

血小板衍生生长因子 BB 在川崎病血小板增多中的作用及机制研究

沈西伟^{1,2} 汤志远³ 申娟娟⁴ 赵建美^{1,2}

(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.南通大学附属医院药剂科, 江苏南通 226001; 4.南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的** 通过体内外实验探究血小板衍生生长因子 BB (platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB) 对川崎病 (Kawasaki disease, KD) 小鼠和人巨核细胞株 Dami 细胞生成血小板的作用及机制。**方法** ELISA 检测 KD 及健康儿童各 40 例血清 PDGF 表达水平。C57BL/6 小鼠构建 KD 模型, 随机分为正常组、KD 组、伊马替尼组, 每组 30 只。检测各组血常规及 PDGF-BB、巨核细胞集落形成单位 (megakaryocyte colony forming unit, CFU-MK)、巨核细胞标记物 CD41 表达。采用 CCK-8、流式细胞术、实时定量 PCR、Western blot 检测 PDGF-BB 对 Dami 细胞生成血小板的作用和机制。**结果** PDGF-BB 在 KD 患儿血清中高表达 ($P<0.001$)。KD 组小鼠血清 PDGF-BB 高表达 ($P<0.05$)、CFU-MK 及巨核细胞标记物 CD41 表达增加 ($P<0.001$); 伊马替尼组 CFU-MK 及 CD41 表达减少 ($P<0.001$)。体外实验结果显示, PDGF-BB 促进 Dami 细胞增殖、血小板生成、PDGFR- β mRNA 及 p-Akt 蛋白表达 ($P<0.05$); 联合组 (PDGF-BB 25 ng/mL+伊马替尼 20 μ mol/L) 血小板生成、PDGFR- β mRNA 和 p-Akt 蛋白表达少于 PDGF-BB 组 ($P<0.05$)。**结论** PDGF-BB 可能通过与 PDGFR- β 结合, 激活 PI3K/Akt 通路, 促进巨核细胞增殖、分化及血小板生成; PDGFR- β 抑制剂伊马替尼可减少血小板生成, 为 KD 血小板增多的诊疗提供了新的策略。

[中国当代儿科杂志, 2023, 25 (6): 579-586]

[关键词] 川崎病; 血小板增多症; 血小板衍生生长因子 BB; Dami 细胞; 儿童; 小鼠

Role and mechanism of platelet-derived growth factor BB in thrombocytosis in Kawasaki disease

SHEN Xi-Wei, TANG Zhi-Yuan, SHEN Xian-Juan, 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 study the role and mechanism of platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) on platelet production in Kawasaki disease (KD) mice and human megakaryocytic Dami cells through *in vitro* and *in vivo* experiments. **Methods** ELISA was used to measure the expression of PDGF in the serum of 40 children with KD and 40 healthy children. C57BL/6 mice were used to establish a model of KD and were then randomly divided into a normal group, a KD group, and an imatinib group (30 mice in each group). Routine blood test was performed for each group, and the expression of PDGF-BB, megakaryocyte colony forming unit (CFU-MK), and the megakaryocyte marker CD41 were measured. CCK-8, flow cytometry, quantitative real-time PCR, and Western blot were used to analyze the role and mechanism of PDGF-BB in platelet production in Dami cells. **Results** PDGF-BB was highly expressed in the serum of KD children ($P<0.001$). The KD group had a higher expression level of PDGF-BB in serum ($P<0.05$) and significant increases in the expression of CFU-MK and CD41 ($P<0.001$), and the imatinib group had significant reductions in the expression of CFU-MK and CD41 ($P<0.001$). *In vitro* experiments showed that PDGF-BB promoted Dami cell proliferation, platelet production, mRNA expression of PDGFR- β , and protein expression of p-Akt ($P<0.05$). Compared

[收稿日期] 2023-02-01; [接受日期] 2023-04-21

[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); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (KYCX21_3114); 南通市科技项目 (MS22022116)。

[作者简介] 沈西伟, 男, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 赵建美, 女, 主任医师, 教授。Email: 2687084388@qq.com。

with the PDGF-BB group, the combination group (PDGF-BB 25 ng/mL + imatinib 20 μ mol/L) had significantly lower levels of platelet production, mRNA expression of PDGFR- β , and protein expression of p-Akt ($P < 0.05$). **Conclusions** PDGF-BB may promote megakaryocyte proliferation, differentiation, and platelet production by binding to PDGFR- β and activating the PI3K/Akt pathway, and the PDGFR- β inhibitor imatinib can reduce platelet production, which provides a new strategy for the treatment of thrombocytosis in KD.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(6): 579-586]

Key words: Kawasaki disease; Thrombocytosis; Platelet-derived growth factor BB; Dami cell; Child; Mouse

