

论著·临床研究

川崎病患儿循环内皮祖细胞功能与血浆超敏C反应蛋白浓度的关系

徐明国¹ 门丽娜² 王海霞¹ 祖莹³ 赵春玉¹ 赵霞² 蔡华波¹ 孟祥春¹ 王涛¹

(深圳市儿童医院 1. 心血管中心; 2. 神经内科; 3. 深圳市儿科研究所, 广东 深圳 518026)

[摘要] **目的** 研究川崎病患儿循环内皮祖细胞的功能状态及其与血浆超敏C反应蛋白(Hs-CRP)浓度的关系。**方法** 将10例川崎病患儿和10例健康体检儿童分为川崎病组 and 对照组。利用含有血管内皮细胞生长因子(VEGF),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的DMEM培养基将入选者的外周血单个核细胞诱导培养为内皮祖细胞。然后分别利用MTT法,改良Boyden小室法及细胞培养板贴壁法测定内皮祖细胞的增殖、迁移和贴壁功能。利用胶乳增强的免疫比浊法测定血浆Hs-CRP的浓度。**结果** 川崎病组内皮祖细胞的增殖能力、迁移能力和贴壁能力均较对照组显著降低,差异有统计学意义, $P<0.01$ 。川崎病组Hs-CRP的浓度较对照组显著升高($87.1\pm30.2\text{ mg/L}$ vs $5.3\pm3.4\text{ mg/L}$; $P<0.01$)。川崎病组循环内皮祖细胞功能与血浆Hs-CRP浓度呈显著负相关。**结论** 川崎病患儿循环内皮祖细胞功能显著降低,这可能与川崎病患儿体内的炎症介质反应有关。

[中国当代儿科杂志,2010,12(7):513-517]

[关键词] 川崎病;内皮祖细胞;内皮细胞;超敏C反应蛋白;儿童

[中图分类号] R72 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)07-0513-05

Decreased circulating endothelial progenitor cell function: relationship with serum concentrations of high-sensitivity C-reactive protein in children with Kawasaki disease

XU Ming-Guo, MEN Li-Na, WANG Hai-Xia, ZU Ying, ZHAO Chun-Yu, ZHAO Xia, CAI Hua-Bo, MENG Xiang-Chun, WANG Tao. Cardiovascular Center, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518026, China (Email: nihaomingguo@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the function of circulating endothelial progenitor cells and its relationship with serum concentrations of high-sensitivity C-reactive protein (Hs-CRP) in children with Kawasaki disease. **Methods** Ten children with Kawasaki disease and ten healthy children as a control group were enrolled. The peripheral mononuclear cells were induced into endothelial progenitor cells using Dulbecco's Modified Eagle Medium containing vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. The proliferative ability, migratory ability and adhesive ability of endothelial progenitor cells were assessed by MTT methods, modified Boyden chamber methods and cell culture plate adhesion method, respectively. The concentrations of serum Hs-CRP were measured by latex enhanced turbidimetric immunoassay. **Results** The proliferative ability, migratory ability and adhesive ability of endothelial progenitor cells in the Kawasaki disease group were significantly lower than those in the control group ($P<0.01$). The serum concentrations of Hs-CRP in the Kawasaki disease group were significantly higher than those in the control group ($87.1\pm30.2\text{ mg/L}$ vs $5.3\pm3.4\text{ mg/L}$; $P<0.01$). The function of circulating endothelial progenitor cells was negatively correlated with serum concentrations of Hs-CRP in the Kawasaki disease group. **Conclusions** The function of circulating endothelial progenitor cells is decreased in children with Kawasaki disease, which may be associated with the abnormal expression of inflammatory mediators.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (7):513-517]

Key words: Kawasaki disease; Endothelial progenitor cell; Endothelial cell; High-sensitivity C-reactive protein; Child

川崎病是一种全身中小血管的炎症性疾病,其病因尚未完全明确,但目前多认为与自身免疫紊乱有关^[1]。川崎病诱发的冠状动脉损伤是危害儿童身体健康的重大疾病。研究表明,冠状动脉内皮细

