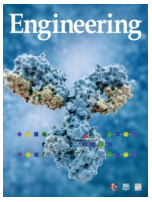
Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Glycomedicine—Article

IgG N-糖基化心血管年龄独立于真实年龄精准表征心血管事件风险

武志远[a,b,#]，郭政[a,#]，郑雨露[a,#]，王玉涛[c]，张海平[b]，潘慧颖[b]，李志伟[b]，Lois Balmer[a]，李霞[d]，陶丽新[b,*]，郭秀花[b,*]，王嵬[a,b,*]

[a] *Centre for Precision Health, Edith Cowan University, Joondalup, WA 6027, Australia*
[b] *Beijing Municipal Key Laboratory of Clinical Epidemiology, School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China*
[c] *Shanghai Fufan Information Technology Co., Ltd., Shanghai 200433, China*
[d] *Department of Mathematics and Statistics, La Trobe University, Melbourne, VIC 3086, Australia*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 September 2022
Revised 18 November 2022
Accepted 8 December 2022
Available online 2 January 2023

关键词
IgG N-糖基化心血管年龄
心血管年龄
免疫球蛋白G
糖基化
炎症
特征选择
机器学习

摘要

亚临床动脉粥样硬化和代谢紊乱是心血管健康的重要风险因素，已有研究报道了应用免疫球蛋白G（IgG）N-聚糖模式作为炎症指标表征其发病风险。然而，对IgG N-糖基谱在心血管疾病（CVD）风险分层中的能力仍然未知。本研究旨在利用IgG N-糖基标志物开发追踪心血管疾病风险的年龄指数。本研究基于横断面调查，从Busselton健康和老龄研究中共招募1465名40~70岁之间的个体。使用机器学习递归特征消除和惩罚回归算法逐步筛选特征糖基，并开发IgG N-糖基化心血管年龄（GlyCage）指数，以反映归因于心血管风险的与真实年龄间的偏差。结果显示，对GlyCage指数贡献最大的是具有双分叉*N*-乙酰葡萄糖胺（GlcNAc）的岩藻糖基化N-聚糖（GP6, FA2B）和具有双分叉GlcNAc的双半乳糖基化N-聚糖（GP13, A2BG2）。GlyCage独立于真实年龄，与较高的Framingham十年心血管风险[优势比（OR）为1.09；95% CI: 1.05~1.13]和心血管疾病患病概率（OR: 1.07; 95% CI: 1.01~1.13）显著相关。GlyCage大于真实年龄三年及以上的个体，其心血管风险和心血管疾病患病概率增加，调整后的OR值分别为2.22（95% CI: 1.41~3.53）和2.71（95% CI: 1.25~6.41）。GlyCage指数区分十年心血管风险和事件的ROC曲线下面积（AUC）值分别为0.73和0.65，而真实年龄为0.65和0.63。因此，本研究开发的GlyCage指数利用IgG N-糖基谱追踪心血管健康水平。GlyCage和真实年龄之间的差距能够独立地表征心血管风险，提示IgG N-糖基化在心血管疾病的发病机制中起作用。GlyCage指数对心血管风险的预测能力需要在其他人群中进行外部和纵向验证。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. 引言

心血管疾病（CVD）是全球残疾和死亡的主要原因，其治疗、发病后康复和护理造成了沉重的经济负担[1]。根据“2019年全球疾病负担研究”[2]，2019年CVD的患病人数达到5.23亿，CVD导致的死亡人数达到1860万。全球因CVD导致的伤残寿命损失年从1990年的1770万增加到2019年的3440万。因此，提升CVD的一级预防，识别新的生物标志物和工具以促进风险评估和有针对性的干预至关重要。

糖基化是一种将糖基分子共价连接到蛋白质上的常见和多样化的翻译后修饰形式，为疾病早期诊断、有针对性

* Corresponding authors.
E-mail addresses: taolixin@ccmu.edu.cn (L. Tao), statguo@ccmu.edu.cn (X. Guo), wei.wang@ecu.edu.au (W. Wang).
# These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
英文原文：Engineering 2023, 26(7): 99–107
引用本文：Zhiyuan Wu, Zheng Guo, Yulu Zheng, Yutao Wang, Haiping Zhang, Huiying Pan, Zhiwei Li, Lois Balmer, Xia Li, Lixin Tao, Xiuhua Guo, Wei Wang. IgG N-Glycosylation Cardiovascular Age Tracks Cardiovascular Risk Beyond Calendar Age. *Engineering*, https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.12.004

的预防和精准医学提供了新方法[3]。在作为生命密码的核酸和蛋白质之后，糖类在中心法则之外可作为细胞生命的第三要素[3]。糖分子代谢由糖基转移酶和糖苷酶调节[4]，并参与关键的生物过程（如细胞黏附、分子运输和清除、受体激活、信号转导和内吞作用）。值得注意的是，N-糖基修饰可以改变免疫球蛋白G（IgG）分子在炎症促进和抗炎功能中的平衡[5]。糖基区域的核心由*N*-乙酰葡萄糖胺（GlcNAc）和甘露糖组成，并可能含有一个附加的连接到第一个甘露糖或末端半乳糖或唾液酸残基的双分叉GlcNAc残基[6–8]。

已有研究报道了IgG N-糖基谱与衰老[9]、炎症[10]以及包括高血压[11]、糖尿病[12]和血脂异常[13]在内的心血管代谢性疾病的关联。这些疾病是CVD的重要风险因素。一项研究证实IgG N-糖基谱与致动脉粥样硬化性脂蛋白和亚临床动脉硬化性颈动脉斑块相关[14]。然而，对IgG N-糖基谱与心血管风险或疾病之间的关联尚不清楚。目前，IgG糖基年龄的概念已被提出并用于解释生物学年龄[15–16]。此外，最近一项研究开发了一种使用炎症生物标志物表征心血管衰老的年龄指数[17]。然而，IgG N-糖基谱提示心血管健康状况的能力尚未被阐明。

与传统的统计模型输入有限变量且预测性能相对较低所不同，人工智能（AI）方法可以将高维和多变量数据整合起来，解决具有挑战性的问题[18]。机器学习（ML）是AI的一个子领域，能够自动挖掘数据中的模式[19–20]。对于不同的机器学习模型，监督式学习工具[如随机森林、最小绝对值收缩和选择操作（LASSO）以及递归特征消除（RFE）]可以通过整合具有多维数据的海量信息来学习复杂的结构[21]。此外，由于出色的性能，机器学习技术越来越多地被应用于临床相关领域，如变量选择、预测诊断、有针对性的预防和个性化医疗服务[9,17–18]。

