

DOI: 10.13376/j.cbls/2020026

文章编号: 1004-0374(2020)02-0195-08

MicroRNA在糖尿病足溃疡中的调控机制和治疗前景

王虹舒^{1,3}, 黎晶晶^{2*}, 陆晟迪³, 马中良⁴, 柴益民^{1,3*}

(1 上海交通大学医学院, 上海 200025; 2 浙江医药高等专科学校, 宁波 315100; 3 上海交通大学附属第六人民医院骨科, 上海 200233; 4 上海大学生命科学学院非编码RNA与癌症实验室, 上海 200444)

摘要: 糖尿病足溃疡 (diabetic foot ulcer, DFU) 是糖尿病主要并发症之一。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种在转录后水平调控基因表达的、内源性、非编码单链小 RNA。近年来的研究表明, miRNA 与 DFU 的炎症调控、血管新生、再上皮化等过程密切相关。MiRNA 靶向治疗的体外和体内实验研究展现出了 miRNA 未来潜在的治疗价值。现就 miRNA 在 DFU 创面愈合的各阶段中的调控作用及其治疗应用的可能性两方面进行综述, 为后续研究开拓新的思路。

关键词: microRNA; 糖尿病足溃疡; 创面愈合; 治疗

中图分类号: Q522; R587.1

文献标志码: A

Roles of miRNA in wound healing and therapeutic prospect of diabetic foot ulcer

WANG Hong-Shu^{1,3}, LI Jing-Jing^{2*}, LU Sheng-Di³, MA Zhong-Liang⁴, CHAI Yi-Min^{1,3*}

(1 Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China;

2 Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China;

3 Department of Orthopaedics, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China;

4 Lab for Noncoding RNA & Cancer, School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: MicroRNA (miRNA) is a group of endogenous non-coding single-stranded small RNA which regulates gene expression at the post-transcriptional level. Recent studies have suggested that miRNA plays an important role in inflammation, angiogenesis, and re-epithelialization in the impaired wound healing process of diabetic foot ulcer (DFU). MiRNA-targeted therapeutics showed promising potentialities of treatment in the future based on plenty of researches. The objective of this review is to summarize the regulatory effects on wound healing of miRNA and its therapeutic potentialities in the treatment of DFU, shedding a light on the future.

Key words: microRNA; diabetic foot ulcer; wound healing; treatment

糖尿病足溃疡 (diabetic foot ulcer, DFU) 是糖尿病主要并发症之一, 糖尿病周围神经病变、周围血管病变、创伤和高足底压力是 DFU 的主要发病机制^[1]。国际糖尿病联合会 (International Diabetes Federation, IDF) 2017 年的报告显示: 全球糖尿病成年患者 4.51 亿, 预计 2045 年时该数字将增加到 6.93 亿^[2]。糖尿病患者发生 DFU 的终身风险高达 25%^[3], DFU 导致了 90% 的非创伤性截肢^[4]。DFU 作为致残性疾病, 极大地降低了患者的生活质量并带来巨大的经济负担。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类高度保守、长 18~25 个核苷酸、内源性、非编码单链小分子 RNA。MiRNA 的调控作用与创面愈合关系紧密。MiRNA 的缺陷将造成间充质干细胞、角质形成细胞、免疫细胞以及血管生成相关细胞的募集和生理

收稿日期: 2019-10-22; 修回日期: 2019-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(81601887); 宁波市自然科学基金项目(2018A610425)

*通信作者: E-mail: ymchai@sjtu.edu.cn (柴益民); pingljj@126.com (黎晶晶)

功能显著受损,造成皮肤组织的再生功能的损害^[5]。Costantino 等^[6]研究表明,糖尿病患者 miRNA 的表达模式发生改变。本文就 DFU 中的 miRNA 分子机制和治疗前景作一综述。

1 MiRNA在DFU创面愈合中的作用机制

正常的创面愈合分为以下几个阶段:炎症期、增生期、再上皮化和重塑期。这几个阶段依次进行、互相交叠,其中任何环节的异常都将导致伤口愈合不良^[7]。以下将分别剖析 miRNA 在 DFU 创面愈合的各个阶段中的调控作用。

1.1 MiRNA在炎症期中的作用

DFU 创面的愈合过程与正常皮肤组织愈合过程不同。正常情况下,创伤急性期组织和细胞释放促炎症因子,启动炎症反应,清除病原体,避免伤口感染。感染控制后,抗炎因子释放,促使伤口愈合过程进入下一阶段,炎症期持续 1~4 d^[7]。DFU 创面呈现慢性炎症表型,中性粒细胞和巨噬细胞在创面组织中浸润的程度过高,炎性细胞因子的表达增加,炎症期异常延长。

