

MicroRNA 在糖尿病并发症中的研究进展

谢丽莉

作者单位:300192 天津市,天津市第一中心医院检验科

【摘要】 糖尿病及其并发症严重威胁着人类健康,具体的发病机制尚不明确,其发生可能涉及到多重复杂因素。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一组长约 22 个核苷酸,非编码的小 RNA,他们参与调节细胞的生长发育、分化、增殖和凋亡等。最近,越来越多研究表明,miRNA 在糖尿病及其并发症的发病机制中起着重要作用,本文就 miRNA 的发现、生物学特性、合成及其作用机制、以及在糖尿病并发症中的研究进展进行综述。

【关键词】 微小 RNA;糖尿病;糖尿病并发症;糖尿病肾病;糖尿病心脏病;糖尿病视网膜病变

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.013

目前,糖尿病已经成为继肿瘤、心脑血管疾病之后影响全球性公共健康的第三大慢性非传染性疾病。糖尿病并发症是糖尿病患者死亡的主要原因,因其进展缓慢,起病隐匿,一旦发生,病变很难逆转,故糖尿病并发症的早期诊断和治疗较为困难。近年来,一些研究表明微小 RNA(microRNA, miRNA)在糖尿病,尤其是糖尿病并发症如糖尿病心脏病(diabetic cardiomyopathy, DC)、糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)、糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)等的发生发展过程中起重要作用。本文主要就 miRNA 及其在糖尿病并发症中的研究进展做一综述。

1 miRNA 的发现

1993 年, Lee 等^[1]首先在线虫中发现了 miRNA, 命名为 RNA:lin-4。但是,该发现并没有得到应有的重视,直到 2000 年, Reinhart 等^[2]才发现了另一个类似的具有转录后调节功能的小分子 RNA:let-7。2001 年《Science》杂志报道了研究者从线虫、果蝇和人体克隆中发现的几十个类似 lin-4 的小分子 RNA 基因,被命名为 microRNA。这时,miRNA 才逐渐被人们所认知并迅速成为研究的热点。

2 miRNA 的生物学特性

miRNA 是一组广泛存在于真核生物中的非编码小 RNA,长度约为 19~25 个核苷酸,其通过与靶基因序列特异性相互作用,在转录后水平调节信使 RNA 的表达,在生物体的各种生命活动过程中发挥着重要作用。miRNA 广泛存在于多种真核生物中,从低等生物到人类都有其存在的痕迹,参与许多生物学现象与生理过程。其生物学特性主要表现为:分布广泛性、高度保守性、时序表达特异性、组织表达特异性和结构特异性。

3 miRNA 的合成及其作用机制

miRNA 的合成及其作用机制是一个十分复杂的过程:首先,细胞核内的 miRNA 基因转录成初级 miRNA (pri-miRNA),然后由细胞核内的酶 DroshaRNase 将其剪切成前体 miRNA(pre-miRNA),核内的转运蛋白将 pre-miRNA 转运到细胞质中。在细胞质中的 Dicer 酶把 pre-miRNA 剪切成双链 miRNA。成熟的 miRNA 与其互补链结合成双螺旋结构,接下来,双螺旋打开,其中的 1 条会与 RNA 诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)形成非对称的 RISC 复合物。该非对称 RISC 复合物能够与目标靶 mRNA 相结合,发挥其调控基因的作用。其作用机制有两种:(1)复合物中的单链 miRNA 与靶 mRNA 的 3'UTR 完全互补,造成 mRNA 被 RISC 降解。(2)复合物中的单链 miRNA 与靶 mRNA 的 3'UTR 不完全互补配对,从而阻断该基因的翻译过程。在植物中,miRNA 多以第 1 种方式起作用;而在动物中,miRNA 则多以第 2 种方式起作用^[3,4]。也有研究表明,miRNA 不仅可以和靶分子 mRNA 的 3'UTR 结合,还可以和编码区及 5'UTR 结合。Wang 等^[5]的研究显示,miRNA 通过与靶分子 mRNA 的编码区结合,调节胚胎干细胞的分化。研究^[6]发现,不同组织或细胞在不同阶段表达着不同的 miRNA 谱。一个 miRNA 可调节数百个靶基因,包括细胞因子、转录因子等,miRNA 与靶基因组成了复杂的调节网络。相对于蛋白水平的调节,miRNA 水平的调节显得更加节省能量,效率更高而且可逆,大多数 miRNA 对靶基因起着微调作用,少数 miRNA 调节也可引起很明显的表型改变。

