

# 血清 lncRNA DLX6-AS1 和 miR-335-3p 与糖尿病视网膜病变患者微血管损伤的关系

陆川, 孙元睿, 杨丽红, 杨明

引用: 陆川, 孙元睿, 杨丽红, 等. 血清 lncRNA DLX6-AS1 和 miR-335-3p 与糖尿病视网膜病变患者微血管损伤的关系. 国际眼科杂志 2022;22(12):1965-1970

作者单位: (250031) 中国山东省济南市, 中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院眼科

作者简介: 陆川, 本科, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 陆川. luchuan960@163.com

收稿日期: 2022-03-06 修回日期: 2022-11-09

## 摘要

**目的:** 探讨血清长链非编码 RNA (lncRNA) 无远端同源框 6 反义 1 (DLX6-AS1)、微小 RNA-335-3p (miR-335-3p) 与糖尿病视网膜病变 (DR) 患者微血管损伤的关系。

**方法:** 前瞻性研究。选取 2019-02/2021-12 我院 2 型糖尿病 (T2DM) 患者 160 例, 根据 DR 分期标准, 分为无 DR (NDR) 组 69 例、非增殖型 DR (NPDR) 组 48 例、增殖型 DR (PDR) 组 43 例。比较三组患者血清 lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p、血管内皮生长因子 (VEGF) 以及内皮细胞 (ECs)、内皮祖细胞 (EPCs) 水平。Pearson 法进行各指标相关性分析。Logistic 回归模型分析影响 T2DM 患者发生 DR 的因素。

**结果:** NDR 组、NPDR 组、PDR 组患者血清 miR-335-3p 表达水平及 EPCs 比例逐次减少, lncRNA DLX6-AS1、VEGF 表达水平及 ECs 比例逐次增加 (均  $P < 0.05$ )。DR 患者血清 lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 负相关 ( $r = -0.668$ ,  $P < 0.01$ )。NPDR 组、PDR 组血清 lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 表达水平均呈负相关性 ( $r = -0.647$ 、 $-0.675$ , 均  $P < 0.01$ ), lncRNA DLX6-AS1 与 VEGF 均呈正相关 ( $r = 0.619$ 、 $0.630$ , 均  $P < 0.01$ ), VEGF 与 miR-335-3p 均呈负相关 ( $r = -0.625$ 、 $-0.649$ , 均  $P < 0.01$ ); PDR 组 lncRNA DLX6-AS1 与 ECs 呈正相关, 与 EPCs 呈负相关 ( $r = 0.528$ 、 $-0.594$ , 均  $P < 0.01$ ), miR-335-3p 与 ECs 呈负相关, 与 EPCs 均呈正相关 ( $r = -0.554$ 、 $0.586$ , 均  $P < 0.01$ )。多因素回归分析显示, lncRNA DLX6-AS1 ( $OR = 2.484$ , 95%  $CI$ : 1.366~4.516)、miR-335-3p ( $OR = 2.171$ , 95%  $CI$ : 1.218~3.871)、VEGF ( $OR = 1.603$ , 95%  $CI$ : 1.115~2.304) 是 T2DM 患者发生 DR 的危险因素 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** DR 患者血清中 lncRNA DLX6-AS1 表达上调, miR-335-3p 表达下调, lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 呈负相关, 二者异常表达均与 DR 患者微血管损伤有关。

**关键词:** 糖尿病视网膜病变; 微血管损伤; 长链非编码 RNA 无远端同源框 6 反义 1 (lncRNA DLX6-AS1); 微小 RNA-335-3p (miR-335-3p)

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.12.06

## Relationship between serum lncRNA DLX6-AS1 and miR-335-3p and microvascular damage in patients with diabetic retinopathy

Chuan Lu, Yuan - Rui Sun, Li - Hong Yang, Ming Yang

Department of Ophthalmology, the 960th Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Jinan 250031, Shandong Province, China

**Correspondence to:** Chuan Lu. Department of Ophthalmology, the 960th Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Jinan 250031, Shandong Province, China. luchuan960@163.com

Received: 2022-03-06 Accepted: 2022-11-09

## Abstract

• **AIM:** To investigate the relationship between serum long non-coding RNA (lncRNA) without distal homeobox 6 antisense 1 (DLX6-AS1) and microRNA (miR)-335-3p and microvascular damage in patients with diabetic retinopathy (DR).