1.1.1 促炎症相关miRNA

T 淋巴细胞作为免疫调控网络中的关键节点,其反应模式受到 miRNA 的调控。miR-15/16 家族对 T 细胞的细胞周期、存活以及记忆 T 细胞的分化起重要的调节作用,是炎症期调控的核心靶点之一。T 淋巴细胞中, *Mirc30* 和 *Mirc10* 基因位点高表达。*Mirc30* 编码的 miR-15-a 和 miR-16-1, 以及 *Mirc10* 编码的 miR-15-b 和 miR-16-2, 对 T 淋巴细胞的诱导、调节性 T 细胞 (Treg)/ 辅助性 T 细胞 17 (Th17) 平衡、克隆不应答起到重要的调控作用^[8]。此外,该家族中的 miR-15b-5p 与病原体的侵袭以及创面慢性感染有着密切的关联。金黄色葡萄球菌是 DFU 创面感染的常见病原体,该病原体可以通过改变宿主细胞的 miRNA 表达以增强自身感染宿主的能力^[9]。Ramirez 等^[10]通过基因芯片测序证实了 DFU 患者的创面皮肤样本中的 miR-15b-5p 相对表达量高于正常人的足部皮肤样本,并且利用 PCR 技术验证了合并金黄色葡萄球菌感染的 DFU 样本中的 miRNA 与 mRNA 表达与正常对照存在显著性差异。他们进一步研究发现,miR-15b-5p 的过表达可抑制 *IKKB* (inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta) 基因, *IKKB* 是炎症反应过程的重要组成部分,其下调导致宿主不能有效地启动炎症反应清除病原体;同时抑制 G₂ 检查点激酶 WEE1 (WEE1 G₂ checkpoint

kinase, WEE1)、成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2)、DNA 双链损伤修复蛋白 RAD50 (RAD50 double strand break repair protein, RAD50)、*MSH2* (mutS homolog 2)、原癌基因-受体酪氨酸激酶 KIT (KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase, KIT) 等基因的表达,其中 *WEE1*、*RAD50*、*MSH2* 是 DNA 损伤修复的重要基因,下调可导致细胞 DNA 损伤^[10]。

1.1.2 抑制炎症相关miRNA

MiR-146a 是首个发现的在免疫系统中起调节作用的 miRNA^[11]。miR-146a 靶向抑制白细胞介素 1 受体相关激酶 1 (interleukin 1 receptor associated kinase 1, IRAK1) 和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6) 两个 NF- κ B 途径的关键衔接分子。在 DFU 创面中,miR-146a 表达下调,导致 *IRAK1* 和 *TRAF6* 表达升高, NF- κ B 信号转导增强,白介素 6 (interleukin 6, IL6)、IL8 表达上调,炎症反应增强。过表达 miR-146a 可以促进糖尿病小鼠的创面愈合^[12]。

MiRNA-129-2 家族对中性粒细胞的功能障碍具有重要的调节作用。Umehara 等^[13]发现,miRNA-129-2 家族在糖尿病小鼠的中性粒细胞中的表达水平显著下调。细胞实验表明,miR-129-2-3p 与 *Casp6* (caspase 6)、*Ccr2* (chemokine C-C motif receptor 2) 和 *Dedd2* (death effector domain-containing DNA binding protein 2) 的 3' 非翻译区 (untranslated regions, UTR) 结合,抑制基因表达,下调炎症反应。小鼠实验进一步验证了 miR-129-2-3p 对炎症反应的负调控作用,过表达 miR-129-2-3p 可以促进 2 型糖尿病小鼠创面愈合^[13]。

晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 是长期高血糖状态诱使体内大分子物质 (核酸及蛋白质等) 发生非酶糖基化,形成的结构异常的代谢产物,是 DFU、糖尿病肾病、周围血管病变等并发症的重要原因之一。miR-5591-5p 与 AGEs/AGER (AGEs receptor) 轴关系密切^[14], AGEs 诱导 AGER 表达升高, AGEs 与 AGER 相互作用触发活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 大量表达,并激活下游 caspase-3/PARP (poly ADP-ribose polymerase 1) 信号通路,诱导脂肪组织来源干细胞、内皮祖细胞等细胞凋亡。miR-5591-5p 在 DFU 创面中的表达量显著低于正常人组织。研究证明,miR-5591-5p 靶向下调 AGER,抑制 AGEs/AGER 轴,使下游 *JNK1/2* (c-Jun N-terminal kinase 1/2) 表达减少、活性降低。在脂肪

组织来源干细胞中过表达 miR-5591-5p, 可降低 AGEs 处理后的细胞内 ROS 水平和凋亡水平。小鼠体内实验中, 创面局部过表达 miR-5591-5p 可使 AGEs 处理后的创面的愈合速度加快, 皮肤再生和再上皮化水平升高^[14]。

