

卵泡抑素样蛋白-1 在川崎病诊断及冠状动脉损害中的作用*

陈艳玲¹, 李小琳¹, 张 莉¹, 彭建明², 官燕飞², 袁 斌², 黄绍芬² (南方医科大学附属中山市博爱医院: 1. 儿科; 2. 检验科, 广东中山 528403)

【摘要】 目的 探讨卵泡抑素样蛋白-1(FSTL-1)水平与川崎病及冠状动脉损害的关联。**方法** 选择 48 例川崎病患者为川崎病组, 根据有无并发冠状动脉损害, 分为川崎病并发冠状动脉损害组(4 例)和无并发冠状动脉损害组(44 例)。选择同期 20 例健康儿童作为健康对照组, 采用酶联免疫吸附试验检测各组血清中的 FSTL-1 水平。**结果** 与健康对照组相比, 川崎病患者血清 FSTL-1 水平明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 并发冠状动脉损伤的患者其 FSTL-1 水平明显高于无冠状动脉损害的患者, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** FSTL-1 水平与川崎病存在一定的相关性, 有助于川崎病相关冠状动脉损害诊断的可能。

【关键词】 川崎病; 卵泡抑素样蛋白-1; 冠状动脉损害

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 02. 012 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)02-0179-02

Role of follistatin-like protein-1 in Kawasaki disease diagnosis and its coronary arterial injury* CHEN Yan-ling¹, LI Xiao-lin¹, ZHAN Li¹, PENG Jian-ming², GUAN Yan-fei², YUAN Bin², HUANG Shao-fen² (1. Department of Pediatrics; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Zhongshan Boai Hospital of Southern Medical University, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between serum levels of follistatin-like protein-1 (FSTL-1) with Kawasaki disease (KD) and its coronary arterial injury. **Methods** 48 patients with KD were selected as the KD group and divided into the KD disease complicating coronary arterial injury group (4 cases) and the KD disease without complicating coronary arterial injury group (44 cases). Contemporaneous 20 healthy children were selected as the control group. Serum FSTL-1 levels were measured by ELISA in each group. **Results** Serum FSTL-1 level in the KD patients was elevated as compared with the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Serum FSTL-1 level in the KD patients complicating coronary arterial injury was significantly higher than that in the KD patients without complicating coronary arterial injury, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** There is certain correlation between serum FSTL-1 level with KD, which has possibility for the application in diagnosing KD related coronary arterial injury.

【Key words】 Kawasaki disease; follistatin-like protein-1; coronary arterial injury

川崎病又名皮肤黏膜淋巴结综合征, 是一种以全身性血管炎为主要病变的小儿急性发热性疾病, 具体病因未明, 可能与多种病毒、细菌、立克次体、支原体等感染所致免疫异常有关^[1]。川崎病是导致儿童冠状动脉损害的主要病因^[2]。该病患者的冠状动脉损害的发生率随着静脉注射丙种球蛋白的应用而下降, 但是仍然有 5% 经治疗的患者及 25% 未经治疗的患者发生冠状动脉瘤并发症^[3-4]。目前对于川崎病及其心血管并发症缺乏特异性的实验室诊断指标, 对于川崎病冠状动脉损害的诊断主要还是采用心脏 B 超和心电图检查方法。本课题拟研究卵泡抑素样蛋白-1(FSTL-1)水平与川崎病及其冠状动脉损害发生、发展的相关性, 并探讨其在川崎病并发冠状动脉损害中的诊断作用。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 5 月至 2014 年 12 月于本院住院及门诊治疗的川崎病儿童 48 例为川崎病组, 其中男 29 例, 女 19 例; 年龄 5 个月至 8 岁, 平均 (3.2 ± 1.8) 岁; 小于 1 岁者 16 例 (33.3%), 1~3 岁者 23 例 (47.9%), 大于 3 岁者 9 例 (18.8%)。诊断标准参照日本川崎病研究班推荐的诊断标准