川崎病 (Kawasaki disease, KD) 常伴有血小板增多, 好发于KD第2~3周。血小板升高增加冠状动脉瘤血栓形成、心肌梗死和死亡的风险^[1-2]。反应性血小板增多症 (reactive thrombocytosis, RT) 指外周血中血小板计数 $>450 \times 10^9/L$, 最常见病因是感染和KD。RT发病机制主要是血小板生成增加, 主要与血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) 升高有关^[2-3]。但是, Ishiguro等^[4]发现KD病程中血小板计数正常的患儿TPO水平高于健康对照组; 在KD第1周血小板计数正常时, 血清TPO水平升高; 当KD第2周血小板计数明显升高达峰值时, TPO水平没有下降; KD第3周时TPO水平与健康对照组相当。Miura等^[5]发现KD患儿在起病第3周血小板计数明显升高, TPO水平却在第2周时下降。Alberio^[6]发现RT与TPO之间没有明显相关性。这些研究^[4-6]表明KD患儿血小板增多的机制尚不清楚。

血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 成员包括PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-CC、PDGF-DD等。其中, PDGF-BB与血小板衍生生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) 结合, 促进造血干细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等增殖, 而酪氨酸酶抑制剂如伊马替尼能够抑制PDGFR活性^[7]。PDGF-BB/PDGFR- β 信号通路与造血系统关系密切。Kaminski等^[8]证明敲除小鼠PDGF-BB和PDGFR- β 基因可诱发血小板减少症。杨默等^[9]证实PDGF-BB/PDGFR- β 能促进造血干细胞增殖及血小板生成。周丽霞等^[10]发现PDGF-BB/PDGFR- β 在原发性血小板增多症中高表达。然而, 目前关于KD患儿血小板增多的机制尚不明确。因此, 本研究首先在临床层面探究PDGF-BB在KD患儿急性期是否升高; 其次, 在动物层面验证PDGF-BB在KD小鼠中的表达情况及其在血小板生成中的作用; 最后, 在细胞层面探究PDGF-BB对Dami细胞生成血小板的机制, 为KD诊治寻找新的策略。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2020年9月—2022年10月我院儿内科住院的40例KD患儿为KD组, 其中男23例 (58%)、女17例 (42%); 年龄从3个月至9岁, 平均年龄为 (35 ± 23) 个月。纳入标准: (1) 符合KD诊断标准^[11]; (2) 病程7 d以内; (3) 静脉注射免疫球蛋白 (intravenous immunoglobulin, IVIG) 2 g/kg单次治疗后体温正常; (4) 临床资料完整。排除标准: (1) 入院前接受IVIG、糖皮质激素、阿司匹林治疗者; (2) 肿瘤及免疫性疾病者。

选取同期在体检中心体检且无感染史的健康儿童40例为健康对照组, 其中男26例 (65%)、女14例 (35%); 年龄从1个月至9岁, 平均年龄为 (37 ± 24) 个月。两组在年龄 ($t=0.438$, $P=0.662$)、性别 ($\chi^2=0.474$, $P=0.491$) 上比较差异无统计学意义。本研究经我院伦理委员会批准 (2018-K021) 及家长签署知情同意书。

1.2 细胞和试剂

Dami细胞株 (北纳创联生物科技有限公司, 中国); 胎牛血清 (北京沃卡威生物技术有限公司); CCK-8试剂 (兰杰柯科技有限公司, 中国); 重组人PDGF-BB (PeproTech, 美国); 伊马替尼 (上海毕得医药科技股份有限公司, 中国); Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒、FITC标记的抗小鼠CD41抗体 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 中国); FITC标记的抗人CD61抗体 (eBioscience, 美国); 人PDGF、小鼠PDGF-BB及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA试剂盒 (上海源桔生物科技公司, 中国); HiScript III RT SuperMix for qPCR、ChamQ SYBR qPCR Master PCR (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 中国); 乙酰胆碱酯酶染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 中国); 兔抗人Akt、p-Akt及鼠抗人 β -actin抗体 (Proteintech, 美国); 山羊抗兔、

山羊抗小鼠荧光二抗 (Cell Signaling Technology, 美国)。

1.3 ELISA检测PDGF表达

收集KD组入院次日清晨和健康对照组儿童空腹全血3 mL, 分离上清冻存于-80℃。ELISA试剂盒常温冷却, 按说明书操作, 计算PDGF浓度。

1.4 实验动物及分组

SPF级3~4周龄雄性C57BL/6小鼠90只 [生产许可证号: SCXK(苏)2020-0009, 使用许可证号: SYXK(苏)2017-0046], 平均体重13~15 g, 购于江苏华创信诺医药科技公司, 饲养温度20~23℃, 湿度50%~60%, 12 h明暗光交替, 自由饮水与进食。获南通大学伦理委员会批准 (IACUC 20220829-1001)。适应性饲养1周后将小鼠随机分为3组: 正常组、KD组和伊马替尼组, 每组各30只。

