

# 川崎病并发冠脉损伤患儿血清活化 HUVECs NF- $\kappa$ B 促使 MMP-9 mRNA 水平上调的实验研究\*

刘丽莎, 李喆倩, 谈 诚, 于汉卿

(南京医科大学附属儿童医院检验科, 南京 210008)

**摘要:**目的 探讨脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)在川崎病(kawasaki disease, KD)并发冠状动脉损伤(coronary artery lesions, CALs)患儿血清作用下,核因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)对基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinases 9, MMP9)mRNA 转录的影响。方法 将 HUVECs 分为4组,分别为正常血清组(control组)、一般发热血清组(F组)、无冠脉损伤组(non-CALs组)和冠脉损伤组(CALs组)。免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, ChIP)检测 HUVECs 中 NF- $\kappa$ B p65 与 MMP-9 启动子结合情况,RT-PCR 检测 HUVECs MMP-9 mRNA 水平。结果 与对照组相比,经 KD 患儿,特别是并发 CALs 患儿血清作用后, HUVECs NF- $\kappa$ B p65 可直接结合在 MMP-9 启动子上,同时 MMP-9 mRNA 呈高表达。结论 HUVECs 在 KD 并发 CALs 患儿血清作用下, NF- $\kappa$ B p65 可直接结合在 MMP-9 启动子上促进其转录。

**关键词:**川崎病;冠状动脉损伤;核因子- $\kappa$ B;基质金属蛋白酶9

中图分类号:R725.5;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)01-131-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.034

## Experimental Study on the Up-Regulation of NF- $\kappa$ B and MMP-9 mRNA Level in HUVECs Stimulated by Serum from Children with Coronary Artery Lesions of Kawasaki Disease

LIU Li-sha, LI Zhe-qian, TAN Cheng, YU Han-qing (Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** Objective To investigate the relationship between nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$ B) and matrix metalloproteinase-9(MMP-9) mRNA in human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) stimulated by the serum from children with coronary artery lesions of Kawasaki disease (KD). **Methods** HUVECs were cultured and were divided into 4 groups: normal serum group, general fever group, Non-CALs group and CALs group. Co-Immunoprecipitation (ChIP) was used to detect the relationship between NF- $\kappa$ B and MMP-9, and RT-PCR was used to detect the mRNA level of MMP-9. **Results** Compared with control groups, NF- $\kappa$ B p65 could bind the promoter of MMP-9 in HUVECs cultured with 10% serum from KD patients with coronary artery lesions. The mRNA level of MMP-9 was also up-regulated. **Conclusion** NF- $\kappa$ B p65 can promote the transcription of MMP-9 in HUVECs induced by the serum from KD patients with coronary artery lesions.

**Keywords:** kawasaki disease; coronary artery lesions; nuclear factor-kappa B; matrix metalloproteinases 9

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岁以下儿童的急性自限性全身性血管炎性疾病,是婴幼儿后天性心脏病最主要的致病原因<sup>[1]</sup>,其发病率呈逐年升高趋势<sup>[2,3]</sup>。目前KD病因尚不明确,研究表明感染因素作用下炎症因子诱发的免疫系统功能紊乱与KD的发生发展密切相关<sup>[4,5]</sup>。先前实验发现, KD急性期患儿外周血单个核细胞中核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达上调<sup>[6]</sup>, KD并发冠脉损伤患儿血清能诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs NF- $\kappa$ B)的活化并可使MMP-9分

泌增加,而抑制NF- $\kappa$ B的活化可有效降低MMP-9的表达水平,表明NF- $\kappa$ B可通过上调MMP-9的表达在KD并发冠脉损伤中发挥了一定的作用<sup>[7]</sup>,但二者具体的机制尚未明确,本实验将继续蛋白水平之后,在转录翻译水平对NF- $\kappa$ B和MMP-9的关系进行深入探讨。

