

论著·临床研究

髓样细胞触发受体-1在川崎病发病机制中的作用

赵建美 王倩

(南通大学附属医院儿科, 江苏 南通 226001)

[摘要] **目的** 探讨髓样细胞触发受体-1 (TREM-1) 激活在川崎病 (KD) 发病机制中的作用。**方法** 45例KD患儿分为有冠脉损害组 (CAL组, 16例) 和无冠脉损害组 (NCAL组, 29例), 同期呼吸道感染患儿作为发热对照组 (15例), 健康体检儿童作为正常对照组 (15例)。采用荧光定量PCR检测外周血单个核细胞 (PBMC) 中TREM-1 mRNA、DNAX-活化蛋白12 (DAP12) mRNA表达水平, ELISA法检测血清可溶性TREM-1 (sTREM-1)、DAP12、单核细胞趋化因子-1 (MCP-1)、IL-8的蛋白水平。**结果** KD患儿的sTREM-1、DAP12蛋白及TREM-1 mRNA、DAP12 mRNA表达均高于两个对照组 ($P<0.05$), 且CAL亚组的sTREM-1蛋白及TREM-1 mRNA表达高于NCAL亚组 ($P<0.05$)。KD患儿的MCP-1、IL-8高于两对照组 ($P<0.05$), 且CAL亚组的MCP-1高于NCAL组 ($P<0.05$)。KD患儿的sTREM-1与MCP-1呈正相关 ($r=0.523$, $P<0.05$)。**结论** 髓样细胞触发受体-1激活可能在KD发生过程中起重要作用。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(6): 522-526]

[关键词] 川崎病; 髓样细胞触发受体-1; 冠状动脉损害; 儿童

Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in the pathogenesis of Kawasaki disease

ZHAO Jian-Mei, WANG Qian. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China (Email: 2687084388@qq.com)

Abstract: Objective To study the role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) in the pathogenesis of Kawasaki disease (KD). **Methods** Based on color Doppler examination results, 45 children with KD were classified into two groups: coronary artery lesions (CAL group) and no coronary artery lesions (NCAL group). Fifteen children with fever caused by respiratory infection (fever control group) and fifteen healthy children (normal control group) served as controls. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of TREM-1 mRNA and DNAX-activating protein 12 (DAP12) mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). ELISA was used to detect the expression of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1), DAP12, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-8 (IL-8) proteins levels. **Results** The mean serum protein concentrations of sTREM-1 and DAP12 and the expression levels of TREM-1 mRNA and DAP12 mRNA in PBMC in 45 children with KD (KD group) were significantly higher than in the two control groups ($P<0.05$). The levels of sTREM-1 protein and TREM-1 mRNA in the CAL subgroup were significantly higher than in the NCAL subgroup ($P<0.05$). The serum protein concentrations of MCP-1 and IL-8 in the KD group were significantly higher than in the two control groups ($P<0.05$). The MCP-1 protein level in the CAL subgroup was significantly higher than in the NCAL subgroup ($P<0.05$). In children with KD, there was a positive correlation between serum sTREM-1 and MCP-1 levels ($r=0.523$, $P<0.05$). **Conclusions** TREM-1 activation may be involved in the development of KD. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(6): 522-526]

Key words: Kawasaki disease; Triggering receptor expressed on myeloid cells-1; Coronary artery lesion; Child

[收稿日期] 2016-03-07; [接受日期] 2016-04-20

[基金项目] 江苏省卫生厅面上科研项目 (H201423); 南通市科技计划项目 (MS22015071)。

[作者简介] 赵建美, 女, 博士, 主任医师。

川崎病 (Kawasaki disease, KD) 是一种主要发生于 5 岁以下儿童的急性炎症性血管炎, 发病率在东亚人群正逐步增高, 未及时治疗可导致严重的心血管并发症, 已成为儿童获得性心脏病最主要的病因^[1]。越来越多的研究表明, 免疫系统激活后形成的炎症瀑布反应在 KD 发病中有着重要的作用^[2-3]。髓样细胞触发受体-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1, TREM-1) 是一种与炎症相关的激发受体, 配体尚未明确, 当与衔接蛋白 DNAX-活化蛋白 12 (DNAX-activating protein 12, DAP12) 结合后, 能诱导机体生成多种炎症趋化因子和细胞因子, 在多种炎症性疾病的发病中发挥重要作用^[4]。sTREM-1 (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1) 是其可溶性形式, 为基质金属蛋白酶作用下膜型 TREM-1 裂解后的产物, 与感染的严重程度密切相关。关于该受体激活后形成的信号通路在川崎病中的作用及机理目前国内外尚无报道。本文通过观察 KD 急性期 TREM-1、DAP12 及下游信号通路的单核细胞趋化因子-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8) 表达水平, 探讨 TREM-1 激活在川崎病发病及冠状动脉损伤中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2014 年 6 月至 2015 年 10 月期间南通大学附属医院住院的 45 例 KD 患儿为研究对象。诊断按照第 7 次世界小儿 KD 研讨会修订标准进行^[5]。其中男 27 例、女 18 例, 年龄 3 个月至 6 岁 9 个月。根据心脏超声检查, 将 KD 患儿分为有冠状动脉损害 (coronary artery lesions, CAL) 组 16 例和无冠状动脉损害 (non coronary artery lesions, NCAL) 组 29 例。CAL 的判断标准^[6]为: 冠状动脉内膜回声增强; 冠状动脉内径超过邻近节段内径的 1.5 倍; 冠状动脉内径/主动脉瓣环内径比值 > 0.2。