• **METHODS:** A total of 160 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) in our hospital from February 2019 to December 2021 were prospectively selected and divided into non-DR group (NDR,  $n = 69$ ), non-proliferative DR group (NPDR,  $n = 48$ ) and proliferative DR group (PDR,  $n = 43$ ) according to DR staging criteria. The serum levels of lncRNA DLX6-AS1, miR-335-3p, vascular endothelial growth factor (VEGF), endothelial cells (ECs), and endothelial progenitor cells (EPCs) were compared among the three groups. Pearson method was used for correlation analysis. Logistic regression model was used to analyze the influencing factors of DR in patients with T2DM.

• **RESULTS:** The expression level of serum miR-335-3p and the proportion of EPCs in NDR, NPDR and PDR groups were gradually decreased, while the expression levels of DLX6-AS1 and VEGF and the proportion of ECs were gradually increased (all  $P < 0.05$ ). Serum lncRNA DLX6-AS1 was negatively correlated with miR-335-3p in patients with DR ( $r = -0.668$ ,  $P < 0.01$ ). The expression levels of serum lncRNA DLX6-AS1 and miR-335-3p in NPDR and PDR groups were negatively correlated ( $r = -0.647$ ,  $-0.675$ , all  $P < 0.01$ ), lncRNA DLX6-AS1 was positively correlated with VEGF ( $r = 0.619$ ,  $0.630$ , all  $P < 0.01$ ), VEGF and miR-335-3p were negatively correlated ( $r = -0.625$ ,  $-0.649$ , all  $P < 0.01$ ); PDR group lncRNA DLX6-AS1 was positively correlated with ECs, and negatively correlated with EPCs ( $r = 0.528$ ,  $-0.594$ , all  $P < 0.01$ ), miR-335-3p was negatively correlated with ECs, and positively correlated with EPCs ( $r = -0.554$ ,  $0.586$ , all  $P < 0.01$ ). Logistic regression analysis showed that lncRNA DLX6-AS1 ( $OR = 2.484$ , 95%  $CI$ : 1.366~4.516), miR-335-3p ( $OR = 2.171$ , 95%  $CI$ : 1.218~3.871), VEGF ( $OR = 1.603$ , 95%  $CI$ : 1.115~2.304) were risk factors for DR in patients with T2DM (all  $P < 0.05$ ).

0.01), and VEGF was negatively correlated with miR-335-3p ( $r = -0.625, -0.649, \text{all } P < 0.01$ ). In the PDR group, lncRNA DLX6-AS1 was positively correlated with ECs, while it was negatively correlated with EPCs ( $r = 0.528, -0.594, \text{all } P < 0.01$ ). The miR-335-3p was negatively correlated with ECs and it was positively correlated with EPCs ( $r = -0.554, 0.586, \text{all } P < 0.01$ ). Multivariate regression analysis showed that lncRNA DLX6-AS1 ( $OR = 2.484, 95\% CI: 1.366-4.516$ ), miR-335-3p ( $OR = 2.171, 95\% CI: 1.218-3.871$ ) and VEGF ( $OR = 1.603, 95\% CI: 1.115-2.304$ ) were risk factors for DR in T2DM patients (all  $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** lncRNA DLX6-AS1 is up-regulated and miR-335-3p is down-regulated in serum of DR patients. lncRNA DLX6-AS1 is negatively correlated with miR-335-3p. Abnormal expressions of both are related to microvascular damage in DR patients.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; microvascular damage; long non-coding RNA without distal homeobox 6 antisense 1 (lncRNA DLX6-AS1); microRNA-335-3p (miR-335-3p)

**Citation:** Lu C, Sun YR, Yang LH, *et al.* Relationship between serum lncRNA DLX6-AS1 and miR-335-3p and microvascular damage in patients with diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(12):1965-1970

