

引用本文:李杰玉,林玉玲,李曾一,等.长链非编码RNA DLX6-AS1与微小RNA-346在糖尿病足72例血清中的表达及其临床意义[J].安徽医药,2022,26(9):1858-1861.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.09.038.



◇临床医学◇

长链非编码RNA DLX6-AS1与微小RNA-346在糖尿病足72例血清中的表达及其临床意义

李杰玉,林玉玲,李曾一,刘琳,金文波

作者单位:南阳市中心医院内分泌科,河南 南阳 473000

摘要: **目的** 探讨长链非编码RNA(lncRNA)DLX6-AS1与微小RNA(miR)-346在糖尿病足病人血清中的表达及其临床意义。**方法** 收集2017年5月至2018年12月南阳市中心医院收治的72例糖尿病足病人为糖尿病足组,选取同期该院收治的60例2型糖尿病无糖尿病足病人为糖尿病组,取同期于该院进行健康体检的健康志愿者55例作为对照组。实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组受检者血清中DLX6-AS1、miR-346的表达水平;采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、成纤维细胞生长因子2(FGF2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;采用电化学发光法检测血清中白细胞介素-6(IL-6)水平;采用Pearson相关性分析检验糖尿病足病人血清DLX6-AS1、miR-346的表达水平与炎症因子的相关性;采用logistic回归分析研究影响糖尿病足发生的相关因素。**结果** 糖尿病组、糖尿病足组病人VCAM-1、FGF2、TNF- α 、IL-6水平高于对照组($P < 0.05$),糖尿病组与糖尿病足组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组DLX6-AS1的表达量是 1.01 ± 0.13 ,低于糖尿病组、糖尿病足组DLX6-AS1的表达量 2.16 ± 0.25 、 3.20 ± 1.03 ($P < 0.05$);对照组miR-346的表达水平是 1.00 ± 0.16 ,高于糖尿病组、糖尿病足组miR-346的表达水平 0.73 ± 0.11 、 0.41 ± 0.08 ($P < 0.05$),糖尿病组与糖尿病足组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);随着糖尿病足病人Wagner分级增加DLX6-AS1的表达水平显著升高($P < 0.05$),miR-346的表达水平显著降低($P < 0.05$);DLX6-AS1的表达与FGF2、TNF- α 、IL-6呈正相关($P < 0.05$),而miR-346与之呈负相关($P < 0.05$);DLX6-AS1与miR-346表达量是影响糖尿病足发生的危险因素($P < 0.05$)。**结论** 糖尿病足病人血清中DLX6-AS1表达量升高,而miR-346表达量降低,二者可能参与糖尿病足发生及发展过程,并可能作为临床诊断的分子标志物。

关键词: 糖尿病足; 糖尿病,2型; 长链非编码RNA DLX6-AS1; 微小RNA-346; 炎症因子

Expression and clinical significance of the long noncoding RNA DLX6-AS1 and microR-346 in the serum of 72 cases of diabetic foot

LI Jieyu, LIN Yuling, LI Zengyi, LIU Lin, JIN Wenbo

Author Affiliation: Department of Endocrinology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473000, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of the long noncoding RNA DLX6-AS1 and microR-346 in the serum of diabetic foot patients. **Methods** Seventy-two patients with diabetic foot admitted to Nanyang Central Hospital from May 2017 to December 2018 were collected as the diabetic foot group, 60 patients with type 2 diabetes without diabetic foot who were admitted to the hospital during the same period were selected as the diabetic group, and those admitted to the hospital during the same period were selected as the diabetic foot group. Fifty-five healthy volunteers who underwent physical examination were used as the control group. The expression levels of DLX6-AS1 and miR-346 in the serum of the subjects in each group were detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), fibroblast growth factor 2 (FGF2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Electrochemiluminescence was used to detect the level of interleukin-6 (IL-6) in serum. Pearson correlation analysis was used to test the correlation between the expression levels of DLX6-AS1 and miR-346 and inflammatory factors in diabetic foot patients. Logistic regression analysis was used to study the related factors affecting the occurrence of diabetic foot. **Results** The levels of VCAM-1, FGF2, TNF- α , and IL-6 in the diabetes group and diabetic foot group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), and the difference between the diabetes group and the diabetic foot group was statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of DLX6-AS1 in the control group was 1.01 ± 0.13 , which was lower than that in the diabetes group and diabetic foot group by 2.16 ± 0.25 and 3.20 ± 1.03 , respectively ($P < 0.05$). The expression level of miR-346 in the control group was 1.00 ± 0.16 , which was higher than that in the diabetes group and the diabetic foot group by 0.73 ± 0.11 and 0.41 ± 0.08 , respectively ($P < 0.05$), and the difference was significant between the diabetes group and the diabetic foot group ($P < 0.05$). With the increase in Wagner grade of diabetic foot patients, the expression level of DLX6-AS1 was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression level of miR-346 was significantly decreased

