

· 临床研究 ·

血管生成素样蛋白-2在急性冠脉综合征患者中的表达及其临床意义

左广锋 谢浩 任晓敏 葛清 金国珍 朱琳琳

【摘要】 目的:探讨急性冠脉综合征(ACS)患者血清中促炎性因子血管生成素样蛋白-2(Angptl-2)的表达及其临床意义。**方法:**采用酶联免疫吸附方法(ELISA)检测182例ACS患者和30例对照组血清中Angptl-2、白细胞介素-6(IL-6)及可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)水平,通过受试者工作特征曲线(ROC)分析血清Angptl-2水平对ACS的诊断价值。人重组Angptl-2蛋白干预人冠状动脉内皮细胞(HCAEC)后,采用蛋白印迹法检测内皮细胞IL-6及ICAM-1的表达。**结果:**ACS患者血清中Angptl-2、IL-6及sICAM-1水平均明显高于对照组($P<0.001$),且急性心肌梗死患者显著高于不稳定型心绞痛患者($P<0.05$)。ROC曲线分析提示Angptl-2水平对ACS具有良好的诊断价值(曲线下面积为0.970),最佳诊断界值为5.77 ng/mL(敏感度为91.8%,特异度为93.3%, $P<0.001$)。人重组Angptl-2蛋白干预HCAEC后,内皮细胞IL-6及ICAM-1蛋白表达均上调($P<0.05$)。**结论:**Angptl-2促进内皮细胞炎性黏附分子表达,其血清水平可作为ACS的诊断标志物。

【关键词】 血管生成素样蛋白-2;急性冠脉综合征;内皮炎性反应

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.01.013

Expression of serum angiopoietin-like protein 2 in patients with acute coronary syndrome and clinical significance ZUO Guangfeng, XIE Hao, REN Xiaomin, GE Qing, JIN Guozhen, ZHU Linlin Department of cardiology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

【Abstract】 Objective: To investigate the expression level and clinical significance of serum angiopoietin-like protein 2 (Angptl-2), which is a kind of serum proinflammatory cytokine, in patients with acute coronary syndrome (ACS). **Methods:** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum Angptl-2, interleukin-6 (IL-6) and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) levels in 182 patients with ACS and 30 controlled cases. Receiver operating characteristic (ROC) curve was constructed to analyze the diagnostic value of Angptl-2 for patients with ACS. Western blot was applied to determine the expression levels of IL-6 and ICAM-1 in human coronary artery endothelial cells (HCAEC) after intervened with recombinant human Angptl-2 protein. **Results:** The expression levels of Angptl-2, IL-6 and sICAM-1 in the serum of ACS patients were significantly higher than those in control group ($P<0.001$). The levels of Angptl-2, IL-6 and sICAM-1 of the patients with acute myocardial infarction were significantly higher than those of patients with unstable angina ($P<0.05$). The results of ROC curve revealed that the Angptl-2 level had a good diagnostic value for ACS (AUC=0.970), and the optimal cut-off value was 5.77 ng/mL with 91.8% sensitivity and 93.3% specificity ($P<0.001$). The protein expression levels of IL-6 and ICAM-1 were up-regulated in HCAEC after intervened with human recombinant Angptl-2 protein ($P<0.05$). **Conclusions:** Angptl-2 promotes the expression level of proinflammatory cytokines in endothelial cell, and the serum Angptl-2 level could be used as a

基金项目:南京市医学科技发展一般性课题(YKK18096)

作者单位:210006 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)心内科

通信作者:朱琳琳, E-mail:zhulinlin_007@sina.com

diagnostic marker for ACS.

【Key words】 Angiotensin-like protein 2; Acute coronary syndrome; Endothelial inflammation

急性冠脉综合征 (ACS) 包括急性 ST 段抬高型心肌梗死、急性非 ST 段抬高性心肌梗死和不稳定型心绞痛 (UAP), 在我国 ACS 病死率和致残率逐年上升, 且日益趋年轻化^[1]。尽管 ACS 治疗已经取得较大进展, 但 ACS 患者的临床结局仍然不乐观^[1-2]。在 ACS 发病过程中, 炎症反应及冠状动脉内皮受损被认为是引起 ACS 的两个重要触发机制^[3]。因此, 抑制促炎性因子表达及改善内皮功能是治疗 ACS 的重要策略。

