

· 综 述 ·

微小RNA-200家族对糖尿病及其并发症的影响

钱玲玲, 徐 凤, 王如兴*

(南京医科大学附属无锡市人民医院心内科, 无锡 214023)

【摘 要】糖尿病并发症可引起人体心、脑和肾等重要组织和器官损害, 严重危害人类健康, 但其发病机制并不十分清楚。近年研究发现微小RNA (microRNA, miRNA) 在糖尿病及其并发症的发生发展中起重要作用。miRNA是真核生物中一类长度约22~25个核苷酸的内源性非编码小分子RNA, 通过转录后机制调控其下游靶基因的表达, 进而影响疾病的病理生理学过程。其中miRNA-200 (miR-200) 家族对糖尿病及其并发症的调控研究较多。miR-200家族不仅对胰岛素相关信号通路具有调控作用, 在糖尿病微血管及大血管并发症中也发挥重要调控作用。因此, 探讨miR-200家族与糖尿病及其并发症之间的关系, 可为糖尿病及其并发症的诊断及治疗提供新的思路。

【关键词】微小RNA; miR-200; 糖尿病; 并发症

【中图分类号】 R342.3; R587.1

【文献标识码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2015.10.181

Role of microRNA-200 family in diabetes mellitus and the related complications

QIAN Ling-Ling, XU Feng, WANG Ru-Xing*

(Department of Cardiology, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China)

【Abstract】 The complications of diabetes usually cause target organ damage, such as the heart, brain, kidneys and others, and are seriously hazardous to human health. But the underlying mechanism is still not very clear. Recent studies indicated that microRNA (miRNA) plays an important role in the occurrence and development of diabetes and its complications. miRNA, An endogenous small non-coding RNA molecule (containing about 22-25 nucleotides) in eukaryotes, regulates the expression of its downstream target genes at post-transcriptional level, and then influences the pathophysiology of diseases. Many studies have reported that miRNA-200 (miR-200) family plays certain regulative roles in diabetes and its complications. The family not only regulates insulin related signal pathway, but also plays an important role in diabetic microvascular and macrovascular complications. Therefore, to explore the relationship of miR-200 family with diabetes and its complications would provide a new train of thought for diagnosis and treatment of diabetes and its complications.

【Key words】 microRNA; miR-200; diabetes mellitus; complications

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81070157 and 81370303), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2011179), the Seventh Batch of High-level Project of the "Six-Industry Talent Summit" of Jiangsu Provincial Bureau of Personnel (006) and the Project of Medical Key Talents of Jiangsu Province (RC201134).

Corresponding author: WANG Ru-Xing, E-mail: ruxingw@aliyun.com

糖尿病是一种以慢性血糖升高为特征的代谢性疾病, 已成为危害人类健康的主要慢性病之一^[1]。糖尿病可引起糖、脂肪、蛋白质、水和电解质等代谢异常, 从而使心、脑、肾、神经和血管等组织及器官出现结构及功能异常, 最终导致器官功能衰竭而死亡。糖尿病并发症一般可分为两大类, 一类为

微血管并发症, 包括视网膜病变、肾脏病变和神经病变等; 另一类为大血管并发症, 包括心血管以及周围血管病变 (心脏病、高血压、脑血管意外及下肢血管病变) 等^[2], 两类并发症均为糖尿病防治的重点和难点。因此, 深入研究糖尿病及其并发症的发病机制、积极探索新的治疗途径, 具有重要意义。

收稿日期: 2015-04-23; 修回日期: 2015-06-03

基金项目: 国家自然科学基金 (81070157、81370303); 江苏省自然科学基金 (BK2011179); 江苏省人事厅“六大人才高峰”第七批高层次人才项目 (006); 江苏省医学重点人才资助项目 (RC201134)

通信作者: 王如兴, E-mail: ruxingw@aliyun.com

最近研究表明,一类具有基因表达调控作用的非编码小分子RNA,即微小RNA(microRNA, miRNA),在糖尿病的发生发展中起重要作用^[2,3],但其机制并不清楚。本文主要综述miRNA-200家族的特性、其在胰岛素相关信号通路中的调控作用及对糖尿病微血管和大血管并发症的影响,以期对糖尿病及其并发症的诊断及治疗提供新思路。