($P < 0.05$). The expression of DLX6-AS1 was positively correlated with FGF2, TNF- α , and IL-6 ($P < 0.05$), while miR-346 was negatively correlated with it ($P < 0.05$). The expression levels of DLX6-AS1 and miR-346 were related to diabetes risk factors for foot development ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of DLX6-AS1 in the serum of diabetic foot patients was increased, while the expression of miR-346 was decreased. Both may be involved in the occurrence and development of diabetic foot and may be used as molecular markers for clinical diagnosis.

Key words: Diabetic foot; Diabetes mellitus, type 2; Long noncoding RNA DLX6-AS1; MicroR-346; Inflammatory factors

糖尿病足溃疡是糖尿病主要并发症之一,神经与血管病变、感染等可促进糖尿病足溃疡的发生,其中炎症反应与细菌感染是造成糖尿病足溃疡病人截肢甚至死亡的重要原因^[1-4]。但糖尿病足溃疡细菌感染及其与血管病变的相关性尚未完全阐明。长链非编码RNA(lncRNA)DLX6-AS1在糖尿病肾病中呈高表达,而微小RNA(miR)-346表达下调,DLX6-AS1可能靶向调控miR-346表达从而参与糖尿病肾病发生及发展过程^[5]。研究表明miR-346在高糖诱导的足细胞分化中发挥重要调控作用^[6]。但DLX6-AS1、miR-346在糖尿病足溃疡中的表达水平尚未可知。本研究通过检测糖尿病足溃疡病人血清中DLX6-AS1、miR-346的表达水平,分析其与炎症因子水平的相关性,初步探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2017年5月至2018年12月南阳市中心医院收治的72例糖尿病足病人为糖尿病足组,所有病人均符合糖尿病足的诊断标准^[7]。糖尿病足组病人年龄(65 ± 6)岁,范围为50~70岁;病程(13.25 ± 7.65)年;男40例,女32例。根据Wagner分级标准^[8]将糖尿病足病人分为1级14例、2级14例、3级14例、4级16例、5级14例。选取同期该院收治的60例2型糖尿病病人为糖尿病组,所有病人均符合2型糖尿病诊断标准^[9],且未达到糖尿病足的诊断标准,其中男35例,女25例;年龄(66 ± 6)岁,范围为52~71岁;病程(14.13 ± 6.12)年。选取同期于该院进行健康体检的健康志愿者55例作为对照组,其中男28例,女27例;年龄(67 ± 7)岁,范围为51~76岁。各组研究对象年龄、性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。纳入标准:糖尿病足病人为第1次发生足部溃疡;糖尿病组与对照组受检者均无足部溃疡;无心功能障碍者;无肝、肾功能不全者。排除标准:外周血管病变病人;合并其他内分泌系统疾病者;合并恶性肿瘤病人。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,所有病人知情且签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 采集血液样本 所有研究对象均于入组次日清晨抽取空腹静脉血5 mL,4℃条件下经3 000 r/

min离心6 min,吸取血清,置于-20℃冰箱内保存待测。

1.2.2 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR) 检测细胞中DLX6-AS1、miR-346的表达水平 取冻存血清样本,采用Trizol法提取血清中总RNA。参照逆转录试剂盒将RNA逆转录为互补DNA(cDNA)。以cDNA为模板进行qRT-PCR反应,反应条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共循环40次。DLX6-AS1以GAPDH为内参,miR-346以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算DLX6-AS1、miR-346相对表达量。Trizol、逆转录与荧光定量PCR试剂盒均购自美国Thermo Fisher公司。

1.2.3 酶联免疫吸附测定(ELISA) 检测炎症因子水平 采用ELISA检测血清炎症因子血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、成纤维细胞生长因子2(FGF2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,严格按照试剂盒说明书进行操作,Multiskan MK3酶标仪购自美国Thermo Fisher公司。采用电化学发光法检测血清中白细胞介素-6(IL-6)水平,Cobas e601电化学发光免疫分析仪及检测试剂盒购自美国Roche公司,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 观察指标 检测所有研究对象收缩压、舒张压、空腹血糖、糖化血红蛋白(HbA1c),检测仪器购自美国Bio-Rad公司。

