

miR-802 靶向 Hnf1B 抑制胰岛素分泌的作用研究

王丹维, 张方方, 金亮*, 吴洁**

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 探究 miR-802 对于胰岛 β 细胞分泌胰岛素的影响及其作用机制。利用 miR-802 类似物及 miR-802 抑制剂分别在胰岛原代细胞及 Min6 细胞过表达或敲降 miR-802; 采用 ELISA 法检测 miR-802 对胰岛素分泌的影响; 通过 miRNA 靶基因数据库预测、荧光素酶报告法和 Western blot 法确证 miR-802 的靶基因; 最后开展功能回复实验阐明 miR-802 调控胰岛 β 细胞分泌胰岛素的作用机制。结果表明: 在胰岛原代细胞和 Min6 细胞中过表达 miR-802 能抑制胰岛 β 细胞分泌胰岛素; qPCR 和 Western blot 实验证明 miR-802 通过抑制靶基因肝细胞核因子 1B (hepatocyte nuclear factor 1 β , Hnf1B) 的转录和翻译, 从而抑制胰岛素的分泌。

关键词 miR-802; 胰岛素分泌; Hnf1B; 靶基因

中图分类号 Q789; R587.1 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)01-0099-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200115

引用本文 王丹维, 张方方, 金亮, 等. miR-802 靶向 Hnf1B 抑制胰岛素分泌的作用研究[J]. 中国药科大学学报, 2020, 50(1): 99–106.
Cite this article as: WANG Danwei, ZHANG Fangfang, JIN Liang, et al. Inhibition of miR-802 on insulin secretion by targeting Hnf1B [J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(1): 99–106.

Inhibition of miR-802 on insulin secretion by targeting Hnf1B

WANG Danwei, ZHANG Fangfang, JIN Liang*, WU Jie**

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To investigate the effect of miR-802 on insulin secretion by islet β cells and its mechanism, miR-802 was overexpressed or knocked down in primary islet cells and Min6 cells via transfecting miR-802 mimic and miR-802 inhibitor, respectively. The effect of miR-802 on insulin secretion was detected by ELISA. The target gene of miR-802 was confirmed by miRNA target gene database prediction, luciferase report and Western blot. The function recovery experiment was carried out to clarify the mechanism of miR-802 regulating β cell secretion of insulin. The results showed that overexpression of miR-802 in islet primary cells and Min6 cells inhibited insulin secretion. qPCR and Western blot showed that miR-802 inhibited insulin secretion by inhibiting the transcription and translation of the target gene, hepatocyte nuclear factor 1 β (Hnf1B).

Key words miR-802; insulin secretion; Hnf1B; target gene

2 型糖尿病是由遗传和环境等因素导致的以高血糖为主要特征的慢性非传染性疾病^[1]。糖尿病可引发多种并发症, 包括心脑血管疾病、肾衰竭、失明等, 严重的胰岛素抵抗也是非酒精性脂肪肝病最主要的致病因素^[2], 极大影响患者的生活质量, 并给患者家庭和社会带来沉重的经济负担, 成为全球公认的医疗卫生保健问题。因此阐明糖尿病的

发病机制, 探究引起糖尿病发生的新靶点, 对糖尿病的诊断和防治意义重大。MicroRNA (miRNA) 是一种内源的短片段非编码 RNA, 约含 20~22 个碱基, 通过与 mRNA 的 3' 端非翻译区结合, 引起靶基因剪切或抑制靶基因的翻译从而对其表达进行调控^[3]。目前研究发现许多 miRNA 参与调控糖尿病的发生、发展^[4-5]。比如, miR-335 已被证明以编

胰岛素分泌相关的 SNARE 复合物成员的 mRNA 为靶点^[6]; miR-375 也被报道可通过反馈环节被高水平的葡萄糖负调控, 因为其可通过靶向 PDK1 减弱胰岛素基因转录^[7]; 另有研究表明 Min6 细胞暴露于高葡萄糖环境可导致多个 miRNA 表达水平的改变, 其中 miR-30d 被发现参与胰岛素基因转录的调节^[8]; 同样, 小鼠胰岛中 miR-15a 表达的变化与胰岛素基因 mRNA 水平相关^[9]。以上研究均表明, miRNA 对胰岛 β 细胞具有重要的调控作用。但目前关于 miRNA 调控胰岛 β 细胞功能的具体机制尚未完全阐明。因此揭示并完善 miRNA 调控胰岛 β 功能的机制, 是糖尿病研究领域亟待解决的重要科学问题。

