DOI:10.16016/j.1000-5404.201412176

论著

血红素加氧酶-1联合C反应蛋白对川崎病冠状动脉病变的预测研究

何先凤[1],张 静[1],钟家蓉[1],邓 兵[2],陈华琼[3] [400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:心血管内科,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地[1],儿科研究所[2],临床检验中心[3]]

[摘要] **目的** 探讨川崎病(kawasaki disease, KD)患儿血清血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)与C反应蛋白(C reactive protein, CRP)水平变化对川崎病冠状动脉病变(coronary artery lesions, CAL)的预测作用。**方法** 采集KD患儿外周血89例,分为无冠脉病变(NCAL)组35例、扩张内径<5 mm冠脉病变(CAL<5 mm)组44例,及扩张内径≥5 mm冠脉病变(CAL≥5 mm)组10例,并设置发热对照(F)组34例和健康对照(N)组45例。检测血清丙二醛(malondialdehyde,MDA)、HO-1、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),并结合CRP和Hb进行分析,对部分患儿IVIG治疗前后以上指标进行对比。**结果** 急性期,KD各组MDA水平显著增高;CAL<5 mm组HO-1明显高于其他4组;仅CAL≥5 mm组SOD水平低于N组;CAL≥5 mm组CRP显著高于其他4组。在HO-1≥9 ng/mL的30例KD患者中,当CRP>44 mg/L时,CAL的发生率为56.52%(13/23),明显高于NCAL(0%,0/7)。在HO-1<9 ng/mL的31例CAL患者中,当CRP>85 mg,CAL≥5 mm的发生率为(88.89%,8/9),明显高于CAL<5 mm的发生率(36.36%,8/22)。CAL组HO-1与Hb呈负相关($r=-0.37$, $P<0.05$)。IVIG治疗后,KD患者H0-1明显升高,仅CAL组MDA水平下降明显,SOD的改变并不显著($P>0.05$)。**结论** 联合应用HO-1与CRP的水平变化,可能对于川崎病急性期预测冠脉病变发生与否及严重程度具有重要的意义。

[关键词] 川崎病;冠状动脉病变;血红素加氧酶-1;C反应蛋白;氧化应激;炎症反应
[中图法分类号] R446.11;R725.433;R725.512 [文献标志码] A

Predictive value of serum heme oxygenase-1 and C-reactive protein for coronary artery lesions in children with Kawasaki disease: report of 89 cases

He Xianfeng[1], Zhang Jing[1], Zhong Jiarong[1], Deng Bing[2], Chen Huaqiong[3] ([1]Department of Cardiology, [2]Institute of Pediatrics, [3]Clinical Examination Center, Key Laboratory of Child Development and Disorders Co-founded by Chongqing and Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the roles of serum levels of heme oxygenase-1 (HO-1) and C reactive protein (CRP) in the prediction of coronary artery lesions (CAL) in children with Kawasaki disease (KD). **Methods** Totally 89 children with identified KD admitted in our hospital from March 2013 to May 2014 were enrolled in this study, and were divided into no coronary artery lesion group (NCAL, $n=35$), CAL<5 mm group ($n=44$) and CAL≥5 mm group ($n=10$). Another 34 children with acute febrile

[通信作者] 张 静,E-mail:zhangjing1211@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150617.0848.004.html(2015-06-17)

diseases (group F, $n=34$) and 45 normal healthy children (group N, $n=45$) were also recruited as control. The levels of malondialdehyde (MDA), HO-1 and superoxide dismutase (SOD) were detected before and after intravenous immunoglobulin (IVIG) treatment respectively. Serum levels of CRP and hemoglobin (Hb) were also enrolled to correlation analysis. **Results** During the acute phase of KD, MDA levels were significantly increased. The levels of HO-1 were significantly higher in CAL <5 mm group than the other 4 groups. The levels of SOD were lower in CAL ≥5 mm group than N group. CRP levels in CAL ≥5 mm group were significantly higher than the other groups. The incidence of CAL was 56.52% (13/23) in 30 KD cases with HO-1 ≥9 ng/mL and CRP >44 mg/L, which was significantly higher than that of NCAL (0%, 0/7). The incidence of CAL ≥5 mm was 88.89% (8 of 9) in 31 CAL cases with HO-1 <9 ng/mL and CRP >85 mg/L, which was significantly higher than that of CAL <5 mm (36.36%, 8/22). HO-1 was significantly negatively correlated with Hb level ($r=-0.37$, $P<0.05$) in CAL group. IVIG treatment resalted in elevated HO-1 and decreased MDA in CAL group but had no change on SOD activity. **Conclusions** Combined analyzing of HO-1 and CRP may predict the occurrence and severity of CAL in the acute phase of KD.

