

小檗碱通过补体和凝血级联改善川崎病 冠状动脉内皮细胞损伤的研究

廖锦文¹ 郭鑫¹ 梁波² 李许霞² 徐明国²

(1. 深圳市龙岗区妇幼保健院/汕头大学医学院龙岗妇幼临床学院, 广东深圳 518172;

2. 深圳市龙岗区第三人民医院儿科, 广东深圳 518020)

[摘要] **目的** 探讨小檗碱 (berberine, BBR) 通过调节补体和凝血级联改善川崎病 (Kawasaki disease, KD) 冠状动脉内皮细胞损伤的作用。**方法** 将人冠状动脉内皮细胞 (human coronary artery endothelial cell, HCAEC) 分为健康对照组、KD组和BBR处理组 (各组 $n=3$)。健康对照组、KD组分别加入健康儿童和KD患儿的15%血清, BBR处理组加入KD患儿的15%血清后再加入浓度20 mmol/L BBR。采用同位素标记相对和绝对定量技术和液相色谱-串联质谱技术分析和鉴定差异蛋白表达, 并对差异蛋白进行GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析; 采用Western blot法检测差异蛋白表达。**结果** KD组与健康对照组之间共鉴定出518个差异蛋白 (上调蛋白300个, 下调蛋白218个)。BBR处理组与KD组之间共鉴定出422个差异蛋白 (上调蛋白221个, 下调蛋白201个)。生物信息学分析结果显示, 与健康对照组比较, KD组差异蛋白富集于补体和凝血级联、真核生物的核糖体生物发生; 与KD组比较, BBR处理组差异蛋白富集于补体和凝血级联、真核生物的核糖体生物发生。Western blot结果显示, 与健康对照组比较, KD组补体C1q亚组分亚基C (complement C1q subcomponent subunit C, C1QC)、激肽原-1 (kininogen-1, KNG1)、补体C1s子组件 (complement C1s subcomponent, C1S)、C4b结合蛋白 α 链 (C4b-binding protein alpha chain, C4BPA) 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与KD组比较, BBR处理组KNG1、C1S、C1QC、C4BPA蛋白表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 补体和凝血级联可能参与调控BBR治疗KD冠状动脉损伤, C1QC、KNG1、C1S和C4BPA可作为其生物标志物。**[中国当代儿科杂志, 2025, 27 (1): 101-108]**

[关键词] 川崎病; 小檗碱; 补体和凝血级联; 冠状动脉病变; 人冠状动脉内皮细胞

Berberine ameliorates coronary artery endothelial cell injury in Kawasaki disease through complement and coagulation cascades

LIAO Jin-Wen, GUO Xin, LIANG Bo, LI Xu-Xia, XU Ming-Guo. Department of Pediatrics, Third People's Hospital of Longgang District of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518020, China (Xu M-G, Email: 18938690175@163.com)

Abstract: Objective To explore the role of berberine (BBR) in ameliorating coronary endothelial cell injury in Kawasaki disease (KD) by regulating the complement and coagulation cascade. **Methods** Human coronary artery endothelial cells (HCAEC) were divided into a healthy control group, a KD group, and a BBR treatment group ($n=3$ for each group). The healthy control group and KD group were supplemented with 15% serum from healthy children and KD patients, respectively, while the BBR treatment group received 15% serum from KD patients followed by the addition of 20 mmol/L BBR. Differential protein expression was analyzed and identified using isobaric tags for relative and absolute quantitation technology and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, followed by GO functional enrichment analysis and KEGG signaling pathway enrichment analysis of the differential proteins. Western blot was used to detect differential protein expression. **Results** A total of 518 differential proteins were identified between the KD group and the healthy control group (300 upregulated proteins and 218 downregulated proteins). A total of 422 differential proteins were identified between the BBR treatment group and the KD group (221 upregulated proteins and

[收稿日期] 2024-06-19; **[接受日期]** 2024-10-14

[基金项目] 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2022A1515012468); 深圳市龙岗区科技创新专项资金 (LGKCYLWS2022035)。

[作者简介] 廖锦文, 男, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 徐明国, 男, 主任医师。Email: 18938690175@163.com。

201 downregulated proteins). Bioinformatics analysis showed that compared to the healthy control group, the differential proteins in the KD group were enriched in the complement and coagulation cascade and ribosome biogenesis in eukaryotes. Compared to the KD group, the differential proteins in the BBR treatment group were also enriched in the complement and coagulation cascade and ribosome biogenesis in eukaryotes. Western blot results indicated that compared to the healthy control group, the expression of complement C1q subcomponent subunit C (C1QC), kininogen-1 (KNG1), complement C1s subcomponent (C1S), and C4b-binding protein alpha chain (C4BPA) was increased in the KD group ($P<0.05$). Compared to the KD group, the expression of KNG1, C1S, C1QC, and C4BPA was decreased in the BBR treatment group ($P<0.05$). **Conclusions** The complement and coagulation cascade may be involved in the regulation of BBR treatment for coronary injury in KD, and C1QC, KNG1, C1S, and C4BPA may serve as biomarkers for this treatment. [Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2025, 27(1): 101-108]

Key words: Kawasaki disease; Berberine; Complement and coagulation cascade; Coronary artery lesion; Human coronary artery endothelial cell

