

· 临床研究 ·

川崎病患儿外周血单个核细胞基质细胞 衍生因子-1 和其受体的变化及意义

张俊¹, 桂永浩¹, 杨毅²

(1. 复旦大学附属儿科医院心血管中心; 2. 复旦大学儿科研究所, 上海 200032)

[摘要] 目的 观察川崎病(KD)患者血浆基质细胞衍生因子-1(SDF-1)水平及外周血单个核细胞(PBMC)中SDF-1的受体CXCR4 mRNA表达变化,并分析其与KD及冠状动脉损害的相关关系。方法 采用ELISA方法及荧光定量PCR技术分别测定12例合并冠脉损害和44例无冠脉损害KD患者的急性期与缓解期血浆SDF-1浓度及PBMC中CXCR4 mRNA表达变化,并与60例正常人比较。结果 KD患者急性期血浆SDF-1蛋白水平为 $1\,833 \pm 395$ ng/L; PBMC中CXCR4 mRNA表达水平为 6.57 ± 2.81 较对照组升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 缓解期血浆SDF-1蛋白和CXCR4 mRNA表达水平较急性期下降($P < 0.01$),但仍显著高于对照组。KD患者合并冠脉损害者PBMC中CXCR4 mRNA表达为 8.19 ± 2.39 ,显著高于无冠脉损害者的 6.13 ± 2.77 ($P < 0.01$)。结论 KD患者血浆SDF-1水平及PBMC中CXCR4 mRNA表达是增高的,有可能作为判断KD病情活动状态及冠脉损害的免疫学指标。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(4): 283-286]

[关键词] 川崎病; 基质细胞衍生因子-1; 外周血单个核细胞; 儿童

[中图分类号] R593 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)04-0283-04

Expressions of plasma SDF-1 and its receptor CXCR4 in peripheral blood mononuclear cells of children with Kawasaki disease

ZHANG Jun, GUI Yong-Hao, YANG Yi. Cardiovascular Centre, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China (Gui Y-H, Email: yhgui@shmu.edu.cn)

Abstract: Objective This study examined the expressions of plasma stromal cell derived factor-1 (SDF-1) and CXCR4 mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of children with Kawasaki disease (KD) and aimed to explore the significance of SDF-1 and CXCR4 mRNA in KD. **Methods** Fifty-six children with KD (12 cases complicated by coronary artery lesions) and 60 age and gender-matched healthy children (normal controls) were enrolled in this study. Plasma SDF-1 levels and CXCR4 mRNA expression in PBMC were measured using ELISA and real-time quantitative PCR at the acute and convalescence stages of KD. **Results** Plasma SDF-1 levels ($1\,833 \pm 395$ ng/L vs $1\,126 \pm 408$ ng/L; $P < 0.05$) and the CXCR4 mRNA expression in PBMC (6.57 ± 2.81 vs 2.58 ± 1.01 ; $P < 0.01$) in KD patients were significantly higher than those in normal controls at the acute stage. Both plasma SDF-1 levels and CXCR4 mRNA expression in KD patients decreased significantly at the convalescence stage, but nevertheless remained higher than those in the normal controls. The patients with concomitant coronary artery lesions showed higher CXCR4 mRNA levels than without at the acute stage (8.19 ± 2.39 vs 6.13 ± 2.77 ; $P < 0.05$). **Conclusions** Plasma SDF-1 concentration and CXCR4 mRNA expression in PBMC increased in KD patients. CXCR4 mRNA might be involved in the development of coronary artery lesions in KD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(4): 283-286]

Key words: Kawasaki disease; Stromal cell derived factor-1; Peripheral blood mononuclear cell; Child

川崎病(Kawasaki disease, KD)是一种原因不明的儿童常见的免疫相关性血管炎综合征,其最严重的并发症是冠状动脉病变,包括冠状动脉瘤的形成和心肌梗死的发生。KD急性期存在明显免疫调节异常,免疫活化细胞的激活是KD基本的免疫病理