本研究采用机器学习方法进行特征选择，并进一步开发和验证IgG N-糖基化心血管年龄（GlyCage）指数以表征心血管风险，从而提供新的工具来评估独立于真实年龄之外的心血管年龄。

2. 方法

2.1. 研究人群

本研究使用的数据来自Busselton健康和衰老研究（BHAS）。BHAS的研究设计和招募程序已在之前的研究中进行详细描述[22]。从2010年5月至2015年12月共招募了5107名参与者用于BHAS [23]。在本次横断面研究中，最终纳入1465名信息完整（包括IgG N-糖基谱、CVD疾病史、人口统计学数据、人体测量和生化检查）的参与者。本研究符合《赫尔辛基宣言》原则，并获得了Busselton人口医学研究所（BSN 22/10）和Edith Cowan大学人类研究伦理委员会的批准（2019-00947-ZHENG和2021-03164-WU）。所有参与者均已知情并同意参加本研究。

2.2. 数据测量和定义

人口统计学特征、生活行为方式、用药信息和疾病史通过问卷进行评估[22]。教育水平分为小学及以下、中学和中学以上。婚姻状况分为已婚和其他。吸烟状况定义为当前吸烟或不吸烟。体重指数（BMI）采用标准人体测量技术测量，并按体重（千克）除以身高（米）平方的方式计算获取。收缩压和舒张压使用血压仪（Omron VP1000，日本）在参与者休息5 min后以仰卧位形式在四肢进行测量。总胆固醇、高密度脂蛋白（HDL）胆固醇、空腹血浆葡萄糖、糖化血红蛋白A1c（HbA1c）和C-反应蛋白（CRP）由PathWest实验室（Busselton和QEII医疗中心，澳大利亚）检测。

2.3. 十年心血管风险和CVD定义

十年心血管风险是根据已建立的Framingham心脏研究评分[24]，对30~74岁的无CVD个体，使用8个临床因素（即年龄、性别、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、收缩压、降压药物使用、糖尿病状态和吸烟状态）进行定义。男性十年心血管风险计算公式为$1-0.88936^{\exp(\sum\beta X-23.9802)}$，女性为$1-0.95012^{\exp(\sum\beta X-26.1931)}$，其中$\beta$为回归系数，$X$为上述每个风险因素的水平。附录A中的表S1提供了详细的公式计算过程。十年心血管风险不低于20%的个体被定义为高风险组。

在本研究，CVD被定义为心绞痛、心肌梗死或心脏病发作、短暂性脑缺血发作（TIA）、中风、冠状动脉成形术或支架植入、冠状动脉旁路移植和植入心脏起搏器。本研究中CVD的构成情况详见附录A中的表S2。

2.4. IgG分离和N-糖基分析

利用先前介绍的方法[25]，采用96孔蛋白G单体板从血浆中分离出IgG。释放和标记N-糖基分子后，通过亲水作用色谱分离，并在超高效液相色谱（UPLC）仪器（Waters Corporation，美国）上最终定性为24个糖基峰（GP）[26]。糖基分子对应的具体结构请参见附录A中的S2节。

2.5. 机器学习特征选择方法

使用LASSO和RFE机器学习算法来选择N-糖基的交

集作为候选标志物集合。这两种方法联合使得模型具有稳定性并最小化过拟合风险。LASSO的lambda值设置为“1se”，选择ROC曲线下面积（AUC）作为性能指标。在RFE中嵌入袋装树，选择精度作为优化的性能指标。基于机器学习方法选择的候选糖基集合，进一步使用多阶段逻辑回归模型来确定最终的糖基分子，根据Framingham十年心血管风险建立GlyCage指数。

2.6. 统计分析

变量以平均值（标准差）或例数（比例）表示。连续变量使用t检验进行差异性比较，分类变量使用χ^2检验。IgG糖基峰的分布根据十年心血管风险和事件，使用箱形图进行可视化。在验证阶段，使用校正的逻辑回归模型评估建立的GlyCage指数与十年心血管风险和CVD的关联性。在模型中调整了真实年龄、教育水平、婚姻状况和CRP水平。同时，分析了GlyCage与真实年龄间的差距对心血管风险和事件的影响，并基于AUC值，使用DeLong检验比较GlyCage、真实年龄和先前研究[27]提出的IgG糖基生物年龄（GlycanAge）区分心血管风险的能力。所有统计分析基于*R*软件进行，版本号4.1.0（R Foundation，奥地利）。差异在双侧显著性水平*P*值小于0.05时被认为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 人群特征

本研究最终纳入1465例个体，平均年龄59.58（标准差5.51）岁，其中107例（7.3%）有CVD疾病史（表1）。在1358例没有CVD疾病史的个体中，376例（27.7%）具有十年心血管高风险（见附录A中的表S3）。

3.2. 多阶段机器学习方法筛选IgG N-糖基分子

附录A中的图S1展示了24个糖基峰在不同十年心血管风险和事件组中的分布情况。第一阶段，5个糖基峰（GP6、GP7、GP8、GP13、GP20）通过LASSO和RFE方法筛选作为候选集合（见附录A中的图S2）（图1）。在第