血管生成素样蛋白 -2 (Angptl-2) 是近年来发现与血管发生相关的分泌型糖蛋白, 在脂肪组织、骨骼肌、心肌、血管、肾脏等组织中广泛表达, 除了调节血管生成外, 还与炎症反应及多种疾病如糖尿病、肿瘤等相关, 已成为心血管领域的研究热点^[4-5]。Horio 等^[6]发现 Angptl-2 在血管内皮细胞炎症反应和动脉粥样硬化性疾病中起重要作用, 但 Angptl-2 能否作为 ACS 诊断标志物, 目前未见报道。本研究检测 ACS 患者血清中 Angptl-2 表达, 初步探讨其在 ACS 诊断中的临床意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象

从 2020 年 6 月 30 日至 2021 年 6 月 30 日, 经排除标准筛选后共有 212 例在院进行冠状动脉造影 (CAG) 的患者连续入选本研究。本研究包括 3 组: UAP 组 98 例, 男性 52 例, 女性 46 例, 年龄 (64.9±10.5) 岁; 急性心肌梗死 (AMI) 组 84 例, 男性 46 例, 女性 38 例, 年龄 (66.5±12.6) 岁; 对照组 30 例, 男性 17 例, 女性 13 例, 年龄 (64.3±11.2) 岁。对照组具有胸闷胸痛或不典型症状, 心肌坏死标志物正常, 且接受诊断性 CAG 证实冠状动脉正常或几乎正常。各组年龄、性别等一般资料比较差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。排除标准: 恶性肿瘤、全身炎症性疾病、严重肝肾功不全、严重室性心律失常、需要手术的严重瓣膜性心脏病等。本研究经我院伦理委员会批准, 所有参与者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 一般临床资料收集 收集患者包括年龄、性别、吸烟、高血压、糖尿病以及血脂异常等危险因素的资料。

1.2.2 病例分析 所有入选者均行 CAG, 结果由 2 位心脏介入医师阅读分析, 冠状动脉中至少有 1 支血管狭窄 $\geq 50\%$, 并结合临床症状、心电图及心肌坏死标志物诊断是 AMI 还是 UAP。

1.2.3 标本采集 所有患者在入院后采集外周静脉血 5 mL, 肝素钠抗凝, 室温静置 30 min, 3 000 转 /min, 离心 15 min, 小心吸取上清, 将上清于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存待用。

1.2.4 酶联免疫吸附试验检测 应用美国 RayBiotech 公司人种属 Angptl-2 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒、英国 abcam 公司人种属白细胞介素 (IL)-6 ELISA 试剂盒及人种属 ICAM-1 ELISA 试剂盒分别检测血清中 Angptl-2、IL-6 及 sICAM-1 的水平。酶标仪型号为 DENIEY DRAGON Wellscan MK 3 (芬兰 Thermo), 分析软件为 Ascent Software for Multiskan。

1.2.5 人冠状动脉内皮细胞培养及干预 人冠状动脉内皮细胞 (HCAEC) 购于武汉普诺赛生命科技有限公司, 应用 HCAEC 完全培养基 (武汉普诺赛) 进行培养传代。人重组 Angptl-2 蛋白 (美国 R&D Systems) 用 PBS 溶解配置成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 母液, 然后分别应用 10 ng/mL、20 ng/mL Angptl-2 干预 HCAEC。选择最佳干预浓度的 Angptl-2 预处理 1 h, 然后再分别处理 4、12 及 24 h, 未经 Angptl-2 干预的 HCAEC 作对照组。

1.2.6 Western Blot 检测 提取 Angptl-2 干预及未干预的 HCAEC 蛋白, 进行电泳及转膜, 然后分别应用 Angptl-2 抗体 (1:200 稀释, R&D Systems)、IL-6 (1:1 000 稀释, 美国 Proteintech) 及 ICAM-1 抗体 (1:5 000 稀释, Proteintech) 进行孵育, 再孵育二抗 (1:1 000 稀释, Cell Signaling Technology)。成像设备型号为 GeneGnome XRQ (英国 Syngene), 分析软件为 ImageJ。

1.3 统计学分析

应用 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用 t 检验或单因素方差分析, 并进行两两比较, 计