(第 5 版)^[5]。对川崎病组患者进行了超声心动图检查, 根据有无冠状动脉损害分为川崎病并发冠状动脉损害组(4 例)和无并发冠状动脉损害组(44 例)2 个亚组。冠状动脉损害的诊断标准为: 当年龄 <5 岁时, 冠状动脉直径 ≥ 3 mm 或年龄 >5 岁时, 冠状动脉 ≥ 4 mm^[6]。选择同期于本院儿保科进行常规体检的健康儿童 20 例为健康对照组, 其中男 12 例, 女 8 例; 年龄 7 个月至 8 岁, 平均 (3.3 ± 1.6) 岁。两组的年龄、性别等一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 方法 收集所有研究对象进行常规检验后的剩余血清, -20 °C 冻存储用。血清 FSTL-1 的检测采用武汉 Elabscience 公司生产的人 FSTL-1 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒, 采用双抗体夹心法, 用抗人 FSTL-1 抗体包被酶标板, 试验时标本中的 FSTL-1 会与包被抗体结合, 未结合的成分被洗去。依次加入生物素化的抗人 FSTL-1 抗体和辣根过氧化物酶标记的亲合素。抗人 FSTL-1 抗体与结合在包被抗体上的人 FSTL-1 结合、生物素与亲合素特异性结合而形成免疫复合物, 游离成分被洗去。加入显色底物 TMB, TMB 在辣根过氧化物酶的催化下显蓝色, 加终止液后变为黄色。用酶标仪在 450

* 基金项目: 广东省中山市科技计划项目 (2014A1FC011)。

作者简介: 陈艳玲, 女, 本科, 副主任医师, 主要研究方向为小儿内分泌代谢及免疫疾病。

nm 处测定 OD 值, FSTL-1 浓度与 OD 值之间呈正比, 通过绘制标准曲线计算出样品中 FSTL-1 浓度。灵敏度为最小可检测 0.19 ng/mL, 检测范围为 0.31~20.00 ng/mL。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 川崎病组与健康对照组血清 FSTL-1 水平比较 川崎病组患儿血清 FSTL-1 水平为 (4.62 ± 1.35) ng/mL, 明显高于健康对照组的 (3.77 ± 2.03) ng/mL, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 川崎病并发冠状动脉损害组与无并发冠状动脉损害组血清 FSTL-1 水平比较 川崎病并发冠状动脉损害组患儿血清 FSTL-1 水平为 (5.07 ± 2.34) ng/mL, 明显高于无并发冠状动脉损害患儿的 (4.38 ± 2.17) ng/mL, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

FSTL-1 是一种含有 308 个氨基酸的细胞外分泌性酸性糖蛋白, 在哺乳类动物中高度保守, 由间质细胞(包括心肌细胞)分泌^[7]。最近的一系列研究表明 FSTL-1 在炎症及心血管疾病的发生、发展中具有重要作用。在类风湿关节炎患者的滑膜组织中发现 FSTL-1 的高表达^[8]。转染 FSTL-1 到巨噬细胞中导致炎症前细胞因子的上调, 被证实有保护心肌细胞、抗凋亡的功能^[9]。FSTL-1 在冠脉综合征患者的血清中增高, 与急性冠脉综合征的危险分层密切相关, 认为其有可能成为评估早期急性冠状动脉综合征病变严重程度的生物标志物^[10-11]。国内张芑^[12]的研究显示, FSTL-1 水平与左心室重构程度呈独立、明显的相关, 为血清 FSTL-1 作为心血管疾病血清标记物应用于临床提供了病理生理基础。由于川崎病是一种与炎症有关的病变且可能导致心血管方面的并发症, 故推测 FSTL-1 可能与川崎病及其冠状动脉损害的发生、发展相关。