改变。多年来研究发现免疫细胞过度激活产生的多种细胞因子介导的促炎和抗炎反应失衡可能是川崎病的发生、发展及其冠状动脉损害的关键因素之一。

基质细胞衍生因子-1(SDF-1)是一种趋化淋

[收稿日期] 2005-11-19; [修回日期] 2006-02-23

[作者简介] 张俊,女,博士生,医师。主攻方向:小儿心血管疾病。

[通讯作者] 桂永浩,教授,复旦大学附属儿科医院。邮编:200032。

巴细胞、单核细胞及树突状细胞的高效趋化因子,通过结合受体 CXCR4,诱导 T 细胞滚动并紧密黏附活化的内皮细胞^[1]。国外研究表明,SDF-1/ CXCR4 可能参与了成人急性冠状动脉病变的病理过程^[2],SDF-1 通过受体 CXCR4 来诱导血小板聚集和活化;并且在冠状动脉粥样硬化斑块内的平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞中 SDF-1 水平明显升高。但与其与川崎病的关联,目前国内外尚无相关报道。本研究于 2004 年 2 月至 2005 年 6 月检测 KD 患儿血浆 SDF-1 浓度和外周血单个核细胞(PBMC)中 SDF-1 的受体-CXCR4 mRNA 表达的变化,以探讨 SDF-1/ CXCR4 在川崎病中的临床意义。

1 对象和方法

1.1 对象

川崎病组:2004 年 2 月至 2005 年 2 月在本院就诊的川崎病患者 56 例,均符合川崎病诊断标准^[3]。男 37 例,女 19 例,年龄 1 月至 4 岁 9 个月,平均 1 岁 9 个月,其中存在冠状动脉损害者 12 例。川崎病合并冠状动脉损害的诊断指标为^[4]:冠状动脉扩张,内径为 3~4 mm, $0.16 < \text{冠状动脉内径}/\text{主动脉根部内径}(\text{CA}/\text{AD}) < 0.3$;冠状动脉瘤:冠状动脉主干内径为 4~8 mm,前降支或回旋支内径 ≥ 3 mm, $\text{CA}/\text{AO} > 0.3$;巨大冠状动脉瘤:内径 > 8 mm, $\text{CA}/\text{AO} \geq 0.6$ 。

健康对照组:60 例本院择期外科手术患儿,无发热,除外感染的临床可能,无心血管疾病,其中男 43 例,女 17 例,年龄 1 月至 5 岁 5 个月,平均 2 岁 2 个月。与川崎病组比较性别及年龄无差异。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 分别抽取急性期,即发热 5~7 d,丙种球蛋白(IVIG)治疗前和 IVIG 治疗后第 7~10 d KD 患儿和健康对照组儿童空腹静脉血 3 mL,置肝素抗凝管,用淋巴细胞分离液(购自华美生物高科技有限公司)密度梯度离心后分离 PBMC,同时留取血浆储存于 -80°C 的冰箱内备检。其中有 3 位患儿未在我院随访,故未采集到其缓解期血。

1.2.2 血浆 SDF-1 浓度检测 按酶联免疫测定试剂盒(购自 R&D 公司)说明,以间接竞争抑制酶联免疫吸附法(ELISA)测定。每孔各加入待测样品 100 μL 及第一抗体工作液 100 μL ,常温下置于水平摇床上振荡 2 h,倾去液体,用洗涤液洗涤 4 次,每孔中加入酶标抗体工作液 200 μL ,常温下置于水平摇床上振荡 2 h,倾去液体,用洗涤液洗涤 4 次,每孔中

加入底物工作液 200 μL ,常温下置暗处约 30 min,每孔加终止液 50 μL ,立即在酶标仪波长 450 nm 处测定吸光度(A)值。每个样本双复孔,取其均值。

