

·血管介入 Vascular intervention·

下肢动脉硬化闭塞症患者支架植入术后血清 miR-140-5p 与 1 年内支架内再狭窄相关性研究

张 克, 杨 涛, 郝 斌

【摘要】 目的 探讨下肢动脉硬化闭塞症(LEAOD)患者支架植入术后血清微小核糖核酸(miR)-140-5p 表达水平与 1 年内支架内再狭窄(ISR)的关系。**方法** 选取 2019 年 2 月至 2020 年 3 月在山西白求恩医院接受支架植入术治疗的 136 例 LEAOD 患者作为研究对象。根据术后是否发生 ISR 分为 ISR 组($n=52$)和非 ISR 组($n=84$)。采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测患者血清 miR-140-5p 表达,受试者工作特征曲线(ROC)评价 miR-140-5p 预判支架植入术后 1 年内 ISR 的价值,logistic 回归分析 miR-140-5p 与支架植入术后 1 年内 ISR 的关系。**结果** ISR 组泛大西洋学会联盟(TASC)Ⅱ分型 B+C 型、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、C 反应蛋白(CRP)比例均高于非 ISR 组(均 $P<0.05$)。ISR 组手术前后 miR-140-5p 相对表达水平均低于非 ISR 组(均 $P<0.05$)。两组术后 miR-140-5p 相对表达水平均高于术前(均 $P<0.05$),ISR 组 miR-140-5p 相对表达升高程度低于非 ISR 组($P<0.05$)。术后 miR-140-5p 预判支架植入术后 1 年内 ISR 的 ROC 曲线下面积(AUC)高于术前 miR-140-5p、miR-140-5p 差值(均 $P<0.05$)。logistic 回归分析结果显示,TASC Ⅱ分型、LDL-C、CRP 均为 LEAOD 患者支架植入术后 1 年内 ISR 的独立危险因素(均 $P<0.05$),术后 miR-140-5p 是术后 1 年内 ISR 的独立保护因素($P<0.05$)。**结论** LEAOD 患者支架植入术后 miR-140-5p 与术后 1 年内 ISR 相关,检测其表达可辅助临床做出更好决策。

【关键词】 微小核糖核酸-140-5p;下肢动脉硬化闭塞症;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(2022)-06-0555-05

Correlation between serum microRNA-140-5p level and in-stent restenosis occurring within one year after interventional treatment in patients with lower extremity atherosclerotic occlusive disease

ZHANG Ke, YANG Tao, HAO Bin. Department of Vascular Surgery, Shanxi Bethune Hospital (Shanxi Academy of Medical Sciences), Taiyuan, Shanxi Province 030032, China

Corresponding author: HAO Bin, E-mail:haobin63@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between the serum expression level of microRNA-140-5p(miR-140-5p) and the in-stent restenosis(ISR) occurring within one year after intervention in patients with lower extremity atherosclerotic occlusive disease(LEAOD). **Methods** A total of 136 LEAOD patients, who received stent implantation treatment at Shanxi Bethune Hospital of China between February 2019 and March 2020, were selected as the study subjects. Based on whether ISR occurred after surgery or not, the patients were divided into ISR group($n=52$) and non-ISR group($n=84$). By using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(PCR) method, the expression level of miR-140-5p in serum was detected. The receiver operating characteristics(ROC) curve was used to assess the value of miR-140-5p in predicting the occurrence of ISR within one year after stent implantation, and logistic regression analysis method was used to analyze the correlation between the serum miR-140-5p expression level and the occurrence of ISR within one year after stent implantation. **Results** The proportions of Transatlantic InterSociety Consensus Ⅱ(TASC Ⅱ) subtype B+C, low-density lipoprotein cholesterol(LDL-C), and C-reaction protein(CRP) in the ISR group were higher than those in the non-ISR group($P<0.05$). Both the preoperative and postoperative relative expression levels of miR-140-5p in the ISR group were lower than those in the non-ISR group($P<0.05$). In both groups, the

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2022.06.007

基金项目:山西省科技厅自然科学基金(201601D011121)