表1 研究人群基本特征

Characteristic	Without CVDs[a]	With CVDs	*P* value
Participants (*n* (proportion))	1358 (92.7%)	107 (7.3%)	
Sex (male; *n* (proportion))	612 (45.1%)	77 (72.0%)	< 0.001
Age (year, mean (SD))	59.40 (5.51)	61.75 (5.05)	< 0.001
Marital status (*n* (proportion))			
Married	1003 (73.9%)	94 (87.9%)	0.002
Others	355 (26.1%)	13 (12.1%)	
Education level (*n* (proportion))			
Primary school or below	20 (1.5%)	1 (0.9%)	0.886
Secondary school	707 (52.1%)	55 (51.4%)	
Above secondary school	630 (46.4%)	51 (47.7%)	
Current smoking (*n* (proportion))	111 (8.2%)	12 (11.2%)	0.362
Hypertension (*n* (proportion))	459 (33.8%)	63 (58.9%)	< 0.001
Diabetes (*n* (proportion))	267 (19.7%)	47 (43.9%)	< 0.001
BMI[b] ($kg \cdot m^{-2}$, mean (SD))	28.94 (5.25)	31.65(5.26)	< 0.001
SBP (mmHg, mean (SD))	133.99 (16.14)	137.57 (15.43)	0.028
DBP (mmHg, mean (SD))	78.04 (9.70)	79.41 (8.80)	0.161
Total cholesterol ($mmol \cdot L^{-1}$, mean (SD))	5.55 (1.11)	0.12 (0.03)	< 0.001
HDL cholesterol ($mmol \cdot L^{-1}$, mean (SD))	1.45 (0.36)	0.03 (0.01)	< 0.001
Fasting glucose ($mmol \cdot L^{-1}$, mean (SD))	5.48 (1.57)	2.58 (0.95)	< 0.001
HbA1c (mean (SD))	5.87% (0.82%)	6.34% (1.10%)	< 0.001
CRP ($mg \cdot L^{-1}$, mean (SD))	3.09 (4.44)	3.39 (4.77)	0.514

SI conversion factors: To convert fasting plasma glucose to $mg \cdot dL^{-1}$, multiply by 18.0; to convert triglyceride to $mg \cdot dL^{-1}$, multiply by 88.6; to convert cholesterol to $mg \cdot dL^{-1}$, multiply by 38.66.

SD: standard deviation; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure. 1 mmHg = 0.133 kPa.

[a] CVDs included angina, myocardial infarction or heart attack, TIA, stroke, experience of coronary angioplasty or stent, coronary bypass, and implant of cardiac pacemaker.

[b] Calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared.

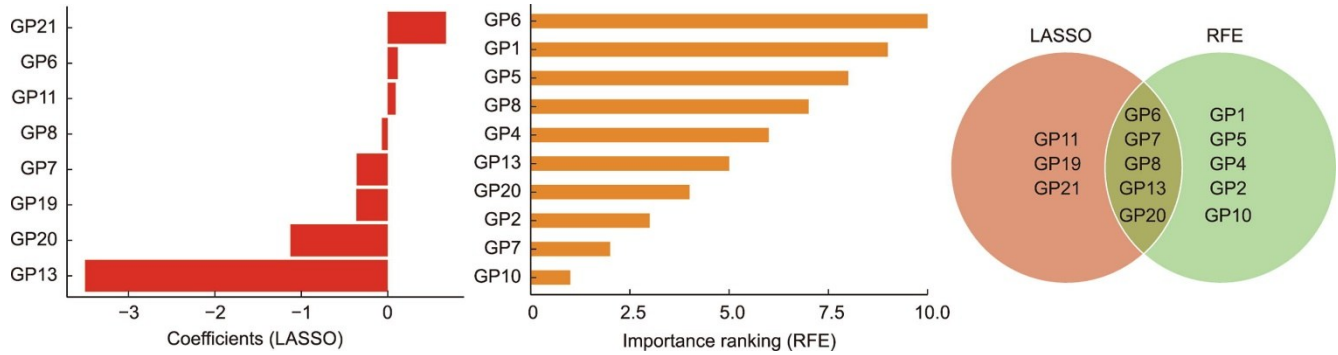


图1. 基于LASSO模型和RFE算法筛选的IgG N-糖基分子。

二阶段逻辑回归模型中，GP6和GP13最终被纳入（见附录A中的表S4）。

3.3. GlyCage指数构建

GlyCage指数计算公式（见附录A中的表S5）如下：

$$\text{GlyCage指数} = (0.29640 * (X_1 - 5.81422) - 5.88346 * (X_2 - 0.22277))/0.16601 + V \quad (1)$$

式中，X_1代表GP6水平；X_2代表GP13水平；V为真实年龄。

结果显示，GP6与十年心血管风险和CVD事件正相关，与GP13负相关[图2（a）~（d）]。GP6和GP13在心血管低风险、高风险、CVD事件组中的分布见附录A中的表S6。此外，GP6与真实年龄正相关，与GP13负相关[图2（e）~（f）]。GlyCage指数与真实年龄的相关系数为0.899 [图2（g）]。GlyCage指数和真实年龄在十年心血管低风险组和没有CVD事件组中的分布较一致，而GlyCage指数在十年心血管高风险组和存在CVD事件组中的分布显著增加（见附录A中的表S7）。

3.4. GlyCage指数与心血管风险的相关性

在校正的逻辑回归模型中，GlyCage独立于真实年龄与十年心血管风险和CVD事件显著相关，OR值分别为1.089（95% CI: 1.050~1.131）和1.068（95% CI: 1.013~1.125），见表2。十年心血管高风险和CVD事件组GlyCage指数更高（见附录A中的图S3）。GlyCage高于真实年龄3岁及以上的个体，其心血管风险和患有CVD事件概率更高。与低GlyCage人群相比（图3和表3），OR值分别为2.220（95% CI: 1.411~3.533）和2.713（95% CI: 1.253~6.406）。

GlyCage指数区分十年心血管高风险的AUC值为0.726（95% CI:0.698~0.754），显著高于真实年龄（0.653; 95% CI:0.621~0.685; DeLong检验$P < 0.001$）和GlycanAge（0.686; 95% CI: 0.658~0.715; DeLong检验$P = 0.041$），见图4。GlyCage指数区分CVD事件的AUC值为0.645（95% CI: 0.593~0.696），显著高于真实年龄（0.626; 95% CI: 0.571~0.681; DeLong检验$P = 0.184$）和GlycanAge（0.627; 95% CI: 0.575~0.679; DeLong检验$P = 0.551$）

4. 讨论

利用临床特征已经开发了心血管疾病风险评估和预测工具。例如，世界卫生组织推导并校准了风险预测模型，以估计21个全球疾病负担（Global Burden of Disease）地区的心血管疾病风险[28]。心血管风险评估合并队列方程（PCE）是在美国队列中开发的并作为制定心血管疾病预防指南的核心[29]。系统性冠心病风险评估项目和动脉粥样硬化性心血管疾病风险预测项目分别在欧洲[30]和中国[31]人群中应用，用于预测心血管疾病风险。此外，也有研究应用基因组数据和多基因评分来提高预测工具的准确性[32–34]，并应用炎症生物标志物来反映心血管衰老水平[17]。