数资料用例数和百分比表示,进行卡方检验。通过 MedCalc v20.0.3 软件绘制受试者工作特征曲线 (ROC),评价血清中 Angptl-2 水平对 ACS 的诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较

3 组之间性别、年龄及高血压的比例的差异无统计学意义,而吸烟、血脂异常及糖尿病在 ACS 患

者中的比例显著高于对照组 (P 均 < 0.01),但 AMI 组与 UAP 组之间的差异无统计学意义,见表 1。

2.2 各组血清 Angptl-2、IL-6 及 sICAM-1 水平比较

ACS 组血清中 Angptl-2、IL-6 及 sICAM-1 的水平均显著高于对照组 (P 均 < 0.001),而 AMI 组血清中的 3 种促炎因子的水平均高于 UAP 组 (P 均 < 0.05),见表 2。

表 1 各组一般资料比较

组别	男/女	年龄/岁	吸烟/例 (%)	高血压/例 (%)	血脂异常/例 (%)	糖尿病/例 (%)
对照组	17/13	64.3 ± 11.2	4 (13.3)	13 (43.3)	2 (6.67)	2 (6.67)
UAP 组	52/46	64.9 ± 10.5	28 (28.6) ⁽¹⁾	46 (46.9)	15 (15.3) ⁽¹⁾	20 (20.4) ⁽¹⁾
AMI 组	46/38	66.5 ± 12.6	26 (30.9) ⁽¹⁾	38 (45.2)	13 (15.5) ⁽¹⁾	19 (22.6) ⁽¹⁾

注:与对照组相比,⁽¹⁾ $P < 0.01$

表 2 各组血清中 Angptl-2、IL-6 及 sICAM-1 水平

检测指标	Angptl-2/ng · mL ⁻¹	IL-6/pg · mL ⁻¹	sICAM-1/ng · mL ⁻¹
对照组	2.50 ± 1.08	7.10 ± 1.54	128.44 ± 40.11
UAP 组	7.53 ± 1.38 ⁽¹⁾	11.37 ± 2.06 ⁽¹⁾	259.63 ± 50.83 ⁽¹⁾
AMI 组	12.15 ± 1.13 ^{(1) (2)}	14.56 ± 2.25 ^{(1) (2)}	312.29 ± 45.25 ^{(1) (2)}

注:与对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.001$;与UAP组比较,⁽²⁾ $P < 0.05$

2.3 Angptl-2 对 ACS 的诊断价值

ROC 曲线分析显示,血清 Angptl-2 水平对 ACS 具有良好的诊断价值,最佳界值为 5.77 ng/mL,敏感度为 91.8%,特异度为 93.3%,曲线下面积为 0.970 (95% CI: 0.937 ~ 0.988, $P < 0.001$),见图 1。

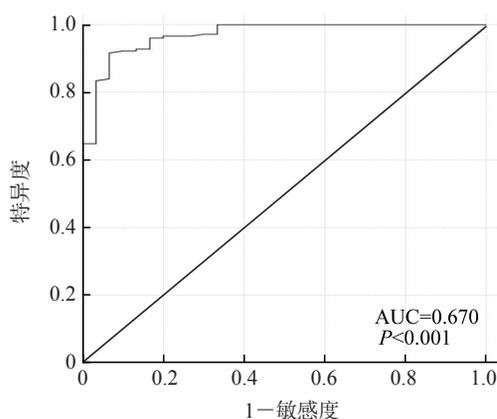


图 1 ROC 曲线评价 Angptl-2 对 ACS 的诊断价值

2.4 Angptl-2 刺激人冠状动脉内皮细胞后 IL-6 及 ICAM-1 表达上调

采用蛋白印迹法检测不同浓度人 Angptl-2 重组蛋白干预及未干预的 HCAEC 中 Angptl-2 的表达水平,显示 Angptl-2 蛋白表达水平在 Angptl-2 干预后明显高于对照组 (P 均 < 0.01),见表 3。Angptl-2 干预 HCAEC 后,IL-6 及 ICAM-1 蛋白表达水平呈时间及浓度依赖性升高 ($P < 0.05$),见表 4、表 5。