作者单位:030032 太原 山西白求恩医院(山西医学科学院)血管外科

通信作者:郝 斌 E-mail:haobin63@163.com

postoperative relative expression level of miR-140-5p was higher than the preoperative one ($P<0.05$); the elevated degree of relative expression level of miR-140-5p in the ISR group was lower than that in the non-ISR group ($P<0.05$). The area under the receiver operating characteristics (ROC) curve of postoperative miR-140-5p for predicting the occurrence of ISR within one year after stent implantation was larger than that of preoperative miR-140-5p and miR-140-5p difference value (both $P<0.05$). Logistic regression analysis showed that all of the TASC II type, LDL-C and CRP were the independent risk factors for ISR occurring within one year after stent implantation in patients with LEAOD ($P<0.05$), and postoperative miR-140-5p was an independent protective factor for ISR occurring within one year after stent implantation ($P<0.05$).

Conclusion In patients with LEAOD receiving stent implantation, the postoperative miR-140-5p level is well correlated with ISR occurring within one year after treatment, and the detection of its expression level can assist clinicians to make better therapeutic decisions. (J Intervent Radiol, 2022, 31: 555-559)

[Key words] microRNA-140-5p; lower extremity atherosclerotic occlusive disease; in-stent restenosis

下肢动脉硬化闭塞症(lower extremity atherosclerotic occlusive disease, LEAOD)是下肢动脉粥样硬化斑块堵塞血管,致使下肢慢性缺血、缺氧的综合征^[1]。血管内介入治疗作为一种微创术式,已广泛应用于 LEAOD 治疗,可有效改善肢体缺血、缺氧情况^[2]。但经长期临床观察,LEAOD 患者经血管内介入治疗后支架内再狭窄(in-stent restenosis, ISR)发生率较高,普通金属支架 ISR 发生率在 15%~30%,即使应用药物洗脱支架,其 ISR 发生率也在 10%左右^[3]。因此,探究预示 ISR 的指标有着重要意义。目前关于 ISR 病理生理机制还未完全阐明,可能与血管内皮损伤、动脉粥样硬化、炎症、血管平滑肌细胞异常增殖和迁移等有关^[4]。有研究显示,微小核糖核酸(miR)-140-5p 可靶向 toll 样受体 4,抑制氧化型低密度脂蛋白诱发的氧化应激和细胞凋亡,干扰动脉粥样硬化斑块形成^[5],因而认为 miR-140-5p 参与了 LEAOD 支架植入术后 ISR 过程。目前鲜有研究分析 miR-140-5p 与 LEAOD 支架植入术后 ISR 的关系。本研究选取 LEAOD 患者作为研究对象,分析 miR-140-5p 与支架植入术后 1 年内 ISR 的关系,以期对 ISR 预防和治疗提供帮助。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

参照《下肢动脉硬化闭塞症诊治指南》^[6] 诊断 LEAOD,就诊患者有间歇性跛行、静息痛或麻木等症状,踝-肱指数(ABI) <0.9 ,经 CTA 检查确诊为 LEAOD。选取 2019 年 2 月至 2020 年 3 月在山西白求恩医院接受支架植入术治疗的 136 例 LEAOD 患者作为研究对象。纳入标准:①首次确诊为 LEAOD;②符合支架植入手术指征;③年龄 <80 岁;④配合完成研究相关事宜。排除标准:①伴肝、肾功能或凝

血功能异常;②伴大动脉炎、高同型半胱氨酸血症、恶性肿瘤、慢性阻塞性肺疾病或骨关节炎等;③术后未遵医嘱服用抗血小板聚集药物;④临床资料不完整。本研究符合赫尔辛基宣言,所有受试者均签署手术知情同意书,并经医院医学伦理委员会批准。

1.2 支架植入术治疗方案

术前行常规检查,包括血常规、尿常规、血生化、凝血功能等。采用 Seldinger 法穿刺股动脉,CTA 检查后行球囊扩张血管成形术,根据血管病变位置、长度等选择大小适宜的同种类型支架并植入,然后依次撤出导丝、导管,最后拔出动脉止血鞘管,局部加压止血。术后口服氯吡格雷(75 mg/d)和阿司匹林(100 mg/d)6 个月,此后口服阿司匹林。

1.3 临床指标和随访

收集患者年龄、性别、体质指数(BMI)、糖尿病史、高血压史、高脂血症史、冠心病史、缺血性脑卒中史、Fontaine 分期、泛大西洋学会联盟(TASC) II 分型、抗血小板聚集药物服用情况、空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和 C 反应蛋白(CRP)等指标。