1.2 miRNA在增生期及肉芽组织形成过程中的作用

肉芽组织的初期主要由巨噬细胞产生的纤维蛋白和纤连蛋白组成^[7], 肉芽组织内部新生血管的生成并提供丰富的血供是肉芽组织健康生长的基础, 也是创面愈合进入下一阶段的必要条件。血管生成过程的调节涉及多种细胞因子, 包括碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β)、促血管生成素 1 (angiopoietin 1, ANGPT1)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 和 IL8 等, 血管生成相关的因子紊乱及其引起的血管生成减少是 DFU 创面难愈的关键因素^[15]。

1.2.1 促血管生成相关miRNA

MiR-126 是调节循环 CD34⁺ 细胞的促血管生成能力的关键 miRNA。CD34⁺ 细胞亚群以外泌体和微囊泡系统分泌 miR-126, 外泌体由内皮细胞摄取, 促进血管生成。糖尿病患者的 miR-126 表达的减少, 极可能是其 CD34⁺ 细胞促血管生成能力显著减弱的重要原因。外周全血测定研究表明, 2 型糖尿病患者的循环 miR-126 水平低于健康对照, 并且在血糖控制得到改善后显著上调^[16]。此外, miR-126 在内皮细胞中表达丰度高, 可作用于 VEGF 途径维持内皮稳态和血管完整性^[17]。MiR-126 促进内皮祖细胞的增殖和迁移并抑制其凋亡, 但对其分化无显著影响。MiR-126 在糖尿病患者的内皮祖细胞中表达下降, 影响了 miR-126 的靶基因 *Spre-1* (sprouty related EVH1 domain containing 1) 及其下游基因的表达, 通过抑制 Ras/ERK/VEGF 以及 PI3K/AKT/eNOS 信号通路对内皮祖细胞的功能造成损害^[18]。

1.2.2 抑制血管生成相关miRNA

VEGF 通过与其受体之一 VEGFR2 结合, 激活细胞内多个下游通路, 促进血管生成, 是血管生成的关键通路, 这一过程的各个环节受到多种 miRNA 调节, 包括 VEGF 的产生以及下游通路基因的表达。

直接作用于 VEGF/VEGFR2 信号通路的 miRNA 包括 miR-15b 和 miR-200b。它们分别靶向 VEGF

和 VEGFR2 的 mRNA 的 3' UTR 区, 阻断该通路, 抑制血管新生^[19]。VEGF/AKT/eNOS 通路作为 VEGF 激活的核心通路之一, 受到 miR-615-5p 的负调控。miR-615-5p 在创面急性期大量表达, 且糖尿病患者的皮肤组织中, miR-615-5p 表达显著高于正常对照。在内皮细胞中, miR-615-5p 通过靶向结合胰岛素样生长因子 2 (insulin like growth factor 2, IGF2) 和 Ras 相关结构域家族 2 (Ras association domain family member 2, RASSF2) mRNA 的 3' UTR 区, 抑制 VEGF/AKT/eNOS 通路的转导, 减少一氧化氮 (NO) 的生成, 抑制内皮细胞的增殖、迁移和成管, 减少血管生成。在糖尿病 db/db 小鼠的伤口组织中, miR-615-5p 的表达量也显著高于野生型小鼠的伤口组织, 通过下调 db/db 小鼠创面局部 miR-615-5p, 可显著增加的血管生成, 肉芽组织厚度以及伤口闭合率。Icli 等^[20]采用人类皮肤类器官模型, 验证了 miR-615-5p 对于 VEGF/AKT/eNOS 通路的抑制效应, 并证实了即使在 VEGF 水平相当的情况下, 由于 miR-615-5p 对于血管再生以及新生肉芽生成的抑制作用, 糖尿病患者的皮肤组织的新生血管仍显著少于正常对照。

VEGF/HIP1/p38K 轴是 VEGF 激活的另一血管生成相关通路, 亨廷顿相关蛋白 (Huntingtin interacting protein 1, HIP1) 是 VEGF 调节的该通路中的重要一环, miR-135a-3p 靶向抑制 *HIP1*, 减少血管生成^[21]。

ANGPT1 也是血管形成过程中的重要因子, ANGPT1 与 VEGF 协调互补, VEGF 促进内皮细胞增殖, 诱导血管管腔形成, ANGPT1 与其受体 TEK (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and epidermal growth factor homology domains) 相结合, 促进内皮细胞间的连接、增强血管壁的完整性和稳定性。miR-200/466 家族对 ANGPT1 起负调节作用, 正常状态下, 蛋白质错误折叠将引起内质网应激, 激活内质网跨膜感受器 IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1 α), IRE1 α 除激活转录因子 XBP1 (X-box binding protein 1) 引起一系列下游反应之外, 也是 miRNA 前体的特异性剪切酶, 通过识别特异性的 G/C 碱基位点, 导致包括 miR-200/466 家族在内的数种 miRNA 前体降解; 但在糖尿病患者中, 持续的代谢状态改变导致 IRE1 α 水平下降, 从而使得 miR-200/466 家族表达过高, ANGPT1 下调, 血管生成减少^[22]。