## 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是一种进行性、特异性糖尿病并发症,由高糖引起的不可逆性视网膜损伤,特点是发生微动脉瘤、毛细血管闭塞、纤维化和新生血管增生等<sup>[1]</sup>。目前,全球4.68亿糖尿病患者中约有9000万人患有不同程度DR,预计到2030年将约有1.91亿人被诊断出患有DR<sup>[2]</sup>。早期诊断和预防DR发展对于避免或延迟视力丧失和降低治疗相关成本尤为必要。据报道,上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程是DR疾病进展中新生血管生成的影响因素之一<sup>[3]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是EMT的重要调节因子,可以特异性参与新生血管增殖,还可以促进内皮细胞增殖、迁移,与DR发生、发展密切相关<sup>[4]</sup>。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)可通过转录后等方式调控基因表达,影响内皮细胞氧化应激等,参与糖尿病微血管病变进展<sup>[5]</sup>。无远端同源框6反义1(non-distal homeobox 6 antisense 1, DLX6-AS1)属于发育调控的lncRNA,其在肾细胞癌、胰腺癌等恶性肿瘤中高表达,并能够增强肿瘤细胞活性,参与EMT途径,发挥促癌基因功能<sup>[6]</sup>。微小RNA(microRNA, miR)属于高度保守的短链非编码RNA,与脂质代谢异常相关,miRNA的异常表达参与DR的血管生成、氧化应激及炎症反应过程<sup>[7]</sup>。近期, Xia等<sup>[8]</sup>的研究显示,miR-335-3p在DR患者血清和高糖处理的APRE-19细胞中显著下调,miR-335-3p可以靶向抑制VEGF表达。然而,血清lncRNA DLX6-AS1在DR中表达变化以及lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p与DR患者微血管损

伤的关系尚未研究。本研究通过检测DR患者血清lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p表达水平,分析二者与DR患者微血管损伤的关系,为深入解析DR发病机制提供依据。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 前瞻性研究。选取2019-02/2021-12我院2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者160例。纳入标准:(1)符合T2DM分型及诊断标准<sup>[9]</sup>;(2)无全身系统性疾病;(3)签署知情同意书。排除标准:(1)合并精神障碍;(2)T1DM、其他特殊类型DM;(3)白内障、青光眼、晶状体疾病、屈光改变等眼部疾病;(4)糖尿病酮症酸中毒、糖尿病高渗性昏迷急性并发症;(5)合并心、肝、肾等严重功能障碍;(6)合并感染性疾病。本研究经医院伦理委员会批准。所有患者均对研究知情同意。

## 1.2 方法

**1.2.1 收集基本临床资料** 记录入组患者的性别、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、年龄、体质量指数(body mass index, BMI)、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、糖尿病病程、甘油三酯(triglyceride, TG)、收缩压(systolic blood pressure, SBP)、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin A1c, HbA1c)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、吸烟史、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)、总胆红素(total bilirubin, Tb)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)等基本临床资料。

**1.2.2 采集标本** 所有患者均在隔夜空腹状态下于次日清晨入院抽取肘静脉血,离心后取上层血清,分为两份:一份用于后续检测血清lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p相对表达水平;另一份用于测定内皮细胞(endothelial cells, ECs)、内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)以及VEGF,均暂存于-80℃冰箱。

## 1.2.3 qRT-PCR检测血清lncRNA DLX6-AS1和miR-335-3p表达水平

**1.2.3.1 检测lncRNA DLX6-AS1表达水平** 使用TRIzol试剂(货号:E01010A,广州复能基因有限公司)提取总RNA, Nano-3000超微量核酸蛋白分析仪(上海嘉鹏科技有限公司)检测RNA浓度,使用逆转录试剂盒(货号:6215A, Takara公司)得到cDNA, CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, 美国)检测系统,采用定量PCR试剂盒(货号:RR420L, Takara公司)进行信号采集。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算血清lncRNA DLX6-AS1表达水平。

**1.2.3.2 检测miR-335-3p表达水平** 从-80℃冰箱取出冻存样品,采用miRNA提取试剂盒(货号:9753A, Takara公司)得到miRNA,取2μg RNA按照广州复能基因有限公司的miRNA专用逆转录试剂盒(货号:QP113),以及定量试剂盒(货号:QP115)说明书操作,同样在CFX96定量仪器上进行反应。以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-335-3p表达水平。各引物序列见表1。

**1.2.4 检测VEGF和ECs及EPCs水平** 采用百奥莱博公司的ELISA试剂盒检测VEGF表达水平(货号:ZN2493),按照说明书操作。采用贝克曼库尔特公司的流

表 1 引物序列

名称	序列
lncRNA DLX6-AS1	F:5'-AGTTTCTCTCTAGATTGCCCTT-3' R:5'-ATTGACATGTTAGTGCCTT-3'
GAPDH	F:5'-GGGAAATTCAACGGCACAGT-3' R:5'-AGATGCTGATGGGCTTCCC-3'
miR-335-3p	F:5'-TTTTTCATTATGCTC-3' R:5'-CTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	F:5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3' R:5'-ACGCTTCACGAATTTTTCGCT-3'

