

•心脏介入 Cardiac intervention•

急性冠状动脉综合征患者 PCI 术后受体相互作用蛋白激酶 1 表达及其与支架内再狭窄的关系

刘小希，邹文，孟刘坤，宋民

【摘要】目的 探讨急性冠状动脉综合征(ACS)患者经皮冠状动脉介入治疗(PCI)后外周血单个核细胞中受体相互作用蛋白激酶(RIPK1)表达及其与支架内再狭窄(ISR)的关系。**方法** 选择 2017 年 4 月至 2019 年 6 月在北京阜外医院接受 PCI 治疗的 188 例 ACS 患者作为研究对象。根据 PCI 术后 1 年是否发生 ISR, 分为 ISR 组($n=51$)和非 ISR 组($n=137$)。采用 Ficoll 密度梯度离心法自外周血中分离单个核细胞, 蛋白质免疫印迹法检测单个核细胞中 RIPK1 表达水平。**结果** PCI 术后, 两组 RIPK1 表达水平均降低, 非 ISR 组低于 ISR 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。非 ISR 组 PCI 术前、术后 RIPK1 降低程度(Δ RIPK1)高于 ISR 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。PCI 术后 RIPK1 诊断 ISR 的受试者工作特征曲线下面积、灵敏度、特异度分别为 0.868、78.43%、84.67%, 其诊断效能高于术前 RIPK1 和 Δ RIPK1, 差异均有显著统计学意义($P<0.001$)。多因素 logistic 回归分析结果显示空腹血糖(FBG)、血管病变支数、术后 RIPK1 和血管病变长度, 均为 ACS 患者 PCI 术后 1 年内 ISR 的独立危险因素($P<0.05$)。限制性立方样条拟合 logistic 回归分析表明, RIPK1 与 ISR 呈线性关系。**结论** RIPK1 与 ACS 患者 PCI 后 1 年内 ISR 有关, 其高表达水平提示 PCI 术后 1 年内发生 ISR 风险高。

【关键词】 急性冠状动脉综合征;经皮冠状动脉介入治疗;受体相互作用蛋白激酶 1;支架内再狭窄

中图分类号:R541.4 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2021)-05-0438-05

The expression level of receptor-interacting protein kinase 1 in patients with acute coronary syndrome after PCI and its relationship with in-stent restenosis LIU Xiaoxi, ZOU Wen, MENG Liukun, SONG Min. Center of Adult Cardiac Surgery, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, National Cardiovascular Center, Fuwai Hospital, Beijing 100037, China

Corresponding author: SONG Min, E-mail: mdsongmin@126.com

[Abstract] **Objective** To investigate the expression level of receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) in peripheral blood mononuclear cells and to discuss its relationship with in-stent restenosis (ISR) in patients with acute coronary syndrome (ACS) after percutaneous coronary intervention (PCI). **Methods** A total of 188 patients with ACS, who received PCI at Beijing Fuwai Hospital of China between April 2017 and June 2019, were selected as the research objects. According to whether ISR occurred or not within one year after PCI, the patients were divided into ISR group ($n=51$) and non-ISR group ($n=137$). Ficoll density gradient centrifugation was used to separate mononuclear cells from peripheral blood, and Western blotting was used to detect the expression level of RIPK1 in mononuclear cells. **Results** After PCI, the expression level of RIPK1 was decreased in both of the two groups, and the expression level of RIPK1 in the non-ISR group was lower than that in the ISR group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The reduction value of RIPK1 before and after PCI (Δ RIPK1) in the non-ISR group was larger than that in the ISR group, the difference in the reduction

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2021.05.003

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81400034)、北京市自然科学基金面上项目(7122182)

作者单位:100037 北京 中国医学科学院、北京协和医学院、国家心血管病中心阜外医院成人心脏外科中心
(刘小希、孟刘坤、宋民);北京市普仁医院心内科(邹文)