川崎病 (Kawasaki disease, KD) 是一种儿童常见发热性疾病, 特征是小到中等血管炎症, 可能发展为冠状动脉病变 (coronary artery lesion, CAL), 导致心肌梗死和猝死^[1]。日本循环学会指南显示, KD 儿童 CAL 发生率约为 6.55%^[2]。KD 的病因尚未完全了解, 普遍认为其发病与遗传易感性、感染和自身免疫有关^[3]。不完全型 KD 的诊断与治疗会延迟, 这可能增加 CAL 风险^[4]。静脉注射用人免疫球蛋白是 KD 的首选治疗方法, 但一些 KD 患者会出现无反应, 这也可能会增加 CAL 风险^[5]。因此, 需要深入探索 KD 的分子调控机制, 寻找早期诊断和治疗的分子标志物。

内皮细胞损伤在 KD 的 CAL 中起重要调控作用^[6]。研究表明, KD 会导致冠状动脉内皮细胞凋亡和周期紊乱^[7]。血管内皮维持血流、协调止血过程, 并调节凝血与抗凝平衡^[8]。在炎症刺激下, 凝血和抗凝平衡被打破, 激活内皮层炎症^[9]。补体活化产物促进内皮细胞炎症和促凝反应^[10]。实际上, 补体和凝血之间存在相互作用, 与多种疾病相关^[11]。补体和凝血级联与 KD 的发展有关, 然而其调节机制尚未明确^[12]。因此, 这间接预测补体和凝血级联可能是 KD 中 CAL 的治疗靶点。

小檗碱 (berberine, BBR) 是一种苕基异喹啉类生物碱, 是黄连根茎的活性成分, 传统用于治疗炎症、皮肤病、癌症和呼吸系统疾病。本团队初步研究证明了 BBR 在 KD 中的药理作用, 包括抗氧化、抗内质网应激和抗内皮炎症损伤^[7]。BBR 已被证明具有抗凝效果^[13]。然而, BBR 对 KD 诱导的冠状动脉内皮细胞损伤中补体和凝血级联的影响尚不清楚。本研究旨在探究 BBR 是否可以通过干预补体和凝血级联来预防 KD 冠状动脉内皮细胞损伤。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

人冠状动脉内皮细胞 (human coronary artery endothelial cell, HCAEC) (美国 ScienCell 公司) 购自中国科学院上海细胞库。其他材料和试剂包括: 蛋白质浓度测定试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司)、BBR (德国 Sigma 公司)、 β -肌动蛋白 (β -actin) 一抗 [天德悦 (北京) 生物科技有限责任公司]、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 RIO2 (serine/threonine protein kinase RIO2, RIOK2) 一抗 (美国 GeneTex 公司)、U3 小核 RNA 相关蛋白 18 同源物 (U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog, UTP18) 一抗 (英国 Abcam 公司)、核糖体生物发生蛋白 BMS1 同源物 (ribosome biogenesis protein BMS1 homolog, BMS1) 一抗 (美国 GeneTex 公司) 和二抗 (武汉阿斯本生物技术有限公司), 以及购自武汉三鹰生物技术公司的激肽原 -1 (kininogen-1, KNG1) 一抗、补体 C1s 子组件 (complement C1s subcomponent, C1S) 一抗、补体 C1q 亚组分亚基 C (complement C1q subcomponent subunit C, C1QC) 一抗、C4b 结合蛋白 α 链 (C4b-binding protein alpha chain, C4BPA)、核糖体 RNA 处理蛋白 7 同源物 A (ribosomal RNA-processing protein 7 homolog A, RRP7A) 一抗。

1.2 血清样本的采集

选取 20 例 KD 患儿 (平均年龄 1.8 岁) 和 20 例健康儿童 (平均年龄 1.95 岁)。两组性别比例、年龄比较差异无统计学意义。治疗前采集 KD 患儿血液样本 1~2 mL, 1 000 r/min 处理 10 min 后, 于 -80°C 保存。本研究经深圳市龙岗区妇幼保健院伦理委员会批准 (审批号: LGFYXLLL-2022-025), 并在获得家长或监护人同意后采集血样。

1.3 实验分组和KD细胞模型构建

实验分为健康对照组、KD组和BBR处理组。健康对照组加入健康儿童的15%血清，KD组加入KD患儿的15%血清构建KD细胞模型^[14-15]。将BBR溶解在无菌超纯水中制成40 mmol/L BBR原液，BBR处理组于造模后加入最终浓度为20 mmol/L的BBR。

1.4 蛋白制备和高效液相色谱-串联质谱技术分析

处理各组细胞后，裂解细胞并测定蛋白浓度。每组取100 μg 蛋白经还原、烷基化和胰酶水解后，用同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)标签(KD组: 117, 健康对照组: 119, BBR处理组: 113)标记，混合并干燥。iTRAQ标记样品用 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 稀释至100 μL ，在Gemini-NX 3 μm C18 110A和Gemini 3 μm C6-Phenyl 110A柱中进行高效液相色谱分离，流速0.2 mL/min。梯度: 0~15 min (5%~10%流动相B)，15~48 min (15%~25%流动相B)，48~60 min (25%~37%流动相B)，60~65 min (37%~95%流动相B)，65~70 min (95%流动相B)。检测波长214 nm和280 nm，每50 s收集一个馏分，共10个馏分，真空离心浓缩干燥。肽段通过0.1%甲酸(流动相A)和80%乙腈+0.1%甲酸(流动相B)按线性梯度分离法分离，99 min内流动相B从5%增至40%，流速300 nL/min。采用Q Exactive 四极杆-Orbitrap质谱仪上以信息依赖模式进行高效液相色谱-串联质谱分析。