川崎病缺乏特异性的诊断试验和特异性的临床病理学特征, 其诊断有赖于临床诊断标准的判定, 在临床诊断条件不足时要借助辅助检查, 如影像学、实验室检查及心电图等。在实验室检查方面, 血小板、红细胞沉降率及 C 反应蛋白是常用的指标, 还有血清清蛋白、转氨酶及白细胞计数等也常用于川崎病的辅助诊断。最近有研究发现, 在川崎病急性期时心磷脂抗体明显升高^[13]。另有研究发现, 川崎病患儿 N 端脑钠肽前体(NT-ProBNP)明显升高^[14]。所有上述实验室指标, 对于川崎病来说, 均是非特异性的实验室指标。川崎病的诊断, 特别是早期诊断, 目前特别需要一种特异性及敏感性均较高的实验室指标。

本研究结果显示, 川崎病患者血清 FSTL-1 水平明显升高, 并发冠状动脉损害的患者其 FSTL-1 水平又高于没有冠状动脉损害的患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 FSTL-1 与川崎病存在一定的相关性, 有助于川崎病相关冠状动脉损害诊断的可能。但本研究的一些缺陷可能对研究结论造成一定的影响。首先是对川崎病患者进行分期, 在川崎病发病的急性期及治疗后不同时期, FSTL-1 的浓度可能存在差异。病例太少也影响结果的分析, 如不太好进行 ROC 曲线分析。研究所采用试剂采购自国内的科研试剂供应商, 其质量好坏也会对研究结果造成一定的影响。

FSTL-1 水平与川崎病冠状动脉损害的相关性机制还未完全明了, 有可能是影响了内皮细胞一氧化氮合成酶的表达。

在小鼠动脉瘤模型中发现一氧化氮合成酶与动脉瘤的形成有关。一氧化氮合成酶基因敲除小鼠与野生型小鼠相比, 其动脉瘤的形成明显降低^[15], 提示一氧化氮合成酶的活性可促进动脉瘤的形成。对川崎病患者的冠状动脉瘤组织进行免疫组化检查发现内皮细胞上一氧化氮合成酶的表达降低^[16]。而最近研究显示, FSTL-1 水平在肌肉中的生成增加及在血清中的浓度增高可以促进野生小鼠缺血肢体的血运重建, 促进内皮细胞分化和转移及启动一氧化氮合成酶的活化和磷酸化^[17], 而在一氧化氮合成酶缺陷的小鼠中, FSTL-1 的生成增加并不导致血管重建。以上研究显示川崎病患者 FSTL-1 表达的增高可能促进冠状动脉瘤的形成。

尽管存在上述不足, 但本研究显示, FSTL-1 水平与川崎病存在一定的相关性, 有助于川崎病相关冠状动脉损害诊断的可能。进一步研究可以从收集更多病例, 进行 ROC 曲线分析, 提高 FSTL-1 检测的灵敏度及特异性入手。

参考文献

- [1] 张晓梅, 孙景辉. 川崎病诊治进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(1): 52-55.
- [2] Taubert KA. Nationwidesurvey of Kawasaki disease and acuterheumatic fever[J]. J Pediatr, 1991, 119(2): 279-282.
- [3] Burns JC, Glode MP. Kawasaki syndrome[J]. Lancet, 2004, 364(9433): 533-544.
- [4] Terai M, Shulman ST. Prevalence of coronary artery abnormalities in Kawasaki disease is highlydependent on gamma globulin dose but independent of salicylate dose[J]. J Pediatr, 1997, 131(6): 888-893.
- [5] 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.
- [6] Akagi T, Rose V, Benson LN, et al. Outcome of coronary artery aneurysms after Kawasaki disease[J]. J Pediatr, 1992, 121(5): 689-694.
- [7] Shibamura M, Mashimo J, Mita A, et al. Cloning from a mouse osteoblastic cell lineof a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide[J]. Eur J Biochem, 1993, 217(1): 13-19.
- [8] Clutter SD, Wilson DC, Marinov AD, et al. Follistatin-like protein-1 promotes arthritis by upregulating IFN-gamma[J]. J Immunol, 2009, 182(1): 234-239.
- [9] Miyamae T, Marinov AD, Sowders D, et al. Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule[J]. J Immunol, 2006, 177(7): 4758-4762.
- [10] Widera C, Horn-Wichmann R, Kempf T, et al. Circulating concentrations of follistatin-like-1 in healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by an immunoluminometric sandwich assay[J]. Clin Chem, 2009, 55(10): 1794-1800.
- [11] 李艳, 张斐斐, 邱春光, 等. 急性冠脉综合征患者血清卵泡抑素样蛋白-1 与病变严重程度的关系[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2013, 48(5): 678-680.
- [12] 张芑. 人血清卵泡抑素样蛋白-1 与器质(下转第 183 页)

