

前列腺素E₂在川崎病患者血浆中的表达及临床意义

杨燕澜, 武宇辉, 黄雀兰, 李成荣, 王国兵, 马伟科
(深圳市儿童医院内二科, 广东 深圳 518026)

【摘要】 目的 观察前列腺素E₂ (PGE₂) 在川崎病(KD)患儿血浆中的表达水平并探讨其临床意义。方法 选择2013年5月至2014年10月在我院住院的35例KD急性期患儿, 在静脉注射免疫球蛋白(IVIG)治疗前后采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血浆PGE₂水平, 实时荧光定量PCR法测定外周血CD14⁺单核/巨噬细胞(MC)环氧合酶-1 (COX-1)、环氧合酶-2 (COX-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)水平。另选15例健康同龄儿童作为对照组, 测定上述指标。结果 KD急性期患儿血浆PGE₂、COX-1、COX-2、TNF- α 、IL-6水平均高于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); KD患儿中的冠状动脉病变组PGE₂、COX-2水平高于无冠状动脉病变组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 但COX-1、TNF- α 、IL-6比较则差异均无统计学意义($P > 0.05$); IVIG治疗后PGE₂、COX-1、COX-2、TNF- α 、IL-6水平较治疗前均降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 KD急性期患儿血浆PGE₂水平升高, 其可能在KD的炎症免疫反应和氧化应激中发挥重要作用。

【关键词】 川崎病; 前列腺素E₂; 环氧合酶-2

【中图分类号】 R442.8 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)18-2675-04

Changes and significance for prostaglandin E₂ level in plasma of patients with Kawasaki disease. YANG Yan-lan, WU Yu-hui, HUANG Que-lan, LI Cheng-rong, WANG Guo-bing, MA Wei-ke. The Second Department of Medicine, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To observe the prostaglandin E₂ (PGE₂) level in plasma of patients with Kawasaki disease (KD) and discuss the clinical significance. **Methods** Thirty-five patients with KD which treated in our hospital from May 2013 to October 2014 were selected. The plasma concentrations of PGE₂ were analyzed by ELISA technique. Real-time quantitative PCR was used to evaluate the expression level of cyclooxygenases-1 (COX-1), cyclooxygenases-2 (COX-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) on CD14⁺ monocyte/macrophage cells (MC) before and after intravenous immunoglobulin (IVIG). Fifteen healthy children were selected as the control group, with the above indicators measured. **Results** The levels of PGE₂, COX-1, COX-2, TNF- α and IL-6 in acute KD patients were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), and they were down-regulated after IVIG ($P < 0.05$). The level of PGE₂ and COX-2 in KD patients with coronary artery lesion were significantly higher than those without coronary artery lesion ($P < 0.05$), and there were no statistically significant difference in COX-1, TNF- α and IL-6 between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Prostaglandin E₂ level in plasma of patients with KD is up-regulated and may play an important role in inflammatory and immune response and oxidative stress.

【Key words】 Kawasaki disease; Prostaglandin E₂; Cyclooxygenases-2

川崎病(Kawasaki disease, KD)又被称为黏膜皮肤淋巴结综合征(Mucocutaneous lymphnode syndrome, MCLS), 是儿科常见的全身血管炎性疾病。少部分未经治疗的患儿可发生冠状动脉损害甚至形成动脉瘤。目前发病机制仍不十分清楚, 流行病学及临床研究提示KD可能为感染引起的急性免疫调节紊乱, 进一步导致血管壁损伤^[1]。近年来, 前列腺素E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂)在炎症反应和免疫中的作用得到越来越多的关注, 在炎症急性期的血管病变可能与PGE₂有关^[2-3]。已经有学者关注到PGE₂

在川崎病患者血液中表达的改变^[4-5]。本文旨在观察PGE₂在KD患儿血浆中的表达水平并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 按照国内川崎病的诊断标准^[6], 收集2013年5月至2014年10月在我院住院的35例初次发病的KD患儿, 年龄1~7岁, 平均3.72岁, 男性20例, 女性15例, 汉族。治疗过程中心脏彩超动态观察患者冠状动脉的改变情况。若5岁以下儿童冠状动脉内径>3 mm, 5岁或5岁以上儿童冠状动脉内径>

