

新发 II 型糖尿病患者外周血中性粒细胞异常转录组分析

华大智造DNBSEQ测序平台在分析糖尿病差异表达基因中的应用

中南大学湘雅第二医院研究团队基于华大智造测序平台对对照组和 II 型糖尿病患者血液中的中性粒细胞进行差异表达基因分析 (DGEs) 以阐明中性粒细胞与人类 II 型糖尿病的关系。

相关成果已于2020年发表在 *Journal of Diabetes Research* 杂志上，题为 “Abnormal Peripheral Neutrophil Transcriptome in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Patients”¹。

推荐应用：疾病组学(慢性病)

推荐机型：MGISEQ-2000RS

• 测序数据质量高

DNBSEQ 测序技术具有高准确性、低重复序列率、低标签跳跃等的重要特性，可为自身免疫疾病研究提供准确的 RNA 测序数据。

• 适配自动化建库设备

测序仪搭配自动化建库平台 MGISP-100 和 MGISP-960 等，在大样本量时可确保高效，准确地建库。



背景介绍

糖尿病 (Diabetes mellitus, DM) 是由胰岛素分泌缺陷或胰岛素作用不当或两者兼有的一种代谢紊乱性疾病。糖尿病患病率和患病人数的快速增加, 给全球卫生体系带来了巨大挑战。截至 2021 年, 全球约有 5.37 亿成年人患有糖尿病, 这一数字到 2045 年预计将增至 7.83 亿^{2,3}。糖尿病主要分为 I 型糖尿病 (T1DM) 和 II 型糖尿病 (T2DM), 其中 T2DM 占比近 95%。T1DM 是一种自身免疫性疾病, 其特点是 T 细胞介导的对能分泌胰岛素的胰腺β细胞的破坏导致胰岛素分泌不足⁴。而 T2DM 则伴随肝脏及外周组织胰岛素抵抗 (Insulin resistance, IR) 进行性发展, β细胞数量减少, 及胰岛素分泌不足, 其特征是糖、脂质和蛋白质代谢紊乱, 且 IR 伴有低度慢性炎症^{5,6}。T2DM 可引起多种器官损伤, 导致各种并发症。如糖尿病肾病、糖尿病足、糖尿病神经病变及与 T2DM 相关的心脑血管疾病, 如今已成为全球主要的健康问题⁷。

中性粒细胞是先天免疫系统的重要组成部分, 也被视为组织修复的重要参与者, 其能够通过吞噬作用和 / 或释放中性粒细胞胞外陷阱 (NET) 以对抗病原体⁸。中性粒细胞指示的慢性炎症可以通过抑制 NET 的释放或通过分解 NETs 来实现, 中性粒细胞衍生的微粒可以引起抗炎反应, 这是一种减少炎症的创新策略⁹。慢性炎症在糖尿病的发生发展及其并发症的发病机制中起着重要的作用, 而中性粒细胞则在炎症反应中起着主导作用¹⁰。最近, 中性粒细胞 / 淋巴细胞比 (NLR) 成为糖尿病新的炎性生物标志物, 这对于糖尿病的病理诊断十分重要¹¹。

研究描述

有关中性粒细胞诱发 II 型糖尿病的确切机制尚未探索清楚。RNA-seq 是一种分析整个转录组中基因表达变化的技术，其既灵敏又能够识别新的转录，已被应用于越来越多的研究案例中。因此，该研究团队希望通过 RNA 测序技术研究在 II 型糖尿病患者中血液循环中的中性粒细胞的转录组变化，用于阐明中性粒细胞在 II 型糖尿病中参与的反应机制。

实验方法

样本收集及 RNA 制备

根据世界卫生组织1999年糖尿病患病标准，该团队在中南大学湘雅二院收集了13个患病小于1年的 II 型糖尿病患者，并招募了与这13名病患性别、年龄相匹配的志愿者作对照组，患者和对照组被随机分为发现组 (n=5:5) 和验证组 (n=8:8)。利用密度梯度离心法从患者和对照组的静脉血中分离出中性粒细胞并进一步纯化，将中性粒细胞按 $5-10 \times 10^6$ cells / 1ml溶解在TRIzol并贮存于-80°C用于后续实验。提取出总RNA并测定其浓度，随后使用cDNA反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA。