本课题组前期通过高通量测序发现与正常饮食小鼠胰岛组织相比, 在高脂饮食模型小鼠胰岛组织中 miR-802 的表达水平显著升高。且新近研究表明, miR-802 直接与 NF- κ B 抑制因子 (NRF) 的 3'-UTR 结合并抑制其表达, 介导肥胖相关肾病^[10]; 同时在小鼠肝脏中 miR-802 的过表达损害葡萄糖耐受性, 并降低胰岛素敏感性, 而 miR-802 表达的降低则改善了葡萄糖耐量和胰岛素作用^[11]。因此, miR-802 对糖尿病的发生、发展发挥着重要的调控作用。

但是 miR-802 是否能直接调控胰岛 β 细胞的功能, 目前尚未有文献报道。为了深入探讨 miR-802 对胰岛 β 细胞功能的调控作用, 本研究利用脂质体转染法在胰岛原代细胞和 Min6 细胞中过表达或敲降 miR-802, 通过 ELISA 及 Western blot 等实验揭示 miR-802 胰岛 β 细胞的功能及其作用机制。

1 材料

1.1 试剂

DMEM 高糖培养基、RPMI 1640 完全培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); LipofectamineTM 2000、Trizol 试剂 (南京诺唯赞公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白质定量试剂盒、胰蛋白酶 (上海碧云天生物公司); 割胶回收试剂盒 (北京康为世纪生物技术有限公司); 兔抗鼠 Hnf1B 单克隆抗体、兔抗鼠 GAPDH 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); miR-802 类似物及其阴性对照, miR-802 抑制剂及其阴性对照、miR-RNA 实时荧光定量 RT-PCR 定量试剂盒 (上海吉玛制药技术公司); All-in-one 逆转录试剂

盒、实时荧光定量 RT-qPCR 试剂盒 (美国 abm 公司); V 型胶原酶 (美国 Sigma-Aldrich 公司); T4 DNA 连接酶 (日本 TaKaRa 公司)。

1.2 仪器

480II 实时荧光定量仪 (美国 Roche 公司); Synergy 荧光酶标仪 (美国 Biotek 公司); TS2R 显微图像采集系统 (日本 Olympus 公司); Trans-Blot Turbo Western blot 电泳转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 4600 蛋白曝光仪 (上海 Tanon 公司)。

1.3 质粒、细胞和动物

大肠埃希菌、293T 细胞、pMIR-REPORT 质粒、海肾质粒、pcDNA3.1 (+) 质粒、PLVX-shRNA2 质粒均保存于本实验室。胰岛 β 细胞系 Min6 细胞由南京医科大学韩晓教授课题组提供。6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠购自扬州大学比较医学中心, 许可证号 SCXK (苏) 2017-0007。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方法

2.1 细胞培养和提取

Min6 细胞复苏及培养和胰岛原代细胞的提取均按文献 [12] 的方法进行。

2.2 细胞的转染

将 miR-802 类似物及其阴性对照、miR-802 抑制剂及其阴性对照的干粉于常温离心机中 12 000 r/min 离心 5 min, 之后加入 ddH₂O 溶解粉末, 配制为 20 μ mol/L 的储存液, 将储存液分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。取培养于 6 孔板中的细胞, 按照 LipofectamineTM 2000 说明书的要求进行转染, 先将细胞上清换成无血清培养基饥饿培养 4 h, 之后将待转染的 miRNA 和 LipofectamineTM 2000 按照体积比 1:2 加入到无血清培养基中, 并使 miRNA 在培养基中的终浓度为 100 μ mol/L, 6 h 后换成完全培养基继续培养用于后续的实验。

2.3 葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS) 实验

将纯净的胰岛原代细胞均匀铺在 12 孔板中, 并设置每孔中胰岛细胞的数量为 30 个。加入 RPMI 1640 完全培养基 100 μ L (含 10% 胎牛血清), 置于细胞培养箱平衡 12 h, 并将 Min6 细胞 (1×10^7 个) 接种于 12 孔板, 按照“2.2”项所述的转染步骤, 在胰岛细胞和 Min6 细胞中过表达或敲降 miR-802, 转染 48 h 后, 用含 2.5 mmol/L 葡萄糖的

Hank's 平衡盐溶液缓冲液作为饥饿液培养 6 h,之后分别用 2.5 和 25 mmol/L 的葡萄糖刺激 2 h,刺激结束之后,收集细胞上清液,用小鼠胰岛素 ELISA 试剂盒检测上清液中胰岛素的含量,同时用细胞刮刀将接种的细胞完全刮下,收集细胞后用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,用每孔胰岛素的含量(μ IU)/每孔细胞蛋白含量(mg)作为胰岛素分泌能力的评价指标。

