

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.04.016

论著·临床研究

内源性血管弹性蛋白酶在川崎病冠状动脉重构中的作用研究

柳颐龄 王献民 李焰 石坤 郭永宏 杨艳峰 陈婷婷

(成都市妇女儿童中心医院儿童心血管内科, 四川 成都 610017)

[摘要] **目的** 探讨内源性血管弹性蛋白酶(EVE)对川崎病患者冠状动脉重构的影响。**方法** 2012年1月至2013年4月诊断为川崎病的60例患儿作为病例组,分别于发病0~11 d(病理I期)、发病12~25 d(病理II期)抽取外周静脉血3 mL;60例同期因发热就诊的非川崎病患者作为对照组,均于发热急性期空腹抽取外周静脉血3 mL。应用酶联免疫法(ELISA)检测各组血清中EVE、IL-6及血浆中血管内皮生长因子(VEGF)水平;病例组分别于发病的第一周末、第二周末和第四周末以超声心动图检查冠状动脉受损情况;Pearson相关分析评价EVE与IL-6和VEGF的相关性。**结果** 病例组I期和II期血清EVE和IL-6水平均明显高于对照组,而血浆VEGF水平均低于对照组(均 $P<0.05$),且II期EVE和IL-6水平均高于I期(均 $P<0.05$);有冠状动脉损害的病理II期患儿血清中EVE和IL-6的含量均显著高于无冠状动脉损害组,而血浆VEGF水平低于无冠状动脉损害组(均 $P<0.05$);有冠状动脉瘤的病理II期患儿血清中EVE和IL-6的含量均显著高于无冠状动脉瘤组,而血浆VEGF水平低于无冠状动脉瘤组(均 $P<0.05$);EVE含量与IL-6水平呈正相关,而与VEGF水平呈负相关(分别 $r=0.915$ 、 -0.769 ,均 $P<0.05$)。**结论** EVE可能参与川崎病患者冠状动脉重构,干预其活性可能缓解和阻止冠状动脉损害。
[中国当代儿科杂志, 2014, 16(4): 389-392]

[关键词] 内源性血管弹性蛋白酶;川崎病;血管重构;血管内皮生长因子;儿童

The role of endogenous vascular elastase in coronary artery reconstruction in Kawasaki disease

LIU Yi-Ling, WANG Xian-Min, LI Yan, SHI Kun, GUO Yong-Hong, YANG Yan-Feng, CHEN Ting-Ting. Department of Pediatric Cardiology, Chengdu Women's & Children's Central Hospital, Chengdu 610017, China (Wang X-M, Email: wxm6910@163.com)

Abstract: Objective To investigate the role of endogenous vascular elastase (EVE) in coronary artery between reconstruction among pediatric patients with Kawasaki disease (KD). **Methods** Sixty children who were diagnosed with KD between January 2012 and April 2013 were selected as the case group, and peripheral venous blood samples were collected on days 0-11 (pathological stage I) and days 12-25 (pathological stage II) after the onset of disease; another 60 children without KD who visited the hospital due to acute fever during the same period were selected as the control group, and fasting peripheral venous blood samples were collected in the acute stage of fever. For both groups, serum levels of EVE and interleukin-6 (IL-6) and plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) level were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. For the case group, ultrasonic cardiography was used to detect coronary artery lesions (CALs) at the first, second and fourth weekends. The correlations of EVE level with IL-6 and VEGF levels were evaluated by Pearson correlation analysis. **Results** Serum levels of EVE and IL-6 in the case group in pathological stages I and II were significantly higher than in the control group ($P<0.05$), but plasma VEGF levels in stages I and II were significantly lower than in the control group ($P<0.05$); in the case group, EVE and IL-6 levels were significantly higher in stage II than in stage I ($P<0.05$). In pathological stage II, KD patients with CALs had significantly higher serum levels of EVE and IL-6 but significantly lower plasma VEGF levels compared with those without CALs ($P<0.05$); KD

[收稿日期] 2013-09-25; [接受日期] 2014-03-07

[基金项目] 四川省卫生厅科研课题(120517)。

[作者简介] 柳颐龄,女,硕士,副主任医师。

[通信作者] 王献民,男,副主任医师。

patients with coronary artery aneurysms (CAAs) had significantly higher serum levels of EVE and IL-6 but significantly lower plasma VEGF level compared with those without CAAs ($P < 0.05$ for all). EVE level was positively correlated with IL-6 level ($r = 0.915$, $P < 0.05$), yet negatively correlated with VEGF level ($r = -0.769$, $P < 0.05$). **Conclusions** EVE may participate in coronary artery reconstruction in children with KD. To interfere EVE activity may reduce and prevent CALs. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(4): 389-392]