RNA测序与生信分析

在完成RNA-Seq测序文库的构建后利用华大智造DNBSEQ测序平台进行文库测序。总共有19718个基因被检测到，每个样本的平均数据量为24.04M reads。

后续生信分析中，先对所有数据进行质控筛选及过滤，后使用HISAT和Bowtie2将clean reads比对到参考基因组上，用软件包RESM统计基因表达量。

根据基因表达水平，该研究使用DEG-seq算法筛选出 II 型糖尿病患者与对照组之间的差异表达基因 (DEGs)，并根据DEGs，该团队进一步进行对包含分子生物学功能、细胞成分和生物过程在内的GO分类。随后，利用R语言的phyper对DEGs进行KEGG途径分类与功能富集。

样品收集与饲养	文库制备和测序	生信流程及亲缘关系分析	结果分析
13例患病小于1年的 II 型糖尿病患者，并有13名与病患性别、年龄相匹配的志愿者作对照组	 MGIEasy RNA 文库制备试剂套装  MGISEQ-2000 基因测序仪	HISAT Bowtie2 RESM DEG-seq算法 KEGG	基因本体 (GO) 分类 KEGG通路富集分析

结果分析

参与者特征

该团队对 26 名参与者（包括 II 型糖尿病患者和志愿者）分为发现组和验证组进行人体测量特征分析。结果发现：在发现组中，II 型糖尿病患者在 HbA1c、餐后血糖、空腹 c 肽以及血压方面均高于健康对照组 ($P < 0.05$)，在 BMI、HER、空腹血糖、LDL-C 和 TC 方面无明显差异 (表 1)；在验证组中，II 型糖尿病患者 HbA1c 和餐后血糖高于健康对照组 (表 2)。

	HC (n = 5)	T2D (n = 5)	P value
Sex (male/female)	5 (4/1)	5 (3/2)	1.000
Age (years)	43.40 ± 13.22	41.40 ± 7.50	0.776
BMI (kg/m ²)	23.18 ± 2.21	23.63 ± 13.27	0.942
WHR	0.86 ± 0.06	0.92 ± 0.03	0.081
DBP (mmHg)	74.40 ± 5.32	81.80 ± 5.85*	0.028
SBP (mmHg)	106.20 ± 8.95	124.00 ± 11.85*	0.029
TG (mmol/L)	1.03 ± 0.56	1.86 ± 0.62	0.056
TC (mmol/L)	4.22 ± 0.49	5.15 ± 1.27	0.166
HDL-C (mmol/L)	1.47 ± 0.44	1.17 ± 0.14	0.210
LDL-C (mmol/L)	2.34 ± 0.54	3.42 ± 1.23	0.109
HbA1c (%)	5.52 ± 0.46	7.80 ± 2.04*	0.040
Fasting BS (mmol/L)*	5.16 (4.88-5.36)	9.88 (5.52-10.22)	0.082
2 h postprandial BS (mmol/L)	4.88 ± 1.64	12.58 ± 5.17**	0.013
Fasting C-peptide (pmol/L)	350.36 ± 90.08	707.36 ± 207.37**	0.008
2 h postprandial C-peptide (pmol/L)	1535.70 ± 549.43	1209.26 ± 82.11	0.225
White cell count (10 ⁹ /L)	6.38 ± 1.35	7.70 ± 1.92	0.241
Lymphoid cell count (10 ⁹ /L)	1.80 ± 0.47	2.61 ± 0.64	0.052
Neutrophil count (10 ⁹ /L)	4.15 ± 1.25	4.68 ± 1.59	0.569
Mononuclear count (10 ⁹ /L)	0.32 ± 0.12	0.31 ± 0.09	0.822

