

· 综 述 ·

胰岛素样生长因子结合蛋白-4 作为动脉粥样硬化易损斑块标志物的研究进展

代新春¹, 曹丰^{2,3*}

(¹ 空军军医大学第一附属医院心血管内科, 西安 710032; ² 解放军总医院第二医学中心, ³ 国家老年疾病临床医学研究中心, 北京 100853)

【摘 要】 动脉易损斑块是导致主要不良心血管事件(MACEs)的重要危险因素,对易损斑块的早期准确评估及有效干预具有重要的临床意义。胰岛素样生长因子结合蛋白-4(IGFBP-4)是妊娠相关蛋白-A(PAPP-A)在易损斑块中水解的底物,可介导局部胰岛素样生长因子(IGF)释放,加速动脉粥样硬化斑块的进展,是易损斑块重要的生物标志物之一。易损斑块是急性冠脉综合征(ACS)的病理基础,是目前心血管领域的研究热点,本文综述了IGFBP-4在易损斑块发生发展中的作用及其判断易损斑块和预测MACEs的潜在作用。

【关键词】 胰岛素样生长因子结合蛋白-4;急性冠脉综合征;金属蛋白酶

【中图分类号】 R541.4

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.01.013

Research progress on insulin-like growth factor-binding protein-4 as a marker of vulnerable atherosclerotic plaque

DAI Xin-Chun¹, CAO Feng^{2,3*}

(¹Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Air force Medical University, Xi'an 710032, China; ²the Second Medical Center of Chinese PLA General Hospital, ³National Clinical Research Center for Geriatric Diseases, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Vulnerable plaque is one of the important risk factors for major adverse cardiovascular events, and its early detection and effective intervention are of great clinical significance. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) is a substrate of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in vulnerable plaques and mediates the release of IGF, which is likely to accelerate atherogenesis. Thus, IGFBP-4 serves as one of the important biomarkers of vulnerable plaque. Vulnerable plaque is the pathogenic basis of acute coronary syndrome and a much sought-after focus in cardiovascular field. In this article, we reviewed the role of IGFBP-4 in the development of vulnerable plaque and its potential in assessing plaque vulnerability and major adverse cardiovascular events.

【Key words】 insulin-like growth factor-binding protein 4; acute coronary syndrome; metalloproteinase

This work was supported by National Natural Science Foundation of China(81530058).

Corresponding author: CAO Feng, E-mail: fengcao8828@163.com

我国心脑血管疾病的死亡率已跃居各类疾病之首,而且无论城市还是农村,冠心病发病率和死亡率都逐年攀升,早期防治刻不容缓。主要不良心血管事件(major adverse cardiovascular events, MACEs)的预测与评估是研究冠心病致病危险因素与发病率、死亡率之间依存关系及规律的关键,是进行疾病防治的核心环节。冠状动脉易损斑块是MACEs的主要危险因素,早期识别易损斑块并给予干预措施或积极治疗,能够减少MACEs的发生。识别易损斑块

不仅需要通过成像、超声等技术描述冠状动脉粥样硬化斑块的结构特征,也需通过血清生化标志物评估斑块的功能特性。根据斑块大小、纤维帽厚度、斑块内坏死和钙化水平、血管成像、超声等影像结果可准确描述斑块的即时参数,但评估斑块破裂风险和预测MACEs有很大的局限性。临床亟需能够早期、准确、快速评估不稳定斑块的生化标志物,从而有效地预防MACEs。近年国外学者认为胰岛素样生长因子结合蛋白-4(insulin-like growth factor binding

收稿日期: 2018-10-08; 接受日期: 2018-10-27

基金项目: 国家自然科学基金(81530058)

通信作者: 曹丰, E-mail: fengcao8828@163.com

protein-4, IGFBP-4)能够反映冠状动脉不稳定斑块的负荷,预测 MACEs 具有较高的灵敏度和特异度,是一种新的非创伤性生化标志物,为此本文综述了 IGFBP-4 作为标志物的研究进展。

1 易损斑块的特征

1.1 易损斑块的定义

易损斑块又称不稳定斑块,指容易破裂、易形成血栓且进展迅速、极有可能发展成“罪犯斑块”的动脉粥样硬化斑块。其病理特征为纤维帽薄,脂质坏死核心大,富含巨噬细胞和其他炎性白细胞,少量动脉平滑肌细胞,斑点状钙化,血管正性扩张重塑等^[1]。易损斑块的病理学形成机制包括脂质驱动机制、细胞外基质降解机制、炎症机制、血管生成机制、斑块切应力机制、斑块侵蚀机制、钙化机制,机制间相互影响,各个因素相互作用^[2]。