[收稿日期]2010-01-12;[修回日期]2010-02-08
[基金项目]广东省医学科学基金(批准号:B2009226)。
[作者简介]徐明国,男,博士,主治医师。

胞功能不全和结构损伤与川崎病诱发的冠状动脉损伤有着密切的联系,内皮细胞结构和功能损伤可能是动脉损伤的始动因素^[2]。因此,维持动脉内皮细胞的正常结构和功能对防治冠状动脉损伤具有重要意义。

大量实验资料表明,骨髓、外周血和脐血中存在能分化为内皮细胞并参与血管内皮细胞修复的内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)^[3-4]。动物实验发现,EPC能够归巢、定位到损伤的动脉内皮细胞处,并增殖、分化为成熟且功能正常的内皮细胞,能有效抑制动脉内膜增厚和管腔狭窄^[5]。临床研究表明,循环EPC数目和功能与动脉内皮细胞功能呈显著正相关,深入研究发现循环EPC水平与心血管事件及心血管死亡的发生率呈显著负相关^[4]。因此,循环EPC水平对维持正常的心血管功能具有重要意义。研究发现血浆超敏C反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, Hs-CRP)能够损伤体外培养EPC的功能,增加EPC的凋亡^[6]。同时,已发现血浆Hs-CRP在川崎病患者体内显著升高^[7]。然而,目前尚未见川崎病患者循环EPC功能状态的报道。

本研究拟探讨川崎病患者循环EPC的增殖、迁移及贴壁功能;同时分析EPC的功能状态与血浆浓度的关系,将有助于阐明川崎病患者发生冠状动脉损伤的机制,为防治川崎病诱发的冠状动脉损伤提供实验依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

典型的川崎病患者10例为川崎病组,年龄6月至4岁,中位年龄26月;男女比例为7:3;健康体检者10例为对照组,年龄7月至4岁,中位年龄25月,男女比例为7:3。两组之间的一般资料,包括年龄、体重、白蛋白、球蛋白及胆红素差异无统计学意义。所有血液标本均在未进行任何治疗前取得。川崎病患者的入选标准依据1984年日本川崎病委员会修订的诊断标准,并排除心力衰竭及其他应激性疾病。所有川崎病患者均在发热的第5~7天,入选本研究并抽取外周静脉血。川崎病患者在急性期均使用2 g/kg的人血丙种球蛋白一次性静脉滴注,并接受30 mg/kg的阿司匹林口服。健康对照组血液标本在体检时获取。

1.2 内皮祖细胞的培养与鉴定

无菌条件下抽取外周静脉血,用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞。最后将分离得到的细胞置于含体积分数10%的胎牛血清、10 ng/L血管内

皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、2 ng/L碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的DMEM培养基中。培养7 d的外周血单个核细胞,倒出原有培养基用PBS液洗两次。然后加入浓度为10 ng/L的Dil标记的乙酰化低密度脂蛋白(1, 10-dioctadecyl-3, 3', 3'', 3'''-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-labeled acetylated low density lipoprotein, Dil-acLDL, Molecular Probes公司)溶液,使液体铺满瓶底,然后37℃孵育1 h。倒出Dil-acLDL溶液,用PBS洗涤两次。随后加入4%多聚甲醛3 mL,固定20 min。倒出4%的多聚甲醛然后加入10 ng/L的异硫氰酸荧光素-标记的植物凝集素(fluorescein isothiocyanate-Lectin, FITC-Lectin, Sigma公司),37℃孵育24 h。然后用Carl Zeiss荧光显微镜观察,Dil-acLDL/FITC-Lectin双阳性细胞定为EPC。

1.3 内皮祖细胞的功能鉴定

用0.125%胰蛋白酶消化收集EPC,悬浮在培养液中并计数。按照下述方法进行实验。

1.3.1 EPC增殖能力检测 将 4×10^5 EPC接种到包被有人纤维连接蛋白的96孔培养板,然后静置24 h。每孔加MTT(5 g/L) 10 μ L,培养4 h后弃上清液,再加入二甲基亚砷(150 μ L/孔),于微量振荡器充分振荡10 min,置酶标仪于波长490 nm处测吸收度值。吸光度强的细胞增殖能力强。

