

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.01.011

论著·临床研究

髓系相关蛋白8和14在川崎病患儿中的表达及其与循环内皮细胞的关系

王从军¹ 陈梅¹ 雷中劲²

(1. 湖北省荆楚理工学院医学院, 湖北 荆门 448000;
2. 湖北省荆门市第一人民医院儿科, 湖北 荆门 448000)

[摘要] **目的** 研究髓系相关蛋白8、14 (MRP-8、-14) 在川崎病 (KD) 患儿中的表达及其与循环内皮细胞数 (CECs) 的关系。**方法** 选取41例KD患儿为研究对象, 根据有无冠状动脉扩张分为冠状动脉无扩张KD组和冠状动脉扩张KD组, 同时选取年龄和性别与KD患儿相匹配的因急性上呼吸道感染发热的40例患儿为对照组。分别通过ELISA、RT-PCR和流式细胞术检测各组患儿外周血MRP-8/MRP-14二聚体含量、单个核细胞MRP-8和MRP-14 mRNA表达水平及CECs。Pearson积差相关分析法分析MRP-8/MRP-14二聚体含量与CECs的相关性。**结果** 冠状动脉扩张KD组患儿MRP-8/MRP-14二聚体含量、单个核细胞MRP-8和MRP-14 mRNA表达水平及CECs均高于冠状动脉无扩张KD组 (均 $P<0.05$), 且两组上述指标均高于对照组 (均 $P<0.05$); MRP-8/MRP-14二聚体含量与CECs呈正相关 ($r=0.69, P<0.05$)。**结论** MRP-8、MRP-14表达增高在KD的发病中起重要作用, 且与CECs增高显著相关, 是引起KD患儿血管损伤、冠状动脉扩张的重要因素。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(1): 48-52]

[关键词] 髓系相关蛋白; 川崎病; 循环内皮细胞; 儿童

Expression of myeloid-related protein complex in association with circulating endothelial cells in children with acute Kawasaki disease

WANG Cong-Jun, CHEN Mei, LEI Zhong-Jing. Medical College, Jingchu University of Technology, Jingmen, Hubei 448000, China (Email: pople@sina.com)

Abstract: Objective To investigate the expression of myeloid-related protein complex (MRP-8/14) in children with acute Kawasaki Disease (KD). **Methods** A total of 41 children with acute KD and 40 age- and sex-matched control children with upper respiratory tract infection were recruited. Serum levels of MRP-8/MRP-14 complex were measured by ELISA, messenger ribonucleic acid (mRNA) abundance of MRP-8 and MRP-14 in circulating granulocytes and monocytes was determined by RT-PCR, and the number of circulating endothelial cells was determined by flow cytometry. **Results** When the analysis was stratified according to the presence or absence of coronary artery ectasia in the KD patient group, serum levels of MRP-8/MRP-14 complex, MRP-8 and MRP-14 mRNA abundance in granulocytes, and the number of circulating endothelial cells were all significantly higher in KD patients with coronary artery ectasia than in KD patients without coronary artery ectasia ($P<0.05$). Serum levels of MRP-8/MRP-14 complex were positively correlated with the number of endothelial cells in the circulation ($r=0.69, P<0.05$). **Conclusions** Serum levels of MRP-8/MRP-14 complex are elevated in a positive association with the number of circulating endothelial cells in KD children with coronary artery ectasia, suggesting a causative role in the development of coronary artery lesions.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(1): 48-52]

Key words: Myeloid-related protein; Kawasaki disease; Circulating endothelial cell; Child

川崎病 (Kawasaki disease, KD) 是一种好发于5岁以下儿童的急性全身性非特异性的血管炎综合

征, 目前KD的病因和发病机制还不完全清楚, 一般认为血管内皮细胞损伤是KD的基础病变。

[收稿日期] 2013-06-21; [接受日期] 2013-07-22
[基金项目] 湖北省教育厅优秀中青年人才项目 (Q20104302)。
[作者简介] 王从军, 男, 博士, 副教授, 副主任医师。

