

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.02.031

DDIAS 在川崎病患儿血液中的表达及意义*

李 敏¹ 张艳敏² 王娟莉³ 刘百灵¹ 张 倩¹ 卫晶丽¹ 高登峰^{4Δ}

(1 西安市儿童医院超声科 陕西 西安 710003; 2 陕西省儿科疾病研究所 陕西 西安 710003;

3 西安市儿童医院心血管内科 陕西 西安 710003; 4 西安交通大学第二附属医院心内科 陕西 西安 710004)

摘要 目的:研究 DNA 损伤诱导凋亡抑制因子(DDIAS)在川崎病(KD)患儿血液中的表达及意义。**方法:**通过彩色多普勒超声心动图检查 96 例 KD 患儿的冠状动脉损伤(CAL)情况,根据 CAL 存在情况将患儿分为 CAL 组和非 CAL 组。选取我院同期体检的 30 例健康儿童作为对照组。通过 ELISA 试剂盒检测受试者外周血中 DDIAS 的水平。将靶向 DDIAS 的小干扰 RNA(siRNA)(DDIAS-siRNA)和阴性对照 siRNA(NC-siRNA)转染到人冠状动脉内皮细胞(HCAEC)中,并用 10 ng/mL TNF- α 处理细胞。通过 RT-PCR 分析细胞中的 TNF- α 、IL-6 和 HO-1 mRNA 水平,通过 Western blot 分析 DDIAS、NF- κ B p65 和 I- κ B α 的蛋白水平。此外,评估了各组 HCAEC 细胞中的超氧化物和谷胱甘肽(GSH)含量及其与单核细胞的粘附。**结果:**与对照组比较,KD 组的 DDIAS 水平显著升高($P<0.001$)。与非 CAL 组比较,CAL 组的 DDIAS 水平显著升高($P<0.01$)。外周血 DDIAS 诊断 KD 的 AUC、敏感性和特异性依次为 0.747、65.62%和 80.65%,外周血 DDIAS 诊断 CAL 的 AUC、敏感性和特异性依次为 0.733、63.83%和 75.51%。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,DDIAS-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的 TNF- α mRNA 表达水平降低了 51.45%,IL-6 mRNA 表达水平降低了 59.46%,细胞核 NF- κ B p65 的蛋白表达水平降低了 26.40%,细胞质 I- κ B α 的蛋白水平升高了 91.30%($P<0.05$)。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,DDIAS-siRNA+TNF- α 组粘附实验的相对荧光强度降低了 53.42%($P<0.05$)。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,DDIAS-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的超氧化物相对荧光强度降低了 35.38%,HO-1 mRNA 水平升高了 1.35 倍,GSH 水平升高了 94.59%($P<0.05$)。**结论:**DDIAS 对 KD 及 CAL 均有较高的诊断价值,下调 DDIAS 减轻 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞损伤。

关键词:DNA 损伤诱导凋亡抑制因子;川崎病;冠状动脉损伤;炎症

中图分类号:R725.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)02-356-08

The Expression and Significance of DDIAS in the Blood of Children with Kawasaki Disease*

LI Min¹, ZHANG Yan-min², WANG Juan-li³, LIU Bai-ling¹, ZHANG Qian¹, WEI Jing-li¹, GAO Deng-feng^{4Δ}

(1 Department of Ultrasound, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710003, China; 2 Shaanxi Institute for Pediatric Diseases, Xi'an,

Shaanxi, 710003, China; 3 Department of Cardiology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710003, China;

4 Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression and significance of DNA damage-induced apoptosis inhibitor (DDIAS) in the blood of children with Kawasaki disease (KD). **Methods:** The coronary artery injury (CAL) of 96 children with KD was examined by color Doppler echocardiography, and the children were divided into CAL group and non-CAL group according to the presence of CAL. 30 healthy children who received physical examination in our hospital during the same period were selected as the control group. The level of DDIAS in the peripheral blood of subjects was detected by an ELISA kit. Small interfering RNA (siRNA) targeting DDIAS (DDIAS-siRNA) and negative control siRNA (NC-siRNA) were transfected into human coronary artery endothelial cells (HCAEC), and the cells were treated with 10 ng/mL TNF- α . The levels of TNF- α , IL-6 and HO-1 mRNA in the cells were analyzed by RT-PCR, and the protein levels of DDIAS, NF- κ B p65 and I- κ B α were analyzed by Western blot. In addition, the superoxide and glutathione (GSH) content in HCAEC cells of each group and their adhesion to monocytes were evaluated. **Results:** Compared with the control group, the level of DDIAS in the KD group was significantly increased ($P<0.001$). Compared with the non-CAL group, the level of DDIAS in the CAL group was significantly increased ($P<0.01$). The AUC, sensitivity and specificity of peripheral blood DDIAS for KD diagnosis were 0.747, 65.62% and 80.65%, respectively. The AUC, sensitivity and specificity of peripheral blood DDIAS for diagnosing CAL were 0.733, 63.83% and 75.51%, respectively. Compared with the NC-siRNA+TNF- α group, the TNF- α mRNA level in the HCAEC cells of the

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81570382);西安市科技计划项目(201805098YX6SF32(5));

西安市卫生健康委员会面上培育科研项目(2020ms12)

作者简介:李敏(1989-),女,硕士研究生,主要研究方向:川崎病,E-mail: Limin8917@163.com,电话:15809227156

Δ 通讯作者:高登峰,E-mail: gaomedic@163.com,电话:15091544672

(收稿日期:2021-04-23 接受日期:2021-05-27)

DDIAS-siRNA+TNF- α group was reduced by 51.45%, the IL-6 mRNA level was reduced by 59.46%, the protein level of nuclear NF- κ B p65 was reduced by 26.40%, and the protein level of cytoplasmic I- κ B α increased by 91.30% ($P<0.05$). Compared with the NC-siRNA+TNF- α group, the relative fluorescence intensity of the adhesion experiment in the DDIAS-siRNA+TNF- α group was reduced by 53.42% ($P<0.05$). Compared with the NC-siRNA+TNF- α group, the relative fluorescence intensity of superoxide in HCAEC cells in the DDIAS-siRNA+TNF- α group was reduced by 35.38%, the level of HO-1 mRNA was increased by 1.35 times, and the level of GSH was increased. 94.59% ($P<0.05$). **Conclusion:** DDIAS has high diagnostic value for KD and CAL. Down-regulation of DDIAS reduces the damage of HCAEC cells induced by TNF- α .

