

## · 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 促进内皮细胞炎症黏附分子表达,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;内皮炎症反应

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 controled 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】** Angiopoietin-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<sup>[1]</sup>。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<sup>[1-2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。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<sup>[4-5]</sup>。Horio 等<sup>[6]</sup>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 ( $64.9 \pm 10.5$ ) 岁; 急性心肌梗死 (AMI) 组 84 例, 男性 46 例, 女性 38 例, 年龄 ( $66.5 \pm 12.6$ ) 岁; 对照组 30 例, 男性 17 例, 女性 13 例, 年龄 ( $64.3 \pm 11.2$ ) 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、严重肝肾功能不全、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  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$  母液, 然后分别应用  $10\text{ ng/mL}$ 、 $20\text{ ng/mL}$  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 ( $1:1\text{ }000$  稀释, 美国 Proteintech) 及 ICAM-1 抗体 ( $1:5\text{ }000$  稀释, Proteintech) 进行孵育, 再孵育二抗 ( $1:1\text{ }000$  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) <sup>(1)</sup>	46 (46.9)	15 (15.3) <sup>(1)</sup>	20 (20.4) <sup>(1)</sup>
AMI组	46/38	66.5±12.6	26 (30.9) <sup>(1)</sup>	38 (45.2)	13 (15.5) <sup>(1)</sup>	19 (22.6) <sup>(1)</sup>

注:与对照组相比,<sup>(1)</sup> $P<0.01$

表 2 各组血清中 Angptl-2、IL-6 及 sICAM-1 水平

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

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

### 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。

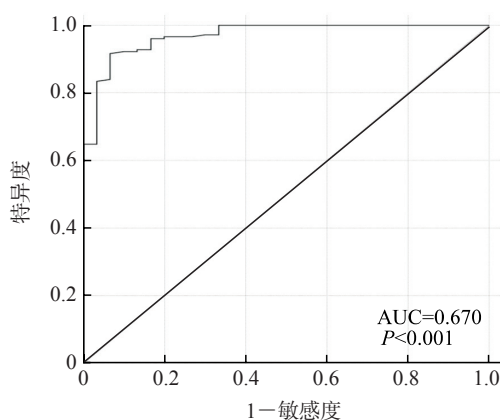


图 1 ROC 曲线评价 Angptl-2 对 ACS 的诊断价值

### 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 <sup>(1)</sup>
20 ng/mL Angptl-2	2.23±0.20 <sup>(1)(2)</sup>

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

**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/ $\beta$ -actin	ICAM-1/ $\beta$ -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 <sup>(1) (2)</sup>	1.72 $\pm$ 0.17 <sup>(1) (2)</sup>
24 h	2.09 $\pm$ 0.25 <sup>(1) (2) (3)</sup>	2.01 $\pm$ 0.22 <sup>(1) (2) (3)</sup>

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

**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/ $\beta$ -actin	ICAM-1/ $\beta$ -actin
0 ng/mL	1.07 $\pm$ 0.08	1.05 $\pm$ 0.09
10 ng/mL	1.70 $\pm$ 0.20 <sup>(1)</sup>	1.63 $\pm$ 0.18 <sup>(1)</sup>
20 ng/mL	2.05 $\pm$ 0.22 <sup>(1) (2)</sup>	2.03 $\pm$ 0.24 <sup>(1) (2)</sup>

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

### 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<sup>[7-8]</sup>。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<sup>[9]</sup>。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性反应、巨噬细胞浸润增加和炎症细胞因子（如 IL-6）表达增加<sup>[10]</sup>。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<sup>[11]</sup>。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<sup>[10-12]</sup>。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<sup>[13]</sup>。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<sup>[14]</sup>。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. Angiopoietin-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 angiopoietin-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),



- (收稿:2021-09-02 修回:2021-11-03)

(本文编辑:丁媛媛)

(上接第 40 页)

- (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