1.5 蛋白质鉴定和定量

使用Protein Pilot 5.0软件(美国AB Sciex公司)和Paragon算法分析肽段数据。iTRAQ原始数据转为峰列表，表示蛋白质水平。MS/MS结果在UniProt人类序列数据库中(<http://www.uniprot.org/proteomes/UP000005640>)搜索。参数包括半胱氨酸烷基化、甲基甲硫氨酸硫酸盐、胰蛋白酶酶解，允许一个切割失误。用Protein Pilot 5.0集成工具分析肽段数据的假阳性率(FDR) ≤ 0.01 。

1.6 生物信息学分析

使用WebGestalt网站(<http://www.webgestalt.org/>)对差异表达蛋白进行基因本体论(Gene Ontology, GO)数据库和京都基因与基因组(Kyoto

Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库进行蛋白功能注释^[16]。选择在显著性水平上的前10个生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)和信号通路条目进行可视化分析。使用Cytoscape软件分析KEGG通路及其对应差异蛋白信息。

1.7 Western blot验证差异表达蛋白

HCAEC裂解后，蛋白经SDS-PAGE电泳分离并转移到PVDF膜上。用5% BSA室温封闭1 h，加入 β -actin (1:10 000)、KNG1 (1:1 000)、C1S (1:1 000)、C1QC (1:2 000)、C4BPA (1:1 000)、RIOK2 (1:500)、UTP18 (1:1 000)、RRP7A (1:2 000)、BMS1 (1:500)一抗4℃孵育过夜。次日，TBST清洗3次(每次5 min)，加入二抗(1:10 000)，室温振荡孵育1 h，TBST清洗3次(每次5 min)后发光显影。用Image J 1.8.0软件分析条带灰度值，结果以目的蛋白/ β -actin比值表示。实验独立重复3次。

1.8 统计学分析

使用R 4.2.1软件对数据进行统计分析。所有定量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用成组 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事后检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BBR对KD引起HCAEC损伤蛋白表达差异的影响

iTRAQ蛋白质组学技术分析结果显示，KD组与健康对照组之间共鉴定出518个差异表达蛋白；KD组300个蛋白表达上调，218个蛋白表达下调。BBR处理组与KD组之间共鉴定出422个差异表达蛋白，BBR处理组221个蛋白表达上调，201个蛋白表达下调。差异倍数排名前20个蛋白见表1。差异蛋白定义为 $P < 0.05$ ，且组间差异倍数 > 1.2 或 $< 1/1.2$ 倍。

2.2 组间差异表达蛋白的生物学功能分析

GO富集分析结果显示，KD组与健康对照组的差异蛋白富集存在DNA复制过程中的DNA解旋、

表 1 各组间差异倍数最大的前 20 个蛋白排名 (n=3)

KD 组 vs 健康对照组			BBR 处理组 vs KD 组		
差异表达蛋白	P 值	差异倍数	差异表达蛋白	P 值	差异倍数
纤维蛋白原 γ 链	0.001	10.00	推测蛋白 CDKN2A-DT	0.002	10.00
亲离子型谷氨酸受体 5	0.006	10.00	含 PAS 结构域的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	0.010	10.00
克雷门蛋白 1	0.005	10.00	FEAS1	0.004	7.34
纤维蛋白原 α 链	0.001	9.57	KRT82	0.026	6.28
血清淀粉样蛋白 2	0.001	9.09	蛋白 unc-79 同源物	0.011	4.17
纤维蛋白原 β 链	0.001	6.88	MGA	0.018	3.60
触珠蛋白	0.001	5.23	纺锤体和中心粒相关蛋白 1	0.020	3.51
α1-酸性糖蛋白	0.001	4.27	中性 α-葡萄糖苷酶 C	0.007	3.26
含 EGF 的纤维蛋白样细胞外基质蛋白 1	0.001	4.23	POTE 锚定结构域家族成员 E	0.002	3.11
α1-抗胰凝乳蛋白酶	0.001	3.83	3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶	0.029	2.93
含 PAS 结构域的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	0.006	0.10	卷曲螺旋结构域含蛋白 121	0.007	0.22
桥粒斑菲素蛋白 1	0.030	0.15	含锌指 SWIM 结构域的蛋白质 6	0.019	0.31
天青杀素	0.026	0.15	血清淀粉样蛋白 A-2 蛋白	0.004	0.33
角蛋白 I 型细胞骨架 9	0.001	0.16	载脂蛋白 C- I	0.002	0.34
CA174	0.035	0.17	溴结构域的蛋白 9	0.037	0.35
角蛋白 II 型细胞骨架	0.001	0.18	纤维蛋白原 γ 链	0.002	0.36
神经胰蛋白酶	0.037	0.18	跨膜丝氨酸蛋白酶 11A	0.037	0.36
角蛋白 II 型细胞骨架 5	0.001	0.21	原肌球蛋白调节蛋白 2	0.002	0.37
角蛋白 II 型细胞骨架	0.001	0.21	金属反应元件结合转录因子 2	0.004	0.37
角蛋白 I 型细胞骨架 14	0.023	0.21	凝血因子 V	0.002	0.38