Key words: DNA damage-induced apoptosis inhibitor; Kawasaki disease; Coronary artery injury; Inflammation

Chinese Library Classification(CLC): R725.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)02-356-08

前言

冠状动脉异常(Coronary artery anomalies, CAAs)如冠状动脉瘤是川崎病(Kawasaki disease, KD)引起的最严重的并发症^[1]。已成为儿童获得性心脏病最常见的病因^[2]。由于KD的症状与其他几种儿童发热性疾病相似^[3],因此迫切需要可用于KD早期诊断的特异性生物标志物。最近,Wright等^[4]报道,KD患儿血液中DNA损伤诱导凋亡抑制因子(DNA damage-induced apoptosis suppressor, DDIAS)的水平明显高于其他感染性和炎症性疾病患儿,并且DDIAS在肿瘤坏死因子和白介素的中央调控网络中发挥作用。然而,目前尚不清楚DDIAS是否可用于KD的早期诊断及其与KD进展的关系。KD患儿冠状动脉病变的发展与内皮功能障碍有关^[5]。冠状动脉内皮细胞调节心脏功能,内皮细胞功能障碍会经历结构和功能的改变,减弱血管舒张功能,并表现出促炎和促血栓形成的特性。内皮细胞主要由活化的白细胞产生的促炎细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor, TNF- α)和白细胞介素-1(Interleukin-1, IL-1),通过激活核因子- κ B(Nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路来激活^[6]。内皮细胞被激活后产生一系列形态和功能变化促进了冠状动脉病变的发生^[7,8]。本研究主要探讨了DDIAS对KD的诊断价值,以及DDIAS在TNF- α 诱导的HCAEC损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与试剂 HCAEC和THP1细胞(单核细胞系)购自美国ATCC;靶向DDIAS的小干扰RNA(siRNA)(DDIAS-siRNA)和阴性对照siRNA(NC-siRNA)由上海吉玛制药技术有限公司合成;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;Human DDIAS ELISA Kit购自瑞典Atlas Antibodies公司;Dulbecco

的改良Eagle培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素购自美国GIBCO;DDIAS、NF- κ B p65、I- κ B α 、Lamin B1、 β -actin一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗购自美国Cell Signaling Technology;人重组TNF- α 购自美国OriGene;蛋白提取试剂盒购自江苏凯基;BCA蛋白测定试剂盒购自上海碧云天;总RNA提取试剂盒购自北京天根;PCR反转录试剂盒购自日本Takara;SYBR Green qPCR试剂盒购自德国Qiagen;BCECF-AM购自美国Sigma;Dihydroethidium(DHE)购自美国Molecular Probes;DAPI购自上海碧云天;monochlorobimane购自上海MedChemExpress;Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen。

1.1.2 临床资料收集 2017年8月至2019年12月,收集我院确诊的96例KD患儿(KD组),包括男性62例,女性34例,年龄为9个月~7岁,平均为 2.14 ± 1.56 岁。纳入本研究的KD患儿均符合KD诊断标准^[9]。通过彩色多普勒超声心动图(UCG)检查患儿的冠状动脉损伤(CAL)情况,出现CAL的患儿纳入CAL组,未出现CAL的患儿纳入非CAL组。另外,选取我院同期体检的30例健康儿童作为对照组,包括男性20例,女性10例,年龄为10个月~5岁,平均为 2.25 ± 1.32 岁。KD患儿和健康对照儿童的基线资料如表1所示。两组的年龄和性别组成无差异($t=0.313$, $P=0.673$ 和 $\chi^2=0.044$, $P=0.835$)。本研究中共有47例(48.96%)KD患儿发生CAL, KD患儿的CAL表现如下:7例(7.29%)LCA主干增宽、3例(3.13%)RCA主干增宽、8例(8.33%)LAD增宽、2例(2.08%)RAD增宽、19例(19.79%)LCA主干及LAD增宽和8例(8.33%)LCA、RCA主干及LAD增宽。如表2所示,CAL患儿和非CAL患儿的年龄和性别组成无显著性差异($t=0.374$, $P=0.609$ 和 $\chi^2=0.687$, $P=0.407$)。本研究经过西安市儿童医院伦理委员会批准,所有研究对象均经父母或监护人签订知情同意书。

表1 受试者的基线资料
Table 1 Baseline data of subjects

Parameter	KD group	Control group	t/χ^2	P
Cases	96	30	-	-
Age (years)	2.14 ± 1.56	2.25 ± 1.32	0.313	0.673
Gender (cases)				
Male	62(64.58%)	20(66.67%)	0.044	0.835
Female	34(35.42%)	10(33.33%)		

表 2 CAL 患儿和非 CAL 患儿的基线资料
Table 2 Baseline data of children with CAL and children with non-CAL

Parameter	CAL group	Non-CAL group	t/χ^2	P
Cases	47	49	-	-
Age(year)	2.01± 1.59	2.26± 1.47	0.374	0.609
Gender(cases)				
Male	31	31	0.687	0.407
Female	14	20		

1.2 方法

1.2.1 外周血中 DDIAS 的检测 抽取受试者外周静脉血 5 mL, 置于抗凝管。3000 r/min 离心 15 min, 收集上层血清并分装、标记、-80℃ 冰箱保存。通过 ELISA 试剂盒检测受试者外周血中 DDIAS 的水平, 检测方法参考试剂盒说明书。

1.2.2 细胞培养 将 HCAEC 细胞加入含有 10% FBS、1% 青霉素 - 链霉素的 DMEM 中。培养条件为 37℃、5% CO₂。指定时间点用含有 10 ng/mL TNF-α 的新培养基替换原培养基。