2.4 靶基因预测和双荧光素酶检测实验

根据 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>

<http://www.mirbase.org/>), miRBase (<http://www.mirbase.org/>), miRwalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) 网站预测 miR-802 潜在的靶基因,利用 Bibiserv2(<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/mahybrid/>) 计算靶基因与 miRNA 的结合自由能,将预测到的靶基因合成包含酶切位点和目的片段的 3'-UTR 种子序列,人工合成野生型片断上下游引物(Hnf1B-WT-F/R),在野生型片断的基础上合成种子序列互补序列的突变位点,合成突变片段(Hnf1B-MU-F/R),片段长度为 59 bp,序列如表 1 所示。

Table 1 Sequence used for luciferase report assay

Primer	Sequence(5'→3')
Hnf1B-WT-F	CTAGTAAGTGTGCAAAAAGTGAATCTGTACTGAAATAAGATGAGGACCAAGGAGGA
Hnf1B-WT-R	AGCTTCCTCCTTGGTCCTCATCTTATTTCACTAAGAGATTCAAG TTTTTCATCAGTTA
Hnf1B-MU-F	CTAGTAAGTGTGCAAAAAGTGAATCTACCGTCAGAAATAAGAT GAGGACCAAGGAGGA
Hnf1B-MU-R	AGCTTCCTCCTTGGTCCTCATCTTATTTCTGACGGTAGATTCAAGTTTTCATCAGTTA

WT:wild type;MU:mutant;F:forward;R:reverse

将合成的单链退火,使用 T4 DNA 连接酶将退火产物与酶切后的 pMIR-REPORT 质粒进行连接重组,并将其转化进大肠埃希菌中,提取质粒。MiR-802 与 pMIR-REPORT 重组质粒、海肾质粒共转染到 293T 细胞:提前将 293T 细胞均匀铺至 24 孔板中,转染 3 种质粒,每种设置 3 个平行孔。293T 细胞铺板密度为每孔 2×10^5 个,体系 500 μ L,转染前将 24 孔板中换成 400 μ L 不含抗生素和血清的培养基,4~6 h 后开始转染。转染结束后 48 h 使用双荧光素酶报告试剂盒对其荧光强度进行检测。

2.5 Western blot 法检测 Hnf1B 蛋白的表达

向上述步骤中获得的胰岛原代细胞和 Min6 细胞中分别加入 RIPA 裂解液(含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂),置于冰上用细胞刮刀刮下,每隔 10 分钟涡旋 10 s,使细胞得到充分的裂解,加入 $5 \times$ 上样缓冲液溶液,并用 PBS 将蛋白浓度调整为 1.0 μ g/ μ L,将制备好的样品置于 100 $^{\circ}$ C 金属浴中煮 10 min。利用 5% 浓缩胶和 10% 分离胶进行电泳,先将电压设置成 80 V,待样品跑到浓缩胶和分离胶的分界线时,调整电压为 140 V,整个电泳持续约 90 min。将 PVDF 膜用甲醇活化 10 min 后,使用半干转印法将蛋白转移到膜上,转移后将膜置 3% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h。封闭结束,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入相应的按 1:1 000 稀释的一抗(兔抗鼠 Hnf1B 单克隆抗体、兔抗鼠 GAPDH 单克隆抗体),将样品

在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜孵育。一抗孵育之后,洗膜 3 次,每次 10 min,后加入相对应的二抗孵育 1 h,二抗孵育结束之后,继续洗膜 3 次并于曝光仪中曝光。

2.6 RNA 的提取和 qPCR

在转染后的细胞中加入 Trizol 裂解液 1 mL,将细胞充分裂解后提取细胞 RNA,使用 qPCR 试剂盒,分别将 RNA 反转录成普通 cDNA 和 miR-802 的 cDNA,进行 qPCR。qPCR 过程中所使用的引物序列如表 2 所示。其中 CYC 为 Hnf1B 的内参;U6 为 miR-802 的内参。

Table 2 Primers used for qPCR

Primer	Sequence (5'→3')
Hnf1B-F	CCCCTCACCATCAGCCAAG
Hnf1B-R	GGTCTGAGATTGCTGGGGATT
CYC-F	GAGCTGTTTGCAGACAAAAGTTC
CYC-R	CCCTGGCACATGAATCCTGG
miR-802-F	CGGCGTCAGTAACAAAGATTCT
miR-802-R	TATGCTTTTGACGACTGTGTGAT
U6-F	CAGCACATATACTAAATTTGGAACG
U6-R	ACGAATTTGCCTGTCATCC

2.7 质粒构建

在 NCBI 数据库中查找 Hnf1B 的编码序列,以 Min6 细胞的 cDNA 作为模板扩增 Hnf1B 的编码区,Hnf1B 全长 1 599 bp,利用割胶回收试剂盒回收所得到的片段,选用 pcDNA3.1(+) 真核生物表达质粒,将回收得到的片段和 pcDNA3.1(+) 质粒