采用复诊方式了解术后患者 ISR 发生情况,每 6 个月 1 次,共 2 次。行下肢动脉超声检查了解 ISR 和支架脱落等情况,必要时行 CTA 检查。共随访 150 例患者,其中 14 例失访,失访率为 9.3%,未将失访患者纳入研究分析。随访过程中无死亡患者。ISR 定义:原支架植入两端 5 mm 内血管腔内径狭窄 $\geq 50\%$ 。

1.4 miR-140-5p 表达检测

采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)^[7]检测患者血清 miR-140-5p 表达。抽取患者支架植入术前(出院前、术后 7 d)肘部静脉血 10 mL,离心后取上清液,置于 Eppendorf 管(EP)中 -80°C 保存待

验。实验步骤:取出 EP,解冻后用 RNA 提取试剂盒(日本 TaKaRa 公司)提取总 RNA,紫外分光光度计(上海光学仪器五厂有限公司)检测 RNA 纯度,吸光度值比(OD260/280)在 1.9~2.0;取 2 μ g RNA,用反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)将其转录为 cDNA;用 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 科技公司)扩增 cDNA,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 60 s,35 个循环,60 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 60 s。选取 10 名年龄、性别与 LEAOD 患者匹配的健康体检者作为对照,2-DDCt 法计算 LEAOD 患者 miR-140-5p 相对表达量。miR-140-5p 和内参 U6 序列见表 1。

表 1 引物序列

名称	序列
miR-140-5p	上游:5'-AGGTACCAGAACAAGGCTAAGCAAAGG-3' 下游:5'-CAAGCTTATGAAATCATTCCACACAAGC-3'
U6	上游:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' 下游:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.5 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件包进行统计学分析。计量资料行 Shapiro-Wilk 检验,正态分布的以均数 \pm 标准差表示,两组间比较用独立样本 t 检验;非正态分布的以 $M(P_{25},P_{75})$ 表示,两组间比较用 Mann-Whitney U 检验;两组间术前、术后 miR-140-5p 相对表达水平比较用重复测量方差分析。计数资料以例(%)表示,两组间比较用 χ^2 检验。采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve,ROC)评价 miR-140-5p 预判支架植入术后 1 年内 ISR 的价值,logistic 回归分析 miR-140-5p 与支架植入术后 1 年内 ISR 的关系。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LEAOD 患者临床特征

136 例 LEAOD 患者中男 88 例,女 48 例;年龄 50~78(59.9 \pm 6.1)岁;BMI 为(23.8 \pm 2.6) kg/m²;有高血压史 68 例,糖尿病史 38 例,高脂血症史 106 例,冠心病史 37 例,缺血性脑卒中史 32 例;血管病变均位于股腘动脉段;Fontaine 分期 II 期 10 例,III 期 88 例,IV 期 38 例;TASC II 分型 A 型 81 例,B 型 39 例,C 型 16 例。支架植入术后 1 年内有 52 例(38.24%)发生 ISR (ISR 组),84 例(61.76%)未发生 ISR(非 ISR 组)。

2.2 两组临床特征比较

两组患者年龄、性别构成比,BMI、高血压史、糖尿病史、高脂血症史、冠心病史、缺血性脑卒中史占比,Fontaine 分期构成比差异无统计学意义(均 $P>$

0.05)。ISR 组 TASC II 分型 B+C 型占比高于非 ISR 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组临床特征比较

参数	ISR 组 (n=52)	非 ISR 组 (n=84)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	60.0 \pm 6.0	59.9 \pm 6.2	0.151	0.880
男性(n)	29	59	2.944	0.086
BMI(kg/m ²)	23.53 \pm 2.55	23.92 \pm 2.55	0.877	0.382
高血压史(n)	24	44	0.498	0.480
糖尿病史(n)	17	21	0.944	0.331
高脂血症史(n)	41	65	0.040	0.841
冠心病史(n)	13	24	0.207	0.649
缺血性脑卒中史(n)	11	21	0.264	0.607
Fontaine 分期(n)			1.995	0.369
II	4	6		
III	30	58		
IV	18	20		
TASC II 分型(n)			15.593	<0.01
A	20	61		
B	23	16		
C	9	7		