1.3 miRNA在再上皮化和重塑期中的作用

伤口愈合的再上皮化和重塑期中, 成纤维细胞、角质形成细胞、血管内皮细胞在多种生长因子诱导下增殖、迁移, 形成肉芽组织。细胞合成分泌胶原

蛋白、纤维连接蛋白, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积, 促使瘢痕形成, 伤口挛缩。ECM 的沉积是通过合成与降解的动态平衡实现的, ECM 代谢的紊乱是 DFU 伤口再上皮化程度差的一个重要原因, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 以及 MMP 组织抑制物 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 在维持 ECM 的动态平衡过程中起重要作用。

MiR-29a 在糖尿病小鼠皮肤中的表达较正常对照明显上调, 改变了胶原蛋白 I 和胶原蛋白 III 在不同时期的表达量, 从而造成糖尿病小鼠的皮肤机械强度显著下降。miRNA 还可以通过调节 MMP、TIMP 等酶及其转录因子, 对再上皮化和重塑期进行调控。研究发现, MMP-9 在多种慢性难愈创面中上调。特化蛋白 1 (specificity protein 1, Sp1) 是 MMP-9 的转录激活因子, 通过结合启动子上调 MMP-9 的转录水平, miR-129 与 miR-335 可以通过靶向结合

下调 Sp1, 从而下调 MMP-9 的表达, 促进 ECM 的沉积, 体内实验也证实了 miR-129 与 miR-335 的局部应用可显著增加伤口的胶原沉积和 ECM 重塑, 增加新生皮肤组织厚度, 说明 miR-129 和 miR-335 的低表达水平是 DFU 创面愈合障碍的原因之一^[23]。以 miR-21 为中介的角质形成细胞和成纤维细胞对话可以促进伤口的愈合, 角质形成细胞通过分泌含有 miR-21 的外泌体调控成纤维细胞中的 MMP-1/3、TIMP3/4 表达量, 并促进成纤维细胞迁移, 诱导其表达 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和 N-钙黏着蛋白, 分化为肌成纤维细胞, 下调 PTEN (phosphatase and tensin homolog) 和 RECK (reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs) 的蛋白水平, 并激活 MAPK/ERK 及其下游信号通路, 增强成纤维细胞促进伤口愈合的能力^[24]。

DFU 创面愈合的调控过程涉及众多 miRNA, 本文中涉及的或未能详述的 miRNA 见表 1。

表1 DFU创面愈合过程中的miRNA及其作用靶点

MicroRNA	愈合阶段	调控方式	作用靶点	参考文献
miR-15b-5p	炎症反应	↑	<i>WEE1</i> 、 <i>RAD50</i> 、 <i>MSH2</i> 、 <i>IKBK</i>	[10]
miR-155	炎症反应	↑	<i>BCL6</i> 、 <i>RhoA</i> 、 <i>SHIP1</i>	[25]
Let-7b	炎症反应	↓	TLR4/NF- κ B/STAT3/AKT通路	[26]
miR-132	炎症反应	↓	NF- κ B、NOD样受体、Toll样受体、TNF信号通路、HB-EGF	[27]
miR-146a	炎症反应	↓	<i>IRAK1</i> 、 <i>TRAF6</i>	[28]
miR-16	炎症反应	↓	<i>COX2</i>	[29]
miR-203	炎症反应	↓	<i>TNFα</i> 、 <i>IL24</i>	[30]
miR-129-2-3p	炎症反应	↓	<i>Casp6</i> 、 <i>Ccr2</i> 、 <i>Dedd2</i>	[13]
miR-5591-5p	炎症反应	↓	AGEs/AGER轴	[14]
miR-27b	血管生成	↑	<i>TSP-1</i>	[31]
miR-126-3p	血管生成	↑	<i>Spred-1</i> 、 <i>AKT</i> 、 <i>ERK1/2</i>	[32]
miR-15b	血管生成	↓	<i>Akt3</i> 、VEGF、 <i>HIF-1α</i>	[19]
miR-615-5p	血管生成	↓	<i>IGF2</i> 、 <i>RASSF2</i>	[20]
miR-135a-3p	血管生成	↓	<i>HIP1</i> 、VEGF/HIP1/p38K通路	[21]
miR-26a	血管生成	↓	BMP1/SMAD1通路	[33]
miR-92a	血管生成	↓	<i>ITGA5</i> 、 <i>ITGB5</i>	[34]
miR-200/466家族	血管生成	↓	<i>ANGPT1</i>	[22]
miR-200b	血管生成	↓	<i>ETS1</i> 、 <i>GATA2</i> 、VEGFR2	[19]
miR-205-5p	血管生成	↓	<i>VEGF</i>	[35]
miR-21	再上皮化	↑	<i>MMP-1</i> 、 <i>MMP-3</i> 、 <i>TIMP-3</i> 、 <i>TIMP-4</i> 、 <i>TGF-β1</i>	[24]
miR-129和miR-335	再上皮化	↑	<i>Sp-1</i>	[23]
miR-29b	再上皮化	↑	纤连蛋白、I型胶原蛋白、III型胶原蛋白、 <i>MMP-9</i>	[36]
miR-25	再上皮化	↓	<i>TGF-β1</i> 、 <i>SMAD-3</i> 、 <i>Colla1</i> 、 <i>Col3a1</i>	[37]
miR-29a	再上皮化	↓	<i>TAB-1</i>	[37]
miR-191	再上皮化	↓	紧密连接蛋白-1	[38]
miR-198	再上皮化	↓	<i>DIAPH1</i> 、 <i>PLAU</i> 、 <i>LAMC2</i>	[39]
miR-99家族	再上皮化	↓	<i>IGF1R</i> 、 <i>mTOR</i> 、 <i>AKT1</i> 、AKT/PKB/mTOR通路	[40]