表 3 不同浓度人重组 Angptl-2 蛋白干预 HCAEC 后 Angptl-2 蛋白表达水平比较

组别	Angptl-2/β-actin
对照组	1.05 ± 0.13
10 ng/mL Angptl-2	1.72 ± 0.24 ⁽¹⁾
20 ng/mL Angptl-2	2.23 ± 0.20 ^{(1) (2)}

注:与对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.01$;与10 ng/mL Angptl-2组比较,⁽²⁾ $P < 0.05$

表 4 人重组 Angptl-2 蛋白 (20 ng/mL) 干预 HCAEC 不同时间后 IL-6 及 ICAM-1 蛋白表达水平比较

检测时间	IL-6/ β -actin	ICAM-1/ β -actin
0 h	1.09 \pm 0.09	1.13 \pm 0.12
4 h	1.22 \pm 0.14	1.29 \pm 0.15
12 h	1.79 \pm 0.21 ^{(1) (2)}	1.72 \pm 0.17 ^{(1) (2)}
24 h	2.09 \pm 0.25 ^{(1) (2) (3)}	2.01 \pm 0.22 ^{(1) (2) (3)}

注：与 0 h 组比较，⁽¹⁾ $P < 0.01$ ；与 4 h 组比较，⁽²⁾ $P < 0.01$ ；与 12 h 组比较，⁽³⁾ $P < 0.05$

表 5 不同浓度人重组 Angptl-2 蛋白干预 HCAEC 24 h 后 IL-6 及 ICAM-1 蛋白表达水平比较

Angptl-2	IL-6/ β -actin	ICAM-1/ β -actin
0 ng/mL	1.07 \pm 0.08	1.05 \pm 0.09
10 ng/mL	1.70 \pm 0.20 ⁽¹⁾	1.63 \pm 0.18 ⁽¹⁾
20 ng/mL	2.05 \pm 0.22 ^{(1) (2)}	2.03 \pm 0.24 ^{(1) (2)}

注：与 0 ng/mL 组比较，⁽¹⁾ $P < 0.01$ ；与 10 ng/mL 组比较，⁽²⁾ $P < 0.05$

3 讨论

炎症反应及内皮受损被认为是触发 ACS 形成的两个重要机制^[7-8]。因此，检测血清中炎症因子水平有助于诊断和预测 ACS 的发生、发展和预后，而抑制促炎性因子表达及改善内皮功能是治疗 ACS 的重要策略。

Angptl-2 是近年来发现的一组与血管发生相关的分泌型糖蛋白，由 493 个氨基酸组成，属于 Angptl (1-8) 家族成员，与血管生成素有很高的同源性结构域^[9]。Angptl-2 作为促炎性因子参与炎症反应，其过表达会诱导血管炎症反应、巨噬细胞浸润增加和炎症细胞因子（如 IL-6）表达增加^[10]。动物实验表明 Angptl-2 诱导内皮细胞衰老及凋亡，造成内皮受损，促进动脉粥样硬化，而敲除 Angptl-2 后可明显改善内皮功能，抑制粥样斑块进展^[11]。本研究通过检测 ACS 患者及对照组血清中 Angptl-2 的水平，发现 Angptl-2 在 ACS 患者血清中的水平明显高于对照组，而 AMI 患者则高于 UAP 患者，ROC 曲线分析显示血清 Angptl-2 水平对 ACS 有良好的诊断价值。这些结果表明，检测血清中 Angptl-2 的水平有助于 ACS 的临床诊断。

Angptl-2 促进 IL-6 表达已经在多种疾病中被报道^[10-12]。IL-6 在 ACS 的发生、发展过程中起重要作用，其介导白细胞黏附，削弱斑块处纤维帽，增

加并促进斑块的不稳定性，加速斑块裂隙发生，最终导致斑块破裂、血栓形成^[13]。ICAM-1 主要表达于内皮细胞，在内皮受损时介导白细胞-血管壁黏连，参与动脉粥样硬化形成^[14]。本研究发现 ACS 患者血清中 IL-6、ICAM-1 水平较对照组明显升高。在体外 Angptl-2 干预 HCAEC 后，IL-6 及 ICAM-1 蛋白水平均明显上调，据此推测 Angptl-2 促进 IL-6 和 ICAM-1 表达增加，引起内皮受损，最终触发 ACS。

