

环状 RNA 与糖尿病及其并发症

方迎昕 周一军

中国医科大学附属第四医院内分泌代谢科, 沈阳 110032

通信作者: 周一军, Email: zhoudoctor@163.com

【摘要】 现有的糖尿病的早期诊断指标存在一定缺陷, 探寻新的高敏感性生物标志物有重要意义。环状 RNA (circRNAs) 具有分子海绵、调控转录、结合 RNA 结合蛋白等丰富的生物学功能, 是糖尿病及其并发症, 包括糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病、糖尿病心血管病变、糖尿病痛性神经病变重要的调控分子, 有望成为新兴糖尿病标志物和分子治疗靶点。

【关键词】 环状 RNA; 糖尿病; 糖尿病并发症; 生物标志物

基金项目: 辽宁省自然科学基金 (20170541029)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2019.02.009

Circular RNAs, diabetes and its complications Fang Yingxin, Zhou Yijun. Department of Endocrinology and Metabolism, The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China
Corresponding author: Zhou Yijun, Email: zhoudoctor@163.com

【Abstract】 Current diagnostic methods show various insufficiencies for the early diagnosis of diabetes, thus a new and highly sensitive biomarker will be of great value. Circular RNAs (circRNAs) have multiple functions: acting as microRNA (miRNA) sponges, involving the regulation of gene transcription and binding with RNA-binding proteins. As the new regulatory molecules, circRNAs play an important role in diabetes and its complications, including diabetes retinopathy, diabetic nephropathy, diabetic cardiovascular complication, as well as diabetic neuropathic pain, and serve as the novel potential biomarkers as well as molecular tools for therapies.

【Key words】 Circular RNAs; Diabetes mellitus; Diabetic complications; Biomarkers

Fund program: Natural Science Foundation of Liaoning Province of China (20170541029)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2019.02.009

全球 2015 年的糖尿病患者约为 4.15 亿, 其中 46.5% 的成年糖尿病患者未能被及时诊断, 自然也无法获得良好的干预和治疗^[1]。因此, 寻找及早诊断和干预糖尿病的方法显得尤为重要。现有的胰岛素抵抗、 β 细胞功能、胰岛素敏感性、空腹血糖以及基因多态性等指标对于糖尿病的早期诊断虽有一定价值, 但仍存在一定缺陷^[2-3]。探寻新的高敏感性、高特异性的分子靶点对糖尿病早期诊断和治疗意义重大。随着高通量测序的发展, 已发现大量非编码 RNA 在人体中执行多种生物学功能, 参与了肿瘤等多种疾病的发生、发展过程^[4]。环状 RNA (circRNAs) 是一类新的单链闭合环状、通过共价键形成的、不具有 5' 末端帽子以及 3' poly-A 尾的非编码 RNA。与普通线性 RNA 不同, 它们的环状结构

使其不易被核酸外切酶降解, 能稳定存在于真核细胞细胞质中, 且具有高度保守性和组织、时序、疾病特异性, 从而有望成为潜在的疾病诊断标志物和治疗靶点^[5]。最新的一些研究证明, circRNAs 与糖尿病有关, 本文将对 circRNAs 的生物起源及调控机制以及与糖尿病及其并发症的关系作一简要综述。

1 circRNAs 的生物起源及调控机制

以往人们认为, circRNAs 由外显子首尾相连形成环状结构, 是基因可变剪接的产物, 命名为外显子 circRNAs。最近, 高纯度提取 circRNAs 的新方法使大量内含子来源的 circRNAs 被鉴定, 即内含子 circRNAs (circular intronic RNAs, ciRNAs)^[6]。此外, 由前体 tRNA 经过剪接产生的 tRNA 内含子 circRNAs 以及由外显子和内含子共同构成的环状