### 1 材料和方法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)株购自上海中乔新舟生物科技有限公司;NF- $\kappa$ B p65 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司;免疫共沉淀(ChIP)检测试剂盒购自美国 millipore 公司;引物设计由英骏生物完成。

\* 基金项目:南京市医学科技发展基金(YKK13131)。

作者简介:刘丽莎(1984—),女,硕士,主管技师,研究方向:川崎病病理损伤与信号转导, E-mail:58065421@qq.com。

1.2 血清制备 36例在本院确诊为KD的患儿,其中21例未并发CALs,15例并发CALs;19例急性上呼吸道感染患儿以及20例在保健科体检的健康儿童,各组年龄、性别差异无统计学意义( $P < 0.05$ )。分别采集以上各组儿童静脉血3 ml,分离血清,冻存待用。

1.3 细胞培养 取传代培养的HUVECs分为4组:正常血清组(Control组)、发热血清组(F组)、无冠状动脉损伤组(non-CALs组)和冠状动脉损伤组(CALs组),分别用含10 ml/dl正常血清、10 ml/dl急性发热患儿血清、10 ml/dl无冠状动脉损伤KD患儿血清和10 ml/dl并发冠脉损伤KD患儿血清的RPMI1640完全培养液培养24 h。

1.4 ChIP实验 取上述各组处理后的细胞,按说明书进行操作,大致操作步骤为超声裂解DNA-NF- $\kappa$ B p65抗体进行免疫共沉淀,形成Protein A agarose/antibody/histone复合物-软件筛选的MMP9启动子引物进行PCR扩增分析,引物序列为:3' CACTTCAAAGTGGTAAGA5';5' GAAAGTGATGGAAGACTCC3'。

1.5 MMP-9 mRNA水平测定 抽提各处理组HUVECs总RNA,RT-PCR法测定MMP-9 mRNA水平,引物序列为:MMP-9(sense 5'-CCT GGA GAC CTG AGA ACC AAT CT-3', anti-sense 5'-CCA CCC GAG TGT AAC CAT AGC-3');GAPDH(sense 5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG CA-3', antisense 5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3')。

## 2 结果

2.1 ChIP 与对照组相比,Non-CALs组和CALs组细胞处理后,用NF- $\kappa$ B p65抗体沉淀下来的DNA片段可用预先设计的针对MMP-9启动子上特定片段的引物扩增出片段,说明在KD患儿血清作用下,HUVECs中NF- $\kappa$ B可以直接结合在MMP-9启动子上,见图1。

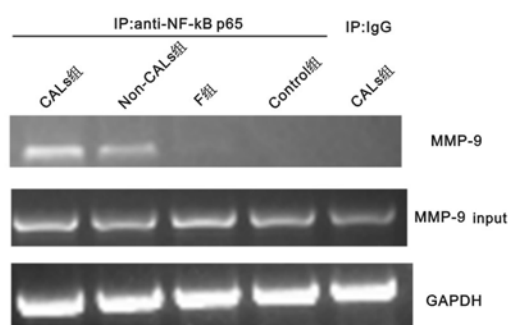


图1 各组HUVECs NF- $\kappa$ B p65与MMP-9结合情况

2.2 RT-PCR 与对照组相比,CALs组和non-CALs组HUVECs MMP-9 mRNA水平上调,说明NF- $\kappa$ B结合在MMP-9启动子上促进了其转录,见图2。

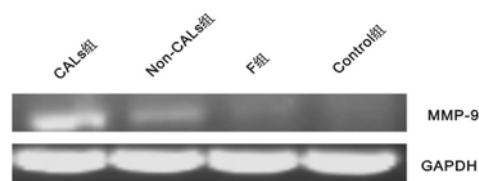


图2 各组MMP-9 mRNA水平

3 讨论 KD是婴幼儿常见的以全身血管炎为主要病变的病因未明的免疫相关性炎症疾病,特征为广泛的中小血管炎症,以心血管系统的损害最为严重,其发病机制尚未明确,血管内皮细胞的损伤与功能障碍是血管炎发生的始动环节,多种信号通路涉及其中<sup>[8~10]</sup>。