通信作者:宋民 E-mail: mdsongmin@126.com

value between the two groups was statistically significant($P<0.05$)。The area under ROC curve, sensitivity and specificity of RIPK1 in diagnosing ISR after PCI were 0.868, 78.43% and 84.67%, respectively. The diagnostic efficacy of post-PCI RIPK1 was higher than that of pre-PCI RIPK1 and Δ RIPK1, and the differences were statistically significant($P<0.001$)。Logistic regression analysis showed that FBG, the number of diseased vascular branches, post-PCI RIPK1, and the length of vascular lesions were the independent risk factors for ISR within one year after PCI in ACS patients($P<0.05$)。Restricted cubic spline fitting Logistic regression analysis indicated that RIPK1 bore a linear relationship with ISR。Conclusion RIPK1 is correlated to ISR within one year after PCI in ACS patients, and its high expression level indicates a high risk of ISR occurring within one year after PCI。(J Intervent Radiol, 2021, 30: 438-442)

[Key words] acute coronary syndrome; percutaneous coronary intervention; receptor-interacting protein kinase 1; in-stent restenosis

经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)是急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的主要治疗方法之一,可有效改善动脉粥样硬化斑块堵塞血管引发的心肌缺血、缺氧^[1,3]。近年来 PCI 术后支架内再狭窄(in-stent restenosis, ISR)备受关注。文献报道显示普通金属支架 ISR 发生率为 15%~30%, 即使是药物洗脱支架, ISR 发生率也高达 10%^[4]。寻找预示 ISR 的相关指标,对患者预后改善有重要意义。然而目前临床中缺乏灵敏度和特异度均较高的指标预示 ISR。受体相互作用蛋白激酶(receptor-interacting protein kinase, RIPK1)是一种细胞膜上死亡受体家族触发的细胞应答上游调节蛋白,在细胞凋亡、坏死性凋亡、炎性反应和细胞表型转换中发挥重要作用^[5]。有研究显示 RIPK1 与血管平滑肌细胞表型转换关系密切,可通过核因子(NF)- κ B 途径参与血管平滑肌细胞表型转换,进而促进 ISR^[6]。血管平滑肌细胞经收缩表型转换成合成表型过程可促进其增殖、迁移和分泌等增强,促进 ISR 发生和发展^[7]。本研究检测 PIPK1 表达水平,探究其与 PCI 术后 ISR 的关系,以期为预防和治疗 ISR 提供帮助。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选择 2017 年 4 月至 2019 年 6 月在北京阜外医院接受 PCI 治疗的 188 例 ACS 患者作为研究对象,根据《急性冠脉综合征急诊快速诊疗指南》^[8]诊断 ACS。纳入标准:①首次诊断为 ACS;②配合完成相关检查;③PCI 术后 1 年内主诉疑似心绞痛不适症状,接受冠状动脉造影检查;④签署知情同意书。排除标准:①既往有 ACS 病史;②接受 PCI 外其他治疗;③伴有慢性阻塞性肺疾病、高同型半胱氨酸

血症、下肢动脉硬化闭塞症、恶性肿瘤等;④有心脏病、心瓣膜病史;⑤PCI 术后不规律服用抗血小板聚集、调节糖脂代谢等药物;⑥临床资料不完整。188 例 ACS 患者中男 141 例,女 47 例,年龄 45~77(63.12±6.44)岁,ST 段抬高型心肌梗死(ST-segment elevation myocardial infarction, STEMI)134 例,非 ST 段抬高型心肌梗死(non-ST elevation myocardial infarction, NSTEMI)45 例,不稳定心绞痛(unstable angina, UA)9 例。根据 PCI 术后 1 年是否发生 ISR 将患者分为 ISR 组($n=51$)和非 ISR 组($n=137$)。本研究经医院医学伦理委员会批准。

1.2 信息收集

收集 ACS 患者年龄、性别、体质量指数(body mass index, BMI)、吸烟史、ACS 类型、糖尿病史、高血压史、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、血管病变位置、血管病变长度、血管病变支数及支架直径等信息。