1.2.3 PBMC 中 SDF-1 受体-CXCR4 基因表达的检测 用荧光定量 PCR 的方法测定。①首先采用 TRIzol(购自 Invitrogen Life Technologies 公司)一步法^[5]抽提上述 3 mL 抗凝血的 PBMC 的 RNA,溶于适量的去核酸酶水中,应用 UV-1601 紫外分光光度仪(日本岛津公司)测定细胞总 RNA 的产量和纯度, A_{260}/A_{280} 比值 = 1.6~2.0。②逆转录过程:总 RNA 溶液 5 μg , Oligo(购自上海生工生物工程技术服务有限公司) 1 μL , DEPC 水加至 11 μL ,混匀, 70°C 、5 min,放置冰上至少 1 min;加入 10 mmol/L dNTP 2 μL , $5 \times \text{RT buffer}$ 4 μL , DEPC 水 1.5 μL , RNA 酶抑制剂(购自华美生物工程技术服务有限公司) 0.5 μL ,轻柔混匀,短暂离心, 37°C 、2 min;加入逆转录酶(Fermentas MMLV) 1 μL ,轻柔混匀, 25°C 、10 min, 37°C 、60 min, 70°C 、10 min,标本进行荧光定量 PCR 或 -20°C 保存备用。③PCR 扩增:根据 GeneBank 内的序列,采用 Primer Premier 5.0 设计引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。CXCR4 引物序列为:上游引物:5'-TTC TAC CCC AAT GAC TTG TG-3' 下游引物:5'-ATG TAG TAA GGC AGC CAA CA-3' 产物长度为 206bp(见图 1)。 β -actin 引物序列为:上游引物:5' AAC CCT AAG GCC AAC AGT GAA AAG 3' 下游引物:5' TCA TGA GGT AGT CTG TGA GGT 3' 产物长度为 231 bp(见图 2)。

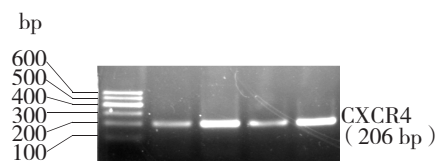


图1 荧光定量 PCR 检测外周血单个核细胞 CXCR4 mRNA 表达

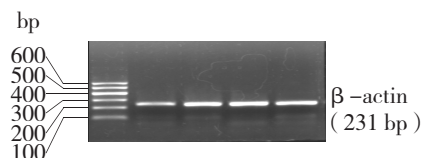


图2 荧光定量 PCR 检测外周血单个核细胞 β -actin 表达

采用荧光定量 PCR 技术;使用 SYBRgreen I 和荧光定量 PCR 仪(美国生物应用公司 ABI 7 000 型)进行 PCR 扩增,以 β -actin 为内参照。反应体系为:5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer;1 μ L dNTP(10 mmol/L);CXCR4 引物各 1 μ L; β -actin 引物各 1 μ L;1 μ L Taq 酶;36 μ L ddH₂O;5 μ L cDNA;总计 50 μ L。PCR 反应条件:94℃预变性 3 min,94℃变性 45 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环。

结果判定:标准参控品 1~5 管,含量依次为 $10^5 \sim 10^9$ 拷贝数/mL,测定阈值循环数(Threshold cycle, Ct),以 Ct 值为横坐标,CXCR4 cDNA 含量为纵坐标,电脑自动绘制标准曲线,并根据此自动计算出各标本的 CXCR4 含量。批间误差:CV 值 < 15%。CXCR4 表达量数据采用 CXCR4 cDNA 含量/ β -actin cDNA 含量的形式给出。

1.3 统计学处理

所有计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行正态性检验。应用 SPSS11.0 统计软件包对数据进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计意义。

2 结果

2.1 KD 患儿血浆中 SDF-1 浓度和 PBMC 中 CXCR4 mRNA 表达强度

KD 患儿急性期与缓解期血浆 SDF-1 蛋白水平均高于对照组($P < 0.05$),PBMC 中 CXCR4 mRNA 表达与对照组比较差异也均有显著性($P < 0.01$)(见表 1,2)。KD 患儿急性期血浆 SDF-1 蛋白水平显著高于缓解期($P < 0.01$),PBMC 中 CXCR4 mRNA 表达缓解期也明显下降($P < 0.01$)(见表 3)。

表 1 川崎病与对照组血浆 SDF-1 浓度

组别	例数	SDF-1 浓度(ng/L)
对照组	60	1 126 $\pm$ 408
川崎病组急性期	56	1 833 $\pm$ 395 ^a
川崎病组缓解期	53	1 551 $\pm$ 404 ^b

与对照组比较,a $t = 9.48, P < 0.05$;b $t = 5.56, P < 0.05$

表 2 川崎病与对照组 PBMC 中 CXCR4 mRNA 表达结果

组别	例数	CXCR4 mRNA
对照组	60	2.58 $\pm$ 1.01
川崎病组急性期	56	6.57 $\pm$ 2.81 ^a
川崎病组缓解期	53	4.01 $\pm$ 2.047 ^b