1.5 构建KD小鼠模型

参考Duong等^[12] KD造模方法。KD组于第1天以干酪乳杆菌细胞壁提取物0.25 mL (0.5 mg) 腹腔注射1次。伊马替尼组于第1天以干酪乳杆菌细胞壁提取物0.25 mL (0.5 mg) 腹腔注射1次, 第2天起以伊马替尼溶液 (50 mg/kg) 灌胃, 1次/d, 持续27 d。正常组第1天腹腔注射等量磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS), 然后与KD组于第2天起分别用等量PBS灌胃, 1次/d, 持续27 d。

1.6 心脏组织苏木精-伊红染色

第14天每组随机取5只小鼠的心脏组织, 经固定、脱水、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色后, 镜下观察心脏组织, 使用Image J软件分析炎症细胞数量^[13]。

1.7 小鼠血常规和细胞因子检测

每组随机取5只小鼠分别于第0天行眼眶取血, 第3、7、14、21、28天摘眼球取血, 将50 μL血样置于抗凝管中, 行血常规检测; 其余血样离心收集血清, 保存-80℃冰箱中, ELISA检测PDGF-BB及TNF-α。

1.8 小鼠骨髓巨核细胞集落形成单位培养及巨核细胞标记物CD41检测

第21天每组随机取5只小鼠颈椎脱臼法处死后, 取双侧股骨, 消毒后用5 mL注射器吸取4 mL IMDM培养基冲洗骨髓腔, 离心收集细胞。取骨髓细胞 2×10^5 /mL接种于6孔板中培养7 d (1 mL培养

体系为IMDM培养基0.6 mL、1%牛血清白蛋白0.1 mL、0.34 mg氯化钙、10%牛血浆0.1 mL、50 ng/mL TPO 10 μL)。培养结束后干燥。每孔2 mL 1%多聚甲醛固定15 min, PBS冲洗后干燥。乙酰胆碱酯酶染色液室温染色4 h后以50%甲醇、PBS洗涤1次, 镜下计数骨髓巨核细胞集落形成单位 (megakaryocyte colony forming unit, CFU-MK)。

CD41是巨核细胞分化成熟标记物。取适量骨髓细胞, 100 μL PBS重悬, 加入CD41单抗5 μL, 避光孵育20 min后上机检测。

1.9 细胞培养

Dami细胞种植于T25培养瓶中, 用含13%胎牛血清的RPMI-1640培养基, 在37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.10 CCK-8细胞增殖实验

取对数生长期的Dami细胞接种于96孔板。PDGF-BB按0、6.25、12.5、25、50、100 ng/mL与细胞共培养, 在24、48、72 h时加入10 μL CCK-8试剂, 孵育3 h后酶标仪检测450 nm处吸光度值。实验独立重复至少3次。

1.11 血小板生成实验及其标记物CD61检测

将PDGF-BB按0、12.5、25、50、100 ng/mL与细胞共培养24 h, PDGF-BB 25 ng/mL+伊马替尼20 μmol/L与细胞共培养24 h。800 r/min离心10 min收集上清, 2 500 r/min离心10 min收集沉淀即血小板。100 μL PBS重悬血小板后, 用自动血液细胞分析仪检测血小板数量。CD61是血小板表面标记物。将PDGF-BB按6.25、25、100 ng/mL与细胞共培养24 h, 用上述同样方法收集血小板, 加入CD61单抗及同型抗体各0.25 μg, 避光孵育20 min后上机检测。实验独立重复至少3次。

本部分实验分为对照组、KD组和伊马替尼组。对照组用含10%正常儿童血清的完全培养基培养; KD组和伊马替尼组用含10% KD急性期患儿血清的完全培养基培养, 后者同时添加伊马替尼 (20 μmol/L)。培养24 h后用上述同样方法收集检测血小板数量。实验独立重复至少3次。

1.12 实时定量PCR检测PDGFR mRNA表达

本部分实验分为对照组、PDGF-BB (25 ng/mL)组、伊马替尼 (20 μmol/L)组和联合组 (PDGF-BB 25 ng/mL+伊马替尼20 μmol/L), 培养细胞24 h后提取RNA。按逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA, 以其为模板, 按PCR试剂盒进行PCR反

应。引物序列如下，PDGFR- α ：上游5'-GCTTGAAGGCA-GGCACATTTACATC-3'，下游5'-AAGGTTACA-GGAGTCTCGGGATCAG-3'；PDGFR- β ：上游5'-CCAGAAGCCATCAGCAGCAAGG-3'，下游5'-CGAGCAGGTCAGAACGAAGGTG-3'； β -actin：上游5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'，下游5'-GGGCCGACTCGTCATAC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算结果。实验独立重复至少3次。