2.3 两组实验室指标比较

两组患者 FBG、TC、TG、HDL-C 水平差异无统计学意义(均 $P>0.05$),ISR 组 LDL-C、CRP 水平高于非 ISR 组(均 $P<0.05$),见表 3。

表 3 两组实验室指标比较

参数	ISR 组 (n=52)	非 ISR 组 (n=84)	t 值	P 值
FBG(mmol/L)	6.44 \pm 0.98	6.34 \pm 0.94	0.616	0.539
TC(mmol/L)	4.44 \pm 1.16	4.61 \pm 1.13	0.841	0.402
TG(mmol/L)	1.94 \pm 0.21	1.92 \pm 0.38	0.492	0.623
LDL-C(mmol/L)	3.85 \pm 0.51	3.37 \pm 0.49	4.325	<0.01
HDL-C(mmol/L)	1.07 \pm 0.21	1.10 \pm 0.19	0.903	0.368
CRP(mg/L)	11.05 \pm 3.11	7.76 \pm 2.03	6.803	<0.01

2.4 两组 miR-140-5p 相对表达比较

两组间 miR-140-5p 相对表达水平差异有统计学意义($F=42.316,P<0.001$);ISR 组 miR-140-5p 相对表达水平在术前、术后均低于非 ISR 组(均 $P<0.05$),术前与术后差异有统计学意义($F=467.020,P<0.01$);两组术后 miR-140-5p 相对表达水平平均分别高于术前(均 $P<0.05$),其时间与 ISR 间存在交互效应($F=6.158,P=0.014$);ISR 组 miR-140-5p 相对表达升高程度低于非 ISR 组($P<0.05$),见表 4。

2.5 miR-140-5p 预判支架植入术后 1 年内 ISR 价值

术前 miR-140-5p、术后 miR-140-5p、miR-140-5p 差值预判支架植入术后 1 年内 ISR 的 ROC 曲线下面积(AUC)、最佳截断点、灵敏度、特异度,分别为 0.639(95%CI:0.542~0.736)、0.58、48.08%、78.57%,0.824(95%CI:0.757~0.892)、0.94、80.77%、70.24%,

表 4 两组 miR-140-5p 相对表达比较

时间	ISR 组 (n=52)	非 ISR 组 (n=84)	t/z 值	P 值
术前	0.62±0.10	0.67±0.11	2.648	0.009
术后	0.85±0.09	0.96±0.08	7.149	<0.01
差值	0.22 (0.14, 0.30)	0.29 (0.19, 0.38)	2.298	0.022

0.617 (95%CI: 0.520~0.715)、0.28、71.15%、52.38%。术前 miR-140-5p 与 miR-140-5p 差值间预判支架植入术后 1 年内 ISR 的 AUC 差异无统计学意义 ($Z=0.234, P=0.815$)，术后 miR-140-5p 预判支架植入术后 1 年内 ISR 的 AUC 高于术前 miR-140-5p ($Z=3.012, P=0.003$)、miR-140-5p 差值 ($Z=5.274, P<0.01$)，见图 1。

2.6 支架植入术后 1 年内 ISR logistic 回归分析

将支架植入术后 1 年内是否发生 ISR 作为因变量，性别、TASC II 分型、LDL-C、CRP 和术后 miR-140-5p 作为自变量 (纳入标准为 $P<0.10$ ，赋值见表 5) 纳入多因素 logistic 回归分析，结果显示 TASC II 分型、LDL-C、CRP 是 LEAOD 患者支架植入术后 1 年内 ISR 的独立危险因素 (均 $P<0.05$)，术后 miR-140-5p 是术后 1 年内 ISR 的独立保护因素 ($P<0.05$)，见表 6。

表 5 自变量赋值情况

自变量	赋值
ISR	非 ISR=0, ISR=1
性别	女=0, 男=1
TASC II 分型	A=0, B=1, C=2
LDL-C	原始值录入
CRP	原始值录入
术后 miR-140-5p	原始值录入

表 6 logistic 回归分析支架植入术后 1 年内 ISR 结果

变量	系数值	标准误	卡方值	P 值	OR	95%CI
性别	-0.314	0.538	0.342	0.559	0.730	0.254~2.096
TASC II 分型	1.184	0.412	8.251	0.004	3.269	1.457~7.335
LDL-C	1.016	0.412	6.080	0.014	2.762	1.232~6.195
CRP	0.392	0.107	13.473	<0.01	1.481	1.201~1.826
术后 miR-140-5p	-2.422	0.575	17.742	<0.01	0.089	0.029~0.274