↑: miRNA对其调控的创面愈合阶段具有促进作用; ↓: miRNA对其调控的创面愈合阶段具有抑制作用。

2 miRNA在DFU创面中的治疗前景

2.1 miRNA作为糖尿病及其并发症治疗靶点的优势

以 miRNA 为代表的非编码 RNA 靶向治疗是目前的研究热点之一。糖尿病微血管病变, 如 DFU、糖尿病肾病、糖尿病性视网膜病变等, 与高血糖状态所致 microRNA 表达谱的改变密切相关^[41]。miRNA 的靶向治疗, 与小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 靶向某一基因相比, 具有同时微调多个基因靶点, 调节复杂疾病的基因网络的优势, 因此, miRNA 是治疗糖尿病等慢性疾病更为理想的方式。

目前, miRNA 治疗有两种思路: (1) 使用合成的双链 miRNA 模拟物 (miRNA mimics) 或构建病毒载体, 过表达目标 miRNA, 恢复其功能; (2) 使用化学修饰的反义 miRNA 寡核苷酸抑制 (anti-miR, miRNA inhibitor), 抑制 miRNA 的功能。

2.2 miRNA靶向治疗技术和挑战

2.2.1 miRNA治疗的化学修饰技术以及给药途径

在过去的 20 年中, 基于化学修饰寡核苷酸技术, miRNA 靶向治疗领域得到了长足的发展。anti-miR 和 miR 模拟物在体内很容易被内源性 RNA 酶降解, 需要一系列化学修饰以增强寡核苷酸的稳定性、亲和力以及被组织摄取的能力。通过细胞实验、动物模型以及临床试验改进化学修饰方法, 优化其体内的药理学性质, 开发出局部或系统性应用的药物。

化学修饰的双链 miRNA 模拟物中的两条链可以通过连接胆固醇等分子修饰编码链以增强其稳定性、亲和力以及被组织摄取的能力, 同时, 也要避免过多修饰而影响其被快速降解的性质。反义链的修饰既要保证在细胞内能够被 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complexes, RISC) 识别, 又要防止外切核酸酶对其进行降解^[42], 2'-F 修饰可以稳定反义链并且不干扰 RISC 加载。除了化学修饰 miRNA 模拟物, 也可使用慢病毒、腺病毒或腺相关病毒搭载 miRNA 重建其表达^[43]; 但其潜在的问题在于病毒的安全性, 以及 miRNA 模拟物被原本不产生目的 miRNA 的组织摄取, 造成脱靶。

相比较于 miRNA 模拟物, anti-miR 的化学修饰以及用药途径较为容易。例如, 锁核酸 (locked nucleic acids, LNA), 是靶点 RNA 的反义寡核苷酸, 在 2'-O 和 4'-C 之间插入亚甲基键, 锁定其位置降低核糖环的可变性, LNA 的靶向结合效率高、体内稳定性强^[44]。同时, 3'-胆固醇结合的 2'-O-Me 修

饰的 antagomir 也取得了良好的体内抑制效应^[45]。Liu 等^[46]验证了局部注射 miR-296-5p 的 antagomir 缓冲盐溶液促进糖尿病大鼠创面愈合的有效性。MiRNA 模拟物一般为双链结构, 只能依赖基于脂质体纳米颗粒、聚乙烯亚胺、去端肽胶原修饰包裹的给药方式^[47]。然而, LNA 或 antagomir 作为单链寡核苷酸, 也可以配制在生理盐水或磷酸盐缓冲液中用于皮下或静脉内注射。血浆中的 anti-miR 可迅速被多种组织吸收, 如肝脏、脾脏、肾脏、脂肪组织和骨髓^[47]。进入细胞后, anti-miR 与内源靶 miRNA 形成高亲和力、稳定的化学键, 达到竞争抑制。

