

论著 · 临床研究

人血丙种球蛋白和阿司匹林治疗对川崎病 患儿循环内皮祖细胞功能的影响

徐明国¹ 门丽娜² 祖莹³ 赵春玉¹ 孟祥春¹

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

【摘要】目的 研究人血丙种球蛋白(IVIG)和阿司匹林(ASP)治疗对川崎病患儿循环内皮祖细胞功能的影响及其可能的机制。**方法** 抽取10例川崎病患儿IVIG和ASP治疗前及治疗7 d后的外周血,将单个核细胞诱导培养内皮祖细胞。利用MTT法、改良Boyden小室法、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。同时测定血浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和超敏C反应蛋白(hs-CRP)的浓度。**结果** IVIG和ASP治疗7 d后循环内皮祖细胞的功能较治疗前显著提高。IVIG和ASP治疗7 d后血浆中TNF- α 和hs-CRP的浓度显著降低。治疗后TNF- α 和hs-CRP浓度的降低与内皮祖细胞功能的提高呈显著正相关关系。**结论** IVIG和ASP治疗可显著改善川崎病患儿循环内皮祖细胞的功能,其机制可能与TNF- α 和hs-CRP的浓度降低有关。

[中国当代儿科杂志,2011,13(12):966-969]

【关键词】 川崎病; 内皮祖细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 超敏C反应蛋白; 儿童
【中图分类号】 R725 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2011)12-0966-04

Effects of intravenous immunoglobulin and aspirin treatment on the functions of circulating endothelial progenitor cells in children with Kawasaki disease

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

Abstract: Objective To study the effects of intravenous immunoglobulin (IVIG) and aspirin treatment on the functions of circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in children with Kawasaki disease (KD) and possible mechanisms. **Methods** Blood samples were obtained in 10 children with KD before and 7 days after the treatment by IVIG and aspirin. MTT method, modified Boyden chamber method and cell culture plate adhesion method were used to assess the functions of EPCs, including proliferation, adhesion and migration activities. The plasma levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and high-sensitivity C reactive protein (hs-CRP) were also measured. **Results** The functions of circulating EPCs 7 days after IVIG and aspirin treatment were significantly improved. IVIG and aspirin treatment significantly reduced plasma TNF- α and hs-CRP concentrations. There was a significant linear regression relationship between the reduced plasma TNF- α and hs-CRP levels and the increased functions of circulating EPCs. **Conclusions** IVIG and aspirin treatment can improve the functions of circulating EPCs, possibly through reducing plasma concentrations of TNF- α and hs-CRP.
[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (12):966-969]

Key words: Kawasaki disease; Endothelial progenitor cell; Tumor necrosis factor- α ; High-sensitivity C reaction protein; Child

川崎病是一种全身血管炎症性疾病,主要损伤中型和小型血管特别是冠状动脉^[1],具体发病机制尚不明确。有报道免疫系统功能紊乱、炎症介质和细胞因子的分泌失调及血管损伤后的修复功能降低可能是川崎病血管损伤发生的主要原因^[2-5]。已经证实,急性期川崎病患儿体内肿瘤坏死因子(tumor

necrosis factor- α , TNF- α)和超敏C反应蛋白(high sensitivity-C reactive protein, hs-CRP)浓度显著升高^[6-8]。TNF- α 和hs-CRP浓度的升高对血管壁的结构和功能有明显的损伤作用^[9-10]。内皮祖细胞是(endothelial progenitor cells, EPCs)是一簇能分化为

[收稿日期]2011-06-15;[修回日期]2011-08-01
[基金项目]广东省医学科学基金(No:B2011291)。
[作者简介]徐明国,男,博士,副主任医师。

成熟内皮细胞的干细胞群^[11],是血管损伤的修复因素,也是维持血管壁结构和功能正常的重要因素^[12-13]。

本课题组前期研究表明急性期川崎病患儿循环EPCs功能显著降低,可能导致冠状动脉的修复延迟,最终导致冠状动脉病变发生^[5]。静注人血丙种球蛋白(intravenous immunoglobulin, IVIG)和阿司匹林(aspirin, ASP)是治疗川崎病的国际公认方法,IVIG和ASP治疗可以有效防止冠状动脉病变的发生。然而,目前尚未见IVIG和ASP治疗对川崎病患者循环EPCs功能影响的报道。因此,本研究观察了IVIG和ASP对急性期川崎病患儿循环EPCs功能的影响及EPCs功能改变与TNF- α 和hs-CRP浓度改变的关系,以期对川崎病的治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2008年7月到2010年3月在我院住院的10例典型川崎病患儿(年龄5个月至3岁,中位年龄20个月;男/女=7/3)在治疗前和治疗7 d后采集静脉血。川崎病患儿的入选标准依据1984年日本川崎病委员会修订的诊断标准^[14],并排除心力衰竭及其他应激性疾病。所有川崎病患儿均在发热的第5~7天,予以2 g/kg的IVIG静脉滴注一次,并予以ASP每日50 mg/kg口服。该研究得到我院医学伦理委员会的批准和患儿家长的知情同意。