4 mm;或者冠状动脉局部内径较邻近处大于或等于 1.5 倍者,考虑合并冠脉损伤^[6]。依据心脏彩超结果把患者分为有冠脉病变组 14 例和无冠脉病变组 21 例。另外收集 15 例健康儿童作为对照组,年龄 1~6 岁,平均 3.94 岁,男性 9 例,女性 6 例。KD 组和对照组的性别、年龄比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。本研究通过医院伦理委员会的批准,所有受试者家属对试验知情同意。

1.2 方法

1.2.1 血标本收集及酶联免疫吸附试验(ELISA) 在静脉注射免疫球蛋白(IVIG)治疗前(病程 10 d 内)和治疗后第 3 天(且体温正常)分别肝素抗凝管留取 KD 患儿外周血标本 2 ml,并立刻送检。800 rpm 离心 10 min 分离上层血浆,双抗体夹心 ELISA (Bender MedSystem 公司试剂盒)测定前列腺素 E₂ 水平,具体按照试剂盒说明书步骤操作。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR) (1) 单核/巨噬细胞(MC)总 RNA 的提取与定量:乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA·Na₂)抗凝管留取静脉血 3 ml,聚

蔗糖(Ficoll)-泛影葡胺($P=1.077$)密度梯度离心法分离外周血单核细胞。免疫磁珠(美国 Invitrogen 公司,111.49 D)分离外周血 CD₁₄⁺MC。进一步分离总 RNA(Ambion 公司试剂盒,AM1912),紫外分光光度计测定 RNA 含量,-80℃冰箱保存。(2) RT-PCR:参照说明书步骤逆转录合成 cDNA (立陶宛 MBI 公司试剂盒,K1632),取 1 μl cDNA 为模板,所需引物向上海英骏生物技术有限公司订购合成(引物序列及 PCR 参数见表 1),PCR 扩增 30~40 循环。(3) RT-PCR 产物鉴定:取 COX-1、COX-2、TNF-α、IL-6 等及 β-action 扩增产物 10 μl 在 2% 琼脂糖凝胶中,90 V 电泳 30 min,回收纯化,送交 invitrogen 公司测序。测序结果与 Genebank 中目的基因 mRNA 序列比较,扩增产物与目的基因序列完全一致。(4) Real-Time PCR:使用罗氏 LightCycler480 II 荧光定量 PCR 仪(德国 QIAGEN 公司 SYBRGreen 试剂盒,204143),采用 Relative Quantification Software Ver1.0 软件对数据进行分析。以待测基因/β-action 的 CT 比值表示结果。

表 1 RT-PCR、荧光实时定量 PCR 引物

基因	引物序列	复性温度	位置	产物长度(bp)
COX-1	正向引物:5'-CCA GAA CAG TGG CTC GTA T-3'	54℃	436-584	149
	反向引物:5'-GGA CCT TAG GAT CTC CGT CT-3'			
COX-2	正向引物:5'-CCG AGG TGT ATG TAT GAG TG-3'	54℃	84-155	72
	反向引物:5'-TCT CCA TAG AAT CCT GTC CG-3'			
IL-6	正向引物:5'-CAA TCT GGA TTC AAT GAG GAG AC-3'	56℃	369-486	118
	反向引物:5'-CTC TGG CTT GTT CCT CAC TAC TC-3'			
TNF-α	正向引物:5'-CTG GTA TGA GCC CAT CTA TC-3'	56℃	7361031	296
	反向引物:5'-CGA AGT GGT GGT CTT GTT GC-3'			
β-action	正向引物:5'-GAG CTA CGA GCT GCC TGA CG-3'	54℃~58℃	787-906	120
	反向引物:5'-GTA GTT TCG TGG ATG CCA CAG-3'			

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 软件包进行数据处理,符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐性检验后用 *t* 检验比较两组之间的差异,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。符合正态分布的两组数据的相关性使用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 IVIG 治疗前后和对照组血浆 PGE₂ 水平 KD 急性期患儿 IVIG 治疗前血浆 PGE₂ 水平显著高于对照组 [(18.48±3.57) pg/ml vs (6.90±1.77) pg/ml, $t=11.89$, $P=0.000$]; IVIG 治疗后下降 [(9.74±2.71) pg/ml vs (18.48±3.57) pg/ml, $t=12.73$, $P=0.000$], 见图 1。KD-有冠状动脉病变组患儿血浆 PGE₂ 水平高于 KD-无冠状动脉病变组 [(19.95±3.74) pg/ml vs (17.50±3.17) pg/ml, $t=2.09$, $P=0.045$], 见图 2。

