

糖尿病视网膜病变血清 miR-146a 与核转录因子- κ B 和 VEGF 的相关性

周垂仁¹, 黄卫¹, 江玲²

作者单位:(402760) 中国重庆市璧山区人民医院¹眼科;²内分泌科

作者简介:周垂仁,男,本科,副主任医师,研究方向:玻璃体视网膜疾病、眼科相关疾病。

通讯作者:江玲,女,本科,副主任医师,研究方向:糖尿病、肥胖症、骨质疏松、痛风、脂质代谢紊乱以及甲状腺相关疾病。
enshizhou123@126.com

收稿日期:2018-03-01 修回日期:2018-06-27

Correlation of serum miR-146a with nuclear factor- κ B and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy patients

Chui-Ren Zhou¹, Wei Huang¹, Ling Jiang²

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Endocrinology, Bishan District People's Hospital, Chongqing 402760, China

Correspondence to: Ling Jiang, Department of Endocrinology, Bishan District People's Hospital, Chongqing 402760, China.
enshizhou123@126.com

Received:2018-03-01 Accepted:2018-06-27

Abstract

• AIM: To investigate the correlation of serum miR-146a with nuclear factor- κ B (NF- κ B) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy patients.

• METHODS: A total of 100 patients with T2DM treated in our hospital from July 2016 to December 2017 were assigned into T2DM patients with DR (DR group, $n=32$) and T2DM patients without DR (T2DM group, $n=68$). Thirty healthy volunteers were selected as control group. Real-time PCR was used to examine the expression of miR-146a. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the levels of NF- κ B and VEGF. The correlation between miR-146a and NF- κ B and VEGF was analyzed.

• RESULTS: Compared with the control group, HbA1c in T2DM group and DR group increased ($t=6.822, 5.709$; $P<0.001$), FBG increased ($t=8.889, 7.923$; $P<0.001$), 2hPBG increased ($t=6.646, 5.514$; $P<0.001$). Compared with T2DM group, the duration of diabetes in DR group was longer ($t=2.431, P=0.017$). Compared with the control group, serum miR-146a in T2DM and group DR significantly decreased ($t=3.967, 7.169$; $P<0.001$), and the DR group was lower than that in the T2DM group ($t=4.444, P<0.001$). Compared with the control group, the

serum NF- κ B in the T2DM and DR group increased significantly ($t=6.063, 14.851$; $P<0.001$), VEGF increased significantly ($t=7.613, 12.943$; $P<0.001$), NF- κ B and VEGF in DR group were larger than those in T2DM group ($t=11.406, 7.560$; $P<0.001$). Pearson analysis showed that miR-146a was negatively correlated with NF- κ B and VEGF ($r=-0.503, -0.574$; $P<0.05$).

• CONCLUSION: The serum miR-146a in DR patients significantly decreased, the NF- κ B and VEGF significantly increased. MiR-146a may be involved in the pathogenesis of DR by mediating inflammatory reaction and vascular proliferation.

• KEYWORDS: diabetic retinopathy; miR-146a; nuclear factor- κ B; vascular endothelial growth factor

Citation: Zhou CR, Huang W, Jiang L. Correlation of serum miR-146a with nuclear factor- κ B and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy patients. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(8):1440-1442

摘要

目的:探讨糖尿病视网膜病变血清 miR-146a 与核转录因子- κ B (NF- κ B) 和血管内皮生长因子(VEGF)的相关性。方法:选取 2016-07/2017-12 我院收治的 2 型糖尿病患者 100 例为研究对象,合并 DR 患者 32 例(DR 组),未合并 DR 患者 68 例(T2DM 组)。选取同期体检的健康志愿者 30 例作为对照组。采用 real-time PCR 检测血清 miR-146a,采用酶联免疫法检测 NF- κ B 和 VEGF,分析 miR-146a 与 NF- κ B 和 VEGF 的相关性。