RNA (Exon-intron circular RNAs, EIciRNAs) 也陆续被研究者发现^[7-8]。

circRNA 的生成调控机制大致可分为 3 种。首先,伴随反向剪切过程的 RNA 聚合酶 II (RNA pol II) 的转录。一方面,反向剪切的环化过程与 RNA Pol II 延伸率有关^[9]。另一方面,研究者通过影响分裂和聚腺苷酸化过程而抑制 RNA pol II 的终止, circRNAs 的表达上调^[10]。其次,顺式和反式的调节因素可以影响反向剪切的效率,其中包括外显子侧翼的内含子互补序列,核心的剪接体元件以及其他有调控作用的 RNA 结合蛋白。最后, circRNAs 的更新如新生 circRNAs 的水平 and 降解过程影响其表达^[9]。

2 circRNAs 的功能

2.1 作为 miRNA 的分子海绵 circRNAs 可作为一种竞争性内源性 RNA,通过微小 RNA (miRNA) 应答元件,竞争性地结合 miRNA,抑制 miRNA 对靶基因的功能^[11]。

2.2 细胞核 circRNAs 调控转录和剪切 细胞核中的 circRNAs,即 ciRNAs 和 EIciRNAs 可以调控基因的表达。EIciRNAs 可以与 U1 小核糖核蛋白结合,通过 RNA-RNA 相互作用顺式地影响其亲本基因的 Pol II 转录^[12]。

2.3 circRNAs 可翻译成蛋白质 大部分已被鉴定的 circRNAs 位于细胞质,且缺少线性 RNA 翻译时需要的 5' 端 7-甲基鸟苷帽和 3' 端的腺苷尾结构。然而,当 circRNAs 充当内部核糖体启动位点 (internal ribosome entry sites, IRESs),促使启动子或核糖体与 circRNAs 的结合时,可翻译成蛋白质^[13]。

2.4 形成 RNA 蛋白复合物 circRNAs 可与不同的蛋白质结合,形成 RNA 蛋白复合物,从而调控相关蛋白行使功能。例如, circ-Foxo3 与抗衰老蛋白 ID-1 和转录因子 E2F1 结合,发挥对心肌组织的保护作用^[14]。

3 circRNAs 与糖尿病及其并发症

3.1 circRNAs 与糖尿病

3.1.1 糖尿病的 circRNAs 表达特征研究 Zhao 等^[15]用基因芯片对 2 型糖尿病患者的外周血样本进行检测,与健康对照组相比,发现 489 个 circRNAs 差异性表达,其中 78 个上调,411 个下调,并认为 hsa_circ_0054633 可以作为糖尿病前期或 2 型糖尿病的诊断标志物。Shang 等^[16]对高糖处理的人内皮细胞进行 RNA 测序分析,发现了 95 个差异表达的 circRNAs。Yan 等^[17]用测序技术检测妊娠期糖尿病

患者的胎盘绒毛组织,鉴定出 227 个上调的 circRNAs,255 个下调的 circRNAs。

3.1.2 circRNAs 与胰岛 β 细胞 糖尿病患者的 β 细胞功能紊乱与 miRNA 和长链非编码 RNA 的表达谱改变有关,最近的研究证明 circRNAs 也参与了这个过程。人胰岛 β 细胞中有数千个 circRNAs,其中 497 个在鼠胰岛中保守存在。在糖尿病 db/db 小鼠中, circHIPK3 和 ciRS-7/CDR1 表达低,导致胰岛素分泌减少,抑制 β 细胞增殖和存活^[18]。 circHIPK3 是胰岛表达最丰富的 circRNAs 之一,其来源于 2 型糖尿病患者缺乏的线性基因 Hipk3 的外显子。线性基因 Hipk3 的缺乏将间接造成 circHIPK3 表达降低。通过 RNA 干扰技术,敲减 circHIPK3,导致细胞凋亡,并抑制催乳素诱导的 β 细胞增殖。 miRNA-7 是人和鼠胰岛中含量最高的 miRNA,过表达 miRNA-7 的转基因小鼠因胰岛素分泌受损和 β 细胞分化障碍,导致糖尿病。相反,若使肥胖小鼠 miRNA-7 失活,则有效改善 β 细胞功能紊乱和高血糖状态。 ciRS-7/CDR1 作用于 miRNA-7 及其靶点肌球蛋白 VIIA 和 Rab 相互作用蛋白 (Myrip) 和对盒基因 6 (Pax6),通过介导 cAMP 和蛋白激酶 C 信号转导通路,调节胰岛素分泌^[19]。