用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切(37 °C 酶切 6 h), 将酶切后的质粒割胶回收, 利用 T4DNA 连接酶将质粒和片段于 37 °C 过夜连接 12 h, 连接后的质粒转化至大肠埃希菌, 挑取单克隆菌测序, 成功构建的过表达质粒命名为 over-Hnf1B; 同时空载的 pcDNA3.1(+) 作为 over-Hnf1B 的对照质粒。利

用 shRNA 数据库 (<http://sirna.wi.mit.edu/home.php>) 设计 Hnf1B 的序列, 采用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 作为酶切位点, 用上述同样的方法, 将其构建在 PLVX-shRNA2 的载体上, 构建成功的敲除质粒命名为 sh-Hnf1B(PCR 引物见表 3)。利用空载的 PLVX-shRNA2 载体作为 shHnf1B 的对照质粒。

Table 3 Primers used for PCR

Primer	Sequence (5' → 3')
Over-Hnf1B-F	CGGGATCCCAGTGGTGTCCAAGCTCACGTCGC
Over-Hnf1B-R	CCCTCGAGGGTCACCAAGGCTTGCAGTGGACAC
Sh-Hnf1B-F	GATCCCAGCATGTCTTCCAGTAAATTCAGAGATTACTGGAAGACATGCTGTTTTTG
Sh-Hnf1B-R	AATTCAAAAACAGCATGTCTTCCAGTAAATCTCTGAATTACTGGAAGACATGCTGG

2.8 功能回复实验

分别将 30 个纯净的胰岛原代细胞和 1×10^7 个 Min6 细胞接种于 12 孔板, 将待实验的细胞分为 4 组, 根据 Lipofectamine™ 2000 说明书的方法, 分别转染 miR-802 类似物及其阴性对照、over-Hnf1B 和 miR-802 类似物 + over-Hnf1B, 转染 48 h 后, 按“2.3”项方法进行 GSIS 实验, 检测胰岛素的分泌能力。

2.9 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 平均值对比分析采用双因素方差分析(Two-Way ANOVA), 单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 miR-802 在 Min6 和胰岛原代细胞中转染效率的验证

将 miR-802 类似物及其阴性对照, miR-802 抑

制剂及其阴性对照分别转染至 Min6 和胰岛原代细胞中, 转染 48 h 后通过 qPCR 检测转染效率, 结果如图 1 所示, 与对照组相比, 转染 miR-802 类似物的组中 miR-802 表达显著上调, 在 Min6 细胞和胰岛原代细胞中分别上调至对照组的 300 倍和 200 倍。转染 miR-802 抑制剂组与对照组相比, 则显著抑制了 miR-802 的表达, 在 Min6 细胞和胰岛原代细胞中分别下调至对照组 80% 及 60%, 上述结果说明 miR-802 类似物和 miR-802 抑制剂可以作为上调和抑制 miR-802 表达的有效工具。

3.2 miR-802 调控胰岛素的分泌

经葡萄糖刺激后 Min6 细胞和胰岛原代细胞的胰岛素分泌结果如图 2 所示, 用高糖或低糖刺激时, 过表达 miR-802 可明显抑制 Min6 细胞和胰岛原代细胞分泌胰岛素, 而敲降 miR-802 则促进 Min6 细胞和胰岛原代细胞分泌胰岛素。以上结果均表明 miR-802 能够调控胰岛 β 细胞胰岛素的分泌。

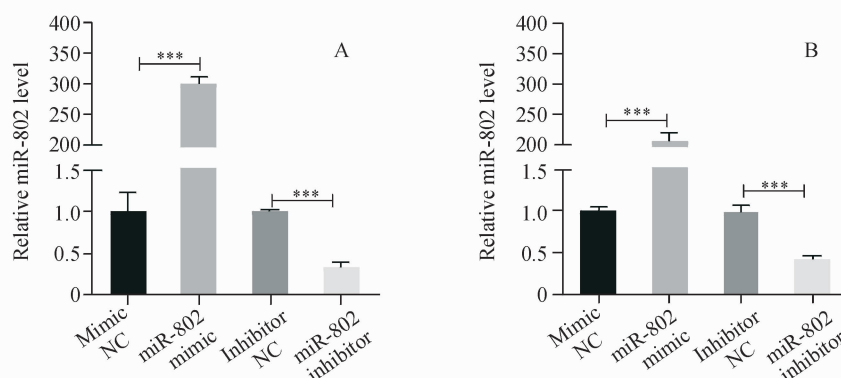


Figure 1 qPCR verified the transfection efficiency of miR-802 in Min6 cells (A) and islet primary cell (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Relative miR-802 level in Min6; B: Relative miR-802 level in islet