与对照组比较,a $t = 10.06, P < 0.01$;b $t = 3.93, P < 0.01$

表 3 川崎病组急性期与缓解期血浆 SDF-1 浓度变化与 PBMC 中 CXCR4 mRNA 表达结果

组别	例数	SDF-1 浓度(ng/L)	CXCR4 mRNA
川崎病组急性期	53	1 844 $\pm$ 392	6.59 $\pm$ 2.81
川崎病组缓解期	53	1 551 $\pm$ 404	4.01 $\pm$ 2.47
t		19.30	26.59
P		<0.01	<0.01

2.2 合并冠脉损害与无冠脉损害的 KD 患儿急性期血浆中 SDF-1 浓度和 PBMC 中 CXCR4 mRNA 表达强度

KD 冠状动脉损害组与无冠状动脉损害组比较,急性期血浆中 SDF-1 蛋白水平差异无显著性($P > 0.05$),PBMC 中 CXCR4 mRNA 表达差异有显著性($P < 0.05$)(见表 4)。

表 4 川崎病组中血浆 SDF-1 浓度变化与 PBMC 中 CXCR4 mRNA 表达结果

组别	例数	SDF-1 浓度(ng/L)	CXCR4 mRNA
川崎病组急性期	12	1 769 $\pm$ 278	8.19 $\pm$ 2.39
川崎病组缓解期	44	1 850 $\pm$ 422	6.13 $\pm$ 2.77
t		0.63	2.34
P		>0.05	<0.05

3 讨论

SDF-1 是一种强烈的淋巴细胞和单核细胞趋化因子,通过结合受体 CXCR4,在 T 细胞定位于炎症部位及归巢于免疫部位的过程中发挥了主要作用。SDF-1 刺激内皮细胞迁移及血管形成,和其他 CXC 趋化因子,如 IL-8 和生长相关致癌基因- α ,以及生长因子一起促进和引导血管生成与血管重构^[6]。SDF-1/CXCR4 在各种生理病理过程中的重要作用日益受到重视。

对川崎病患者冠状动脉瘤的病理检查发现,血管梗阻与显著活跃的血管再生(重构)并存,局部有大量的单个核细胞浸润,提示单个核细胞在冠状动脉损害病变机制中发挥了关键作用。在冠状动脉瘤标本中检测到 3 种不同的血管生长因子及其受体:转移生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)、血小板衍生因子-A (PDGF-A)、血管内皮生长因子 (VEGF),这些细胞因子在血管壁各层均明显表达^[7]。

本研究发现川崎病患者血浆 SDF-1 水平及 PBMC 中 CXCR4 mRNA 表达水平均高于对照组,且冠状动脉损害组与无冠状动脉损害组血浆 SDF-1 水平与 PBMC 中 CXCR4 mRNA 表达水平相一致,表明

KD 患儿存在 CXCR4 基因转录和 SDF-1 翻译水平的异常。关于 KD 患儿血浆中 SDF-1 及 PBMC 中 CXCR4 产生增多的原因,推测可能由于血管局部浸润的炎症细胞所分泌的炎症介质增加,这些炎症介质在促进局部细胞增生和积聚的同时又能促进 PBMC 被活化,从而诱导 CXCR4 表达增强、SDF-1 分泌增加。而川崎病组冠状动脉损害组与无冠状动脉损害组比较,急性期血浆 SDF-1 蛋白水平差异无显著性,这可能是由于 SDF-1 与细胞表面表达增强的 CXCR4 结合过多导致外周血浆水平上升不明显。

目前所知 SDF-1 是 CXCR4 的唯一生理配体, CXCR4 也是 SDF-1 的唯一受体,两者之间有非常高的亲和力, SDF-1 与 CXCR4 相互作用是一对一的, SDF-1 介导的趋化反应是由细胞表面受体 CXCR4 的表达水平所决定, CXCR4 表达量越高, SDF-1 诱导发生的迁移细胞越多^[8]。

