

川崎病合并冠脉损伤患儿血清抑制 HUVECs 增殖并诱导其凋亡

刘丽莎,谈 诚,李喆倩,陈红兵*

(南京医科大学附属儿童医院检验科,江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:观察川崎病(Kawasaki disease, KD)合并冠脉损伤患儿血清对脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)增殖及凋亡的影响,以进一步了解KD患儿血管内皮细胞损伤的机制。方法:HUVECs分为正常血清组(Control组)、发热血清组(F组)、KD无冠脉损伤组(Non-CALs组)和KD合并冠脉损伤组(CALs组)。MTT比色法检测细胞增殖,流式细胞术(flow cytometry, FCM)分析各组HUVECs的凋亡情况。结果:MTT比色结果显示,Non-CALs组和CALs组经血清干预后的细胞活性低于F组和Control组,且CALs组低于Non-CALs组,差异有统计学意义($P<0.01$)。此外经KD患儿血清作用后,HUVECs的凋亡率增加,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$),且CALs组凋亡率高于Non-CALs组。结论:KD合并冠脉损伤患儿血清具有抑制HUVECs增殖并诱导HUVECs凋亡的作用。

[关键词] 川崎病;增殖;凋亡

[中图分类号] R725.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)04-434-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20170410

Serum from children with coronary artery lesions of Kawasaki disease inhibits HUVECs proliferation and induces the apoptosis

Liu Lisha, Tan Cheng, Li Zheqian, Chen Hongbing*

(Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital of NJMU, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects on proliferation and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) cultured with the serum of the children with coronary artery lesions of Kawasaki disease, in order to further understand the possible mechanism of vascular endothelial injury from Kawasaki disease. **Methods:** HUVECs were cultured and divided into 4 groups, including the normal serum group, the general fever group, the non-CALs group, and the CALs group. The proliferation was detected by MTT test and the apoptosis was detected by flow cytometry (FCM). **Results:** The OD value of the HUVECs detected by MTT test after being cultured with the serum of the children with Kawasaki disease including the Non-CALs group and the CALs group (0.492 ± 0.033 and 0.395 ± 0.031 , respectively) were lower than that of the general fever group and the normal serum group (0.592 ± 0.033 and 0.612 ± 0.036 , respectively) ($P<0.01$). The apoptosis of HUVECs detected by FCM after being cultured with the serum of the children with Kawasaki disease was higher than that of the other two groups ($P<0.01$), and the apoptosis of CALs group was higher than that of the Non-CALs group. **Conclusion:** The serum from children with coronary artery lesions of Kawasaki disease could inhibit the proliferation of HUVECs and induce the apoptosis.

[Key words] Kawasaki disease; proliferation; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(04):434-436]

川崎病(Kawasaki disease, KD),又称皮肤黏膜淋巴结综合征(mucocutaneous lymph node syndrome, MCLS),是一种好发于5岁以下儿童和婴幼儿的自身免疫性疾病,其病理变化主要为全身性血

管炎,可累及动、静脉和毛细血管发生严重的心血管并发症,尤其是冠状动脉损害,目前该病已成为儿童后天性心脏病的主要病因^[1]。内皮细胞功能失调是KD血管损伤的重要特征^[2-3],其发病机制仍不清楚。本研究通过观察KD合并冠脉损伤患儿血清对脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)增殖及凋亡病变的影

[基金项目] 南京市医学科技发展基金(YKK13131)

*通信作者(Corresponding author),E-mail: etty001@sina.com

响,为今后深入研究其发病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(HUVECs)株(上海中乔新舟生物科技有限公司);RPMI1640 培养基、胰蛋白酶(Gbico 公司,美国);胎牛血清(杭州四季青生物工程公司)。

1.2 方法

1.2.1 血清制备

选择在本院诊断为 KD 未合并冠脉损伤患儿 21 例、KD 合并冠脉损伤患儿 15 例、上呼吸道感染患儿(发热但除外血管炎性疾病)19 例以及在保健科体检的同年龄段健康儿童 20 例,各组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。分别采集以上各组儿童静脉血 3 mL,常规分离血清,-70℃冻存待用。实验前将血清室温解冻,0.22 μm 微孔滤器过滤除菌。