表1.RNA-seq研究参与者的临床和生化特征

	HC (n = 8)	T2D (n = 8)	P value
Sex (male/female)	8 (6/2)	8 (6/2)	1.000
Age (years)	44.25 ± 8.41	47.63 ± 10.74	0.496
BMI (kg/m ²)	22.40 ± 2.10	23.82 ± 2.83	0.273
WHR	0.85 ± 0.08	0.88 ± 0.05	0.388
DBP (mmHg)	75.85 ± 7.85	79.88 ± 8.01	0.316
SBP (mmHg)	121.00 ± 11.20	118.50 ± 16.45	0.733
TG (mmol/L)	1.61 ± 0.81	1.54 ± 1.58	0.903
TC (mmol/L)*	4.77 (4.05-4.93)	3.96 (2.50-4.56)	0.050
HDL-C (mmol/L)	1.14 ± 0.48	1.51 ± 0.92	0.332
LDL-C (mmol/L)	2.75 ± 0.36	2.07 ± 0.89	0.065
HbA1c (%)*	5.30 (5.20-5.55)	6.50 (6.05-7.70)***	<0.001
Fasting BS (mmol/L)*	4.61 (4.21-5.11)	5.97 (5.14-7.65)**	0.002
2 h postprandial BS (mmol/L)	4.88 ± 1.64	12.58 ± 5.17***	<0.001
Fasting C-peptide (pmol/L)	418.71 ± 90.49	369.44 ± 141.28	0.420
2 h postprandial C-peptide (pmol/L)	1598.80 ± 711.38	1229.03 ± 548.98	0.264
White cell count (10 ⁹ /L)	5.97 ± 0.81	5.73 ± 0.42	0.411
Lymphoid cell count (10 ⁹ /L)	1.97 ± 0.54	1.83 ± 0.83	0.695
Neutrophil count (10 ⁹ /L)*	3.41 (3.12-3.50)	3.42 (2.88-3.68)	0.878
Mononuclear count (10 ⁹ /L)	0.40 ± 0.08	0.30 ± 0.07	0.095

BMI: 体重指数; WHR: 腰臀比; DBP: 舒张压; SBP: 收缩压; TG: 甘油三酯; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇。

表2.研究参与者的临床和生化特征进行验证

生物信息学分析

在这项研究中，该团队在 DNBSEQ 测序平台上对 5 个 T2DM 患者样本和 5 个对照组样本进行了测序，并通过中性粒细胞的 RNA 序列分析，然后鉴定 DEG。结果如图 1 和 2 所示，与健康对照组的中性粒细胞相比，T2DM 患者的中性粒细胞中发现 1990 个 DEGs 上调，1314 个 DEGs 下调。

