（T1DM）的发病率有逐渐上升的趋势，18%的新发患者为 9 岁以下儿童[1]。T1DM 严重影响儿童的生命健康，寻找早期诊断标志物具有重要临床意义。既往有研究发现，微小 RNA（miRNA）参与 T1DM 的发生和发展[2]。由于 miRNA 在外周血中表达的稳定性较好，并且 miRNA 异常改变常早于其他蛋白表达，因此可能成为 T1DM 诊断的标志物[3]。有研究发现，miRNA-145-5p 有助于 T1DM 的诊断，并且有助于早期预测血管并发症发生[4]。T1DM 的发生与胰岛 β 细胞炎症损伤有关[5]。miRNA-29 是一种与免疫炎症损伤密切相关的 miRNA[6]。miRNA-29 在糖尿病大鼠肝脏组织和胰腺组织中呈高表达[7]，并且可以通过肿瘤坏死因子受体相关因子 3（TRAF3）促进单核细胞和巨噬细胞募集和激活，进而造成胰岛 β 细胞炎症损伤[8]。miRNA-29、TRAF3 与 T1DM 的关系既往少有报道，为此，本研究分析了 T1DM 患儿血清 miRNA-29、TRAF3 水平及其临床意义，旨在为儿童 T1DM 的诊断和治疗提供新靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2021 年 6 月至 2023 年 1 月本院收治的 78 例 T1DM 患儿作为观察组，其中男 44 例，女 34 例；年龄 2～14 岁，平均（7.21±2.65）岁。纳入标准：（1）首诊入院；（2）符合《中国 1 型糖尿病诊疗指南（2021 版）》[9] 中 T1DM 诊断标准。排除标准：（1）合并糖尿病并发症；（2）2 型糖尿病；（3）心、肝、肾等脏器功能不全。另选取同期在本院进行健康体检的 60 例儿童作为对照组，其中男 34 例，女 26 例；年龄 2～14 岁，平均（7.52±2.89）岁。两组性别、年龄等一般资料比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$），具有可比性。所有受试者监护人均知情同意并签署知情同意书。本研究方案获得本院医学伦理委员会审核批准（2021 伦审科字第 021 号）。

1.2 方法

1.2.1 血清炎症因子水平检测 采集所有受试者肘静脉血 1.5 mL，以 3 000 r/min 离心 10 min，取上层血清分装，置于－80 ℃冰箱中保存待检。采用酶联免疫吸附试验检测血清白细胞介素 6（IL-6）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、干扰素 γ（IFN-γ）、TRAF3 水平，试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司，操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 血清 miRNA-29 水平检测 采用 Trizol 试剂（北京普利莱基因技术有限公司）提取总 RNA，采用 miScript Ⅱ RT 反转录试剂盒（北京普利莱基因技术有限公司）将 RNA 反转录为 cDNA，操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。采用 miRNA 实时荧光定量聚合酶链反应检测试剂盒（美国 Sigma 公司）检测 miRNA-29 水平，引物序列：miRNA-29 正向 5′-AAGACTTGCCTGCGGAGCAG-3′；反向 5′-CAAACTCCTGGCACTTGGTT-3′，内参 U6 正向 5′-GTGCATTGTAGTTGCATT -3′，反向 5′-AACATGTACAGTCCATGGATG -3′。反应条件：加热 95 ℃ 30 min，变性 94 ℃ 15 s，退火 55 ℃ 30 s，延伸 70 ℃ 30 s，共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miRNA-29 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 t 检验；计数资料以例数表示，组间比较采用 χ^2 检验；绘制受试者工作特征（ROC）曲线分析 miRNA-29 和 TRAF3 辅助诊断儿童 T1DM 的价值，并计算曲线下面积（AUC）；采用 Pearson 相关对血清 miRNA-29、TRAF3 与炎症因子的相关性进行分析；采用多因素 Logistic 回归分析儿童 T1DM 发生的危险因素。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 观察组和对照组临床指标水平比较 观察组 IL-6、TNF-α、IFN-γ、miRNA-29 和 TRAF3 水平均高于对照组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1 观察组和对照组临床指标水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	IL-6（pg/mL）	TNF-α（pg/mL）	IFN-γ（pg/mL）	miRNA-29	TRAF3（pg/mL）
观察组	78	60.03±7.17	106.47±40.02	3.17±1.54	1.67±0.27	61.18±16.23
对照组	60	44.09±6.50	64.23±5.86	2.38±0.98	0.78±0.14	37.10±8.26
t		13.192	8.604	3.507	23.804	10.76
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 T1DM 患儿血清 miRNA-29 和 TRAF3 与炎症因子的相关性 T1DM 患儿 miRNA-29 和 TRAF3