3 讨论

ISR 严重影响着 LEAOD 介入治疗预后，是临床急需解决的问题之一。探究预示 ISR 的指标有着重要意义。目前已有多数 miRNA 被报道参与了 LEAOD 发病和进展过程，如 miR-342-5p、miR-29a 和 miR-143^[8-10]等。本研究主要分析 miR-140-5p 与 LEAOD 患者支架植入术后 1 年内 ISR 的关系，结果显示 ISR 发生率为 38.24%，与徐永平等^[11]研究结果 (33.82%) 接近；ISR 组术前和术后 miR-140-5p 相对表达均低于非 ISR 组，两组术后相对表达均高于术前，ISR 组升高程度低于非 ISR 组，提示 miR-140-5p 与 LEAOD 患者支架植入术后 1 年内 ISR 有关，或可作为辅助预判 ISR 的潜在生物标志物；ROC 曲线分析结果显示术后 miR-140-5p 预判支架植入术后 1 年内 ISR 的 AUC、灵敏度、特异度分别为 0.824、80.77%、70.24%，其预判价值高于术前 miR-140-5p 和 miR-140-5p 差值，提示术后 miR-140-5p 对于 LEAOD 患者支架植入术后 1 年内 ISR 有一定预判价值，可辅助用于 ISR 诊断。

进一步采用 logistic 回归分析显示，术后 miR-140-5p 是 LEAOD 患者支架植入术后 1 年内 ISR 的独立保护因素。推测其原因：miR-140-5p 可靶向 toll 样受体 4，抑制氧化型低密度脂蛋白诱发的氧化应激和细胞凋亡，干扰动脉粥样硬化斑块形成，其表达水平与动脉粥样硬化斑块形成有关，进而反映支架植入术后 1 年内 ISR 情况；miR-140-5p 还被报道参与多种炎症性疾病，如骨关节炎^[12]、脑出血诱发的神经炎症^[13]等，其可能通过调节炎症反应参与 ISR 发生过程，因此其表达水平可反映 ISR 发生情况。本研究结果还显示 TASC II 分型、LDL-C 和 CRP 均为 LEAOD 患者支架植入术后 1 年内 ISR 的独立危险因素，与既往一些研究结果一致^[14-16]；糖尿病与

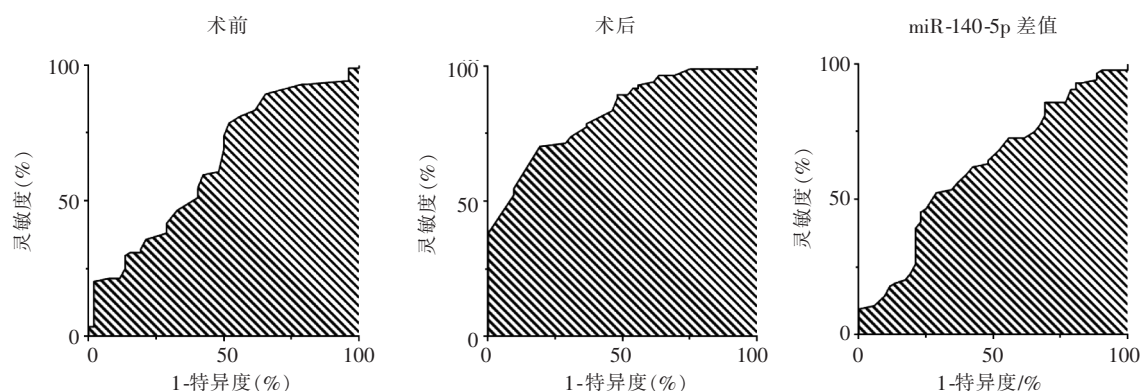


图 1 miR-140-5p 预判支架植入术后 1 年内 ISR 的 AUC

术后 1 年内 ISR 无关,与上述研究结果不一致,推测可能与样本量大小、区域等因素有关,还需开展大样本、多中心研究予以验证。支架植入数量和支架直径等因素也或与 ISR 有关,但本研究未纳入这些因素进行分析,原因在于支架植入数量取决于患者血管病变支数,支架直径取决于血管狭窄程度,而 TASC II 分型包含上述内容。

