doi：10.7499/j.issn.1008-8830.2412085

论著·实验研究

铜过载介导内质网应激在川崎病血管内皮损伤中的作用及机制研究

温世芳[1,2,3]　汤志远[1]　申娴娟[1]　陈涛[1]　赵建美[1]

（1.南通大学附属医院儿内科，江苏南通　226001；2.南通大学医学院，江苏南通　226001；
3.驻马店市中心医院PICU，河南驻马店　463000）

［摘要］**目的**　探讨铜过载介导的内质网应激（endoplasmic reticulum stress, ERS）在川崎病（Kawasaki disease, KD）血管内皮损伤中的作用及机制。**方法**　将4周龄雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组、KD组、KD+铜螯合剂四硫代钼酸盐（tetrathiomolybdate, TTM）组及KD+内质网应激抑制剂AMG PERK 44（AMG）组（每组*n*=20），使用白色念珠菌提取物构建KD小鼠模型；将人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cell, HUVEC）分为对照组（健康儿童血清干预）、KD组（KD患儿血清干预）、KD+TTM组（KD患儿血清联合20 μmol/L TTM干预）。采用红氨酸铜染色检测小鼠心脏组织铜沉积情况，通过测量小鼠腹主动脉直径和面积、苏木精-伊红染色观察小鼠血管病理改变，透射电镜、免疫荧光检测ERS激活情况；采用CCK8、流式细胞术、细胞划痕和细胞成管实验评估HUVEC细胞活力、凋亡和功能改变，Western blot法检测ERS标志蛋白表达水平。**结果**　与KD组比较，KD+TTM组和KD+AMG组血管壁铜盐沉积减少，冠状动脉内皮细胞和内质网肿胀、炎性细胞浸润、腹主动脉病变扩张减轻；腹主动脉直径和面积、ERS标志蛋白（GRP78、CHOP）荧光强度降低（*P*<0.05）。与KD组比较，KD+TTM组细胞活力、小管数目、划痕愈合率升高，细胞凋亡率、ERS标志蛋白（GRP78、CHOP、ATF6和p-PERK）表达降低（*P*<0.05）。**结论**　铜过载通过激活ERS通路加重KD血管内皮损伤，TTM可通过调控铜代谢及抑制ERS通路发挥内皮保护作用。

［中国当代儿科杂志，2025，27（7）：842-849］

［关键词］川崎病；血管内皮损伤；内质网应激；铜螯合剂；人脐静脉内皮细胞；小鼠

Role and mechanism of copper overload-mediated endoplasmic reticulum stress in vascular endothelial injury in Kawasaki disease

WEN Shi-Fang, TANG Zhi-Yuan, SHEN Xian-Juan, CHEN Tao, ZHAO Jian-Mei. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China (Zhao J-M, Email: 2687084388@qq.com)

Abstract: Objective　To investigate the role and mechanism of copper overload-mediated endoplasmic reticulum stress (ERS) in vascular endothelial injury in Kawasaki disease (KD). **Methods**　Four-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: control, KD, KD plus copper chelator tetrathiomolybdate (TTM), and KD plus ERS inhibitor AMG PERK 44 (AMG) (*n*=20 per group). A KD mouse model was established using Candida albicans extract. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into control (intervention with healthy children's serum), KD (intervention with KD patients' serum), and KD+TTM (intervention with KD patients' serum plus 20 μmol/L TTM). Copper deposition in mouse heart tissue was assessed using rubeanic acid staining. Vascular pathological changes were observed using hematoxylin-eosin staining and measurement of abdominal aortic diameter and area. ERS activation was detected by transmission electron microscopy and immunofluorescence. HUVEC viability, apoptosis, and functional changes were evaluated using CCK8, flow cytometry, cell scratch assay, and angiogenesis experiments. ERS marker protein expression levels were measured by Western blot. **Results**　Compared to the KD

［收稿日期］2024-12-13；［接受日期］2025-05-29
［基金项目］国家自然科学基金面上项目（82270528）；江苏省卫健委医学科研重点A类项目（ZDA2020010）。
［作者简介］温世芳，女，硕士研究生，主治医师。
［通信作者］赵建美，女，主任医师，教授。Email：2687084388@qq.com。

group, the KD+TTM and KD+AMG groups showed reduced copper deposition in the vascular wall, decreased swelling of coronary endothelial cells and endoplasmic reticulum, reduced inflammatory cell infiltration, and less abdominal aortic lesion expansion. The abdominal aortic diameter and area, and the fluorescence intensity of ERS marker proteins (GRP78 and CHOP) were significantly lower (P<0.05). Compared to the KD group, the KD+TTM group exhibited increased cell viability, tube number, and scratch healing rate, along with decreased apoptosis rate and expression of ERS marker proteins (GRP78, CHOP, ATF6, and p-PERK) (P<0.05). **Conclusions** Copper overload aggravates vascular endothelial injury in KD by activating the ERS pathway. TTM can exert protective effects on the endothelium by regulating copper metabolism and inhibiting the ERS pathway.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2025, 27(7): 842-849]

Key words: Kawasaki disease; Vascular endothelial injury; Endoplasmic reticulum stress; Copper chelator; Human umbilical vein endothelial cell; Mouse