1.3.2 EPC迁移能力检测 将含有VEGF 50 μ g/L的培养液25 μ L加入改良的Boyden小室的下室,将 2.5×10^4 个EPC悬浮在50 μ L培养液中,注入上室,培养24 h,刮去滤膜上面的未移动细胞,用甲醇固定,Giemsa染色,随机选择5个显微镜视野($\times 400$),计数迁移的细胞。

1.3.3 EPC贴壁能力检测 2.5×10^4 个EPC悬浮在500 μ L培养液中,然后将EPC接种在包被有人纤维连接蛋白的24孔培养板中,37℃培养30 min,用PBS洗涤3次后,每孔选择5个高倍视野($\times 200$)计数贴壁细胞。贴壁细胞数多的黏附能力强。

1.4 Hs-CRP浓度的测定

清晨空腹抽取静脉血5 mL置于枸橼酸钠抗凝管中,离心10 min后取血浆,用终点散射比浊法测定Hs-CRP浓度,测定范围为0.156~1 000 mg/L。

1.5 统计学分析

结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析使用SPSS 13.0进行。川崎病组和对照组的比较采用非配对 t 检验;使用简单线性回归分析川崎病组Hs-CRP浓度与EPC功能的关系。 $P < 0.05$ 定义为

有统计学意义。

2 结果

2.1 EPC 的鉴定

刚分离得到的外周血单个核细胞,在光镜下呈圆形,细胞中心可见细胞核。培养 7 d 后细胞变为

梭形、铺路样;用 DIL-acLDL 和 FITC-Lectin 进行标记,呈双阳性反应,定义为 EPC。见图 1。

2.2 EPC 的功能测定

川崎病组 EPC 的增殖能力、迁移能力和贴壁能力均较对照组显著降低,差异有统计学意义,均 $P < 0.01$ 。见表 1。

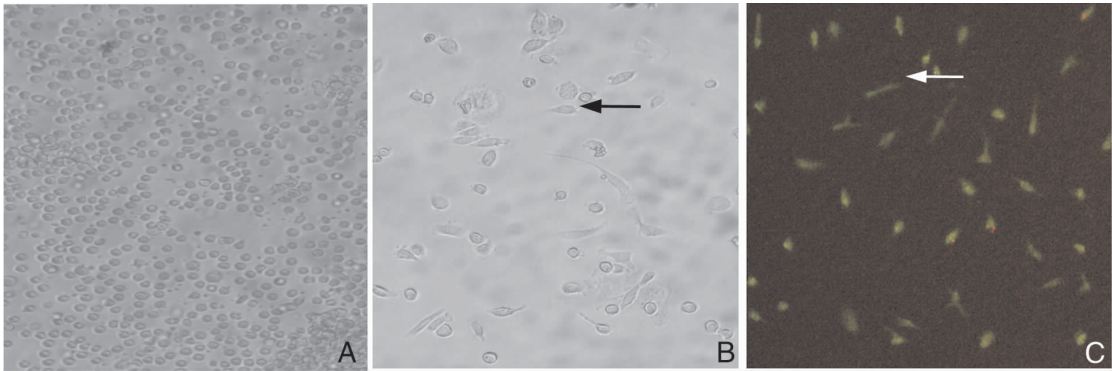


图1 EPC 的体外诱导、培养与鉴定 A: 光镜下观察刚分离得到的单个核细胞,呈圆形(×100);B:培养7d的单个核细胞成为EPC,呈铺路石样改变,箭头所示(×100);C:荧光显微镜观察 Dil-acLDL 和 FITC-Lectin 双阳性的EPC,呈红、绿重叠的颜色,箭头所示(×100)。

表1 川崎病组和对照组 EPC 功能的比较 (x̄±s)				
组别	例数	迁移能力 (细胞数目/高倍视野)	增殖能力 (OD490)	贴壁能力 (细胞数目/高倍视野)
对照组	10	5.50±1.78	0.66±0.07	11.20±2.04
川崎病组	10	3.40±1.35	0.47±0.08	6.50±2.12
t 值		2.97	5.64	5.05
P 值		0.008	0.000	0.000