1 miRNA概述及miR-200家族简介

miRNA是真核生物中一类长度约在22~25个核苷酸的内源性非编码小分子RNA,通过转录后机制调控其下游靶基因的表达^[4,5]。miRNA通过与靶基因信使RNA(mRNA)的3'端非翻译区作用而抑制靶基因的转录和表达^[6]。在动植物以及病毒中迄今已发现有两万多个miRNA分子,大多数miRNA基因以单拷贝、多拷贝或基因簇的形式存在于基因组中。越来越多的研究表明miRNA参与调控糖尿病及其并发症的发生发展^[7],尤其以对miR-200家族的研究最为广泛。

miR-200家族有5个成员,分为两大组:一组包括miR-200b、miR-200c以及miR-429,另一组包括miR-200a和miR-141^[8,9]。这两组之间仅在种子序列中含有单个核苷酸的差异(miR-200b/200c/429为AAUACUG,而miR-200a/141为dAACACUG),因而具有相同的下游靶基因。在小鼠中,miR-200a、miR-200b以及miR-429在4号染色体(人类为1号染色体)上作为单个多顺反子转录本表达,而miR-200c和miR-141表达于6号染色体(人类为12号染色体)^[10]。miR-200家族基因在脊椎动物物种间高度保守。它们最早被发现于肿瘤和代谢失衡状态时的上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中^[8],在上皮细胞中大量表达。

miR-200家族的表达可以通过其启动子区的修饰调控。最近的研究表明,miR-200家族启动子区的修饰可以导致其表达丢失。比如在肿瘤组织中,miR-200c与miR-141的启动子被甲基化修饰,而聚梳蛋白家族(polycomb group, PcG)介导的组蛋白修饰可以使miR-200a、miR-200b和miR-429的表达沉默^[11]。另外,miR-200家族的启动子还可以与转录抑制因子锌指E盒结合同源盒(zinc-finger E-box binding homeobox, Zeb)1、Zeb2、特殊蛋白1和P53结合。结合后,Zeb1和Zeb2可以抑制miR-200家族转录,而特殊蛋白1和P53可以分别激活miR-200a/miR-200b/miR-429和miR-200c/miR-141^[11]。随着研究的深入,miR-200家族在一些疾病,特别

是糖尿病及其并发症中的表达及其调控作用得到密切关注。

2 miR-200家族在胰岛素相关信号通路中的调控作用

糖尿病主要是由胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗所致,因此,胰岛素相关信号通路是影响糖尿病发生的关键。肌腱膜纤维肉瘤癌基因同源物(avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog, Maf)和锌指蛋白多类型2(zinc finger protein multitype 2, ZFPM2/FOG2)这两个转录因子是胰岛素信号通路中的重要分子^[12]。它们均在胰岛α细胞上大量表达,且在它们的3'端非翻译区包含多个胰岛β细胞高表达的miRNA,如miR-200c、miR-125b和miR-182等的识别位点。Klein等^[12]发现,胰岛细胞系min6细胞予以miR-200c抑制剂刺激后,cMaf的RNA水平明显上升;而当小鼠胰岛α细胞过表达miR-200c时,cMaf的RNA及蛋白表达水平明显下降。miR-200c还可抑制FOG2的表达,进而减少胰岛素受体底物-1/p85a/p110复合体的形成,影响磷脂酰肌醇-3激酶信号通路的激活,进一步导致胰岛素生成信号通路受损。同样,miR-200家族与其靶蛋白EP300作用可激活核转录因子κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)通路,促进炎症反应发生,影响胰岛素信号通路^[2]。出生后予以瘦素阻断且高脂饮食喂养的大鼠产生明显的胰岛素抵抗,其下丘脑及肝组织中的能量代谢相关蛋白的表达发生改变,同时检测到miR-200a水平上调,提示miR-200a水平与胰岛素/瘦素反应有一定的关系^[13]。miR-200家族对胰岛素相关信号通路中的调控作用也得到了循证医学的支持。Nielsen等^[14]发现,在新诊断为1型糖尿病的儿童患者的血清中,miR-200a的水平明显上升。

miR-200家族还直接参与对胰岛β细胞的调控^[15]。胰岛β细胞的损失是糖尿病发生发展的关键因素之一。已有的研究表明,糖尿病时,胰岛β细胞中硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)的表达明显增加,且促进了β细胞凋亡;而TXNIP缺失对糖尿病具有保护作用。Filios等^[15]最近发现,胰岛β细胞株INS-1细胞以及原代培养的胰岛中,糖尿病状态以及TXNIP可以诱导miR-200家族的高表达;而miR-200的靶蛋白Zeb1减少,同时β细胞凋亡增加。单独下调Zeb1与miR-200作用的效应是一致的。他们还发现,miR-200作用可以使