川崎病（Kawasaki disease, KD）是一种以全身性血管炎为特征的小儿急性发热性疾病。好发于5岁以下婴幼儿（占比>85%）[1]。目前病因与发病机制尚未完全阐明，临床诊断主要依赖特征性临床表现结合实验室指标[2]。未经治疗的患儿约20%可并发冠状动脉病变，为儿童时期最常见的获得性心脏病之一[3]。

近年研究发现，KD血管损伤的核心机制与内皮功能障碍密切相关[4]，而内质网应激（endoplasmic reticulum stress, ERS）在此过程中发挥关键调控作用，多种病理因素诱导的ERS可通过激活未折叠蛋白反应，触发肌醇需求酶1（inositol-requiring enzyme 1, IRE1）、蛋白激酶R样内质网激酶（protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK）及激活转录因子6（activating transcription factor 6, ATF6）信号通路级联反应。静息状态下，IRE1α、PERK和ATF6与分子伴侣葡萄糖调节蛋白78（glucose-regulated protein 78, GRP78）结合；当内质网稳态破坏时，GRP78发生移位，从而激活下游CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白（CCAAT enhance-binding protein homologous protein, CHOP），导致氧化应激、炎症级联反应和细胞凋亡等病理过程，最终加剧内皮损伤[5]。因此，靶向调控ERS信号网络被认为是改善心血管疾病预后的潜在策略。

在金属离子调控体系中，铜稳态失衡与血管内皮损伤的关联备受关注[6-9]。生理状态下，铜离子通过结合金属伴侣蛋白维持动态平衡，但胞内铜过载可干扰脂质代谢并激活烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶系统，导致线粒体氧化磷酸化解偶联和活性氧过量生成[10]。铜过载诱导的氧化应激可通过激活PERK-CHOP通路增强ERS反应，形成“氧化应激-ERS-内皮损伤”恶性循环[11]。而铜螯合剂四硫代钼酸盐（tetrathiomolybdate, TTM）可通过抑制血管生成和炎症反应，显著改善血管损伤和心脏功能[12]。

然而，铜稳态失衡是否通过ERS调控网络参与KD血管内皮损伤的分子机制尚未明确，本研究拟系统阐明铜过载介导的ERS信号转导在KD内皮损伤中的作用机制，为开发基于铜稳态调控的新型治疗策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cell, HUVEC）由南通大学附属医院妇产科实验室赠予，白色念珠菌（CCTCC AY 2018005）由中国典型培养物宝藏中心提供。主要试剂包括胎牛血清（北京沃卡威生物公司），TTM、红氨酸（Sigma，美国），青霉素链霉素双抗培养基，胰蛋白酶消化液，Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒（上海珀赫生物科技有限公司），CCK8试剂（上海东仁化学科技有限公司），兔抗人CHOP、鼠抗兔β-actin、AMG PERK 44（上海美迪西生物医药有限公司），鼠抗人GRP78、兔抗人PERK（上海泽恩生物科技有限公司），兔抗人ATF6（上海艾博抗贸易有限公司），羊抗鼠、羊抗兔荧光二抗（北京中杉金桥生物技术有限公司），MCF 10A培养基（武汉普诺赛生命科技有限公司），苏木精-伊红（hematoxylin-eosin, HE）试剂（河南赛诺特生物技术有限公司），ECMatrix胶（Sigma，美国）。

1.2 白色念珠菌细胞壁β-葡聚糖的提取物制备

参考文献［13］的方法制备白色念珠菌细胞壁β-葡聚糖的提取物（Candida albicans cell wall secreted proteins, CAWS），将白念珠菌接种于5 L沙氏培养基中，37℃条件下培养48 h。随后采用C-limiting培养基孵育2 d。加入等体积无水乙醇4℃过夜后收集沉淀，蒸馏水搅拌重悬，以5 000 r/min

离心 5 min 收集上清并加入等体积无水乙醇 4℃过夜。再次离心收集沉淀，丙酮干燥，无菌生理盐水溶解备用。

1.3 构建 KD 小鼠模型

采用 Takahashi 等[14]的方法诱导念珠菌相关 KD 动物模型。将 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 80 只［生产许可证号：SCXK（苏）2020-0009，使用许可证号：SYXK（苏）2017-0046］随机均分为对照组、KD 组、KD+TTM 组和 KD+内质网应激抑制剂 AMG PERK 44（AMG）组。除对照组外，各组小鼠于实验第 1~5 天上午同一时间依次腹腔注射 8 mg 的 CAWS，对照组小鼠腹腔注射相同体积生理盐水。CAWS 注射后第 6 天，KD+TTM 组给予 TTM 灌胃（5 mg/（kg·d），灌胃体积 500 μL，持续 7 d）。KD+AMG 组予 AMG 灌胃（5 mg/kg，单次灌胃，灌胃体积 500 μL）。于 CAWS 末次注射后的第 2 周每组随机抽取 6 只小鼠处死，取心脏组织及冠状动脉标本，行 HE 染色病理学检查，观察心脏及冠状动脉病变情况；同时，剥离腹主动脉，拍照并使用 Image J 软件测量腹主动脉直径和面积。本研究获南通大学医学院动物伦理委员会批准（批准号：S20220303-007）。

1.4 心脏组织 HE 和红氨酸铜染色

第 14 天每组随机选 10 只小鼠取心脏组织，4%多聚甲醛固定 48 h，脱水，石蜡包埋切片，HE 染色观察心脏冠状动脉炎性浸润。使用 Image J 软件分析炎性细胞数量。

