

川崎病 11 β -羟基类固醇脱氢酶与促炎性细胞因子的变化及意义

王娟莉¹, 周南¹, 吴守振¹, 严晓华², 王涛¹, 行海舰¹ (1. 西安市儿童医院, 陕西西安 710003; 2. 陕西省人民医院, 陕西西安 710068)

[摘要] 目的:探讨 11 β -羟基类固醇脱氢酶(11 β -HSD)与促炎性细胞因子在川崎病(KD)发生、发展中的变化及意义。方法:应用 Real-time PCR 检测 KD 患儿急性期及治疗后外周血单核细胞内 11 β -HSD mRNA 的表达,应用免疫印迹方法检测 11 β -HSD 蛋白的表达;应用酶联免疫吸附试验检测血浆 IL-17A 和 IL-6 水平。结果:病例组患儿治疗前外周血单核细胞内 11 β -HSD1 mRNA 表达水平及 IL-17A 和 IL-6 水平分别为 7.13 \pm 0.79、(43.40 \pm 5.20) pg/mL、(68.30 \pm 6.26) pg/mL,较正常对照组 1.00 \pm 0.07、(24.30 \pm 2.26) pg/mL、(30.04 \pm 2.86) pg/mL 明显升高(P <0.01),而治疗后结果分别为 3.43 \pm 0.52、(27.30 \pm 2.50) pg/mL、(38.30 \pm 3.50) pg/mL,均较治疗前明显下降(P <0.01);治疗前 11 β -HSD2 mRNA 表达水平为 0.32 \pm 0.05,明显低于正常对照组 1.00 \pm 0.06(P <0.01),治疗后水平为 0.82 \pm 0.04,较治疗前明显升高(P <0.01)。免疫印迹检测 11 β -HSD 蛋白表达水平的结果分析与 11 β -HSD mRNA 表达水平结果分析一致。结论:KD 急性期 11 β -HSD、促炎性细胞因子在调节 KD 炎症反应中发挥着重要作用。

[关键词] 川崎病;11 β -羟基类固醇脱氢酶;促炎性细胞因子

[中图分类号] R725.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-108X(2016)08-0001-03

Significance of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase and Proinflammatory Cytokines in Kawasaki Disease

Wang Juanli¹, Zhou Nan¹, Wu Shouzhen¹, Yan Xiaohua², Wang Tao¹, Xing Haijian¹ (1. Xi'an Children's Hospital, Shaanxi Xi'an 710003, China; 2. Shaanxi Provincial People's Hospital, Shaanxi Xi'an 710068, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the changes and significance of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) and proinflammatory cytokines in the occurrence and development of Kawasaki disease (KD). **Methods:** Real-time PCR was performed to detect the mRNA expressions of 11 β -HSD in peripheral blood monocytes in acute phase and after treatment. Western blot was performed to detect the protein expressions of 11 β -HSD. ELISA was performed to detect the levels of IL-6 and IL-17 in plasma. **Results:** The expression levels of 11 β -HSD1 mRNA, IL-17A and IL-6 in acute phase were 7.13 \pm 0.79, (43.40 \pm 5.20) pg/mL, (68.30 \pm 6.26) pg/mL, significantly higher than the normal levels 1.00 \pm 0.07, (24.30 \pm 2.26) pg/mL, (30.04 \pm 2.86) pg/mL (P <0.01), after treatment the levels were 3.43 \pm 0.52, (27.30 \pm 2.50) pg/mL, (38.30 \pm 3.50) pg/mL, which were significantly reduced than before (P <0.05). The expression level of 11 β -HSD2 mRNA was 0.32 \pm 0.05 before treatment, lower than the normal group (P <0.01), while significantly increased after treatment than before (P <0.01). The results of Western blot were consistent with those of Real-time PCR. **Conclusion:** 11 β -HSD and the level of proinflammatory cytokines in acute phase of KD are important factors in regulating inflammatory responses.