结果:与对照组比较,T2DM 组和 DR 组 HbA1c 升高($t=6.822, 5.709$,均 $P<0.001$),空腹血糖(FBG)升高($t=8.889, 7.923$,均 $P<0.001$),餐后 2h 血糖(2h PBG)升高($t=6.646, 5.514$,均 $P<0.001$)。与 T2DM 组比较,DR 组糖尿病病程较长($t=2.431, P=0.017$)。与对照组比较,T2DM 组和 DR 组血清 miR-146a 明显降低($t=3.967, 7.169$,均 $P<0.001$),且 DR 组低于 T2DM 组($t=4.444, P<0.001$)。与对照组比较,T2DM 组和 DR 组血清 NF- κ B 明显增加($t=6.063, 14.851$,均 $P<0.001$),VEGF 明显增加($t=7.613, 12.943$,均 $P<0.001$);且 DR 组 NF- κ B 和 VEGF 大于 T2DM 组($t=11.406, 7.560$,均 $P<0.001$)。Pearson 分析显示 miR-146a 与 NF- κ B 和 VEGF 呈负相关($r=-0.503, -0.574, P<0.05$)。

结论:DR 患者血清 miR-146a 明显降低,NF- κ B 和 VEGF 明显增加,miR-146a 有可能通过介导炎症反应和血管增生参与 DR 的发病。

关键词:糖尿病视网膜病变;miR-146a;核转录因子- κ B;血管内皮生长因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.8.19

引用:周垂仁,黄卫,江玲. 糖尿病视网膜病变血清 miR-146a 与核转录因子- κ B 和 VEGF 的相关性. 国际眼科杂志 2018;18(8):1440-1442

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是导致成人失明的主要原因^[1],其具体发病机制尚不十分清楚。近年来有关 miRNA 与 DR 发病的关系逐渐引起学者的重视。miR-146a 是 miRNA 家族成员之一,已有研究证实 miR-146a 参与了周围神经病变^[2-3]和糖尿病肾病^[4]等糖尿病并发症的发生。然而有关 miR-146a 与 DR 发病的关系,鲜有大宗文献报道。大量研究证实高血糖引起的炎症反应、血管增生共同促进了 DR 的发病^[5]。核转录因子- κ B (NF- κ B)调控的信号通路是重要的炎症反应通路,在免疫应答、炎症反应、细胞增殖和凋亡等多种过程中发挥作用^[6]。血管内皮生长因子(VEGF)被认为是新生血管形成的关键细胞因子^[7]。NF- κ B 和 VEGF 已被证实与 DR 的发病密切相关。本研究通过分析 DR 患者血清 miR-146a,及其与 NF- κ B 和 VEGF 的相关性,探讨其在 DR 发病中的作用,现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2016-07/2017-12 我院收治的 2 型糖尿病(T2DM)患者 100 例为研究对象,合并 DR 患者 32 例(DR 组),其余 68 例患者未合并 DR(T2DM 组)。纳入标准:符合 1999 年世界卫生组织有关 T2DM 诊断标准,符合 2014 年我国 DR 临床诊疗指南有关 DR 诊断标准,所有患者均知情同意并签署知情同意书。排除标准:1 型糖尿病、青光眼、白内障等其它眼部疾病,冠心病、严重心梗患者、脑卒中等严重心脑血管疾病。选取同期体检的健康志愿者 30 例作为对照组。本研究严格遵守医学伦理要求,经本院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 观察指标 采集清晨空腹肘静脉血,采用 AU5421 型全自动生化分析仪(日本 OLYMPUS 公司)测定空腹血糖(FBG)、餐后 2h 血糖(2h PBG),采用 HA-8160 全自动糖化血红蛋白分析仪(日本 ARKRAY 公司)测定糖化血红蛋白(HbA1c),采用酶联免疫吸附法测定 NF- κ B 和 VEGF,试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。