现。目前有关糖尿病足湿性坏疽感染的病原菌分布及耐药性分析,国内的报告不多。本研究着重分析糖尿病足湿性坏疽分泌物培养出的多重耐药菌的分布特点及耐药情况。

本研究结果显示,多重耐药的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌均为产 ESBLs 菌株,其耐药机制可能与其产生的各种灭活酶或钝化酶有关,使其对青霉素类、头孢菌素类、喹诺酮类、氨基糖苷类抗菌药物表现出多重耐药性。由于碳青霉烯类抗菌药物能够稳定水解 ESBLs,故耐药率较低,成为治疗的最有效药物。本研究也发现多重耐药的大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物仍能保持 100.00% 的敏感率。近年来,由于第 3 代头孢菌素在临床上的广泛使用及不合理应用,导致多重耐药的大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌感染率呈逐年上升趋势^[6]。鲍曼溶血不动杆菌为临床常见院内感染菌,本研究中多重耐药的鲍曼溶血不动杆菌分离率居第 2 位,并出现多例泛耐药菌株,且其对临床常用药物耐药率普遍较高。鲍曼溶血不动杆菌的高耐药性与其复杂的耐药机制有关^[7-8],多重耐药的鲍曼溶血不动杆菌对氨基糖苷类和 β -内酰胺类抗菌药物的耐药性与氨基糖苷类修饰酶和 β -内酰胺酶的表达有关;多重耐药的鲍曼溶血不动杆菌的膜孔蛋白 OprD 和 CarO 与敏感菌株 SDF 相比,氨基酸存在突变,并引起孔蛋白结构发生改变,可能导致其耐药性的产生;多重耐药的鲍曼溶血不动杆菌 adeABC 外排泵系统的 adeB 基因发生突变,导致了菌株对多种药物耐药^[9]。

本研究共发现多重耐药铜绿假单胞菌 40 株,对 β -内酰胺酶抑制剂的抗菌药物及头孢吡肟、头孢他啶较敏感。有调查显示亚胺培南、喹诺酮类可诱导铜绿假单胞菌体内主动外排系统高表达,使其达不到有效药物浓度而失去抗菌活性,极易产生耐药。而本研究发现铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药率为 47.50%,对环丙沙星耐药率为 52.50%,对左氧氟沙星耐药率为 62.50%。基于其特殊耐药机制,临床应慎用亚胺培南以防耐药菌出现^[9]。

本研究结果显示,分离的多重耐药凝固酶阴性葡萄球菌及金黄色葡萄球菌均为耐甲氧西林阳性菌株,这些菌株对 β -内酰胺类、 β -内酰胺类酶抑制剂、大环内酯类、林可酰胺类及氟喹诺酮类抗菌药物均表现出高耐药性,其耐药率均在 85.00% 以上,但对万古霉素、利奈唑胺、达托霉素及辛内吉高度敏感,未发现耐药菌株,与黄德斌等^[10]研究结果一致,不同之处在于,本研究金黄色葡萄球菌多重耐药率偏低,这可能与本文选取患者较多有关,更具有代表性。多重耐药的肠球菌属细菌中,未发现耐万古霉素菌株,这些肠球菌对临床常用抗菌药物也均表现出高耐药性,对利奈唑胺及辛内吉未发现耐药菌株。

