Modern Practical Medicine, November 2024, Vol. 36, No. 11

·临床研究·

糖尿病足溃疡患者血清及创面组织miR-29a-3p、VEGF表达情况及对预后的影响

陆颖，王春

【摘要】目的 探讨糖尿病足溃疡（DFU）患者血清及创面组织miR-29a-3p、血管内皮生长因子（VEGF）表达情况及对预后的影响。**方法** 收集2021年4月至2024年4月蚌埠医学院第二附属医院收治的DFU患者80例。采用Pearson相关系数分析miR-29a-3p表达与VEGF表达的相关性；荧光素酶活性检测探讨miR-29a-3p对VEGF的靶向调控作用；采用Logistic回归分析影响预后的因素；通过受试者工作特征（ROC）曲线评估miR-29a-3p、VEGF表达对预后的诊断价值。**结果** DFU不同严重程度的患者糖尿病病程、糖化血红蛋白（HbAlc）、C反应蛋白、VEGF及miR-29a-3p差异均有统计学意义（均$P<0.05$）；miR-29a-3p可通过作用于VEGF 3'-UTR负向靶向调控VEGF表达，且DFU患者血清、创面组织中miR-29a-3p表达与VEGF表达呈负相关（均$P<0.05$）；VEGF水平增加是患者预后的保护因素，年龄、糖尿病病程、HbAlc、miR-29a-3p增加是患者预后的危险因素，且VEGF、miR-29a-3p对患者预后不良存在独立相关性（均$P<0.05$）。创面及血清中miR-29a-3p、VEGF对预后的诊断价值排序为创面miR-29a-3p＞血清miR-29a-3p＞创面VEGF＞血清VEGF。**结论** DFU患者体内miR-29a-3p可负向靶向调控VEGF表达，VEGF水平增加、miR-29a-3p水平降低是患者预后的保护因素，miR-29a-3p对预后的诊断价值优于VEGF。

【关键词】 糖尿病足溃疡；血管内皮生长因子；miR-29a-3p；预后

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.11.012

【中图分类号】 R587.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)11-1446-04

糖尿病足溃疡（diabetic foot ulcer，DFU）的发生与糖尿病的多种病理、生理变化密切相关[1]，也是糖尿病的严重并发症，将导致患者截肢，甚至危及生命[2]。miR-29a-3p是一种微小RNA，属于miR-29家族。研究显示，在急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征中，miR-29a-3p通过减少肺泡上皮细胞凋亡来改善肺损伤[3]。miR-29a-3p下调炎症因子如肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白介素1β（IL-1β）和白介素6（IL-6）的表达，减少肺泡上皮细胞的凋亡，从而改善肺损伤。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子，对血管内皮细胞具有强烈的促分裂和增殖作用[4]。VEGF通过与其特异性受体结合，激活一系列信号转导通路，促进内皮细胞增殖、迁移，增加血管通透性，促进血浆蛋白外渗，形成血管生成的临时基质，诱导血管形成。研究指出，VEGF能促进DFU伤口愈合[5]。本研究拟探讨DFU患者血清及创面组织miR-29a-3p、VEGF表达情况及对预后的影响，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2021年4月至2024年4月蚌埠医学院第二附属医院收治的DFU患者80例，纳入标准：（1）符合DFU诊断标准[6]；（2）年龄≥18岁，且临床资料完整。排除标准：（1）合并其他感染性疾病者，（2）住院期间放弃治疗者，（3）伴有认知功能障碍的精神疾病者。本研究获得蚌埠医学院第二附属医院伦理委员会批准，豁免/免除知情同意。

80例患者中男46例，女34例；年龄36～87岁，平均（60.1±7.3）岁；DFU严重程度采用Wagner分级[7]，Ⅰ级22例，Ⅱ级17例，Ⅲ级13例，Ⅳ级28例。将Wagner Ⅰ～Ⅱ级设为A组，Wagner Ⅲ～Ⅳ级设为B组。

DFU愈合标准：（1）治疗6个月内伤口创面完全愈合，未出现新发溃疡；（2）治疗6个月内原发溃疡愈合，新发溃疡在其他区域或另足。所有患者均每个月随访1次，随访6个月。若创面愈合则为预后