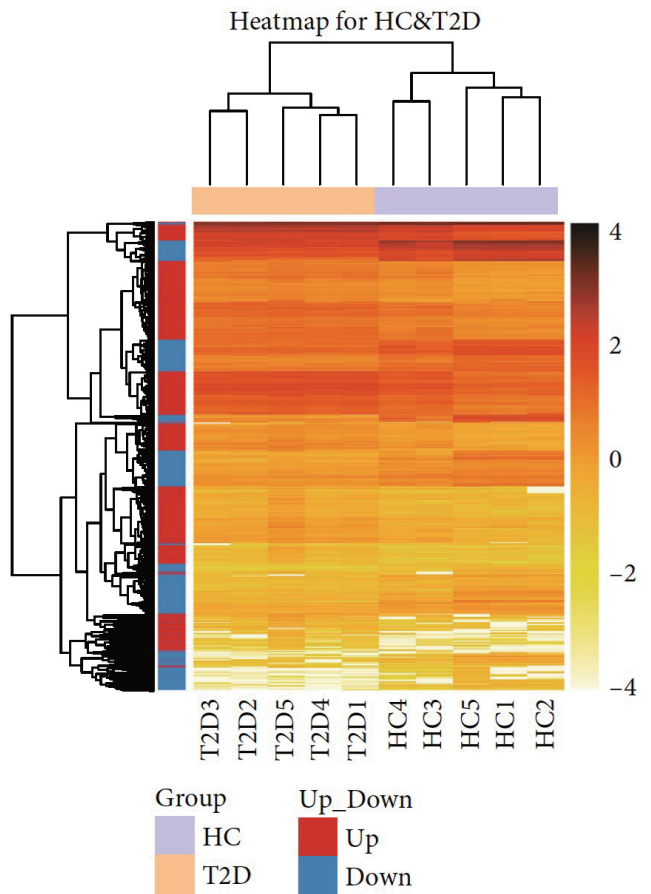


图1. 新诊断的T2DM (T2D) 患者与健康对照者的外周中性粒细胞转录组不同, Heatmap显示从健康对照组 (紫色, n = 5) 和新诊断的T2D患者 (橙色, n = 5) 中分离的中性粒细胞差异表达基因(DEGs)

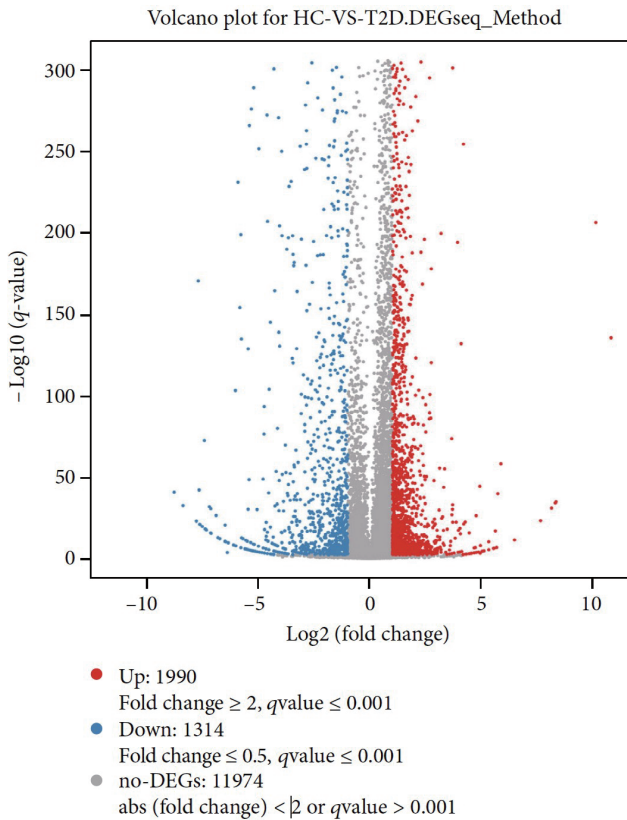


图2.火山图显示新诊断的T2DM患者与健康对照者外周血中性粒细胞中差异表达基因(DEGs)的数量

基因本体(GO)分类

基于这些 DEGs, 该研究根据基因本体 (GO) 进行分类, 以确定这些基因编码的蛋白质所涉及的分子功能(MM)、细胞成分(CC)和生物过程(BP)。发现上调的 GO 分类主要是髓系白细胞、T 细胞及免疫应答调节通路, 而下调的 GO 类别主要是细菌来源分子反应、炎症反应等(图 3)

KEGG 通路富集分析

重要 DEGs 的 KEGG 通路富集分析表明, 与对照组相比, T2DM 患者的中性粒细胞中多种生物途径发生了改变(图 4)。相关差异通路主要涉及细胞因子-细胞因子受体相互作用、NF-κB 信号等其他信号。其中与细胞因子-细胞因子受体相互作用和细胞粘附分子(CAM)信号通路相关的大部分基因在 T2DM 中表达上调(图 5)。