1.2 EPCs的培养与鉴定

无菌条件下抽取外周静脉血15 mL,密度梯度离心法分离外周血单个核细胞^[5]。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(VEGF)、2 ng/L碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的DMEM培养基中。培养7 d的外周血单个核细胞,用PBS液洗2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-diiododecyl-3, 3', 3'', 3'''-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-labeled acetylated low density lipoprotein, Dil-acLDL, Molecular Probes公司)溶液,37℃孵育1 h后,PBS洗涤2次。加入4%多聚甲醛3 mL固定20 min。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EPCs。见图1。

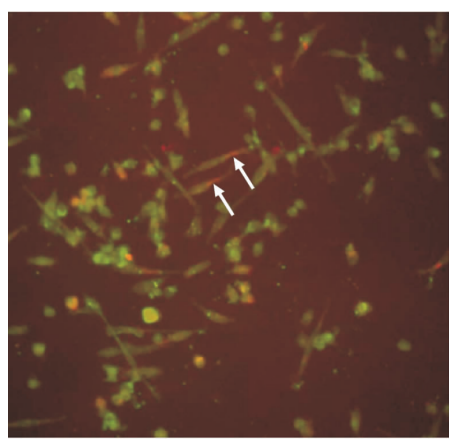


图1 EPCs的鉴定 荧光显微镜观察 Dil-acLDL 阳性(红色)和 FITC-Lectin 阳性(绿色)双阳性的内皮祖细胞($\times 100$)。箭头所示为阳性细胞,呈红、绿重叠的颜色。

1.3 EPCs的功能鉴定

1.3.1 EPCs增殖能力检测 将 4×10^5 个EPCs接种到包被含人纤维连接蛋白的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,再加入二甲基亚砜(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 EPCs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EPCs悬浮在培养液50 μ L,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 EPCs贴壁能力检测 2.5×10^4 个EPCs悬浮在培养液500 μ L中,然后将EPCs接种在包被含人纤维连接蛋白的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 血浆TNF- α 和hs-CRP的测定

于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,后利用终点散射比浊法测定hs-CRP浓度,测定范围为0.156~1000 mg/L。血浆TNF- α 通过ELISA方法测定。ELISA试剂盒购于R&D公司,根据说明书进行操作。每份标本测定2次,取平均值。

1.5 统计学分析

统计学分析使用SPSS 13.0软件进行。结果以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析采用配对t检验;使用线性回归分析EPCs的功能变化与hs-CRP和

TNF-α 浓度变化的关系; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IVIG 和 ASP 治疗前后 EPCs 的功能变化

对体外诱导培养得到 EPCs 进行功能测定显示:IVIG 和 ASP 治疗后,EPCs 的迁移、增殖和贴壁能力均较治疗前显著改善($P < 0.01$),见表 1。

2.2 IVIG 和 ASP 治疗前后血浆 TNF-α 和 hs-CRP 水平的变化

与治疗前比较,治疗后患儿血浆 TNF-α 和 hs-CRP 浓度显著下降($P < 0.01$),见表 1。

2.3 血浆 TNF-α 和 hs-CRP 浓度变化与 EPC 功能变化的关系

血浆 TNF-α 和 hs-CRP 浓度治疗前后的变化值与 EPCs 功能的改变值之间均呈正相关。见图 2~3。

表 1 治疗前后各项指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

	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)	TNF-α 浓度 (pg/L)	hs-CRP 浓度 (mg/L)
治疗前	10	5.5 ± 1.8	0.38 ± 0.08	6.5 ± 1.7	48 ± 7	84 ± 24
治疗后	10	7.9 ± 2.2	0.50 ± 0.08	10.7 ± 1.9	32 ± 6	13 ± 3
t 值		-4.78	-5.07	-5.62	6.47	8.45
P 值		0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001