在此背景下，本研究首次开发了一种心血管健康指数，即GlyCage指数，利用IgG N-糖基谱独立于真实年龄来表征心血管风险。研究发现，过高的GlyCage与较高的心血管风险显著相关。因此，GlyCage提供了一个基于糖组学平台的实用简单的指数，可用于真实世界中的心血管风险分层。与真实年龄相比，GlyCage指数对十年心血管风险的AUC有显著改善（0.073, $P < 0.001$），对心血管疾病的AUC改善不明显（0.019, $P = 0.184$），这可能是由统计效力不足所导致。同时也应注意到，在包括年龄和性别的基线模型中加入多基因风险评分，对冠心病预测的AUC仅提高了0.024，这表明GlyCage指数是心血管风险分层的重要补充[35]。

GlyCage指数在改善心血管风险分层和临床决策，以及促进一级预防方面具有巨大潜力。在临床评估的风险之

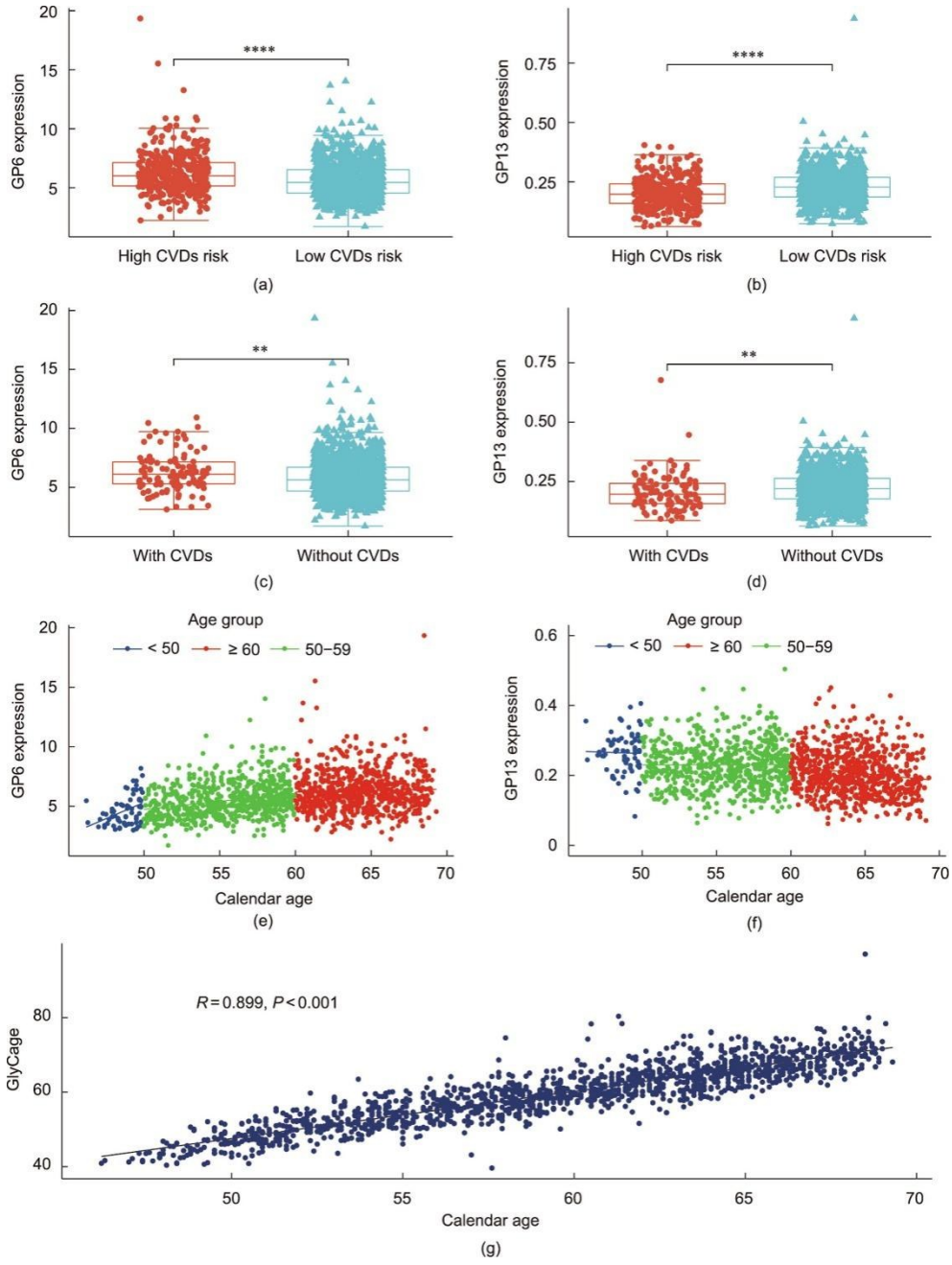


图2. GlyCage指数、IgG *N*-糖基分子和真实年龄的相关性。（a）、（b）GP6和GP13在无心血管事件人群不同十年心血管风险组的分布情况。（c）、（d）GP6和GP13在有无心血管事件组中的分布情况。（e）、（f）GP6和GP13与真实年龄的相关性。（g）GlyCage指数与真实年龄的相关性。

外，仍然存在较高的残余心血管风险。多基因风险评分反映了心血管疾病的先天固有风险，而GlyCage指数则可以根据两个N-糖基标志物提示CVD实时风险[36]。在指南建议未覆盖的人群中，建议GlyCage指数过高的人群开始积极的生活方式，从而实现非药物干预。假设，考虑单一指标变量的效率相对较低以及不健康生活方式的高流行率，将GlyCage指数、临床风险和多基因风险结合起来，可以在很大程度上提高心血管疾病的精准预防并减轻疾病负担。GlyCage指数过高和临床风险过高的个体可能急需加强预防和风险管理。

通过应用LASSO和RFE机器学习算法，从UPLC检测到的24个IgG糖基峰中选择了N-糖基的交集。在本研究中，将LASSO和RFE与多阶段逐步回归相结合，选择N-糖基，有助于避免过度拟合现象，并实现对糖基效应的稳定估计[37]。确定最相关的IgG N-糖基在开发用于评估和管理心血管风险的准确预测工具（GlyCage指数）方面起着至关重要的作用。因此，使用先进的机器学习方法选择的IgG N-糖基变量更可能是建立GlyCage指数的有效

表2 GlyCage指数独立于真实年龄与十年心血管风险和心血管事件的关联性分析

Variables	Model 1			Model 2[c]		
	OR	95% CI	*P* value	OR	95% CI	*P* value
High CVDs risk[a]						
Calendar age	1.049	0.997–1.104	0.067	1.051	0.997–1.107	0.062
GlyCage	1.092	1.053–1.132	< 0.001	1.089	1.050–1.131	< 0.001
CVDs[b]						
Calendar age	1.010	0.936–1.090	0.806	1.002	0.929–1.082	0.961
GlyCage	1.061	1.007–1.116	0.023	1.068	1.013–1.125	0.013

OR: odds ratio.

