

微小 RNA 在糖尿病足溃疡发病及愈合过程中的研究进展*

李文惠, 柳国斌[△], 黄 海

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

摘要: 微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约为 20~24 个核苷酸的具有调控功能的非编码 RNA,在人体中主要通过抑制 mRNA 翻译来调节人类约 30%的编码蛋白,进而调节一系列生物学过程,包括生物体生长、发育和疾病等。研究表明,miRNA 在糖尿病及其并发症发生发展过程中发挥重要作用,已成为调节生物学过程的核心因子。糖尿病溃疡是糖尿病常见并发症,已有大量证据证实 miRNA 在糖尿病溃疡发生及愈合过程中发挥重要作用。本文就糖尿病足发病过程中对神经及微血管的损害及其溃疡愈合中各环节中的相关 miRNA 作用作一综述。

关键词: miRNA; 糖尿病足溃疡; 发病机制; 愈合; 治疗进展

中图分类号: R587.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)03-0095-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.03.024

糖尿病是以慢性高血糖为特征的代谢紊乱,据相关调查显示 2005 年全球糖尿病患者达到 2.4 亿人^[1]。血糖控制不佳可能导致糖尿病微血管病变、糖尿病神经病变及糖尿病肾病等慢性并发症发生。其中糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)是一种常见的、高代价的糖尿病并发症,约四分之一的糖尿病患者会出现足部溃疡。皮肤损伤后溃疡愈合延迟或不愈合,给患者造成很大的精神压力,生活质量明显下降;同时会增加患者的死亡率及截肢风险,多达 85%的截肢患者患 DFU^[2]。

DFU 的发生主要涉及神经及外周血管的损伤,通常分为神经性、缺血性、神经缺血性。然而 DFU 发生的具体机制尚未明确,研究表示可能与持续高血糖状态下氧化应激、多元醇通路、蛋白质非酶糖基化等相关机制中氧自由基、山梨醇及 AGEs(终末糖基化产物)等物质的堆积对神经、血管的损伤有关^[3]。有数据明确表明,在过去的 20 年里,DFU 的病理生理机制已发生改变,缺血性和神经缺血性溃疡的比例增高。目前估计,至少 65%的 DFU 患者存在缺血情况,几乎是 1990 年数据的一倍^[4-5]。与神经性

溃疡相比,缺血性溃疡复发率高,截肢风险翻倍,预后不佳。因此多领域、多层次的探究糖尿病足的发生发展机理愈为重要。

近年来,随着基因技术的发展,涌现出越来越多有关糖尿病及其并发症与微小 RNA(microRNA, miRNA)的研究。miRNA 是一类长度约为 20~24 个核苷酸的具有调控功能的非编码 RNA,在人体中主要通过抑制 mRNA 翻译来调节人类约 30%的编码蛋白。随着 miRNA 检测技术的不断进步及认识的逐步提高,miRNA 也许会成为认识疾病发生发展过程中的一个重要部分。现对近年来 miRNA 在糖尿病足前期发病过程及溃疡愈合两个角度作如下综述。

1 miRNA 在糖尿病足溃疡发病中的作用

1.1 周围神经病变

miRNA 通过调节背根神经节(DRG)的表达影响外周神经的功能。背根神经节是外周神经系统中的感觉神经元,作为痛觉传入的第一级神经元,在感觉传递途径中起着重要的作用。研究表明^[6],糖尿病大鼠皮肤组织和皮肤神经均存在明显形态结构改变,同时存在 p-JNK 蛋白的高表达,而 JNK 在神

* 基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(10DZ1972800);上海市科学技术委员会科研计划项目(12401903800);上海市中医药事业发展三年行动计划项目(ZYSNXD-CC-ZDYJ055);上海市浦东新区重点学科群建设资助项目(PWZxkq2010-04)

收稿日期: 2016-04-16

作者简介: 李文惠(1989-),女,山东青岛人,在读博士研究生,研究方向:中西医结合治疗周围血管疾病。

[△]通信作者: 柳国斌, E-mail: drliuguobin@163.com

经元的凋亡中也是必须的^[7]。miR-146a 的表达下调在糖尿病高糖状态下 DRG 凋亡中起到重要作用。L. WANG 等^[8]通过糖尿病周围神经病变小鼠模型的背根神经节及培养的背根神经节元中发现高糖环境下 miR-146a 明显下调,并提高白细胞介素-1 受体相关激酶(IRAK1)和肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6 (TRAF6)水平。