将 0.1%红氨酸乙醇液与 10%醋酸钠按 1∶20 的比例混合均匀，将切片浸入混合液中，于 37℃水浴锅中处理 3 d；随后依次用 70%乙醇浸洗 2 次，每次 10 min；无水乙醇浸洗 2 次，每次 3 h；蒸馏水浸洗 3 次。用核固红复染 3 min，经无水乙醇 3 缸脱水、正丁醇透明 5 min、二甲苯透明 5 min，用中性树胶封片。采用显微镜镜检并采集图像进行分析。

1.5 免疫荧光

组织切片经抗原修复后，5% BSA 封闭，一抗（CHOP 按 1∶5 000 稀释、GRP78 按 1∶1 000 稀释）4℃孵育过夜，Alexa Fluor 488 二抗室温避光孵育 2 h，DAPI 染核后荧光显微镜观察。

1.6 透射电镜

取样心脏组织 2 mm×2 mm 大小，立即放入戊二醛电镜液中预固定。依次固定、包埋、烘烤后，用 LKb 超薄切片机切片，切片厚度为 60~80 nm，切片用饱和醋酸双氧铀染色 30 min，用枸橼酸铅染液染色 5 min，通过电镜观察并拍照。

1.7 细胞培养与分组

HUVEC 在含 10%胎牛血清、1%双抗的完全培养基中，于 37℃、5% CO_2 条件下常规培养。选取 2023 年 10 月—2024 年 9 月期间驻马店市中心医院儿科健康体检儿童及 KD 患儿血清，经 56℃灭活 30 min 后，0.22 μm 滤膜过滤备用。细胞分为对照组（健康血清处理 24 h）、KD 组（KD 血清处理 24 h）、KD+TTM 组（KD 血清联合 20 μmol/L TTM 处理 24 h）。

1.8 CCK8 检测

将对数生长期 HUVEC 配制成浓度为 5×10^4 个细胞/mL 的细胞悬液，接种于 96 孔板，每孔加入 100 μL 细胞悬液，每组分别于 0、6、12、24、48、72 h 加入 10 μL CCK8 试剂，孵育 2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度，计算细胞活力。细胞活力（%）=（实验组吸光度−空白组吸光度）/（对照组吸光度−空白组吸光度）。实验独立重复 3 次。

1.9 流式细胞术

消化收集各组细胞，调整细胞密度至 1×10^6 个细胞/mL。用预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞，离心（1 000 r/min，5 min）弃上清，重复洗涤 2~3 次。采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测凋亡：取 500 μL Binding Buffer 重悬细胞，分装至流式管，依次加入 5 μL Annexin V-FITC 和 PI，避光孵育 15 min。使用流式细胞仪（BD FACSCalibur）进行检测。实验独立重复 3 次。

1.10 细胞划痕实验

取对数生长期细胞，调整细胞密度至 5×10^5 个细胞/mL，接种于 6 孔板中。待 HUVEC 细胞融合度达 80%时，用细胞刮刀垂直于培养板底部的参考线，划出一条直线划痕。无血清培养基培养 24 h，在倒置显微镜下观察。划痕愈合率（%）=［（0 h 划痕宽度−24 h 划痕宽度）/0 h 划痕宽度］×100%。实验独立重复 3 次。

1.11 细胞成管实验

各组细胞接种于预铺 ECMatrix 胶的 96 孔板中，37℃孵育 6 h。倒置相差显微镜观察管状结构形成。使用 Image J 定量分析小管数目。实验独立重复 3 次。

1.12 Western blot 检测

RIPA 裂解液（含蛋白酶/磷酸酶抑制剂）提取细胞及小鼠心脏组织蛋白，BCA 法定量。取等量蛋白经 SDS-PAGE 电泳转膜后，5%脱脂乳封闭，分别与 CHOP（1∶5 000）、ATF6（1∶1 000）、

GRP78（1∶1 000）、PERK/p-PERK（1∶1 000）、β-actin（1∶10 000）一抗4℃孵育过夜，HRP二抗（1∶10 000）室温孵育1 h。ECL显影后Image J进行定量分析。实验独立重复3次。

1.13 统计学分析

使用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料数据以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Tukey检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠心脏组织中铜盐沉积情况比较