1.3 统计学方法 采用统计学软件SPSS 21.0进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料采用 χ^2 检验;采用Pearson相关性分析检验变量间的相关性;采用logistic回归分析研究影响糖尿病足发生的相关因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组研究对象一般资料比较 三组受检者收缩压、舒张压、HbA1c比较差异无统计学意义($P > 0.05$),糖尿病组、糖尿病足组病人空腹血糖、VCAM-1、FGF2、TNF- α 、IL-6水平高于对照组($P < 0.05$),糖尿病组与糖尿病足组VCAM-1、FGF2、TNF- α 、IL-6水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 健康者55例与糖尿病132例一般资料比较 $\bar{x} \pm s$

临床指标	对照组(n=55)	糖尿病组(n=60)	糖尿病足组(n=72)	F值	P值
收缩压/mm Hg	124.35±10.32	126.57±16.57	127.59±18.46	0.66	0.516
舒张压/mm Hg	79.51±14.65	80.13±15.24	81.11±12.57	0.21	0.811
HbA1c/%	5.23±0.36	5.42±1.58	5.44±1.23	0.56	0.575
空腹血糖/(mmol/L)	4.85±0.96	8.21±2.54 ^①	8.42±2.56 ^①	48.29	<0.001
VCAM-1/(μg/L)	136.58±56.32	653.24±175.45 ^①	865.42±132.26 ^{①②}	484.29	<0.001
FGF2/(ng/L)	8.56±1.36	12.65±3.71 ^①	17.68±5.13 ^{①②}	87.39	<0.001
TNF-α/(ng/L)	6.57±1.35	16.15±4.16 ^①	21.74±6.52 ^{①②}	160.42	<0.001
IL-6/(ng/L)	3.25±1.03	4.59±1.13 ^①	15.68±3.21 ^{①②}	654.14	<0.001

注: HbA1c为糖化血红蛋白, VCAM-1为血管细胞黏附分子-1, FGF2为成纤维细胞生长因子2, TNF-α为肿瘤坏死因子-α, IL-6为白细胞介素-6。

①与对照组相比, P<0.05。②与糖尿病组相比, P<0.05。

2.2 各组研究对象血清中 lncRNA DLX6-AS1 与 miR-346 的表达比较 与对照组相比, 糖尿病组与糖尿病足组病人血清中 DLX6-AS1 的表达水平显著升高 (P<0.05), miR-346 的表达水平显著降低 (P<0.05), 糖尿病组与糖尿病足组血清中 DLX6-AS1、miR-346 的表达水平相比差异有统计学意义 (P<0.05), 见表2。

表2 健康者55例与糖尿病132例血清中 DLX6-AS1 与 miR-346 的表达比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	DLX6-AS1	miR-346
对照组	55	1.01±0.13	1.00±0.16
糖尿病组	60	2.16±0.25 ^①	0.73±0.11 ^①
糖尿病足组	72	3.20±1.03 ^{①②}	0.41±0.08 ^{①②}
F值		172.54	397.60
P值		<0.001	<0.001

注: ①与对照组相比, P<0.05。②与糖尿病组相比, P<0.05。

2.3 DLX6-AS1 与 miR-346 在不同 Wagner 分级糖尿病足组病人血清中的表达比较 与 Wagner 分级1级糖尿病足病人相比, 2~5级病人血清 DLX6-AS1 的表达水平显著升高 (P<0.05), miR-346 的表达水平显著降低 (P<0.05), 见表3。

2.4 糖尿病足组病人血清中 DLX6-AS1、miR-346 的表达与炎症因子水平的相关性分析 Pearson 相

表3 DLX6-AS1 与 miR-346 在不同 Wagner 分级糖尿病足 72 例血清中的表达比较 $\bar{x} \pm s$

Wagner 分级	例数	DLX6-AS1	miR-346
1级	14	1.23±0.18	0.98±0.13
2级	14	2.11±0.15	0.65±0.10
3级	14	2.58±0.16	0.63±0.11
4级	16	3.01±0.16	0.53±0.13
5级	14	3.31±0.37 ^①	0.35±0.09 ^①
F值		198.54	57.59
P值		<0.001	<0.001