1.2 微血管病变

血管病变是糖尿病主要并发症之一,相关研究发现在糖尿病早期就已经发生了血管内皮的损伤,并能引起血管内皮细胞的生成及功能障碍,其中 miRNA 在这些过程中都发挥着重要作用。

1.2.1 影响血管内皮细胞的生成

研究表明,miRNA 参与了内皮细胞新生的机制。在高糖环境下,内皮细胞 miR-221 和 miR-222 表达呈下降趋势,致使其靶基因周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1C 和 1B 基因表达上调,从而影响了内皮细胞的新生^[9]。

1.2.2 引起血管内皮细胞的功能障碍

有研究表明,糖尿病患者内皮祖细胞数量减少,细胞功能受到严重影响^[10-11],导致内皮祖细胞修复血管的能力减弱。

研究^[12]发现 2 型糖尿病患者内皮祖细胞上的 miR-126,miR-21,miR-27a,miR-27b,miR-130a 和 miR-107 的表达均下降,其中 miR-126 下调通过导致 Spred-1 过表达而引起内皮祖细胞的迁移、增殖和克隆形成能力减弱,从而增加细胞凋亡。通过 miR-126 过表达也能促进内皮祖细胞的功能修复。

miRNA 在糖尿病患者血管内皮修复中起到负调节的作用。Caporali 等^[13]发现在糖尿病患者的缺血性肌肉组织及血浆中的 miR-503 水平均高于正常水平。通过抑制细胞周期蛋白 E1 和 Cdc25 mRNA 则可降低 miR-503 表达,进而帮助微血管网络形成,改善血管内皮细胞功能,起到恢复血液供应的作用。

高水平 miR-221 可通过抑制 c-kit 蛋白表达影响内皮细胞的迁移。通过抑制 miR-221 过分表达可恢复 c-kit 蛋白的表达水平,并部分恢复血管内皮细胞的迁移功能。提示 miR-221/c-kit 蛋白途径在糖尿病血管损伤机制中起重要的作用^[14]。

1.2.3 参与损害血管内皮细胞

miRNAs 通过多种途径参与损害血管内皮细

胞。在糖尿病小鼠体内 miR-125b-2 表达上调导致 miR-125b 表达上调,而 miR-125b 的上调可以通过上调炎症反应、单核细胞趋化蛋白 1 以及 IL-6 基因三条通路造成血管内皮的损伤,同时也发现三甲基赖氨酸 9 基因受到了抑制,以此造成内皮细胞的损害。同样,研究发现糖尿病小鼠血管平滑肌细胞 miR-200b、miR-200c 和 miR-429 表达升高,而 miR-200 可使炎症因子的基因 COX-2、单核细胞趋化蛋白-1 表达上调,从而促进糖尿病小鼠炎症的进一步发生^[15-16]。

2 糖尿病足溃疡愈合相关的 miRNA

糖尿病足溃疡属于慢性创面,近年来针对糖尿病溃疡难愈的机制提出许多新的学说和观点,包括蛋白质糖基化学说,微血管损伤学说,修复细胞凋亡学说,表皮干细胞库“干涸”及异常炎症反应学说等。创伤愈合是由多种细胞因子参与的复杂的动态过程,目前认为主要经历炎症反应、再上皮化及创伤重塑三个主要过程^[17]。随着 miRNA 学科的日益发展,发现糖尿病性溃疡愈合过程中伴随多种 miRNA 的表达异常。

刘移峰等^[18]通过微小 RNA 微阵列芯片检测技术寻找大鼠模型中糖尿病创面组织与正常皮肤组织的 miRNAs 差异表达谱,结果发现 rno-miR-496-5p、-105、-122-5p 等显著上调;rno-miR-196a-5p、-134-5p、-425-3p、-484、-31-3p 等显著下调。功能富集分析显示差异表达明显的 miR-449a、miR-222、miR-31 等 miRNA 分别参与 Notch、Wnt、有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)等与创面修复相关的信号通路。Sampath^[19]等发现皮肤中存在一种名为 miR-198 的微小 RNA,可通过控制伤口愈合所需的皮肤细胞的迁移促进创面愈合。健康皮肤受损时,miR-198 生成迅速停止,miR-198 水平降低,开启伤口愈合途径;而糖尿病患者未愈合的伤口中长期存在 miR-198,抑制伤口愈合。科学家指出这也许是调控糖尿病性慢性伤口愈合的分子“开关”。

近年来研究显示,糖尿病是一种慢性炎症疾病,许多炎症因子(如:TNF- α 、IL-6 等)不但直接参与胰岛素抵抗,而且在糖尿病及其并发症的发展中起着重要作用^[20]。现代研究发现,多种 miRNA 都在炎症反应这一阶段发挥了重要作用。Xu J 等发现糖尿病溃疡创面中 miR-146 的表达明显下调,从而进入一种异常炎症的持续状态,抑制创面愈合^[21]。