4 miRNA 与 DC

DC 以心肌肥厚和收缩障碍为主要特征,这与持续高血

糖(hyperglycemia, HG)状态引起 miRNA 的改变密切相关^[7]。miR-133 是在 DC 中第一个被发现发生改变的 miRNA。心脏中 miR-133 水平的改变最终会导致两种结果:(1)QT 间期延长综合征(long qt syndrome, LQTS)。QT 间期是心电图从 Q 波开始到 T 波结束的时间段。LQTS 是一种威胁人类生命的疾病,其影响心脏系统并有可能导致晕厥、心跳停止和猝死。与 LQTS 相关的基因是 HERG 基因,HERG 基因主要负责编码心肌中 K⁺通道相关的蛋白,而在 DC 中 HERG 基因表达是被下调的,其下调主要发生在转录后水平。在糖尿病患者心脏中,HERG 蛋白下降了 60%而 mRNA 水平无改变。目前已经证实 miR-133 对 HERG 表达具有抑制作用。研究^[8]显示,miR-133 在糖尿病家兔和 db/db 小鼠的心脏中表达显著提高。高浓度的 miR-133 抑制 HERG 基因表达,进而导致快钾通道相关蛋白合成减少。在糖尿病患者心脏中降低快钾通道会导致 QT 延长,最终导致 LQTS 的发生而引起心律失常。(2)心肌肥大。miR-133 对心肌肥大的作用与在 LQTS 中完全相反。miR-133 过表达导致 LQTS,而下调 miR-133 水平导致心肌肥大。Shen 等^[9]在以心肌肥大特征的 DC 鼠模型中发现,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路富集于心脏。该信号通路包括 ERK1/2、JNK 和 p38 三个主要部分。研究者将乳鼠心肌细胞暴露于 HG 中并用 miR-373 转染,发现心肌细胞体积缩小,靶基因肌细胞增强因子 2C 水平降低,而 miR-373 的表达依靠 p38 的调控,因此,miR-373 参与 MAPK 信号通路对心肌肥厚调控。另外, Feng 等^[10]在 T1DM 心脏病小鼠的肥厚心肌组织及 HG 环境下培养的鼠新生心肌细胞中发现 miR-133a 表达显著上调。提示 miR-133a 在糖尿病患者心肌组织中开始上调可能是心肌肥厚的信号。

心肌损伤或能量代谢异常致心肌收缩障碍与 miRNA 调控相关。在体内外,分别用 HG 刺激心肌细胞,出现 miR-1/206 表达显著上调,随后对热休克蛋白 60(heat shock protein 60, Hsp60)转录后调控使 Hsp60 水平降低^[11]。Hsp60 是糖尿病心肌损伤防御机制的重要组分,其下调将加速心肌细胞凋亡,导致心肌损伤。

5 miRNA 与 DN

DN 是一种由糖尿病导致的肾脏疾病,与 Kimmelstiel-Wilson 综合征和毛细血管间肾小球性肾炎相似,DN 最终导致糖尿病患者发生肾衰。近年来有关 miRNAs 在 DN 发病过程中的作用已经引起研究人员的广泛关注。Wang 等^[12]将体外培养的人及小鼠肾小球系膜细胞,暴露在 HG 和转化生长因子-β1 的刺激下,相比较于正常对照组,发现其与体内实验中糖尿病小鼠模型的系膜细胞一样均出现 miR-373 表达水平明显升高。miR-373 通过减少 p21 活化激酶、超氧化物歧化酶和其他靶点的 mRNA 的表达,抑制相应蛋白合成,间接