我们的结果表明川崎病冠状动脉损害者 PBMC 中 CXCR4 表达增强,提示它可能参与了本病冠状动脉损害的发生机制,而川崎病患者冠状动脉内皮细胞功能异常持续存在并呈弥漫性分布,这可能是日后发生动脉粥样硬化重要的危险因素^[9]。因此,对此类患者需长期随访,在 KD 患者中早期检测 CXCR4 含量并检测 SDF-1 的浓度,可以为估计冠脉损害提供帮助,但 SDF-1/CXCR4 在 KD 中的作用机制还有待进一步研究。本次研究是以健康儿童为对照组,因此还不能充分说明 SDF-1/CXCR4 在川崎病组中的特异性,如能将其他多组炎症疾病组纳入,将有助于进一步阐明其临床意义。

本资料表明 KD 急性期 SDF-1 蛋白质和 CXCR4

mRNA 表达增加,冠状动脉损害者更加明显。SDF-1 的变化有可能作为观察 KD 病情活动状态的免疫学指标、CXCR4 表达增高则提示 KD 患儿可能出现冠状动脉损害。

[参 考 文 献]

- [1] 杨文博,孔佩艳. 趋化因子基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) 及其受体 CXCR4 [J]. 免疫学杂志, 2003, 19(S1): 142-144.
- [2] Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Ueland T, Muller F, Eiken HG, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha in unstable angina: potential anti-inflammatory and matrix-stabilizing effects [J]. Circulation, 2002, 106(1): 36-42.
- [3] Council on Cardiovascular Disease in the Young, Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease, American Heart Association. Diagnostic Guidelines for Kawasaki Disease [J]. Circulation, 2001, 103(2): 335-336.
- [4] 王新房. 超声心动图学 [M]. 第 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 1999, 726.
- [5] Mannhalter C, Koizar D, Mitterbauer G. Evaluation of RNA isolation methods and reference genes for RT-PCR analyses of rare target RNA [J]. Clin Chem Lab Med, 2000, 38(2): 171-177.
- [6] Brogan PA, Bose A, Burgner D, Shingadia D, Tulloh R, Michie C, et al. Kawasaki disease: an evidence based approach to diagnosis, treatment, and proposals for future research [J]. Arch Dis Child, 2002, 86(4): 286-290.
- [7] Suzuki A, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M, Yutani C. Remodeling of coronary artery lesions due to Kawasaki disease: comparison of arteriographic and immunohisto-chemical findings [J]. Jpn Heart J, 2000, 41(3): 245-256.
- [8] 丁宇, 张焱焱. 基质细胞衍生因子-1 及其受体 CXCR4 对造血细胞的调控作用 [J]. 实用儿科临床杂志, 2004, 19(1): 69-71.
- [9] Murakami H, Hirokami M, Hanawa N, Oomoto Y, Yamaguchi Y, Miyamoto K, et al. Acetylcholine-induced coronary spasm with a history of Kawasaki disease: case report [J]. Circ J, 2003, 67(3): 273-274.

(本文编辑: 吉耕中)

· 消息 ·

“新生儿颅内病变的 B 超、CT 和 MRI 影像诊断” —国家级继续医学教育学习班通知

上海交通大学医学院附属新华医院上海市儿科医学研究所承担国家级继续医学教育项目“新生儿颅内病变的 B 超、CT 和 MRI 影像诊断”(项目编号: 20060603018), 由陈惠金教授、朱杰明教授等担任主讲。重点介绍 B 超、CT、MRI 及核医学的诊断原理和方法以及对新生儿颅内病变的诊断特性, 并着重介绍头颅 B 超诊断技术。结合影像诊断, 进一步介绍新生儿和早产儿脑损伤的发病机制、病理分型、影像诊断及防治进展, 并介绍有关出血后脑积水的最新治疗方法。拟定 2006 年 10 月 16 日开班, 为期 5 天, 授国家 I 类学分 10 分。招生对象为从事儿科、新生儿、超声或影像学诊断的专业人员。参加者请与陈冠仪联系。地址: 上海市控江路 1665 号, 上海市儿科医学研究所, 邮编: 200092, 电话: (021) 65013060, (021) 65791316。Email: gychen2@hotmail.com, 或 gychenl@yahoo.com.cn。

上海交通大学医学院附属新华医院
上海市儿科医学研究所