

虾青素对 Ang II 诱导的心脏成纤维细胞 胶原蛋白合成的影响

陈素琴 黎明江 吴 限 张文艳

摘 要 **目的** 探讨虾青素对血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导的心脏成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs) 胶原蛋白合成的影响。**方法** 体外培养 SD 乳鼠的 CFs, 分为 5 组, 分别为对照组、Ang II 组、Ang II + 虾青素低剂量组 (20 $\mu\text{mol/L}$)、Ang II + 虾青素中剂量组 (40 $\mu\text{mol/L}$)、Ang II 组 + 虾青素高剂量组 (80 $\mu\text{mol/L}$), 干预 24h 后, 采用 Western blot 法检测 I 型胶原蛋白的含量, RT-PCR 检测 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的含量, 活细胞计数试剂盒 (CCK8) 测定 CFs 增殖情况。**结果** Ang II 可以使 I 型胶原蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白表达上升 ($P < 0.05$), CFs 增殖增加, 不同浓度的虾青素均可以抑制这种作用 ($P < 0.05$)。**结论** 在一定的浓度范围内, 虾青素可抑制心脏成纤维细胞胶原蛋白的合成, 抑制心脏成纤维细胞的增殖。

关键词 虾青素 心脏成纤维细胞 心肌纤维化 I 型胶原蛋白

中图分类号 R542.2 + 3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.02.010

Effects of Astaxanthin on the Collagen Expression of Cardiac Fibroblasts Induced by Angiotensin II. Chen Suqin, Li Mingjiang, Wu Xian, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of astaxanthin on the collagen expression in cardiac fibroblasts induced by Angiotensin II (Ang II). **Methods** We cultured cardiac fibroblasts (CFs) of neonatal Sprague-Dawley (SD) rats in vitro. The CFs were divided into five groups which were control group cultured without Ang II or astaxanthin, Ang II group cultured with Ang II and astaxanthin groups cultured with Ang II and astaxanthin 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$, respectively. After 24 hours of cultivation, the level of collagen I was detected by Western blotting, the expression of the α -smooth muscle actin (α -SMA) was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the proliferation of CFs was measured by CCK8 kit. **Results** The expression of collagen I and α -SMA were increased induced by Ang II ($P < 0.05$), and the proliferation of CFs was also enhanced by Ang II, but astaxanthin reversed these effects during co-treating with Ang II ($P < 0.05$). **Conclusion** Within a range of given concentrations, astaxanthin can reduce the expression of collagen I and α -SMA, and inhibit the proliferation of CFs, which indicate that astaxanthin can inhibit cardiac fibrosis.

Key words Astaxanthin; Cardiac fibroblast; Cardiac fibrosis; Collagen I

心血管疾病是发展中国家居民死亡的主要原因之一^[1]。心肌重构是多种慢性心血管疾病的终末期表现。而心脏纤维化是心肌重构的重要组成部分。心脏纤维化主要表现为心脏成纤维细胞过度增殖, 转化为肌成纤维细胞, 胶原蛋白合成增多, 降解失衡, 心肌外基质过度沉积, 最终导致心脏的舒缩功能障碍, 出现心力衰竭等^[2]。血管紧张素 II 是强致心脏纤维化的因子, 可以促进心脏成纤维细胞的增殖, 转化以及迁移^[3]。

虾青素是一种类胡萝卜素, 化学名称是 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β,β -胡萝卜素, 主要存在于虾、蟹、鲑鱼、藻类、酵母等海洋生物中^[4]。虾青素有抗炎、抗氧化、抗缺血再灌注损伤^[5-10]等作用。而且, 虾青素对心血管系统也有保护作用^[11]。但是, 虾青素是否有抗心脏纤维化作用, 研究较少。本实验旨在探讨虾青素对心脏成纤维细胞胶原蛋白合成是否有影响。

材料与方法

1. 实验动物: SD 乳鼠 (1~3 天), 雌雄不限, 由湖北省疾病预防控制中心提供, SPF 级。

2. 主要试剂: 虾青素 (纯度 > 90%), 购自上海源叶生物科技有限公司, 血管紧张素 II 购自美国 Sigma 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 波形蛋白 (vim-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81170085)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院心内科, 武汉大学心血管病研究所, 心血管病湖北省重点实验室