1.2.3 细胞转染与分组 在 siRNA 转染之前, 分别将 5 μL DDIAS-siRNA、NC-siRNA 和 5 μL Lipofectamine 2000 加入 200 μL 无血清 DMEM 培养基中进行稀释, 室温下放置 15 min。将 HCAEC 细胞分为 NC-siRNA 组、DDIAS-siRNA 组、NC-siRNA+TNF-α 组和 DDIAS-siRNA+TNF-α 组。将各组

HCAEC 细胞接种在 6 孔板中, 用 DMEM 调整浓度为 1×10^5 个 /mL。每孔加 2 mL 细胞悬液, 37℃、5% CO₂ 过夜培养。细胞生长至 60%~70% 融合时, 分别将稀释的 DDIAS-siRNA、NC-siRNA 与 Lipofectamine 2000 混合, 室温孵育 20 min。将 1.0 mL 的无血清 DMEM 培养基加入 6 孔板中, 然后加入混合物并摇匀, 37℃、5% CO₂ 培养 24 h。更换为完全 DMEM 培养基继续培养。然后根据分组, 用 10 ng/mL TNF-α 刺激细胞 4 h。

1.2.4 RT-PCR 分析 使用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 并使用 PCR 反转录试剂盒进行反转录, 使用 SYBR Green Mix 进行扩增, 使用美国 Bio-Rad T100 PCR 仪进行 PCR。Real-time PCR 反应条件如下: 预变性: 95℃, 2 min; 变性: 95℃, 15 s; 退火: 60℃, 10 s; 延伸: 68℃, 10 s; 40 个循环。引物序列见表 3。

表 3 引物序列
Table 3 Primer sequence

Gene		Primer sequence
DDIAS	Forward	5'-AGGTACCGAGCCATGGACAG-3'
	Reverse	5'-AATGCTCTGGTGGGTGGTC-3'
TNF-α	Forward	5'-AACCTCTCCCCTCATGTCAA-3'
	Reverse	5'-CTGCGCAGTCCTACTGTCTC-3'
IL-6	Forward	5'-GACAAAGCAGGGACAAGACT-3'
	Reverse	5'-TTACCATCGGCATCAGTCCT-3'
HO-1	Forward	5'-AACTAGAGATTCGGCAAGGA-3'
	Reverse	5'-CCATACAGCACCTCTCAGTACGAT-3'
β-actin	Forward	5'-CTCCCTTCTTCTTCAGCCCT-3'
	Reverse	5'-ACTGCGTAGGCAGTTTGCAG-3'

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达水平 使用蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。在 10% SDS-PAGE 凝胶上电泳分离蛋白并转移至聚偏二氟乙烯膜。在室温下, 用含 5% 脱脂奶粉和 0.1% Tween-20 的 Tris 缓冲盐水封闭膜, 室温放置 20 min。将膜与一抗(抗 DDIAS、NF-κB p65、I-κBα、Lamin B1 和 β-actin 一抗按 1:1000 稀释)4℃ 过夜孵育。然后将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗(按 1:2000 稀释)室温孵育 2 h。将 ECL 滴加在膜上进行显影。Lamin B1 和 β-actin 作为内部对照。

1.2.6 单核细胞粘附测定法 参考 Horigome 等人方法测定单核细胞粘附^[10]。将 HCAEC 细胞接种在 24 孔板中至 80-90% 融

合, 然后用 10 ng/mL TNF-α 刺激细胞 4 h。在与 THP1 细胞共培养之前, 用含有 1% FBS 的 RPMI-1640 培养基洗涤细胞。将 THP1 细胞在 RPMI-1640 培养基中用 2 μM BCECF-AM 标记 20 min, 然后添加到 HCAEC 细胞(5×10^4 细胞 / 孔)中, 共培养 30 min。使用含 1% FBS 的 RPMI-1640 培养基清洗每个孔 3 次, 以除去未粘附的 THP1 细胞。Olympus IX83 荧光显微镜下观察粘附的 THP1 细胞。从 6 个随机视野中获取图像, 并使用荧光微板读取器以 510 nm 的激发和 531 nm 的发射来测量荧光强度。基于每个视野中的细胞数量来计算平均荧光强度 (MFI)/ 细胞。

1.2.7 超氧化物检测 通过 Dihydroethidium (DHE) 染色

HCAEC 细胞中的超氧化物^[11]。将 HCAEC 细胞接种在 48 孔板中至 80%~90% 融合, 然后用 10 ng/mL TNF- α 刺激细胞 4 h。洗涤细胞并与 10 μ M DHE 孵育 30 min。洗涤细胞 3 次, 通过荧光显微镜检测产生的荧光。

1.2.8 细胞内谷胱甘肽(GSH)的测定 参考 Kamencic 等人的方法测定细胞内 GSH 的含量^[12]。将 HCAEC 细胞接种在 24 孔板中至 80%~90% 融合, 然后用 10 ng/mL TNF- α 刺激细胞 4 h。将 HCAEC 细胞用 PBS 洗涤两次, 然后在黑暗中与 monochlorobimane (2 mM) 在黑暗中于 37℃ 孵育 20 min。PBS 洗涤 3 次后, 将细胞用 1% SDS 和 5 mM Tris-HCl (pH 7.4) 处理。用荧光微板读数器分别测量激发和发射波长为 380 nm 和 470 nm 的荧光。

1.3 统计学方法

SPSS21.0 统计软件用于数据分析。计数资料表示为例数(百分比), 两组间比较采用卡方检验; 正态分布的计量资料以

均数 $\pm$ 标准差表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析; 非正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距表示, 两组间比较采用非参数 Mann Whitney U 检验。采用受试者工作特征曲线(ROC)来评价各因子对 KD 的诊断价值。所有实验的统计学显著性定义为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 受试者外周血中 DDIAS 的水平