1.2 易损斑块的炎性机制

从稳定斑块到易损斑块,炎性反应在其中起至关重要的作用。损伤反应早期,炎症细胞被激活,并迁移到斑块局部,通过合成大量基质金属蛋白酶,抑制胶原纤维合成及促进降解,介导平滑肌细胞凋亡,使纤维帽变薄;另一方面吞噬脂质的泡沫细胞不断死亡,促进脂质核心扩大,最终导致斑块破裂和诱发血栓形成^[3]。炎性反应是易损斑块的重要病理特征,检测炎性因子可早期识别易损斑块,对急性冠脉综合征的危险分层进行评估以及预测未来 MACEs。目前研究较为广泛的炎性标志物有 C-反应蛋白、脂蛋白相关磷脂酶 A2、白介素-6、白介素-8、基质金属蛋白酶 9、妊娠相关蛋白-A (pregnancy-associated plasma protein-A, PAPP-A)、髓过氧化物酶等^[3]。

1.3 PAPP-A 与易损斑块

2001 年 Bayes-Genis 等^[4]在新英格兰医学杂志发表文章,通过免疫组化发现 PAPP-A 在不稳定冠状动脉粥样硬化斑块中大量表达,并且集中在炎症反应区,而在稳定斑块中几乎不表达。进一步有学者在转基因和基因敲除小鼠模型中也证实 PAPP-A 直接参与动脉粥样硬化的病理生理过程^[5,6]。大量临床研究^[7]提示 PAPP-A 与易损斑块密切相关,检测 PAPP-A 可早期识别急性冠脉综合征高危患者和预测 MACEs。

2 IGFBP-4 在易损斑块进展中的机制

易损斑块的炎性反应中,PAPP-A 通过 IGFBP-4 发挥作用。IGFBP-4 是胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 信号通路中一种重要的抑制

因子,主要通过 IGF 结合并调节生物活性来发挥功能,IGFBP-4 高亲和力结合 IGF,结合物没有生理活性,因此能够阻止 IGF 介导的附着于细胞表面的 IGF 受体激活,而水解 IGFBP-4 则能够引起 IGF 释放,激活 IGF 受体。体外实验中,PAPP-A 能够在蛋氨酸-135/赖氨酸-136 位点分解 IGFBP-4 为两个蛋白:NT-IGFBP-4(氨基酸 1~135, *Mr* 14 628)和 CT-IGFBP-4(氨基酸 136~237, *Mr* 11 345),并且这种分解需在 IGFBP-4 与 IGF-1 或 IGF-2 结合的情况下发生,两个产物与 IGF 的结合力很弱^[8-10]。PAPP-A、IGFBP-4 与 IGF-1/IGF-1 受体构成一个信号传导系统,三者之间的动态平衡构成了 IGF 轴。在动脉粥样硬化斑块中,PAPP-A 水解 IGFBP-4,引起局部 IGF 浓度升高,通过刺激细胞增殖、促进巨噬细胞活化、摄取低密度脂蛋白、释放炎性因子导致斑块不稳定^[11,12]。基于 PAPP-A 积极参与动脉粥样硬化的发生发展,在不稳定动脉粥样斑块中切割 IGFBP-4 并释放水解产物入循环中,因此对代谢产物的定量检测可作为一种间接测定 PAPP-A 浓度的方式,进而用于易损斑块的识别。目前两项研究^[13,14]结果表明循环中 PAPP-A 与 NT-IGFBP-4、CT-IGFBP-4 水平呈正相关,提示 NT-IGFBP-4 和 CT-IGFBP-4 能够反映不稳定斑块中 PAPP-A 的酶活性。

3 IGFBP-4 蛋白对急性冠脉综合征预后的预测

Postnikov 等^[15]收集研究了 180 例伴有心肌缺血症状但无 ST 段抬高急诊患者的抗凝血浆,并追踪 6 个月的 MACEs,发现 NT-IGFBP-4 与 CT-IGFBP-4 可作为心肌缺血患者 MACEs 的预测标志物 (ROC 曲线下面积分别为 0.856 和 0.809),当 NT-IGFBP-4 > 214 $\mu\text{g/L}$ 及 CT-IGFBP-4 > 124 $\mu\text{g/L}$ 时,患者 MACEs 风险分别增加 14 倍和 8 倍,但这项研究是在假定 NT-IGFBP-4 与 CT-IGFBP-4 不受临床状况和肝素介导 PAPP-A 升高的影响下进行的。另一项临床研究认为^[14],在无心血管基础病的 1 型糖尿病患者中,无论有无糖尿病肾病,NT-IGFBP-4 与 CT-IGFBP-4 高水平都与全因和心血管死亡风险相关,且预测的能力要比 PAPP-A 要强。在此基础上,Hjortebjerg 等^[13]纳入了 656 例经皮冠状动脉介入治疗的 ST 段抬高型心肌梗死患者,在术前抽取血样,追踪 5 年的全因、心血管死亡以及 MACEs,发现两个蛋白都与所有终点有关 ($P < 0.001$),两个蛋白有很强的正相关 ($r = 0.83$, $P < 0.001$);经过多变量调整后,两个蛋白仍与所有终点相关,其中 NT-IGFBP-4