1.3 RIPK1 表达水平检测

抽取 ACS 患者 PCI 术前、术后 7 d 空腹外周静脉血 10 mL, Ficoll 密度梯度离心法^[9]获取外周血中单个核细胞。蛋白质免疫印迹法^[10]检测单个核细胞中 RIPK1 表达水平。放射免疫沉淀法(RIPA)裂解单个核细胞,分离出总蛋白,二辛可酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒定量。10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳(80~120 V)至溴酚蓝跑出胶面,转膜(300 mA),5%脱脂奶粉室温封闭 2 h。分别滴加兔抗人 RIPK1 单克隆抗体、兔抗人 β -肌

动蛋白(actin)抗体(上海群己生物科技公司),4℃孵育过夜;滴加山羊抗兔二抗(上海群己生物科技公司),室温下孵育2 h。电化学发光(electrochemiluminescence, ELC)液显影。Image J软件计算RIPK1相对表达水平。

1.4 ISR 检查

所有ACS患者均于PCI术后1年复查冠状动脉造影,观察左前斜、右前斜及头脚轴状位投影,评估左主干、左前降支、左回旋支和右冠状动脉狭窄程度。定量冠状动脉造影(QCA)分析软件(CASS,荷兰Pie Medical Imaging公司)对造影图像进行定量分析。ISR定义为支架内和/或支架两端5 mm内管腔狭窄率 $\geq 50\%$ 。

1.5 统计学方法

采用R3.6.3软件进行数据分析。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用独立样本t检验,组内比较用配对样本t检验。计数资料以例(n)表示,组间比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)评价RIPK1诊断ACS患者ISR的效能。限制性立方样条拟合logistic回归法分析RIPK1与ACS患者ISR的关系。

2 结果

2.1 两组基线资料比较

两组间患者年龄、性别、BMI、吸烟史、糖尿病史、高血压史、SBP、DBP、TC、TG、HDL-C、ACS类型、血管病变位置和支架直径差异均无统计学意义($P > 0.05$)。ISR组FBG、LDL-C、3支血管病变占比和血管病变长度均高于非ISR组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.2 两组RIPK1表达水平比较

非ISR组、ISR组PCI术前RIPK1表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),术后RIPK1表达水平均降低,且非ISR组低于ISR组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。非ISR组PCI术前、术后RIPK1降低程度($\Delta RIPK1$)高于ISR组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2、图1。

2.3 RIPK1评估ISR的价值

PCI术前、术后RIPK1诊断ISR的ROC曲线下面积、最佳截断点、灵敏度、特异度分别为0.528(95%CI:0.454~0.601)、0.84、25.49%、85.40%,0.868(95%CI:0.812~0.913)、0.50、78.43%、84.67%; $\Delta RIPK1$ 诊断ISR的ROC曲线下面积、最佳截断

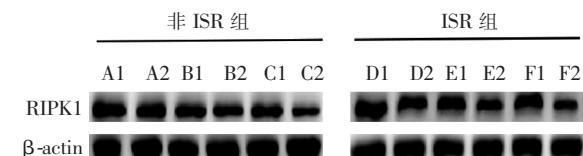
表1 两组基线资料比较

参数	非 ISR 组 (n=137)	ISR 组 (n=51)	t/χ ² 值	P 值
年龄/岁	63.24±6.42	62.78±6.54	0.431	0.667
性别(男/女)/n	105/32	36/15	0.726	0.394
BMI/(kg/m ²)	25.83±2.85	26.11±2.99	0.593	0.554
吸烟史/n	60	20	0.319	0.572
糖尿病史/n	51	24	1.498	0.221
高血压史/n	80	33	0.617	0.432
SBP/mmHg	137.01±16.35	139.00±19.95	0.696	0.487
DBP/mmHg	80.31±11.44	81.43±11.23	0.598	0.550
FBG/(mmol/L)	6.54±1.37	7.13±1.23	2.688	0.008
TC/(mmol/L)	5.23±1.02	5.38±1.01	0.922	0.358
TG/(mmol/L)	2.16±0.63	2.03±0.47	1.487	0.140
LDL-C/(mmol/L)	2.19±0.62	2.53±0.72	3.192	0.002
HDL-C/(mmol/L)	1.03±0.19	1.04±0.20	0.450	0.653
ACS类型(STEMI/ NSTEMI/UA)/n	97/33/7	37/12/2	0.130	0.937
血管病变位置(左主干/ 左前降支/左回旋支/ 右冠状动脉)/n	9/88/18/22	6/27/8/10	2.482	0.479
血管病变支数(单支/ 双支/3支)/n	86/47/4	21/18/12	21.605 <0.001	
血管病变长度/mm	27.52±6.28	36.13±7.25	8.000 <0.001	
支架直径/mm	3.06±0.41	3.11±0.45	0.637	0.525