3.1.3 circRNAs 与炎症反应 多项研究证实,抗炎治疗可能会纠正 2 型糖尿病患者的代谢异常。对 2 型糖尿病患者外周血白细胞测序鉴定出 220 个差异表达的 circRNAs。其中 circANKRD36 显著上调,且与血糖和糖化血红蛋白呈正相关。对 2 型糖尿病有预测作用的白细胞介素 6 和肿瘤细胞坏死因子 α 显著高表达,与 circANKRD36 呈正相关。研究者认为, circANKRD36 通过与 hsa-miRNA-3614-3p、 hsa-miRNA-498 和 hsa-miRNA-501-5p 等 miRNAs 结合,参与了 2 型糖尿病的发生及炎症反应相关的信号通路。 circANKRD36 与 2 型糖尿病的慢性炎症反应有关,可作为糖尿病炎症状态的标志物和治疗靶点^[20]。

3.2 circRNAs 与糖尿病并发症

3.2.1 circRNAs 与糖尿病视网膜病变 在糖尿病病史超过 20 年的患者中,80% 并发糖尿病视网膜病变。有研究者用基因芯片分析 2 型糖尿病视网膜病变患者血清,发现 30 个显著上调的 circRNAs,其中 circRNA_406918 来源于胰岛素样结合蛋白,其相关的基因胰岛素样结合蛋白 2 与 β 细胞功能紊乱和糖尿病有关^[21]。 circ_0005015 在糖尿病视网膜病变

患者的血液、玻璃体、纤维血管膜均表达上调,可作为 miRNA-519d-3 的分子海绵,促进视网膜内皮细胞增殖、迁移和小管形成^[22]。另外,糖尿病小鼠视网膜中 circHIPK3 水平也显著上调。沉默 circHIPK3,则视网膜血管渗漏及炎性反应减轻。进一步研究显示, circHIPK3 可与 miRNA-30a-3p 结合,抑制其活性,造成视网膜内皮细胞增殖和血管功能紊乱^[23]。

3.2.2 circRNAs 与糖尿病肾病 circRNA_15698 在 db/db 糖尿病肾病小鼠中或小鼠肾小球系膜细胞中均表达上调。功能缺失实验显示,敲减 circRNA_15698 可明显抑制 I 型胶原、IV 型胶原和纤维连接蛋白的表达。生物信息分析和荧光素酶报告系统证实, circRNA_15698 是 miRNA-185 的分子海绵,并对转化生长因子- β 1 起正向调节作用。 circRNA_15698/miRNA-185/转化生长因子- β 1 通路促使细胞外基质相关蛋白的合成,初步描述了 circRNAs 在糖尿病肾病发病机制中的作用^[24]。

3.2.3 circRNAs 与糖尿病心血管并发症 用基因芯片对 2 型糖尿病合并冠心病的患者外周血进行检测,研究者鉴定出 40 个差异表达的 circRNAs,其中 13 个上调,27 个下调。糖尿病小鼠 db/db 鼠心肌组织有 43 个差异表达的 circRNAs。其中 circRNA_010567 在糖尿病小鼠心肌组织和血管紧张素 II 处理的心肌成纤维细胞均显著上调。 circRNA_010567 可以介导 miRNA-141、转化生长因子- β 1 的表达,在糖尿病小鼠心肌纤维化过程中起调控作用^[25]。

3.2.4 circRNAs 与糖尿病痛性神经病变 在糖尿病痛性神经病变患者的血清以及链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠的背根神经节中, circHIPK3 的含量均比较丰富。 circHIPK3 的上调与 2 型糖尿病患者的神经痛评分相关。沉默 circHIPK3 可减轻糖尿病鼠的神经痛及神经炎性反应。进一步的机制研究表明, circHIPK3 与 miRNA-124 结合,可抑制其表达。 miRNA-124 抑制剂可以逆转 circHIPK3 基因敲除介导的神经病理性疼痛的缓解和糖尿病大鼠中神经炎性反应的抑制。 circHIPK3 短发夹 RNA 可用于糖尿病鼠神经痛的治疗^[26]。