胰岛β细胞内上皮细胞的标记蛋白——E-钙黏着蛋白表达增加。这与上皮细胞-间充质转化的抑制作用是一致的,而这一作用可能参与了胰岛β细胞的膨胀过程。TXNIP/miR-200/Zeb1/E-钙黏着蛋白的信号通路的提出,首次表明了miR-200家族参与调控胰岛β细胞功能。

3 miR-200家族在糖尿病微血管并发症中的调控作用

3.1 糖尿病视网膜病变

糖尿病视网膜病变是致盲的重要原因之一。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的增多导致血管新生和通透性增加是引起糖尿病视网膜病变的重要机制。McArthur等^[16]采用基因芯片技术检测链脲霉素诱导的糖尿病大鼠视网膜组织中miRNA的表达,发现与正常对照组相比,miR-200b的表达明显减少,同时miR-200b的靶蛋白VEGF的mRNA及蛋白表达均明显增加。在视网膜组织中,miR-200b定位于神经元、神经胶质细胞和血管细胞上。当血管内皮细胞予以高糖培养模拟糖尿病环境时,miR-200b的表达亦明显减少。将转染miR-200b模拟物的内皮细胞经玻璃体注射后,可以抑制糖尿病大鼠视网膜组织中VEGF的增加,从而阻止血管通透性的增加和血管进一步的新生,使糖尿病视网膜病变得到缓解。而转染miR-200b阻遏物则使VEGF表达进一步上调,加重糖尿病视网膜病变。然而,Murray等^[17]发现在遗传性1型糖尿病Akita小鼠视网膜组织内,miR-200b的表达却明显增加,并证实氧化抵抗蛋白1(oxidation resistance 1, Oxr1)是miR-200b的下游靶蛋白。在人Muller细胞系MIO-M1中,转染miR-200b的模拟物可下调Oxr1的表达,相反,转染miR-200b的阻遏物则上调Oxr1的表达。而当过表达重组Oxr1蛋白时,细胞氧化应激标志物明显减少,还进一步改善了由4-羟基导致的细胞凋亡。因此,miR-200b在Akita小鼠视网膜组织中表达增加,并可能通过下调其下游Oxr1表达,加重氧化应激与细胞凋亡,促进糖尿病视网膜进一步病变。这一结果与链脲霉素诱导的糖尿病大鼠模型相反,可能是和不同的动物模型以及不同的病程有关,miR-200家族对糖尿病视网膜病变的调控作用还需要更进一步的深入研究。

3.2 糖尿病性肾病

糖尿病性肾病的主要特征表现为肾脏基底膜、肾小球系膜区以及肾小管周围间充质区细胞外基质

的堆积,引起肾的纤维化。其中,转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)是影响纤维化进程的关键。在大鼠肾细胞系NRK52E细胞中,异位表达miR-200a可以下调细胞基质蛋白的表达,以及抑制TGF-β诱导的上皮细胞-间充质转化。miR-200a还可直接与TGF-β₂的3'端非翻译区结合而降低其表达。在ApoE基因敲除糖尿病小鼠模型中,不管是早期肾脏病变还是晚期病变,miR-141和miR-200a的表达均减少^[18]。表明糖尿病时miR-200家族可能通过调控TGF-β影响肾脏纤维化水平。除纤维化之外,TGF-β还可通过激活蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)影响肾小球系膜细胞肥大。Park等^[19]发现2型糖尿病db/db小鼠肾组织中TGF-β的增加导致miR-200b和miR-200c水平上升。增加的miR-200家族下调其靶蛋白FOG2,使FOG2对磷脂酰肌醇-3激酶/Akt通路的抑制作用降低,因而激活的Akt信号使糖尿病系膜细胞进一步肥大。Wei等^[20]发现链脲霉素诱导的糖尿病小鼠醛糖还原酶缺失时,miR-141和miR-200a表达明显增加,而纤维化相关蛋白表达减少。当糖尿病小鼠予以miR-200家族抑制剂处理后,其皮质部与肾小球纤维化明显,蛋白尿增多。以上研究均证实,miR-200家族在糖尿病性肾病的调控中发挥了重要作用。