基金项目： 安徽省高校科研项目计划（自然科学类）（2022AH051456）

作者单位： 233000 安徽省蚌埠，蚌埠医学院第二附属医院

通信作者： 陆颖，Email：13625525635@163.com

良好，若创面未愈合、需截肢或死亡则为预后不良。

1.2　方法　（1）收集研究对象年龄、性别、体质量指数（BMI）、吸烟史、糖尿病病程、高血压史、冠心病史、饮酒史、收缩压（SBP）、平均动脉压（MAP）及舒张压（DBP）值。（2）生化指标收集。患者入院时采集空腹静脉血 5 ml，离心（3 000 r/min，10 min）取血清，采用全自动生化分析仪检测总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、高密度脂蛋白（HDL）、空腹血糖（FPG）、糖化血红蛋白（HbA1c）、低密度脂蛋白（LDL）及 C 反应蛋白（CRP）值。（3）创面组织 VEGF 测定。采用酶联免疫吸附实验（Enzyme linked immunosorbent assay，ELISA），将培养好的创面组织细胞，胰蛋白酶消化后，接种至 96 孔酶标板继续培养 48 h 后，收集贴壁细胞，4 400 r/min 离心 6 min，弃去上层培养基，加入蛋白裂解液进行裂解反应，用 BCA（BCA Protein Quantification Kit）试剂盒定量总蛋白，用β-actin 做内参，计算 VEGF 蛋白表达水平。（4）血清 VEGF 测定。抽取患者空腹静脉血 5 ml，凝固后，3 000 r/min 离心 10 min，血清保存在−80℃冰箱。采用化学发光微粒子免疫法检测血清 VEGF 含量，试剂盒购自上海医学生物科技有限公司。（5）血清 miR-29a-3p 测定：入院后采集患者空腹静脉血 3 ml 注入干燥试管，待血液凝固后取上清液，3 000 r/min 离心 10 min。使用 TRIzol 试剂（上海碧云天生物技术股份有限公司）提取、测定 RNA 的浓度和纯度；使用逆转录试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司）逆转录合成 cDNA；采用 Step One Plus™（美国赛默飞）实时荧光定量 PCR 系统进行 3 次重复的 PCR 分析，检测标本中 miR-29a-3p 的表达水平。引物序列：miR-29a-3p 上游为 5’-TACCTCGGTAGCACCATCATCAT-3’，下游为 5’-TATCCTTGTTCACGACTACTGTCAC-3’；U6（内参）上游为 5’-TGTCCACCTTCCAGCAGATGG-3’，下游为 5’-GCTCAGTAACATTCCGCCTAGA-3’。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算血清、miR-29a-3p 相对表达量。（6）创面组织中 miR-29a-3p 测定。取部分创面组织标本，研磨组织，后续步骤同血清 miR-29a-3p 测定。

1.3　生物信息学预测和双荧光素酶实验　使用 Target Scan 数据库预测 miR-29a-3p 和 VEGF 的结合位点，并扩增上述片段。分别构建 VEGF 野生型（WT）质粒和突变型（MUT）质粒。将两种质粒分别与 miR-29a-3p mimics 及 miR-NC 混合。将培养好的创面组织细胞，胰蛋白酶消化后，继续培养 48 h，收集贴壁细胞，利用 Lipofectamine 2000 分别进行转染，转染 48 h 后，通过双荧光素酶检测系统检测相对荧光素酶活性水平。

1.4　统计方法　数据采用 SPSS 27.0 软件分析，符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示，采用 t 检验；计量资料以率的形式表示，采用 χ^2 检验；采用 Logistic 回归分析影响预后的因素；采用 Pearson 相关系数分析相关性；通过受试者工作特征（ROC）曲线评估诊断价值。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　A 组与 B 组一般资料比较　A 组与 B 组糖尿病病程、HbAlc、FPG 及 CRP 差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$），见表 1。

2.2　A 组与 B 组血清及创面组织中 miR-29a-3p 和 VEGF 表达情况比较　两组血清及创面中 VEGF 水平 A 组均显著高于 B 组（均 $P < 0.05$），创面中 miR-29a-3p A 组显著低于 B 组（$P < 0.05$），见表 2。

2.3　miR-29a-3p、VEGF 表达情况与临床特征的关系　以 miR-29a-3p 及 VEGF 表达水平中位数为界，将 DFU 患者分为 miR-29a-3p 高表达组（n=29）与低