1.13 Western blot检测蛋白表达

本部分实验分为对照组、PDGF-BB (25 ng/mL)组、伊马替尼 (20 μ mol/L)组和联合组 (PDGF-BB 25 ng/mL+伊马替尼 20 μ mol/L)。培养细胞24 h后RIPA裂解液提取蛋白，通过SDS-PAGE电泳将蛋白转移至PVDF膜上，快速封闭液室温封闭10 min，加入一抗Akt、p-Akt (浓度均为1:5 000)、 β -actin (1:10 000)，4 $^{\circ}$ C过夜。洗膜后室温孵育荧光二抗 (1:10 000) 1 h，洗膜后显影。实验独立重复至少3次。

1.14 统计学分析

使用GraphPad Prism 10.0软件对数据进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示，两组间比较采用Student's t 检验，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。相关性分析采用Pearson检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组儿童血清PDGF与血常规指标比较

与健康对照组相比，KD组血清PDGF-BB、白细胞计数、中性粒细胞绝对值及血小板计数增高 ($P < 0.001$)，红细胞计数及血红蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。两组PDGF-AA、PDGF-CC、PDGF-DD水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表1。

2.2 KD组患儿血清PDGF-BB与血常规指标的相关性分析

KD组患儿急性期血清PDGF-BB与血小板计数呈正相关 ($r = 0.397$, $P < 0.05$)，见表2。

2.3 小鼠冠状动脉病理学变化

与正常组相比，KD组冠状动脉炎症细胞数量增多 ($P < 0.001$)；与KD组相比，伊马替尼组冠状动脉炎症细胞数量变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表3。

表1 两组儿童血清PDGF与血常规指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	健康对照组 (n=40)	KD组 (n=40)	t值	P值
PDGF-AA (ng/mL)	0.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3	0.747	0.458
PDGF-BB (pg/mL)	4.7 \pm 0.6	15.2 \pm 3.1	20.270	<0.001
PDGF-CC (ng/mL)	1.01 \pm 0.34	1.05 \pm 0.33	0.553	0.582
PDGF-DD (ng/mL)	1.85 \pm 0.52	1.78 \pm 0.52	0.625	0.534
白细胞计数 ($\times 10^9/L$)	7 \pm 2	14 \pm 4	9.160	<0.001
中性粒细胞绝对值 ($\times 10^9/L$)	2.6 \pm 1.5	9.3 \pm 3.9	10.110	<0.001
红细胞计数 ($\times 10^{12}/L$)	4.5 \pm 0.3	4.2 \pm 0.4	2.576	0.012
血红蛋白 (g/L)	121 \pm 9	115 \pm 11	2.464	0.016
血小板计数 ($\times 10^9/L$)	260 \pm 46	336 \pm 89	4.810	<0.001

注：[PDGF]血小板衍生生长因子；[KD]川崎病。

表2 KD组患儿血清PDGF-BB与血常规指标的相关性分析
(n=40)

指标	r值	P值
白细胞计数 ($\times 10^9/L$)	-0.044	0.787
中性粒细胞绝对值 ($\times 10^9/L$)	0.068	0.675
红细胞计数 ($\times 10^{12}/L$)	0.078	0.635
血红蛋白 (g/L)	-0.066	0.684
血小板计数 ($\times 10^9/L$)	0.397	0.011

表3 各组小鼠冠状动脉炎症细胞数量比较 ($\bar{x} \pm s$, n=5)

组别	炎症细胞 ($\times 10^3/mm^2$)
正常组	6.5 \pm 1.2
KD组	14.4 \pm 1.6 ^a
伊马替尼组	14.8 \pm 2.3
F值	36.000
P值	<0.001

注：[KD]川崎病。a示与正常组比较， $P < 0.05$ 。

2.4 小鼠血常规及血清细胞因子比较

与正常组相比，KD组白细胞计数第3、7、14天时升高 ($P < 0.05$)，血小板计数第7、14、21天时升高 ($P < 0.001$)，红细胞计数、血红蛋白水平变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与KD组相比，伊马替尼组白细胞计数、红细胞计数、血红蛋白水平变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，血小板计数第14、21天时降低 ($P < 0.001$)。见表4~7。

与正常组相比，KD组第3、7、14、21天时PDGF-BB、TNF- α 浓度升高 ($P < 0.05$)；与KD组相比，伊马替尼组PDGF-BB、TNF- α 变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表8~9。

表 4 各组小鼠外周血白细胞计数比较 ($\bar{x} \pm s, n=5, \times 10^9/L$)