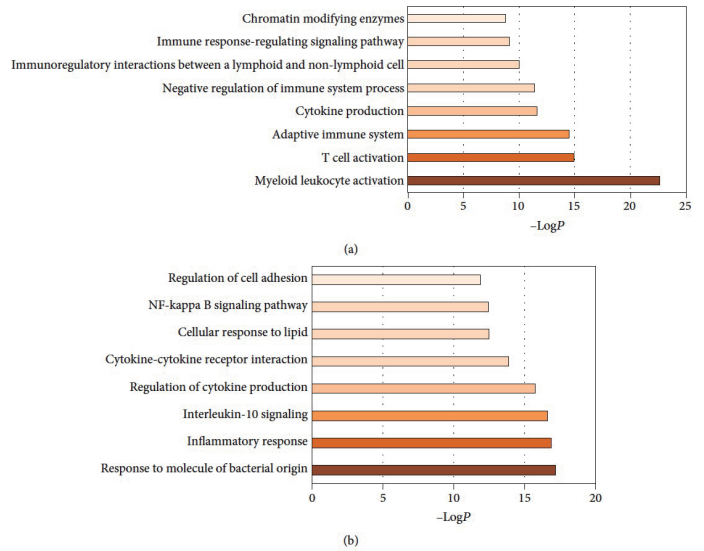


图3.通过对T2DM患者和健康对照者差异表达基因(DEGs)富集进行基因本体(GO)分析(a)列出了GO上调基因的前8类,(b)为下调基因GO的前8类。

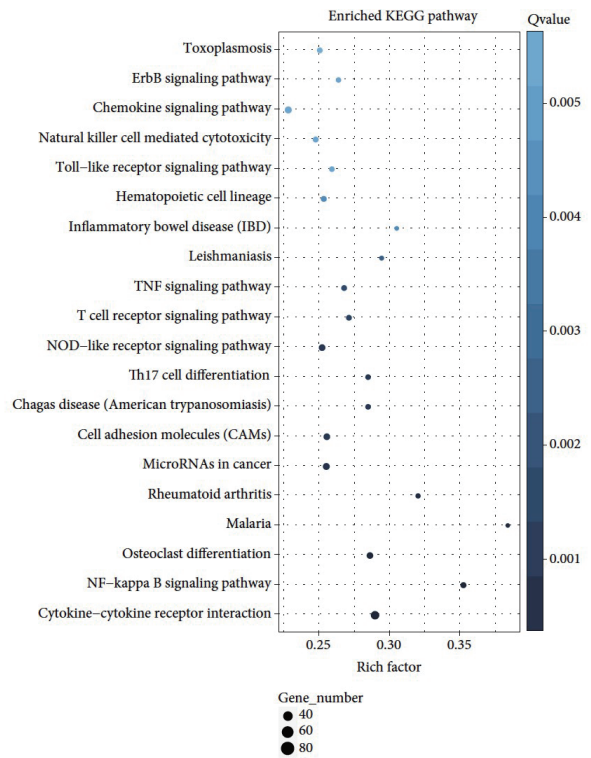


图4.基于T2DM患者与健康对照者中性粒细胞的所有差异表达基因(DEGs), 筛选出前20条KEGG通路

实时定量 PCR

接下来，该研究扩大了对纯化中性粒细胞的分析。在 RNA-seq 结果中，基因与中性粒细胞的激活直

接相关，如粘附分子和相关配体或受体的表达，如 CXCR1、CXCR2 等基因在 T2DM 中表达增加(图6)。

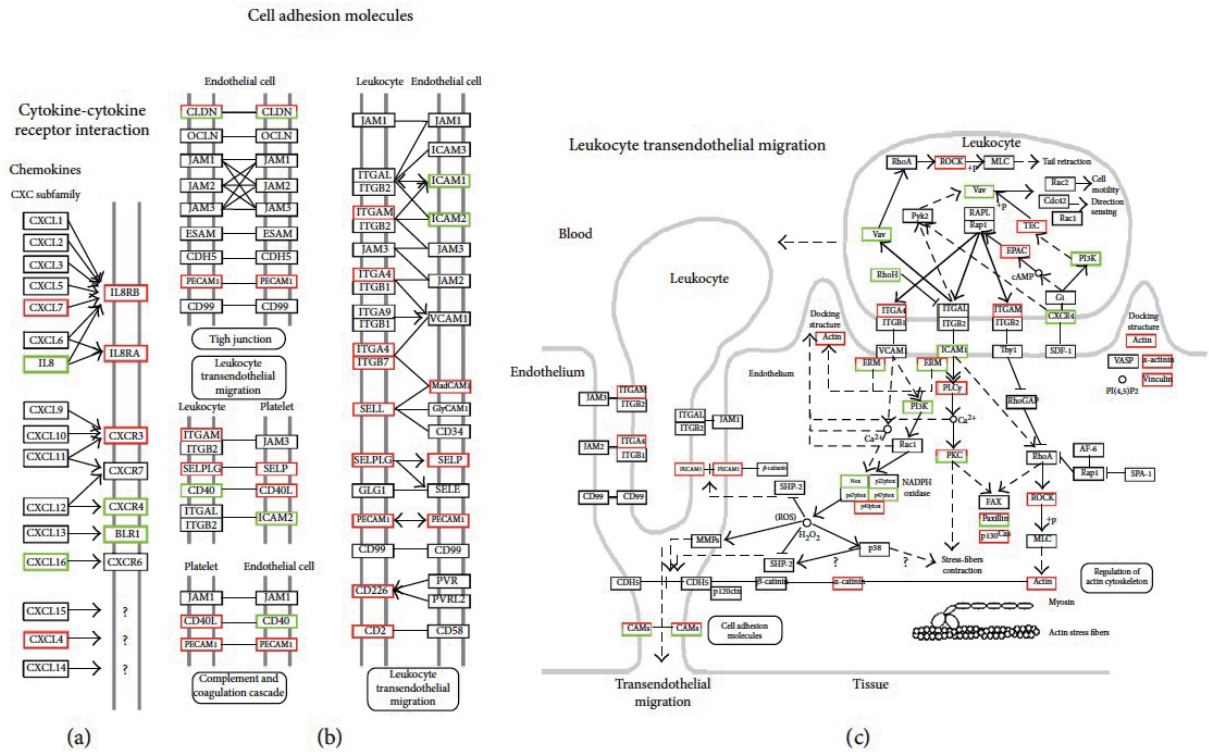


图5.与健康对照相比，T2DM患者中性粒细胞差异表达基因(DEGs)富集路径图

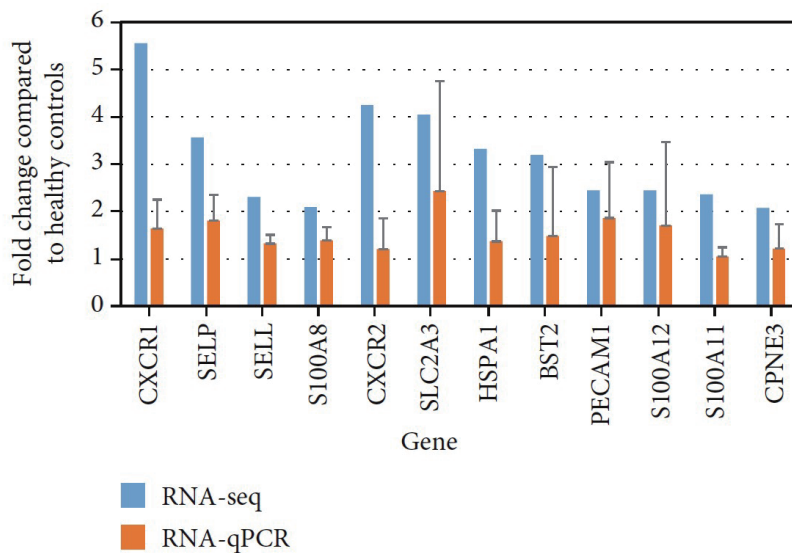


图6.RT-qPCR验证了12个基因子集的RNA-seq结果

仅供研究使用，不适用于临床诊断

总结

本研究调查了 T2DM 患者和健康对照者中性粒细胞中 DEGs 的存在以及与这些基因相关的生物学功能。研究表明，T2DM 患者在转录组水平上中性粒细胞活化增加，对趋化因子的反应增加，中性粒细胞跨内皮细胞迁移增加；另一方面，中性粒细胞对细菌源性分子（如 LPS）的反应、对细菌的细胞反应和炎症反应减少。这些发现支持中性粒细胞在 T2DM 发病机制中的作用。

本研究基于华大智造自主研发的 DNBSEQ 测序平台，利用 RNA-seq 技术对健康人群和 T2DM 患者的差异表达基因分析（DGEs）进行对比。基于 RNA-seq 的研究在确定 T2DM 与中性粒细胞之间的潜在病理关系具有重要用途，也能为糖尿病的预防和治疗提供新的靶点¹²。该测序平台所特有的 DNBSEQ 测序技术具有高准确度、高保真性、高信噪比和高性价比的特点，广泛应用于科研到临床领域的研究。



基因测序仪 MGISEQ-2000RS

参考文献

1. Lin Q Q, Zhou W Z, Wang Y F, et al. Abnormal peripheral neutrophil transcriptome in newly diagnosed type 2 diabetes patients[J]. *Journal of Diabetes Research*,2020: 1-10.
2. Sharma P, Singh S, Thakur V, et al. Novel and emerging therapeutic drug targets for management of type 2 Diabetes Mellitus[J]. *Obesity Medicine*,2021, 23:100329.