红氨酸铜染色结果显示，与对照组相比，KD组血管壁铜盐沉积明显增多；KD+TTM组和KD+AMG组血管壁铜盐沉积较KD组减少。见图1。

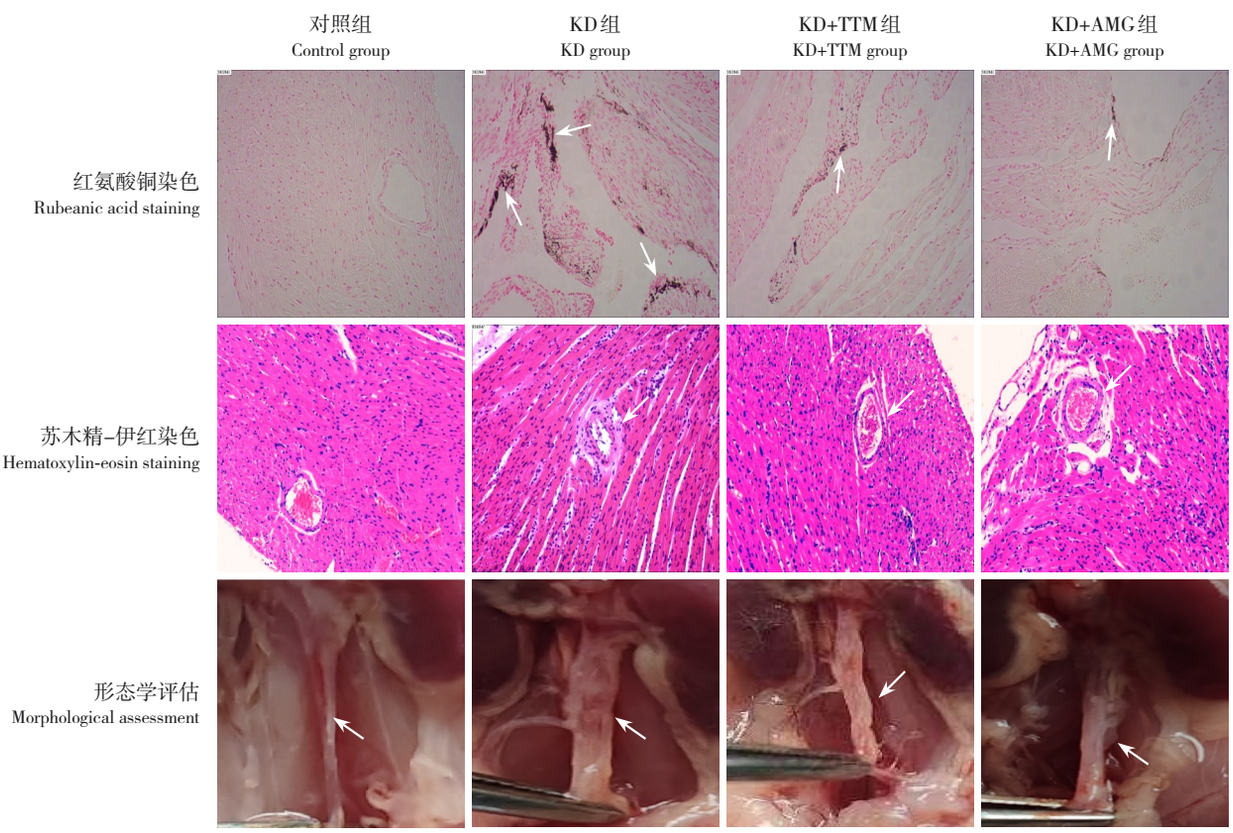


图1 各组小鼠心脏组织铜盐沉积及血管内皮病理变化 红氨酸铜染色（光学显微镜，×40）结果显示，KD+TTM组和KD+AMG组小鼠血管壁铜盐沉积较KD组减少。棕黄色为铜盐沉积处阳性表达，红色为细胞核；白色箭头示铜盐沉积处。HE染色（光学显微镜，×40）结果显示，KD+TTM组和KD+AMG组冠状动脉内皮细胞肿胀、炎性细胞浸润较KD组减轻。紫蓝色为细胞核，红色为细胞质、细胞外基质成分；白色箭头示冠状动脉。腹主动脉形态学评估结果显示，KD+TTM组和KD+AMG组腹主动脉病变较KD组减轻。白色箭头示腹主动脉。

2.2 TTM及AMG对KD小鼠血管内皮的影响

HE染色结果显示，与对照组相比，KD组冠状动脉内皮细胞肿胀，内皮下中性粒细胞聚集，淋巴细胞浸润明显；与KD组相比，KD+AMG组和KD+TTM组冠状动脉内皮细胞肿胀减轻，炎性细胞浸润减轻（P<0.05）。透射电镜观察显示，与对照组相比，KD组腹主动脉病变明显扩张，腹主动脉直径和面积增大（P<0.05）；与KD组相比，KD+TTM组和KD+AMG组腹主动脉病变减轻，腹主动脉直径和面积缩小但未恢复正常（P<0.05）。见图1、表1。

表1 各组小鼠腹主动脉直径和面积比较

（$\bar{x} \pm s$，n=6）

组别	腹主动脉直径 (mm)	腹主动脉面积 (cm^2)
对照组	0.66 ± 0.04	0.35 ± 0.04
KD组	1.24 ± 0.10[a]	1.21 ± 0.21[a]
KD+TTM组	0.91 ± 0.08[a,b]	0.65 ± 0.11[a,b]
KD+AMG组	0.96 ± 0.06[a,b]	0.72 ± 0.09[a,b]
F值	50.805	40.219
P值	<0.001	<0.001

注：［KD］川崎病；［TTM］四硫钼酸盐；［AMG］内质网应激抑制剂。a示与对照组比较，P<0.05；b示与KD组比较，P<0.05。

2.3 TTM及AMG对KD小鼠ERS的影响

透射电镜显示，与对照组相比，KD组内质网结构紊乱并明显扩张肿胀；与KD组相比，KD+TTM组和KD+AMG组内质网肿胀减轻，结构清晰。免疫荧光显示，与对照组（分别为4.62±0.04、6.35±0.04）相比，KD组（分别为21.13±0.10、15.21±0.21）内质网标记蛋白GRP78、CHOP荧光强度增强（P<0.05）；与KD组相比，KD+TTM组（分别为6.10±0.08、10.65±0.11）和KD+AMG组（分别为8.96±0.06、10.72±0.09）GRP78、CHOP荧光强度减弱（P<0.05）。见图2。