KD 患儿和健康儿童外周血中 DDIAS 的水平如图 1 所示。与对照组比较, KD 组患儿的 DDIAS 水平显著升高 [1.93 (1.61, 2.57) pg/mL vs 4.06 (2.06, 5.58) pg/mL, $Z=-4.125$, $P<0.001$]。CAL 患儿和非 CAL 患儿外周血中 DDIAS 的水平如图 2 所示。与非 CAL 组比较, CAL 组的 DDIAS 水平显著升高 [2.74 (1.77, 4.45) pg/mL vs 5.22 (3.09, 7.05) pg/mL, $Z=-3.925$, $P<0.001$]。

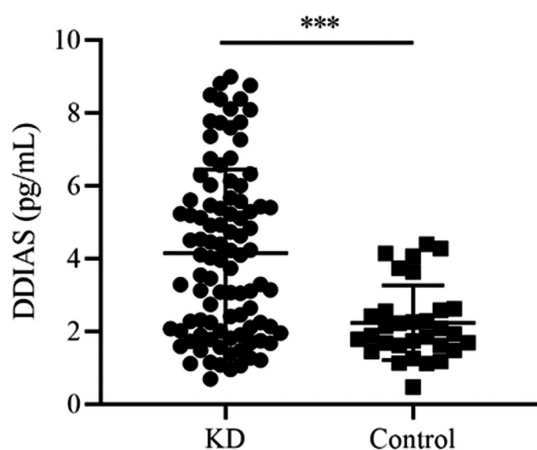


图 1 KD 患儿和健康儿童外周血中 DDIAS 的水平

Fig.1 The levels of DDIAS in peripheral blood of children with KD and healthy children

Note: Compared with Control group, *** $P<0.001$.

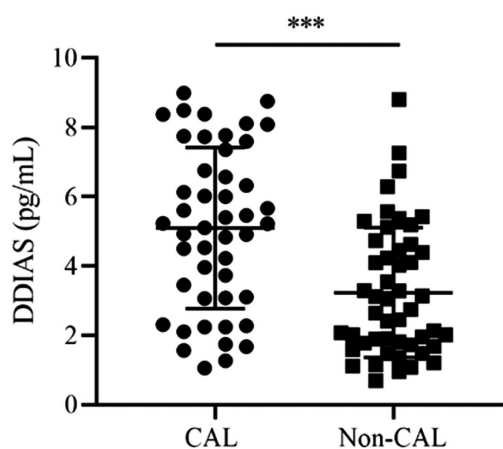


图 2 CAL 患儿和非 CAL 患儿外周血中 DDIAS 的水平

Fig.2 The levels of DDIAS in peripheral blood of children with CAL and non-CAL children

Note: Compared with Non-CAL group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.2 DDIAS 对 KD 和 CAL 的诊断价值

如图 3 所示, 外周血 DDIAS 诊断 KD 患儿的 AUC、敏感性和特异性依次为 0.747、65.62% 和 80.65%。如图 4 所示, 外周

血 DDIAS 诊断 CAL 患儿的 AUC、敏感性和特异性依次为 0.733、63.83% 和 75.51%。

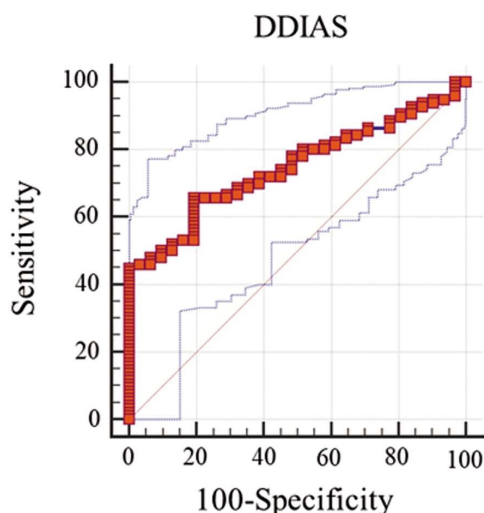


图 3 DDIAS 诊断 KD 的 ROC 曲线分析

Fig.3 ROC curve analysis of DDIAS in the diagnosis of KD

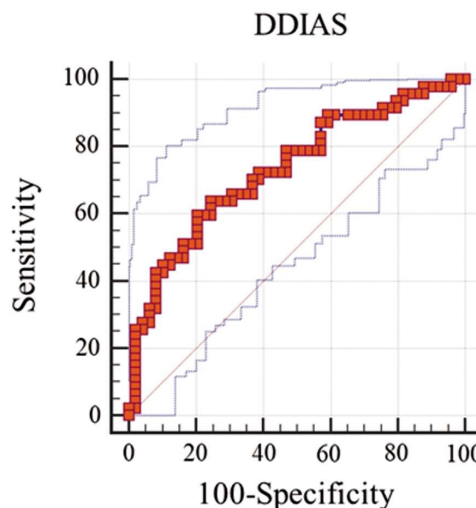


图 4 DDIAS 诊断 CAL 的 ROC 曲线分析

Fig.4 ROC curve analysis of DDIAS in the diagnosis of CAL

2.3 TNF- α 对 HCAEC 细胞中 DDIAS 表达的影响

结果如图 5 显示,与对照组相比,DDIAS-siRNA 组 HCAEC 细胞中的 DDIAS mRNA 表达水平下降了 76.01% ($P<0.05$),DDIAS 蛋白表达水平下降了 78.95% ($P<0.05$)。与 NC-siRNA 组相比,NC-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的

DDIAS mRNA 表达水平升高了 2.44 倍 ($P<0.05$),DDIAS 蛋白表达水平升高了 98.11% ($P<0.05$)。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,DDIAS-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的 DDIAS mRNA 表达水平下降了 54.65% ($P<0.05$),DDIAS 蛋白表达水平下降了 60.61% ($P<0.05$)。