4 miR-200家族在糖尿病大血管并发症中的调控作用

糖尿病时,血管组织中炎症介质的表达明显增加,包括糖基化终末产物受体、环氧合酶2(cyclo-oxygenase 2, COX-2)、细胞因子如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和趋化因子如单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)等^[21-24]。这些炎症介质可以促进细胞增殖、氧化应激、迁移以及单核细胞与平滑肌细胞的结合,从而导致平滑肌细胞功能障碍,加重糖尿病时大血管病变的发生^[25-27],但其具体机制并不十分清楚。Reddy等^[10]发现,2型糖尿病db/db小鼠主动脉组织及其平滑肌细胞中,miR-200b、miR-200c及miR-429的表达较对照组明显升高,而其靶蛋白Zeb1的表达则明显下降。分离培养该小鼠血管平滑肌细胞,予以miR-200b模拟物转染后,Zeb1的表达下调,而炎症因子COX-2、MCP-1显著增加,且平滑肌细胞与单核细胞的结合增多。相反,转染miR-200阻遏物则使平滑肌细胞与单核细胞的结合率下降。进一步使用miR-200模拟物或小RNA干扰下调Zeb1表达后,COX-2的启动子活性明显增强。表

明在2型糖尿病时, miR-200可能通过其靶蛋白Zeb1参与调控主动脉血管平滑肌细胞的炎症反应, 进一步影响糖尿病血管并发症的发生发展。

糖尿病性心脏病的发生与心肌组织中多种细胞的功能密切相关, 包括心肌细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞以及成纤维细胞等^[28]。而细胞的线粒体功能障碍是糖尿病性心脏病发生的重要原因之一, 研究表明miRNA可能参与其中。在低剂量链脲霉素注射5周后的糖尿病小鼠心脏组织中, miR-200的成员之一——miR-141的表达明显增加^[29]。通过预测分析发现, 线粒体膜磷转运蛋白——溶质载体家族25的3号成员(solute carrier family 25 member 3, Slc25a3)是miR-141的下游靶蛋白。Slc25a3可为线粒体基质提供无机磷酸盐, 为腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)生成所必须。在小鼠心肌细胞系HL-1细胞中, 过表达miR-141可使Slc25a3蛋白表达水平明显下调, ATP合成酶活性降低, ATP生成减少。糖尿病小鼠肌纤维间线粒体中Slc25a3减少与miR-141的增加呈正相关。这些结果表明糖尿病小鼠心脏组织中, miR-141可以调控Slc25a3, 进而影响ATP合成, 造成线粒体功能障碍, 从而加重糖尿病心脏病变。

5 结 语

综上所述, miR-200家族可能通过cMaf、FOG2等转录因子参与调控胰岛素相关信号通路, 且TXNIP/miR-200/Zeb1/E-钙黏着蛋白的信号通路参与调控胰岛β细胞凋亡; 通过调控其下游靶蛋白VEGF、Oxrl等影响糖尿病视网膜病变; 通过调控TGF-β影响糖尿病性肾病的纤维化过程; 通过调控靶蛋白Zeb1参与糖尿病大血管的炎症反应过程; 通过调控Slc25a3, 影响ATP合成, 从而加重糖尿病心脏病变。因此, miR-200家族在糖尿病及其并发症中发挥重要的调控作用。然而在不同类型的糖尿病、相同类型糖尿病的不同病程阶段以及不同的靶器官病变中, miR-200家族成员发挥的重要调控作用不尽相同。因此有待进一步深入研究, 为糖尿病及其并发症的治疗提供针对性强的有效新途径。