Dangwal 等^[22]运用 miRNA 芯片检测糖尿病溃疡患者血浆 miRNA,发现 41 个 miRNA 表达异常,进一步采用 PCR 证实 miR-191 与 miR-200b 降低,且与 C 反应蛋白、细胞炎症因子水平显著相关。miRNA-155 通过降低基质金属蛋白酶的表达抑制组织损伤,提示 miRNA-155 可能是一种保护性的 miRNA^[23]。Kishore 等^[24]将小鼠心肌成纤维细胞暴露于正常血糖及高血糖环境中,24h 后发现高血糖环境下 miRNA-155 明显上调。

miRNA 在促进肉芽组织生长及创伤重塑过程中也发挥了重要作用。miRNA-126 为内皮细胞特异性 miRNA,在维持血管内皮功能稳定、血管壁完整、血管新生及创面愈合中发挥重要作用,被认为是内皮细胞特异性的血管生成调节因子^[25]。miR-331 糖尿病大鼠创面中的表达上调可能使其细胞增殖受阻,从而干扰创面修复过程^[26]。还有研究结果显示 miR-484 可抑制线粒体分裂蛋白 Fis1 的翻译,从而抑制线粒体分裂和细胞凋亡^[27]。Zampetaki 等^[28]研究发现糖尿病患者组织中 miRNA-126 的表达受到明显抑制,且内皮凋亡小体中 miRNA-126 的含量呈葡萄糖依赖性,并成负相关。miRNA-21 在最近研究表明其在多种细胞增殖、分化、凋亡、上皮细胞间质化及迁移中均发挥重要作用^[29]。Madhyastha 等^[30]比较了糖尿病大鼠及正常大鼠的皮肤组织,发现糖尿病大鼠皮肤中 miRNA-21 显著高表达,然而在溃疡愈合过程中,正常对照组创面局部组织中 miRNA-21 表达逐渐上调,糖尿病大鼠 miRNA-21 表达却呈下降趋势,使用增益和损耗的函数方法,证明了 miR-21 参与成纤维细胞的迁移影响糖尿病创面愈合。miRNA-29 家族直接参与调控胶原及细胞外基质蛋白的表达^[31]。目前有研究提出在糖尿病鼠体内 miRNA-29 家族在胰岛素靶组织肌肉、脂肪及肝脏中均呈高表达,可能与糖尿病性溃疡延迟愈合相关^[32]。

3 总结与展望

糖尿病足溃疡属于慢性创面,其愈合需要多种细胞、细胞因子和细胞外基质等因素的共同参与,构成一个复杂的生物网络。微小 RNA 是一个庞大的基因系统,近年来发现糖尿病足患者微小 RNA 的改变数目较多,且在其发病过程及溃疡愈合阶段均呈现不同程度的改变。然而现在对于微小 RNA 的研究只是冰山一角,许多机理尚未明确。另一方面,囿于基因检测方法以及医学水平的局限性,miR-

NAs 的研究还仅仅停留于实验阶段。未来如何将其运用到临床,将要面临的巨大的考验和挑战。

参考文献:

- [1] 李峥璟,柏素萍,孙炳伟. 糖尿病溃疡形成机制的研究进展[J]. 江苏大学学报(医学版),2012,22(4):363-366.
- [2] Boulton AJ. The diabetic foot;from art to science. The 18th Camillo Golgi lecture[J]. Diabetologia,2004,47:1343-1353.
- [3] 郑玲,刘秋爽,金晶,等. 糖尿病并发症治疗靶点的研究进展[J]. 海峡药学,2014,26(1):13-17.
- [4] Armstrong DG,Kanda VA,Lavery LA,et al. Mind the gap: the disparity between research funding and costs of care for diabetic foot ulcers [J]. Diabetes Care,2013,36 (7):1815-1817.
- [5] Hinchliffe RJ,Andros G,Apelqvist J,et al. A systematic review of the effectiveness of revascularization of the ulcerated foot in patients with diabetes and peripheral arterial disease[J]. Diabetes Metab Res Rev,2012,28(S 1):179-217.
- [6] 倪桂莲,崔融,陈干明,等. 糖尿病大鼠背根神经节 JNK 的表达水平对足部皮肤组织学变化的影响 [J]. 中国病理生理杂志,2015,31(3):415-420.
- [7] Eilers A,Whitfield J, Shah B,et al. Direct inhibition of c-jun N-terminal kinase in sympathetic neurons prevents c-jun promoter activation and NGF withdrawal induced death [J]. J Neurochem,2001,76(5):1439-1454.
- [8] Wang L,Chopp M,Szalad A,et al. The role of miR-146a in dorsal root ganglia neurons of experimental diabetic peripheral neuropathy[J]. Neuroscience,2014,259:155-163.
- [9] Togliatto G,Trombetta A,Dentelli P,et al. MIR221/MIR222-driven post-transcriptional regulation of P27KIP1 and P57KIP2 is crucial for high-glucose-and AGE-mediated vascular cell damage[J]. Diabetologia,2011,54(7):1930-1940.
- [10] Loomans CJ,de Koning EJ,Staal FJ,et al. Endothelial progenitor cell dysfunction:a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes [J]. Diabetes, 2004,53:195-199.
- [11] Tepper OM,Galiano RD,Capla JM,et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures[J]. Circulation,2002,106(22):2781-2786.
- [12] Meng S,Cao JT,Zhang B,et al. Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients,impairs their functional properties,via target gene Spred-1[J]. J Mol Cell Cardiol,2012,53(1):64-72.
- [13] Caporali A,Meloni M,Vollenkle C,et al. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-Induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia [J]. Circulation,2011,123(3):