2.2 KD 患儿治疗前后外周血 MC COX-1、COX-2、IL-6、TNF-α 水平 KD 患儿 IVIG 治疗前 COX-1、COX-2、TNF-α、IL-6 水平均较对照组儿童上升,IVIG 治疗后 COX-1、COX-2、TNF-α、IL-6 水平均较治疗前降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。KD 患儿中的冠状动脉病变组 COX-2 水平高于无冠状动脉病变组,差异有统计学意义($P<0.05$),而两组 TNF-α、IL-6、COX-1 水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.3 IVIG 治疗前血浆 PGE₂ 水平和 COX-2、TNF-α 水平的相关性 KD 急性期患儿 IVIG 治疗前 PGE₂ 水平和 CD₁₄⁺MC 的 COX-2、TNF-α 水平均较正常对照组升高,血浆 PGE₂ 水平与 COX-2、TNF-α 水平均呈正相关($r=0.652$, $P=0.000$; $r=0.648$, $P=0.000$),见图 3。

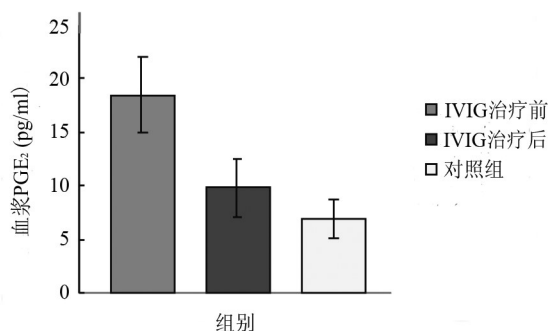


图1 KD 患儿 IVIG 治疗前后和对照组血浆 PGE₂ 水平($\bar{x} \pm s$)

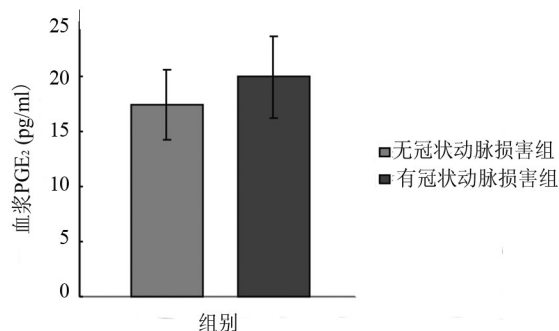


图2 KD 有冠脉病变和无冠脉病变组患儿血浆 PGE₂ 水平($\bar{x} \pm s$)

表2 KD 组 IVIG 治疗前后和对照组样本基因表达相对定量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	COX-1 ($\times 10^{-4}$)	COX-2 ($\times 10^{-2}$)	IL-6 ($\times 10^{-4}$)	TNF- α ($\times 10^{-3}$)
KD _{IVIG} 前组	23.82 \pm 6.90 ^{ab}	25.09 \pm 11.31 ^{ab}	46.65 \pm 25.04 ^{ab}	113.69 \pm 46.11 ^{ab}
KD _{IVIG} 后组	13.24 \pm 5.63	14.20 \pm 5.54	24.95 \pm 16.69 ^c	76.74 \pm 27.15 ^c
对照组	14.87 \pm 6.72	11.67 \pm 4.50	2.74 \pm 1.07	5.87 \pm 2.42

注:均采用荧光定量PCR检测,结果以待测基因/ β -action 的比值表示。^aKD 组 IVIG 治疗前后比较, $P < 0.05$; ^bKDIVIG 前与对照组比较, $P < 0.05$; ^cKDIVIG 后与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表3 KD 组 IVIG 治疗前样本基因表达相对定量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	COX-1 ($\times 10^{-4}$)	COX-2 ($\times 10^{-2}$)	IL-6 ($\times 10^{-4}$)	TNF- α ($\times 10^{-3}$)
KD-有冠状动脉病变组	22.15 \pm 5.03	28.00 \pm 14.56	47.21 \pm 18.51	118.86 \pm 56.52
KD-无冠状动脉病变组	23.37 \pm 5.79	22.29 \pm 8.67	46.91 \pm 23.72	103.52 \pm 33.80
<i>t</i> 值	0.641	1.458	0.041	1.006
<i>P</i> 值	0.864	0.015	0.572	0.215