Key words: Endogenous vascular elastase; Kawasaki disease; Vascular remodeling; Vascular endothelial growth factor; Child

川崎病 (Kawasaki disease, KD) 是一种原因不明且好发于儿童的免疫相关性血管炎综合征, 免疫损伤性血管炎是 KD 的基本病理变化。其发病机制可能为冠状动脉及其它中等肌性血管内皮的损害及弹力纤维损伤, 主要表现为冠状动脉扩张或动脉瘤^[1-2]。有研究表明, 内源性血管弹性蛋白酶 (EVE) 可快速诱导兔脑动脉瘤, 提示 EVE 可能通过破坏弹性纤维而在血管重构过程中起重要作用^[3]。近年国内外陆续有文献报道, 血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 与血管重构程度密切相关^[4], 并且 VEGF 直接参与 KD 患儿血管内稳态的失衡。另外有报道指出, EVE 对 VEGF 的表达具有显著的抑制作用^[5]。目前有研究证实, IL-6 可作为反映 KD 不同病理期血管内皮细胞损伤的生物标记物^[6]。本文通过检测 KD 患儿不同病理期血清 EVE、血浆 VEGF、IL-6 水平及冠脉损伤情况, 探讨 EVE 在 KD 血管重构中的作用机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2012 年 1 月至 2013 年 4 月于成都市妇女儿童中心医院就诊并确诊为 KD 的患儿 60 例为病例组, 其中男 38 例, 女 22 例, 年龄为 8 个月~10 岁, 平均年龄 21 ± 11 个月。所有病例诊断均符合 2004 年美国心脏学会 (AHA) KD 诊断指南标准^[7], 其中 3 例诊断为不完全性 KD。另选取同期因发热待查于我院就诊且排除 KD 的患儿 60 例作为对照组, 其中男 36 例, 女 24 例, 年龄为 9 个月~10 岁, 平均年龄 23 ± 10 个月, 两组病例一般资料具有可比性。

所有病例组患儿均接受阿司匹林和 IVIG 治疗, 对照组仅行降温、抗炎等对症处理。本研究经成都市妇女儿童中心医院医学伦理委员会批准, 且获得所有患儿监护人同意并签署知情同意书。

1.2 ELISA 法检测血清 EVE、IL-6 及血浆 VEGF 水平

病例组患儿分别于病理 I 期 (发病 0~11 d, 治疗前)、病理 II 期 (发病 12~25 d) 清晨空腹抽取静脉血 3 mL, 将其中 1 mL 静脉血注入含 2% EDTA 钾抗凝管中, 3000 rpm、4℃ 离心 10 min 分离血浆; 将剩余静脉血注入普通采血管中, 静置 1~2 h, 3000 rpm、4℃ 离心 15 min 分离血清, 将得到的血浆和血清分别快速放入储器后于 -80℃ 冰箱冻存以备检测。对照组于发热期抽取静脉血 3 mL, 血液样本处理方法与病例组相同。参照试剂盒说明书, 采用 ELISA 法分别检测血清 EVE、IL-6 含量及血浆 VEGF 含量, 所有试剂盒均购自上海抚生生物科技有限公司, 其中 IL-6 含量由成都市妇女儿童中心医院检验科检测。

1.3 二维彩色超声心动图

病例组患儿分别于发病的第一周末、第二周末和第四周末进行超声心动图 (UCG) 探测。主要观察冠状动脉情况包括: 有无冠状动脉瘤 (CAA)、冠状动脉扩张 (CAD)、主动脉根部扩张等冠状动脉病变, 计算冠状动脉 / 主动脉根部 (CA/AO) 值。冠状动脉病变的判断标准^[8]: (1) UCG 示冠脉内膜回声增强; (2) CAD: ~3 岁冠脉内径 ≥ 2.5 mm, ~9 岁冠脉内径 ≥ 3.0 mm, ~14 岁冠脉内径 ≥ 3.5 mm; (3) CAA: 不同形状的 CAD, 冠脉内径为 4~7 mm; (4) 巨大冠脉瘤 (GCAA): 冠脉内径 ≥ 8 mm。所有超声检查由专人专机完成。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包对数据进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数的比较采用 t 检验; 多组均数比较采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验。计数资料采用例数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。数据的相关性采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 EVE、IL-6 和血浆 VEGF 水平以及冠状动脉病变情况比较

病例组患儿 I 期和 II 期血清 EVE 和 IL-6 含量均显著高于对照组，且 II 期 EVE 和 IL-6 水平均显著高于 I 期，差异有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）。病例组 I 期和 II 期血浆 VEGF 水平均显著低于对照组（均 $P < 0.05$ ），而 I 期与 II 期患儿间 VEGF 水平差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。病例组 II 期有冠状动脉病变的患儿比率高于 I 期和对照组（均 $P < 0.05$ ）。见表 1。