组别	0 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	6.6 ± 1.3	6.2 ± 0.7	6.4 ± 0.6	5.8 ± 1.2	6.0 ± 1.8	5.8 ± 0.7
KD组	6.2 ± 1.2	9.4 ± 1.1 ^a	10.7 ± 1.2 ^a	8.4 ± 0.8 ^a	6.0 ± 1.3	5.5 ± 1.1
伊马替尼组	5.9 ± 1.3	9.6 ± 1.2	10.2 ± 1.1	8.4 ± 0.9	5.9 ± 1.2	5.6 ± 1.5
F值	0.345	17.570	21.530	11.44	0.012	0.088
P值	0.715	<0.001	<0.001	0.002	0.988	0.917

注: [KD] 川崎病。a 示与正常组比较, $P < 0.05$ 。

表 5 各组小鼠外周血红细胞计数比较 ($\bar{x} \pm s, n=5, \times 10^{12}/L$)

组别	0 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	8.62 ± 0.55	8.57 ± 0.45	8.58 ± 0.45	9.42 ± 0.38	9.81 ± 0.25	9.60 ± 0.37
KD组	8.62 ± 0.43	8.53 ± 0.32	8.69 ± 0.32	9.37 ± 0.51	9.70 ± 0.28	9.27 ± 0.38
伊马替尼组	8.45 ± 0.47	8.63 ± 0.61	8.68 ± 0.52	9.37 ± 0.64	9.84 ± 0.13	9.33 ± 0.43
F值	0.003	0.060	0.099	0.014	0.507	1.028
P值	0.997	0.942	0.906	0.986	0.614	0.387

注: [KD] 川崎病。

表 6 各组小鼠外周血血红蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=5, g/L$)

组别	0 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	130.2 ± 9.7	132.2 ± 4.0	129.0 ± 3.8	137.2 ± 5.1	143.8 ± 4.3	139.8 ± 3.4
KD组	130.4 ± 4.7	131.8 ± 2.4	131.4 ± 3.0	137.8 ± 7.7	141.8 ± 5.4	136.0 ± 3.5
伊马替尼组	127.2 ± 5.0	132.6 ± 5.5	129.8 ± 4.9	137.0 ± 7.9	142.6 ± 3.0	136.4 ± 4.7
F值	0.340	0.047	0.477	0.018	0.271	1.437
P值	0.718	0.954	0.632	0.983	0.768	0.276

注: [KD] 川崎病。

表 7 各组小鼠外周血小板计数比较 ($\bar{x} \pm s, n=5, \times 10^9/L$)

组别	0 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	581 ± 43	560 ± 93	566 ± 83	559 ± 64	607 ± 34	578 ± 49
KD组	571 ± 44	569 ± 30	888 ± 45 ^a	1 046 ± 83 ^a	768 ± 37 ^a	571 ± 65
伊马替尼组	582 ± 35	579 ± 63	862 ± 49	870 ± 36 ^b	639 ± 44 ^b	522 ± 44
F值	0.123	0.105	42.610	73.970	24.890	1.628
P值	0.886	0.901	<0.001	<0.001	<0.001	0.237

注: [KD] 川崎病。a 示与正常组比较, $P < 0.05$; b 示与KD组比较, $P < 0.05$ 。

表 8 各组小鼠血清 PDGF-BB 浓度比较 ($\bar{x} \pm s, n=5, pg/mL$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	439 ± 36	390 ± 33	472 ± 23	442 ± 43	426 ± 21
KD组	1 761 ± 193 ^a	1 984 ± 286 ^a	1 929 ± 150 ^a	778 ± 176 ^a	454 ± 45
伊马替尼组	1 782 ± 220	2 187 ± 209	1 766 ± 354	748 ± 91	422 ± 34
F值	102.300	109.300	64.560	12.720	1.320
P值	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.303

注: [KD] 川崎病。a 示与正常组比较, $P < 0.05$ 。

表 9 各组小鼠血清 TNF- α 浓度比较 ($\bar{x} \pm s, n=5, pg/mL$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	45.4 ± 7.1	39.3 ± 1.2	51.2 ± 10.5	36.6 ± 2.8	37.0 ± 4.8
KD组	256.3 ± 45.1 ^a	297.0 ± 62.0 ^a	294.7 ± 50.4 ^a	105.7 ± 13.8 ^a	46.1 ± 9.1
伊马替尼组	258.3 ± 8.1	297.8 ± 62.8	263.7 ± 19.9	111.9 ± 13.4	51.9 ± 15.0
F值	104.500	42.790	86.710	69.180	2.543
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.12

注: [KD] 川崎病。a 示与正常组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 各组小鼠 CFU-MK 及巨核细胞标记物 CD41 的比较

KD 组 CFU-MK 数量高于正常组 ($P<0.001$), 伊马替尼组 CFU-MK 数量低于 KD 组 ($P<0.001$)。KD 组 CD41 表达高于正常组 ($P<0.001$), 伊马替尼组 CD41 表达低于 KD 组 ($P<0.001$)。见表 10。