通讯作者: 黎明江, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 电子邮箱: 754851539@qq.com

entin)一抗购自武汉博士德生物工程有限公司,荧光(FITC)标记羊抗小鼠二抗购自武汉博士德生物工程有限公司,Trizol 试剂购自美国 Aidlab 公司,DAPI 购自碧云天公司。

3. 主要仪器:超净台;光学显微镜;免疫荧光显微镜;CO₂ 培养箱;离心机;实时荧光定量 PCR 仪。

4. 心脏成纤维细胞的分离及培养:取出生 1~3 天的 SD 乳鼠,在无菌条件下取其心室部分,将其剪成 1mm³ 的组织块,先用不含 EDTA 的胰蛋白酶(0.125%)消化 10min,弃去上清,再用混合酶(0.125%胰蛋白酶,0.08%胶原酶 II)消化,每 5min 收集一次细胞,共消化 8 次,将所得的细胞悬液离心(1000r/min,5min),离心后弃去上清,将余下的细胞重悬,转移至盛有培养基(含胎牛血清的 10%,青霉素链霉素双抗 1%)的培养皿中,在 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 90min(差速贴壁法分离成纤维细胞),弃去未贴壁细胞,所得贴壁细胞绝大部分为成纤维细胞,继续培养待细胞生长接近汇合时,用 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶消化,以 1:2 传代,选用第 2~4 代细胞用于实验。

5. 心脏成纤维细胞的鉴定:取第 2 代心脏成纤维细胞,接种于 35mm 皿中,待细胞生长到合适密度时,4%多聚甲醛固定细胞 15min。用含 0.5% Triton X-100 的 PBS(PBST)溶液室温通透 20min,再用正常山羊血清室温封闭 30min,加入 vimentin 一抗(1:100)并放入湿盒,4℃ 孵育过夜。第 2 天加入荧光(FITC)标记羊抗小鼠二抗,湿盒中 20~37℃ 孵育 1h,滴加 DAPI 避光孵育 5min,对标本进行染核,PBST 洗后用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,在荧光显微镜下观察并拍照。

6. 最佳诱导纤维化的血管紧张素 II 浓度测定:选取第 2~4 代的心脏成纤维细胞,分为 4 组,待细胞生长到 30%~50% 时,用含 1% 胎牛血清的培养基饥饿细胞 8~12h,再分别加入不同浓度的血管紧张素 II(0、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L),24h 后测定 I 型胶原蛋白的表达水平,从而选择出诱导纤维化最佳的血管紧张素 II 的浓度。

7. 实验分组和给药:选取第 2~4 代的心脏成纤维细胞,待细胞生长到 30%~50% 时,用含 1% 胎牛血清的培养基饥饿细胞 8~12h,分为 5 组,分别为对照组、Ang II 组、Ang II + 虾青素低剂量组(20μmol/L)、Ang II + 虾青素中剂量组(40μmol/L)、Ang II + 虾青素高剂量组(80μmol/L),干预 24h,观察相应指

标的变化情况。

8. 实时荧光定量 PCR 检测:采用实时荧光定量 PCR 检测不同浓度的 Ang II 诱导的心脏成纤维细胞 I 型胶原蛋白 mRNA 的表达水平,测定不同浓度的虾青素处理后 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的含量变化。各组细胞干预 24h 后,分别加入 1ml 的 Trizol 试剂,裂解细胞,提取总的 RNA,测定样本 RNA 的浓度和纯度,使用反转录酶将 RNA 转录为 cDNA。以 β-actin 为内参,采用 20μl 体系进行 PCR 扩增。引物序列为:上游引物:5'-CACGATGGAGGGGCCG-GACTCATC-3',下游引物:5'-TAAAGACCTCTAT-GCCAACACAGT-3',大小为 240bp;I 型胶原蛋白序列为:上游引物:5'-TGACTGGAAGAGCG-GAGAGT-3',下游引物:5'-GAATCCATCGGTCAT-GCTCT-3',大小为 202bp;α-SMA 序列为:上游引物:5'-CACCATCGGGAATGAACGCT-3',下游引物:5'-CTGTCAGCAATGCCTGGGTAC-3',大小为 192bp。