髓系相关蛋白8、14 (myeloid-related protein-8 and -14, MRP-8、-14) 是 S100 钙结合蛋白家族成员, 主要通过钙离子依赖性方式形成特殊的异二聚体 MRP-8/MRP-14 而发挥作用。已有研究表明 MRP-8/MRP-14 蛋白复合体能与内皮细胞结合, 导致血管内皮细胞损伤^[1], 在系统性血管炎的炎性活动中起重要作用^[2]。鉴于 KD 的基本病理改变及 MRP-8/MRP-14 对内皮细胞的作用, 有理由认为 MRP-8/MRP-14 高表达在 KD 的发生过程中起重要作用, 为了明确二者之间关系, 本研究对 41 例 KD 患儿和 40 例一般发热患儿的血清 MRP-8/MRP-14 含量和循环单个核细胞 MRP-8 mRNA、MRP-14 mRNA 表达进行了检测并与循环内皮细胞数 (circulating endothelial cells, CECs) 进行比较, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2010 年 3 月至 2011 年 9 月于荆门市第一人民医院儿科住院的 41 例 KD 患儿为研究对象, 其中男 24 例, 女 17 例, 年龄 2 个月~5 岁, 所有患儿均符合 2004 年美国儿科学会和心脏病学会联合制定的川崎病诊断标准^[3], 且回顾性诊断没有误诊。根据彩色多普勒超声诊断是否合并冠状动脉扩张, 将 41 例 KD 患儿分为冠状动脉扩张 KD 组 ($n=15$) 和冠状动脉无扩张 KD 组 ($n=26$), 同时选取同期年龄和性别相匹配的急性上呼吸道感染发热患儿 40 例为对照组。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 采集所有患儿外周静脉血 5 mL, 其中 1 mL 用 EDTA 抗凝后离心分离血浆于 -70°C 冰箱保存待测 MRP8/MRP14; 余 4 mL 肝素抗凝后即刻分离外周血单个核细胞, 一部分于 12 h 内提取 RNA 用于 RT-PCR 的检测, 一部分用于流式细胞检测。

1.2.2 主要试剂 人 MRP-8/MRP-14 ELISA 试剂盒由美国 R & D systems 公司生产, CD45-PE-Cy5、CD146-PE 单抗均由美国 Becton-Dickinson 公

司生产。

1.2.3 ELISA 法测定血清 MRP-8/MRP-14 二聚体含量 用纯化的人 MRP-8/MRP-14 抗体包被微孔板, 制成固相抗体。在包被 MRP-8/MRP-14 单抗的微孔中加入待检标本, 再与生物素化的人 MRP-8/MRP-14 抗体结合, 形成免疫复合物连接在板上, 洗涤后再加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素, 彻底洗涤后加入 TMB 显色液显色, 酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值, 通过标准曲线计算样品中 MRP-8/MRP-14 浓度。

1.2.4 RT-PCR 法检测外周血单个核细胞中 MRP-8 及 MRP-14 mRNA 水平 采用 Ficoll 分离外周血单个核细胞, 抽提总 RNA, 逆转录合成 cDNA。引物用 Primer 5.0 软件设计, 由武汉意德生物技术有限公司设计合成, MRP-14 上游引物: 5'-TCCACCAATACTCTGTGAAGCTG-3', 下游引物: 5'-CCTCCATGATGTGTTCTATGACC-3', 片段长度 201 bp; MRP-8 上游引物: 5'-AATTGCTAGAGACGAGTGTCCCTCA-3', 下游引物: 5'-TGCCACGCCCATCTTTATCA-3', 片段长度 105 bp; GAPDH 上游引物: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 下游引物: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3', 片段长度 271 bp。PCR 反应体系: $10\times$ PCR buffer 5 μL , 10 mM dNTPMix 5 μL , RT-PCR 产物 cDNA 2 μL , 上、下游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , Taq polymerase 0.25 μL , 灭菌水补足总反应体系体积为 50 μL 。反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 55°C 退火 50 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 再延伸 10 min。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 采用 Kodak Digital Science System DC40 凝胶成像系统对图像进行采集, 应用图像分析软件进行各条带平均灰度值分析, 以同时扩增的 GAPDH 为内参照, 用目的基因条带灰度与 GAPDH 条带灰度比值表示目的基因相对表达量。