检测血清中 Angptl-2 水平具有十分重要的临床意义，可作为 ACS 早期诊断的血清标志物。然而，本研究样本量较少，结论还需要随机对照研究进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Corbett SJ, Ftouh S, Lewis S, et al. Acute coronary syndromes of updated NICE guidance[J]. *BMJ*, 2021, 372:m4760.
- [2] Crea F, Libby P. Acute coronary syndromes: the way forward from mechanisms to precision treatment[J]. *Circulation*, 2017, 136(12):1155-1166.
- [3] Wu S, Sun H, Sun B. MicroRNA-145 is involved in endothelial cell dysfunction and acts as a promising biomarker of acute coronary syndrome[J]. *Eur J Med Res*, 2020, 25(1):2.
- [4] Thorin-Trescases N, Thorin E. High circulating levels of ANGPTL2: beyond a clinical marker of systemic inflammation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:1096385.
- [5] Yoshinaga T, Niou T, Niihara T, et al. Angiotensin-like protein 2 is a useful biomarker for pancreatic cancer that is associated with type 2 diabetes mellitus and inflammation[J]. *J Cancer*, 2018, 9(24):4736-4741.
- [6] Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, et al. Role of endothelial cell-derived angptl2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4):790-800.
- [7] Liu H, Li G, Zhao W, et al. Inhibition of miR-92a may protect endothelial cells after acute myocardial infarction in rats: role of KLF2/4[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22:2451-2462.
- [8] Jeong HS, Hong SJ, Cho SA, et al. Comparison of ticagrelor versus prasugrel for inflammation, vascular function, and circulating endothelial progenitor cells in diabetic patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome requiring coronary stenting: a prospective, randomized, crossover trial[J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2017, 10(16):1646-1658.
- [9] Tang C, Chen E, Peng K, et al. Mining the role of angiotensin-like protein family in gastric cancer and seeking potential therapeutic targets by integrative bioinformatics analysis[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(13):4850-4863.
- [10] Wu Z, Liu J, Chen G, et al. CD146 is a novel ANGPTL2 receptor that promotes obesity by manipulating lipid metabolism and energy expenditure[J]. *Adv Sci (Weinh)*,

2021, 8(6):2004032.

[11] Caland L, Labbé P, Mamarbachi M, et al. Knockdown of angiotensin-like 2 induces clearance of vascular endothelial senescent cells by apoptosis, promotes endothelial repair and slows atherogenesis in mice[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(11):3832-3850.

[12] Sugimoto K, Nakamura T, Tokunaga T, et al. Angiotensin-like protein 2 induces synovial inflammation in the facet joint leading to degenerative changes via interleukin-6 secretion[J]. Asian Spine J, 2019, 13(3):368-376.

[13] Gager GM, Biesinger B, Hofer F, et al. Interleukin-6 level is a powerful predictor of long-term cardiovascular mortality in patients with acute coronary syndrome[J]. Vascul Pharmacol, 2020, 135:106806.

[14] Ma CY, Xu ZY, Wang SP, et al. Change of inflammatory factors in patients with acute coronary syndrome[J]. Chin Med J (Engl), 2018, 131(12):1444-1449.

(收稿:2021-09-02 修回:2021-11-03)
(本文编辑:丁媛媛)

(上接第 40 页)

[37] Canaud L, Alric P, Desgranges P, et al. Factors favoring stent-graft collapse after thoracic endovascular aortic repair[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010, 139(5):1153-1157.

[38] Kasirajan K, Dake MD, Lumsden A, et al. Incidence and outcomes after infolding or collapse of thoracic stent grafts[J]. J Vasc Surg, 2012, 55(3):652-658.

[39] Konstantinou N, Banafsche R, Mehmedovic A, et al. Balloon-assisted true lumen expansion and fenestration of a symptomatic, triple-barrel, post-dissection thoracoabdominal aneurysm with collapsed true lumen to facilitate endovascular treatment with a t-Branch[J]. Ann Vasc Surg, 2021, 74:521.e15-521.e21.

(收稿:2021-05-10 修回:2021-11-07)
(本文编辑:丁媛媛)

**To cure sometimes,
to relieve often,
to comfort always.**

—Edward Livingston Trudeau

有时，去治愈，
常常，去帮助，
总是，去安慰。

—爱德华·利文斯顿·特鲁多