注：[KD] 川崎病；[BBR] 小檗碱。

核糖体生物发生、DNA 双链解旋等 BP，MCM 复合物、高密度脂蛋白颗粒和 90S 前核糖体等 CC，以及 ATP 依赖性螺旋酶活性、嘌呤 NTP 依赖性螺旋酶活性、DNA 依赖性 ATP 酶活性和螺旋酶活性等 MF。BBR 处理组与 KD 组的差异蛋白富集存在乳糜微粒重塑、乳糜微粒组装、高密度脂蛋白颗粒重塑和急性炎症反应等 BP，球形高密度脂蛋白颗粒、乳糜微粒和高密度脂蛋白颗粒等 CC，以及磷脂酰胆碱-甾醇 O-酰基转移酶激活剂活性、脂蛋白颗粒受体结合和脂肪酶抑制剂活性等 MF。见图 1。

KEGG 通路分析结果显示，KD 组与健康对照组的差异蛋白富集在补体和凝血级联、真核生物的核糖体生物发生等 10 条 KEGG 通路。KD 组与 BBR 处理组的差异蛋白富集在补体和凝血级联、真核生物的核糖体生物发生等 10 条 KEGG 通路。

2.3 BBR 介导 KD 诱发 HCAEC 损伤的生物标志物的挖掘和验证

Cytoscape 软件分析结果显示，与健康对照组

比较，KD 组补体和凝血级联通路的 C1QC、C1S、C4BPA、KNG1 和 VWF 表达显著上调 ($P<0.05$)，真核生物核糖体生物发生的 BMS1、IMP3、NOL6、PWP2、RIOK2、RRP7A、TBL3、UTP15 和 UTP18 表达显著下调 ($P<0.05$)。与 KD 组比较，BBR 处理组补体和凝血级联的 C1QB、C1QC、C1R、C1S、C4BPA 和 KNG1 表达显著下调 ($P<0.05$)，而真核生物核糖体生物发生的 BMS1、RIOK2、RRP7A 和 UTP18 表达显著上调，GNL3 和 SBDS 表达显著下调 ($P<0.05$)。见图 2。

Western blot 检测结果显示，与健康对照组比较，KD 组 C1QC、KNG1、C1S、C4BPA、RRP7A、RIOK2 蛋白表达上调，UTP18 和 BMS1 蛋白表达下调 ($P<0.05$)；与 KD 组比较，BBR 处理组 C1QC、KNG1、C1S、C4BPA、RRP7A、RIOK2 蛋白表达下调，UTP18 和 BMS1 蛋白表达上调 ($P<0.05$)。见表 2、图 3。