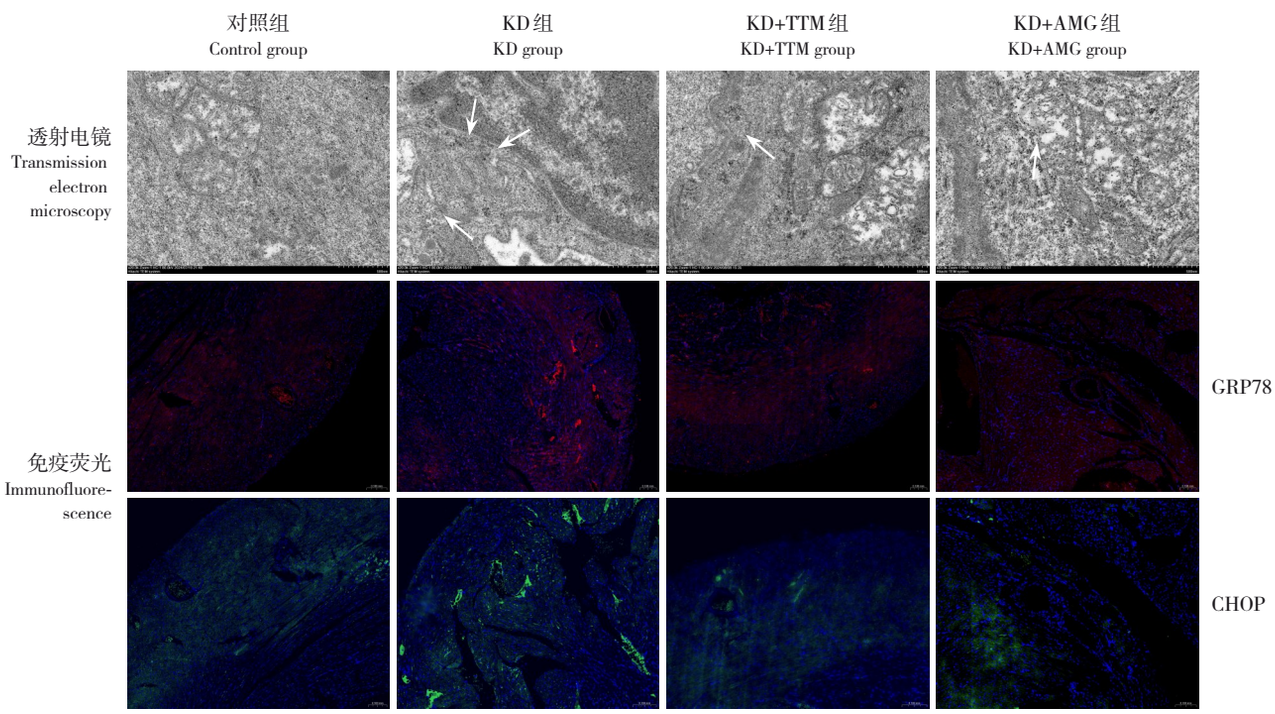


图2 各组小鼠心脏组织ERS激活情况 透射电镜（×20 000）显示，与对照组相比，KD组内质网结构紊乱，内质网管腔扩张肿胀；KD+TTM组和KD+AMG组内质网肿胀较KD组减轻，结构清晰。图中白色箭头示内质网。免疫荧光检测（激光共聚焦显微镜，×40）结果显示，KD+TTM组和KD+AMG组GRP78、CHOP荧光强度较KD组减弱。DAPI标记细胞核呈蓝色荧光，红色荧光标记GRP78，绿色荧光标记CHOP。

2.4 TTM对KD血清诱导的HUVEC细胞活力的影响

CCK8结果显示，KD组不同时间点细胞活力较对照组降低，KD+TTM组细胞活力较KD组升高（P<0.05）。见表2。

表2 不同时间点各组HUVEC细胞活力比较 （$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.465±0.006	0.599±0.024	0.996±0.040	1.594±0.043	1.726±0.083	1.835±0.084
KD组	0.462±0.004	0.498±0.016[a]	0.566±0.038[a]	1.021±0.065[a]	1.193±0.074[a]	1.229±0.063[a]
KD+TTM组	0.459±0.011	0.541±0.022[b]	0.747±0.042[b]	1.177±0.056[b]	1.384±0.062[b]	1.539±0.057[b]
F值	1.350	51.430	259.259	255.590	121.715	172.392
P值	0.278	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：［KD］川崎病；［TTM］四硫钼酸盐。a示与对照组比较，P<0.05；b示与KD组比较，P<0.05。

2.5 TTM对KD血清诱导的HUVEC血管生成、迁移和凋亡的影响

与对照组相比，KD组小管数、划痕愈合率显著下降，细胞凋亡率升高（P<0.05）；与KD组相比，KD+TTM组小管数、划痕愈合率升高，细胞凋亡率下降（P<0.05）。见图3、表3。