与 CT-IGFBP-4 浓度增加 1 倍,心血管死亡事件的风险比分别为 2.54[95%CI 1.59~4.07, $P<0.001$] 和 2.07[95%CI 1.41~3.04, $P<0.001$];通过区分度、校准度以及净重新分类指数分析,IGFBP-4 蛋白要比其他常见危险因子(C-反应蛋白、肌钙蛋白 I)更能提供有力的预后信息。但也有研究发现对于稳定性心血管疾病,CT-IGFBP-4 高水平是更复杂及易损冠状动脉的独立预测因子^[16], NT-IGFBP-4 和 CT-IGFBP-4 并不能预测患者长期预后。目前认为这种结果相矛盾可能与研究人群的差异有关,不能被患者是否处于急性与稳定状态以及追踪事件的长短所解释^[13]。

4 IGFBP-4 蛋白的检测及稳定性

目前对蛋白的测定主要采用夹心免疫法,用捕捉抗体 IBP3 和检测抗体 IBP144 测定 NT-IGFBP-4,捕捉抗体 IBP182 和检测抗体 IBP163 测定 CT-IGFBP-4。该方法通过特异性识别 PAPP-A 裂解 IGFBP-4 产生的新表位,精确测量出蛋白水平,并且与全长-蛋白有不到 1% 的交叉反应^[15,17]。在孵育和冻融稳定性试验^[18,19]中, NT-IGFBP-4、CT-IGFBP-4 水平变化(减少或增加) $\leq 10\%$,样本储存 3~6 年及 20 年的蛋白平均含量基本一致。另外 NT-IGFBP-4 和 CT-IGFBP-4 在急性冠脉综合征患者循环中不会被进一步切断、修饰或者形成复合物^[17]。

5 IGFBP-4 蛋白表达的影响因素

5.1 糖基化与 IGFBP-4 蛋白

糖基化修饰与蛋白质结构和功能密切相关。循环中部分全长 IGFBP-4 分子在 N 端区域的天冬酰胺 104 位点糖基化,糖基化对 IGFBP-4 与 IGFs 的相互作用没有影响,但 PAPP-A 介导糖基化 IGFBP-4 的水解效率要比非糖基化 IGFBP-4 低 3~4 倍($P<0.001$)。急性冠脉综合征患者循环中糖基化 NT-IGFBP-4 水平占总水平的 9.8%~23.5%,糖基化不影响通过夹心免疫法检测循环中的 NT-IGFBP-4^[19]。

5.2 肝素与 IGFBP-4 蛋白

研究发现,肝素能够通过分离血管壁上 PAPP-A 而增加急性冠脉综合征患者循环中 PAPP-A 水平,但易损斑块中 PAPP-A 水解 IGFBP-4 的酶活性没有变化,循环中 IGFBP-4 降解片段的表达水平不受肝素的影响^[13,14,18]。

5.3 二甲双胍与 IGFBP-4 蛋白

Hjortebjerg 等^[20]研究发现,服用二甲双胍的 2 型糖尿病患者循环中的 NT-IGFBP-4 与 CT-IGFBP-4

水平低于未服用二甲双胍 2 型糖尿病患者及健康对照组,而未接受二甲双胍治疗的 2 型糖尿病组与对照组水平相同,认为 IGFBP-4 蛋白水平改变与二甲双胍有关,推测其机制可能与二甲双胍抑制炎症因子释放、降低炎症介导 PAPP-A 的活性有关。

5.4 其他因素

研究显示^[13,14,21],急性冠脉综合征患者循环中 IGFBP-4 蛋白浓度与肾小球滤过率呈负相关,提示其水平升高与肾功能降低有关。目前还没发现 IGFBP-4 蛋白与左室射血分数、症状发作至球囊扩张时间、冠状动脉病变位置及复杂性、肌钙蛋白 I 峰值、高胆固醇血症、他汀类及抗血小板药物使用等因素相关^[13,14,18]。