[**Key words**] Kawasaki disease; coronary artery lesions; heme oxygenase-1; C-reactive protein; oxidative stress; inflammation

Corresponding author: Zhang Jing, E-mail: zhangjing1211@cqmu.edu.cn

川崎病(kawasaki disease, KD)又称皮肤黏膜淋巴结综合征(muco-cuta-meous lymph node syndrome, MCLS),是一种以全身血管炎变为主要病理的急性发热性出疹性小儿疾病。冠状动脉病变(coronary artery lesion, CAL)是影响患儿预后的首要严重并发症,CAL主要包括冠状动脉扩张、狭窄、闭塞、冠状动脉瘤等。冠脉扩张内径在5mm以内者,大多可在患病的1~2年内消退,而内径≥5mm的冠脉瘤则大多难以完全消退[1],后期可能发生冠脉狭窄或闭塞,少数患者可发生心肌缺血甚至猝死[2-3]。本研究通过对川崎病外周血氧化应激指标丙二醛(malondialdehyde, MDA)以及抗氧化指标血红素加氧酶-1(hemin oxygenase-1, HO-1)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的检测,并联合分析CRP和血红蛋白,了解氧化应激及炎症反应在川崎病并发CAL中的变化,寻找冠脉病变,尤其是严重冠脉病变的预测指标,为川崎病的临床治疗和后期随访提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 临床资料

收集2013年3月至2014年5月在重庆医科大学附属儿童医院住院治疗的确诊川崎病患儿89例,根据是否并发冠状动脉病变分为不伴冠脉病变(NCAL)组35例、冠脉扩张内径<5 mm(CAL<5 mm)组44例和扩张内径≥5 mm(CAL≥5 mm)组10例。收集同期在本院住院治疗的其他急性发热性疾病如肺炎、手足口病、传染性单核细胞增多症等34例,作为发热对照组(F),门诊健康体检儿童45例为健康对照组(N)。F和N组均无冠状动脉扩张。5组在年龄和性别上无统计学差异($P>0.05$,表1)。

1.2 纳入和排除标准

KD患儿满足日本KD委员会2002年修订第5版诊断标准[4],排除猩红热、幼年特发性关节炎、败血症、风湿热、先天性心脏病及其他心血管系统疾病。

表1 各组研究对象一般情况比较

组别	例数	月龄	男/女
CAL≥5 mm组	10	68.40±36.86	8/2
CAL<5 mm组	44	36.20±27.94	28/16
NCAL组	35	40.74±23.37	18/17
*F*组	34	33.24±28.80	23/11
*N*组	45	43.13±29.31	29/16

1.3 研究方法

1.3.1 标本采集 所有患儿于入院当天或次日抽取外周静脉促凝血3 mL,室温静置1 h,2 500 r/min离心10 min,留取血清标本。分别用硫代巴比妥酸法(TBA试剂盒购自南京建成生物工程公司)检测血清MDA,双抗体酶联免疫吸附法(试剂盒购自上海沪尚生物科技有限公司)检测血清HO-1,以及羟胺法(试剂盒购自南京建成生物工程公司)检测血清SOD的表

表 2　各组研究对象 HO-1、MDA、SOD、CRP、Hb 表达变化（$\bar{x} \pm s$）

组别	HO-1(ng/mL)	MDA(nmol/mL)	SOD(U/mL)	CRP(mg/L)	Hb(g/L)
CAL≥5 mm 组	4.55 ± 2.88	3.53 ± 2.29	46.89 ± 17.15[b]	126.54 ± 59.02[c]	108.80 ± 16.89
CAL<5 mm 组	9.71 ± 8.25[c]	4.84 ± 3.81[a]	60.89 ± 15.01	71.08 ± 56.56	107.43 ± 12.95
NCAL 组	4.48 ± 5.52	3.76 ± 1.86[a]	55.83 ± 14.79	66.11 ± 53.91	108.94 ± 11.35
F 组	5.11 ± 5.2	2.55 ± 1.17	57.14 ± 9.29	11.12 ± 8.85	115.68 ± 12.27
N 组	3.42 ± 3.61	1.98 ± 0.89	67.53 ± 11.23	8.00 ± 0.00	121.4 ± 9.46

a：$P<0.05$，与 F 和 N 组比较；b：$P<0.05$，与 N 组比较；c：$P<0.05$，与另外 4 组比较

达。同时留取抗凝血 2 mL，采用 U2DOT Read Meter 检测仪测定血浆 CRP，XE2100 全自动血液分析仪分析 Hb。操作严格按照说明书进行。所有临床采样经医院伦理委员会审核批准，并获得患儿家属签字同意。