综上所述, circRNAs 具有复杂的生物起源和调控机制,以及分子海绵、调控转录等丰富的生物学功能,是糖尿病发生、发展过程中重要的调控分子。越来越多的 circRNAs 已被鉴定出来,然而仍有许多问题有待探索。例如, circRNAs 的降解途径、 circRNAs 的序列和结构与其生物学功能的联系等。一方面,

circRNAs 在糖尿病患者血液、肾脏、视网膜、胎盘中稳定存在,且差异性地表达,样本易得到,且具有高特异性和敏感性,可以作为糖尿病早期诊断的生物标志物。另一方面,具有互补序列和侧翼剪接位点的 circRNAs 可以被人工合成出来,有望成为糖尿病治疗的分子工具。可以期待的是,人工合成或修饰的 circRNAs 不仅作用于相应的 miRNAs,也作用于特异的 RNA 结合蛋白,人们将通过控制 circRNAs,调控多种后续的细胞学过程和疾病进展。虽然目前对 circRNA 的作用机制、调控网络尚不十分清楚,相信随着研究的进一步深入, circRNAs 有望成为新兴的糖尿病诊断标志物和潜在靶点,用于糖尿病及其并发症的临床诊断和治疗。

参 考 文 献

- [1] Raheli D. 7th edition of IDF diabetes ATLAS--CALL for immediate action[J]. Lijec Vjesn, 2016, 138(1-2): 57-58.
- [2] Ghasemi A, Tohidi M, Derakhshan A, et al. Cut-off points of homeostasis model assessment of insulin resistance, beta-cell function, and fasting serum insulin to identify future type 2 diabetes: Tehran Lipid and Glucose Study [J]. Acta Diabetol, 2015, 52(5): 905-915. DOI: 10. 1007/s00592-015-0730-3.
- [3] Chidambaram M, Liju S, Saboo B, et al. Replication of genome-wide association signals in Asian Indians with early-onset type 2 diabetes [J]. Acta Diabetol, 2016, 53(6): 915-923. DOI: 10. 1007/s00592-016-0889-2.
- [4] 耿艳,徐书杭,鲁一兵,等. 非编码 RNA 在分化型甲状腺癌分子诊断中的作用 [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2017, 2(37): 101-104. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-4157. 2017. 02. 008.
- [5] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. RNA, 2013, 19(2): 141-157. DOI: 10. 1261/rna. 035667. 112.
- [6] Panda AC, De S, Grammatikakis I, et al. High-purity circular RNA isolation method (RPAD) reveals vast collection of intronic circRNAs [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(12): e116. DOI: 10. 1093/nar/gkx297.
- [7] Meng X, Li X, Zhang P, et al. Circular RNA: an emerging key player in RNA world [J]. Brief Bioinform, 2017, 18(4): 547-557. DOI: 10. 1093/bib/bbw045.
- [8] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(3): 256-264. DOI: 10. 1038/nsmb. 2959.
- [9] Zhang Y, Xue W, Li X, et al. The biogenesis of nascent circular RNAs [J]. Cell Rep, 2016, 15(3): 611-624. DOI: 10. 1016/j. celrep. 2016. 03. 058.
- [10] Liang D, Tatomer DC, Luo Z, et al. The output of protein-coding genes shifts to circular RNAs when the pre-mRNA processing machinery is limiting [J]. Mol Cell, 2017, 68(5): 940-954. e3. DOI: 10. 1016/j. molcel. 2017. 10. 034.