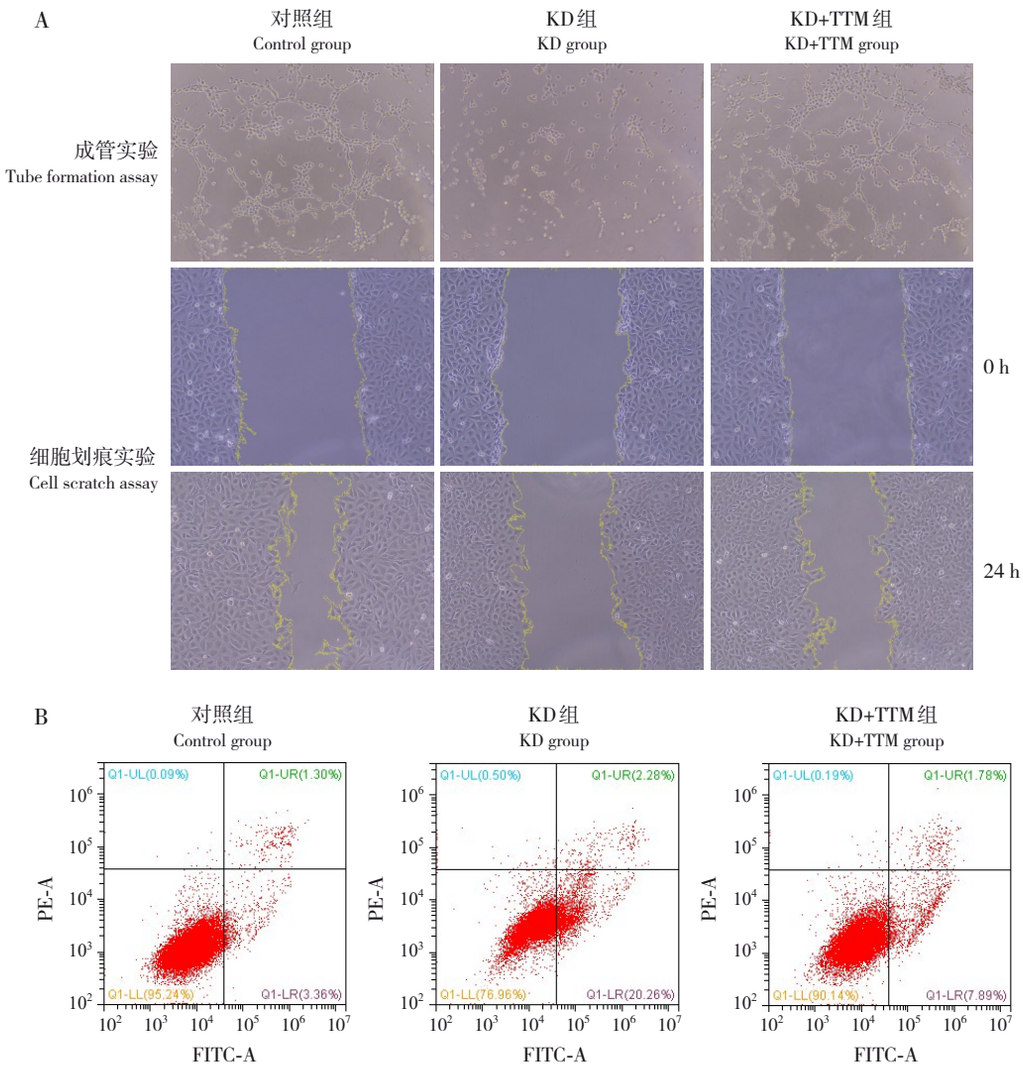


图3　各组HUVEC血管生成能力、迁移能力和凋亡能力比较　A：血管生成实验（光学显微镜，×40）结果显示，KD+TTM组小管数目较KD组增多；细胞划痕实验结果显示（光学显微镜，×40），24 h时，与对照组相比，KD组细胞迁移速度明显下降；KD+TTM组迁移速度较KD组增加。B：流式细胞术检测细胞凋亡率。UR为晚期凋亡或坏死细胞，UL为机械损伤或晚期坏死细胞，LL为活细胞，LR为早期凋亡细胞。KD+TTM组细胞凋亡率较KD组降低。

表3　各组细胞凋亡率、迁移能力及成管能力

（$\bar{x} \pm s$，n=3）

组别	细胞凋亡率(%)	划痕愈合率(%)	小管数目
对照组	6.1 ± 1.5	0.63 ± 0.06	33.7 ± 2.5
KD组	28.4 ± 8.9[a]	0.24 ± 0.06[a]	3.3 ± 1.5[a]
KD+TTM组	12.7 ± 2.6[a,b]	0.37 ± 0.06[a,b]	28.0 ± 3.0[a,b]
*F*值	13.482	33.385	132.509
*P*值	0.006	0.001	<0.001

注：［KD］川崎病；［TTM］四硫钼酸盐。a示与对照组比较，*P*<0.05；b示与KD组比较，*P*<0.05。

2.6　TTM对KD血清诱导的HUVEC中ERS的影响

与对照组相比，KD组GRP78、CHOP、ATF6和p-PERK蛋白表达水平升高（*P*<0.05）；与KD组相比，KD+TTM组GRP78、CHOP、ATF6和p-PERK蛋白表达水平降低（*P*<0.05）。见表4、图4。

表 4　各组细胞 ERS 标志蛋白表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$，n=3）

组别	GRP78	CHOP	ATF6	PERK	p-PERK
对照组	0.10 ± 0.03	0.056 ± 0.025	0.121 ± 0.010	0.497 ± 0.012	0.21 ± 0.06
KD 组	0.73 ± 0.26[a]	0.419 ± 0.024[a]	0.692 ± 0.224[a]	0.480 ± 0.021	0.76 ± 0.20[a]
KD+TTM 组	0.34 ± 0.30[a,b]	0.223 ± 0.083[a,b]	0.431 ± 0.033[a,b]	0.500 ± 0.008	0.24 ± 0.08[a,b]
F 值	5.596	36.404	14.378	1.613	17.483
P 值	0.043	<0.001	0.005	0.275	0.003