【参考文献】

- [1] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095–2128.
- [2] McClelland AD, Kantharidis P. microRNA in the development of diabetic complications[J]. *Clin Sci(Lond)*, 2014, 126(2): 95–110.
- [3] Kantharidis P, Wang B, Carew RM, *et al.* Diabetes complications: the microRNA perspective[J]. *Diabetes*, 2011, 60(7): 1832–1837.
- [4] Qin S, Zhang C. MicroRNAs in vascular disease[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011, 57(1): 8–12.
- [5] Xu F, Qian LL, Wang RX. Research progress of microRNAs in coronary cardiopathy[J]. *Natl Med J China*, 2013, 93(26): 2087–2090. [徐 凤, 钱玲玲, 王如兴. 微小RNA在冠状动脉性心脏病中的研究进展[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(26): 2087–2090.]
- [6] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233.
- [7] Reddy MA, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90(3): 421–429.
- [8] Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, *et al.* A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7846–7854.
- [9] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5): 593–601.
- [10] Reddy MA, Jin W, Villeneuve L, *et al.* Pro-inflammatory role of microRNA-200 in vascular smooth muscle cells from diabetic mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(3): 721–729.
- [11] Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(9): 6472–6498.
- [12] Klein D, Misawa R, Bravo-Egana V, *et al.* microRNA expression in alpha and beta cells of human pancreatic islets[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55064.
- [13] Benoit C, Ould-Hamouda H, Crepin D, *et al.* Early leptin blockade predisposes fat-fed rats to overweight and modifies hypothalamic microRNAs[J]. *J Endocrinol*, 2013, 218(1): 35–47.
- [14] Nielsen LB, Wang C, Sørensen K, *et al.* Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression[J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 896362.
- [15] Filios SR, Xu G, Chen J, *et al.* microRNA-200 is induced by thioredoxin-interacting protein and regulates Zeb1 protein signaling and beta cell apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(52): 36275–36283.
- [16] McArthur K, Feng B, Wu Y, *et al.* microRNA-200b

- regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy[J]. *Diabetes*, 2011, 60(4): 1314–1323.
- [17] Murray AR, Chen Q, Takahashi Y, *et al.* microRNA-200b downregulates oxidation resistance 1 (Oxr1) expression in the retina of type 1 diabetes model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(3): 1689–1697.
- [18] Wang B, Koh P, Winbanks C, *et al.* miR-200a prevents renal fibrogenesis through repression of TGF- β_2 expression[J]. *Diabetes*, 2011, 60(1): 280–287.
- [19] Park JT, Kato M, Yuan H, *et al.* FOG2 protein down-regulation by transforming growth factor- β_1 -induced microRNA-200b/c leads to Akt kinase activation and glomerular mesangial hypertrophy related to diabetic nephropathy[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(31): 22469–22480.
- [20] Wei J, Zhang Y, Luo Y, *et al.* Aldose reductase regulates miR-200a-3p/141-3p to coordinate Keap1-Nrf2, Tgf $\beta_1/2$, and Zeb1/2 signaling in renal mesangial cells and the renal cortex of diabetic mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 67: 91–102.
- [21] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications[J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1058–1070.
- [22] Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications[J]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008, 4(5): 285–293.
- [23] Meng L, Park J, Cai Q, *et al.* Diabetic conditions promote binding of monocytes to vascular smooth muscle cells and their subsequent differentiation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(3): H736–H745.
- [24] Devaraj S, Dasu MR, Jialal I. Diabetes is a proinflammatory state: a translational perspective[J]. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2010, 5(1): 19–28.
- [25] Magenta A, Greco S, Gaetano C, *et al.* Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 17319–17346.
- [26] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2002, 105(9): 1135–1143.
- [27] Natarajan R, Cai Q. Monocyte retention in the pathology of atherosclerosis[J]. *Future Cardiol*, 2005, 1(3): 331–340.
- [28] Miki T, Yuda S, Kouzu H, *et al.* Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features[J]. *Heart Fail Rev*, 2013, 18(2): 149–166.
- [29] Baseler WA, Thapa D, Jagannathan R, *et al.* miR-141 as a regulator of the mitochondrial phosphate carrier (Slc25a3) in the type 1 diabetic heart[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303(12): C1244–C1251.

(编辑: 李菁竹)