[a] Analyzed among individuals without CVDs (n = 1358); high risk refers to a Framingham ten-year cardiovascular risk ⩾ 20%.

[b] Whole population (n = 1465); CVDs included angina, myocardial infarction or heart attack, TIA, stroke, experience of coronary angioplasty or stent, coronary bypass, and implant of cardiac pacemaker.

[c] Education level, marital status, and CRP adjusted in Model 2.

预测因子。另外，需要使用不同队列对提出的GlyCage指数的普适性进行进一步验证。用于构建GlyCage指数工具的IgG N-糖基系数可以在不同人群中进行动态调整。

研究发现，GP6和GP13与十年心血管风险和CVD患病显著相关。使用GlyCage计算的个体心血管风险年龄等同于具有相同心血管风险且GP6和GP13处于人群平均表达水平的个体年龄。简而言之，提出的GlyCage指数表征了由心血管风险导致的与真实年龄间的偏差。

组成GlyCage指数的两个IgG N-糖基（即GP6和GP13）在先前的研究中也被报道与CVD的风险因素相关。Menni等[14]发现亚临床动脉硬化病理的存在主要由GP6相对丰度增加所解释。Liu等[38]报道缺血性卒中患者GP13丰度较低。Wang等[39]发现GP6丰度高和GP13丰度低与高血压显著相关。这些研究结论与本研究的发现一致，即GP6丰度较高和GP13水平较低与十年心血管风险和CVD相关。

IgG N-糖基化和心血管风险间的相关性可能存在以下潜在机制。慢性炎症在CVD的发展中发挥着至关重要的作用，通过促进斑块生长、动脉内松动斑块和触发血凝块，成为冠心病和中风的主要病因[40–41]。IgG是循环系统中最丰富的免疫球蛋白[5]。糖基化是蛋白质最常见的共翻译和后翻译修饰之一[42]。如前所述，IgG N-糖基具有复杂的双天线/双分叉型结构，可通过调节IgG与激活或抑制Fcγ受体（FcγR）结合亲和力来决定效应因子功能，诱导促炎症或抗炎症反应[43]。

研究表明，将双分叉GlcNAc添加到富含岩藻糖的N-糖基中可以防止富含岩藻糖的修饰，并诱导促炎症反应。通过增强IgG与自然杀伤（NK）细胞、巨噬细胞和中性粒细胞上的FcγRIIIA结合亲和力，促进了抗体依赖的细胞介导的细胞毒性（ADCC）的活性[44–45]。此外，研究指出，无半乳糖和无唾液酸IgG分子可以通过激活补体系统和ADCC来调节IgG的促炎症效应[46–47]。本研究观察到高心血管风险组中GP6的水平较高。双分叉GlcNAc的存在抑制了富含岩藻糖修饰的过程，从而增强了ADCC的活性[3]。此外，GP6的结构是无半乳糖基化和无唾液酸化结构。GP6上末端半乳糖或唾液酸的缺失通过激活补体级联或ADCC，分别具有促炎症效应[48]。因此，这种效应有助于IgG的炎症活性的形成。此外，本研究观察到高心血管风险组中半乳糖基化的N-糖基（即GP13）水平较低。通过激活凝集素引发的补体途径，IgG半乳糖基化水平的降低阻碍了循环IgG的抗炎症效应。本研究观察到低水平的半乳糖基化N-糖基与CVD风险相关，这支持了凝集素引发的补体途径在CVD风险中发挥至关重要的作用的理论。总的来说，IgG N-糖基化的程度（即无半乳糖基化、无唾液酸化和富含双分叉GlcNAc的岩藻糖基化N-糖基）在高心血管风险个体中被改变，本研究和其他与

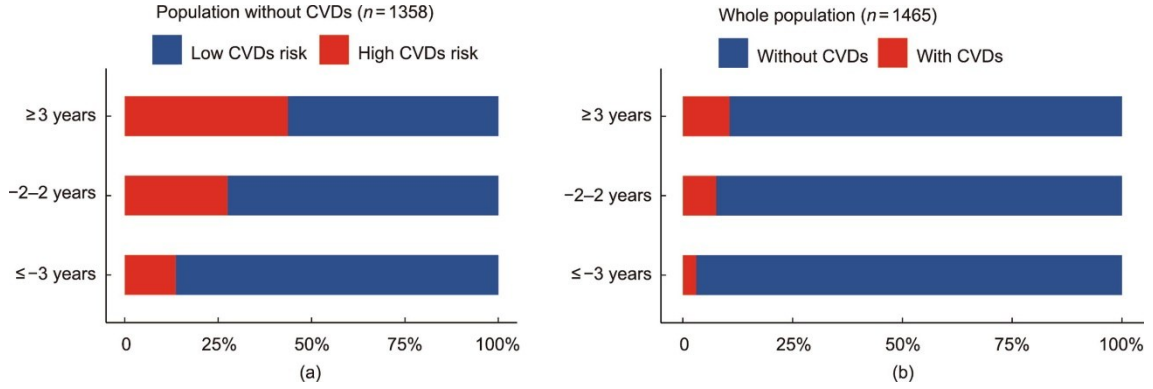


图3. 十年心血管风险和心血管事件在不同GlyCage指数与真实年龄差距组中的分布情况。根据GlyCage指数与真实年龄差距将人群分为三组：GlyCage低于真实年龄3岁（组1），GlyCage与真实年龄差距在2岁之间（组2），GlyCage高于真实年龄3岁（组3）。（a）心血管风险分布，高风险定义为十年心血管风险大于等于20%，组1至组3的高心血管风险占比分别为13.6%、27.5%和43.7%。（b）心血管事件分布，心血管事件包括心肌梗死、短暂性脑卒中发作、脑卒中、心脏成形术或支架植入、心脏搭桥术、心脏起搏器植入，组1至组3的心血管事件占比分别为3.1%、7.6%和10.6%。