照组 Hs-CRP 的浓度为 5.3 ± 3.4 mg/L,两组比较差异有统计学意义, $t = -8.52, P < 0.01$ 。

2.4 EPC 的功能与 Hs-CRP 浓度的关系

简单线性回归分析发现,川崎病组 EPC 的增殖、迁移与贴壁功能与 Hs-CRP 浓度呈显著负相关。见图 2。

2.3 Hs-CRP 浓度比较

川崎病组 Hs-CRP 的浓度为 87.1 ± 30.2 mg/L,对

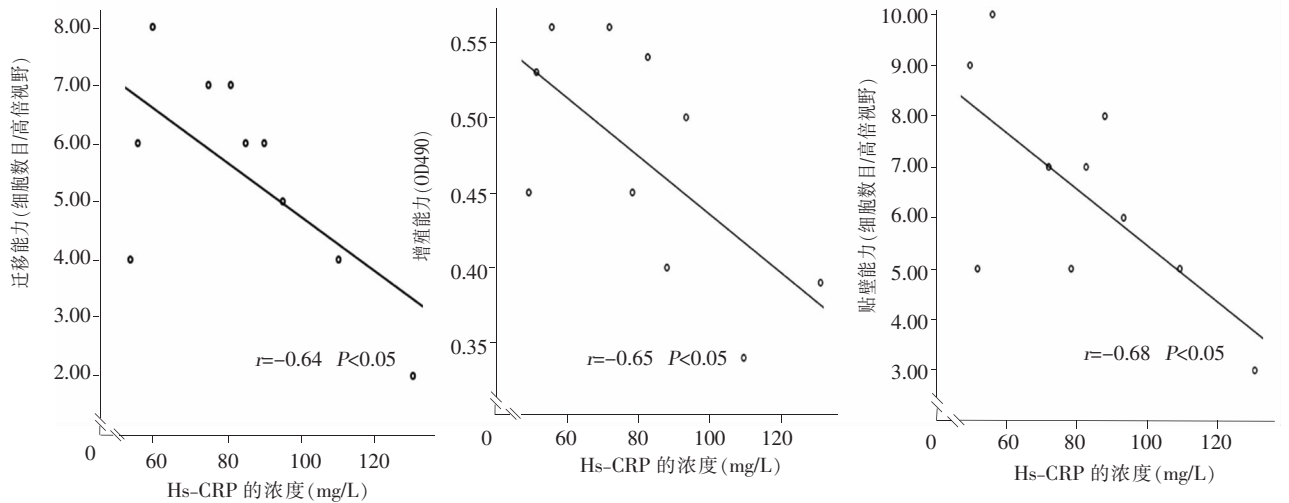


图2 EPC 的迁移、增殖和贴壁能力与 Hs-CRP 浓度的关系

3 讨论

川崎病是一种主要波及全身中、小动脉的炎症性疾病,其中危害最大的是心脏冠状动脉的损伤^[8]。即使川崎病患儿在急性期未发生冠状动脉损伤,但其所遗留的冠状动脉内皮细胞功能不全是成年期发生冠状动脉粥样硬化的危险因素^[2]。因此,维持正常的动脉内皮细胞结构和功能,对防治川崎病诱发的冠状动脉损伤具有重要意义。