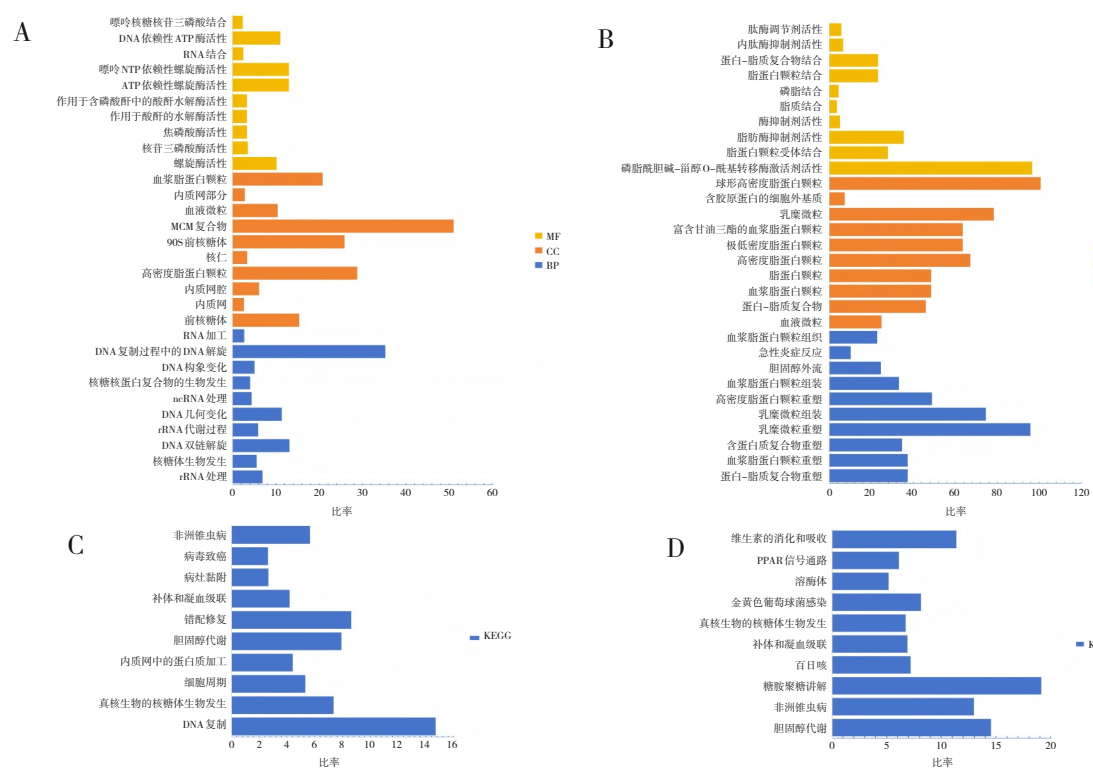


图 1 GO和KEGG特征图 A: KD组与健康对照组差异蛋白GO富集分析; B: BBR处理组与KD组差异蛋白GO富集分析; C: KD组与健康对照组差异蛋白KEGG富集分析; D: BBR处理组与KD组差异蛋白KEGG富集分析。A、B图中黄色条目代表生物过程(BP), 橙色条目代表细胞组分(CC), 蓝色条目代表分子功能(MF); C、D图中蓝色条目代表KEGG信号通路。从图中可看出, KD组与健康对照组比较, KEGG信号通路补体和凝血级联、真核生物的核糖体生物发生在KD组中显著富集; 与KD组比较, KEGG信号通路补体和凝血级联、真核生物的核糖体生物发生在BBR处理的KD组中显著富集。

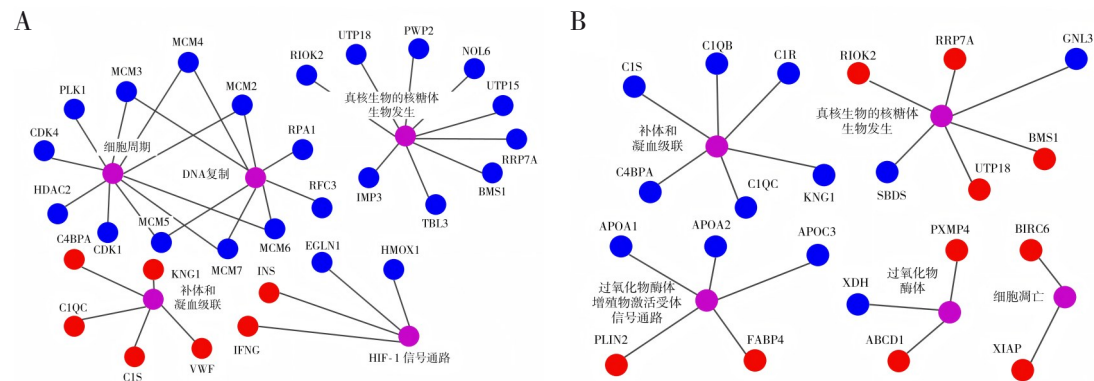


图 2 差异蛋白-通路的网络关系图 A: KD组 vs 健康对照组; B: BBR处理组 vs KD组。红色代表上调蛋白, 蓝色代表下调蛋白, 紫色代表信号通路。差异倍数 ≥ 1.2 且 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 2 各组生物标志物蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	KNG1	C1S	C1QC	C4BPA	RIOK2	UTP18	RRP7A	BMS1
健康对照组	0.131 ± 0.089	0.102 ± 0.012	0.15 ± 0.04	0.267 ± 0.021	0.174 ± 0.018	0.60 ± 0.04	0.16 ± 0.07	0.84 ± 0.08
KD组	0.534 ± 0.061 ^a	0.485 ± 0.053 ^a	0.72 ± 0.09 ^a	0.670 ± 0.103 ^a	0.446 ± 0.069 ^a	0.12 ± 0.03 ^a	0.73 ± 0.04 ^a	0.49 ± 0.08 ^a
BBR处理组	0.288 ± 0.108 ^b	0.237 ± 0.016 ^b	0.33 ± 0.06 ^b	0.468 ± 0.029 ^b	0.312 ± 0.016 ^b	0.32 ± 0.03 ^b	0.38 ± 0.12 ^b	0.71 ± 0.11
F值	23.98	106.74	60.91	30.93	31.25	171.67	35.93	11.64
P值	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.009

注: a 示与健康对照组比较, $P < 0.05$; b 示与KD处理组比较, $P < 0.05$ 。[KD] 川崎病; [BBR] 小檗碱; [KNG1] 激肽原-1; [C1S] 补体C1s子组件; [C1QC] 补体C1q亚组分亚基C; [C4BPA] C4b结合蛋白 α 链; [RIOK2] 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶RIO2; [UTP18] U3小核RNA相关蛋白18同源物; [RRP7A] 核糖体RNA处理蛋白7同源物A; [BMS1] 核糖体生物发生蛋白BMS1同源物。

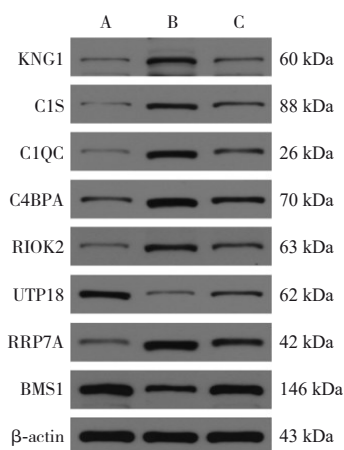


图 3 Western blot 检测各组生物标志物蛋白表达条带

图 A: 健康对照组; B: KD 组; C: BBR 处理组。[KNG1] 激肽原-1; [C1S] 补体 C1s 子组件; [C1QC] 补体 C1q 亚组分亚基 C; [C4BPA] C4b 结合蛋白 α 链; [RIOK2] 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 RIO2; [UTP18] U3 小核 RNA 相关蛋白 18 同源物; [RRP7A] 核糖体 RNA 处理蛋白 7 同源物 A; [BMS1] 核糖体生物发生蛋白 BMS1 同源物。