表 1　A 组与 B 组一般资料比较

指标	A 组（n=39）	B 组（n=41）	χ^2（t）值	P 值
性别（男/女，例）	20/19	26/15	1.20	＞ 0.05
年龄（岁）	58.7±5.4	60.2±5.6	（1.23）	＞ 0.05
BMI（kg/m²）	24.38±2.62	23.32±2.27	（1.93）	＞ 0.05
糖尿病病程（年）	8.53±4.18	10.86±5.01	2.00	＜ 0.05
吸烟史（有/无，例）	20/19	19/22	0.19	＞ 0.05
饮酒史（有/无，例）	24/15	27/14	0.16	＞ 0.05
高血压史（有/无，例）	18/21	17/24	0.17	＞ 0.05
SBP（mmHg）	139.22±23.04	132.48±22.14	（0.33）	＞ 0.05
DBP（mmHg）	72.84±8.54	73.89±7.57	（0.58）	＞ 0.05
MAP（mmHg）	96.48±7.25	95.44±6.94	（0.65）	＞ 0.05
TC（mmol/L）	3.86±0.76	4.12±0.83	（1.45）	＞ 0.05
TG（mmol/L）	2.43±0.54	2.65±0.61	（1.70）	＞ 0.05
HDL（mmol/L）	1.16±0.26	1.21±0.31	（0.78）	＞ 0.05
LDL（mmol/L）	2.23±0.51	2.25±0.54	（0.17）	＞ 0.05
HbAlc（%）	8.72±0.92	9.86±0.94	（5.47）	＜ 0.05
FPG（mmol/L）	10.69±3.38	12.61±3.15	（2.63）	＜ 0.05
CRP（mg/L）	2.02±0.36	2.91±0.27	（12.55）	＜ 0.05

注：BMI 为体质量指数，SBP 为收缩压，MAP 为平均动脉压，DBP 为舒张压，TC 为总胆固醇，TG 为三酰甘油，HDL 为高密度脂蛋白，FPG 为空腹血糖，HbA1c 为糖化血红蛋白，LDL 为低密度脂蛋白，CRP 为 C 反应蛋白。1 mmHg≈0.133 kPa

表达组（n=51），VEGF 高表达组（n=47）与低表达组（n=33），分析其糖尿病病程、HbAlc 及 CRP 水平，结果显示仅血清中 VEGF 表达与 CRP 水平有关（χ^2=22.78，P < 0.05）。

2.4 miR-29a-3p 对 VEGF 的靶向调控作用 miR-29a-3p mimics 与含有 VEGF 3'-UTR 的野生型质粒共转染后，荧光素酶活性受到明显抑制，与 VEGF 3'-UTR 野生型质粒共转染的 miR-NC 与 miR-29a-3p mimics 的活力分别为 1.01±0.04 与 0.54±0.04，差异有统计学意义（t=14.39，P < 0.05）。

2.5 miR-29a-3p 表达与 VEGF 表达相关性 DFU 患者血清、创面组织中 miR-29a-3p 表达均与 VEGF 表达呈负相关（r=−0.372、−0.449，均 P < 0.05）。

2.6 影响预后单因素分析 以预后不良为因变量，以 VEGF、miR-29a-3p、年龄、糖尿病病程、HbAlc、CRP 为自变量，结果显示，VEGF 水平增加是患者预后的保护因素（P < 0.05）；年龄、糖尿病病程、HbAlc 及 miR-29a-3p 增加是患者预后的危险因素（均 P < 0.05）；CRP 水平与患者预后无关，见表 3。

2.7 血清及创面组织 miR-29a-3p、VEGF 表达与患者预后不良的独立相关性 将与预后相关的变量纳入 Logistic 回归模型，逐步排除混杂因素，最终校正年龄、糖尿病病程、HbAlc。结果显示，miR-29a-3p、VEGF 水平与患者预后不良存在独立相关性[OR（95%CI）=0.58（0.43 ～ 0.79）、0.70（0.53 ～ 0.86），均 P < 0.05]。

miR-29a-3p、VEGF 二分类变量后，血清及创面组织中较高水平 miR-29a-3p 与较低水平 miR-29a-3p 比较，较高水平的 miR-29a-3p 与患者预后不良存在独立相关性 [OR（95%CI）=0.77（0.52 ～ 0.99）、0.72（0.54 ～ 0.95），均 P < 0.05]；血清及创面组织中较高水平 VEGF 与较低水平 VEGF 比较，较低水平的 VEGF 与患者预后不良存在独立相关性 [OR（95% CI）=−0.69（−0.96 ～−0.54）、−0.75（−0.91 ～−0.50），均 P < 0.05]。