1.2.2 real-time PCR 测定血清 miR-146a 采集清晨空腹肘静脉血 10mL,4℃ 下 3500r/min 离心 10min,取上清。Trizol 法提取总 RNA,按逆转录试剂盒操作说明逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,引物委托上吉玛公司合成,miR-146a 上游:5'-GGGTGAGAACTGAATTCCA-3',下游:5'-CACTGCCGTGCTGGACT-3'。U6 上游:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',下游:5'-CGCTTCACGAATTTCGCTGTCAT-3'。扩增条件:95℃ 10min,95℃ 15s,60℃ 15s,72℃ 15s,55℃ 15s,共计 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因相对含量(RQ), $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

统计学分析:采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,所有数据均经正态性分布检验,符合正态分布的计量资

料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,若存在差异则进行组内两两比较,采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。计数资料以(%)表示,多组间比较采用整体 χ^2 检验,若存在差异则进行组内两两比较,以 $P<0.017$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较 三组患者 HbA1c、FBG 和 2h PBG 比较,差异有统计学意义($F=25.330,44.784,23.924$,均 $P<0.001$)。与对照组比较,T2DM 组和 DR 组 HbA1c 升高($t=6.822,5.709$,均 $P<0.001$),FBG 升高($t=8.889,7.923$,均 $P<0.001$),2h PBG 升高($t=6.646,5.514$,均 $P<0.001$)。三组性别、年龄和体质量指数比较差异无统计学意义($\chi^2=0.264, P=0.876; F=0.195, P=0.823; F=0.166, P=0.847$)。与 T2DM 组比较,DR 组糖尿病病程较长($t=2.431, P=0.017$),而 HbA1c、FBG 和 2h PBG 比较差异无统计学意义($t=0.208, P=0.836; t=0.304, P=0.762; t=0.259, P=0.796$),见表 1。

2.2 血清 miR-146a 比较 对照组、T2DM 组和 DR 组血清 miR-146a 相对含量分别为 $22.34\pm 5.16, 18.33\pm 4.14$ 和 14.67 ± 3.09 ,三组比较差异有统计学意义($F=25.782, P<0.001$);与对照组比较,T2DM 组和 DR 组血清 miR-146a 明显降低,差异有统计学意义($t=3.967, 7.169$,均 $P<0.001$),且 DR 组低于 T2DM 组,差异有统计学意义($t=4.444, P<0.001$),见图 1。

2.3 血清 NF- κ B 和 VEGF 比较 三组患者血清 NF- κ B 和 VEGF 比较,差异均有统计学意义($F=116.487, 83.773$,均 $P<0.001$);与对照组比较,T2DM 组和 DR 组血清 NF- κ B 明显增加,差异有统计学意义($t=6.063, 14.851$,均 $P<0.001$),VEGF 明显增加,差异有统计学意义($t=7.613, 12.943$,均 $P<0.001$);且 DR 组 NF- κ B 和 VEGF 大于 T2DM 组,差异有统计学意义($t=11.406, 7.560$,均 $P<0.001$),见表 2。

2.4 miR-146a 与 NF- κ B 和 VEGF 相关性 Pearson 分析显示,miR-146a 与 NF- κ B 和 VEGF 呈负相关($r=-0.503, -0.574, P<0.05$)。

3 讨论

DR 的主要病理特征表现为毛细血管基底膜增厚,内皮细胞和周细胞凋亡增加,血管内皮损伤、渗漏,以及新生血管形成等。5a 病程以上 T2DM 患者 DR 发生率为 24%~40%,10a 病程以上 T2DM 患者 DR 发病率高达 53%~84%^[8]。本研究中,DR 患者和 T2DM 患者 HbA1c、FBG 和 2h PBG 显著高于对照组,而 DR 患者糖尿病病程明显高于 T2DM 患者,这也证明了长期慢性高血糖是引起 DR 发病的核心因素。所以对于 DR 的防治及其发病机制的探讨具有重要意义。