*** $P < 0.001$

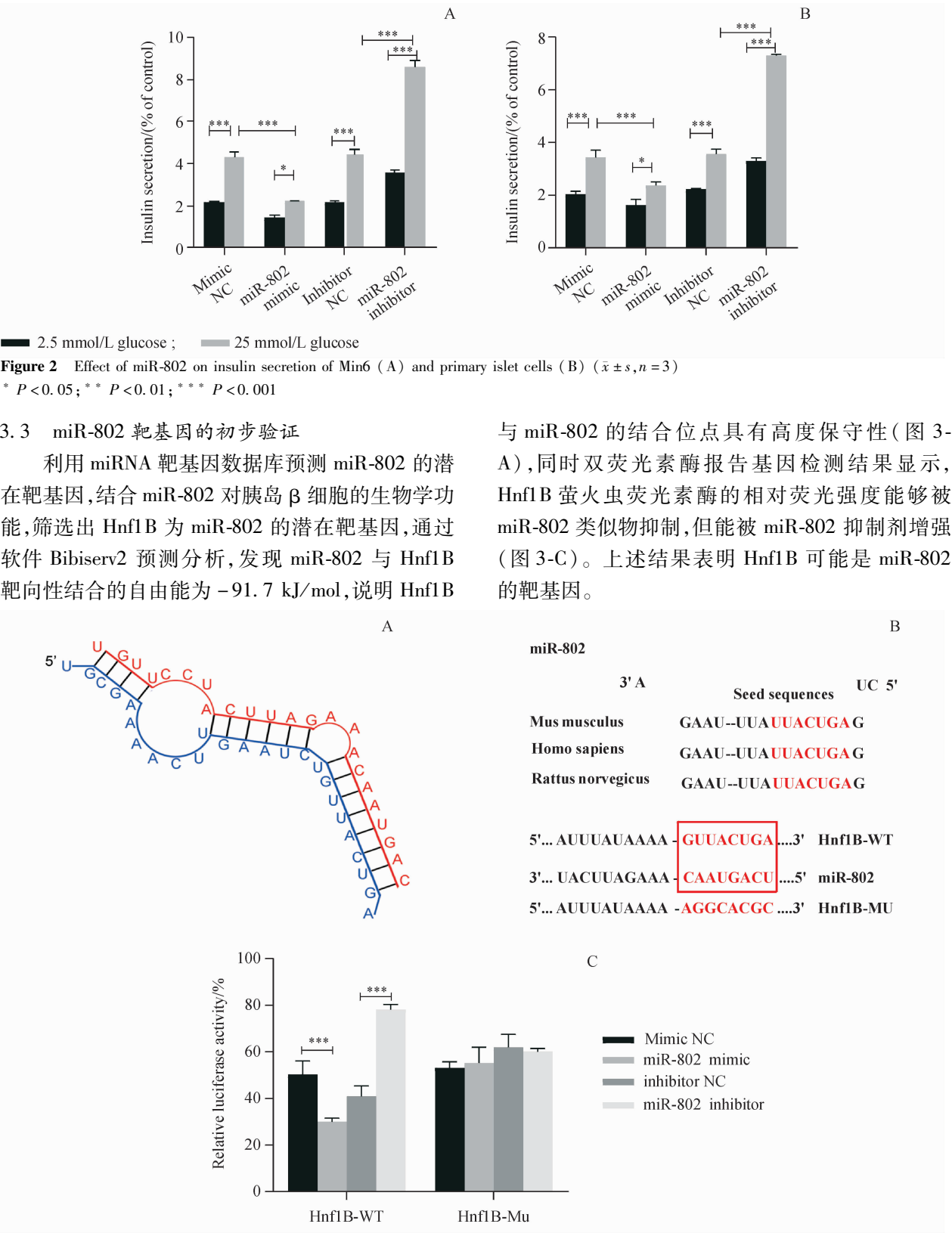


Figure 3 Prediction and preliminary verification of miR-802 target gene
A: Target binding free energy of miR-802 and Hnf1B was predicted and analyzed by bibiserv2; B: Target binding sequence of miR-802 and Hnf1B was predicted by targetscan; C: Target relationship between miR-802 and Hnf1B was preliminarily verified by double luciferase reporter gene ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
*** $P < 0.001$

3.4 Western blot 和 qPCR 验证 miR-802 靶向 Hnf1B

为了进一步确证 miR-802 靶向 Hnf1B, 本研究利用 Western blot 和 qPCR 进一步确认。结果如图 4 所示, 在 Min6 细胞中过表达 miR-802 可以显著降低靶基因 Hnf1B 的蛋白和 mRNA 水平, 而在 Min6 细胞中敲除 miR-802 时观察到相反的现象。