9. Western blot 法检测:检测不同浓度的虾青素处理后 I 型胶原蛋白水平的变化。各组细胞干预 24h 后,分别加入裂解液裂解细胞,4℃ 13000 × g 离心 5min,收集上清,用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。按计算好的蛋白浓度,每组取 40μg 的样品进行上样,按浓缩胶 80V、分离胶 120V 进行恒压电泳分离,电泳结束后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,转好的膜加入封闭液室温封闭 1h,去除封闭液,加入已稀释好的 I 型胶原蛋白(collagen I)一抗,4℃ 过夜,次日加羊抗小鼠二抗,孵育 30min,摇床、暗室中曝光、显影、定影,AlphaEaseFC 软件处理系统分析目标带的光密度值。

10. CCK8 法测定 CFs 细胞的增殖:采用 CCK8 试剂盒测定不同浓度虾青素处理后 CFs 的增殖水平。将第 2 代的 CFs 转移到 96 孔板中,5 × 10⁴ 个/孔,待细胞贴壁后,用含 1% 血清的培养基培养 12h,按分组加入药物,在培养箱中培养 24h 后,每孔加入 10μl CCK8 试剂,继续在培养箱中孵育 3h 后,用酶标仪测定 450nm 处的吸光值(A 值)。每组设 3 个复孔。

11. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析方法,组间多重比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 心脏成纤维细胞鉴定:光学显微镜下观察心脏

成纤维细胞 (CFs) 的形态, 贴壁 90min 的原代心脏成纤维细胞较小, 呈圆形、椭圆形或梭形 (图 1D), 随着时间的推移, 细胞渐渐变长, 变扁, 48h 细胞呈长梭形, 胞体大, 细胞核清晰, 胞质透明 (图 1F)。在荧光显微镜下

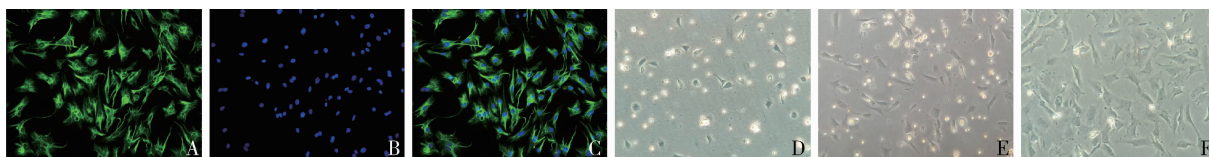


图 1 荧光显微镜下及光镜下 CFs 鉴定 ($\times 200$)

A. vimentin 蛋白阳性; B. DAPI 染细胞核; C. A + B; D. 原代 CFs 贴壁 90min; E. 原代 CFs 贴壁 12h; F. 原代 CFs 贴壁 48h

2. 最佳诱导纤维化的 Ang II 浓度: 实时荧光定量 PCR 检测 I 型胶原蛋白 mRNA 的表达水平 结果显示, 与对照组比较, 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 浓度的血管紧张素 II 均能使 I 型胶原蛋白 mRNA 的表达水平升高, 其中, 10^{-7} mol/L 的血管紧张素 II 组 I 型胶原蛋白 mRNA 的表达水平最高 (图 2)。

3. 虾青素对心脏成纤维细胞 I 型胶原蛋白表达的影响: 血管紧张素 II 选用 10^{-7} mol/L 的浓度, 按照分组和给药方法进行分组及给药。Western blot 法检测各组 I 型胶原蛋白的表达。与对照组比较, Ang II 组 I 型胶原蛋白水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各虾青素组与 Ang II 组比较, I 型胶原蛋白表达水平均有下降, 其中 $80 \mu\text{mol/L}$ 的虾青素组下降最明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