表3 GlyCage指数与真实年龄间差距与十年心血管风险和心血管事件的关联性分析

Variables	β [c]	OR	95% CI	*P* value
Population 1 [a]				
Calendar age	0.139	1.149	1.118–1.182	0.001
Distance of GlyCage and calendar age (n_{hCVD}/n_{total}, proportion)				
⩽ –3 years (39/286, 13.6%)	Reference	—	—	—
–2 to 2 years (223/811, 27.5%)	0.403	1.496	1.016–2.244	0.046
⩾ 3 years (114/261, 43.7%)	0.797	2.220	1.411–3.533	0.001
Population 2 [b]				
Calendar age	0.067	1.069	1.025–1.116	0.002
Distance of GlyCage and calendar age (n_{CVD}/n_{total}, proportion)				
⩽ –3 years (9/295, 3.1%)	Reference	—	—	—
–2 to 2 years (67/878, 7.6%)	0.717	2.048	1.039–4.522	0.053
⩾ 3 years (31/292, 10.6%)	0.998	2.713	1.253–6.406	0.015

n_{hCVD}: number of patients with high CVDs risk; n_{CVD}: number of patients with CVDs; n_{total}: number of corresponding total patients.
The distance between GlyCage and calendar age was grouped into ⩽ –3 years (regressive), –2 to 2 years (equivalent) and ⩾ 3 years (excessive).
[a] Analyzed among individuals without CVDs (n = 1358) for association between excessive GlyCage and high cardiovascular risk (ten-year cardiovascular risk ⩾ 20%).
[b] Analyzed among whole population (n = 1465) for association between excessive GlyCage and CVDs including angina, myocardial infarction or heart attack, TIA, stroke, experience of coronary angioplasty or stent, coronary bypass, and implant of cardiac pacemaker.
[c] Adjusted for education level, marital status, and CRP level.

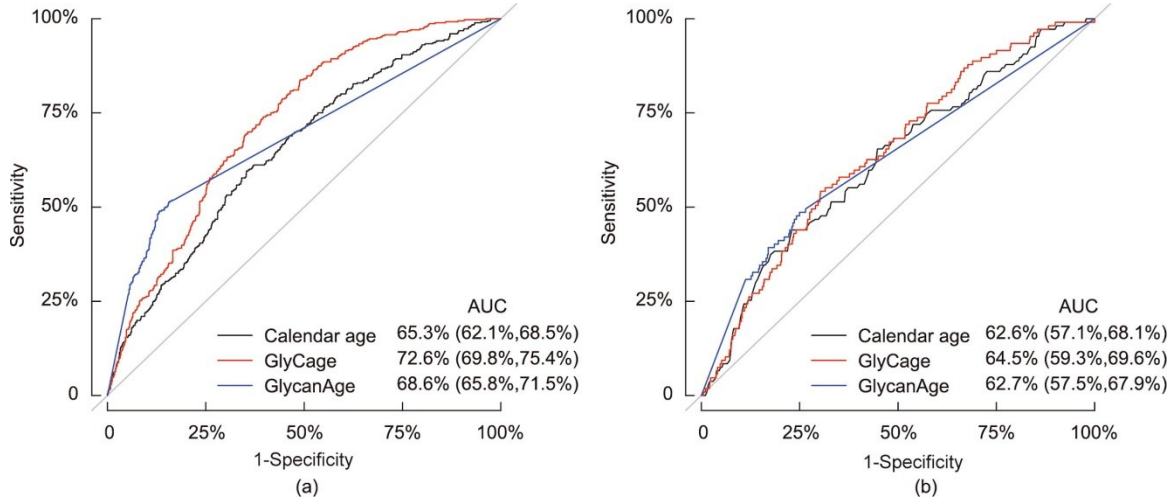


图4. GlyCage指数、真实年龄和IgG糖基生物年龄（GlycanAge）对于心血管风险和心血管事件的区分能力。（a）GlyCage指数、真实年龄和GlycanAge识别心血管高风险，高风险定义为十年心血管风险不低于20%。（b）GlyCage指数、真实年龄和GlycanAge识别心血管事件，心血管事件包括心肌梗死、短暂性脑卒中发作、脑卒中、心脏成形术或支架植入、心脏搭桥术、心脏起搏器植入。

CVD相关的研究的结果都表明，改变的IgG N-糖基化会导致促炎症活性的增强[38,49]。总之，这些观察结果解释了为什么在出现症状之前检测IgG N-糖基化变化可能是预测CVD发生的有前途的生物标志物。

此外，细胞因子和调节炎症分子的产生可能潜在地介导了IgG N-糖基化模式和心血管风险之间的相关性。动物研究表明，高IgG半乳糖基化水平的抗炎症特性是由于FcγRIIB和dectin-1的激活，可防止促炎症效应器的功能[50]。这些研究结果表明，IgG半乳糖基化水平较低的个体预计会具有更多的促炎症抗体，导致免疫活化水平升高。此外，已有研究表明，缺乏IgG半乳糖基化可能会诱导NK细胞的活化，并且这种改变与更高水平的干扰素-γ（IFN-γ）和肿瘤坏死因子-α（TNF-α）相关，从而增强促炎症效应[51]。一项体内研究揭示了细胞因子IFN-γ通过重塑碳水化合物结构来触发IgG的致病性。其他细胞因子，如白细胞介素（IL）-21和IL-17A，可以根据IgG糖基模式在促炎症和抗炎症之间切换[52]。此外，一些随机临床试验（例如，在高动脉粥样硬化风险患者中通过抑制IL-6来预防心血管风险和改善CVD结局的RESCUE试验、ASSAIL-MI试验和CANTOS试验）已针对IL-1β或IL-6

进行了靶向治疗[53–55]。总的来说，IgG N-糖基化模式的改变对心血管风险的影响可能部分地通过免疫微环境中特定的细胞因子和分子介导，然而这需要进一步研究。

本研究存在以下局限性。首先，这是一项横断面研究，没有干预措施，无法明确IgG N-糖基和心血管风险之间的因果关系。但分析了GlyCage指数对前瞻性十年心血管风险的独立影响，表明GlyCage指数具有预测CVD发生的能力。需要对IgG N-糖基和CVD之间的潜在机制进行进一步研究，从而为预防和干预CVD提供潜在的分子靶点。其次，CVD疾病史由个体自报获取，可能存在回忆偏倚。需要在其他人群和队列研究中对IgG N-糖基的风险效应以及GlyCage指数对心血管健康的评估和预测能力进行进一步验证。