[Keywords] Kawasaki disease; 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase; proinflammatory cytokines

川崎病(Kawasaki disease, KD)是主要发生于5岁以下儿童的系统性血管炎。KD病因不明,静脉用丙种球蛋白(intravenous immunoglobulin, IVIG)冲击治疗是KD公认的标准治疗方案,但仍有约5% KD患儿治疗后并发冠状动脉病变,且8%~38%的患儿初次应用IVIG便出现抵抗^[1]。近年来,多项临床研究显示,糖皮质激素(glucocorticoid, GC)联合IVIG治疗KD在减轻患儿发热、缩短住院时间、改善冠状动脉损害程度上具有积极的作用^[2-6]。GC广泛用于多种免疫性血管炎的治疗,可能通过对炎症因子的调控发挥重要的抗炎作用。GC在

体内主要与糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)结合发挥生理作用,而GC与受体结合的量除与体内GC浓度、皮质激素结合蛋白有关外,11- β 羟基类固醇脱氢酶(11-beta hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β -HSD)作为GC的代谢酶,在调节糖皮质激素的作用上发挥着重要作用。本文通过检测KD患儿外周血白细胞内11 β -HSD mRNA及11 β -HSD蛋白的表达水平,并检测血浆IL-17A和IL-6水平,研究11 β -HSD与促炎性细胞因子的关系,探讨GC在KD发病中的抗炎症机制。

基金项目: 西安市卫生局科技项目,编号 J2011031。

作者简介: 王娟莉(1971.12~),女,硕士,副主任医师,主要从事儿童心血管系统疾病研究, E-mail: wangjl206@163.com。

1 资料和方法

1.1 一般资料

1.1.1 纳入标准 所有患儿符合第七届国际 KD 论坛修定的第 5 版 KD 诊断标准^[1],病程≤10 d,未接受非甾体类抗炎药及 IVIG 治疗,且发热第 1 天被指定为发病第 1 天。

1.1.2 排除标准 同时合并先天性心脏病、糖尿病或其他炎性、免疫性疾病者。

1.1.3 分组 选取 2013 年 8 月至 2014 年 5 月在我院住院治疗的 KD 患儿 30 例为病例组,其中男 22 例,女 8 例;年龄 5 个月~6 岁,平均 1.6 岁;根据有无冠状动脉损害将病例组分成两个亚组,其中冠状动脉正常 (coronary artery normal, CAN) 组 16 例,冠状动脉扩张 (coronary artery lesion, CAL) 组 14 例。所有患儿均于病程 7~10 d 接受 IVIG 冲击治疗,每次 2 g/kg。选取同期健康同龄儿童 30 例为对照组。病例组和对照组儿童年龄和性别比较差异无统计学意义。本研究经本院伦理委员会审查批准。所有患儿父母均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 病例组患儿于入院次日及治疗后 5~7 d 空腹采集外周静脉血 4 mL,用乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝,分层液密度梯度离心法常规分离单核细胞,然后将其分成 2 份各 1 mL,分别用于提取 mRNA 和蛋白。对照组仅采血 1 次,方法同上。

1.2.2 检测方法 实时荧光定量 PCR (real-time PCR): Trizol 处理分离的单核细胞,试剂购自中国大连 TaKaRa 公司,按 TaKaRa 说明书方法,提取 mRNA 反转录,对 cDNA 定量后,进行 Real-time PCR 检测,以 actin 作为内参。蛋白质印迹法检测:常规方法提取单核细胞蛋白,将所有病例组的蛋白混合后,以 BCA 进行定量,然后行免疫印迹检测。抗 11β-HSD1、11β-HSD2、GRα 单克隆抗体购自 Trask Lane, Danvers, MA, USA。二抗购自广州中杉公司。内参用 GAPDH。应用酶联免疫吸附试验检测血浆 IL-17A 和 IL-6 水平。

1.3 统计学方法

应用 SPSS16.0 统计软件,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前两组患儿 11β-HSD1 mRNA、11β-HSD2 mRNA、IL-17A、IL-6 水平比较

结果见表 1。病例组 11β-HSD1 mRNA 水平较对照组明显升高 (*P*<0.01), 11β-HSD2 mRNA 水平较对照组明显降低 (*P*<0.01), IL-17A 和 IL-6 水平均较对照组明显升高 (*P*<0.01)。

表 1 治疗前两组患儿 11β-HSD1 mRNA、11β-HSD2 mRNA、IL-17A、IL-6 水平比较

组别	例数	11β-HSD1 mRNA	11β-HSD2 mRNA	IL-17A/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)
病例组	30	7.13±0.79	0.32±0.05	43.40±5.20	68.30±6.26
对照组	30	1.00±0.07	1.00±0.06	24.30±2.26	30.04±2.86
<i>t</i>		3.076	2.918	2.989	3.512
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 治疗前 CAL 组与 CAN 组患儿 11β-HSD1 mRNA、11β-HSD2 mRNA、IL-17A、IL-6 水平比较