表 1 两组血清 EVE、IL-6 和血浆 VEGF 水平以及冠状动脉病变情况比较 ($\bar{x} \pm s$, 例)

组别	例数	EVE (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	VEGF (pg/mL)	冠状动脉病变 (有/无)
对照组	60	87 ± 12	9.2 ± 1.7	290 ± 26	0/60
病例组 I 期	60	145 ± 39 ^a	79.6 ± 28.8 ^a	245 ± 35 ^a	3/57
病例组 II 期	60	174 ± 55 ^{ab}	125.8 ± 39.9 ^{ab}	234 ± 59 ^a	17/43 ^{ab}
$F(\chi^2)$ 值		62.457	222.500	47.092	(11.760)
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.001

注：a 为与对照组比较， $P < 0.05$ ；b 为与病例组 I 期比较， $P < 0.05$ 。

2.2 冠状动脉病变与病理 II 期 KD 患儿血清 EVE、IL-6 和血浆 VEGF 含量的关系

病例组 II 期 60 例患儿中，有冠状动脉病变的 17 例（无冠状动脉狭窄），血清 EVE 和 IL-6 水平均显著高于同期 43 例无冠状动脉病变患儿（均 $P < 0.05$ ）；而血浆 VEGF 水平却低于同期无冠状动脉病变患儿（ $P < 0.05$ ）。见表 2。

表 2 血清 EVE、IL-6 和血浆 VEGF 在有无冠状动脉病变的病理 II 期 KD 患儿中的表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	EVE (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	VEGF (pg/mL)
无冠状动脉病变	43	152 ± 25	88 ± 34	248 ± 34
有冠状动脉病变	17	232 ± 39	243 ± 38	161 ± 21
t 值		8.715	4.735	-9.342
P 值		<0.05	<0.01	<0.05

2.3 CAA 与病理 II 期 KD 患儿血清 EVE、IL-6 和血浆 VEGF 含量的关系

病例组 II 期 60 例患儿中，有 CAA 的 4 例，

血清 EVE 和 IL-6 水平均显著高于同期 56 例无 CAA 患儿（均 $P < 0.01$ ）；而血浆 VEGF 水平却显著低于同期无 CAA 患儿（ $P < 0.01$ ）。见表 3。

2.4 相关性分析

EVE 含量与 IL-6 水平呈正相关（ $r = 0.915$ ， $P < 0.05$ ），而与 VEGF 水平呈负相关（ $r = -0.769$ ， $P < 0.05$ ）。

表 3 血清 EVE、IL-6 和血浆 VEGF 在有无 CAA 的病理 II 期 KD 患儿中的表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	EVE (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	VEGF (pg/mL)
无冠状动脉瘤	56	165 ± 31	106 ± 18	229 ± 27
有冠状动脉瘤	4	319 ± 53	447 ± 55	133 ± 30
t 值		9.611	28.735	-8.905
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

KD 好发于 5 岁以下儿童，是一种全身性急性中小血管炎性疾病，目前已成为儿童后天性心脏病的主要病因^[9]。本病的死因主要为冠状动脉的炎性损伤所导致的冠状动脉阻塞性扩张，可发展至心肌缺血最终发生心肌梗死及猝死^[8]。关于 KD 的发病机制尚未完全阐明，目前比较认可的发病机制主要包括发病急性期的免疫系统高度激活所导致的血管炎性损害。发病早期即可出现血管壁水肿和坏死病变，内皮细胞改变和外膜炎，即出现血管重构^[10]。而血管重构是最终使冠状动脉发生扩张、阻塞等严重后果的根本病理改变，抑制血管重构的发生进而减轻冠状动脉的损害是儿科医生面临的重要问题。

VEGF 是近年来发现的特异性促内皮细胞有丝分裂原，具有改善和修复受损内皮细胞、抑制受损内膜的增生和平滑肌细胞增殖、增加血管壁通透性等多种生物学功能^[11]。Breunis 等^[12]的研究结果表明，VEGF 直接参与 KD 患儿血管内稳态的失衡。另有研究表明，VEGF 数目的增多由 KD 亚急性期可持续至恢复期，尤其多见于冠脉损伤时^[13]。本研究中有冠状动脉病变组比无冠状动脉病变组血浆中 VEGF 显著降低，推测血浆 VEGF 浓度动态变化或可间接判断 KD 患儿冠状动脉损害程度，可能对 KD 的病情判断及预后评价有一定的意义。