表 10 各组小鼠 CFU-MK 数量、CD41 表达的比较

组别	CFU-MK		CD41	
	(个/ 2×10^5 cells, $n=5$)		(%, $n=3$)	
正常组	20.0 ± 1.6		16.0 ± 1.6	
KD 组	35.8 ± 2.5 ^a		40.2 ± 2.7 ^a	
伊马替尼组	24.8 ± 3.1 ^b		15.7 ± 2.4 ^b	
<i>F</i> 值	53.490		113.700	
<i>P</i> 值	<0.001		<0.001	

注: [KD] 川崎病; [CFU-MK] 巨核细胞集落形成单位。a 示与正常组比较, $P<0.001$; b 示与 KD 组比较, $P<0.001$ 。

2.6 PDGF-BB 对 Dami 细胞增殖的影响

PDGF-BB 与 Dami 细胞共培养 24、48、72 h 后, PDGF-BB 对 Dami 细胞的增殖作用与其浓度有关。24 h、72 h 时 PDGF-BB 25 ng/mL 促进细胞增殖的作用最显著 ($P<0.05$); 48 h 时 PDGF-BB 25 ng/mL 促进细胞增殖的作用与 PDGF-BB 12.5 ng/mL 相当, 优于其他浓度组 ($P<0.05$)。见表 11。

表 11 不同浓度 PDGF-BB 对 Dami 细胞增殖的影响

PDGF-BB (ng/mL)	吸光度值		
	24 h	48 h	72 h
0	0.427 ± 0.012	0.752 ± 0.030	1.440 ± 0.038
6.25	0.450 ± 0.012	0.806 ± 0.019 ^a	1.553 ± 0.014 ^a
12.5	0.456 ± 0.013 ^a	0.859 ± 0.008 ^{a,b}	1.579 ± 0.016 ^a
25	0.500 ± 0.007 ^{a,b,c}	0.890 ± 0.026 ^{a,b}	1.724 ± 0.030 ^{a,b,c}
50	0.464 ± 0.014 ^{a,d}	0.794 ± 0.014 ^{a,c,d}	1.530 ± 0.026 ^{a,d}
100	0.454 ± 0.017 ^{a,d}	0.715 ± 0.009 ^{b,c,d}	1.363 ± 0.028 ^{a,b,c,d}
<i>F</i> 值	17.650	55.520	109.300
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

注: [PDGF] 血小板衍生生长因子。a 示与 0 ng/mL 组比较, $P<0.05$; b 示与 6.25 ng/mL 组比较, $P<0.05$; c 示与 12.5 ng/mL 组比较, $P<0.05$; d 示与 25 ng/mL 组比较, $P<0.05$ 。

2.7 KD 急性期患儿血清与 PDGF-BB 对血小板生成的影响

Dami 细胞单独培养时, 未检测到血小板。与

对照组相比, KD 组血小板生成增加, 加入伊马替尼后血小板生成减少 ($P<0.05$)。不同浓度的 PDGF-BB 可诱导 Dami 细胞生成血小板, PDGF-BB 25 ng/mL 加入伊马替尼后血小板生成减少 ($P<0.001$)。见表 12~13。

表 12 KD 急性期患儿血清对血小板生成的影响

组别	血小板计数 ($\times 10^9/L$)
对照组	0 ± 0
KD 组	3.8 ± 0.8 ^a
伊马替尼组	1.8 ± 0.8 ^b
<i>F</i> 值	38.710
<i>P</i> 值	<0.001

注: [KD] 川崎病。a 示与对照组比较, $P<0.001$; b 示与 KD 组比较, $P<0.05$ 。

表 13 PDGF-BB 对血小板生成的影响

PDGF-BB (ng/mL)	血小板计数 ($\times 10^9/L$)
0	0 ± 0
12.5	6.40 ± 1.14 ^a
25	12.00 ± 2.24 ^a
50	9.80 ± 1.92 ^a
100	7.40 ± 0.89 ^a
25 ng/mL PDGF-BB+20 μ mol/L 伊马替尼	6.80 ± 0.84 ^b
<i>F</i> 值	36.020
<i>P</i> 值	<0.001

注: [PDGF] 血小板衍生生长因子。a 示与 0 ng/mL 组比较, $P<0.001$; b 示与 25 ng/mL 组比较, $P<0.001$ 。

2.8 PDGF-BB 对血小板标记物 CD61 的影响

PDGF-BB 6.25、25、100 ng/mL 作用于 Dami 细胞 24 h 后, CD61 表达比例分别为 (14.4 ± 1.2)%、(25.3 ± 4.4)%、(18.4 ± 1.6)%, 差异有统计学意义 ($F=11.850$, $P=0.008$)。经组间两两比较, 25 ng/mL 组 CD61 表达比例高于 6.25 ng/mL 组 ($P<0.05$)。