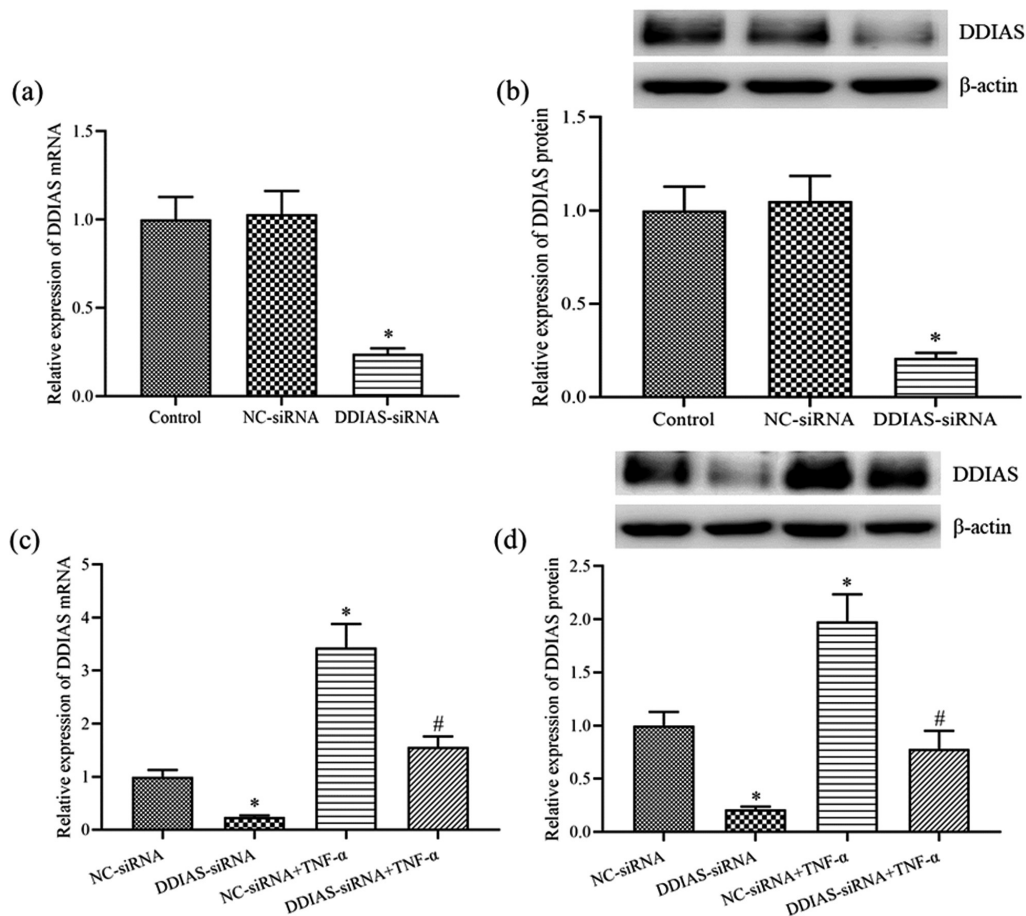


图 5 DDIAS 在 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞中的表达

Fig.5 The expression of DDIAS in HCAEC cells induced by TNF- α

Note: (a and b): Transfection efficiency of DDIAS-siRNA, compared with Control group, * $P<0.05$; (c and d): DDIAS mRNA and protein levels in HCAEC cells induced by TNF- α ; compared with NC-siRNA group, * $P<0.05$; compared with NC-siRNA+TNF- α group, # $P<0.05$.

2.4 下调 DDIAS 抑制 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞中的炎症和 NF- κ B 的活化

结果如图 6 显示,与 NC-siRNA 组相比,NC-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的 TNF- α mRNA 表达水平升高了 2.11 倍 ($P<0.05$),IL-6 mRNA 表达水平升高了 4.23 倍 ($P<0.05$)。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,DDIAS-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的 TNF- α mRNA 表达水平降低了 51.45% ($P<0.05$),IL-6 mRNA 表达水平降低了 59.46% ($P<0.05$)。与 NC-siRNA 组相比,NC-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中细胞核的 NF- κ B p65 蛋白表达水平升高了 78.13% ($P<0.05$)。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,DDIAS-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中细胞核的 NF- κ B p65 蛋白表达水平降低了 26.40% ($P<0.05$)。与 NC-siRNA 组相比,NC-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中细胞质的 I- κ B α 蛋白表达水平降低了 54.02% ($P<0.05$)。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,DDIAS-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中细胞质 I- κ B α 的蛋白表达水平升高了 91.30%

($P<0.05$)。

2.5 下调 DDIAS 抑制 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞与单核细胞粘附

结果如图 7 显示,与 NC-siRNA 组相比,NC-siRNA+TNF- α 组粘附实验的相对荧光强度升高了 3.53 倍 ($P<0.05$)。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,DDIAS-siRNA+TNF- α 组粘附实验的相对荧光强度降低了 53.42% ($P<0.05$)。

2.6 下调 DDIAS 提高了 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞的抗氧化能力

结果如图 8 显示,与 NC-siRNA 组相比,NC-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的超氧化物相对荧光强度升高了 1.12 倍 ($P<0.05$)。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,DDIAS-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的超氧化物相对荧光强度降低了 35.38% ($P<0.05$)。与 NC-siRNA 组相比,NC-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的 HO-1 mRNA 表达水平降低了 44.24% ($P<0.05$)。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,

DDIAS-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的 HO-1 mRNA 表达水平升高了 1.35 倍 ($P<0.05$)。与 NC-siRNA 组相比,NC-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的 GSH 水平降低了 26.32%

($P<0.05$)。与 NC-siRNA+TNF- α 组相比,DDIAS-siRNA+TNF- α 组 HCAEC 细胞中的 GSH 水平升高了 94.59%($P<0.05$)。