1.3.2　冠状动脉超声检查结果判定　　根据年龄和内径关系，冠脉内径在 3 岁以下 <2.5 mm，~9 岁 <3 mm，~14 岁 <3.5 mm 为无扩张。冠脉内径超过正常但 <5 mm 为轻度扩张或小型冠脉瘤，冠脉内径 5 ~ 8 mm 为中型冠脉瘤，冠脉内径 >8mm 为巨大冠脉瘤。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　川崎病急性期 MDA、HO-1、SOD 的表达

在 KD 急性期，血清 MDA 水平增高，CAL <5 mm 组以及 NCAL 组 MDA 均显著高于 F 组和 N 组（$P<0.05$），尽管 CAL <5 mm 组 MDA 水平增高更明显，但 KD 3 个亚组之间无明显统计学差异（$P>0.05$）；HO-1 在 KD 患儿血清中的表达较 N 组有所升高，其中以 CAL <5 mm 组升高最显著，明显高于其他 4 组（$P<0.05$）。CAL≥5 mm 组与 NCAL 组无统计学差异（$P>0.05$），且与 F 组及 N 组比较，亦无统计学差异（$P>0.05$）；CAL≥5 mm 组血清 SOD 活力降低，与 N 组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。但 CAL <5 mm 组、NCAL 组及 F 组与 N 组比较无统计学意义（$P>0.05$，表 2）。

2.2　联合分析 HO-1 和 CRP 与冠状动脉病变的关系

KD 急性期，各组 KD 患儿外周血 CRP 显著高于 F 组及 N 组，CAL≥5 mm 组与 CAL <5 mm 组及 NCAL 组相比，增高更明显（$P<0.05$）。

对 HO-1≥9 ng/mL 的 30 例 KD 患儿进行 ROC 曲线分析 CRP 与冠脉病变的关系，结果显示，以 CRP > 44 mg/L 为界值时，对冠脉病变的预测敏感性为 56.5%，特异性为 100%。AUC 为 0.807，*CI* 为 0.623 ~ 0.928，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 1）。χ^2 检验显示，HO-1≥9 ng/mL 时，以 44 mg/L 为 CRP 的水平界限值，CAL 的发生率为 56.52%（13/23），明显高于 NCAL（0%，0/7，$\chi^2=6.982$，$P<0.01$）。

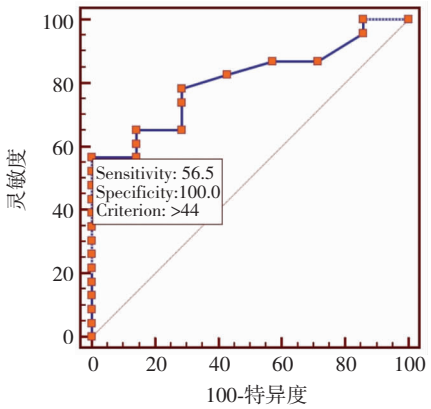


图 1　ROC 曲线分析川崎病患儿 CRP 与冠脉病变的关系

对 HO-1 <9 ng/mL 的 31 例 CAL 患儿进行 ROC 曲线分析 CRP 与严重冠脉病变的关系，结果显示，将 CRP 水平界限值定为 >85 mg/L 时预测 CAL≥5 mm 的敏感度和特异度分别为 88.9% 和 65.7%。AUC 为 0.759，*CI* 为 0.608 ~ 0.91，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 2）。再对 HO-1 <9 ng/mL，以 CRP 水平值 85 mg/L为界限，进行 χ^2 检验，结果显示，CAL≥5 mm 的发生率为 88.89%（8/9），明显高于 CAL <5 mm 的发生率（36.36%，8/22，$\chi^2=7.056$，$P<0.01$）。

2.3　川崎病并发冠脉病变组血清 HO-1 与 Hb 水平相关性分析

Hb 含量在 CAL 组与 NCAL 组均低于健康儿童，但无统计学差异（$P>0.05$），而 CAL 组 Hb 与 HO-1 呈显著负相关（$r=-0.37$，$P<0.01$）。