2.9 PDGF-BB 对 Dami 细胞 PDGFR mRNA 的影响

与对照组相比, PDGF-BB 组 PDGFR- α mRNA 表达无显著变化 ($P>0.05$), PDGFR- β mRNA 表达增加, 加入伊马替尼后 PDGFR- β mRNA 表达下调 ($P<0.05$), 见表 14。

表 14 各组 Dami 细胞 PDGFR mRNA 相对表达量的比较
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PDGFR- α	PDGFR- β
对照组	0.98 \pm 0.03	1.04 \pm 0.06
PDGF-BB 组	0.98 \pm 0.13	1.48 \pm 0.17 ^a
伊马替尼组	1.08 \pm 0.12	1.22 \pm 0.07
联合组	0.94 \pm 0.19	0.94 \pm 0.11 ^b
F 值	0.640	13.790
P 值	0.611	0.002

注：[PDGF] 血小板衍生生长因子；[PDGFR] 血小板衍生生长因子受体。a 示与对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与 PDGF-BB 组比较， $P<0.05$ 。

2.10 PDGF-BB 对 Dami 细胞 PI3K/Akt 通路的影响

与对照组相比，PDGF-BB 组 Akt 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)，p-Akt 蛋白表达增加 ($P<0.05$)；与 PDGF-BB 组相比，联合组 Akt 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)，p-Akt 蛋白表达下调 ($P<0.05$)。见图 1、表 15。

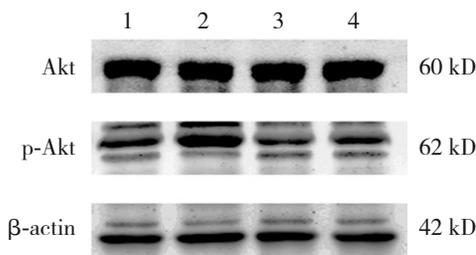


图 1 Western blot 检测各组 Dami 细胞中 Akt、p-Akt 蛋白表达电泳图 1：对照组；2：PDGF-BB 组；3：伊马替尼组；4：联合组。

表 15 各组 Dami 细胞 Akt、p-Akt 蛋白相对表达量的比较
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Akt	p-Akt
对照组	2.72 \pm 0.43	0.80 \pm 0.03
PDGF-BB 组	2.54 \pm 0.17	1.24 \pm 0.17 ^a
伊马替尼组	2.51 \pm 0.07	0.73 \pm 0.14
联合组	2.44 \pm 0.08	0.87 \pm 0.15 ^b
F 值	0.756	8.628
P 值	0.549	0.007

注：[PDGF] 血小板衍生生长因子。a 示与对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与 PDGF-BB 组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

本研究通过病例研究发现 PDGF-BB 在 KD 患儿

急性期血清中高表达，与血小板计数呈正相关，提示 PDGF-BB 可能参与血小板生成。通过 KD 小鼠模型，证实 PDGF-BB 在 KD 小鼠中高表达，并促进 CFU-MK 形成、巨核细胞分化及血小板生成。通过细胞实验证实 Dami 细胞在 PDGF-BB 诱导下高表达 PDGFR- β mRNA 及 p-Akt 蛋白，伊马替尼抑制 PDGFR- β 后，下调巨核细胞 CD41、PDGFR- β mRNA 及 p-Akt 蛋白表达，影响血小板生成。这与罗毅等^[14]证实 PDGF-BB 在骨髓抑制小鼠模型中促进巨核细胞增殖和血小板生成的结论相符合。

PDGFR 属于受体酪氨酸酶，受到刺激时表达增加^[15]。Yang 等^[16]证实 Dami 细胞表达 PDGFR- α 和 PDGFR- β 。当 PDGFR- α 和 PDGFR- β 同时存在时，PDGF-BB 优先与 PDGFR- β 结合^[17]。研究发现 PDGFR 抑制剂伊马替尼可导致血小板减少^[18]。机制可能是伊马替尼抑制 PDGFR- β ，阻滞 PI3K/Akt 信号通路，影响巨核细胞增殖及血小板生成^[19-20]。

尽管血小板计数升高反映 KD 炎症与疾病的严重程度，但本研究发现抑制 PDGFR 导致血小板计数减少并未减轻 KD 炎症，原因可能是 KD 主要由异常的免疫激活、细胞因子风暴、内皮细胞损伤等多种因素引起^[1]，而 PDGF-BB/PDGFR 只是众多细胞因子网络通路中的一员，单独抑制 PDGFR 可能不会直接减轻 KD 冠状动脉炎症。

综上所述，本研究通过体内外实验，初步探究了 PDGF-BB 在 KD 血小板增多中的作用。PDGF-BB 可能通过与 PDGFR- β 结合，激活 PI3K/Akt 通路，促进巨核细胞的增殖、分化，调节血小板的生成，而伊马替尼能对抗 PDGF-BB 的促增殖作用、减少血小板的生成，这为 KD 的治疗提供了一个新的靶点。本研究仍有不足之处，由于骨髓中的巨核细胞数量非常少，无法为实验提供稳定的原代细胞来源，研究的借鉴意义相对受限；同时细胞之间的信号通路复杂有待进一步的研究。

利益冲突声明：所有作者声明无利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] 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.