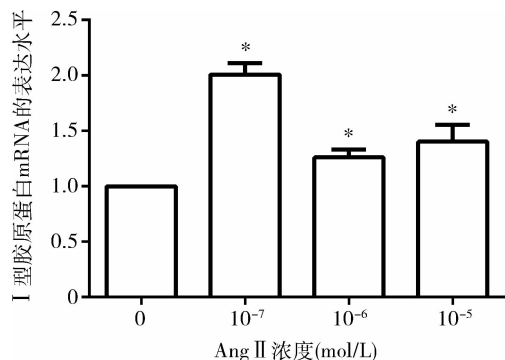


图 2 不同浓度 Ang II 作用于 CFs 24h 后 I 型胶原蛋白 mRNA 的表达水平
与 0mol/L 比较, * $P < 0.05$

4. 虾青素对心脏成纤维细胞 α -SMA mRNA 表达的影响: PCR 检测各组 α -SMA mRNA 的表达水平。与对照组比较, Ang II 组 α -SMA mRNA 表达水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各虾青素组与 Ang II 组比较, α -SMA mRNA 表达水平均有

观察, 心脏成纤维细胞 vimentin (波形蛋白) 表达呈阳性反应 (图 1A), 阳性细胞率 95% 以上, 其中, 绿色为波形蛋白, 蓝色为 DAPI 标记的细胞核。

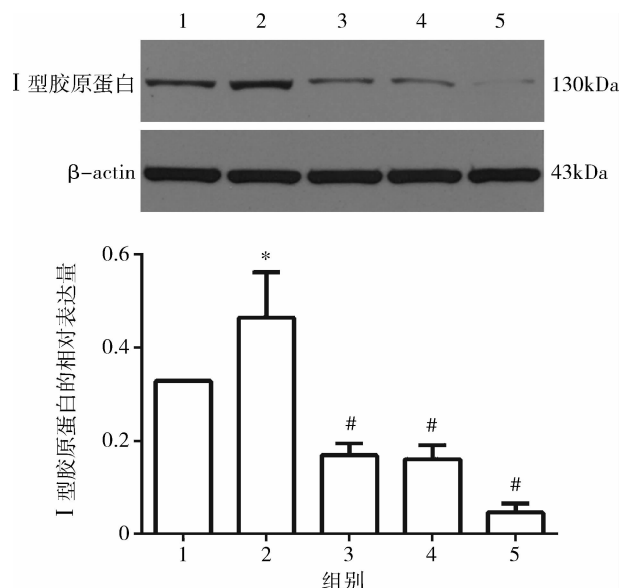


图 3 不同浓度的虾青素对 I 型胶原蛋白表达的影响

1. 空白对照组; 2. Ang II 组 (10^{-7} mol/L); 3. Ang II (10^{-7} mol/L) + 虾青素低剂量组 ($20 \mu\text{mol/L}$); 4. Ang II (10^{-7} mol/L) + 虾青素中剂量组 ($40 \mu\text{mol/L}$); 5. Ang II (10^{-7} mol/L) + 虾青素高剂量组 ($80 \mu\text{mol/L}$); 与 1 比较, * $P < 0.05$; 与 2 比较, # $P < 0.05$

下降, 其中 $80 \mu\text{mol/L}$ 的虾青素组下降最明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

5. 虾青素对心脏成纤维细胞增殖的影响: CCK8 试剂盒测定各组细胞的增殖情况。与对照组比较, Ang II 组细胞增殖明显增加; 与 Ang II 组相比, 各剂量的虾青素组细胞的增殖水平均下降, 其中, $80 \mu\text{mol/L}$ 的虾青素组 CFs 增殖能力下降最明显, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5)。

讨 论

心脏纤维化是一个全球性的健康问题, 几乎所有的慢性心脏疾病最终都会发展为心脏纤维化。在纤维化进程中, 心脏成纤维细胞扮演了重要的角色。当

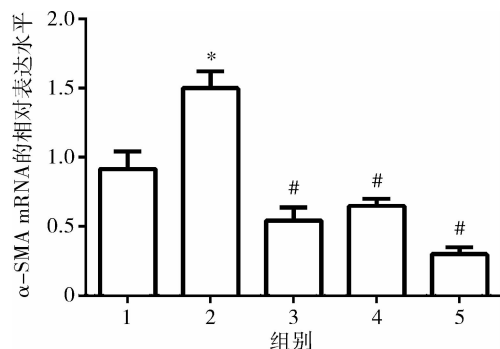


图 4 不同浓度的虾青素对 α -SMA mRNA 表达的影响

1. 空白对照组; 2. Ang II 组 (10^{-7} mol/L); 3. Ang II (10^{-7} mol/L) + 虾青素低剂量组 (20 μ mol/L); 4. Ang II (10^{-7} mol/L) + 虾青素中剂量组 (40 μ mol/L); 5. Ang II (10^{-7} mol/L) + 虾青素高剂量组 (80 μ mol/L); 与 1 比较, * $P < 0.05$; 与 2 比较, # $P < 0.05$