1.2.5 流式细胞术测定 CECs Ficoll 分离外周血单个核细胞, 取 50 μL 备测细胞悬液到已加入 10 μL CD45-PE-Cy5、CD146-PE 的专用流式试管

中，振荡混匀，室温避光孵育 15 min，加入溶血剂 500 μL，振荡混匀，室温避光孵育 10 min，完全溶血后在 15 min 内上流式细胞仪检测。根据同期患者血常规检查结果中每毫升淋巴细胞 (L) 及单核细胞 (M) 绝对数，结合流式细胞仪测得的内皮细胞与单个核细胞比例 (R%) 计算每毫升中的 CECs: $CECs = (L+M) \times R\%$ 。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用 *F* 检验，组间两两比较采用 SNK-*q* 检验，MRP-8/MRP-14 含量与 CECs 的关系采用 Pearson 积差相关分析法进行分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 MRP-8/MRP-14 含量比较

3 组间血清 MRP-8/MRP-14 含量差异有统计学意义 ($F=396.87, P<0.001$)，其中冠状动脉扩张 KD 组 MRP-8/MRP-14 含量 (1799 ± 250 ng/mL) 高于冠状动脉无扩张 KD 组 (1185 ± 195 ng/mL) ($P<0.05$)，且两组的 MRP-8/MRP-14 含量均高于对照组 (280 ± 139 ng/mL) (均 $P<0.05$)。

2.2 各组 MRP-8 和 MRP-14 mRNA 水平比较

冠状动脉扩张 KD 组 MRP-8 和 MRP-14 mRNA 表达水平均高于冠状动脉无扩张 KD 组 (均 $P<0.05$)，且两组 MRP-8 和 MRP-14 mRNA 表达水平均高于对照组 (均 $P<0.05$)。见图 1，表 1。

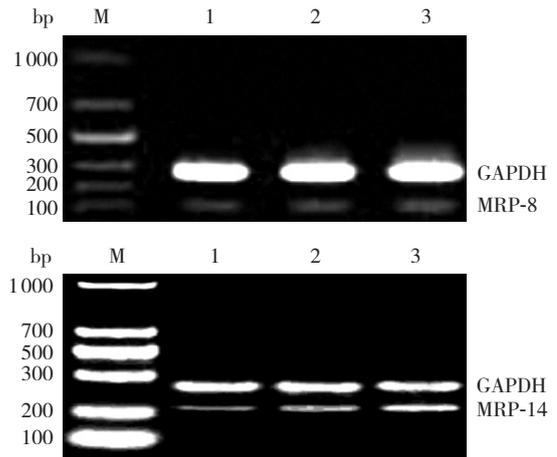


图 1 各组 MRP-8 及 MRP-14 mRNA RT-PCR 电泳图 M: Marker; 1: 对照组; 2: 冠状动脉无扩张 KD 组; 3: 冠状动脉扩张 KD 组。

表 1 各组血清 MRP-8 和 MRP-14 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MRP-8 mRNA	MRP-14 mRNA
对照组	40	0.15 ± 0.07	0.34 ± 0.11
冠状动脉无扩张 KD 组	26	0.28 ± 0.09 ^a	0.47 ± 0.10 ^a
冠状动脉扩张 KD 组	15	0.37 ± 0.06 ^{ab}	0.54 ± 0.13 ^{ab}
<i>F</i> 值		57.87	29.25
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与冠状动脉无扩张 KD 组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组 CECs 比较