3.5 Hnf1B 促进胰岛素分泌

Hnf1B 是对胰腺细胞形成和维持血糖稳态具有重要作用的转录因子。为了研究 Hnf1B 是否能调控胰岛 β 细胞功能, 本研究通过在 Min6 和胰岛原代细胞中转染 sh-Hnf1B 和 Hnf1B 过表达载体, 通过 qPCR 及 Western blot 验证 Hnf1B 的转染效率, 结果显示 Hnf1B 在 Min6 细胞中过表达约 300 倍, 降低至 70% (图 5-A); 在胰岛原代细胞中 Hnf1B 被过表达约 250 倍降低至 70% (图 5-B)。接着在 Min6 细胞及胰岛原代细胞中开展 GSIS 实验, ELISA 检测结果显示 Hnf1B 可以显著促进 Min6 细胞 (图 5-C) 和胰岛原

代细胞 (图 5-D) 分泌胰岛素。以上结果表明 Hnf1B 可调控胰岛 β 细胞分泌胰岛素。

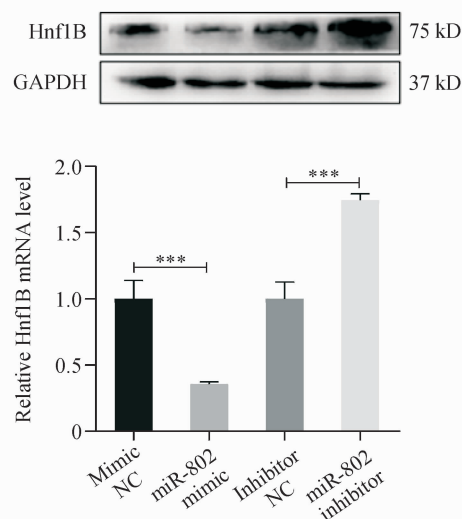


Figure 4 Effects of miR-802 on the protein and mRNA expression of Hnf1B in Min6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$). *** $P < 0.001$