2.8 血清及创面组织中 miR-29a-3p、VEGF 表达对预后的诊断价值 结果显示，创面及血清中 miR-29a-3p 对预后诊断的 AUC 分别为 0.862（0.858 ～ 0.941）、0.837（0.803 ～ 0.886）；创面及血清中 VEGF 对预后的诊断 AUC 分别为 0.773（0.528 ～ 0.904）、0.725（0.515 ～ 0.863），见表 4 及图 1。

3 讨论

一项关于糖尿病性视网膜病变的研究指出 [8]，miR-29a-3p 的低表达可改善糖尿病性视网膜病变和血管功能障碍，虽然该研究与本研究针对的糖尿病并发症不同，但说明了 miR-29a-3p 在糖尿病相关病变中的作用。本研究分别将血清、创面组织中的 miR-29a-3p、VEGF 与临床特征比较后发现，只有血清中 VEGF 表达与 CRP 水平相关。VEGF 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子，具有促进血管通透性增加[9]、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用 [10-11]。CRP 是一种由肝脏合成的急性时相反应蛋白 [12-13]，在细菌感染或组织损伤等情况下，其浓度会显著升高。但目前并没有直接的广泛认可的研究结果表明两者之间存在明确的、固定的关联。

本研究为验证在 DFU 患者体内 miR-29a-3p 靶向调控 VEGF，通过 Target Scan 数据库分析发现两者间存在部分互补的关系，通过开展荧光素酶活性

表 2 A 组与 B 组血清及创面组织中 miR-29a-3p 和 VEGF 表达情况比较

指标	部位	A 组（n=39）	B 组（n=41）	t 值	P 值
VEGF（pg/ml）	血清	63.45±10.18	56.32±9.57	3.22	< 0.05
	创面	65.72±8.69	60.05±11.23	2.51	< 0.05
miR-29a-3p	血清	1.65±0.71	1.94±0.62	1.94	> 0.05
	创面	1.62±0.45	2.07±0.66	3.54	< 0.05

表 3 影响 DFU 患者预后的因素分析

因素	OR 值（95%CI）	P 值
VEGF	0.871（0.806 ～ 0.994）	< 0.05
miR-29a-3p	1.642（1.373 ～ 1.806）	< 0.05
年龄	1.629（1.364 ～ 1.709）	< 0.05
糖尿病病程	2.004（1.559 ～ 2.807）	< 0.05
HbAlc	1.605（1.248 ～ 2.039）	< 0.05
CRP	1.146（0.891 ～ 1.327）	> 0.05

表 4 血清及创面组织中 miR-29a-3p、VEGF 表达对预后的诊断价值

指标	$cut\text{-}off$ 值	灵敏度（%）	特异度（%）	AUC	95%CI	P 值[a]
创面 miR-29a-3p	1.58	83.91	84.77	0.862	0.858 ～ 0.941	< 0.05
血清 miR-29a-3p	1.71	82.15	79.68	0.837	0.803 ～ 0.886	< 0.05
创面 VEGF	59.87	79.84	76.67	0.773	0.528 ～ 0.904	< 0.05
血清 VEGF	56.74	73.55	76.58	0.725	0.515 ～ 0.863	

注：a 为与血清 VEGF 比较

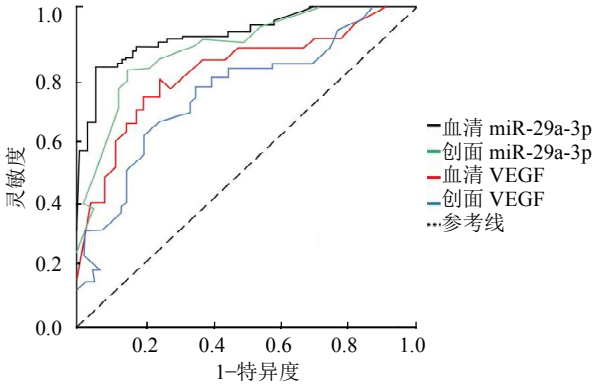

图 2　血清及创面组织中 miR-29a-3p、VEGF 表达对预后的诊断价值

检测发现 miR-29a-3p 可通过作用于 VEGF 3'-UTR 抑制 VEGF 表达，相关性分析亦显示 DFU 患者血清、创面组织中 miR-29a-3p 表达与 VEGF 表达呈负相关。一项关于孕妇早期血清 miR-29a-3p 和 VEGFA 表达水平及其对子痫前期预测价值研究的报道指出[14]，子痫前期患者血清中 miR-29a-3p 表达上升，而 VEGFA 表达下降，这与本研究的结果相似。