6 与 PAPP-A 相比,IGFBP-4 更适合作为易损斑块标志物

血液中 PAPP-A 有两种形式:异构四聚体复合物和同型二聚体复合物。易损斑块中 PAPP-A 以有活性的二聚体形式存在^[22-24],循环中含量极低^[25],且 PAPP-A 试剂很难鉴别两种形式^[26]。其次,肝素治疗能引起急性冠脉综合征患者循环中 PAPP-A 水平迅速增高^[18,27-30],而两个 IGFBP-4 蛋白水平不受影响。目前 PAPP-A 检测方法没有统一标准,不同试剂得到的最佳临界值不同^[14,31]。因此,对于心血管风险的评估,IGFBP-4 蛋白要比 PAPP-A 更加可靠、高效。

综上所述,IGFBP-4 蛋白是一种潜在的评估心血管疾病风险的生化标志物,能够反映不稳定斑块中 PAPP-A 的酶活性水平,对 IGFBP-4 蛋白的定量检测可作为一种间接而更加可靠的 PAPP-A 测定方式。将之与影像学检查或其他冠心病危险因素相结合有望为评价冠状动脉斑块稳定性提供更加准确的依据。目前其与冠心病的临床相关研究还较少,作为一个新的生化标志物,仍需要大规模的临床研究来验证其预测心血管疾病风险的能力,并制定其预测预后的参考值,这将有助于为心血管事件的预防提供更有效的方案。

【参考文献】

- [1] Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy[J]. N Engl J Med, 2013, 368(21): 2004-2013. DOI: 10.1056/NEJMr1216063.
- [2] 周光妍,于波. 冠状动脉易损斑块形成机制研究进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(2): 153-155. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.02.034.
- Zhou GY, Yu B. Research progress of pathogenesis of coronary vulnerable plaque[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2018,