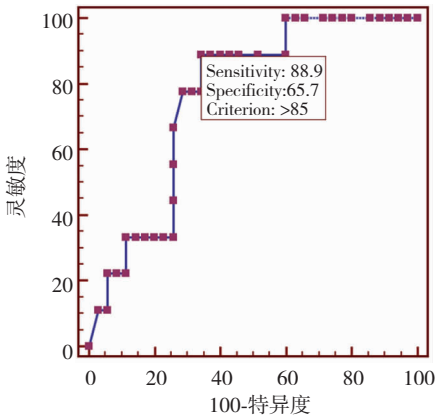


图2 ROC曲线分析冠状动脉病变患儿CRP与严重冠脉病变的关系

2.4 IVIG治疗前后川崎病患儿血清各指标变化情况

以上KD患儿中，共有39例（29例CAL和10例NCAL）在给予INIG治疗后，再次测定了上述指标变化。结果显示，CAL组IVIG治疗后与治疗前相比，HO-1明显增加[(21.14±5.27) ng/mL *vs* (9.24±8.36) ng/mL，$P<0.01$]。而NCAL组HO-1在治疗后亦明显增加[(19.43±3.78) ng/mL *vs* (2.78±3.78) ng/mL，$P<0.01$]。CAL与NCAL两组在IVIG治疗后无显著差异（$P>0.05$）。IVIG治疗后，血清MDA水平下降，CAL组与治疗前相比差异有统计学意义[(3.21±1.40) nmol/mL *vs* (4.81±3.15) nmol/mL，$P<0.05$]，而NCAL组与治疗前相比差异无统计学意义（$P>0.05$）。IVIG治疗后CAL与NCAL两组SOD虽有所恢复，但与治疗之前相比，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。

3 讨论

川崎病自首次报道以来，已近50年，近年来流行病学调查资料显示，该病发病在全世界范围内呈波动性上升趋势。尽管大部分患儿经过急性期丙种球蛋白加阿司匹林标准治疗，KD并发CAL的发生率下降至5%以下，但并不能使巨大冠脉瘤的发生明显减少[5]。部分患儿尽管未发生明显的冠状动脉病变，但其血管内皮细胞持续受到低剂量炎症和氧化损害，内皮功能紊乱，成为成年后冠状动脉粥样硬化的重要危险因素[6-7]。Straface等[8]研究表明，KD患儿全血氧化应激水平增高，并可能与预后密切相关，提示氧化应激可能在冠脉病变的进程中发挥了重要作用。本研究在KD急性期各亚组检测到高水平的MDA，MDA为脂质过氧化产物，提示KD患儿氧化应激普遍增高。

HO-1是体内最易被诱导的抗氧化酶，当机体收到炎症、氧化应激、中毒等不良刺激后，可引起HO-1表达增加。既往研究发现，HO-1及其催化产物在高血压、糖尿病、冠状动脉粥样硬化等众多血管氧化事件中，发挥了重要的细胞保护作用[9-11]。Donovan等[12]研究提示，提高体外培养的人冠状动脉内皮细胞HO-1的表达，可保护细胞抵抗H_2O_2的毒性作用，提示HO-1对冠状动脉内皮细胞可能存在重要的保护作用。本研究发现，KD并发CAL<5 mm组与其他4组比较，HO-1表达明显增高，然而CAL≥5 mm患者HO-1水平反而下降，与NCAL组无统计学差异，提示HO-1在KD患儿轻度冠脉病变时明显升高，可能是预测发生冠脉病变的敏感指标，但在严重冠脉病变的患者中反而降低，因此还需要结合其他指标判断。既往研究提示CRP水平升高可能为冠脉病变的危险因素[13-14]。本研究中，KD急性期CRP水平显著高于健康儿童，而CAL≥5 mm组患者CRP水平又较CAL<5 mm组和NCAL组明显增高，不仅验证了炎症反应参与了KD的发生，更提示在冠脉病变严重的患者，体内的炎症反应更加强烈，CRP的高表达可能与严重的冠脉病变相关。