- 282-291.
- [14] Li Y, Song YH, Li F, et al. MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(1): 81-83.
- [15] 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.
- [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] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration[J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 314-321.
- [18] 刘移峰, 刘德伍, 毛远桂, 等. 糖尿病创面与正常创面微小 RNA 差异表达谱分析 [J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(1): 57-59.
- [19] Sundaram G M, Common J E, Gopal F E, et al. 'See-saw' expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing [J]. *Nature*, 2013, 495(7439): 103-106.
- [20] 陆君. 慢性炎症与 2 型糖尿病 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2006, 14(8): 600-602.
- [21] Xu J, Wu W, Zhang L, et al. The role of microRNA-146a in the pathogenesis of the diabetic wound-healing impairment; correction with mesenchymal stem cell treatment[J]. *Diabetes*, 2012, 61(11): 2906-2912.
- [22] Dangwal S, Stratmann B, Bang C, et al. Impairment of Wound Healing in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Influences Circulating MicroRNA Patterns via Inflammatory Cytokines [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(6): 1480-1488.
- [23] Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(4): 1001-1009.
- [24] Kishore R, Verma SK, Mackie AR, et al. Bone marrow progenitor cell therapy-mediated paracrine regulation of cardiac miRNA-155 modulates fibrotic response in diabetic hearts[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60161.
- [25] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2): 261-271.
- [26] Epis MR, Giles KM, Kalinowski FC, et al. Regulation of expression of deoxyhypusine hydroxylase (DOHH), the enzyme that catalyzes the activation of eIF5A, by miR-331-3p and miR-642-5p in prostate cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(42): 35251-35259.
- [27] Wang K, Long B, Jiao JQ, et al. miR-484 regulates mitochondrial network through targeting Fis1 [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 781.
- [28] Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 Diabetes[J]. *Circ Res*, 2010, 107(6): 810-817.
- [29] Cottonham CL, Kaneko S, Xu L. miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(46): 35293-35302.
- [30] Madhyastha R, Madhyastha H, Nakajima Y, et al. MicroRNA signature in diabetic wound healing: promotive role of miR-21 in fibroblast migration [J]. *Int Wound J*, 2012, 9(4): 355-361.
- [31] Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(6): 1733-1743.
- [32] He A, Zhu L, Gupta N, et al. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(11): 2785-2794.

(编辑:徐建平)

Research Progress of MicroRNA in the Pathogenesis and Healing of Diabetic Foot Ulcer

LI Wenhui, LIU Guobin, HUANG Hai

(Shanghai Shuguang Hospital Affiliated with Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: MiRNA is the non-coding RNA which length about 20-24 nucleotides with the function of regulating, inhibiting mRNA translation to regulate the nearly 30% of all human protein encoding in the human body, it can regulate a variety of biological processes, including the organism growth, development and disease. Studies have indicated that miRNA plays an important role in the development of diabetes and its complications, and it has become a key factor in the regulation of biological processes. Diabetic ulcer is the most common complications of diabetes, there are amounts of evidences in the generating and healing process that miRNA counts a lot in the diabetic ulcer. In this paper, we overview of related miRNA function of nerve and vascular damage, and ulcer healing process in the pathogenesis of diabetic foot.

KEY WORDS: microRNA; diabetic foot ulcer; pathogenesis; healing; treatment progress