结果见表 2。CAL 组 11β-HSD1 mRNA 水平较 CAN 组明显升高 (*P*<0.01); CAL 组 11β-HSD2 mRNA 水平较 CAN 组明显降低 (*P*<0.01)。CAL 组血浆 IL-17A 和 IL-6 水平较 CAN 组明显升高 (*P*<0.01)。

表 2 CAL 组与 CAN 组患儿 11β-HSD1 mRNA、11β-HSD2 mRNA、IL-17A、IL-6 水平比较

组别	例数	11β-HSD1 mRNA	11β-HSD2 mRNA	IL-17A/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)
CAL 组	14	8.76±1.59	0.28±0.08	69.8±7.59	93.6±7.24
CAN 组	16	5.98±1.31	0.50±0.12	38.6±4.61	59.8±8.71
<i>t</i>		4.002	3.784	3.211	3.592
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 病例组治疗前后 11β-HSD1 mRNA、11β-HSD2 mRNA、IL-17A 和 IL-6 水平比较

结果见表 3。治疗后, 11β-HSD1 mRNA 水平较治疗前明显下降 (*P*<0.01), 11β-HSD2 mRNA 水平较治疗前明显升高 (*P*<0.01)。IL-17A 和 IL-6 水平均呈下降趋势 (*P*<0.01)。

表 3 病例组治疗前后 11β-HSD1 mRNA、11β-HSD2 mRNA、IL-17A、IL-6 水平比较

组别	例数	11β-HSD1 mRNA	11β-HSD2 mRNA	IL-17A/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)
治疗前	30	7.13±0.79	0.32±0.05	43.40±5.20	68.30±6.26
治疗后	30	3.43±0.52	0.82±0.04	27.30±2.50	38.30±3.50
<i>t</i>		2.861	3.339	2.922	3.459
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 病例组治疗前后 11β-HSD1 mRNA、11β-HSD2 mRNA 蛋白表达变化

免疫印迹分析结果与 Real-time PCR 一致, 病例组治疗后 11β-HSD1 mRNA 蛋白表达显著下调, 11β-HSD2 mRNA 蛋白表达明显上调。见图 1、图 2。

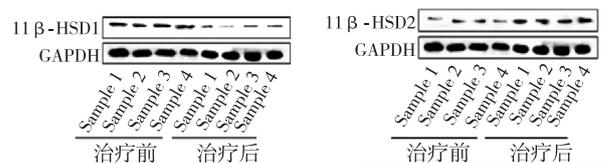


图 1 治疗前、后 11β-HSD1 mRNA 蛋白表达印迹图

图 2 治疗前、后 11β-HSD2 mRNA 蛋白表达印迹图

3 讨论

11 β -HSD 是受体前调节 GC 作用的关键酶,主要分为两种亚型,11 β -HSD1 和 11 β -HSD2。一般认为,11 β -HSD1 能增强细胞内糖皮质激素的浓度和活性,诱导 11 β -HSD1 表达,增强糖皮质激素对血管内皮细胞炎性损伤的保护,11 β -HSD2 的作用则相反^[7-8]。Sano S 等^[9]研究发现,KD 患儿入院时和首剂 IVIG 治疗前血清中氢化可的松和可的松的水平均显著高于疾病恢复期,提示 KD 患儿体内 11 β -HSD1 活性上调,但这种上调呈时间依赖性降低,由于肾上腺分泌减少和/或 11 β -HSD 活性降低,导致内源性皮质醇水平下降,如果早期给予外源性 GC,则可以发挥抗炎作用^[9]。本研究结果证实,在 KD 患儿急性期,11 β -HSD1 mRNA 水平较对照组明显升高,同时 11 β -HSD2 mRNA 水平较对照组明显降低;治疗后 11 β -HSD1 mRNA 水平较治疗前明显降低,而 11 β -HSD2 mRNA 水平较治疗前明显升高,与 Sano S 等^[9]研究结果一致。提示 11 β -HSD 活性的变化是川崎病急性期调节炎症反应的重要因素。