3 讨论

KD 是儿童后天性心脏病的常见原因之一，CAL 是其重要并发症。尽管接受静脉注射用人免疫球蛋白和阿司匹林治疗，仍有少数患者发展为 CAL^[2]。CAL 与内皮细胞功能障碍密切相关^[7]。目前缺乏减缓 CAL 进展的有效手段，因此发现新治疗靶点尤为迫切。已有研究表明，BBR 具有抗血小板和抗血栓效果^[17]。补体和凝血级联与 KD 发展有关^[12]。本课题组前期研究发现，BBR 能保护内皮细胞免受 KD 血清损伤^[7]。本研究着重探索了 BBR 是否能通过抑制补体和凝血级联中关键蛋白的激活保护冠状动脉内皮细胞。

血栓形成、高凝状态和免疫激活是内皮细胞紊乱的重要机制，而补体和凝血级联已被证明可能参与 KD 中的冠状动脉内皮细胞损伤^[18]。补体和凝血级联在 KD 冠状动脉内皮细胞损伤中的分子调控机制以及是否可作为治疗靶标尚不清楚。本研究结果显示，共鉴定出 518 种与 KD 冠状动脉内皮细胞损伤相关的差异蛋白，422 种与 BBR 治疗 KD 冠状动脉内皮细胞损伤相关的差异表达蛋白。差异蛋白生物功能分析结果显示，健康对照组与 KD 组差异蛋白富集于补体和凝血级联、真核生物的核糖体生物发生；KD 组与 BBR 处理组差异蛋白富集于补体和凝血级联、真核生物的核糖体生物发生。补体系统和凝血系统相互交织，共同参与炎

症诱导、血栓形成和溶栓^[19]。在败血症中，补体系统的激活促进凝血和溶栓，导致弥散性血管内凝血^[20]。凝血因子 FXIa 的产生增强了补体系统的活性，从而增强了免疫反应^[21]。补体系统的 C3 和 C3a 受体促进了败血症诱导的急性肺损伤中肺血管内皮细胞焦亡^[22]。补体途径和凝血途径的激活促进了内皮细胞炎症^[23]。补体激活在 KD 血管炎的发展中起着重要的调节作用^[24]。血液的高凝状态参与了 KD 血管炎的进展，抗凝和抗血小板也是 KD 冠状动脉损伤的重要治疗手段^[25]。本研究发现，BBR 参与了 KD 冠状动脉内皮细胞损伤中补体和凝血级联的调节，结合先前研究结果^[7]，补体和凝血级联可能是 BBR 在 KD 冠状细胞损伤中保护作用的重要靶标。

在内源性凝血途径启动时，F12 刺激下游激肽原产生，激肽原与 KNG1 的相互作用导致进一步产生缓激肽，从而导致炎症和血管舒张^[26]。激肽原可通过产生纤溶酶间接作用，或直接切割补体 C3 产生活性成分 C3b 和 C3a 并激活补体途径，但由激肽原直接转化的 C3 可被白念珠菌招募的 H 因子抑制^[27]。纤溶酶还直接切割补体 C5 产生活性成分 C5b 和 C5a，这些成分促进组织损伤和炎症。C1 复合物 C1s 由 C1QC、C1R 和 C1S 组成，是经典补体激活途径的启动子，C1S 和 C1QC 在各种病理条件下被激活，并与炎症、自身免疫疾病和癌症的发生发展密切相关^[28]。C4b2a 是 C3 转化酶之一，通过 C4b2a 切割 C3 与补体途径是否能被激活有关，而 C4BPA 可以结合到 C4b2a 并加速 C4b2a 的衰减，从而阻断补体途径的激活并促进细胞溶解^[14]。因此，补体途径和凝血途径之间存在恶性循环，补体途径和凝血途径之间的交流影响 KD 冠状动脉内皮功能障碍的发展。

本研究发现，在 KD 血清诱导的 HCAEC 损伤中，补体和凝血级联的标志物 C1QC、C1S、C4BPA 和 KNG1 表达增加，表明补体和凝血级联参与了 KD 血清诱导的冠状动脉内皮损伤。C1QC、C1S 和 KNG1 是 KD 冠状动脉内皮损伤的危险因素，为对抗 KD 中激活的补体途径，C4BPA 的反应性提高^[14]。BBR 处理后，补体和凝血级联的上述标志物表达逆转。本研究结果表明，补体和凝血级联参与了 KD 血清诱导的冠状动脉内皮细胞功能障碍，BBR 可能通过抑制补体和凝血级联在 KD 冠状动脉内皮功能障碍中发挥保护作用。