本研究尚存在一定不足,仅分析了术前、术后 miR-140-5p 与 LEAOD 患者支架植入术后 1 年内 ISR 的关系,未确定最佳时点的 miR-140-5p 用于诊断。对于接受球囊扩张治疗患者术后 miR-140-5p 是否可用于 ISR 评价仍未可知,还需开展研究予以验证。本研究结果与既往研究结果有略微差异,后续将开展大样本、多中心研究进行验证分析。

[参考文献]

- [1] Bai J, Wang F, Wang X, et al. Expression and clinical significance of HSP27 and its phosphorylation in lower extremity arteriosclerosis obliterans[J]. PeerJ, 2020, 8: e9305.
- [2] Ren HC, Zhuang JM, Li X, et al. Avoiding revascularization strategy versus revascularization with drug-coated balloon for the treatment of superficial femoral artery occlusive disease[J]. J Intervent Med, 2021, 4: 87-93.
- [3] Kim MS, Dean LS. In-stent restenosis[J]. Cardiovasc Ther, 2011, 29: 190-198.
- [4] Kokkinidis DG, Waldo SW, Armstrong EJ. Treatment of coronary artery in-stent restenosis[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2017, 15: 191-202.
- [5] Liu H, Mao Z, Zhu J, et al. MiR-140-5p inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced oxidative stress and cell apoptosis via targeting toll-like receptor 4[J]. Gene Ther, 2021, 28: 413-421.
- [6] 中华医学会外科学分会血管外科学组. 下肢动脉硬化闭塞症诊治指南[J]. 中华医学杂志, 2015, 95: 1883-1896.
- [7] Wang Y, Shen S, Li Z, et al. MIR-140-5p affects chondrocyte proliferation, apoptosis, and inflammation by targeting HMGB1 in osteoarthritis[J]. Inflamm Res, 2020, 69: 63-73.
- [8] 杜自忠,王晨,张明星,等. 下肢动脉硬化闭塞症患者介入治疗后血清 miR-342-5p 水平及其意义[J]. 介入放射学杂志, 2020, 29: 894-898.
- [9] Wang K, Yu J, Wang B, et al. miR-29a regulates the proliferation and migration of human arterial smooth muscle cells in arteriosclerosis obliterans of the lower extremities[J]. Kidney Blood Press Res, 2019, 44: 1219-1232.
- [10] Yu ZH, Wang HT, Tu C. Diagnostic value of microRNA-143 in predicting in-stent restenosis for patients with lower extremity arterial occlusive disease[J]. Eur J Med Res, 2017, 22: 2.
- [11] 徐永平,陈伟彬,陈俊卯,等. 下肢动脉硬化闭塞症患者外周血单个核细胞中 CBX3 水平与介入术后 1 年内支架内再狭窄的关系[J]. 山西医科大学学报, 2020, 51: 999-1004.
- [12] Wang Z, Hu J, Pan Y, et al. miR-140-5p/miR-149 affects chondrocyte proliferation, apoptosis, and autophagy by targeting FUT1 in osteoarthritis[J]. Inflammation, 2018, 41: 959-971.
- [13] Wang S, Cui Y, Xu J, et al. miR-140-5p attenuates neuroinflammation and brain injury in rats following intracerebral hemorrhage by targeting TLR4[J]. Inflammation, 2019, 42: 1869-1877.
- [14] 陈懿,陆舜钦. 下肢动脉粥样硬化闭塞症患者 C 型凝集素样受体-2 水平与介入术后 2 年支架内再狭窄的关系[J]. 介入放射学杂志, 2021, 30: 498-501.
- [15] 曾仲衍,李嘉宏,黄敏捷,等. 下肢动脉硬化闭塞经介入治疗后再狭窄的危险因素分析[J]. 福建医药杂志, 2020, 42: 51-55.
- [16] 周欣峰,戚韶红,周俊文,等. 血清 sTREM-1 对下肢动脉硬化闭塞症支架植入术后血管再狭窄的预测价值[J]. 山东医药, 2020, 60: 18-22.

(收稿日期:2021-08-25)

(本文编辑:边 伟)