本研究结果显示，VEGF 水平增加是 DFU 患者预后的保护因素；年龄、糖尿病病程、HbAlc、miR-29a-3p 增加是患者预后的危险因素；CRP 水平与患者预后无关。且血清及创面组织中较高水平 miR-29a-3p 与较低水平 miR-29a-3p 比较，较高水平的 miR-29a-3p 与患者预后不良存在独立相关性；血清及创面组织中较高水平 VEGF 与较低水平 VEGF 比较，较低水平的 VEGF 与患者预后不良存在独立相关性。根据 ROC 曲线绘制血清、创面组织中 miR-29a-3p、VEGF 表达对预后的诊断价值的 *AUC* 可判断创面及血清中 miR-29a-3p、VEGF 对预后的诊断价值排序创面中 miR-29a-3p ＞血清 miR-29a-3p ＞创面 VEGF ＞血清 VEGF。

本研究可能存在的不足之处：(1)本研究仅纳入了 80 例 DFU 患者，需更大的样本量能够提供更可靠、更具普遍性的结论。(2) 本研究主要关注了 miR-29a-3p 和 VEGF 的表达水平及其与预后的关系，但未涉及针对这些分子的治疗干预。

综上所述，DFU 患者体内 miR-29a-3p 可负向靶向调控 VEGF 表达，VEGF 水平增加、miR-29a-3p 水平降低是患者预后的保护因素，miR-29a-3p 对预后的诊断价值优于 VEGF。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　陆颖：实验操作、论文撰写、数据整理、统计学分析；王春：研究指导、论文修改、经费支持

参　考　文　献

[1] HUANG F, LU X Y, YANG Y, et al. Microenvironment-based diabetic foot ulcer nanomedicine[J]. Adv Sci, 2023, 10(2): e2203308.

[2] DAYYA D, O'NEILL O J, HUEDO-MEDINA T B, et al. Debridement of diabetic foot ulcers[J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2022, 11(12): 666-686.

[3] CUI Y H, WANG X Q, LIN F Y, et al. MiR-29a-3p improves acute lung injury by reducing alveolar epithelial cell PANoptosis[J]. Aging Dis, 2022, 13(3): 899-909.

[4] DU E M, LI X, HE S Y, et al. The critical role of the interplays of EphrinB2/EphB4 and VEGF in the induction of angiogenesis[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(6): 4681-4690.

[5] LIU J Y, ZHANG Y H, LIU C, et al. A single dose of VEGF-A circular RNA sustains in situ long-term expression of protein to accelerate diabetic wound healing[J]. J Control Release, 2024, 373: 319-335.

[6] LIPSKY B A, SENNEVILLE E, ABBAS Z G, et al. Guidelines on the diagnosis and treatment of foot infection in persons with diabetes (IWGDF 2019 update)[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2020, 36(Suppl 1): e3280.

[7] WAGNER F W. The dysvascular foot: A system for diagnosis and treatment[J]. Foot Ankle, 1981, 2(2): 64-122.

[8] JIANG Q, LIU C, LI C P, et al. Circular RNA-ZNF532 regulates diabetes-induced retinal pericyte degeneration and vascular dysfunction[J]. J Clin Invest, 2020, 130(7): 3833-3847.

[9] PHOENIX K N, YUE Z C, YUE L X, et al. PLCβ2 promotes VEGF-induced vascular permeability[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022, 42(10): 1229-1241.

[10] LEE S K, KIM M J, SON S H, et al. Xanthorrhizol suppresses vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by modulating Akt/ENOS signaling and the NF-[formula: See text]B-dependent expression of cell adhesion molecules[J]. Am J Chin Med, 2021, 49(3): 737-751.

[11] 张传政,郑兵,屈芳,等.血管内皮生长因子在脑出血中的发病机制及治疗进展[J].中国实用神经疾病杂志,2024,27(5):643-647.

[12] HART P C, RAJAB I M, ALEBRAHEEM M, et al. C-reactive protein and cancer-diagnostic and therapeutic insights[J]. Front Immunol, 2020, 11: 595835.

[13] 李莉, 刘建华, 王杨, 等. 肺炎支原体与流感病毒混合感染患儿 WBC、CRP 指标变化监测[J]. 中国实验诊断学,2024,28(5): 523-526.

[14] 康会贤,张蕾,马夕锐,等.孕妇早期血清 miR-29a-3p 和 VEGFA 表达水平及其对子痫前期预测价值研究[J].现代检验医学杂志,2023,38(2):32-36.

收稿日期：2024-09-23

（本文编辑：钟美春）