3. Dr Jayakrishnan B. Historical aspects and current understanding of the connections and implications of viruses and diabetes: A narrative review[J]. *Clinical Epidemiology and Global Health*,2022:1610 1110.
4. DiMeglio L A, Evans-Molina C, Oram R A. Type 1 diabetes[J]. *Lancet*,2018,391:2449-2462.
5. Bahmani M, Zargaran A, Rafieian-Kopaei Mahmoud. Ethnobotanical study of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus in the Urmia, Northwest Iran[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(Suppl 1): S348-S354.
6. Li Y G, Ji D F, Zhong S, et al. Hybrid of 1-deoxynojirimycin and polysaccharide from mulberry leaves treat diabetes mellitus by activating PDX-1/insulin-1 signaling pathway and regulating the expression of glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in alloxan-induced diabetic mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011,134:961-970.
7. Dong J, Liang Q X, Niu Y. Effects of Nigella sativa seed polysaccharides on type 2 diabetic mice and gut microbiota[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020,159 :725-738.
8. Castanheira F V S, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation[J]. *Blood*, 2019, 133(20): 2178-2185.
9. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation[J]. *Nature Reviews Immunology*,2017, 17:248-261.
10. Garcia C, Fève B, Ferré P, et al. Diabetes and inflammation: fundamental aspects and clinical implications[J]. *Diabetes & Metabolism*,2010, 36:327-338.
11. Ilgun E, Akyurek O, Kalkan AO, et al. Neutrophil/Lymphocyte ratio and Platelet/Lymphocyte ratio in fibromyalgia[J]. *European Journal of General Medicine*,2016,13(2):100-104.
12. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nature Reviews Genetics*,2009,10(1):57-63.

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪 MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	MGISP-100RS 自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-960RS 自动化样本制备系统	900-000100-00
软件	MegaBOLT 生信分析加速器(工作站式服务器)	970-000085-00
建库试剂	MGEasy RNA 文库制备试剂套装(16 RXN)	1000006383
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装(FCL PE100)	1000012554

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 www.mgi-tech.com

✉ MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有，未经本公司书面许可，任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2022年10月版

撰稿：张扬星 肖泽琳

责任编辑：王其伟

审稿：江遥