内皮细胞是覆盖于动脉内表面的单核细胞层,内皮细胞不仅是动脉的渗透屏障而且是一个多功能的旁分泌和内分泌器官^[9]。心血管疾病的危险因素如炎症、高血脂、高血糖、高血压、吸烟、肥胖、高龄、高半胱氨酸血症等都可以损伤内皮细胞,从而启动(或加速)冠状动脉的损伤^[10]。国内研究报道用高分辨率超声观察川崎病恢复期肱动脉血流介导的扩张反应(flow mediated-vasodilation, FMD),以此评价血管内皮功能。该研究证实在川崎病恢复期仍存在内皮功能障碍^[11]。Yamakawa等^[12]在川崎病患者冠脉内分别注射内皮依赖性血管舒张因子乙酰胆碱和非内皮依赖性血管舒张因子硝酸异山梨酯,观察冠脉的舒缩反应,以此了解冠状动脉内皮细胞功能。结果发现持续冠脉瘤处及冠脉瘤消退处冠脉皆存在内皮细胞功能障碍。Niboshi等^[2]证明有川崎病史的成人亦存在血管内皮细胞功能不全,其研究表明川崎病史可能是早期冠状动脉粥样硬化发生的危险因素。持续性冠状动脉瘤(coronary artery aneurysm, CAA)患者的冠脉因内皮和(或)平滑肌功能障碍而较正常的冠脉僵硬、弹性降低。即使CAA消退,该处血管壁形态仍持续异常,内膜不同程度增厚,血管功能受损。因此,川崎病患儿冠状动脉内皮细胞结构和功能受损,修复受损的内皮细胞对防治冠状动脉瘤和冠状动脉粥样硬化的发生具有重要意义。

1997年Asahara等^[13]首次报道了成人外周血中存在能够分化为成熟内皮细胞的干细胞——EPC。目前认为骨髓中的CD34⁺和VEGFR-2⁺的造血干细胞是EPC。2002年,Walter等^[14]利用基因转染技术证明EPC可以归巢到损伤的动脉部位。2003年,Griese等^[15]报道静脉内注射体外扩增的EPC,可以有效抑制损伤动脉新生内膜的形成。2003年,Hill等^[16]报道外周循环中的EPC水平与反映内皮细胞功能的指标FMD(flow-mediated dilation, FMD)呈正相关,说明EPC与动脉内皮细胞功能有密切关系。2004年He等^[17]报道,移植体外扩

增的EPC可以促进损伤动脉的再内皮化程度并改善内皮细胞功能。2005年,Werner等^[4]报道,外周循环中CD34⁺/KDR双阳性的细胞水平与心血管事件的发生和心血管死亡呈显著负相关。由此可见,EPC对维持正常的内皮细胞结构和功能具有重要意义。

本研究发现,川崎病患儿外周循环EPC功能较对照组显著降低,说明川崎病患儿体内参与损伤内皮细胞修复的EPC能力下降。提示川崎病容易发生冠状动脉损伤的原因一方面与自身免疫反应及炎症直接损伤有关,另一方面与内皮细胞损伤后未能得到及时有效修复有关。若能通过药物或者生物工程学的方法提高外周循环中EPC的数目和功能,可能会减少川崎病患儿发生冠状动脉损伤的概率。

为了探讨川崎病患儿体内循环EPC功能较对照组显著降低的原因,本研究分析了血浆hs-CRP浓度和EPC功能的关系。结果发现,川崎病患儿血浆hs-CRP浓度较对照组显著升高,这一结果与文献报道相一致^[18-19]。统计学分析表明,川崎病组血浆hs-CRP浓度与EPC的增殖、迁移和贴壁功能呈显著负相关。提示川崎病诱发的炎症不仅能直接损伤血管内皮细胞,而且损伤了EPC的功能,使动脉内皮细胞的保护因素进一步减少。有效和及时抑制川崎病患儿体内的炎症反应,可能会从两方面保护冠状动脉:一方面直接减少炎症因子对血管的损伤,另一方面增加修复因素,如EPC的数目和功能,对血管起到间接的保护作用。综上所述,川崎病患儿体内循环EPC功能较对照组显著下降,这可能与患儿体内炎症介质的损伤有关。抑制炎症反应并提高循环EPC的功能可能会有效降低川崎病患儿发生冠状动脉损伤的风险。

【参 考 文 献】

- [1] Satou GM, Giamelli J, Gewitz MH. Kawasaki disease: diagnosis, management, and long-term implications[J]. *Cardiol Rev*, 2007, 15(4):163-169.
- [2] Niboshi A, Hamaoka K, Sakata K, Yamaguchi N. Endothelial dysfunction in adult patients with a history of Kawasaki disease[J]. *Eur J Pediatr*, 2008, 167(2):189-196.
- [3] Hibbert B, Olsen S, O'Brien E. Involvement of progenitor cells in vascular repair[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13(8):322-326.
- [4] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(10):999-1007.
- [5] Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(3):413-421.
- [6] 崔斌, 黄岚, 谭虎, 赵晓辉, 宋明宝, 于世勇. C反应蛋白对内皮祖细胞部分生物学功能的影响及其机制的实验研究[J].