1.2.2 细胞培养

取传至 III~IV 代 HUVECs,选用 6 孔培养板,每孔接种 1.0×10^6 个细胞,分为 4 组:①正常血清组(Control 组):HUVECs 细胞于含 10% 正常儿童血清的 RPMI1640 完全培养液培养 24 h,弃上清,加入无血清培养液;②发热血清组(F 组):改用含 10% 急性发热患儿血清的 RPMI1640 完全培养液,余同 Control 组;③无冠脉损伤组(Non-CALs 组):改用含 10% 无冠脉损伤 KD 患儿血清的 RPMI1640 完全培养液,余同 Control 组;④冠脉损伤组(CALs 组):改用含 10% KD 合并冠脉损伤患儿血清的 RPMI1640 完全培养液,余同 Control 组。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖

4 组细胞每孔加入 10 μL MTT 继续培养 4 h,小心吸除孔内培养液,每孔加入 100 μL DMSO,在摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,应用酶联免疫检测仪测定 490 nm 波长处的吸光值。

1.2.4 FCM 检测细胞凋亡

消化各组处理好的细胞,800 r/min、4℃离心 10 min,弃上清,用 PBS 重复洗涤 2 次后,将细胞重悬于 200 μL Binding Buffer (含 10 μL Annexin V)中,轻轻混匀,避光室温反应 10 min 或 4℃反应 30 min,而后 800 r/min、4℃离心 10 min,弃上清,用 200 μL Binding Buffer (含 5 μL PI)重悬细胞,采用 FACS Vantage 流式细胞分析仪检查(激发光光源波长为 488 nm),每个样本检测计数的细胞数量均固定为 10 000 个,应用 Cell Quest 软件获取,分析输

出的实验数据。

1.3 统计学方法

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Bonferroni 检验。结果均在 SPSS16.0 软件上处理, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KD 患儿血清对 HUVECs 增殖的影响

应用 MTT 比色法测定各组血清对 HUVECs 增殖的影响,发现 KD 患儿血清处理后吸光度值低于 F 和 Control 组,且 CALs 组低于 Non-CALs 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 KD 特别是合并冠脉损伤患儿血清对 HUVECs 的增殖有抑制作用。

表 1 各组血清处理后 HUVECs 增殖活性

Table 1 Proliferation of the HUVECs after cultured with the serum in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	吸光度值
Control 组	20	0.612±0.036
F 组	19	0.596±0.032
Non-CALs 组	21	0.492±0.033 [#]
CALs 组	15	0.395±0.031 ^{#Δ}

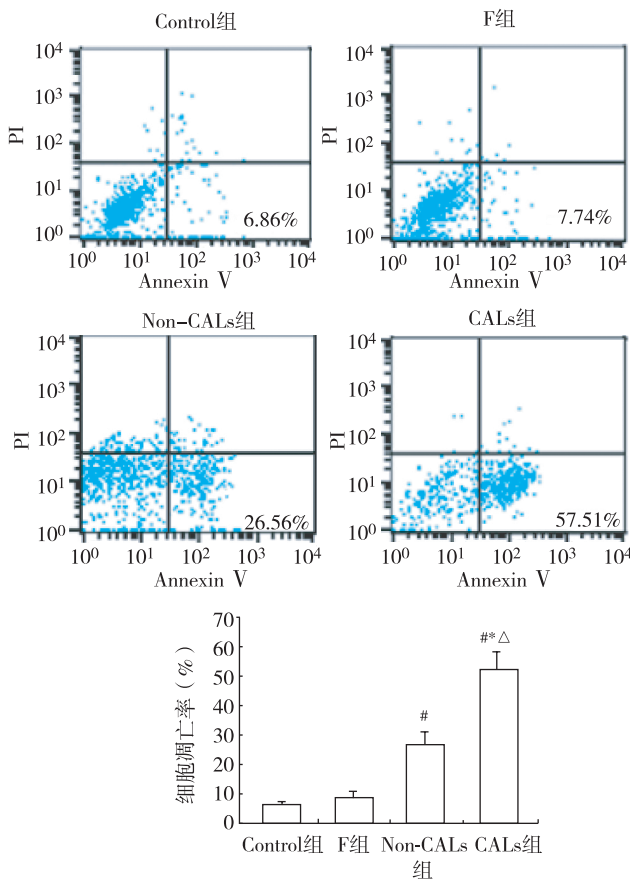
与 Control 组比,[#] $P < 0.01$;与 F 组比,^{*} $P < 0.01$;与 Non-CALs 组比,^Δ $P < 0.01$ 。

2.2 KD 患儿血清对 HUVECs 凋亡的影响

经 KD 患儿血清处理后,HUVECs 出现凋亡现象,其凋亡细胞百分率高于其他各组,且 CALs 组高于 Non-CALs 组,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 1),提示 KD 患儿血清具有促进 HUVECs 凋亡的作用。