我们对部分患儿在应用IVIG治疗后，再次测定上述指标变化。结果显示，无论是否并发冠状动脉病变，IVIG治疗后，HO-1的表达均明显增加，与治疗前相比，差异十分显著（$P<0.01$），而CAL组与NCAL组之间无统计学差异。同时，IVIG治疗后CRP均下降至正常水平，提示氧化应激与炎症反应可能存在一定的相互作用，提高抗氧化力可能有利于炎症的消除。本研究提示在川崎病急性期，当CRP增高至44 mg/L以上，同时伴HO-1表达明显增高（≥9 ng/mL）时，应警惕发生冠脉病变；但当CRP明显增高>85 mg/L，HO-1反而<9 ng/mL时，应警惕发生严重冠脉病变。究其原因，推测在KD冠脉病变的发病中，炎症反应与氧化应激可能通过丝裂原活化蛋白激酶（MAPKs）、Akt等信号通路相互影响[15]。一方面，适当的炎症反应可能激活氧化应激，诱导机体抗氧化作用反应性增高，对机体产生保护作用；另一方面，当炎症反应明显增强甚至失控时，反而会抑制机体抗氧化反应，如HO-1及其上游调控信号核因子相关因子2（Nrf2）的表达，而Nrf2/HO-1等通路的受抑，造成冠脉进一步严重损害。

本研究探讨HO-1在不同程度冠状动脉病变的川崎病患儿体内的表达变化，并通过对HO-1和CRP的

联合分析,可能对川崎病患儿是否发生冠脉病变及病变严重程度进行有效预测,进一步验证了氧化应激和炎症反应在川崎病冠状动脉病变中的相互作用。同时提示我们,通过提高机体抗氧化因子的表达,可能对于抑制过强的炎症反应具有潜在的临床应用前景。但本研究未对上述指标进行动态观察,存在一定的局限性,川崎病患儿尤其是合并巨大冠脉瘤者在随访中,应注意机体氧化水平的变化以及冠脉内皮细胞功能,预防发生冠脉狭窄、闭塞等严重威胁生命的并发症。

参考文献:

[1] Olafsdottir H S, Oskarsson G, Haraldsson A. Kawasaki disease in Iceland 1996-2005, epidemiology and complications [J]. Laeknabladid, 2012, 98(2): 91 - 95.

[2] Mandal S, Pande A, Mandal D, *et al*. Various coronary artery complications of Kawasaki disease: Series of 5 cases and review of literature[J]. J Cardiovasc Dis Res, 2012, 3(3): 231 - 235.

[3] Ponniah U. Coronary artery thrombus resulting in sudden cardiac death in an infant with Kawasaki disease and giant coronary artery aneurysms[J]. Ann Pediatr Cardiol, 2013, 6(2): 197 - 199.

[4] 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.

[5] Fukazawa R, Ogawa S. Long-term prognosis of patients with Kawasaki disease: at risk for future atherosclerosis? [J]. J Nippon Med Sch, 2009, 76(3): 124 - 133.

[6] Giacchi V, Sciacca P, Stella I, *et al*. Assessment of coronary artery intimal thickening in patients with a previous diagnosis of Kawasaki disease by using high resolution transthoracic echocardiography: our experience[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2014, 14:106.

[7] Cho H J, Yang S I, Kim K H, *et al*. Cardiovascular risk factors of early atherosclerosis in school-aged children after Kawasaki disease[J]. Korean J Pediatr, 2014, 57(5): 217 - 221.

[8] Straface E, Marchesi A, Gambardella L *et al*. Does oxidative stress play a critical role in cardiovascular complications of Kawasaki disease? [J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 17(10): 1441 - 1446.

[9] Tiwari S, Ndisang J F. Heme oxygenase system and hypertension: a comprehensive insight[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(9): 1354 - 1369.

[10] Zhao Y, Zhang L, Qiao Y, *et al*. Heme oxygenase-1 prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic mice by reducing inflammation, oxidative stress, apoptosis and enhancing autophagy[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75927.

[11] Araujo J A, Zhang M, Yin F. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis[J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 119.

[12] Donovan E L, McCord J M, Reuland D J, *et al*. Phytochemical activation of Nrf2 protects human coronary artery endothelial cells against an oxidative challenge[J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 2012: 132931.

[13] 段泓宇, 华益民, 王晓琴. 川崎病患儿并发冠状动脉损害的高危因素分析[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(7): 640 - 643.

[14] 白新凤, 田杰, 张静. 川崎病并发冠状动脉瘤预后研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2011, 26(10): 777 - 779.

[15] Bellezza I, Mierla A L, Minelli A. Nrf2 and NF-κB and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression[J]. Cancers (basel), 2010, 2(2): 483 - 497.

(**收稿**:2014-12-17;**修回**:2015-03-11)

(编辑 黄 超)