EVE 主要存在于血管平滑肌细胞中，是一种

与丝氨酸弹性蛋白酶相关的酶,在炎症损伤下,血管平滑肌细胞释放EVE可使弹性蛋白分解为弹性蛋白多肽片段,从而刺激基质糖蛋白和纤连蛋白合成,使血管壁内细胞外基质增多,这是引起动脉血管重构的根本原因。KD并发冠状动脉病变的典型特征为内源性弹性蛋白破坏,细胞外机制的降解而平滑肌细胞未丢失。在血管重构过程中,EVE参与血管内层弹力纤维的破坏,进一步诱导了血管重构的发生。有研究表明,在肺血管重构中,EVE活性明显升高^[14],推测其可能在冠状动脉血管重构中也有着类似作用,但目前国内外尚未有关于KD时冠状动脉损害与EVE相关研究的报道。

本研究的实验结果显示,观察组患儿在病理I期及II期的血清中,EVE的含量均显著高于对照组,并且II期与I期相比含量亦有所升高。KD的病理分期主要是根据中小动脉及冠状动脉的损伤程度划分。在病理I期,主要表现为大、中、小血管炎和血管周围炎,白细胞浸润和水肿,以T淋巴细胞为主。II期则主要表现为中动脉、弹力纤维及肌层断裂和坏死,且血栓形成并发动脉瘤和动脉扩张,冠状动脉损伤主要发生于此期。因此推断,II期的冠状动脉损伤可能与此期患儿的血清中EVE含量升高密切相关。但本研究纳入的病例组发病后均经过药物干预,故不能排除药物对EVE的影响,因此有待于进一步的动物实验加以证实。

另外本研究还观察到,17例有冠状动脉损伤的KD患儿与43例无冠状动脉损伤的患儿相比,血清中EVE平均含量明显较高,另外,有CAA的4例患儿血清平均EVE含量显著高于无CAA组。这个结果表明,EVE在冠状动脉重构中可能有着与肺血管重构类似的作用,这与国内的研究^[14]以及Rabinovitch^[15]的报道相符。

KD引起的冠状动脉病变严重阻碍患儿的正常生活并威胁患儿的生命。有研究认为,KD的发病与病原微生物、机体炎性反应、免疫应答及遗传因素等有关,但不同病例的冠状动脉损伤程度不一^[16]。随着对KD研究的不断深入,加强对KD冠状动脉损伤的预防及治疗至关重要。本研究的结果表明,EVE在KD血管损害过程中可能起到关键作用,为临床干预血管损害进程提供了必要的理论基础。EVE可能参与KD患儿冠状动脉重构,干预其活性可能缓解和阻止冠状动脉损害。

[参 考 文 献]

- [1] 段超,杜忠东,王玉,等. 川崎病冠状动脉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.
- [2] Scuccimarrì R. Kawasaki disease[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2012, 59(2): 425-445.
- [3] 苏正,李铁林,黄庆,等. 弹性蛋白酶快速诱发动脉瘤模型实验研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2002, 28(3): 182-184.
- [4] Chappell JC, Bautch VL. Vascular development: genetic mechanisms and links to vascular disease[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 90: 43-72.
- [5] Kurtagic E, Jedrychowski MP, Nugent MA. Neutrophil elastase cleaves VEGF to generate a VEGF fragment with altered activity[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296(3): L534-L546.
- [6] Tan Z, Yuan Y, Chen S, et al. Plasma endothelial microparticles, TNF- α and IL-6 in Kawasaki disease[J]. *Indian Pediatr*, 2013, 50(5): 501-503.
- [7] 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.
- [8] Coustasse A, Larry J, Lee D. Can Kawasaki disease be managed?[J]. *Perm J*, 2012, 16(2): 70-72.
- [9] 李焰,王献民,柳颐龄,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
- [10] Lv YW, Wang J, Sun L, et al. Understanding the pathogenesis of Kawasaki disease by network and pathway analysis[J]. *Comput Math Methods Med*, 2013, 2013: 989307.
- [11] Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(2): a006544.
- [12] Breunis WB, Biezeveld MH, Geissler J, et al. Vascular endothelial growth factor gene haplotypes in Kawasaki disease[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(5): 1588-1594.
- [13] Kariyazono H, Ohno T, Khajoev V, et al. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor gene polymorphisms with coronary artery lesions of Kawasaki disease[J]. *Pediatr Res*, 2004, 56(6): 953-959.
- [14] 傅立军,周爱卿,沈捷,等. 弹性蛋白酶抑制剂对野百合碱诱导的肺动脉高压干预作用的研究[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(5): 375-378.
- [15] Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension: Impact on clinical management[J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*, 2000, 3: 63-81.
- [16] Sotelo-Cruz N. A review of Kawasaki disease, a perspective from the articles published in Mexico since January 1977 to May 2012[J]. *Arch Cardiol Mex*, 2013, 83(3): 214-222.

(本文编辑:刘伟)