1 mmHg=0.133 kPa

表2 两组RIPK1表达水平比较

组别	PCI术前	PCI术后	$\Delta RIPK1$
非 ISR 组(n=137)	0.75±0.11	0.44±0.08	0.32±0.13
ISR 组(n=51)	0.76±0.10	0.55±0.07	0.21±0.11
t值	0.637	9.065	5.119
P值	0.525	<0.001	<0.001



1:PCI术前 2:术后

图1 两组RIPK1表达的蛋白质免疫印迹图

点、灵敏度、特异度分别为0.736(95%CI:0.667~0.797)、0.28、78.43%、61.31%。PCI术后RIPK1诊断ISR的效能高于术前RIPK1和 $\Delta RIPK1$,差异均有显著统计学意义($Z=6.284, 3.729, P < 0.001$),见图2。

2.4 影响ACS患者ISR的因素分析

将ACS患者PCI术后1年内是否发生ISR作为因变量,FBG、LDL-C、血管病变支数、术后RIPK1和血管病变长度作为自变量,纳入多因素logistic回归分析,结果显示FBG、血管病变支数、术后RIPK1和血管病变长度均为ACS患者PCI术后1年内ISR的独立危险因素($P < 0.05$),见表3。

2.5 RIPK1与ISR的关系

用限制性立方样条拟合logistic回归法分析RIPK1与ISR的关系,节点个数为3时Akaike信息

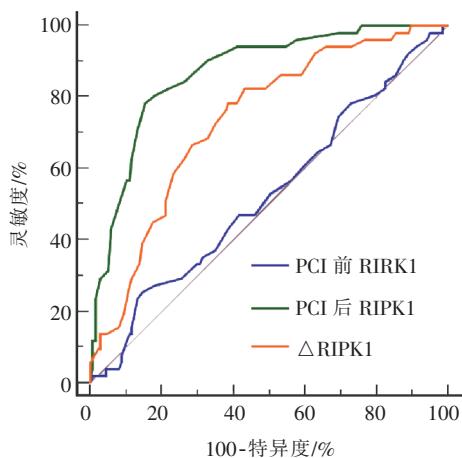


图 2 RIPK1 诊断 ISR 的 ROC 曲线

表 3 影响 ACS 患者 ISR 的因素分析

因素	系数值	标准误	卡方值	P 值	OR 值	95%CI
FBG	0.437	0.203	4.659	0.031	1.548	1.041~2.303
LDL-C	0.687	0.372	3.405	0.065	1.988	0.958~4.124
血管病变支数	1.096	0.376	8.500	0.004	2.992	1.432~6.251
术后 RIPK1	2.884	0.531	29.531	<0.001	17.886	6.321~50.611
血管病变长度	0.183	0.043	18.232	<0.001	1.200	1.104~1.305

准则 (AIC) 值最小 ($AIC=153.010$)，显示 RIPK1 与 ISR 有关 ($\chi^2=37.14, P<0.001$)，呈线性关系 (非线性检验 $\chi^2=1.41, P=0.235$)。将 PCI 术后 RIPK1 诊断 ISR 的最佳截断点作为参考点， $RIPK1 < 0.50$ 时，PCI 术后 1 年内 ISR 发生风险降低； $RIPK1 > 0.50$ 时，PCI 术后 1 年内 ISR 发生风险增加，见图 3。