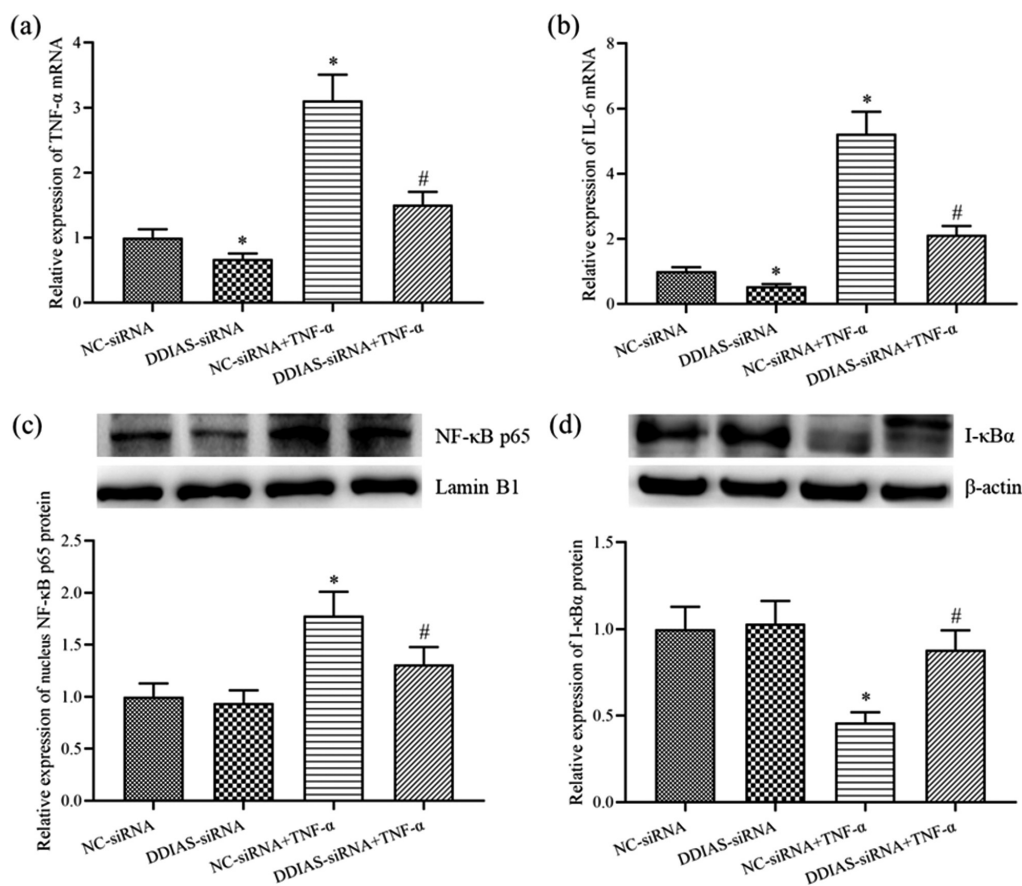


图 6 DDIAS 对 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞中炎症因子和 NF- κ B 信号通路的影响

Fig.6 The effect of DDIAS on inflammatory factors and NF- κ B signaling pathways in HCAEC cells induced by TNF- α

Note: (a): TNF- α mRNA expression level; (b): IL-6 mRNA expression level; (c): Relative expression of nuclear NF- κ B p65 protein; (d): Relative expression of cytoplasmic I- κ B α protein; compared with NC-siRNA group, * $P<0.05$; compared with NC-siRNA+TNF- α group, # $P<0.05$.

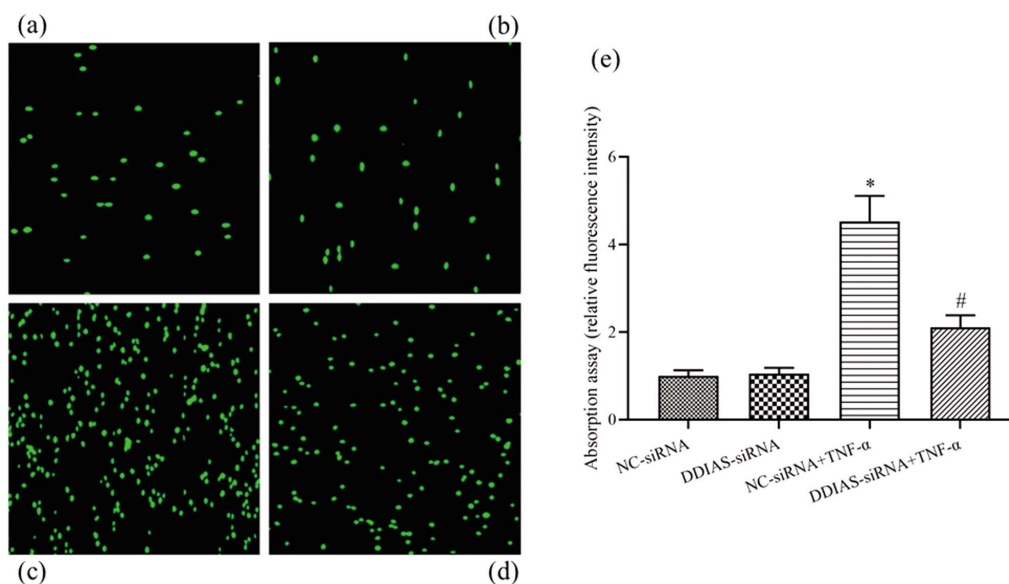


图 7 DDIAS 对 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞与单核细胞粘附的影响

Fig.7 The effect of DDIAS on the adhesion of HCAEC cells and monocytes induced by TNF- α

Note: (a-d): Fluorescence images of NC-siRNA, DDIAS-siRNA, NC-siRNA+TNF- α and DDIAS-siRNA+TNF- α groups in sequence ($\times 200$); (e): Relative fluorescence intensity of each group of monocyte adhesion experiment; compared with NC-siRNA group, * $P<0.05$; compared with NC-siRNA+TNF- α group, # $P<0.05$.