[2] Shin J, Lee DH, Jung N, et al. A cross-sectional retrospective study to analyze the underlying causes and clinical

- characteristics of children with reactive thrombocytosis at a Korean tertiary medical center[J]. *Blood Res*, 2018, 53(3): 233-239. PMID: 30310791. PMCID: PMC6170300. DOI: 10.5045/br.2018.53.3.233.
- [3] Harrison CN, Bareford D, Butt N, et al. Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis[J]. *Br J Haematol*, 2010, 149(3): 352-375. PMID: 20331456. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08122.x.
- [4] Ishiguro A, Ishikita T, Shimbo T, et al. Elevation of serum thrombopoietin precedes thrombocytosis in Kawasaki disease[J]. *Thromb Haemost*, 1998, 79(6): 1096-1100. PMID: 9657430.
- [5] Miura N, Terai M, Meng YG, et al. Serum thrombopoietin levels in Kawasaki disease[J]. *Br J Haematol*, 1998, 100(2): 387-388. PMID: 9488632. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1998.00584.x.
- [6] Alberio L. Do we need antiplatelet therapy in thrombocytosis? Pro. Diagnostic and pathophysiologic considerations for a treatment choice[J]. *Hamostaseologie*, 2016, 36(4): 227-240. PMID: 25707870. DOI: 10.5482/HAMO-14-11-0074.
- [7] Su RJ, Zhang XB, Li K, et al. Platelet-derived growth factor promotes *ex vivo* expansion of CD34⁺ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient repopulating cells and formation of adherent cells[J]. *Br J Haematol*, 2002, 117(3): 735-746. PMID: 12028051. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2002.03500.x.
- [8] Kaminski WE, Lindahl P, Lin NL, et al. Basis of hematopoietic defects in platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF β -receptor null mice[J]. *Blood*, 2001, 97(7): 1990-1998. PMID: 11264163. DOI: 10.1182/blood.v97.7.1990.
- [9] 杨默, 束玲玲, 崔韵. PDGF/PDGFR 对血小板生成的调节作用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(5): 1097-1101. PMID: 22040950.
- [10] 周丽霞, 梁恩瑜, 叶洁瑜, 等. PDGF/PDGFR 在原发性血小板增多症中的作用及机制[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(2): 526-530. PMID: 27151023. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2016.02.041.
- [11] 中华医学会儿科学分会心血管学组, 中华医学会儿科学分会风湿学组, 中华医学会儿科学分会免疫学组, 等. 川崎病诊断和急性期治疗专家共识[J]. *中华儿科杂志*, 2022, 60(1): 6-13. PMID: 34986616. DOI: 10.3760/cma.j.cn112140-20211018-00879.
- [12] 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.
- [13] 周美云, 钱元原, 张凡, 等. 银杏黄酮对川崎病小鼠冠状动脉损伤和核因子 κ B 信号的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(2): 221-225. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.02.015.
- [14] 罗毅, 孔惠敏, 苏伟青, 等. PDGF-BB 对放射诱导骨髓抑制模型小鼠的造血保护作用研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2022, 30(6): 1873-1880. PMID: 36476919. DOI: 10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2022.06.039.
- [15] Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor[J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(4): 1283-1316. PMID: 10508235. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.4.1283.
- [16] Yang M, Khachigian LM, Hicks C, et al. Identification of PDGF receptors on human megakaryocytes and megakaryocytic cell lines[J]. *Thromb Haemost*, 1997, 78(2): 892-896. PMID: 9268191.
- [17] Rogers MA, Campaña MB, Long R, et al. PDGFR dimer-specific activation, trafficking and downstream signaling dynamics[J]. *J Cell Sci*, 2022, 135(17): jcs259686. PMID: 35946433. PMCID: PMC9482349. DOI: 10.1242/jcs.259686.
- [18] Repsold L, Pool R, Karodia M, et al. Apoptotic profiling of chronic myeloid leukaemia patients' platelets *ex vivo* before and after treatment with imatinib[J]. *Cell Biochem Funct*, 2021, 39(4): 562-570. PMID: 33569808. DOI: 10.1002/cbf.3625.
- [19] 束玲玲, 江千里, 孟凡义, 等. 伊马替尼治疗 CML 引致血小板减少的分子机制[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(5): 1314-1318. PMID: 22040995.
- [20] Waller CF. Imatinib mesylate[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2018, 212: 1-27. PMID: 30069623. DOI: 10.1007/978-3-319-91439-8_1.

(本文编辑: 王颖)