注: ①与1级相比, P<0.05。

关性分析显示糖尿病足病人血清中 DLX6-AS1 的表达与 VCAM-1、FGF2、TNF-α、IL-6 呈正相关 (P<0.05), miR-346 与 FGF2、TNF-α、IL-6 呈负相关 (P<0.05), 见表4。

表4 糖尿病足72例血清中 DLX6-AS1、miR-346 的表达与炎症因子水平的 Pearson 相关性分析结果

临床指标	DLX6-AS1		miR-346	
	r值	P值	r值	P值
VCAM-1	0.44	<0.001	-0.09	0.471
FGF2	0.34	0.011	-0.50	<0.001
TNF-α	0.30	0.031	-0.54	<0.001
IL-6	0.57	<0.001	-0.36	0.008

注: VCAM-1 为血管细胞黏附分子-1, FGF2 为成纤维细胞生长因子2, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, IL-6 为白细胞介素-6。

2.5 影响糖尿病足发生的多因素分析 采用 logistic 回归分析对影响糖尿病足发生的相关因素进行分析, 结果显示血清中 DLX6-AS1 表达量升高与 miR-346 表达量是影响糖尿病足发生的独立危险因素 (P<0.05), 见表5。

表5 影响糖尿病足发生的多因素 logistic 回归分析结果

影响因素	β值	标准误	Wald χ ² 值	P值	OR值	95%CI
VCAM-1	0.02	0.02	1.03	0.412	1.02	(1.00, 1.03)
FGF2	0.02	0.04	0.24	0.502	1.02	(0.72, 1.45)
TNF-α	0.30	0.16	3.61	0.321	1.35	(1.06, 1.72)
IL-6	0.16	0.16	0.99	0.425	1.17	(1.03, 1.32)
DLX6-AS1	0.64	0.21	8.92	0.001	1.89	(1.42, 2.51)
miR-346	0.68	0.27	6.33	0.012	1.97	(1.43, 2.71)

注: VCAM-1 为血管细胞黏附分子-1, FGF2 为成纤维细胞生长因子2, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, IL-6 为白细胞介素-6。

3 讨论

lncRNA 可通过调控下游 miRNA 表达从而参与多种炎症反应疾病发生过程, 研究表明 lncRNA 在糖尿病足病人中异常表达并可能参与该疾病发生

及发展过程^[10-11]。但 lncRNA 在糖尿病足发生过程中的调控机制尚未阐明,因而本研究积极寻找新型 lncRNA,初步分析其在糖尿病足病人中的表达,为深入了解糖尿病足的病理生理机制提供新方向。

DLX6-AS1 在大肠癌、膀胱癌、宫颈癌等肿瘤中呈高表达并可促进肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭^[12-14]。但 DLX6-AS1 在糖尿病足中的表达尚未可知。本研究结果显示糖尿病足病人血清中 DLX6-AS1 的表达水平显著升高,随着 Wagner 分级的增加 DLX6-AS1 的表达水平明显升高,提示 DLX6-AS1 表达量升高可能促进糖尿病足发生及发展。研究表明炎症因子 VCAM-1、FGF2、TNF- α 、IL-6 在糖尿病足病人中的水平升高,并可促进其发展进程^[15-16]。与上述研究结果相似,本研究结果显示糖尿病足病人血清中炎症因子 VCAM-1、FGF2、TNF- α 、IL-6 水平明显高于糖尿病组病人,提示炎症因子 VCAM-1、FGF2、TNF- α 、IL-6 水平升高可加重糖尿病足的严重程度。本研究进一步分析显示 DLX6-AS1 表达量与炎症因子 VCAM-1、FGF2、TNF- α 、IL-6 呈正相关,说明随着 DLX6-AS1 表达量的升高可明显促进糖尿病足病人体内炎症反应的发生。提示 DLX6-AS1 可能在糖尿病足发生过程中发挥重要调控作用。

miR-346 在脓毒症病人中表达下调,并可参与脓毒症发生及发展过程^[17-18]。有研究表明 miR-346 还可调节机体免疫反应^[19]。本研究结果显示 miR-346 在糖尿病足病人血清中的表达下调,随着 Wagner 分级的增加 miR-346 的表达量明显降低,其低表达量与炎症因子 FGF2、TNF- α 、IL-6 呈负相关,提示 miR-346 表达量降低可能促进糖尿病足的发生及发展。同时本研究采用 logistic 回归分析对影响糖尿病足发生的相关因素进行分析,结果显示血清中 DLX6-AS1 与 miR-346 表达量是影响糖尿病足发生的独立危险因素,提示血清中 DLX6-AS1 表达水平升高与 miR-346 表达水平降低可增加糖尿病足的发生风险。