2.2.2 miRNA治疗临床试验进展与挑战

目前已有部分基于 miRNA 治疗的药物进入了临床试验阶段。MiRNA 的模拟物和抑制剂在肿瘤、病毒性肝炎、心血管疾病、糖尿病、慢性肾脏病等疾病的动物试验中取得良好的疗效, 目前进入临床试验阶段的慢性疾病相关 miRNA 药物见表 2。

尽管近年来已经进行了大量 miRNA 治疗的临床前研究, 但迄今为止, 只有少数 miRNA 治疗药物进入了临床试验阶段。MiRNA 治疗的最大挑战之一是寻找疾病最佳的 miRNA 靶标, 识别最佳靶标的主要难点在于 miRNA 表达的异质性、复杂性和动态性。DFU 创面微环境中的缺氧和炎症等因素会导致区域异质性, 缺氧下调了 miRNA 合成过程中关键酶的表达^[48], 导致 miRNA 异常表达。MiRNA 变化的复杂性在于每一种 miRNA 可以靶向多个目标基因, 而在疾病中表达发生变化的往往是多种 miRNA, 为寻找疾病中起关键作用 miRNA 或 miRNA 组增加了难度。另外, 患者间也存在异质性, 不同患者是否存在共同表达的 miRNA 组还有待验证。MiRNA 临床治疗的其他挑战还包括, 设计赋予 miRNA 治疗药物更高的稳定性和组织特异性靶向性 miRNA 传递载体, 以及如何避免潜在的毒性并克服脱靶效应等技术限制。

3 展望

MiRNA 能够靶向多种基因进行多通路的网络式调控, 使得其临床治疗具有诱人前景。目前已经有大量的研究证明了 miRNA 靶向治疗在动物模型体内的有效性^[49]。本课题组基于 miR-296-5p 靶向钠离子-葡萄糖共转运体-2 (sodium-glucose transporter 2, SGLT2) 调控胰岛细胞的增殖、周期和凋亡的研究基础, 在大鼠创面模型上验证了局部使用 agomir-296-5p 和 antagomir-296-5p 的治疗效果^[46]。本课题

组正在进行针对 miR-199a 在血管生成方面的细胞学实验,验证其对于血管形成相关通路的调控作用,并根据该实验结果进行正常大鼠创面的 agomir-199a 过表达体内实验,以及利用 antagomir-199a 进行糖尿病大鼠创面的治疗,实验已取得一定进展。

尽管已有充足的动物实验结果验证了人工合成的 miRNA 模拟物及抑制物的治疗效果,并且已有 miRNA 治疗进入了临床试验阶段,并展现出了低毒性、有效递送至靶器官的特性。然而,总体来说,目前人们对复杂的 miRNA 调控网络的认知还不够

清晰完整,甚至未能明确在治疗条件下达到非生理浓度的 miRNA 是否具有未知的靶标,是否会对正常细胞稳态基因造成潜在的不利影响^[49]。加之化学修饰和药物递送等技术难点,增加了 DFU 的选择性 miRNA 靶向治疗药物的开发难度。因此,进入临床试验之前,必须更加全面地研究 miRNA 组的表达谱及其靶基因效应,以确保其安全性。

综上,miRNA 有望成为新的 DFU 治疗靶点,但距临床应用仍有很长的距离,需进一步的探索和更多的尝试。

表2 miRNA治疗药物临床试验

药物名(公司)	miR类型	化学修饰及给药方式	治疗疾病	临床试验状态	临床试验注册号
Mirvirasen (Santaris Pharma A/S and Hoffmann-La Roche)	AntimiR-122	LNA-miR反义单链	丙型肝炎 (包括慢性丙肝)	单中心, I期,	NCT01646489
				已完成	
				多中心, II期,	NCT01200420
				已完成	
				多中心, II期,	NCT01872936
				状态未知	
				单中心, II期,	NCT02031133
				已完成	
				单中心, II期,	NCT02508090
				已完成	
RG-101 (Regulus Therapeutics)	AntimiR-122	N-乙酰-D-半乳糖胺 基结合的antimiR	慢性丙型肝炎	多中心, I B期,	EudraCT-2013-
				已完成	002978-49
				多中心, 已完成	EudraCT-2014-
					002808-25
RG-125/AZD4076 (Regulus Therapeutics)	AntimiR-103/107	N-乙酰-D-半乳糖胺 基结合的antimiR	2型糖尿病伴非 酒精性脂肪肝	单中心, I期,	NCT02612662
				进行中	
				单中心, I/II期,	NCT02826525
				进行中	
MRG-106 (miRagen Therapeutics)	AntimiR-155	LNA	皮肤型T细胞淋巴 瘤及蕈样肉芽肿	多中心, I期,	NCT02580552
				进行中	
MRG-201 (miRagen Therapeutics)	miR-29 mimic	胆固醇结合的双链 miRNA	硬皮病	单中心, I期,	NCT02603224
				已完成	
MRX34 (Mirna Therapeutics)	miR-34 mimic	脂质体(Smarticles)	多发性实体瘤	多中心, I期,	NCT01829971
				已终止	