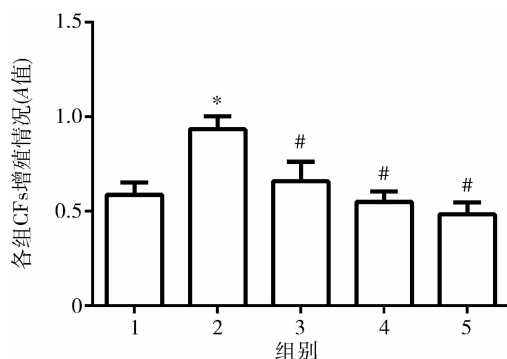


图 5 不同浓度的虾青素对 CFs 增殖的影响

1. 空白对照组; 2. Ang II 组 (10^{-7} mol/L); 3. Ang II (10^{-7} mol/L) + 虾青素低剂量组 (20 μ mol/L); 4. Ang II (10^{-7} mol/L) + 虾青素中剂量组 (40 μ mol/L); 5. Ang II (10^{-7} mol/L) + 虾青素高剂量组 (80 μ mol/L); 与 1 比较, * $P < 0.05$; 与 2 比较, # $P < 0.05$

心肌急性损伤时, 炎症因子和促纤维化因子表达水平上升, 心脏成纤维细胞增殖, 转化为肌成纤维细胞, 肌成纤维细胞的出现是纤维化组织的重要特征。肌成纤维细胞特异性表达 α -SMA, 兼具有成纤维细胞和平滑肌细胞的特性。肌成纤维细胞富含粗面内质网和高尔基体, 分泌胶原蛋白能力较成纤维细胞显著增加^[12]。过度的细胞外基质蛋白沉积导致心肌僵硬增加, 顺应性降低, 收缩及舒张功能受损, 细胞外基质沉积还会干扰心肌细胞的电生理特性, 导致心肌的电传导效应降低, 心律失常的易感性增加, 此外, 血管周围的炎症和纤维化导致细胞的摄氧功能障碍, 加快了心肌重构的进程^[13]。

虾青素是一种类胡萝卜素, 有很强的抗氧化功能。最近的研究表明, 虾青素对心血管系统有保护作用。在临床研究发现, 虾青素可以抗低密度脂蛋白

(LDL) 氧化, 升高高密度脂蛋白 (HDL) 和脂联素的水平, 具有潜在的抗动脉粥样硬化功能^[14]。虾青素可以减轻糖尿病大鼠氧化应激水平, 抗糖尿病大鼠大动脉内皮细胞功能紊乱^[15]。虾青素可以抑制兔心肌缺血再灌注损伤过程中补体的激活, 从而降低心肌梗死的面积^[16]。虾青素还有抗器官纤维化的作用。研究表明, 虾青素具有抗肝纤维化、肾纤维化、肺纤维化的作用^[17-20]。但虾青素是否有抗心肌纤维化作用, 目前研究较少。

本研究用差速贴壁法分离乳鼠的心脏成纤维细胞, 光镜下观察心脏成纤维细胞呈长梭形, 多边形, 经免疫荧光鉴定 vimentin 蛋白阳性, 心脏成纤维细胞纯度达 95% 以上。用血管紧张素 II 造细胞纤维化模型, 本研究发现加入 10^{-7} mol/L 的血管紧张素 II 心脏成纤维细胞 I 型胶原蛋白的表达水平最高。不同浓度的虾青素 (20、40、80 μ mol/L) 均能使 I 型胶原蛋白的表达水平降低, 细胞增殖能力下降。实验还发现, 虾青素还能抑制心脏成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 抑制 α -SMA 的表达。