- 17(2): 153–155. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.02.034.
- [3] Shah PK. Biomarkers of plaque instability[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2014, 16(12): 547. DOI: 10.1007/s11886-014-0547-7.
- [4] Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, *et al.* Pregnancy-associated plasma protein-A as a marker of acute coronary syndromes[J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(14): 1022–1029. DOI: 10.1056/NEJMoa003147.
- [5] Conover CA, Mason MA, Bale LK, *et al.* Transgenic overexpression of pregnancy-associated plasma protein-A in murine arterial smooth muscle accelerates atherosclerotic lesion development[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(2): H284–H291. DOI: 10.1152/ajpheart.00904.2009.
- [6] Harrington SC, Simari RD, Conover CA. Genetic deletion of pregnancy-associated plasma protein-A is associated with resistance to atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice challenged with a high-fat diet [J]. *Circ Res*, 2007, 100(12): 1696–1702. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.106.146183.
- [7] Jespersen CH, Vestergaard KR, Schou M, *et al.* Pregnancy-associated plasma protein-A and the vulnerable plaque[J]. *Biomark Med*, 2014, 8(8): 1033–1047. DOI: 10.2217/bmm.14.53.
- [8] Laursen LS, Overgaard MT, Nielsen CG, *et al.* Substrate specificity of the metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) assessed by mutagenesis and analysis of synthetic peptides: substrate residues distant from the scissile bond are critical for proteolysis [J]. *Biochem J*, 2002, 367 (Pt 1): 31–40. DOI: 10.1042/bj20020831.
- [9] Byun D, Mohan S, Yoo M, *et al.* Pregnancy-associated plasma protein-A accounts for the insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) proteolytic activity in human pregnancy serum and enhances the mitogenic activity of IGF by degrading IGFBP-4 *in vitro* [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(2): 847–854. DOI: 10.1210/jcem.86.2.7223.
- [10] Byun D, Mohan S, Kim C, *et al.* Studies on human pregnancy-induced insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteases in serum; determination of IGF-II dependency and localization of cleavage site[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(1): 373–381. DOI: 10.1210/jcem.85.1.6319.
- [11] Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: a review of atherosclerosis and restenosis[J]. *Circ Res*, 2000, 86(2): 125–130.
- [12] Fierro-Macias AE, Floriano-Sanchez E, Mena-Burciaga VM, *et al.* Association between IGF system and PAPP-A in coronary atherosclerosis[J]. *Arch Cardiol Mex*, 2016, 86(2): 148–156. DOI: 10.1016/j.acmx.2015.12.006.
- [13] Hjortebjerg R, Lindberg S, Pedersen S, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-4 fragments provide incremental prognostic information on cardiovascular events in patients with ST-segment elevation myocardial infarction[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(3): e005358. DOI: 10.1161/JAHA.116.005358.
- [14] Hjortebjerg R, Tarnow L, Jorsal A, *et al.* IGFBP-4 fragments as markers of cardiovascular mortality in type 1 diabetes patients with and without nephropathy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(8): 3032–3040. DOI: 10.1210/jc.2015-2196.
- [15] Postnikov AB, Smolyanova TL, Kharitonov AV, *et al.* N-terminal and C-terminal fragments of IGFBP-4 as novel biomarkers for short-term risk assessment of major adverse cardiac events in patients presenting with ischemia [J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(7–8): 519–524. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.030.
- [16] Schulz O, Postnikov AB, Smolyanova TI, *et al.* Clinical differences between total PAPP-A and measurements specific for the products of free PAPP-A activity in patients with stable cardiovascular disease[J]. *Clin Biochem*, 2014, 47(3): 177–183. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.10.027.
- [17] Konev AA, Smolyanova TI, Kharitonov AV, *et al.* Characterization of endogenously circulating IGFBP-4 fragments-novel biomarkers for cardiac risk assessment [J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(12): 774–780. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.05.010.
- [18] Hjortebjerg R, Lindberg S, Hoffmann S, *et al.* PAPP-A and IGFBP-4 fragment levels in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with heparin and PCI[J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(4–5): 322–328. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2014.11.022.
- [19] Konev AA, Serebryanaya DV, Koshkina EV, *et al.* Glycosylated and non-glycosylated NT-IGFBP-4 in circulation of acute coronary syndrome patients[J]. *Clin Biochem*, 2018, 55: 56–62. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.004.
- [20] Hjortebjerg R, Laugesen E, Hoyem P, *et al.* The IGF system in patients with type 2 diabetes: associations with markers of cardiovascular target organ damage [J]. *Eur J Endocrinol*, 2017, 176(5): 521–531. DOI: 10.1530/eje-16-0940.
- [21] Hjortebjerg R, Flyvbjerg A, Frystyk J. Insulin growth factor binding proteins as therapeutic targets in type 2 diabetes [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(2): 209–224. DOI: 10.1517/14728222.2014.858698.
- [22] Mikkelsen JH, Resch ZT, Kalra B, *et al.* Indirect targeting of IGF receptor signaling *in vivo* by substrate-selective inhibition of PAPP-A proteolytic activity[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(4): 1014–1025. DOI: 10.18632/oncotarget.1629.
- [23] Conover CA. Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(5): 242–249. DOI: 10.1016/j.tem.2012.02.008.
- [24] Qin QP, Kokkala S, Lund J, *et al.* Molecular distinction of circulating pregnancy-associated plasma protein-A in myocardial infarction and pregnancy [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(1): 75–83. DOI: 10.1373/clinchem.2004.036467.
- [25] Wittfooth S, Qin QP, Lund J, *et al.* Immunofluorometric point-of-care assays for the detection of acute coronary syndrome-related noncomplexed pregnancy-associated plasma protein-A [J]. *Clin Chem*, 2006, 52(9): 1794–1801. DOI: 10.1373/clinchem.2006.070607.
- [26] Schulz O, Reinicke M, Kramer J, *et al.* Pregnancy-associated plasma protein-A values in patients with stable cardiovascular disease: use of a new monoclonal antibody-based assay[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(11–12): 880–886. DOI: 10.1016/j.cca.2011.01.009.
- [27] Wang G, Zhang A, Han X, *et al.* Effect of routine heparins treatment in acute coronary syndrome on serum pregnancy-associated plasma protein-A concentration [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2013, 43(3): 274–277.
- [28] Wittfooth S, Terti R, Lepantalo M, *et al.* Studies on the effects of heparin products on pregnancy-associated plasma protein-A [J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(3–4): 376–381. DOI: 10.1016/j.cca.2010.11.024.
- [29] Terti R, Wittfooth S, Porela P, *et al.* Intravenous administration of low molecular weight and unfractionated heparin elicits a rapid increase in serum pregnancy-associated plasma protein-A [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(6): 1214–1217. DOI: 10.1373/clinchem.2008.108738.
- [30] Terkelsen CJ, Oxvig C, Norgaard BL, *et al.* Temporal course of pregnancy-associated plasma protein-A in angioplasty-treated ST-elevation myocardial infarction patients and potential significance of concomitant heparin administration [J]. *Am J Cardiol*, 2009, 103(1): 29–35. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.08.027.
- [31] von Haehling S, Doehner W, Jankowska EA, *et al.* Value of serum pregnancy-associated plasma protein-A for predicting cardiovascular events among patients presenting with cardiac chest pain [J]. *CMAJ*, 2013, 185(7): 295–303. DOI: 10.1503/cmaj.110647.