作用于细胞外基质蛋白-纤连蛋白,使其表达增加及氧化应激敏感性增强,从而在 DN 系膜改变的发生发展过程中起了重要作用。Fu 等^[13]报道氧化应激在 DN 发病机制中扮演重要角色。DN 中还还原型辅酶 II(NADPH)氧化酶源性超氧与 HG 诱导的氧化应激较密切,而 NADPH 氧化酶的表达受到 miRNA 调控。miR-25 作为内源性基因沉默因子,在 DN 中调控 NOX4(HG 状态下 NADPH 氧化酶主要催化亚基)的功能与表达。他们发现 miR-25 在糖尿病鼠的肾脏和 HG 处理的系膜细胞中降低显著,而 NOX4 表达水平升高。在体外研究中 miR-25 的抑制物显著提高了 NOX4 的 mRNA 和蛋白的水平,证实 miR-25 可能与 NOX4 的 mRNA 稳定性表达相关。Kato 等^[14]提出 miR-216 是导致 DN 的另一个潜在因素,即在肾小球系膜细胞中,TGF-β1 刺激能上调 miR-216 的表达,导致 I 型胶原 α₂ 的表达量增加,这牵涉到 I 型胶原 α₂ 基因启动子上 E-box 序列和一系列分子复合物之间的关系,其中之一是受 RNA 结合蛋白 Y-box 结合蛋白-1 的调节,他们提出假设即上调 miR-216 可通过 Y-box 结合蛋白-1 介导对 I 型胶原 α₂ 的调节,因此,TGF-β1 刺激下通过 miR-216 抑制 YB-1 的表达可极大地促进纤维化的发展。

庞琦等^[15]用 12 只 HG 且 24 h 尿蛋白显著增高的先天性肥胖性 2 型糖尿病小鼠(db/db)作为早期 DN 组,db/m 作为正常对照组,建立 db/db 小鼠早期 DN miRNA 的差异表达谱,用 miRNA 芯片技术和 RT-PCR 进行检测。通过对早期 db/db 小鼠的 miRNA 初步筛查显示,miR-196a、miR-98 和 miR-29c 在 DN 组表达明显上调,miR-21、miR-451、miR-709 和 miR-187 在 DN 组表达明显下调,说明部分 miRNA 在 DN 和正常对照小鼠肾脏组织中存在差异表达,可能参与了 DN 发生的分子机制。Zhang 等^[16]同时发现在糖尿病 db/db 小鼠体内异位表达 miR-21 对 DN 组肾小球系膜增殖起着一定的调控作用,PTEN 是 miR-21 的靶基因并受其负调控,miR-21 的下调将导致肾脏纤维化。

6 miRNA 与 DR

DR 是糖尿病最常见和最严重的微血管并发症之一,其主要的特征是视网膜微血管功能障碍,最严重的后果是导致失明,已成为大多数发达国家工作年龄人群致盲的首要原因。Kovacs 等^[17]采用链脲佐菌素诱导建立糖尿病大鼠模型,通过与对照组对比分析,发现在两组大鼠视网膜中有 350 种 miRNA,其中 86 种 miRNA 表达有差异;视网膜内皮细胞中检测出 220 种 miRNA,其中 120 种 miRNA 表达有差异。通过基因功能注释分析发现,miRNA-146 通过作用于白细胞介素-1 受体相关激酶 1 和肿瘤坏死因子受体相关因子 6,抑制了核转录因子-κB 的活化。与血管内皮生长因子诱导有关的 miRNA-17-5p、miRNA-18a、miRNA-20a、miRNA-21、miRNA-31 和 miRNA-155 等的表达都有增加。与 p53 相作用的