式细胞仪(型号: CytoFLEX LX)检测外周血中 ECs、EPCs 比例。

统计学分析:采用 SPSS25.0 软件分析数据。计数资料以  $n$  表示,行  $\chi^2$  检验。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较行单因素方差分析,组内两两比较行 LSD- $t$  检验。以 Pearson 法分析各组患者血清各指标的相关性。采用 Logistic 回归分析 T2DM 患者发生 DR 的影响因素。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 三组患者临床资料比较** 本研究共纳入患者 160 例,其中男 68 例、女 92 例,年龄 42~72(平均  $59.39 \pm 6.38$ ) 岁。所有患者均经眼底彩色照相及眼底镜检查,并按照 DR 临床分期标准<sup>[10]</sup>,分为无 DR(NDR)组 69 例、非增殖型 DR(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)组 48 例、增殖型 DR(proliferative diabetic retinopathy, PDR)组 43 例。PDR 组与 NPDR 组年龄、糖尿病病程、SBP、DBP、FBG 以及 HbA1c 均高于 NDR 组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),而性别、LDL、TC、ALT、Tb、BMI、吸烟史、AST、HDL 比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。

**2.2 三组患者各指标比较** 三组患者血清 lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p、VEGF 表达水平、ECs 和 EPCs 比例比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。PDR 组和 NPDR 组血清 lncRNA DLX6-AS1、VEGF 表达水平及 ECs 比例显著高于 NDR 组,而 PDR 组高于 NPDR 组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );NDR 组、NPDR 组、PDR 组 EPCs 比例,miR-335-3p 表达水平逐次下降,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

**2.3 血清 lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 表达水平的相关性** 生物信息学预测结果显示,血清 lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 存在结合位点,见图 1。DR 患者血清 lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 表达水平存在负相关性( $r = -0.668, P < 0.01$ ),见图 2。

**2.4 血清 lncRNA DLX6-AS1 和 miR-335-3p 与各指标的相关性** 相关性分析结果显示, NPDR 组和 PDR 组患者血清 lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 表达水平呈负相关, lncRNA DLX6-AS1 与 VEGF 呈正相关, miR-335-3p 与 VEGF 呈负相关。PDR 组患者血清 lncRNA DLX6-AS1 与 ECs 呈正相关,与 EPCs 呈负相关; miR-335-3p 与 ECs 呈负相关,与 EPCs 呈正相关性(均  $P < 0.01$ ),见表 4~6。

**2.5 影响 T2DM 患者发生 DR 的危险因素分析** 以 T2DM 患者发生 DR 为因变量,进行单因素分析,并将结果中有统计学意义的糖尿病病程、SBP、DBP、FBG、HbA1c、

lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p、ECs、EPCs、VEGF 为自变量纳入多因素 Logistic 回归分析,采用向前逐步回归法,变量纳入标准为  $\alpha = 0.05$ ,剔除标准为  $\alpha = 0.1$ 。结果显示,血清 lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p、VEGF 是影响 T2DM 患者发生 DR 的危险因素,见表 7、8。

## 3 讨论

DR 为微血管系统的进行性改变导致视网膜缺血、新血管形成、视网膜通透性改变和黄斑水肿, NPDR 是 DR 的早期阶段, PDR 是 DR 的晚期阶段<sup>[11]</sup>。视网膜新生血管生成与 VEGF 调节作用相关,是 DR 进展的关键因素。VEGF 在视网膜的多种细胞(如内皮细胞)中表达, VEGF 的异常高表达是视网膜新生血管形成和血管渗漏的主要原因,并被认为是 DR 病变中抗血管生成的治疗靶点<sup>[4]</sup>。因此,明确与视网膜血管生成相关的调控因子,探究其病理机制,为有效地早期预防和治疗 DR 策略提供依据。