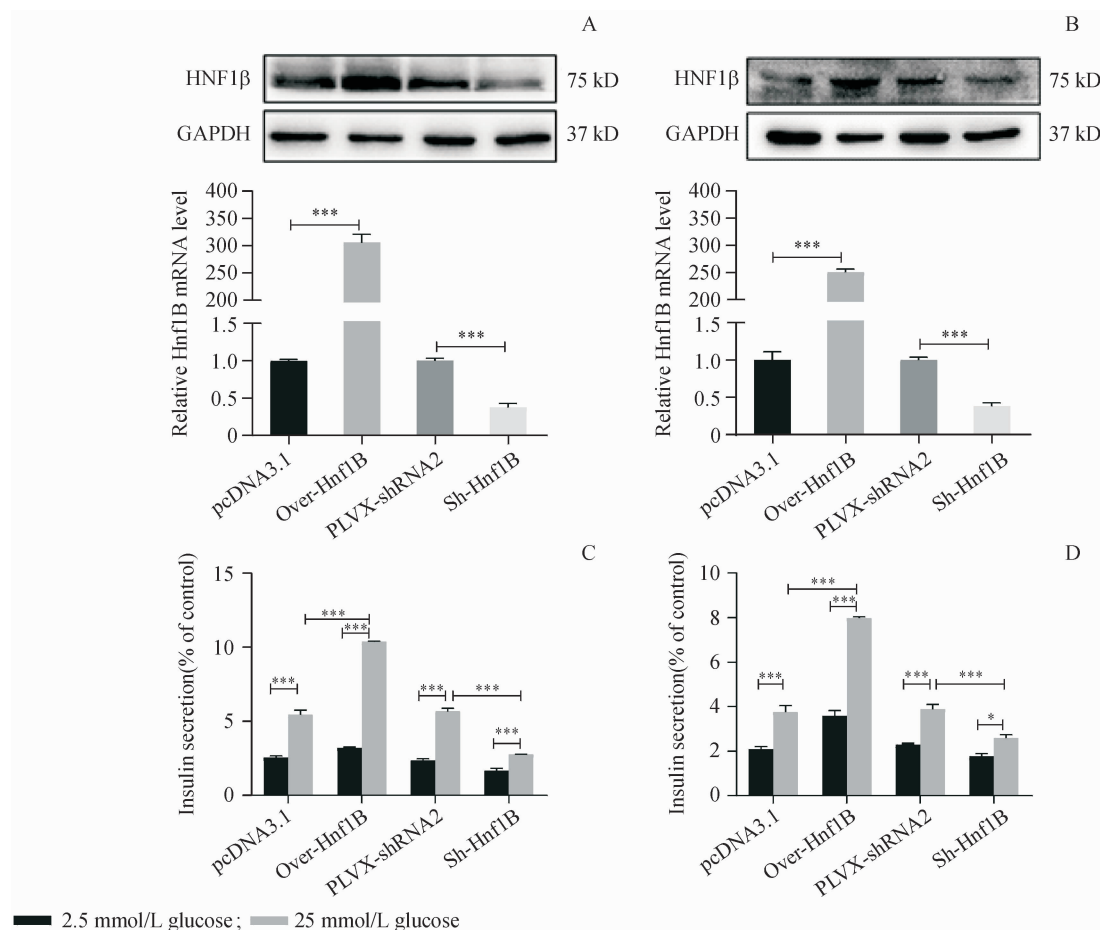


Figure 5 Effect of Hnf1B on the secretory function of islet β cells. Overexpression and knockdown of Hnf1B in Min6 and primary islet cells respectively A: Changes in protein and mRNA levels of Hnf1B in Min6 cells; B: Changes in protein and mRNA levels of Hnf1B in primary islet cells; C: Effects on insulin secretion in Min6 cells; D: Effects on insulin secretion in primary islet cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$; * * $P < 0.01$; * * * $P < 0.001$

3.6 miR-802 靶向 Hnf1B 抑制胰岛 β 细胞分泌胰岛素

为了进一步验证 miR-802 是否通过靶向 Hnf1B 调控胰岛素的分泌,在 Min6 细胞和胰岛原代细胞中转染 miR-802 类似物和 Hnf1B 过表达载

体,结果如图 6-A 和 6-B 显示,与单转染 miR-802 类似物组相比,共转染 Hnf1B 和 miR-802 类似物组可回复 miR-802 降低的胰岛素分泌能力,以上结果表明 miR-802 是通过靶向 Hnf1B 抑制胰岛素分泌。

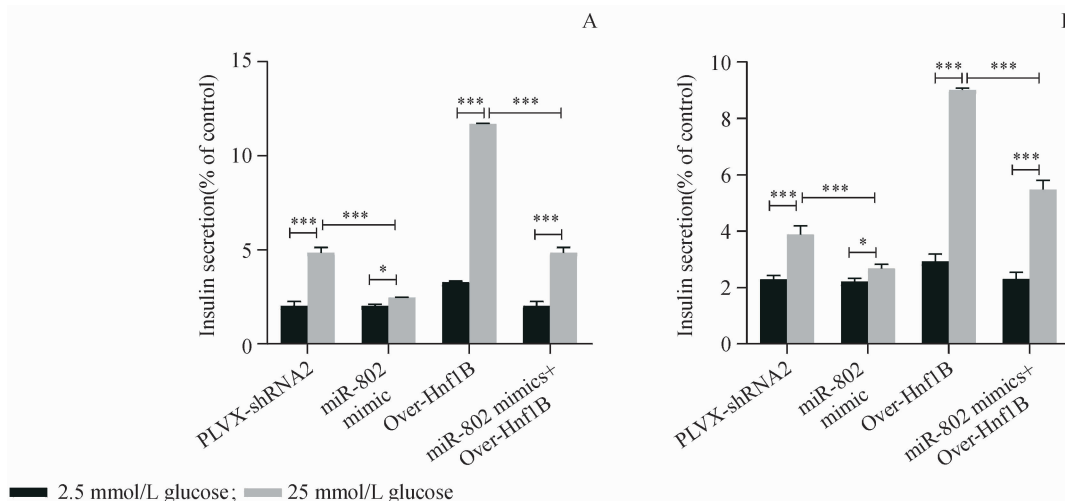


Figure 6 MiR-802 targeting Hnf1B regulates the secretion of islet β cells. Co-transfected miR-802 mimics and Hnf1B in Min6 and primary islet cells for 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Insulin secretion in Min6 cells; B: Insulin secretion in primary islet cells

* * $P < 0.001$

4 讨论

肝细胞核因子 1α (Hnf1A) 和 Hnf1B (或 vHNF1) 是在肝、肾、肠道和胰腺 β 细胞中表达的密切相关的转录因子^[13]。其最初被发现为单基因糖尿病基因,临床特征包括胰腺发育不全和外分泌功能不全。来自动物模型的数据表明, Hnf1B 对于胰腺和肝脏发育的多个阶段至关重要^[14]。Hnf1B 的分子改变与多器官疾病有关^[15-16],包括 5 岁以下儿童的成熟期糖尿病 (MODY5, HNF1 β -MODY)^[17-18],外分泌胰腺的形态和功能异常^[19]。另有研究表明 Hnf1B 突变携带者具有高胰岛素血症并伴有胰岛素抵抗^[20]。新近研究显示 Hnf1B 通过调控 PPAR γ 信号通路参与调控胰岛素抵抗^[15],以上研究均说明 Hnf1B 可能参与胰岛 β 细胞功能的调控。同时, Hnf1B 可能与 PAX6 启动子结合,直接控制 PAX6 的表达^[21],许多证据表明, PAX6 的任何改变(过度表达和限制性表达)均能对血糖产生影响,从而参与了糖尿病的发生与发展。PAX6 有望成为治疗糖尿病的新的发展方向^[22],也为进一步深入研究提供新的依据。