注：［KD］川崎病；［TTM］四硫钼酸盐；［GRP78］葡萄糖调节蛋白 78；［CHOP］CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白；［ATF6］激活转录因子 6；［PERK］蛋白激酶 R 样内质网激酶；［p-PERK］磷酸化的蛋白激酶 R 样内质网激酶。a 示与对照组比较，P<0.05；b 示与 KD 组比较，P<0.05。

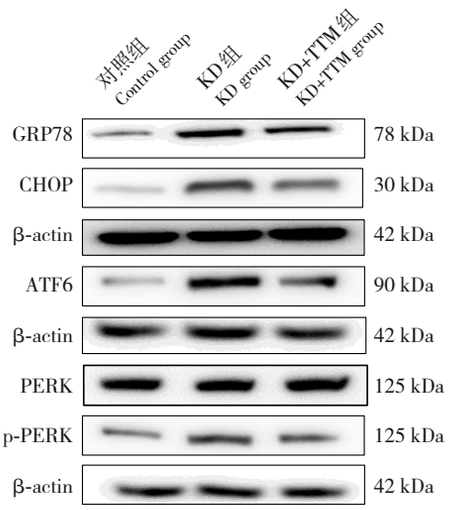


图 4　Western blot 法检测各组细胞 ERS 相关蛋白表达电泳图

3　讨论

铜离子作为必需微量元素，其生理功能的发挥高度依赖于机体的稳态调控。铜离子缺乏会引起心肌肥厚、心肌能量不足、氧化应激以及基因异常表达[15]，进而导致多种心血管疾病。补充铜能够促进内皮细胞生长因子及血管再生，改善心肌肥厚并可能减少心肌细胞纤维化[16]。而过量铜则可能诱发氧化应激、细胞凋亡和炎症等反应[17-19]，导致心血管功能障碍。本研究通过动物实验和细胞实验，为铜离子参与 KD 冠状动脉病变的发病机制提供了直接实验证据。

为揭示铜稳态失衡与 ERS 之间的交互作用机制。本研究发现，KD 组小鼠心脏组织和 HUVEC 中 ERS 标志蛋白表达较对照组显著上调；透射电镜观察发现，KD 组内皮细胞内质网呈现特征性囊泡扩张和核糖体脱落现象。铜螯合剂 TTM 干预可有效降低小鼠心脏组织铜沉积，下调小鼠心脏组织和 HUVEC 中 ERS 标志蛋白表达，提示铜过载可能是 KD 发病过程中 ERS 的关键触发因素。有研究证实，铜过载可诱导肝细胞 ERS，通过 CHOP-Caspase-12 途径激活细胞凋亡信号[20]，慢性铜暴露不仅可诱导 ERS，还能通过激活 NLRP3 炎症小体加剧炎症级联反应[21-22]。这些证据共同构建了“铜过载-ERS-内皮凋亡–血管内皮损伤”的病理轴，为理解 KD 血管病变提供了新的分子机制框架。

本研究动物实验结果发现，经 TTM 处理后的 KD 小鼠，铜沉积程度显著改善，冠状动脉损伤和腹主动脉扩张明显改善；细胞实验结果发现，KD+TTM 组 HUVEC 较 KD 组细胞增殖、迁移及成管能力明显改善。结果表明，铜过载对血管内皮功能具有调控作用。有研究表明，TTM 除发挥铜稳态调节作用外，可能通过下调成纤维细胞生长因子 2 和血小板衍生生长因子亚基 B 等促血管生成因子，发挥抗增殖效应[23]。这些关于 TTM 的治疗效果评估，为开发靶向铜代谢的 KD 治疗策略提供了重要的前期实验依据。

本研究仍存在一定局限性，后续将结合单细胞转录组测序技术，深入解析铜代谢相关基因在 KD 不同病程阶段的动态变化规律。

综上，本研究证实高浓度铜离子在 KD 血管内皮损伤中起关键作用，铜过载可通过介导 ERS 触发血管内皮损伤，而 TTM 能显著改善 ERS 标志蛋白异常表达，并修复血管内皮功能。这些发现为 KD 的精准治疗提供了新的理论和实验依据。

作者贡献声明：温世芳负责实验设计及实施，陈涛参与部分实验，赵建美、汤志远、申娴娟负责指导实验设计、实施及文章的写作及修订。

利益冲突声明：所有作者声明无利益冲突。

［参 考 文 献］

[1] Fukazawa R, Kobayashi J, Ayusawa M, et al. JCS/JSCS 2020 guideline on diagnosis and management of cardiovascular sequelae in Kawasaki disease[J]. Circ J, 2020, 84(8): 1348-1407. PMID: 32641591. DOI: 10.1253/circj.CJ-19-1094.

[2] Burns JC. The etiologies of Kawasaki disease[J]. J Clin Invest, 2024, 134(5): e176938. PMID: 38426498. PMCID: PMC10904046. DOI: 10.1172/JCI176938.

[3] Kobayashi T, Ayusawa M, Suzuki H, et al. Revision of diagnostic guidelines for Kawasaki disease (6th revised edition) [J]. Pediatr Int, 2020, 62(10): 1135-1138. PMID: 33001522. DOI: 10.1111/ped.14326.