综上所述,糖尿病足病人血清中 DLX6-AS1 表达升高,miR-346 表达降低,二者表达量变化与糖尿病足进展密切相关,还与糖尿病足炎症反应程度有关,可能作为临床诊断糖尿病足的有效标志物,还可为揭示糖尿病足发病机制提供新思路。但本研究样本量较小,后续还须扩大样本量进一步证实。

参考文献

[1] 朱柄铭,温旺荣. 糖尿病及其并发症中 microRNAs 的作用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(1): 68-73.
[2] FORMOSA C, GATT A, CHOCKALINGAM N. The importance of clinical biomechanical assessment of foot deformity and joint

mobility in people living with type-2 diabetes within a primary care setting[J]. Prim Care Diabetes, 2013, 7(1): 45-50.
[3] GOMES A, TEIXEIRA C, FERRAZ R, et al. Wound-healing peptides for treatment of chronic diabetic foot ulcers and other infected skin injuries[J]. Molecules, 2017, 22(10): 1-13.
[4] WANG T, LI X, FAN L, et al. Negative pressure wound therapy promoted wound healing by suppressing inflammation via down-regulating MAPK-JNK signaling pathway in diabetic foot patients [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 150: 81-89.
[5] 胡奕芳. 糖尿病肾病中链非编码 RNA DLX6-AS1 的表达及临床意义的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2018: 1-68.
[6] 焦文举. MicroRNA-346 在高糖诱导的足细胞转分化中的作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2014: 1-70.
[7] 国际血管联盟中国分会糖尿病足专业委员会. 糖尿病足诊治指南[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22(9): 705-708.
[8] WAGNER FW. The dysvascular foot: a system for diagnosis and treatment[J]. Foot Ankle, 1981, 2(2): 64-122.
[9] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2010 年版)[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2012, 19(4): 1-15.
[10] 李晓燕, 张艳, 李辉, 等. 富含血小板血浆和脐带干细胞联用对糖尿病足模型 lncRNA 表达谱的影响[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(22): 4224-4228.
[11] LI B, LUAN S, CHEN J, et al. The MSC-derived exosomal lncRNA H19 promotes wound healing in diabetic foot ulcers by up-regulating PTEN via microRNA-152-3p[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19(1): 814-826.
[12] ZHANG JJ, XU WR, CHEN B, et al. The up-regulated lncRNA DLX6-AS1 in colorectal cancer promotes cell proliferation, invasion and migration via modulating PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(19): 8321-8331.
[13] FANG C, XU L, HE W, et al. Long noncoding RNA DLX6-AS1 promotes cell growth and invasiveness in bladder cancer via modulating the miR-223-HSP90B1 axis [J]. Cell Cycle, 2019, 18(23): 3288-3299.
[14] TIAN Y, WANG YR, JIA SH. Knockdown of long noncoding RNA DLX6-AS1 inhibits cell proliferation and invasion of cervical cancer cells by downregulating FUS[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(17): 7307-7313.
[15] 张莹, 王伟灵, 杨沁彤, 等. 血清 VCAM-1、FGF2 等炎症因子与难愈性糖尿病足的相关性研究[J]. 检验医学, 2014, 29(5): 472-476.
[16] 徐松明, 许晓华, 孙云鹰, 等. 硫辛酸对早期糖尿病足患者氧化应激与炎症反应的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(11): 909-911, 915.
[17] YANG QH, CAO K, JIN GG, et al. Hsa-miR-346 plays a role in the development of sepsis by downregulating SMAD3 expression and is negatively regulated by lncRNA MALAT1 [J]. Mol Cell Probes, 2019, 47: 101444. DOI: org/10.1016/j.mcp.2019.101444.
[18] 吴哲乾, 戴李华. 血液净化联合乌司他丁治疗脓毒症急性肺损伤的疗效和对基质金属蛋白酶水平的影响[J]. 安徽医药, 2019, 23(12): 2382-2385.
[19] CHEN J, TIAN J, TANG XY, et al. MiR-346 regulates CD4⁺CXCR5⁺ T cells in the pathogenesis of Graves' disease [J]. Endocrine, 2015, 49(3): 752-760.

(收稿日期: 2020-02-07, 修回日期: 2020-03-08)