本次研究结果表明,川崎病患儿急性期外周血单核细胞内 11 β -HSD1 mRNA 水平及其蛋白表达较正常组明显升高,11 β -HSD2 mRNA 水平及其蛋白表达较正常组明显降低($P < 0.01$),与本课题组前期研究^[10] KD 患儿急性期,外周血 β -HSD1 及 β -HSD2 水平变化一致,再次证实了 KD 患儿急性期 11 β -HSD 的活性发生了明显变化,11 β -HSD1 活性增强,同时 11 β -HSD2 活性减弱;特别是 CAL 组与 CAN 组比较有显著差异,提示 11 β -HSD 的活性变化可能是川崎病发病及冠状动脉损害机制中的重要环节。IVIG 治疗后 11 β -HSD1 mRNA 水平明显降低,而 11 β -HSD2 mRNA 水平升高,可能与 IVIG 抑制机体免疫反应及细胞因子活性有关。因此,适时给予外源性糖皮质激素可能会有效地抑制严重炎症反应,减轻冠状动脉损害。

IL-6 是由活化的 T 细胞、B 细胞及巨噬细胞等合成的炎性细胞因子,具有多种生物效应。IL-17 是 Th17 细胞产生的重要细胞因子,可使中性粒细胞和单核细胞在血管壁募集,促进炎症反应,介导血管壁组织的渗透和损伤。研究提示,细胞因子及心血管损伤可通过激活 11 β -HSD1,从而增强氢化可的松的活性^[11]。本研究结果证实,KD 患儿急性期血浆 IL-17A 和 IL-6 水平明显升高,治疗后水平下降与 11 β -HSD1 mRNA 表达呈一致性,与 11 β -HSD2 mRNA 表达变化相反,与上述研究结果一致。此结果表明,在 KD 的炎症反应中,细胞因子与 11 β -HSD 的变化密切相关,可能是调节 11 β -HSD 活性的重要环节。IVIG 治疗后 11 β -HSD1 mRNA 水平降低,可能与其抑制细胞因子活性、减轻对 11 β -HSD1 mRNA

的激活有关,是机体自身调节炎症反应的表现。

本研究提示,内源性糖皮质激素变化是川崎病炎症反应的重要因素,适时给予外源性糖皮质激素可能会有效地抑制严重炎症反应,减轻冠状动脉病变。

参考文献:

- [1] WENG K P, OU S F, LIN C C, et al. Recent advances in the treatment of Kawasaki disease [J]. Chin Med Assoc, 2011, 74 (11): 481-484.
- [2] KOBAYASHI T, KOBAYASHI T, AREKAWA H. Prednisolone therapy for Kawasaki disease [J]. Nihon Rinsho, 2014, 72(9): 1623-1628.
- [3] OGATA S, OQIHARA Y, HONDA T, et al. Corticosteroid pulse combination therapy for refractory Kawasaki disease a randomized trial [J]. Pediatrics, 2012, 129(1): e17-23.
- [4] CHEN S, DONG Y, YIN Y. et al. Intravenous immunoglobulin plus corticosteroid to prevent coronary artery abnormalities in Kawasaki disease, a meta-analysis [J]. Heart, 2013, 99(2): 76-82.
- [5] LIM Y J, JUNG J W. Clinical outcomes of initial dexamethasone treatment combined with a single high dose of intravenous immunoglobulin for primary treatment of Kawasaki disease [J]. Yonsei Med J, 2014, 55(5): 1260-1266.
- [6] KOBAYASHI T, SAJI T, OTANI T, et al. Efficacy of immunoglobulin plus prednisolone for prevention of coronary artery abnormalities in severe Kawasaki disease (RAISE study): a randomised, open-label, blinded-endpoints trial [J]. Lancet, 2012, 379(9826): 1613-1620.
- [7] GARBRECHT M R, SCHMIDT T J, KROZOWSKI Z S, et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and the regulation of surfactant protein A by dexamethasone metabolites [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 290(4): E653-660.
- [8] HOLMES M C, SANGRA M, FRENCH K L, et al. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 protects the neonatal cerebellum from deleterious effects of glucocorticoids [J]. Neuroscience, 2006, 137(3): 865-873.
- [9] SANO S, NAKAGAWA Y, IWASHIMA S, et al. Dynamics of endogenous glucocorticoid secretion and its metabolism in Kawasaki disease [J]. Steroids, 2010, 75(12): 848-852.
- [10] 王娟莉,周南,苏德成,等.川崎病患儿血 11 β -羟基类固醇脱氢酶的变化研究[J].中国妇幼健康研究,2013,24(5): 643-645.
- [11] IGNATOVA I D, KOSTADINOVA R M, GOLDRING C E, et al. Tumor necrosis factor-alpha upregulates 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by CCAAT/enhancer binding protein-beta in HepG2 cells [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 296(2): E367-E377.

(编辑:杨丹)

(收稿日期:2015-10-20 修回日期:2016-01-31)