[4] McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American Heart Association[J]. Circulation, 2017, 135(17): e927-e999. PMID: 28356445. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000484.

[5] Battson ML, Lee DM, Gentile CL. Endoplasmic reticulum stress and the development of endothelial dysfunction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 312(3): H355-H367. PMID: 27923788. DOI: 10.1152/ajpheart.00437.2016.

[6] Wang Z, Yang B, Chen X, et al. Nobiletin regulates ROS/ADMA/DDAHII/eNOS/NO pathway and alleviates vascular endothelium injury by iron overload[J]. Biol Trace Elem Res, 2020, 198(1): 87-97. PMID: 32002792. DOI: 10.1007/s12011-020-02038-6.

[7] Fan X, Yang G, Yang Z, et al. Catecholamine induces endothelial dysfunction via angiotensin II and intermediate conductance calcium activated potassium channel[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 177: 116928. PMID: 38889637. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116928.

[8] Gouaref I, Otmane A, Makrelouf M, et al. Crucial interactions between altered plasma trace elements and fatty acids unbalance ratio to management of systemic arterial hypertension in diabetic patients: focus on endothelial dysfunction[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(17): 9288. PMID: 39273236. PMCID: PMC11395650. DOI: 10.3390/ijms25179288.

[9] Maier JA. Novel insights into an old story: magnesium and vascular tone[J]. Acta Physiol (Oxf), 2024, 240(3): e14110. PMID: 38314446. DOI: 10.1111/apha.14110.

[10] Liu Y, Miao J. An emerging role of defective copper metabolism in heart disease[J]. Nutrients, 2022, 14(3): 700. PMID: 35277059. PMCID: PMC8838622. DOI: 10.3390/nu14030700.

[11] Isei MO, Kamunde C. Effects of copper and temperature on heart mitochondrial hydrogen peroxide production[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 147: 114-128. PMID: 31825803. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.006.

[12] Poursani EM, Mercatelli D, Raninga P, et al. Copper chelation suppresses epithelial-mesenchymal transition by inhibition of canonical and non-canonical TGF-β signaling pathways in cancer[J]. Cell Biosci, 2023, 13(1): 132. PMID: 37480151. PMCID: PMC10362738. DOI: 10.1186/s13578-023-01083-7.

[13] Duong TT, Silverman ED, Bissessar MV, et al. Superantigenic activity is responsible for induction of coronary arteritis in mice: an animal model of Kawasaki disease[J]. Int Immunol, 2003, 15(1): 79-89. PMID: 12502728. DOI: 10.1093/intimm/dxg007.

[14] Takahashi K, Oharaseki T, Wakayama M, et al. Histopathological features of murine systemic vasculitis caused by *Candida albicans* extract: an animal model of Kawasaki disease[J]. Inflamm Res, 2004, 53(2): 72-77. PMID: 15021972. DOI: 10.1007/s00011-003-1225-1.

[15] Wei T, Wang Q, Chen T, et al. The possible association of mitochondrial fusion and fission in copper deficiency-induced oxidative damage and mitochondrial dysfunction of the heart[J]. J Trace Elem Med Biol, 2024, 85: 127483. PMID: 38878467. DOI: 10.1016/j.jtemb.2024.127483.

[16] Baker ZN, Jett K, Boulet A, et al. The mitochondrial metallochaperone SCO1 maintains CTR1 at the plasma membrane to preserve copper homeostasis in the murine heart[J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(23): 4617-4628. PMID: 28973536. PMCID: PMC5886179. DOI: 10.1093/hmg/ddx344.

[17] Liu H, Guo H, Deng H, et al. Copper induces hepatic inflammatory responses by activation of MAPKs and NF-κB signalling pathways in the mouse[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 201: 110806. PMID: 32512418. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110806.

[18] Wu H, Guo H, Liu H, et al. Copper sulfate-induced endoplasmic reticulum stress promotes hepatic apoptosis by activating CHOP, JNK and caspase-12 signaling pathways[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 191: 110236. PMID: 32001424. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110236.

[19] Guo H, Ouyang Y, Yin H, et al. Induction of autophagy via the ROS-dependent AMPK-mTOR pathway protects copper-induced spermatogenesis disorder[J]. Redox Biol, 2022, 49: 102227. PMID: 34979450. PMCID: PMC8728583. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102227.

[20] Delsouc MB, Conforti RA, Vitale DL, et al. Antiproliferative and antiangiogenic effects of ammonium tetrathiomolybdate in a model of endometriosis[J]. Life Sci, 2021, 287: 120099. PMID: 34715139. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120099.

[21] Zhou Q, Zhang Y, Lu L, et al. Copper induces microglia-mediated neuroinflammation through ROS/NF-κB pathway and mitophagy disorder[J]. Food Chem Toxicol, 2022, 168: 113369. PMID: 35985369. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113369.

[22] Zhao G, Sun H, Zhang T, et al. Copper induce zebrafish retinal developmental defects via triggering stresses and apoptosis[J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 45. PMID: 32169084. PMCID: PMC7071659. DOI: 10.1186/s12964-020-00548-3.

[23] Delsouc MB, Conforti RA, Vitale DL, et al. Antiproliferative and antiangiogenic effects of ammonium tetrathiomolybdate in a model of endometriosis[J]. Life Sci, 2021, 287: 120099. PMID: 34715139. PMID: 34715139. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120099.

（本文编辑：杨丹）

（版权所有©2025 中国当代儿科杂志）