miR-146a 定位于人基因染色体 5q34 位点,是一个典型的多靶基因调节器^[2-4]。王国凤等^[3]研究显示 miR-146a 在糖尿病周围神经病变患者外周血中的含量显著降低,且与患者病情严重程度相关。Bhatt 等^[4]学者研究显示糖尿病肾病患者外周血 miR-146a 含量显著降低。有关 miR-146a 与 DR 的关系,鲜有文献报道。那么 miR-146a 在 DR 患者中的表达情况如何,能否成为检测 DR 的相关指标?实际上我们有理由推测 miR-146a 可能也参与了 DR 的发病。本研究中,DR 患者和 T2DM 患者血

表1 三组一般资料比较

组别	例数	性别 (男/女,例)	年龄 ($\bar{x}\pm s$,岁)	体质量指数 ($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	糖尿病病程 ($\bar{x}\pm s$,a)	HbA1c ($\bar{x}\pm s$,%)	FBG ($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	2h PBG ($\bar{x}\pm s$,mmol/L)
DR组	32	18/14	56.4±12.1	23.4±6.1	9.5±6.1b	9.47±2.23	9.04±1.94	10.54±2.63
T2DM组	68	40/28	55.3±11.7	22.7±5.7	6.7±5.0	9.56±2.16	8.92±2.01	10.67±2.49
对照组	30	16/14	56.8±12.8	23.1±5.9	-	6.54±1.33	5.33±1.23	7.26±1.51
$\chi^2/F/t$		0.264	0.195	0.166	2.431	25.330	44.784	23.924
<i>P</i>		0.876	0.823	0.847	0.017	<0.001	<0.001	<0.001

注:对照组:健康志愿者。

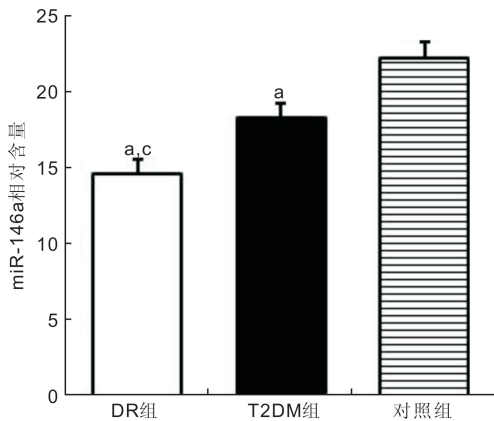


图1 三组患者血清 miR-146a 比较 ^a*P*<0.05 vs 对照组; ^c*P*<0.05 vs T2DM 组。

表2 三组血清 NF-κB 和 VEGF 比较

组别	例数	NF-κB (ng/mL)	VEGF (pg/mL)
DR组	32	68.12±20.09	184.63±53.21
T2DM组	68	33.88±13.14	133.09±23.51
对照组	30	15.27±5.33	80.02±11.23
<i>F</i>		116.487	83.773
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:对照组:健康志愿者。

清 miR-146a 显著降低,而 DR 患者又明显低于 T2DM 患者,这说明 miR-146a 同样可能参与了 DR 的发病。NF-κB 信号通路是重要的炎症反应通路,被证明在 DR 血管内皮细胞中表达增加^[9]。Konstantin 等学者发现,在肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和白细胞介素-1β (IL-1β) 等炎症因子刺激下,机体通过 NF-κB 信号通路上调 miR-146a 表达,而 miR-146a 通过负反馈作用于 TNF 受体相关因子-6 和 IL-1 受体相关激酶-1,减少下游 TNF-α、IL-1β、白细胞介素-6 (IL-6) 等炎症因子表达^[10]。本研究结果发现,DR 组和 T2DM 组患者血清 NF-κB 显著增加,DR 组又明显高于 T2DM 组,且 miR-146a 与 NF-κB 呈负相关。Habibi 等^[11]学者研究显示糖尿病模型大鼠 miR-146a 和 NF-κB 负反馈环中 miR-146a 表达的减少增加了 NF-κB 的表达,从而增强了细胞炎症和凋亡。我们的研究与之基本相符。