糖尿病足湿性坏疽感染的预后与感染程度具有一定相关性,上述耐药菌的出现,提示临床医师应严格把握抗菌药物的

适应证,杜绝滥用和滥用,防止因诱导突变而产生大量耐药菌株、甚至超级细菌。临床上治疗糖尿病足湿性坏疽应注意致病菌的变化及感染程度,及时取感染足分泌物进行常规细菌培养和药敏试验,根据药敏结果合理选择有效抗菌药物,减少抗菌药物的耐药性,以降低截肢率及减轻患者经济负担,提高治愈率。

参考文献

- [1] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013, 103(2): 137-149.
- [2] Prompers L, Huijberts M, Schaper N, et al. Resource utilization and costs associated with the treatment of diabetic foot ulcers. Prospective data from the Eurodiale Study [J]. *Diabetologia*, 2008, 51(10): 1826-1834.
- [3] 陈丽丹, 石玉玲, 曾兰兰. 需氧菌与厌氧菌混合感染致糖尿病足一例病原学检测[J]. *中国全科医学*, 2010, 13(2): 544.
- [4] Sueki H, Furukawa N, Higo N, et al. Association of verrucous skin lesions and skin ulcers on the feet in patients with diabetic neuropathy[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2004, 29(3): 247-253.
- [5] Kandemir O, Akbay E, Sahin E, et al. Risk factors for infection of the diabetic foot with multi-antibiotic resistant microorganisms[J]. *J Infect*, 2007, 54(5): 439-445.
- [6] 李惠琴, 苏晓飞, 丁波, 等. 218 例糖尿病足患者临床特征及高危因素分析[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28(6): 492-495.
- [7] 于沁, 刘嘉琳, 谭若铭, 等. 瑞金医院重症监护病房和烧伤病房鲍曼不动杆菌的流行病学监测和分析[J]. *诊断学理论与实践*, 2009, 8(5): 487-491.
- [8] 赵建平, 周秀岚. 多重耐药铜绿假单胞菌判定方法探讨[J]. *中国医药*, 2012, 7(12): 1603-1605.
- [9] 移小峰, 高建瓴, 詹英. 重症监护室多重耐药鲍曼不动杆菌感染的危险因素分析[J]. *中国医药*, 2012, 7(12): 1600-1602.
- [10] 黄德斌, 李晓行, 邵芬, 等. 糖尿病足发生多重耐药菌感染的危险因素分析[J]. *中国全科医学*, 2012, 15(14): 1689-1692.

(收稿日期: 2015-08-07 修回日期: 2015-09-13)

(上接第 180 页)

性心脏病左心室重构程度的相关性研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2010, 29(3): 169-173.

- [13] Gupta M, Johann-Liang R, Bussell JB, et al. Elevated IgA and IgM anti-cardiolipin antibodies in acute Kawasaki disease[J]. *Cardiology*, 2002, 97(4): 180-182.
- [14] McNeal-Davidson A, Fournier A, Spigelblatt L, et al. Value of amino-terminal pro B-natriuretic peptide in diagnosing Kawasaki disease[J]. *Pediatr Int*, 2012, 54(5): 627-633.
- [15] Pimiento JM, Maloney SP, Tang PC, et al. Endothelial nitric oxide synthase stimulates aneurysm growth in aged

mice[J]. *J Vasc Res*, 2008, 45(3): 251-258.

- [16] Fukazawa R, Ikegami E, Watanabe M, et al. Coronary artery aneurysm induced by Kawasaki disease in children show features typical senescence[J]. *Circ J*, 2007, 71(5): 709-715.
- [17] Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, et al. Follistatin-like-1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(47): 32802-32811.

(收稿日期: 2015-03-06 修回日期: 2015-08-10)