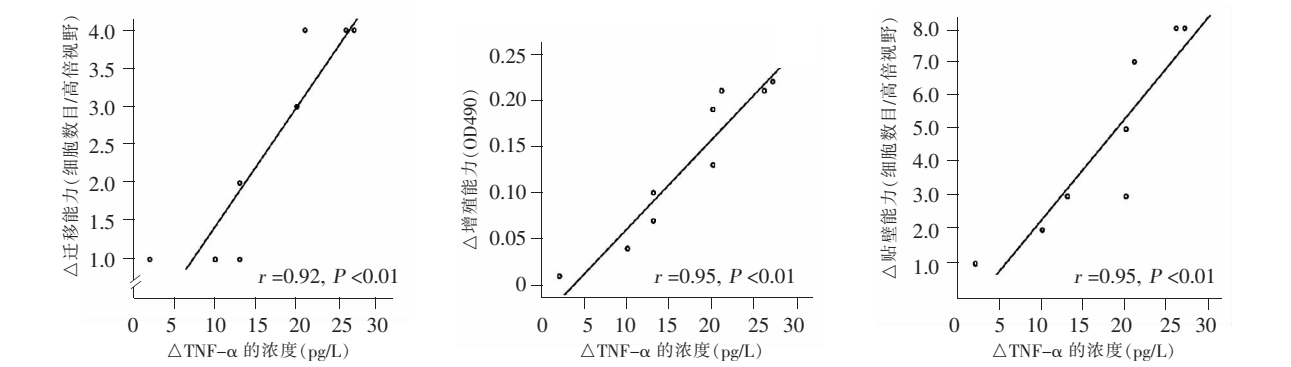


图 2 治疗前后 EPCs 的功能改变与血浆 TNF-α 浓度变化的相关分析($n = 10$) Δ示治疗前后的变化值

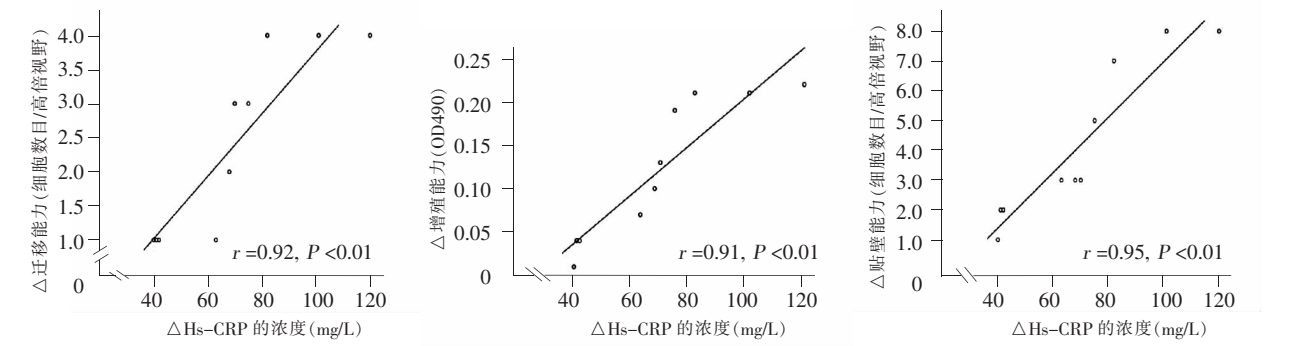


图 3 治疗前后 EPCs 的功能改变与血浆 Hs-CRP 浓度变化的相关分析($n = 10$) Δ示治疗前后的变化值

3 讨论

川崎病所导致的冠状动脉病变是儿童获得性心脏病主要原因,冠状动脉瘤是川崎病最严重的并发症,可能会导致患病儿童的死亡^[15]。冠状动脉瘤持续存在的患儿可出现冠状动脉内皮细胞和平滑肌细胞的功能异常^[16-17]。即使冠状动脉瘤得以恢复,冠

状动脉壁的形态和细胞功能仍不能完全恢复正常。近来的研究表明,EPCs 在维持血管壁的正常结构和功能方面具有重要作用^[11-12,18]。循环 EPCs 的数目和功能与内皮细胞的功能呈正相关关系^[12]。动物和临床试验均表明:提高外周循环 EPCs 的水平可以增加损伤动脉的再内皮化程度并有效抑制新生内膜的形成,阻止血管狭窄的进展^[18-19],增加外周循环 EPCs 的水平可以降低心血管死亡的风险^[13]。