本研究结果显示，KD 组真核生物的核糖体生

物发生标志物 BMS1 和 UTP18 表达下降。经 BBR 处理后, UTP18 和 BMS1 表达显著上升。然而, RRP7A 和 RIOK2 的高通量组织学分析结果与 Western blot 验证的结果相矛盾, 这可能为高通量组织学分析更容易受到样本处理、抗体特异性或数据归一化等因素的影响。真核生物的核糖体生物发生是每个生长细胞中的核心过程, 抑制该过程会抑制细胞增殖和生成^[29]。核糖体生物发生减少会阻碍内皮细胞增殖^[30]。UTP18、BMS1、RRP7A 和 RIOK2 的表达均可以促进核糖体生物发生和细胞增殖^[31-34]。结合本研究结果, 可初步推断真核生物的核糖体生物发生可能在 KD 冠状动脉内皮损伤中发挥保护作用, UTP18 和 BMS1 可能参与 BBR 调控 KD 冠状动脉内皮损伤的过程。其具体机制仍需进一步研究验证。

综上, 本研究初步阐明 BBR 通过抑制补体和凝血级联对 KD 血清诱导的冠状动脉内皮损伤的保护作用, C1QC、C1S、KNG1 和 C4BPA 可作为 BBR 治疗 KD 合并 CAL 的标志物, 为治疗 KD 冠状病变提供新的策略。

作者贡献声明: 廖锦文负责实验设计和数据分析, 撰写论文, 参与最终审阅论文; 郭鑫负责 iTRAQ 标记和蛋白质组学分析的部分工作, 参与生物信息学分析和论文撰写; 梁波负责细胞模型构建, 并对实验结果进行初步分析; 李许霞负责 Western blot 实验, 并对相关数据进行分析; 徐明国负责整体研究项目的指导, 对实验方案提供建议, 并参与论文撰写和修改。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[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] 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.
- [3] Chaudhary H, Nameirakpam J, Kumrah R, et al. Biomarkers for Kawasaki disease: clinical utility and the challenges ahead[J]. *Front Pediatr*, 2019, 7: 242. PMID: 31275907. PMCID: PMC6591436. DOI: 10.3389/fped.2019.00242.
- [4] Li T, Feng J, Li N, et al. Correct identification of incomplete Kawasaki disease[J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(3): 3000605211001712. PMID: 33784852. PMCID: PMC8020237. DOI: 10.1177/03000605211001712.
- [5] Fabi M, Andreozzi L, Frabboni I, et al. Non-coronary cardiac events, younger age, and IVIG unresponsiveness increase the risk for coronary aneurysms in Italian children with Kawasaki disease[J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40(4): 1507-1514. PMID: 32936425. DOI: 10.1007/s10067-020-05331-w.
- [6] Fabi M, Petrovic B, Andreozzi L, et al. Circulating endothelial cells: a new possible marker of endothelial damage in Kawasaki disease, multisystem inflammatory syndrome in children and acute SARS-CoV-2 infection[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 10106. PMID: 36077506. PMCID: PMC9456219. DOI: 10.3390/ijms231710106.
- [7] Xu M, Qi Q, Men L, et al. Berberine protects Kawasaki disease-induced human coronary artery endothelial cells dysfunction by inhibiting of oxidative and endoplasmic reticulum stress[J]. *Vascul Pharmacol*, 2020, 127: 106660. PMID: 32070767. DOI: 10.1016/j.vph.2020.106660.
- [8] Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation[J]. *Cell Tissue Res*, 2022, 387(3): 391-398. PMID: 34014399. PMCID: PMC8975780. DOI: 10.1007/s00441-021-03471-2.
- [9] Stojkovic S, Kaun C, Basilio J, et al. Tissue factor is induced by interleukin-33 in human endothelial cells: a new link between coagulation and inflammation[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25171. PMID: 27142573. PMCID: PMC4855148. DOI: 10.1038/srep25171.
- [10] Bossi F, Bulla R, Tedesco F. Endothelial cells are a target of both complement and kinin system[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(2): 143-147. PMID: 18182217. DOI: 10.1016/j.intimp.2007.08.006.
- [11] Conway EM. Complement-coagulation connections[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2018, 29(3): 243-251. PMID: 29517503. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000720.
- [12] Ba H, Wang Y, Zhang L, et al. Prediction of immune infiltration diagnostic gene biomarkers in Kawasaki disease[J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 8739498. PMID: 35755167. PMCID: PMC9232301. DOI: 10.1155/2022/8739498.
- [13] Wang C, Yuan Z, Xie J, et al. Integrated metabolomics and molecular docking reveal berberrubine inhibits thrombosis by regulating the vitamin K catalytic cycle in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 938: 175436. PMID: 36481237. DOI: 10.1016/j.ejphar.2022.175436.
- [14] Kuttner-Kondo LA, Dybvig MP, Mitchell LM, et al. A corresponding tyrosine residue in the C2/factor B type A domain is a hot spot in the decay acceleration of the complement C3 convertases[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(52): 52386-52391. PMID: 14561755. DOI: 10.1074/jbc.M304620200.
- [15] Tao Y, Wang W, Jin Y, et al. The therapeutic effects of EFNB2-Fc in a cell model of Kawasaki disease[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(4): 500. PMID: 37111257. PMCID:

- PMC10142267. DOI: 10.3390/ph16040500.
- [16] Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, et al. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W199-W205. PMID: 31114916. PMCID: PMC6602449. DOI: 10.1093/nar/gkz401.
- [17] Wang C, Cheng Y, Zhang Y, et al. Berberine and its main metabolite berberrubine inhibit platelet activation through suppressing the class I PI3K β /RASA3/rap1 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 734603. PMID: 34690771. PMCID: PMC8531212. DOI: 10.3389/fphar.2021.734603.
- [18] Zhang L, Wang W, Bai J, et al. Proteomic analysis associated with coronary artery dilatation caused by Kawasaki disease using serum exosomes[J]. *Rev Port Cardiol*, 2016, 35(5): 265-273. PMID: 27118092. DOI: 10.1016/j.repc.2015.11.016.
- [19] Mossanen Parsi M, Duval C, Ariëns RAS. Vascular dementia and crosstalk between the complement and coagulation systems [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 803169. PMID: 35004913. PMCID: PMC8733168. DOI: 10.3389/fcvm.2021.803169.
- [20] Abe T, Kubo K, Izumoto S, et al. Complement activation in human sepsis is related to sepsis-induced disseminated intravascular coagulation[J]. *Shock*, 2020, 54(2): 198-204. PMID: 31917735. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001504.
- [21] Puy C, Pang J, Reitsma SE, et al. Cross-talk between the complement pathway and the contact activation system of coagulation: activated factor XI neutralizes complement factor H [J]. *J Immunol*, 2021, 206(8): 1784-1792. PMID: 33811105. PMCID: PMC8030746. DOI: 10.4049/jimmunol.2000398.
- [22] Li ZF, Wang YC, Feng QR, et al. Inhibition of the C3a receptor attenuates sepsis-induced acute lung injury by suppressing pyroptosis of the pulmonary vascular endothelial cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 184: 208-217. PMID: 35367342. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.032.
- [23] Qin Z, Liu F, Blair R, et al. Endothelial cell infection and dysfunction, immune activation in severe COVID-19[J]. *Theranostics*, 2021, 11(16): 8076-8091. PMID: 34335981. PMCID: PMC8315069. DOI: 10.7150/thno.61810.
- [24] Polycarpou A, Grigoriadou S, Klavinskis L, et al. Does the lectin complement pathway link Kawasaki disease and SARS-CoV-2? [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 604512. PMID: 33584675. PMCID: PMC7874141. DOI: 10.3389/fimmu.2020.604512.
- [25] Yoshizawa H, Nogami K, Matsumoto T, et al. Dynamic evaluation of hemostasis in the acute phase of Kawasaki disease using comprehensive coagulation functional assays[J]. *Thromb Res*, 2019, 174: 76-83. PMID: 30579149. DOI: 10.1016/j.thromres.2018.12.016.
- [26] Hintze S, Möhl BS, Beyerl J, et al. Mutant plasminogen in hereditary angioedema is bypassing FXII/kallikrein to generate bradykinin[J]. *Front Physiol*, 2023, 13: 1090732. PMID: 36685169. PMCID: PMC9849239. DOI: 10.3389/fphys.2022.1090732.
- [27] Irmischer S, Döring N, Halder LD, et al. Kallikrein cleaves C3 and activates complement[J]. *J Innate Immun*, 2018, 10(2): 94-105. PMID: 29237166. PMCID: PMC6757171. DOI: 10.1159/000484257.
- [28] Ye J, Yang P, Yang Y, et al. Complement C1s as a diagnostic marker and therapeutic target: progress and prospective[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1015128. PMID: 36275687. PMCID: PMC9582509. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1015128.
- [29] Awad D, Prattes M, Kofler L, et al. Inhibiting eukaryotic ribosome biogenesis[J]. *BMC Biol*, 2019, 17(1): 46. PMID: 31182083. PMCID: PMC6558755. DOI: 10.1186/s12915-019-0664-2.
- [30] Koltowska K, Okuda KS, Gloger M, et al. The RNA helicase Ddx21 controls Vegfc-driven developmental lymphangiogenesis by balancing endothelial cell ribosome biogenesis and p53 function[J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(11): 1136-1147. PMID: 34750583. DOI: 10.1038/s41556-021-00784-w.
- [31] Pan M, Xiao T, Xu L, et al. UTP18-mediated p21 mRNA instability drives adenoma-carcinoma progression in colorectal cancer[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(5): 112423. PMID: 37086406. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112423.
- [32] Wang Y, Zhao Z, Yu H, et al. Stability and function of RCL1 are dependent on the interaction with BMS1[J]. *J Mol Cell Biol*, 2024, 15(7): mjad046. PMID: 37451810. PMCID: PMC11023236. DOI: 10.1093/jmcb/mjad046.
- [33] Farooq M, Lindbæk L, Krogh N, et al. RRP7A links primary microcephaly to dysfunction of ribosome biogenesis, resorption of primary cilia, and neurogenesis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5816. PMID: 33199730. PMCID: PMC7670429. DOI: 10.1038/s41467-020-19658-0.
- [34] Messling JE, Agger K, Andersen KL, et al. Targeting RIOK2 ATPase activity leads to decreased protein synthesis and cell death in acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2022, 139(2): 245-255. PMID: 34359076. PMCID: PMC8759535. DOI: 10.1182/blood.2021012629.
- (本文编辑: 杨丹)
- (版权所有©2025 中国当代儿科杂志)