综上所述, 虾青素可以抑制血管紧张素 II 诱导的心脏成纤维细胞胶原蛋白的合成, 抑制心脏成纤维细胞的增殖及转化, 具有潜在的抗心肌纤维化作用, 但其具体作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Zhao X, Hua Y, Chen H, *et al*. Aldehyde dehydrogenase - 2 protects against myocardial infarction - related cardiac fibrosis through modulation of the Wnt/ β - catenin signaling pathway [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2015, 11: 1371 - 1381
- 2 Balasubramanian S, Pleasant DL, Kasiganesan H, *et al*. Dasatinib attenuates pressure overload induced cardiac fibrosis in a murine transverse aortic constriction model [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (10): e0140273
- 3 Li R, Xiao J, Qing X, *et al*. Sp1 mediates a therapeutic role of MiR - 7a/b in angiotensin II - induced cardiac fibrosis via mechanism involving the TGF - β and MAPKs pathways in cardiac fibroblasts [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (4): e0125513
- 4 Monroy - Ruiz J, Sevilla MA, Carron R, *et al*. Astaxanthin - enriched - diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats [J]. *Pharmacol Res*, 2011, 63 (1): 44 - 50
- 5 Zhou XY, Zhang F, Hu XT, *et al*. Depression can be prevented by astaxanthin through inhibition of hippocampal inflammation in diabetic mice [J]. *Brain Res*, 2017, 1657: 262 - 268
- 6 Jiang X, Chen L, Shen L, *et al*. Trans - astaxanthin attenuates lipopolysaccharide - induced neuroinflammation and depressive - like behavior in mice [J]. *Brain Res*, 2016, 1649 (Pt A): 30 - 37
- 7 Dose J, Matsugo S, Yokokawa H, *et al*. Free radical scavenging and