3 组间 CECs 差异均有统计学意义 ($F=133.23, P<0.001$)，其中冠状动脉扩张 KD 组 CECs (588 ± 110 /mL) 高于冠状动脉无扩张 KD 组 (392 ± 160 /mL) ($P<0.05$)，且两组 CECs 均高于对照组 (66 ± 43 /mL) (均 $P<0.05$)。见图 2。

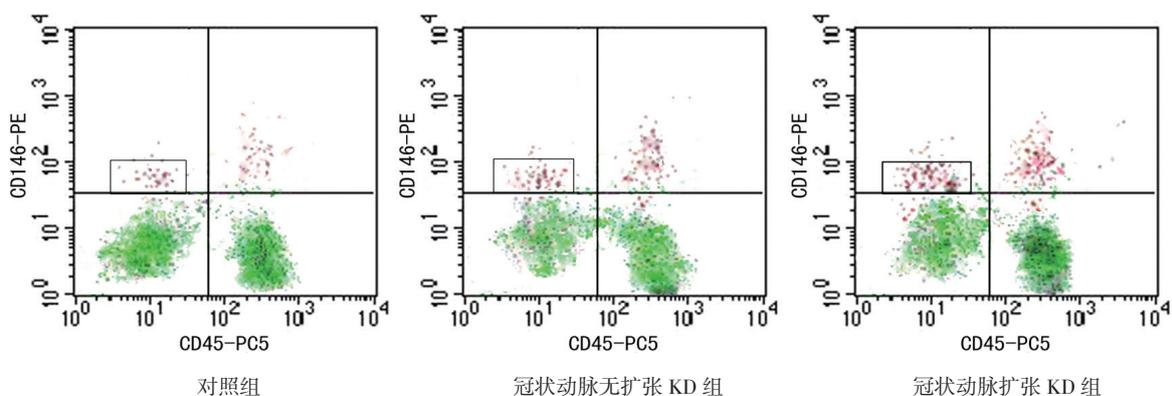


图 2 各组 CECs 流式细胞仪检测图 图中方框内所示为各组 CECs。

2.4 CECs 与血清 MRP-8/MRP-14 含量相关性

Pearson 积差相关分析显示, KD 患儿 CECs 与血清 MRP-8/MRP-14 含量呈显著正相关 ($r=0.69$, $P<0.05$)。见图 3。

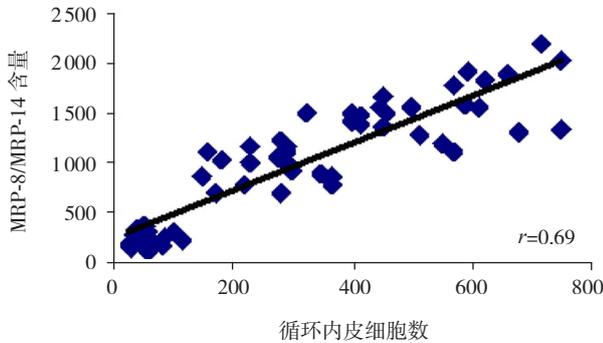


图3 CECs 与血清 MRP-8/MRP-14 含量线性相关图

3 讨论

KD 是一种好发于 5 岁以下儿童的急性全身性非特异性的血管炎综合征, 容易侵犯冠状动脉, 部分患儿形成冠状动脉瘤, 是引起儿童后天性心脏病的主要原因^[4], 至今 KD 的病因和发病机制还不完全清楚。一般认为 KD 可能的发病机制是在具有遗传易感体质基础上, 由于感染因素的影响而发生的异常免疫应答导致 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及单核-巨噬细胞激活后释放细胞因子, 引起血管内皮细胞的损伤而出现相应的临床表现^[5]。