与 IL-6、TNF-α、IFN-γ 均呈正相关（$P<0.05$）。见表 2。

表 2　T1DM 患儿血清 miRNA-29 和 TRAF3 与炎症因子的相关性

指标	miRNA-29		TRAF3	
	r	*P*	*r*	*P*
IL-6	0.431	0.001	0.539	<0.001
TNF-α	0.671	<0.001	0.701	<0.001
IFN-γ	0.387	0.009	0.410	0.002

2.3　T1DM 患儿血清 miRNA-29 与 TRAF3 的相关性　T1DM 患儿血清 miRNA-29 与 TRAF3 呈正相关（$r=0.581$，$P<0.05$）。

2.4　儿童 T1DM 发生的多因素 Logistic 回归分析　以发生 T1DM 情况作为因变量（发生＝1，未发生＝0），以 IL-6（原值输入）、TNF-α（原值输入）、IFN-γ（原值输入）、miRNA-29（原值输入）和 TRAF3（原值输入）作为自变量，进行多因素 Logistic 回归分析，结果显示，IL-6、TNF-α、IFN-γ、miRNA-29 和 TRAF3 水平升高均为儿童 T1DM 发生的独立危险因素（$P<0.05$）。见表 3。

表 3　儿童 T1DM 发生的多因素 Logistic 回归分析

指标	*β*	*SE*	*Wald* χ^2	*P*	*OR*(95%*CI*)
IL-6	0.256	0.145	3.003	0.010	1.292(1.100～3.672)
TNF-α	0.178	0.094	2.356	0.029	1.195(1.004～1.563)
IFN-γ	0.301	0.200	3.671	0.008	1.351(1.114～2.786)
miRNA-29	1.011	0.685	10.092	<0.001	2.748(1.001～3.142)
TRAF3	0.553	0.345	4.009	0.001	1.738(1.130～3.782)

2.5　各项指标辅助诊断儿童 T1DM 的价值　以对照组为阴性样本，以观察组为阳性样本进行 ROC 曲线分析，结果显示，miRNA-29 和 TRAF3 辅助诊断儿童 T1DM 的 AUC 分别为 0.866、0.798，均高于 IL-6（0.601）、TNF-α（0.687）、IFN-γ（0.572）。见表 4。

表 4　各项指标辅助诊断儿童 T1DM 的价值

指标	AUC(95%*CI*)	*P*	灵敏度	特异度
IL-6	0.601(0.509～0.887)	<0.05	0.789	0.612
TNF-α	0.687(0.673～0.901)	<0.05	0.782	0.613
IFN-γ	0.572(0.551～0.810)	<0.05	0.600	0.524
miRNA-29	0.866(0.812～0.971)	<0.05	0.898	0.783
TRAF3	0.798(0.703～0.934)	<0.05	0.823	0.671

3　讨　论

T1DM 是一种自身免疫性疾病，炎症因子损伤胰岛 β 细胞可能是其发病的重要机制[10]。有研究发现，T1DM 患者血清 IL-6、TNF-α、IFN-γ 水平均升高，这些炎症因子会损伤胰岛 β 细胞并造成炎症级联反应，进而参与 T1DM 的病情进展[11]。本研究发现，T1DM 患儿血清 IL-6、TNF-α、IFN-γ 水平均高于健康儿童，进一步提示炎症因子可能是 T1DM 诊断和治疗的靶点。遗憾的是，既往有研究发现，炎症细胞因子在早期诊断 T1DM 方面价值有限，存在灵敏度、特异度低的缺点[11]。miRNA 属于非编码 RNA，长度约为 22 个核苷酸，可通过靶向调控一个或多个基因，进而影响细胞增殖、分化、凋亡等。越来越多的研究显示，miRNA 通过介导免疫炎症损伤而参与多种疾病的发生和发展，如肿瘤、心血管疾病、糖尿病等[12-13]。miRNA 通过多种途径介导炎症性损伤，进而影响 T1DM 的发生和发展[14]。