[参 考 文 献]

- [1] Noor S, Zubair M, Ahmad J. Diabetic foot ulcer—a review on pathophysiology, classification and microbial etiology. *Diabetes Metab Syndr*, 2015, 9: 192-9
- [2] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138: 271-81
- [3] Bowling FL, Rashid ST, Boulton AJ. Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11: 606-16
- [4] Geiss LS, Li Y, Hora I, et al. Resurgence of diabetes-related nontraumatic lower-extremity amputation in the young and middle-aged adult U.S. population. *Diabetes Care*, 2019, 42: 50-4
- [5] Li D, Landen NX. MicroRNAs in skin wound healing. *Eur J Dermatol*, 2017, 27: 12-4
- [6] Costantino S, Paneni F, Luscher TF, et al. MicroRNA profiling unveils hyperglycaemic memory in the diabetic heart. *Eur Heart J*, 2016, 37: 572-6
- [7] Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, et al. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *Eur*

- Surg Res, 2017, 58: 81-94
- [8] Gagnon JD, Kageyama R, Shehata HM, et al. Mir-15/16 restrain memory T cell differentiation, cell cycle, and survival. *Cell Rep*, 2019, 28: 2169-81.e4
- [9] Cervantes-Garcia E, Garcia-Gonzalez R, Resendiz-Albor A, et al. Infections of diabetic foot ulcers with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Low Extrem Wounds*, 2015, 14: 44-9
- [10] Ramirez HA, Pastar I, Jozic I, et al. *Staphylococcus aureus* triggers induction of miR-15b-5p to diminish DNA repair and deregulate inflammatory response in diabetic foot ulcers. *J Invest Dermatol*, 2018, 138: 1187-96
- [11] 孙舒瑶, 王椿, 冉兴无. 微小RNA在糖尿病创面愈合中的研究进展. *中国修复重建外科杂志*, 2014, 28: 1431-4
- [12] Zgheib C, Hilton SA, Dewberry LC, et al. Use of cerium oxide nanoparticles conjugated with microRNA-146a to correct the diabetic wound healing impairment. *J Am Coll Surg*, 2019, 228: 107-15
- [13] Umehara T, Mori R, Mace KA, et al. Identification of specific miRNAs in neutrophils of type 2 diabetic mice: overexpression of miRNA-129-2-3p accelerates diabetic wound healing. *Diabetes*, 2019, 68: 617-30
- [14] Li Q, Xia S, Yin Y, et al. Mir-5591-5p regulates the effect of adscs in repairing diabetic wound via targeting AGES/AGER/JNK signaling axis. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 566
- [15] Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther*, 2014, 31: 817-36
- [16] Mocharla P, Briand S, Giannotti G, et al. Angiomir-126 expression and secretion from circulating CD34⁺ and CD14⁺ PBMCs: role for proangiogenic effects and alterations in type 2 diabetics. *Blood*, 2013, 121: 226-36
- [17] Mathiyalagan P, Liang Y, Kim D, et al. Angiogenic mechanisms of human CD34⁺ stem cell exosomes in the repair of ischemic hindlimb. *Circ Res*, 2017, 120: 1466-76
- [18] Hulsmans M, Holvoet P. MicroRNAs as early biomarkers in obesity and related metabolic and cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des*, 2013, 19: 5704-17
- [19] Pizzino G, Irrera N, Galfo F, et al. Effects of the antagomirs 15b and 200b on the altered healing pattern of diabetic mice. *Br J Pharmacol*, 2018, 175: 644-55
- [20] Icli B, Wu W, Ozdemir D, et al. MicroRNA-615-5p regulates angiogenesis and tissue repair by targeting AKT/eNOS (protein kinase B/endothelial nitric oxide synthase) signaling in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39: 1458-74
- [21] Icli B, Wu W, Ozdemir D, et al. MicroRNA-135a-3p regulates angiogenesis and tissue repair by targeting p38 signaling in endothelial cells. *FASEB J*, 2019, 33: 5599-614
- [22] Wang JM, Qiu Y, Yang ZQ, et al. Inositol-requiring enzyme 1 facilitates diabetic wound healing through modulating microRNAs. *Diabetes*, 2017, 66: 177-92
- [23] Wang W, Yang C, Wang XY, et al. MicroRNA-129 and -335 promote diabetic wound healing by inhibiting Sp1-mediated MMP-9 expression. *Diabetes*, 2018, 67: 1627-38
- [24] Li Q, Zhao H, Chen W, et al. Human keratinocyte-derived microvesicle miRNA-21 promotes skin wound healing in diabetic rats through facilitating fibroblast function and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 114: 105570
- [25] Van Solingen C, Araldi E, Chamorro-Jorganes A, et al. Improved repair of dermal wounds in mice lacking microRNA-155. *J Cell Mol Med*, 2014, 18: 1104-12
- [26] Ti D, Hao H, Tong C, et al. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *J Transl Med*, 2015, 13: 308
- [27] Li D, Wang A, Liu X, et al. MicroRNA-132 enhances transition from inflammation to proliferation during wound healing. *J Clin Invest*, 2015, 125: 3008-26
- [28] Yang M, Ye L, Wang B, et al. Decreased miR-146 expression in peripheral blood mononuclear cells is correlated with ongoing islet autoimmunity in type 1 diabetes patients. *J Diabetes*, 2015, 7: 158-65
- [29] Shanmugam N, Reddy MA, Natarajan R. Distinct roles of heterogeneous nuclear ribonuclear protein K and microRNA-16 in cyclooxygenase-2 RNA stability induced by S100b, a ligand of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 2008, 283: 36221-33
- [30] Primo MN, Bak RO, Schibler B, et al. Regulation of pro-inflammatory cytokines TNF α and IL24 by microRNA-203 in primary keratinocytes. *Cytokine*, 2012, 60: 741-8
- [31] Wang JM, Tao J, Chen DD, et al. MicroRNA miR-27b rescues bone marrow-derived angiogenic cell function and accelerates wound healing in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34: 99-109
- [32] Tao SC, Guo SC, Li M, et al. Chitosan wound dressings incorporating exosomes derived from microRNA-126-overexpressing synovium mesenchymal stem cells provide sustained release of exosomes and heal full-thickness skin defects in a diabetic rat model. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6: 736-47
- [33] Icli B, Nabzyk CS, Lujan-Hernandez J, et al. Regulation of impaired angiogenesis in diabetic dermal wound healing by microRNA-26a. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91: 151-9
- [34] Lucas T, Schafer F, Muller P, et al. Light-inducible antimir-92a as a therapeutic strategy to promote skin repair in healing-impaired diabetic mice. *Nat Commun*, 2017, 8: 15162
- [35] Zhu L, Wang G, Fischbach S, et al. Suppression of microRNA-205-5p in human mesenchymal stem cells improves their therapeutic potential in treating diabetic foot disease. *Oncotarget*, 2017, 8: 52294-303
- [36] Xu J, Zgheib C, Hodges MM, et al. Mesenchymal stem cells correct impaired diabetic wound healing by decreasing ECM proteolysis. *Physiol Genomics*, 2017, 49: 541-8
- [37] Caskey RC, Zgheib C, Morris M, et al. Dysregulation of collagen production in diabetes following recurrent skin injury: contribution to the development of a chronic wound. *Wound Repair Regen*, 2014, 22: 515-20
- [38] Nagpal N, Kulshreshtha R. Mir-191: an emerging player in disease biology. *Front Genet*, 2014, 5: 99