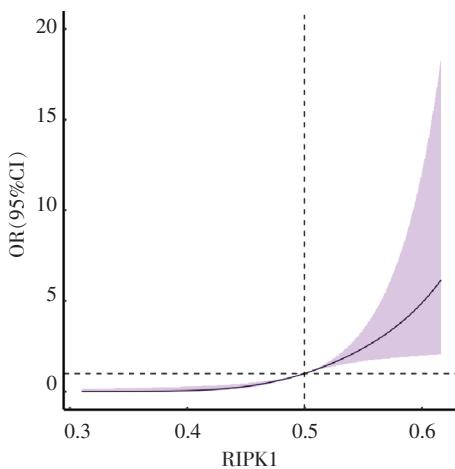


图 3 RIPK1 与 ISR 限制性立方样条图

3 讨论

外周血单个核细胞与 ACS 发病及进展关系密切，其可通过黏附、活化血管内皮细胞释放白细胞介素-1 β 、C 反应蛋白等炎性介质，促进 ACS 发病及进展^[11]。本研究推测 RIPK1 通过调节血管平滑肌细胞表型转换参与 PCI 术后 ISR 发生和发展过程，因此检测外周血单个核细胞中 RIPK1 表达水平，探究

其与 ISR 关系，有助于预防 ISR，降低死亡率。本研究中 ACS 患者 ISR 发生率为 27.1%，高于既往文献报道的 ISR 发生率，推测原因可能在于受试者均于主诉疑似心绞痛不适症状后接受冠状动脉血管造影检查，ISR 发生率偏高。本研究结果显示 PCI 术后 ISR 组和非 ISR 组 RIPK1 表达水平均降低，而非 ISR 组低于 ISR 组，且非 ISR 组 Δ RIPK1 高于 ISR 组；提示 RIPK1 可能与 ISR 有关，其表达水平或可预测 ISR 发生情况。

本研究构建 RIPK1 诊断 PCI 术后 1 年内 ISR 的 ROC 曲线，结果显示 PCI 术后 RIPK1 诊断 ISR 的 ROC 曲线下面积、灵敏度、特异度分别为 0.868、78.43%、84.67%，诊断效能高于术前 RIPK1 和 Δ RIPK1；表明 PCI 术后 RIPK1 评价术后 1 年内 ISR 的效能较高，但灵敏度偏低，尚可辅助评价 ISR。

既往研究表明 ISR 危险因素较多。阎志等^[12]研究显示高血压史、糖尿病史、LDL-C 高于 1.8 mmol/L、多支病变、支架位于左前降支、支架直径 < 3 mm，支架长度 > 20 mm，均为冠心病患者 PCI 术后 ISR 的独立危险因素。Cheng 等^[13]研究显示糖尿病史和支架长度是 PCI 术后 1 年内 ISR 的独立危险因素。Wu 等^[14]研究显示 2 型糖尿病、支架长度和支架直径与 PCI 术后 ISR 有关。此外，钟继明等^[15]研究显示伴糖尿病、伴高血压、吸烟史、植入支架长度和支架直径均为 ISR 的独立相关因素。本研究采用多因素 logistic 回归法分析影响 ACS 患者 PCI 术后 1 年内 ISR 的危险因素，结果显示 FBG、血管病变支数、PCI 术后 RIPK1 和血管病变长度均为 ACS 患者 PCI 术后 1 年内 ISR 的独立危险因素，而糖尿病史、高血压史、吸烟史、支架直径、病变位置和 LDL-C 等与 PCI 术后 1 年内 ISR 无关。本研究结果与上述研究结果存在一定差异，可能与纳入研究样本量、地域等有关，后续需开展多中心大样本研究验证本研究结论。