lncRNA 参与调控转录干扰、核内转运、X 染色体沉默等生理和病理过程,其异常表达与糖尿病、DR、脉络膜新生血管等有关<sup>[5]</sup>。血清 lncRNA DLX6-AS1 属于 DLX 基因家族,位于人类染色体 7q21.3 区域,目前血清 lncRNA DLX6-AS1 的相关报道集中于恶性肿瘤。研究显示,血清 lncRNA DLX6-AS1 在恶性肿瘤如肺癌、宫颈癌、胃癌中发挥促癌作用<sup>[12]</sup>。近期有报道称,血清 lncRNA DLX6-AS1 在糖尿病肾病患者及小鼠模型的肾组织中上调表达<sup>[13]</sup>。下调血清 lncRNA DLX6-AS1 后,高糖诱导的肾小球系膜细胞炎症反应和纤维化均受到抑制<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, PDR 组和 NPDR 组患者血清 lncRNA DLX6-AS1 表达水平显著高于 NDR 组,说明 lncRNA DLX6-AS1 表达失调可能参与 DR 进展。研究证实, lncRNA DLX6-AS1 在乳腺癌、膀胱癌、胃癌中的高表达能够增强 EMT,抑制化学敏感性,推动肿瘤进展<sup>[12]</sup>。Wang 等<sup>[15]</sup>有关膀胱癌的研究显示, lncRNA DLX6-AS1 通过靶向 miR-195-5p 和介导 VEGFA/Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路,促进血管生成,推动癌症进展,并认为是潜在膀胱癌治疗靶点。鉴于 VEGF 是 EMT 的调节因子之一,而 EMT 与肿瘤血管重构有关<sup>[3]</sup>。NDR 组、NPDR 组以及 PDR 组患者血清中 VEGF 逐次升高,且 NPDR 组、PDR 组患者血清 lncRNA DLX6-AS1 与 VEGF 表达水平呈正相关,提示 lncRNA DLX6-AS1 可能通过间接调控 VEGF 参与 EMT 进程,从而在 DR 发展过程中促进视网膜新生血管生成。

近年来一系列研究表明 miRNA 与血管发生、肿瘤细胞生物学活动、氧化应激、糖尿病病及其并发症有关<sup>[1]</sup>。本研究中 PDR 组、NPDR 组患者血清 miR-335-3p 表达水平显著低于 NDR 组,而 PDR 组又低于 NPDR 组,说明 miR-335-3p 的降低可能对 DR 发生以及严重程度有一定作用。另有研究显示,  $H_2O_2$  诱导人脐静脉内皮细胞衰老并上调 miR-335-5p 表达,而 miR-335-5p 的过表达会靶向抑制血清可溶性 klotho 蛋白,促进氧化应激,加速内皮细胞衰老<sup>[16]</sup>。另有研究显示, miR-335-3p 在骨肉瘤中表达下调, miR-335-3p 的过表达会对肿瘤细胞活性产生抑制,导致肿瘤微血管密切降低<sup>[17]</sup>。提示 miR-335-3p 可能与 DR 进展中的血管生成、氧化应激有关。近期, Xia 等<sup>[8]</sup>有关 DR 的研究显示, miR-335-3p 能够靶向抑制 VEGF 表达。血管生成与 EMT 密切相关,而 VEGF 参与 EMT 过程。本研究结果显示, NPDR 组和 PDR 组患者血

表2 三组患者临床资料比较

分组	例数	性别(例)		年龄	BMI	糖尿病病程	SBP	DBP	FBC	TC
		男	女	( $\bar{x}\pm s$ ,岁)	( $\bar{x}\pm s$ ,kg/m <sup>2</sup> )	( $\bar{x}\pm s$ ,a)	( $\bar{x}\pm s$ ,mmHg)	( $\bar{x}\pm s$ ,mmHg)	( $\bar{x}\pm s$ ,mg/dL)	( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)
NDR组	69	29	40	56.94±6.12	24.38±3.07	5.61±1.35	117.53±12.90	73.72±8.04	133.19±14.85	4.63±1.22
NPDR组	48	20	28	59.73±6.40 <sup>a</sup>	24.05±2.89	8.48±1.96 <sup>a</sup>	130.80±11.25 <sup>a</sup>	78.16±7.82 <sup>a</sup>	147.57±16.90 <sup>a</sup>	4.69±1.14
PDR组	43	19	24	62.95±6.76 <sup>a,c</sup>	24.72±2.5	11.63±2.24 <sup>a,c</sup>	136.49±12.82 <sup>a,c</sup>	81.50±9.16 <sup>a</sup>	160.79±21.08 <sup>a,c</sup>	4.75±1.35
<i>F</i> / <i>A</i> <sup>2</sup>		0.070		11.849	0.609	147.872	34.850	12.177	34.847	0.128
<i>P</i>		0.966		<0.01	0.545	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.880