总之，本研究开发了GlyCage指数，独立于真实年龄以表征心血管风险，进而提供了基于糖组学分析评估和预测心血管健康的新指标。

致谢

本研究由国家自然科学基金（8177120753）和中澳国际合作基金（NHMRC APP1112767，NSFC 81561128020）资助（王嵬）。武志远获得了中国国家留学基金委员会（201908110447）的支持。郑雨露和郭政获得伊迪斯科文大学研究生奖学金（ECU-HDR ST10469322和ST10468211）的支持。

Authors’ contribution

Study conception and design: Xiuhua Guo, Wei Wang, and Zhiyuan Wu; data collection: Zheng Guo and Yulu Zheng; data analysis and interpretation: Zhiyuan Wu, Yutao Wang, Huiying Pan, Zhiwei Li, and Xia Li; manuscript writing and reviewing: Zhiyuan Wu, Zheng Guo, Yulu Zheng, Lois Balmer, and Haiping Zhang; study supervision: Wei Wang, Xiuhua Guo, Lixin Tao, and Lois Balmer.

Compliance with ethics guidelines

Zhiyuan Wu, Zheng Guo, Yulu Zheng, Yutao Wang, Haiping Zhang, Huiying Pan, Zhiwei Li, Lois Balmer, Xia Li, Lixin Tao, Xiuhua Guo, and Wei Wang declare that they have no competing interests.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.12.004.

References

[1] Riegel B, Moser DK, Buck HG, Dickson VV, Dunbar SB, Lee CS, et al. Self-care for the prevention and management of cardiovascular disease and stroke: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association. J Am Heart Assoc 2017;6(9):e006997.
[2] Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 Study. J Am Coll Cardiol 2020;76(25):2982–3021.
[3] Wang W. Glycomedicine: the current state of the art. Engineering. In press.
[4] Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell 2006;126(5):855–67.
[5] Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nat Rev Immunol 2010;10(5):301–16.
[6] Alter G, Ottenhoff THM, Joosten SA. Antibody glycosylation in inflammation, disease and vaccination. Semin Immunol 2018;39:102–10.
[7] Wang H, Li X, Wang X, Liu D, Zhang X, Cao W, et al. Next-generation (glycomic) biomarkers for cardiometabolic health: a community-based study of immunoglobulin G *N*-glycans in a Chinese Han population. Omics 2019;23(12):649–59.
[8] Seeling M, Brückner C, Nimmerjahn F. Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? Nat Rev Rheumatol 2017;13(10):621–30.
[9] Greto VL, Cvetko A, Štambuk T, Dempster NJ, Kifer D, Deriš H, et al. Extensive weight loss reduces glycan age by altering IgG N-glycosylation. Int J Obes 2021;45(7):1521–31.
[10] Dall'Olio F, Vanhooren V, Chen CC, Slagboom PE, Wuhrer M, Franceschi C. N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: a link with inflammaging. Ageing Res Rev 2013;12(2):685–98.
[11] Kifer D, Louca P, Cvetko A, Deriš H, Cindrić A, Grallert H, et al. N-glycosylation of immunoglobulin G predicts incident hypertension. J Hypertens 2021;39(12):2527–33.
[12] Wu Z, Li H, Liu D, Tao L, Zhang J, Liang B, et al. IgG glycosylation profile and the glycan score are associated with type 2 diabetes in independent Chinese populations: a case-control study. J Diabetes Res 2020;2020:5041346.
[13] Liu D, Chu X, Wang H, Dong J, Ge SQ, Zhao ZY, et al. The changes of immunoglobulin G N-glycosylation in blood lipids and dyslipidaemia. J Transl Med 2018;16(1):235.
[14] Menni C, Gudelj I, Macdonald-Dunlop E, Mangino M, Zierer J, Bešić E, et al. Glycosylation profile of immunoglobulin G is cross-sectionally associated with cardiovascular disease risk score and subclinical atherosclerosis in two independent cohorts. Circ Res 2018;122(11):1555–64.
[15] Yu X, Wang Y, Kristic J, Dong J, Chu X, Ge S, et al. Profiling IgG *N*-glycans as potential biomarker of chronological and biological ages: a community-based study in a Han Chinese population. Medicine 2016;95(28):e4112.
[16] Jurić J, Kohrt WM, Kifer D, Gavin KM, Pezer M, Nigrovic PA, et al. Effects of estradiol on biological age measured using the glycan age index. Aging 2020;12(19):19756–65.
[17] Sayed N, Huang Y, Nguyen K, Krejciova-Rajaniemi Z, Grawe AP, Gao T, et al. An inflammatory aging clock (iAge) based on deep learning tracks multimorbidity, immunosenescence, frailty and cardiovascular aging. Nat Aging 2021;1:598–615.
[18] Heo J, Yoon JG, Park H, Kim YD, Nam HS, Heo JH. Machine learning-based model for prediction of outcomes in acute stroke. Stroke 2019;50(5):1263–5.
[19] Bruffaerts R. Machine learning in neurology: what neurologists can learn from machines and vice versa. J Neurol 2018;265(11):2745–8.
[20] Wu Z, Li L, Jin R, Liang L, Hu Z, Tao L, et al. Texture feature-based machine learning classifier could assist in the diagnosis of COVID-19. Eur J Radiol 2021;137:109602.
[21] Abedi V, Goyal N, Tsivgoulis G, Hosseinichimeh N, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J, et al. Novel screening tool for stroke using artificial neural network. Stroke 2017;48(6):1678–81.