3 讨论

KD 是一种以免疫系统活化和血管内皮系统广泛损害为特征的全身性血管炎。KD 急性期患儿外周血表现为白细胞总数、中性粒细胞、血小板、血沉、高敏 C 反应蛋白等指标呈不同程度的升高^[4],表明炎性细胞因子在发病初期发挥了重要作用。临床显示 KD 患儿,特别是合并冠脉损伤高危因素,如高白细胞、高血沉、1 岁以下男性患儿血清脑钠肽(BNP)含量高于正常,提示心肌细胞受损。KD 最重要的危害是冠脉炎性损伤导致的冠状动脉扩张和冠状动脉瘤形成,严重者可引起急性心肌梗死和猝死^[5]。有研究显示 KD 的发生和成人时期的冠状动脉粥样硬化密切相关^[6]。目前 KD 病因与发病机制



与 Control 组比, * $P < 0.01$; 与 F 组比, * $P < 0.01$; 与 Non-CALs 组比, [△] $P < 0.01$ 。

图 1 各处理组 HUVECs 的凋亡率分析

Figure 1 Apoptosis rate of the HUVECs in different groups

尚不十分清楚,其致病机制得到了广泛研究^[7-9]。本课题组先前研究回顾性分析 1 446 例在本院确诊的 KD 病例,发现其发病率呈逐年上升趋势^[10],进而对 KD 的分子机制进行了初步探讨^[11]。目前多数学者认为免疫系统的高度活化和血管内皮系统广泛损害是 KD 的基本病理特征,血管内皮细胞的激活或损伤是导致血管炎症的关键环节^[12]。本实验在体外研究 KD 合并冠脉损伤患儿血清对 HUVECs 增殖和凋亡病变的影响,发现其可以抑制 HUVECs 增殖并诱导 HUVECs 凋亡,提示血清中某些与增殖凋亡病变相关的细胞因子对 HUVECs 具有直接的细胞毒性作用,从而造成内皮细胞损伤,这也为进一步探讨 KD 合并冠脉损伤涉及的分子机制以及 KD 新

的治疗靶点奠定了理论基础。

[参考文献]

[1] Kowalczyk M, Turska-Kmiec A, Ziolkowska L, et al. Symptoms, diagnosis and characteristic abnormalities in the coronary arteries in Kawasaki disease in children[J]. Med Wieku Rozwoj, 2010, 14(4): 344-349

[2] 刘晓琴,黄国英,梁雪村,等. 川崎病恢复期患儿血管病变的超声研究[J]. 中华医学杂志,2007,87(30): 2117-2120

[3] Cheung YF. Vascular health late after Kawasaki disease: implications for accelerated atherosclerosis[J]. Korean J Pediatr, 2014, 57(11): 472-478

[4] 张雅媛,钱小青,李娟,等. 6 月龄以下小婴儿川崎病 43 例临床分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2011, 31(11):1670-1673

[5] Shah AH, Abdel-Hadi H, Overgaard CB, et al. Kawasaki disease and coronary intervention: A word of caution [J]. Int J Cardiol. 2014, 201(6): 646-647

[6] Bhagwat A, Mukhedkar S, Ekbote S, et al. Missed Kawasaki disease in childhood presenting as myocardial infarction in adults[J]. Indian Heart, 2015, 67(4): 385-388

[7] Shimizu C, Jain S, Davila S, et al. Transforming growth factor-beta signaling pathway in patients with Kawasaki disease[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(1): 16-25

[8] Portman MA, Olson A, Soriano B, et al. Etanercept as adjunctive treatment for acute Kawasaki disease: study design and rationale[J]. Am Heart J, 2011, 161(3):494-499

[9] 杨世伟,王大为,秦玉明,等. 基质金属蛋白酶-9 在川崎病外周血表达及其在冠状动脉损伤中的临床意义[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2005, 25(2):87-90

[10] 谈诚,殷丝雨,李喆倩,等. 江苏省南京市 2012-2014 年川崎病流行病学调查[J]. 中国基层医药, 2015, 22(21):3249-3250, 3251

[11] 刘丽莎,朱纯亮,韩勃,等. 川崎病急性期患儿血清活化 HUVECs NF- κ B 并促进 MMP-9 分泌[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(1):99-100

[12] Xu MG, Men LN, Zhao CY, et al. The number and function of circulating endothelial progenitor cells in patients with Kawasaki disease[J]. Eur J Pediatr, 2010, 169(3):289-296

[收稿日期] 2016-04-09