- cellular antioxidant properties of astaxanthin [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(1):103
- 8 Ambati RR, Phang SM, Ravi S, *et al.* Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications – a review[J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(1): 128 – 152
 - 9 Li J, Wang F, Xia Y, *et al.* Astaxanthin pretreatment attenuates hepatic ischemia reperfusion – induced apoptosis and autophagy via the ROS/MAPK pathway in mice [J]. *Mar Drugs*, 2015, 13 (6): 3368 – 3387
 - 10 Qiu X, Fu K, Zhao X, *et al.* Protective effects of astaxanthin against ischemia/reperfusion induced renal injury in mice[J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 28
 - 11 Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin in cardiovascular health and disease[J]. *Molecules*, 2012, 17(2): 2030 – 2048
 - 12 蔡辉,张蓓蓓.心脏成纤维细胞在心肌纤维化中的作用[J].微循环学杂志,2014,24(4):80 – 82
 - 13 Travers JG, Kamal FA, Robbins J, *et al.* Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens[J]. *Circ Res*, 2016, 118(6): 1021 – 1040
 - 14 Kishimoto Y, Yoshida H, Kondo K. Potential anti – atherosclerotic properties of astaxanthin[J]. *Mar Drugs*, 2016, 14(2):35
 - 15 Zhao ZW, Cai W, Lin YL, *et al.* Ameliorative effect of astaxanthin on endothelial dysfunction in streptozotocin – induced diabetes in male rats[J]. *Arzneimittelforschung*, 2011, 61(4): 239 – 246
 - 16 Lauver DA, Lockwood SF, Lucchesi BR. Disodium disuccinate astaxanthin (Cardax) attenuates complement activation and reduces myocardial injury following ischemia/reperfusion[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 314(2): 686 – 692
 - 17 Kim B, Farruggia C, Ku CS, *et al.* Astaxanthin inhibits inflammation and fibrosis in the liver and adipose tissue of mouse models of diet – induced obesity and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 43: 27 – 35
 - 18 Yang Y, Bae M, Park YK, *et al.* Histone deacetylase 9 plays a role in the antifibrogenic effect of astaxanthin in hepatic stellate cells[J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 40: 172 – 177
 - 19 Xie C, Meng M, Yin X, *et al.* Effects of astaxanthin on renal fibrosis and cell apoptosis induced by partial unilateral ureteral obstruction in rats[J]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao*, 2013, 33(2): 305 – 308
 - 20 Zhang J, Xu P, Wang Y, *et al.* Astaxanthin prevents pulmonary fibrosis by promoting myofibroblast apoptosis dependent on Drp1 – mediated mitochondrial fission [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19 (9): 2215 – 2231 (收稿日期:2017 – 04 – 27)
(修回日期:2017 – 05 – 11)
-
- (上接第 35 页)
- 4 Sato S, Kawashima H, Kashiwagi Y, *et al.* Inflammatory cytokines as predictors of resistance to intravenous immunoglobulin therapy in Kawasaki disease patients [J]. *Int J Rheum Dis*, 2013, 6(2):168 – 172
 - 5 武育蓉,陈树宝,孙隰,等.现有儿科心力衰竭诊断标准及脑利钠肽对先天性心脏病合并心力衰竭的诊断价值[J].中华儿科杂志,2006, 44 (10): 728 – 732
 - 6 Stienen S, Salah K, Eurlings LW, *et al.* Targeting N – terminal pro – brain natriuretic peptide in older versus younger acute decompensated heart failure patients[J]. *JACC Heart Fail*, 2016, 4(9):736 – 745
 - 7 Lin KH, Chang SS, Yu CW, *et al.* Usefulness of natriuretic peptide for the diagnosis of Kawasaki disease: a systematic review and meta – analysis[J]. *BMJ Open*, 2015, 5(4):e006703
 - 8 Ye Q, Shao WX, Shang SQ, *et al.* Value of the N – terminal of pro-hormone brain natriuretic peptide in diagnosis of Kawasaki disease [J]. *Int J Cardiol*, 2015,178:5 – 7
 - 9 Kimata T, Mine K, Uchiyama T, *et al.* N – terminal pro – brain natriuretic peptide and risk of coronary artery lesions and resistance to intravenous immunoglobulin in Kawasaki disease[J]. *J Pediatr*, 2013, 62(6):1205 – 1209
 - 10 Wang W, Gong F, Zhu W, *et al.* Macrophage activation syndrome in Kawasaki disease: more common than we thought? [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2015, 44(4): 405 – 410
 - 11 Yamamoto N, Sato K, Hoshina T, *et al.* Utility of ferritin as a predictor of the patients with Kawasaki disease refractory to intravenous immunoglobulin therapy[J]. *Mod Rheumatol*, 2015,25(6):898 – 902
 - 12 Nasir A, Al Tatari H, H amdan MA. Very high serum ferritin levels in three newborns with Kawasaki – like illness [J]. *Paediatr Child Health*, 2012, 17(4): 201 – 204
 - 13 Kobayashi T, Inoue Y, Takeuchi K, *et al.* Prediction of intravenous immunoglobulin unresponsiveness in patients with Kawasaki disease [J]. *Circulation*, 2006, 113(22):2606 – 2612
 - 14 Egami K, Muta H, Ishii M, *et al.* Prediction of resistance to intravenous immunoglobulin treatment in patients with Kawasaki disease[J]. *J Pediatr*, 2006,149(2):237 – 240
 - 15 Fu PP, Du ZD, Pan YS. Novel predictors of intravenous immunoglobulin resistance in Chinese children with Kawasaki disease[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2013,32(8):e319 – e323
 - 16 Rigante D, Andreozzi L, Fastigi M, *et al.* Critical overview of the risk scoring systems to predict non – responsiveness to intravenous immunoglobulin in Kawasaki syndrome [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (3):278
 - 17 Kaneko K, Yoshimura K, Ohashi A, *et al.* Prediction of the risk of coronary arterial lesions in Kawasaki disease by brain natriuretic peptide[J]. *Pediatr Cardiol*, 2011,32(8):1106 – 1109
 - 18 Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, *et al.* Ferritin for the clinician [J]. *Blood Rev*, 2009,23(3):95 – 104
 - 19 Cunha BA, Pherez FM, Alexiadis V, *et al.* Adult Kawasaki’s disease with myocarditis, splenomegaly, and highly elevated serum ferritin levels[J]. *Heart Lung*, 2010,39(2):164 – 172
(收稿日期:2017 – 05 – 29)
(修回日期:2017 – 06 – 12)