miRNA-29 与细胞增殖、分化、代谢、衰老、凋亡均有关[15]。miRNA-29 在 T 细胞免疫应答中也有重要作用[16]。miRNA-29 可以通过 TRAF3 促进单核细胞和巨噬细胞募集和激活，进而造成胰岛 β 细胞炎症损伤[8]。有研究发现，miRNA-29 参与肥胖和糖尿病的发生[17]。本研究发现，T1DM 患儿血清 miRNA-29 水平高于健康儿童，提示 miRNA-29 可能参与 T1DM 发病。Pearson 相关分析结果显示，T1DM 患儿 miRNA-29 与 IL-6、TNF-α、IFN-γ 均呈正相关（$P<0.05$），说明 miRNA-29 可能通过介导炎症损伤而影响 T1DM。TRAF3 为肿瘤坏死因子受体作用因子 3，与泛素化淋巴细胞功能调节有关[18]。有研究发现，TRAF3 与机体血糖调节有关，并且与高血糖诱导内皮炎症有关[19]。本研究发现，T1DM 患儿血清 TRAF3 水平升高，并且 TRAF3 与 IL-6、TNF-α、IFN-γ 均呈正相关（$P<0.05$），提示 TRAF3 通过介导炎症而影响 T1DM 发生。TRAF3 是 miRNA-29 的调控靶点，miRNA-29/TRAF3 通路可影响单核细胞和巨噬细胞募集和激活，进而造成胰岛 β 细胞炎症损伤[8]。本研究还发现，T1DM 患儿血清 miRNA-29 与 TRAF3 呈正相关（$P<0.05$），提示 miRNA-29/TRAF3 通路参与 T1DM 发病。

由于 miRNA 在外周血中表达的稳定性较好，并且 miRNA 异常改变常早于其他蛋白表达[20]，因此，检测外周血 miRNA 表达有助于疾病早期的辅助诊断。本研究发现，miRNA-29、TRAF3 水平升高是儿童 T1DM 发生的独立危险因素（$P<0.05$）。另外，miRNA-29 和 TRAF3 辅助诊断儿童 T1DM 的 AUC 分别为 0.866、0.798，说明二者对儿童 T1DM 的辅助诊断有一定价值。

综上所述，miRNA-29、TRAF3 可能通过介导炎症损伤而参与儿童 T1DM 发生，二者对儿童 T1DM 的辅助诊断有一定价值。然而本研究也存在一些局

限性,例如未对 T1DM 患儿进行随访,未明确 miRNA-29、TRAF3 与并发症及疗效的关系;本研究为单中心研究,样本量相对较小;未直接明确 miRNA-29 对 TRAF3 的调控作用。未来需要开展细胞和动物研究,进一步探讨 miRNA-29/TRAF3 信号通路在 T1DM 发生和发展中的作用机制。

参考文献

[1] MONAGHAN M,BRYANT B L,INVERSO H,et al. Young children with type 1 diabetes:recent advances in behavioral research[J]. Curr Diab Rep,2022,22(6):247-256.

[2] PIONA C,COSTANTINI S,ZUSI C,et al. Early marker of ocular neurodegeneration in children and adolescents with type 1 diabetes:the contributing role of polymorphisms in mir146a and mir128a genes[J]. Acta Diabetol,2022,59(12):1551-1561.

[3] MARGARITIS K,MARGIOULA-SIARKOU G,MARGIOULA-SIARKOU C,et al. Circulating serum and plasma levels of micro-RNA in type-1 diabetes in children and adolescents:a systematic review and meta-analysis[J]. Eur J Clin Invest,2021,51(7):e13510.