[22] James A, Hunter M, Straker L, Beilby J, Bucks R, Davis T, et al. Rationale, design and methods for a community-based study of clustering and cumulative effects of chronic disease processes and their effects on ageing: the Busselton healthy ageing study. BMC Public Health 2013;13:936.
[23] Tan HE, Lan NSR, Knuiman MW, Divitini ML, Swanepoel DW, Hunter M, et al. Associations between cardiovascular disease and its risk factors with hearing loss-A cross-sectional analysis. Clin Otolaryngol 2018;43(1):172–81.
[24] Sr. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. Circulation 2008;117(6):743–53.
[25] Liu D, Xu X, Li Y, Zhang J, Zhang X, Li Q, et al. Immunoglobulin G *N*-glycan analysis by ultra-performance liquid chromatography. J Vis Exp 2020(155): e60104.
[26] Zhang X, Yuan H, Lyu J, Meng X, Tian Q, Li Y, et al. Association of dementia with immunoglobulin G *N*-glycans in a Chinese Han population. NPJ Aging Mech Dis 2021;7(1):3.
[27] Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, et al. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2014;69(7):779–89.
[28] Lam TH. World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions. Lancet Glob Health 2019; 7(10): e1332–45.
[29] Yadlowsky S, Hayward RA, Sussman JB, McClelland RL, Min YI, Basu S. Clinical implications of revised pooled cohort equations for estimating atherosclerotic cardiovascular disease risk. Ann Intern Med 2018;169(1):20–9.
[30] Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. Eur Heart J 2003;24(11):987–1003.
[31] Yang X, Li J, Hu D, Chen J, Li Y, Huang J, et al. Predicting the 10-year risks of atherosclerotic cardiovascular disease in Chinese population: the China – PAR Project (prediction for ASCVD risk in China). Circulation 2016; 134(19): 1430–40.
[32] Inouye M, Abraham G, Nelson CP, Wood AM, Sweeting MJ, Dudbridge F, et al. Genomic risk prediction of coronary artery disease in 480, 000 adults: implications for primary prevention. J Am Coll Cardiol 2018;72(16):1883–93.
[33] Aragam KG, Natarajan P. Polygenic scores to assess atherosclerotic cardiovascular disease risk: clinical perspectives and basic implications. Circ Res 2020;126(9):1159–77.
[34] Sun L, Pennells L, Kaptoge S, Nelson CP, Ritchie SC, Abraham G, et al. Polygenic risk scores in cardiovascular risk prediction: a cohort study and modelling analyses. PLoS Med 2021;18(1):e1003498.
[35] Lu X, Liu Z, Cui Q, Liu F, Li J, Niu X, et al. A polygenic risk score improves risk stratification of coronary artery disease: a large-scale prospective Chinese cohort study. Eur Heart J 2022;43(18):1702–11.
[36] Štambuk T, Klasić M, Zoldoš V, Lauc G. *N*-glycans as functional effectors of genetic and epigenetic disease risk. Mol Aspects Med 2021;79:100891.
[37] Zheng Y, Guo Z, Zhang Y, Shang J, Yu L, Fu P, et al. Rapid triage for ischemic stroke: a machine learning-driven approach in the context of predictive, preventive and personalised medicine. Epma J 2022;13(2):285–98.
[38] Liu D, Zhao Z, Wang A, Ge S, Wang H, Zhang X, et al. Ischemic stroke is associated with the pro-inflammatory potential of N-glycosylated immunoglobulin G. J Neuroinflammation 2018;15(1):123.
[39] Wang Y, Klarić L, Yu X, Thaqi K, Dong J, Novokmet M, et al. The association between glycosylation of immunoglobulin G and hypertension: a multiple ethnic cross-sectional study. Medicine 2016;95(17):e3379.
[40] Costantino S, Paneni F, Cosentino F. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. J Physiol 2016;594(8):2061–73.
[41] Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. Circulation 2004;109(21 Suppl 1):Ii2–10.
[42] Li X, Wang H, Russell A, Cao W, Wang X, Ge S, et al. Type 2 diabetes mellitus is associated with the immunoglobulin G *N*-glycome through putative proinflammatory mechanisms in an Australian population. Omics 2019;23(12): 631–9.
[43] Liu D, Li Q, Zhang X, Wang H, Cao W, Li D, et al. Systematic review: immunoglobulin G *N*-glycans as next-generation diagnostic biomarkers for common chronic diseases. Omics 2019;23(12):607–14.
[44] Vučković F, Krištić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, et al. Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. Arthritis Rheumatol 2015;67(11):2978–89.
[45] Takahashi M, Kuroki Y, Ohtsubo K, Taniguchi N. Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the *N*-glycan core: their functions and target proteins. Carbohydr Res 2009;344(12):1387–90.
[46] Petrović T, Vijay A, Vučković F, Trbojević-Akmačić I, Ollivere BJ, Marjanović D, et al. IgG *N*-glycome changes during the course of severe COVID-19: an observational study. EBioMedicine 2022;81:104101.
[47] Russell A, Adua E, Ugrina I, Laws S, Wang W. Unravelling immunoglobulin G Fc N-glycosylation: a dynamic marker potentiating predictive, preventive and personalised medicine. Int J Mol Sci 2018;19(2):390.
[48] Russell AC, Šimurina M, Garcia MT, Novokmet M, Wang Y, Rudan I, et al. The N-glycosylation of immunoglobulin G as a novel biomarker of Parkinson's disease. Glycobiology 2017;27(5):501–10.
[49] Meng X, Song M, Vilaj M, Štambuk J, Dolikun M, Zhang J, et al. Glycosylation of IgG associates with hypertension and type 2 diabetes mellitus comorbidity in the Chinese Muslim ethnic minorities and the Han Chinese. J Pers Med 2021;11(7):614.
[50] Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. Nat Med 2012;18(9):1401–6.
[51] Vicente MM, Alves I, Gaifem J, Rodrigues CS, Fernandes Â, Dias AM, et al. Altered IgG glycosylation at COVID-19 diagnosis predicts disease severity. Eur J Immunol 2022;52(6):946–57.
[52] Cao Y, Song Z, Guo Z, Zhao X, Gong Y, Zhao K, et al. Cytokines in the immune microenvironment change the glycosylation of IgG by regulating intracellular glycosyltransferases. Front Immunol 2021;12:724379.
[53] Ridker PM, Devalaraja M, Baeres FMM, Engelmann MDM, Hovingh GK, Ivkovic M, et al. IL-6 inhibition with ziltivekimab in patients at high atherosclerotic risk (RESCUE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. Lancet 2021;397(10289):2060–9.
[54] Broch K, Anstensrud AK, Woxholt S, Sharma K, Tøllefsen IM, Bendz B, et al. Randomized trial of interleukin-6 receptor inhibition in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2021;77(15):1845–55.
[55] Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. N Engl J Med 2017;377(12):1119–31.