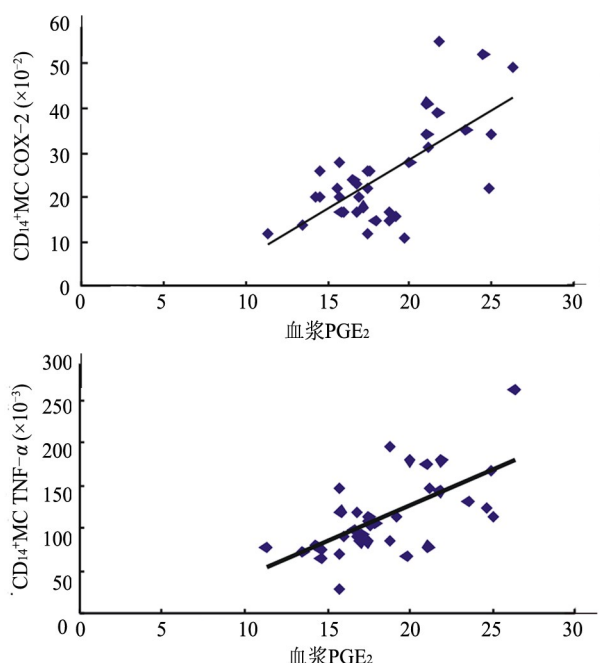


图3 KD 组 IVIG 治疗前血浆 PGE₂ 水平和 CD₁₄⁺MC COX-2、TNF- α 水平的关系

3 讨论

川崎病是一种急性自身免疫性血管炎综合征,以亚裔人发病率为高,常见于<5 岁儿童^[7]。本病为自限性疾病,多数预后良好,但部分患儿可引起全身多系统受累,最严重的就是冠状动脉损害,是儿

童获得性心脏病常见的病因之一,甚至成年后遗留严重后遗症^[8]。目前研究认为,感染导致 T 细胞、MC 等免疫活性细胞异常活化并产生的一系列炎症细胞因子,可能在 KD 患儿的血管内皮损伤过程中发挥重要作用并干扰自身免疫耐受^[9]。我们课题组前期的研究也证实了川崎病急性期外周血单核细胞大量分泌 NF- κ B,介导炎症细胞因子过度产生^[10]。此外,近年来研究显示,氧化应激因素可能参与了 KD 患者血管内皮损伤的发生发展^[11-13]。

PGE₂ 是花生四烯酸环氧化酶途径的代谢产物之一,主要由 MC 产生,是机体应激条件下参与免疫调节的重要介质。PGE₂ 通过受体的相互协同及拮抗作用,参与机体内环境稳态的维持,如调控 T 细胞、引起血小板聚集。PGE₂ 在炎症发展的不同阶段发挥不同的作用,可以在致炎和抗炎两个方向上参与整个调节过程^[14-15]。研究数据显示,在早期炎症反应阶段,通过 EP2 受体,前列腺素 E₂ 在人冠状动脉内皮细胞诱导 β_1 -整合素活化,发挥促炎作用^[5]。炎症过程中 PGE₂ 通过与缓激肽、5-羟色胺、组胺等介质在炎症部位相互作用,引起血管尤其是冠状动脉扩张,增加血管通透性,并产生致热源引起发热,参与炎症急性期的血管反应。此外,氧化应激反应过程中也有 PGE₂ 的参与^[16]。

本研究的结果显示, KD 急性期患儿外周血中 PGE₂ 水平高于健康同龄对照组儿童 ($P < 0.05$), 与 CD14⁺ MC 中的炎症因子 TNF- α 水平正相关, 而且急性期存在冠状动脉病变的 KD 患者较未发生冠状动脉病变的 KD 患儿血浆中 PGE₂ 水平升高 ($P < 0.05$), 患儿在 IVIG 治疗后 PGE₂ 水平较治疗前下降 ($P < 0.05$), 提示 PGE₂ 参与了 KD 的发病机制并发挥着促炎作用, KD 患儿血管炎的发生可能和其有关。大剂量 IVIG 通过降低急性期 KD 患儿 PGE₂ 水平, 减少了氧化应激所致的冠脉损伤^[17]。

环氧酶(COX)是合成 PGE₂ 的主要限速酶, 分为环氧酶-1 (COX-1) 和环氧酶-2 (COX-2) 二种异构酶。COX-1 在体内呈生理性表达, 催化 PGE₂ 合成, 临床上常在 KD 急性期广泛使用 COX-1 抑制剂阿司匹林对抗血小板聚集^[18-19]。本组中 KD 患儿在 IVIG 治疗后 COX-1 水平明显下降, 考虑可能与 KD 组患儿在 IVIG 治疗后已经使用了数天大剂量阿司匹林有关。COX-2 是 COX-1 的异构体, 存在于多种类型细胞中, 通常在正常生理状态下没有活性, 在病理状态或应激状态下受 NF- κ B 等炎症介质诱导激活, 参与炎症、肿瘤的发生发展^[20-21]。本研究结果进一步证实, 在 KD 急性期患儿外周血 MC 的 COX-2 显著升高, 有冠状动脉病变的 KD 患儿 COX-2 和 PGE₂ 均水平高于无冠状动脉病变患者, 且 PGE₂ 水平和 CD14⁺ MC 的 COX-2 水平呈正相关。