分组	例数	吸烟史(例)		TG	LDL	HDL	HbA1c	Tb	ALT	AST
		是	否	( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	( $\bar{x}\pm s$ ,%)	( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	( $\bar{x}\pm s$ ,U/L)	( $\bar{x}\pm s$ ,U/L)
NDR组	69	18	51	4.80±1.19	3.05±0.56	1.17±0.28	7.89±1.55	12.63±3.10	22.94±4.33	21.67±3.54
NPDR组	48	12	36	4.72±1.26	2.96±0.43	1.15±0.21	8.72±2.07 <sup>a</sup>	11.80±2.94	23.02±4.05	22.88±3.29
PDR组	43	10	33	4.65±1.21	2.88±0.42	1.16±0.23	9.30±1.98 <sup>a,c</sup>	11.57±2.86	22.63±4.19	22.40±3.60
<i>F</i> / <i>A</i> <sup>2</sup>		0.113		0.207	1.649	0.093	8.224	2.001	0.109	1.778
<i>P</i>		0.945		0.813	0.196	0.911	<0.01	0.139	0.896	0.172

注:<sup>a</sup>*P*<0.05 vs NDR组;<sup>c</sup>*P*<0.05 vs NPDR组。

表3 三组患者各指标比较

分组	例数	lncRNA DLX6-AS1	miR-335-3p	VEGF(pg/mL)	ECs(%)	EPCs(%)
NDR组	69	1.06±0.15	1.12±0.18	129.31±17.44	0.073±0.021	0.069±0.013
NPDR组	48	1.43±0.26 <sup>a</sup>	0.79±0.14 <sup>a</sup>	162.58±19.17 <sup>a</sup>	0.128±0.023 <sup>a</sup>	0.053±0.008 <sup>a</sup>
PDR组	43	1.89±0.34 <sup>a,c</sup>	0.51±0.12 <sup>a,c</sup>	220.74±21.86 <sup>a,c</sup>	0.166±0.027 <sup>a,c</sup>	0.029±0.003 <sup>a,c</sup>
<i>F</i>		150.543	213.989	299.748	221.928	223.711
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup>*P*<0.05 vs NDR组;<sup>c</sup>*P*<0.05 vs NPDR组。

表4 NDR组患者血清 lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p 与 VEGF、ECs、EPCs 的相关性

指标	统计值	miR-335-3p	VEGF	ECs	EPCs
lncRNA DLX6-AS1	<i>r</i>	-0.205	0.193	0.118	-0.094
	<i>P</i>	0.118	0.205	0.169	0.176
miR-335-3p	<i>r</i>	-	-0.176	-0.153	0.186
	<i>P</i>	-	0.187	0.229	0.190

表5 NPDR组患者血清 lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p 与 VEGF、ECs、EPCs 的相关性

指标	统计值	miR-335-3p	VEGF	ECs	EPCs
lncRNA DLX6-AS1	<i>r</i>	-0.647	0.619	0.236	-0.272
	<i>P</i>	<0.01	<0.01	0.147	0.105
miR-335-3p	<i>r</i>	-	-0.625	-0.262	0.258
	<i>P</i>	-	<0.01	0.164	0.136

表6 PDR组患者血清 lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p 与 VEGF、ECs、EPCs 的相关性

指标	统计值	miR-335-3p	VEGF	ECs	EPCs
lncRNA DLX6-AS1	<i>r</i>	-0.675	0.630	0.528	-0.594
	<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
miR-335-3p	<i>r</i>	-	-0.649	-0.554	0.586
	<i>P</i>	-	<0.01	<0.01	<0.01

清 miR-335-3p 表达水平与 VEGF 存在负相关,说明miR-335-3p 的异常低表达可能导致 VEGF 高表达,从而推动视网膜血管新生。

本研究经生物信息学预测,结果显示,lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 存在结合位点,且 lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 存在负相关,提示 lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 可能存在靶向关系,共同参与糖尿病患者 DR 过程。ECs、EPCs 能够直接反映 DR 患者微血管内皮

功能损伤。本研究中 NDR 组、NPDR 组和 PDR 组患者 ECs、EPCs 比例变化与李开元等<sup>[18]</sup>研究一致。说明 T2DM 患者合并 DR 将会破坏患者血管内皮功能,DR 程度越加重,内皮损坏也随之加重。PDR 组患者血清 lncRNA DLX6-AS1 与 ECs 存在正相关,与 EPCs 存在负相关性;miR-335-3p 表达水平与 ECs 存在负相关,与 EPCs 存在正相关性,提示 lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p 可能与 ECs、EPCs 存在相互作用,并共同参与调控 DR 过程。此