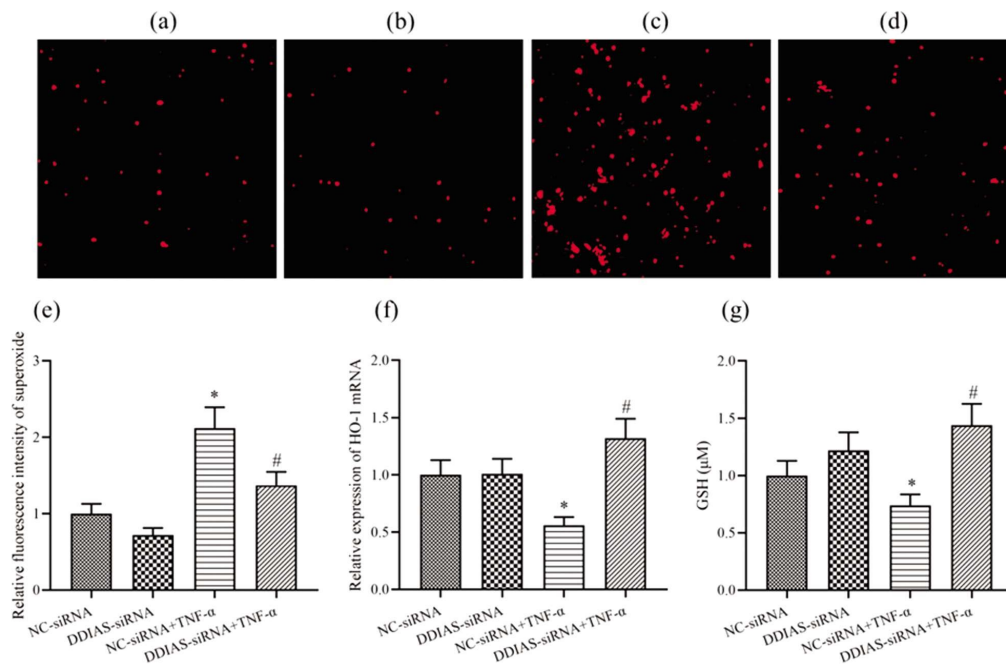


图 8 DDIAS 对 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞的抗氧化能力的的影响

Fig.8 The effect of DDIAS on the antioxidant capacity of HCAEC cells induced by TNF- α

Note: (a-d): Fluorescence images of NC-siRNA, DDIAS-siRNA, NC-siRNA+TNF- α and DDIAS-siRNA+TNF- α groups in sequence ($\times 200$);

(e): Relative fluorescence intensity of each group of superoxide; (f): HO-1 mRNA expression level; (g): GSH level; compared with NC-siRNA group,

* $P < 0.05$; compared with NC-siRNA+TNF- α group, # $P < 0.05$.

3 讨论

本研究表明, KD 患儿外周血中 DDIAS 的水平显著高于健康儿童, 并且 CAL 患儿外周血中 DDIAS 水平高于非 CAL 患儿。此外, 外周血 DDIAS 诊断 KD 的 AUC、敏感性和特异性依次为 0.747、65.62% 和 80.65%; 诊断 CAL 的 AUC、敏感性和特异性依次为 0.733、63.83% 和 75.51%。这些结果提示, DDIAS 可能参与 KD 的发生发展, 并且可用于 KD 的辅助诊断。

为了进一步考察 DDIAS 在 KD 中的作用机制, 本研究考察了 DDIAS 对 TNF- α 诱导的 HCAEC 的调控作用。内皮细胞可被 TNF- α 等炎症介质激活, 并参与调节炎症反应^[9]。TNF- α 调节细胞因子分泌、粘附和促血管生成活性。临床研究表明, 使用抗 TNF- α 抗体可抑制细胞因子产生、预防白细胞浸润和抑制 MMPs 生成^[13]。本研究结果证实 TNF- α 诱导了 HCAEC 细胞中炎症介质的高表达。然而, 下调 DDIAS 降低了 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞中炎症因子的水平。这些结果提示 DDIAS 可能在 KD 相关 HCAEC 细胞炎症损伤中发挥重要作用。另外, 循环白细胞与内皮细胞的粘附是炎症反应过程中必不可少的过程^[14]。本研究结果显示, 下调 DDIAS 抑制了 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞与单核细胞粘附。因此, DDIAS 可能通过调节 HCAEC 细胞与单核细胞粘附来参与 KD 疾病的进展。

内皮细胞主要由活化的白细胞产生的促炎细胞因子 (如 TNF- α 和 IL-1) 通过激活 NF- κ B 信号通路来激活^[6]。TNF- α 诱导的 NF- κ B 活化会刺激人内皮细胞中促炎介质 (包括 IL-6 等细胞因子、IL-8 等趋化因子、白细胞结合粘附分子等) 的产生^[6,15,16]。本研究中, 下调 DDIAS 抑制了 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞中 NF- κ B 的核易位, 并上调了其抑制剂 I- κ B α 的表达。因此, 下调 DDIAS 对 NF- κ B 核易位的抑制可阻止 NF- κ B 与促炎

介质的结合能力, 从而抑制促炎介质的释放, 随后抑制 HCAEC 细胞与单核细胞粘附, 最终减轻 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞损伤。

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 或超氧化物的过度产生所触发的氧化应激与血管病变有关^[17,18]。过多的 ROS 或超氧化物引起内皮功能障碍, 导致冠状动脉炎症或功能障碍^[5]。研究表明, 抗氧化基因 HO-1 的沉默限制了抗氧化剂物质的药理作用, 这可能是由于 NF- κ B 调控受损所致^[19]。HO-1 除了具有清除自由基的作用, 还通过减少 TNF- α 诱导的各种粘附分子的过表达来在内皮细胞中表现出抗炎特性^[20,21]。细胞内还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 通过 SH 基团与 ROS 的直接相互作用而充当非酶抗氧化剂, 或参与酶解毒反应以消除 ROS^[22]。本研究显示, TNF- α 诱导了 HCAEC 细胞中超氧化物的产生, 并降低了抗氧化基因 HO-1 的表达和 GSH 水平, 然而, 下调 DDIAS 促进了 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞中抗氧化基因 HO-1 的表达, 提高 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞中 GSH 水平, 从而抑制了超氧化物的产生。因此, 下调 DDIAS 可能通过提高细胞的抗氧化能力来减轻内皮损伤。