miRNA-34 家族在糖尿病组的表达上调,表明 p53 依赖的 miRNA-34 介导的细胞凋亡可能在早期 DR 中起重要作用。

目前,已有较多 miRNA 作用于视网膜新生血管机制方面的研究报道。Silva 等^[18]在对 miR-29b 及其潜在靶点促凋亡 RNA 依赖的蛋白激酶相关蛋白 X 进行定位和表达的研究中发现 miR-29b 和 RAX 定位和表达于正常小鼠和糖尿病小鼠的视网膜神经节细胞和视网膜内层核细胞中,且二者之间存在间接调控关系。因此,miR-29b 的表达变化可尽早预测视网膜神经细胞的凋亡。另外,视网膜周细胞凋亡在 DR 早期发病机制中起重要作用,而 NF- κ B 参与视网膜周细胞促凋亡程序的触发。McArthur 等^[19]利用基因芯片技术,对已经出现 DR 的大鼠视网膜和 HG 刺激下的人视网膜血管内皮细胞进行对比筛查,发现 miRNA-200b 的表达显著增高,同时血管内皮生长因子的 mRNA 和蛋白表达也增高。在视网膜中,miRNA-200b 定位于神经元、神经胶质细胞和血管内皮细胞。通过基因干扰技术阻断 miRNA-200b 的表达,可明显降低血管内皮生长因子 mRNA 和蛋白的表达水平;同时也阻碍了糖尿病引起的视网膜血管通透性的增加和新生血管的生成。因此,针对 miRNA 的研究可能成为未来 DR 治疗的新靶点。

7 问题与展望

miRNA 是目前生命科学领域研究的一大热点,虽然人类主要 miRNA 已经逐步被认识,但确定和破译每个 miRNA 的作用靶点和作用途径及其调节仍是目前极为重要的工作。糖尿病并发症发病机制十分复杂,目前已发现多种 miRNA 在其发病过程中起着重要作用。根据现有研究结果可推测,针对 miRNA 的进一步研究将有望发现早期诊断糖尿病并发症生物标志物及防治的新靶点,对糖尿病并发症的干预治疗提供新的突破口,有着广阔的临床应用前景和价值。

8 参考文献

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, et al. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843-854.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403: 901-906.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 2009, 19: 92-105.
- Gu S, Jin L, Zhang F, et al. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16: 144-150.
- Wang Y, Xu Z, Jiang J, et al. Endogenous miRNA sponge lincRNA-RoR regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in human embryonic stem cell self-renewal. *Dev Cell*, 2013, 25: 69-80.
- Yeung ML, Jeang KT. MicroRNAs and cancer therapeutics. *Pharm Res*, 2011, 28: 3043-3049.
- Diao X, Shen E, Wang X, et al. Differentially expressed microRNAs and their target genes in the hearts of streptozotocin-induced diabetic mice. *Mol Med Rep*, 2011, 4: 633-640.
- Xiao J, Luo X, Lin H, et al. MicroRNA miR-133 represses HERG K⁺ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts. *J Biol Chem*, 2011, 286: 28656.
- Shen E, Diao X, Wang X, et al. MicroRNAs involved in the mitogen-activated protein kinase cascades pathway during glucose-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Am J Pathol*, 2011, 179: 639-650.
- Feng B, Chen S, George B, et al. miRNA133a regulates cardiomyocyte hypertrophy in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 2010, 26: 40-49.
- Shan ZX, Lin QX, Deng CY, et al. miR-1/miR-206 regulate Hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes. *FEBS Lett*, 2010, 584: 3592-3600.
- Wang Q, Wang Y, Minto AW, et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. *FASEB J*, 2008, 22: 4126-4135.
- Fu Y, Zhang Y, Wang Z, et al. Regulation of NADPH oxidase activity is associated with miR-25-mediated NOX4 expression in experimental diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*, 2010, 32: 581-589.
- Kato M, Wang L, Putta S, et al. Post-transcriptional up-regulation of Tsc-22 by Ybx1, a target of miR-216a, mediates TGF- β -induced collagen expression in kidney cells. *J Biol Chem*, 2010, 285: 34004-34015.
- 庞琦, 牟娇, 郭艳红, 等. microRNA-215 在糖尿病肾病小鼠肾组织中的表达及意义. *中华肾脏病杂志*, 2012, 28: 305-311.
- Zhang Z, Peng H, Chen J, et al. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice. *FEBS Lett*, 2009, 583: 2009-2014.
- Kovacs B, Lumayag S, Cowan C, et al. MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52: 4402-4409.
- Silva VA, Polesskaya A, Sousa TA, et al. Expression and cellular localization of microRNA-29b and RAX, an activator of the RNA-dependent protein kinase (PKR), in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Vis*, 2011, 17: 2228-2240.
- McArthur K, Feng B, Wu Y, et al. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. *Diabetes*, 2011, 60: 1314-1323.

(收稿日期: 2014-11-17)

(本文编辑: 李霖)