[4] BARUTTA F,BELLINI S,GUARRERA S,et al. Association of serum microRNA-145-5p levels with microvascular complications of type 1 diabetes:the EURODIAB prospective complications study[J]. Diabetes Res Clin Pract,2022,190:109987.

[5] DONATH M Y,DINARELLO C A,MANDRUP-POULSEN T. Targeting innate immune mediators in type 1 and type 2 diabetes[J]. Nat Rev Immunol,2019,19(12):734-746.

[6] HORITA M,FARQUHARSON C,STEPHEN L A. The role of miR-29 family in disease[J]. J Cell Biochem,2021,122(7):696-715.

[7] KURTZ C L,PECK B C E,FANNIN E E,et al. MicroRNA-29 fine-tunes the expression of key FOXA2-activated lipid metabolism genes and is dysregulated in animal models of insulin resistance and diabetes[J]. Diabetes,2014,63(9):3141-3148.

[8] SUN Y,ZHOU Y C,SHI Y,et al. Expression of miRNA-29 in pancreatic β cells promotes inflammation and diabetes via TRAF3[J]. Cell Rep,2021,34(1):108576.

[9] 中华医学会糖尿病学分会,中国医师协会内分泌代谢科医师分会,中华医学会内分泌学分会,等. 中国 1 型糖尿病诊治指南(2021 版)[J]. 中华糖尿病杂志,2022,14(11):1143-1150.

[10] BLUESTONE J A,BUCKNER J H,HEROLD K C. Immunotherapy:building a bridge to a cure for type 1 diabetes[J]. Science,2021,373(6554):510-516.

[11] LU J L,LIU J Y,LI L L,et al. Cytokines in type 1 diabetes:mechanisms of action and immunotherapeutic targets[J]. Clin Transl Immunol,2020,9(3):e1122.

[12] ELLIS B W,RONAN G,REN X,et al. Human heart anoxia and reperfusion tissue (HEART) model for the rapid study of exosome bound miRNA expression as biomarkers for myocardial infarction[J]. Small,2022,18(28):e2201330.

[13] PANDEY A,AJGAONKAR S,JADHAV N,et al. Current insights into miRNA and lncRNA dysregulation in diabetes:signal transduction,clinical trials and biomarker discovery[J]. Pharmaceuticals (Basel),2022,15(10):1269.

[14] GHAFFARI M,RAZI S,ZALPOOR H,et al. Association of microRNA-146a with type 1 and 2 diabetes and their related complications[J]. J Diabetes Res,2023,2023:2587104.

[15] GALLANT-BEHM C L,PIPER J,LYNCH J M,et al. A microRNA-29 mimic (remlarsen) represses extracellular matrix expression and fibroplasia in the skin[J]. J Invest Dermatol,2019,139(5):1073-1081.

[16] YEE MON K J,ZHU H Y,DALY C W P,et al. MicroRNA-29 specifies age-related differences in the $CD8^+$ T cell immune response[J]. Cell Rep,2021,37(6):109969.

[17] DOOLEY J,GARCIA-PEREZ J E,SREENIVASAN J,et al. The microRNA-29 family dictates the balance between homeostatic and pathological glucose handling in diabetes and obesity[J]. Diabetes,2016,65(1):53-61.

[18] LIN W W,HOSTAGER B S,BISHOP G A. TRAF3,ubiquitination,and B-lymphocyte regulation[J]. Immunol Rev,2015,266(1):46-55.

[19] PADILLA J,CARPENTER A J,DAS N A,et al. TRAF3IP2 mediates high glucose-induced endothelin-1 production as well as endothelin-1-induced inflammation in endothelial cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2018,314(1):52-64.

[20] JORDAN-ALEJANDRE E,CAMPOS-PARRA A D,CASTRO-LÓPEZ D L,et al. Potential miRNA use as a biomarker:from breast cancer diagnosis to metastasis[J]. Cells,2023,12(4):525.

(收稿日期:2023-10-12 修回日期:2024-03-16)