中华心血管病杂志, 2008, 36(5):435-438.

[7] Mitani Y, Sawada H, Hayakawa H, Aoki K, Ohashi H, Matsumura M, et al. Elevated levels of high-sensitivity C-reactive protein and serum amyloid-A late after Kawasaki disease: association between inflammation and late coronary sequelae in Kawasaki disease[J]. Circulation, 2005, 111(1):38-43.

[8] Onouchi Y, Gunji T, Burns JC, Shimizu C, Newburger JW, Yashiro M, et al. ITPKC functional polymorphism associated with Kawasaki disease susceptibility and formation of coronary artery aneurysms[J]. Nat Genet, 2008, 40(1):35-42.

[9] Wu-Wong JR. Endothelial dysfunction and chronic kidney disease: treatment options[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2008, 9(9):970-982.

[10] Grover-Paez F, Zavalza-Gomez AB. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2009, 84(1):1-10.

[11] 谢永林, 邓又斌, 常青, 向慧娟, 刘红云. 超声评价川崎病后肱动脉内皮功能[J]. 郧阳医学院学报, 2004, 23(4):201-204.

[12] Yamakawa R, Ishii M, Sugimura T, Akagi T, Eto G, Iemura M, et al. Coronary endothelial dysfunction after Kawasaki disease: evaluation by intracoronary injection of acetylcholine[J]. J Am Coll Cardiol, 1998, 31(5):1074-1080.

[13] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302):964-967.

[14] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. Circulation, 2002, 105(25):3017-3024.

[15] Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy[J]. Circulation, 2003, 108(21):2710-2715.

[16] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. N Engl J Med, 2003, 348(7):593-600.

[17] He T, Smith LA, Harrington S, Nath KA, Caplice NM, Katusic ZS. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries[J]. Stroke, 2004, 35(10):2378-2384.

[18] 陈瑞, 张爱荣, 赵信喜, 李战华. 川崎病患者血清中 hs-CRP 与基质金属蛋白酶及抑制剂联合检测的临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(12):989-991.

[19] 彭茜, 吴青, 陈昌辉, 洪华, 张玲英. 血清 sIL-2 RIL-6 与 hs-CRP 水平的测定在川崎病早期诊断中的临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(3):208-210.

(本文编辑:黄 榕)

· 消息 ·

2010 年全军第十一届儿科学专业学术会议征文通知

中国人民解放军医学科学技术委员会儿科学专业委员会拟定于 2010 年 8 月在兰州举办全军第十一届儿科学专业学术会议暨第四次全国儿科热点会议。欢迎军内外从事小儿内科、内儿科、妇儿科、小儿外科专业的各级临床医师及护理人员、预防医学工作者、实验室研究及相关人员踊跃投稿参加学术会议。

- 一、征文范围:小儿内、外科所有专业临床、保健、实验室以及军事儿科学方面各种形式的论文。
- 二、征文要求:(1)文章末在国内外杂志上公开发表,全文 4500 字以内及摘要 800 字以内的打印稿一份,需同时附电子版(Word 格式),写明作者姓名、单位、邮编、联系电话,加盖单位公章。
- 三、来稿请寄:兰州市七里河区滨河南路 333 号兰州军区总医院儿科收。邮编 730050。在信封上请注明“会议征文”字样,联系人:戴永利(手机:13099147678)。电子版请寄:zmt0702@163.com;guolinmei9999@sina.com;guolinmei9999@163.com
- 四、注意事项:(1)请作者自留底稿;(2)截稿日期:2010 年 6 月 26 日
- 五、会议确切时间以第二轮会议通知为准。

全军医学科学委员会儿科学专业委员会
2010 年 1 月 22 日