包勤学等^[6]研究显示血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞中 RIPK1 表达水平升高，血管平滑肌细胞表型转换加快；抑制 RIPK1 表达可降低 NF- κ B 的 p65 亚基磷酸化水平，同时血管平滑肌细胞表型转换、增殖、迁移及分泌均受到一定程度抑制。本研究结果还显示 PCI 术后 RIPK1 与 ISR 有关，且呈线性关系； $RIPK1 < 0.50$ 时 PCI 术后 1 年内 ISR 发生风险降低， $RIPK1 > 0.50$ 时术后 1 年内 ISR 发生风险增加，推测原因在于外周血单个核细胞中 RIPK1 可通过促进 NF- κ B 的 p65 亚基磷酸化诱导收缩表型

的血管平滑肌细胞向合成表型的血管平滑肌细胞转化,促进血管平滑肌细胞增殖、迁移及分泌,加速 ISR 发病和进展。

综上所述,RIPK1 与 ACS 患者 PCI 术后 1 年内 ISR 有关,检测其表达水平有助于预判 PCI 术后 1 年内 ISR 发生情况。RIPK1 高表达水平提示 PCI 术后 1 年内发生 ISR 风险高。本研究为单中心研究,样本量偏小,后续将开展多中心大样本研究验证本研究结论。

[参考文献]

- [1] 刘江萍,木胡牙提.急性冠脉综合征流行病学及危险因素的研究进展[J].国际心血管病杂志,2019,46:1-3,7.
- [2] Khan SA, Bhattacharjee S, Ghani M, et al. Vitamin C for cardiac protection during percutaneous coronary intervention: a systematic review of randomized controlled trials[J]. Nutrients, 2020, 12: 2199.
- [3] Li W, He W, Zhou Y, et al. Immediate versus deferred percutaneous coronary intervention for patients with acute coronary syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. PLoS One, 2020, 15: e0234655.
- [4] Kim MS, Dean LS. In-stent restenosis[J]. Cardiovasc Ther, 2011, 29: 190-198.
- [5] Kondylis V, Kumari S, Vlantis K, et al. The interplay of IKK, NF- κ B and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation [J]. Immunol Rev, 2017, 277: 113-127.
- [6] 包勤学,陈丽,吴思媛,等.受体相互作用蛋白激酶 1 在血管平滑肌细胞表型转换中的作用研究[J].生物医学工程学杂志,2016,33: 719-728.
- [7] 舒刘芳.血管平滑肌细胞表型转换对动脉粥样硬化的作用研究进展[J].中国动脉硬化杂志,2018,26: 99-102.
- [8] 中国医师协会急诊医师分会,中华医学会心血管病学分会,中华医学会检验医学分会.急性冠脉综合征急诊快速诊疗指南[J].中华急诊医学杂志,2016,25: 397-404.
- [9] Tang X, Wang J, Xia X, et al. Elevated expression of ciRS-7 in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients[J]. Diagn Pathol, 2019, 14: 11.
- [10] Ye G, Qin Y, Wang S, et al. Lamc1 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma cells by regulating PKM2 expression through AKT pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20: 711-719.
- [11] Han H, Dai DP, Wang WC, et al. Impact of serum levels of lipoprotein lipase, hepatic lipase, and endothelial lipase on the progression of coronary artery disease[J]. J Intervent Med, 2019, 2: 16-20.
- [12] 阎志,邢小卫,刘玉胜,等.冠心病患者 PCI 术后冠状动脉药物支架内再狭窄的危险因素分析[J].山东医药,2019,59: 47-50.
- [13] Cheng G, Chang FJ, Wang Y, et al. Factors influencing stent restenosis after percutaneous coronary intervention in patients with coronary heart disease: a clinical trial based on 1-year follow-up[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 240-247.
- [14] Wu XA, Xie G, Li XQ, et al. The value of serum visfatin in predicting in-stent restenosis of drug-eluting stents[J]. Clin Chim Acta, 2018, 479: 20-24.
- [15] 钟继明,黄学成,张景昌,等.冠状动脉雷帕霉素涂层支架植入术后支架内再狭窄临床预测因素探讨[J].介入放射学杂志,2017,26: 874-877.

(收稿日期:2020-09-29)

(本文编辑:边信)