表 7 T2DM 患者发生 DR 的单因素 Logistic 回归分析

项目	B	SE	Wald $\chi^2$	P	OR	95% CI
性别	0.016	0.102	0.024	0.876	1.016	0.832~1.241
年龄	0.130	0.115	1.281	0.258	1.139	0.909~1.427
BMI	-0.028	0.094	0.091	0.763	0.972	0.808~1.169
糖尿病病程	0.746	0.185	16.249	<0.01	2.108	1.467~3.029
吸烟史	0.234	0.137	2.924	0.087	1.264	0.966~1.653
SBP	0.274	0.129	4.506	0.034	1.315	1.021~1.693
DBP	0.487	0.160	9.254	0.002	1.627	1.189~2.226
FBG	0.371	0.132	7.894	0.005	1.449	1.119~1.877
TC	0.166	0.128	1.672	0.196	1.180	0.918~1.516
TG	-0.049	0.104	0.224	0.636	0.952	0.776~1.167
LDL	0.061	0.094	0.422	0.516	1.063	0.884~1.278
HDL	0.314	0.167	3.537	0.060	1.369	0.987~1.899
HbA1c	0.534	0.151	12.486	<0.01	1.705	1.268~2.292
Tb	0.205	0.126	2.657	0.103	1.228	0.959~1.572
ALT	0.014	0.132	0.011	0.916	1.014	0.783~1.313
AST	0.184	0.118	2.431	0.119	1.202	0.954~1.515
lncRNA DLX6-AS1	0.975	0.185	27.751	<0.01	2.650	1.844~3.808
miR-335-3p	0.913	0.174	27.513	<0.01	2.491	1.772~3.503
ECs	0.493	0.153	10.377	0.001	1.637	1.213~2.209
EPCs	0.461	0.162	8.105	0.004	1.586	1.155~2.179
VEGF	0.369	0.172	4.598	0.032	1.446	1.032~2.026

表 8 T2DM 患者发生 DR 的多因素 Logistic 回归分析

项目	B	SE	Wald $\chi^2$	P	OR	95% CI
糖尿病病程	0.154	0.547	0.080	0.778	1.167	0.399~3.409
SBP	-0.008	0.553	<0.01	0.988	0.992	0.336~2.932
DBP	-0.264	0.619	0.182	0.670	0.768	0.228~2.584
FBG	0.034	0.084	0.168	0.682	1.035	0.878~1.220
HbA1c	0.187	0.131	2.044	0.153	1.206	0.933~1.559
lncRNA DLX6-AS1	0.910	0.306	8.899	0.003	2.484	1.366~4.516
miR-335-3p	0.775	0.295	6.905	0.009	2.171	1.218~3.871
ECs	0.496	0.254	3.812	0.050	1.642	0.998~2.701
EPCs	0.339	0.196	2.985	0.084	1.403	0.955~2.060
VEGF	0.472	0.185	6.506	0.011	1.603	1.115~2.304

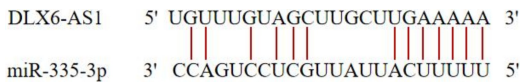


图 1 血清 lncRNA DLX6-AS1 序列中含有与 miR-335-3p 互补的核苷酸序列。

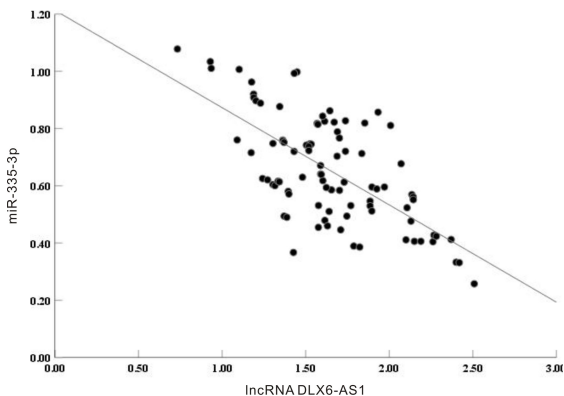


图 2 血清 lncRNA DLX6-AS1 与 miR-335-3p 表达水平的相关性。

外,多因素分析显示,lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p 以及 VEGF 是影响 DR 的危险因素,提示及时监控血清 lncRNA DLX6-AS1、miR-335-3p 以及 VEGF 水平,有利于尽早诊断和防治 DR 病情。