本课题组前期研究从蛋白水平研究了HUVECs在KD急性期和并发CALs患儿血清作用下NF- $\kappa$ B和MMP-9的表达情况<sup>[6,7]</sup>。本实验对使用KD并发CALs患儿血清处理HUVECs后,NF- $\kappa$ B p65和MMP-9表达量上调进行了更为深入地研究,结果显示在血清作用下,NF- $\kappa$ B可直接结合在MMP-9启动子上促进其转录水平的增加,对之前实验结果进行了验证,表明在始发因素的作用下,NF- $\kappa$ B/MMP-9表达上调在KD并发CALs患儿血清诱导的HUVECs病变中发挥作用。这为进一步研究涉及的上下游信号通路奠定了基础,也为临床寻求KD并发CALs新的诊断标记和药物治疗靶点提供了理论基础。

## 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 Wiek Rozwoj, 2010, 14(4): 344-349.
- [2] 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): 3249-3251.  
Tan C, Yin SY, Li ZQ, et al. Epidemiological study of children with kawasaki-disease in Nanjing of Jiangsu Province from 2012 to 2014[J]. Chin J Prim Med Pharm, 2015, 22(21): 3249-3251.
- [3] Sano T, Makino N, Aoyama Y, et al. Temporal and geographical clustering of Kawasaki disease in Japan: 2007~2012[J]. Pediatr Int, 2016, 58(11): 1140-1145.
- [4] Hara T, Nakashima Y, Sakai Y. Kawasaki disease: a matter of innate immunity[J]. Clin Exp Immunol, 2016, 186(2): 134-142.

(下转 136 页)

- [5] Dimitriadis VR, Brown AG, Gedalia A. Kawasaki disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management[J]. Curr Rheumatol Rep, 2014, 16(6): 423.
- [6] 刘丽莎, 朱纯亮, 韩 勃, 等. 川崎病患儿血清活化 HUVECs NF- $\kappa$ B 并促进 MMP-9 分泌[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(1): 99-100.  
Liu LS, Zhu CL, Han Q, et al. Serum activation of HUVECs NF- $\kappa$ B and MMP-9 secretion in children with kawasaki-disease[J]. Basic & Clinical Medicine, 2015, 35(1): 99-100.
- [7] 朱纯亮, 韩 勃, 韩晶晶, 等. 川崎病合并冠状动脉损伤患儿血清对脐静脉内皮细胞 NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 表达的影响[J]. 江苏医药, 2015, 41(20): 2407-2409.  
Zhu CL Han Q, Han JJ, et al. Effect of serum from kawasaki disease children with coronary artery lesions on expressions of NF- $\kappa$ B and matrix metalloproteinase-9 in human umbilical with endothelial cells[J]. Jiangsu Med J, 2015, 41(20): 2407-2409.
- [8] Lee Y, Wakita D, Dagvadorj J, et al. IL-1 signaling is critically required in stromal cells in kawasaki disease vasculitis mouse model: role of both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(12): 2605-2616.
- [9] 靳剑芸, 李启亮, 宋文琪. 血浆血栓弹力图与抗凝血酶Ⅲ检测对儿童川崎病诊断的应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2): 130-132.  
Jin JY, Li QL, Song WQ. Correlation discussion of blood plasma thromboelastography values and antithrombin Ⅲ level in children's kawasaki disease[J]. J Med Lab Med, 2017, 32(2): 130-132.
- [10] 马 乐, 杜忠东. 川崎病血管内皮细胞损伤机制的研究进展[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(2): 158-160.  
Ma L, Du ZD. Advances in the mechanism of vascular endothelial cell injury in kawasaki disease[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2016, 54(2): 158-160.

收稿日期: 2017-11-26

修回日期: 2017-12-24