- 019.
- [20] Yu L, Liang H, Dong X, et al. Reduced silent information regulator 1 signaling exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetic rats and the protective effect of melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2015, 59(3):376-390. DOI:10.1111/jpi.12269.
- [21] Limb GA, Hickman-Casey J, Hollifield RD, et al. Vascular adhesion molecules in vitreous from eyes with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(10):2453-2457.
- [22] Yoshizawa M, Nagai Y, Ohsawa K, et al. Elevated serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in NIDDM patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 1998, 42(1):65-70.
- [23] Yan Z, Zhao J, Gan L, et al. CTRP3 is a novel biomarker for diabetic retinopathy and inhibits HGHL-induced VCAM-1 expression in an AMPK-dependent manner [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6):e0178253. DOI:10.1371/journal.pone.0178253.
- [24] Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(4):660-671. DOI:10.1007/s00125-014-3171-6.
- [25] Ma ZG, Yuan YP, Xu SC, et al. CTRP3 attenuates cardiac dysfunction, inflammation, oxidative stress and cell death in diabetic cardiomyopathy in rats [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(6):1126-1137. DOI:10.1007/s00125-017-4232-4.

(收稿日期:2018-07-25)

(本文编辑:饶颖)

(上接第 111 页)

- [11] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441):384-388. DOI:10.1038/nature11993.
- [12] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3):256-264. DOI:10.1038/nsmb.2959.
- [13] Li X, Liu CX, Xue W, et al. Coordinated circRNA biogenesis and function with NF90/NF110 in viral infection [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(2):214-227. e7. DOI:10.1016/j.molcel.2017.05.023.
- [14] Du WW, Yang W, Chen Y, et al. Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(18):1402-1412. DOI:10.1093/eurheartj/ehw001.
- [15] Zhao Z, Li X, Jian D, et al. Hsa_circ_0054633 in peripheral blood can be used as a diagnostic biomarker of pre-diabetes and type 2 diabetes mellitus [J]. *Acta Diabetol*, 2017, 54(3):237-245. DOI:10.1007/s00592-016-0943-0.
- [16] Shang FF, Luo S, Liang X, et al. Alterations of circular RNAs in hyperglycemic human endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 499(3):551-555. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.03.187.
- [17] Yan L, Feng J, Cheng F, et al. Circular RNA expression profiles in placental villi from women with gestational diabetes mellitus [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(4):743-750. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.03.051.
- [18] Stoll L, Sobel J, Rodriguez-Trejo A, et al. Circular RNAs as novel regulators of β -cell functions in normal and disease conditions [J]. *Mol Metab*, 2018, 9:69-83. DOI:10.1016/j.molmet.2018.01.010.
- [19] Xu H, Guo S, Li W, et al. The circular RNA Cdr1as, via miR-7 and its targets, regulates insulin transcription and secretion in islet cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:12453. DOI:10.1038/srep12453.
- [20] Fang Y, Wang X, Li W, et al. Screening of circular RNAs and validation of circANKRD36 associated with inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4):1865-1874. DOI:10.3892/ijmm.2018.3783.
- [21] Gu Y, Ke G, Wang L, et al. Altered expression profile of circular RNAs in the serum of patients with diabetic retinopathy revealed by microarray [J]. *Ophthalmic Res*, 2017, 58(3):176-184. DOI:10.1159/000479156.
- [22] Zhang SJ, Chen X, Li CP, et al. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in diabetes retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(14):6500-6509. DOI:10.1167/iovs.17-22698.
- [23] Shan K, Liu C, Liu BH, et al. Circular noncoding RNA HIPK3 mediates retinal vascular dysfunction in diabetes mellitus [J]. *Circulation*, 2017, 136(17):1629-1642. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029004.
- [24] Hu W, Han Q, Zhao L, et al. Circular RNA circRNA_15698 aggravates the extracellular matrix of diabetic nephropathy mesangial cells via miR-185/TGF- β 1 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2):1469-1476. DOI:10.1002/jcp.26959.
- [25] Zhou B, Yu JW. A novel identified circular RNA, circRNA_010567, promotes myocardial fibrosis via suppressing miR-141 by targeting TGF- β 1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(4):769-775. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.04.044.
- [26] Wang L, Luo T, Bao Z, et al. Intrathecal circHIPK3 shRNA alleviates neuropathic pain in diabetic rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(3):644-650. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.09.158.

(收稿日期:2018-08-16)

(本文编辑:饶颖)