总之, 本研究表明, DDIAS 对 KD 及 CAL 均有较高的诊断价值, 下调 DDIAS 抑制了 TNF- α 诱导的 HCAEC 细胞中的炎症、NF- κ B 信号通路的活化、HCAEC 细胞与单核细胞粘附, 并提高了细胞的抗氧化能力。

参考文献 (References)

- [1] He M, Chen Z, Martin M, et al. miR-483 Targeting of CTGF Suppresses Endothelial-to-Mesenchymal Transition: Therapeutic Implications in Kawasaki Disease [J]. *Circ Res*, 2017, 120(2): 354-365
- [2] Agarwal S, Agrawal DK. Kawasaki disease: etiopathogenesis and novel treatment strategies [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13 (3):

- 247-258
- [3] Dominguez SR, Anderson MS, El-Adawy M, et al. Preventing coronary artery abnormalities: a need for earlier diagnosis and treatment of Kawasaki disease[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2012, 31(12): 1217-1220
- [4] Wright VJ, Herberg JA, Kaforou M, et al. Diagnosis of Kawasaki Disease Using a Minimal Whole-Blood Gene Expression Signature [J]. *JAMA Pediatr*, 2018, 172(10): e182293
- [5] Ishikawa T, Seki K. The association between oxidative stress and endothelial dysfunction in early childhood patients with Kawasaki disease[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1): 30
- [6] Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(10): 803-815
- [7] Bochenek ML, Schäfer K. Role of Endothelial Cells in Acute and Chronic Thrombosis[J]. *Hamostaseologie*, 2019, 39(2): 128-139
- [8] Harper E, Rochfort KD, Smith D, et al. RANKL treatment of vascular endothelial cells leading to paracrine pro-calcific signaling involves ROS production[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 464(1-2): 111-117
- [9] Ayusawa M, Sonobe T, Uemura S, et al. Revision of diagnostic guidelines for Kawasaki disease (the 5th revised edition)[J]. *Pediatr Int*, 2005, 47(2): 232-234
- [10] Horigome S, Yoshida I, Ito S, et al. Inhibitory effects of Kaempferia parviflora extract on monocyte adhesion and cellular reactive oxygen species production in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Eur J Nutr*, 2017, 56(3): 949-964
- [11] Majumder K, Chakrabarti S, Davidge ST, et al. Structure and activity study of egg protein ovotransferrin derived peptides (IRW and IQW) on endothelial inflammatory response and oxidative stress[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(9): 2120-2129
- [12] Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, et al. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione[J]. *Anal Biochem*, 2000, 286(1): 35-37
- [13] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 860-867
- [14] Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1069-1112
- [15] Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction[J]. *Basic Res Cardiol*, 2008, 103(5): 398-406
- [16] Zhang WJ, Frei B. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells[J]. *Faseb j*, 2001, 15(13): 2423-2432
- [17] Tucker MA, Fox BM, Seigler N, et al. Endothelial Dysfunction in Cystic Fibrosis: Role of Oxidative Stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1629638
- [18] Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS [J]. *Circulation*, 2003, 108(16): 1912-1916
- [19] Hseu YC, Lo HW, Korivi M, et al. Dermato-protective properties of ergothioneine through induction of Nrf2/ARE-mediated antioxidant genes in UVA-irradiated Human keratinocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 86: 102-117
- [20] Pae HO, Lee YC, Chung HT. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide: emerging therapeutic targets in inflammation and allergy [J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2008, 2(3): 159-165
- [21] Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, et al. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation[J]. *J Immunol*, 2004, 172(6): 3553-3563
- [22] Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57(3-4): 145-155

(上接第 391 页)

- [18] 何大香, 朱虹霖. 愈创汤治疗肛瘻术后创面瘢痕组织的疗效及其对胶原 I 和胶原 III 的影响 [J]. *世界中医药*, 2018, 13 (3): 632-634, 639
- [19] 郭光丽, 张迪, 许颖, 等. 紫归解毒膏促进肛裂术后创面愈合 120 例[J]. *环球中医药*, 2013, 6(6): 427-428
- [20] 王琴, 刘强. 加味苦参汤坐浴联合红外线照射对肛瘻术后伤口愈合的影响[J]. *吉林中医药*, 2018, 38(9): 1064-1067
- [21] 赵鹏飞, 王书奇, 杨杰, 等. 紫归解毒膏治疗痔病临床研究[J]. *河北中医药学报*, 2016, 31(2): 25-27
- [22] 陈笑吟, 孙婉瑾, 金实, 等. 加味苦参汤治疗肛窦炎湿热下注证临床研究[J]. *中医学报*, 2017, 32(7): 1187-1191
- [23] 周军惠, 乔敬华. 加味苦参汤熏洗法对肛瘻术后创面愈合及肛肠动力学影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(4): 378-381
- [24] Wang C, Rosen L. Management of low transsphincteric anal fistula with serial setons and interval muscle-cutting fistulotomy [J]. *J Integr Med*, 2016, 14(2): 154-158
- [25] 孙凤伟. 加味苦参汤坐浴熏洗对缓解肛瘻术后创面疼痛及促进愈合的效果观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2015, 24(36): 4076-4078
- [26] 李志, 冷羽, 曹波, 等. 湿润生肌膏对肛瘻术后创面肉芽组织中 bFGF、TGF- β 1 细胞生长因子表达及肉芽生长情况的临床观察[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(3): 694-696
- [27] Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis [J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24(2): 215-222
- [28] Cai J, Zhou Q, Wang Z, et al. Comparative Analysis of KGF-2 and bFGF in Prevention of Excessive Wound Healing and Scar Formation in a Corneal Alkali Burn Model[J]. *Cornea*, 2019, 38(11): 1430-1437
- [29] 岳朝驰, 杨向东. "加味苦参汤"熏洗坐浴治疗混合痔术后疼痛 60 例临床观察[J]. *江苏中医药*, 2012, 44(1): 38-39
- [30] Flores-Ocelotl MR, Rosas-Murrieta NH, Moreno DA, et al. Taraxacum officinale and Urtica dioica extracts inhibit dengue virus serotype 2 replication in vitro [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 95