VEGF 被认为是新生血管形成的关键细胞因子,其表达异常是引起 DR 发病的中心环节^[12]。正常情况下眼部 VEGF 低表达,大量研究证实 VEGF 在 DR 患者中高表达,其表达异常则会促进血管内皮细胞增殖,毛细血管基底膜降解,血管通透性增加,引起血管内皮损伤^[13-14]。Zhang 等^[15]研究发现,过表达 miR-146a 可下调肝癌细胞 VEGF 表达,这为 miR-146a 抑制 VEGF 表达提供了证据,我们推

测在 DR 患者中可能也存在这种表达调控。本研究结果发现,DR 组和 T2DM 组患者血清 VEGF 显著增加,DR 组又明显高于 T2DM 组,且 miR-146a 与 VEGF 呈负相关。

综上所述,DR 患者血清 miR-146a 明显降低,NF-κB 和 VEGF 明显增加,miR-146a 有可能通过介导炎症反应和血管增生参与 DR 的发病。

参考文献

- 张凤俊,易敬林,李晶明,等. 糖尿病视网膜病变发病机制研究进展. 眼科新进展 2016;36(6):584-587
- Yousefzadeh N, Alipour MR, Soufi FG. Deregulation of NF-κB-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Physiol Biochem* 2015;71(1):51-58
- 王国凤,徐宁,杨涛. 外周血单个核细胞 miR-146a 在 2 型糖尿病周围神经病变发病机制中的作用. 中华内分泌代谢杂志 2016;32(7):552-555
- Bhatt K, Lanting LL, Jia Y. Anti-inflammatory role of MicroRNA-146a in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(8):2277-2288
- 刘玉华,高玲. 糖尿病视网膜病变治疗研究现状、问题与展望. 中华眼底病杂志 2016;32(2):206-210
- Kim SJ, Yoo WS, Choi M, et al. Increased O-GlcNAcylation of NF-κB enhances retinal ganglion cell death in streptozotocin-induced diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 2016;41(2):249-257
- 肖艳新,岳东,张艳,等. 糖尿病视网膜病变患者血清中血管内皮生长因子和色素上皮衍生因子水平的变化. 中华眼底病杂志 2013;29(1):80-82
- 杨健,郭真杰,张正,等. 糖尿病性视网膜病变行 Lucentis 眼内注射联合玻璃体切割手术对视力的影响分析. 中国实验诊断学 2015;19(1):92-94
- 章莹,熊燕,张美英,等. 蛋白激酶 C、内皮素与核因子-κB 在糖尿病早期视网膜中的实验观察. 中国糖尿病杂志 2016;24(9):831-835
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ. NF-κB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(33):12481-12486
- Habibi F, Ghadir SF, Ghiasi R, et al. Alteration in inflammation-related miR-146a expression in NF-κB signaling pathway in diabetic rat hippocampus. *Adv Pharm Bull* 2016;6(1):99-103
- Matsuyama K, Ogata N, Matsuoka M, et al. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor before and after intravitreal injection of bevacizumab. *Br J Ophthalmol* 2010;94(9):1215-1218
- Kolevageorgieva DN, Sivkova NP, Terzieva D. Serum inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy. *Folia Med (Plovdiv)* 2011;53(2):44-50
- 谢秀雯,周建强,崔红平. VEGF 在糖尿病视网膜病变发病机制中作用的研究新进展. 国际眼科杂志 2011;11(2):282-285
- Zhang Z, Zhang Y, Sun XX, et al. microRNA-146a inhibits cancer metastasis by downregulating VEGF through dual pathways in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 2015;14:5