MRP-8、MRP-14 又称 S100A8、S100A9 蛋白, 是 S100 钙结合蛋白家族成员, 主要通过钙离子依赖性方式形成特殊的异二聚体 MRP-8/MRP-14 而发挥作用^[6]。MRP-8/MRP-14 具有广泛的细胞内和细胞外生物学功能, 能被特异性地分泌至炎症病灶处, 是中性粒细胞化学趋化性和黏附性强有力的诱导剂, 并与炎症高度相关^[7], 在各种急慢性炎症病变中起主要作用, 如类风湿性关节炎、炎性肠病都发现 MRP-8/MRP-14 二聚体浓度升高^[8-9]。已有研究表明 MRP-8/MRP-14 蛋白复合体能通过硫酸乙酰肝素蛋白多糖或羧基-N-葡聚糖作用与内皮细胞结合^[10], 表明 MRP-8/MRP-14 与血管内皮细胞有重要的相互作用。在体外人类微血管内皮细胞中 MRP-8/MRP-14 能诱导血栓形成导致血小板粘附、聚集和炎症反应, 增加血管内皮细胞的通透性, 破坏内皮细胞单层的完整

性^[11], 表明 MRP-8/MRP-14 与系统性血管炎的炎症活动密切相关。

本研究检测了 41 例 KD 患儿和 40 例普通发热患儿血清 MRP-8/MRP-14 二聚体含量和外周血单个核细胞 MRP-8、MRP-14 mRNA 表达, 结果显示 KD 患儿血清 MRP-8/MRP-14 二聚体含量和外周血单个核细胞 MRP-8、MRP-14 mRNA 表达均明显高于对照组, 且上述指标在伴有冠状动脉扩张的 KD 患儿中要高于无冠状动脉扩张的 KD 患儿, 证实 MRP-8、MRP-14 在 KD 的发病中起重要作用, 是引起冠状动脉扩张的重要因素, 推测 KD 发病过程中存在免疫系统的异常激活, 活化的 T 细胞、B 细胞、中性粒细胞、单核/巨噬细胞分泌 MRP-8、MRP-14 从而介导了血管内皮细胞的损伤, 但致病因素如何激活炎症细胞导致 MRP-8、MRP-14 的高表达机制还不清楚。

CECs 为脱落的血管内皮细胞, 20 世纪 70 年代由 Bouvier 提出, 能表达较为具有特异性的 CD146 膜糖蛋白, 在正常人血中数量极少, 而在很多血管损伤性疾病如肿瘤形成和心血管疾病等情况下数量可明显增加, 可作为血管损伤的标记物^[12-15]。本研究在检测 MRP-8、MRP-14 mRNA 的同时采用特异性的 CD-146 单抗标记并与外周血白细胞作比较通过流式细胞仪检测了 CECs, 结果显示 KD 患儿 CECs 较因急性上呼吸道感染而发热的普通发热患儿明显增加, 且伴有冠状动脉扩张的 KD 患儿 CECs 高于无冠状动脉扩张的 KD 患儿, 进一步证实血管内皮细胞的损伤是 KD 发病并导致冠状动脉扩张的重要原因。通过 MRP-8/MRP-14 与 CECs 进行 Pearson 积差相关性分析显示二者呈正相关, 说明 KD 患儿血管内皮细胞的损伤系由 MRP-8/MRP-14 介导所致, 具体作用的分子机制还需进一步研究明确。

[参 考 文 献]

- [1] Robinson MJ, Tessier P, Poulson R, et al. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(5): 3658-3665.
- [2] Pepper RJ, Hamour S, Chavele KM, et al. Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 2013, 83(6): 1150-1158.
- [3] Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, et al. Diagnosis,

- treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association[J]. *Circulation*, 2004, 110(17): 2747-2771.
- [4] 李焰, 王献民, 柳颀龄, 等. 川崎病患儿并发冠状动脉病变的危险因素分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(12): 938-941.
- [5] 段超, 杜忠东, 王玉, 等. 川崎病冠脉瘤患儿远期血管内皮功能的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(5): 373-376.
- [6] Roth J, Vogl T, Sorg C, et al. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules[J]. *Trends Immunol*, 2003, 24(4): 155-158.
- [7] Maiseyeu A, Badgeley MA, Kampfrath T, et al. In vivo targeting of inflammation-associated myeloid-related protein 8/14 via gadolinium immunonanoparticles[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(4): 962-970.
- [8] Holzinger D, Frosch M, Kastrop A, et al. The Toll-like receptor 4 agonist MRP8/14 protein complex is a sensitive indicator for disease activity and predicts relapses in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(6): 974-980.
- [9] Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Tiaka EK, et al. Calprotectin, calgranulin C, and other members of the S100 protein family in inflammatory bowel disease[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(6): 1601-1611.
- [10] Viemann D, Barczyk K, Vogl T, et al. MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and independent cell death program[J]. *Blood*, 2007, 109(6): 2453-2460.
- [11] Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins[J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 60(6): 540-551.
- [12] Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P. On the clinical relevance of circulating endothelial cells and platelets in prostate cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(6): 1387.
- [13] Lampka M, Grabczewska Z, Jendryczka-Mackiewicz E, et al. Circulating endothelial cells in coronary artery disease[J]. *Kardiol Pol*, 2010, 68(10): 1100-1105.
- [14] Campioni D, Zauli G, Gambetti S, et al. In vitro characterization of circulating endothelial progenitor cells isolated from patients with acute coronary syndrome[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56377.
- [15] Erdbruegger U, Dhaygude A, Haubitz M, et al. Circulating endothelial cells: markers and mediators of vascular damage[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2010, 5(4): 294-302.
- (本文编辑: 万静)

· 消息 ·

2014 年国家级儿科神经病学新进展培训班暨学术会议通知

国家继续教育项目小儿神经病学新进展培训班暨学术会议将于 2014 年 4 月 25~27 日在深圳市福田区雅枫国际酒店举行。会议邀请北京大学、首都医科大学、中南大学、福建医科大学、暨南大学和深圳市儿童医院专家就儿科神经病学热点问题、新进展讲座。主要内容有: 脑电图新进展与管理, 结节性硬化症诊断标准与治疗新进展, 小儿颅内感染(化脑、病脑)最新指南, 癫痫持续状态急救, 癫痫外科神经电生理定位与术中监测, 小儿癫痫等神经系统遗传性疾病分子诊断, 生酮饮食疗法新进展, 神经科学学术论文撰写, 儿科药物临床试验机构管理与治疗药物监测。同期进行学术会议, 欢迎踊跃投稿。投稿范围: 小儿癫痫, 颅内感染, 小儿脑瘫, 小儿神经肌肉病, 脑电图, 神经遗传代谢病, ADHD, 抽动障碍, 孤独症等小儿神经系统疾病。投稿格式: 结构式摘要 1000 字以内, 欢迎论著全文投稿。来稿需注明作者姓名、通讯地址、email、手机。投稿方式: 电子邮件, word 格式, 主题: 2014 年深圳儿科神经病学学术会议投稿。邮件地址: epilepsycenter@vip.163.com。截稿日期: 2014 年 4 月 10 日。全文投稿格式按《中国实用神经疾病杂志》投稿要求, 杂志编委会挑选合格论著 10 篇发表。凡参会者可获国家级医学继续教育证书及 I 类学分 8 分。注册费: 1200 元, 研究生凭研究生证 600 元。食宿统一安排, 费用自理。项目负责人: 廖建湘。学术委员会主任: 翟琼香。联系人: 胡雁、吴勇, 联系电话: 18718796805。主办单位: 深圳市医学继续教育中心, 深圳市儿童医院和深圳市抗癫痫协会。承办: 深圳市儿童医院, 深圳市抗癫痫协会。日程: 2014 年 4 月 25 日报到; 26~27 日全天交流, 27 日下午撤离。

深圳市医学继续教育中心
深圳市儿童医院
深圳市抗癫痫协会
2013 年 12 月 26 日