总之, 通过本研究我们发现 KD 急性期血浆 PGE₂ 水平升高, 可能参与了 KD 冠脉病变过程, 而 IVIG 治疗可下调 COX-2 表达, 从而降低 PGE₂ 水平, 在 KD 治疗过程中发挥抗血管炎、抗氧化应激等作用。

参考文献

- [1] Iwańczak B, Krynicka-Scaringella O. Kawasaki disease in children: epidemiology, clinical symptoms, diagnostics and treatment [J]. Pol Merkury Lekarski, 2013, 35(210): 375-378.
- [2] 薛 瑞, 苗一非, 杨吉春, 等. 前列腺素 E₂ 对免疫细胞及炎症相关疾病的调控作用[J]. 生理科学进展, 2011, 42(3): 165-168.
- [3] Gomez I, Foudi N, Longrois D. The role of prostaglandin E₂ in human vascular inflammation [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013, 89(2-3): 55-63.
- [4] Lee T, Furukawa S, Fukuda Y, et al. Plasma prostaglandin E₂ Level in Kawasaki disease [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1988, 31(2): 53-57.
- [5] Kajimoto M, Ichiyama T, Ueno Y, et al. Enhancement of activated beta1-integrin expression by prostaglandin E₂ via EP receptors in isolated human coronary arterial endothelial cells: implication for the treatment of Kawasaki disease [J]. Inflamm Res, 2009, 58(4): 224-228.
- [6] 《中华儿科杂志》编辑委员会, 中华医学会儿科学分会心血管学组, 中华医学会儿科学分会免疫学组. 川崎病专题讨论会纪要[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(11): 826-830.
- [7] 杨 波, 朱义杰, 罗 军, 等. 川崎病流行病学、病因和发病机制的新进展[J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(2): 189-192.
- [8] Son MB, Newburger JW. Kawasaki disease [J]. Pediatr Rev, 2013, 34(4): 151-162.
- [9] Bayers S, Shulman ST, Paller AS. Kawasaki disease: part I. Diagnosis, clinical features, and pathogenesis [J]. J Am Acad Dermatol, 2013, 69(4): 501.
- [10] 王国兵, 李成荣, 祖 莹, 等. 川崎病 Toll 样受体信号途径调节因子变化及其意义[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(1): 49-54.
- [11] Zhang PY, Xu X, Li XC. Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014, 18(20): 3091-3096.
- [12] Sekine K, Mochizuki H, Inoue Y, et al. Regulation of oxidative stress in patients with Kawasaki disease [J]. Inflammation. 2012, 35(3): 952-958.
- [13] Prasad K, Dhar I. Oxidative stress as a mechanism of added sugar-induced cardiovascular disease [J]. Int J Angiol, 2014, 23(4): 217-226.
- [14] Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE₂ in inflammation and cancer [J]. Semin Immunopathol, 2013, 35(2): 123-137.
- [15] Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E₂ [J]. J Immunol, 2012, 188(1): 21-28.
- [16] Furuyashiki T, Narumiya S. Stress responses: the contribution of prostaglandin E (2) and its receptors [J]. Nat Rev Endocrinol, 2011, 7(3): 163-175.
- [17] Takatsuki S, Ito Y, Takeuchi D, et al. IVIG reduced vascular oxidative stress in patients with Kawasaki disease [J]. Circ J, 2009, 73(7): 1315-1318.
- [18] Hamada H. Aspirin treatment for patients with Kawasaki disease [J]. Nihon Rinsho, 2014, 72(9): 1612-1616.
- [19] 李淑芳. 阿司匹林药理学研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(1): 31, 33.
- [20] Sellers RS, Radi ZA, Khan NK. Pathophysiology of cyclooxygenases in cardiovascular homeostasis [J]. Vet Pathol, 2010, 47(4): 601-613.
- [21] 黄海兵. 环氧酶-2 研究进展[J]. 医药前沿, 2014, 18: 247-248.

(收稿日期: 2015-03-15)