- [39] Sundaram GM, Common JE, Gopal FE, et al. 'See-saw' expression of microRNA-198 and *fstl1* from a single transcript in wound healing. *Nature*, 2013, 495: 103-6
- [40] Jin Y, Tymen SD, Chen D, et al. MicroRNA-99 family targets AKT/mTOR signaling pathway in dermal wound healing. *PLoS One*, 2013, 8: e64434
- [41] Berezin A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: achieving and perspectives. *Diabetes Metab Syndr*, 2016, 10: S176-83
- [42] Van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med*, 2014, 6: 851-64
- [43] Jackson KL, Viel C, Clarke J, et al. Viral delivery of a microRNA to *Gba* to the mouse central nervous system models neuronopathic gaucher disease. *Neurobiol Dis*, 2019, 130: 104513
- [44] Hagedorn PH, Persson R, Funder ED, et al. Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery. *Drug Discov Today*, 2018, 23: 101-14
- [45] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature*, 2005, 438: 685-9
- [46] Liu X, Wang Y, Zhang X, et al. MicroRNA-296-5p promotes healing of diabetic wound by targeting sodium-glucose transporter 2 (SGLT2). *Diabetes Metab Res Rev*, 2019, 35: e3104
- [47] Lu Y, Hippen KL, Lemire AL, et al. Mir-146b antagomir-treated human Tregs acquire increased GVHD inhibitory potency. *Blood*, 2016, 128: 1424-35
- [48] Rupaimoole R, Ivan C, Yang D, et al. Hypoxia-upregulated microRNA-630 targets *dicer*, leading to increased tumor progression. *Oncogene*, 2016, 35: 4312-20
- [49] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 203-22