本研究发现川崎病患儿循环 EPCs 的增殖、迁移和贴壁功能在 IVIG 和 ASP 治疗 7 d 后显著改善,提示 IVIG 和 ASP 治疗可以提高患儿 EPCs 的功能。已有报道,高浓度的 TNF- α 可以损伤 EPCs 的功能^[10],血浆 hs-CRP 水平与循环 EPCs 功能呈显著负相关^[9]。体外实验和临床研究发现,IVIG 可以显著抑制 TNF- α 的分泌^[3,6]。本研究测定了 IVIG 和 ASP 治疗前后 TNF- α 和 hs-CRP 的浓度变化,发现 IVIG 和 ASP 治疗后川崎病患儿血浆中 TNF- α 和 hs-CRP 显著降低。进一步的统计学分析显示:川崎病患儿循环 EPCs 的功能改善与血浆 TNF- α 和 hs-CRP 浓度的下降程度呈正相关。研究显示 TNF- α 可能通过损伤内皮细胞,促进白细胞聚集,加速弹性蛋白降解和其他炎症损伤促进冠状动脉病变的形成^[20]。然而,以往的研究主要集中在 TNF- α 对川崎病患儿冠状动脉的直接损伤。本研究发现 TNF- α 对 EPCs 功能的损伤,可能直接影响到机体对冠状动脉的修复能力。因此减少 TNF- α 的分泌,不仅可以有效阻断 TNF- α 对冠状动脉的直接损伤,而且可以通过保护 EPCs 的功能来加速冠状动脉的修复过程。hs-CRP 是一种被广泛应用的炎症反应和组织损伤的标志物,在急性炎症反应、手术创伤、微生物感染和自身免疫反应时可显著升高^[21]。研究发现,hs-CRP 可以直接损伤内皮细胞和 EPCs^[9,22]。本研究发现,IVIG 和 ASP 治疗后 hs-CRP 浓度显著降低,这阻断了 hs-CRP 对血管内皮细胞的直接损伤并通过保护 EPCs 的功能来维持血管壁的修复过程。

综上所述,本研究在国内外首次提出了 IVIG 和 ASP 治疗后川崎病患儿循环 EPCs 功能显著改善,其机制可能与 TNF- α 和 hs-CRP 的浓度降低有关。EPCs 的功能改善可能是 IVIG 和 ASP 治疗川崎病减少冠状动脉损伤形成的机制之一。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] Furukawa S, Matsubara T, Ichiyama T. Regulation of proinflammatory cytokine cascade in Kawasaki disease[J]. Nippon Rinsho, 2008, 66(2): 258-264.
- [3] Lau AC, Duong TT, Ito S, Wilson GJ, Yeung RS. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity improves coronary outcome in an animal model of Kawasaki disease[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 157(2): 300-309.
- [4] Lau AC, Duong TT, Ito S, Yeung RS. Intravenous immunoglobulin and salicylate differentially modulate pathogenic processes leading to vascular damage in a model of Kawasaki disease[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(7): 2131-2141.
- [5] 徐明国, 门丽娜, 王海霞, 祖莹, 赵春玉, 赵霞, 等. 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[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(07): 513-517.
- [6] Ahn SY, Jang GC, Shin JS, Shin KM, Kim DS. Tumor necrosis factor-alpha levels and promoter polymorphism in patients with Kawasaki disease in Korea[J]. Yonsei Med J, 2003, 44(6): 1021-1026.
- [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] Pinna GS, Kafetzis DA, Tselkas OI, Skevaki CL. Kawasaki disease: an overview[J]. Curr Opin Infect Dis, 2008, 21(3): 263-270.
- [9] Chen J, Huang L, Song M, Yu S, Gao P, Jing J. C-reactive protein upregulates receptor for advanced glycation end products expression and alters antioxidant defenses in rat endothelial progenitor cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2009, 53(5): 359-367.
- [10] Zhang Y, Herbert BS, Rajashekhar G, Ingram DA, Yoder MC, Clauss M, et al. Premature senescence of highly proliferative endothelial progenitor cells is induced by tumor necrosis factor-alpha via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Faseb J, 2009, 23(5): 1358-1365.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 于宪一. 川崎病的药物治疗[J]. 中国处方药, 2011, 2(35): 21-23.
- [15] Burns JC, Glode MP. Kawasaki syndrome[J]. Lancet, 2004, 364(9433): 533-544.
- [16] Fukazawa R, Ogawa S. Long-term prognosis of patients with Kawasaki disease: at risk for future atherosclerosis? [J]. J Nippon Med Sch, 2009, 76(3): 124-133.
- [17] 蔡招华, 刘亚黎. 川崎病患者易早发动脉粥样硬化[J]. 中国实用儿科学杂志, 2011, 26(9): 709-712.
- [18] 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.
- [19] Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury[J]. Circ Res, 2003, 93(2): e17-e24.
- [20] Hui-Yuen JS, Duong TT, Yeung RS. TNF-alpha is necessary for induction of coronary artery inflammation and aneurysm formation in an animal model of Kawasaki disease[J]. J Immunol, 2006, 176(10): 6294-6301.
- [21] Musunuru K, Kral BG, Blumenthal RS, Fuster V, Campbell CY, Gluckman TJ, et al. The use of high-sensitivity assays for C-reactive protein in clinical practice[J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2008, 5(10): 621-635.
- [22] Nabata A, Kuroki M, Ueba H, Hashimoto S, Umamoto T, Wada H, et al. C-reactive protein induces endothelial cell apoptosis and matrix metalloproteinase-9 production in human mononuclear cells: Implications for the destabilization of atherosclerotic plaque[J]. Atherosclerosis, 2008, 196(1): 129-135.

(本文编辑:王庆红)