本次研究通过在 Min6 细胞和胰岛原代细胞中转染 miR-802 的模拟物和抑制剂,发现过表达 miR-802 会抑制胰岛 β 细胞胰岛素的分泌,利用生物信息学预测并经过双荧光素酶报告系统、Western blot 等实验确证了 Hnf1B 是 miR-802 的靶基因;最后通过功能回复实验证明了 miR-802 是通过靶向 Hnf1B,从而抑制胰岛素分泌。本研究首次阐明了 miR-802 可以参与胰岛 β 细胞功能的调控,初步探讨其调控机制,为糖尿病的发生发展提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, **87**(1): 4-14.
- [2] Du T, Chen J, Shen X. Research advances in susceptibility genes of non-alcoholic fatty liver disease and its association with type 2 diabetes [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(5): 537-544.
- [3] Wu Y, Tang TT, Zhu QH, et al. Mechanisms of miR-29a in migration and invasion of breast cancer MCF-7 cells *in vitro* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(3): 348-353.

- [4] Chen X, Ba Y, Ma LJ, *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Res*, 2008, **18**(10): 997–1006.
- [5] van de Bunt M, Gaulton KJ, Parts L, *et al.* The miRNA profile of human pancreatic islets and beta-cells and relationship to type 2 diabetes pathogenesis [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(1): e55272.
- [6] Esguerra JL, Bolmeson C, Cilio CM, *et al.* Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets of non-obese type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rat [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(4): e18613. doi:10.1371/journal.pone.0018613.
- [7] El Ouamari A, Baroukh N, Martens GA, *et al.* MiR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells [J]. *Diabetes*, 2008, **57**(10): 2708–2717.
- [8] Tang XQ, Muniappan L, Tang GL, *et al.* Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic beta cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription [J]. *RNA*, 2009, **15**(2): 287–293.
- [9] Sun LL, Jiang BG, Li WT, *et al.* MicroRNA-15a positively regulates insulin synthesis by inhibiting uncoupling protein-2 expression [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, **91**(1): 94–100.
- [10] Sun D, Chen J, Wu W, *et al.* MiR-802 causes nephropathy by suppressing NF- κ B-repressing factor in obese mice and human [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, **23**(4): 2863–2871.
- [11] Kornfeld JW, Baitzel C, Könnner AC, *et al.* Obesity-induced over-expression of miR-802 impairs glucose metabolism through silencing of Hnf1b [J]. *Nature*, 2013, **494**(7435): 111–115.
- [12] Zhang FF, Liu Y, Jin L. Mechanism of lncRNA-Pluto on promoting insulin biosynthesis and secretion [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2019, **50**(4): 481–489.
- [13] Wang L, Coffinier C, Thomas MK, *et al.* Selective deletion of the Hnf1b (MODY5) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release [J]. *Endocrinology*, 2004, **145**(8): 3941–3949.
- [14] El-Khairi R, Vallier L. The role of hepatocyte nuclear factor 1 β in disease and development [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2016, **18**(Suppl 1): 23–32.
- [15] Su SH, Wu GY, Cheng XD, *et al.* Oleanolic acid attenuates PCBs-induced adiposity and insulin resistance via HNF1b-mediated regulation of redox and PPAR γ signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, **124**: 122–134.
- [16] Clissold RL, Hamilton AJ, Hattersley AT, *et al.* HNF1B-associated renal and extra-renal disease—an expanding clinical spectrum [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015, **11**(2): 102–112.
- [17] Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, *et al.* Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY [J]. *Nat Genet*, 1997, **17**(4): 384–385.
- [18] Bellanné-Chantelot C, Chauveau D, Gautier JF, *et al.* Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations [J]. *Ann Intern Med*, 2004, **140**(7): 510–517.
- [19] Haldorsen IS, Vesterhus M, Raeder H, *et al.* Lack of pancreatic body and tail in HNF1B mutation carriers [J]. *Diabet Med*, 2008, **25**(7): 782–787.
- [20] Brackenridge A, Pearson ER, Shojaee-Moradie F, *et al.* Contrasting insulin sensitivity of endogenous glucose production rate in subjects with hepatocyte nuclear factor-1beta and-1alpha mutations [J]. *Diabetes*, 2006, **55**(2): 405–411.
- [21] Cebola I, Rodríguez-Seguí SA, Cho CH, *et al.* TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, **17**(5): 615–626.
- [22] Panneerselvam A, Kannan A, Mariajoseph-Antony LF, *et al.* PAX proteins and their role in pancreas [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, **155**: 107792.