综上所述,DR 患者血清中 lncRNA DLX6-AS1 上调表达,miR-335-3p 低表达,二者呈负相关,其异常表达均与 DR 患者微血管损伤有关。

参考文献

- Helal HG, Rashed MH, Abdullah OA, *et al.* microRNAs (-146a,-21 and -34a) are diagnostic and prognostic biomarkers for diabetic retinopathy. *Biomed J* 2021;44(6 Suppl 2):S242-S251
- López-Contreras AK, Martínez-Ruiz MG, Olvera-Montaña C, *et al.* Importance of the use of oxidative stress biomarkers and inflammatory profile in aqueous and vitreous humor in diabetic retinopathy. *Antioxidants (Basel)* 2020;9(9):E891
- 隋文婕, 张晶晶, 汤庆丽, 等. lncRNA PVT1 及 miR-26b 在增生型糖尿病视网膜病变患眼玻璃体、增生膜中的表达研究. *临床眼科杂志* 2020;28(4):289-293

4 Rossino MG, Lulli M, Amato R, *et al.* Oxidative stress induces a VEGF autocrine loop in the retina: relevance for diabetic retinopathy. *Cells* 2020;9(6):E1452

5 Atef MM, Shafik NM, Hafez YM, *et al.* The evolving role of long noncoding RNA HIF1A-AS2 in diabetic retinopathy: a cross-link axis between hypoxia, oxidative stress and angiogenesis via MAPK/VEGF-dependent pathway. *Redox Rep* 2022;27(1):70-78

6 Yang JY, Ye Z, Mei D, *et al.* Long noncoding RNA DLX6-AS1 promotes tumorigenesis by modulating miR-497-5p/FZD4/FZD6/Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in pancreatic cancer. *Cancer Manag Res* 2019;11:4209-4221

7 Akbari Kordkheyli V, Amir Mishan M, Khonakdar Tarsi A, *et al.* microRNAs may provide new strategies in the treatment and diagnosis of diabetic retinopathy: importance of VEGF. *Iran J Basic Med Sci* 2021;24(3):267-279

8 Xia ZX, Yang XX, Zheng YX, *et al.* Plasma levels and diagnostic significance of miR-335-3p and EGFR in diabetic retinopathy. *Clin Lab* 2022;68(4):

9 中华医学会糖尿病学分会, 朱大龙. 中国2型糖尿病防治指南(2020年版). 国际内分泌代谢杂志 2021;41(5):482-548

10 中华医学会眼科学会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南(2014年). 中华眼科杂志 2014;50(11):851-865

11 Gui F, You ZP, Fu SH, *et al.* Endothelial dysfunction in diabetic

retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11(5):591

12 Xue C, Lv LX, Jiang JW, *et al.* Promising long noncoding RNA DLX6-AS1 in malignant tumors. *Am J Transl Res* 2020;12(12):7682-7692

13 史嫣. 长链非编码 RNA DLX6-AS1/Dlx6-os1 在糖尿病肾病患者和糖尿病肾病模型小鼠肾组织中的表达变化及意义. 郑州大学 2019

14 杜艺, 崔彤霞, 马文洁, 等. 荞麦黄酮通过下调 lncRNA DLX6-AS1 抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞炎症因子表达和纤维化. 中国中西医结合肾病杂志 2021;22(1):37-40

15 Wang HB, Niu XB, Jiang HS, *et al.* Long non-coding RNA DLX6-AS1 facilitates bladder cancer progression through modulating miR-195-5p/VEGFA signaling pathway. *Aging (Albany NY)* 2020;12(16):16021-16034

16 Liu YX, Lai P, Deng JL, *et al.* Micro-RNA335-5p targeted inhibition of sKlotho and promoted oxidative stress-mediated aging of endothelial cells. *Biomark Med* 2019;13(6):457-466

17 Yu YL, Wang LM, Li ZJ, *et al.* Long noncoding RNA CRNDE functions as a diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma, as well as promotes its progression via inhibition of miR-335-3p. *J Biochem Mol Toxicol* 2021;35(5):e22734

18 李开元, 艾明. 血清 ICAM-1、VEGF 水平与老年糖尿病视网膜病变患者微血管损伤的相关性研究. 中华保健医学杂志 2019;21(1):39-41