随机选择同期因呼吸道疾病 (包括上呼吸道感染、支气管炎、轻症肺炎) 住院的 15 例发热 (体温 $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$) 患儿作为发热对照组, 15 例门诊常规体检的健康儿童作为正常对照组。KD 组与两对照组在性别、年龄构成比方面差异均无统计学意

义 ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 3 组患儿一般资料比较

组别	<i>n</i>	男/女 (例)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 月)
正常对照组	15	9/6	30 $\pm$ 18
发热对照组	15	9/6	27 $\pm$ 17
KD 组	45	27/18	27 $\pm$ 18
NCAL	29	17/12	28 $\pm$ 21
CAL	16	10/6	24 $\pm$ 13
$F(\chi^2)$ 值		(0.00)	0.153
<i>P</i> 值		$P>0.05$	$P>0.05$

1.2 标本采集

急性期 KD 患儿在 IVIG 治疗前, 发热对照组在入院时, 正常对照组在门诊体检时分别收集两份静脉血, 1 份为非抗凝血 (干燥管取血), 2000 转/min, 离心 20 min 后收集血清, 保存于 -80°C 冰箱待测; 另 1 份为含 EDTA 抗凝血, 用淋巴细胞分离液离心后分离外周血单个核细胞, 加 1 mL Trizol (美国 Invitrogen 公司) 裂解细胞后于 -80°C 保存待提取 RNA。

1.3 ELISA 检测血清 sTREM-1、DAP12、MCP-1、IL-8 蛋白水平

采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清 sTREM-1、DAP12、MCP-1、IL-8 蛋白水平, 试剂盒购自美国 R&D 公司, 操作按照说明书进行。

1.4 荧光定量 PCR 检测 TREM-1 mRNA、DAP12 mRNA 表达水平

在 NCBI 查找 TREM-1 mRNA、DAP12 mRNA 序列, 由上海生工设计并合成 Real-time PCR 引物。TREM-1 mRNA 上游引物为 5'-GTGTGTGATCTA-CCAGCCT-3', 下游引物为 5'-TTCAGAGTCAGG-AGTGGAG-3' (232 bp); DAP12 mRNA 上游引物为 5'-GAGACCGAGTCGCCTTATCA-3', 下游引物为 5'-GTCATGATTCGGGCTCATTT-3' (101 bp)。经 Trizol 裂解的外周血单个核细胞依次经过氯仿、异丙醇等提取总 RNA, 按 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) 说明配制 mRNA 逆转录体系, 逆转录合成 cDNA。取 1 μL cDNA 行 PCR, 反应体系 20 μL : Fast SYBR Green Master Mix (Roche) 10 μL , 上下游引物各

1 μL , ddH₂O 7 μL , cDNA 模板 1 μL 。反应条件为: 95℃预变性 5 min, 共 45 个循环 (95℃ 15 s, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min), 每个循环在 72℃ 延伸阶段收集荧光。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件处理。结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 或 t' 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 SNK- q 检验; 相关分析采用直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 sTREM-1、DAP12 蛋白及 TREM-1 mRNA、DAP12 mRNA 表达水平

KD 患儿血清 sTREM-1、DAP12 蛋白及外周血单个核细胞中 TREM-1 mRNA、DAP12 mRNA 表达水平明显高于两对照组 ($P < 0.05$), 且 CAL 亚组 sTREM-1 蛋白及 TREM-1 mRNA 表达水平较 NCAL 亚组高 ($P < 0.05$); 发热对照组的血清 sTREM-1、DAP12 蛋白及外周血单个核细胞中 TREM-1 mRNA、DAP12 mRNA 表达水平明显高于正常对照组 ($P < 0.05$)。见表 2~3。

表 2 3 组患儿的 sTREM-1、DAP12 蛋白及 TREM-1 mRNA、DAP12 mRNA 的相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	sTREM-1 (pg/mL)	TREM-1 mRNA	DAP12 (pg/mL)	DAP12 mRNA
正常对照组	15	20 $\pm$ 10	1.6 $\pm$ 0.8	51 $\pm$ 25	0.7 $\pm$ 0.4
发热对照组	15	174 $\pm$ 26 ^a	3.5 $\pm$ 1.3 ^a	110 $\pm$ 24 ^a	1.5 $\pm$ 1.0 ^a
KD 组	45	250 $\pm$ 43 ^{ab}	8.4 $\pm$ 2.5 ^{ab}	143 $\pm$ 39 ^{ab}	3.1 $\pm$ 1.2 ^{ab}
F 值		235.310	74.205	40.683	35.761
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: a 示与正常对照组比较, $P < 0.05$; b 示与发热对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 两组 KD 患儿的 sTREM-1、DAP12 蛋白及 TREM-1 mRNA、DAP12 mRNA 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	sTREM-1 (pg/mL)	TREM-1 mRNA	DAP12 (pg/mL)	DAP12 mRNA
NCAL 组	29	232 $\pm$ 36	7.7 $\pm$ 2.5	137 $\pm$ 43	2.9 $\pm$ 1.1
CAL 组	16	282 $\pm$ 35	9.5 $\pm$ 2.0	153 $\pm$ 29	3.6 $\pm$ 1.2
$t(t')$ 值		0.309	0.686	(8.205)	0.059
P 值		<0.001	0.049	0.164	0.115

表 4 3 组患儿的 MCP-1、IL-8 蛋白浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	MCP-1	IL-8
正常对照组	15	35 $\pm$ 17	382 $\pm$ 164
发热对照组	15	156 $\pm$ 35 ^a	665 $\pm$ 180 ^a
KD 组	45	266 $\pm$ 61 ^{ab}	1031 $\pm$ 243 ^{ab}
F 值		122.640	54.863
P 值		<0.05	<0.05

注: a 示与正常对照组比较, $P < 0.05$; b 示与发热对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 下游信号分子血清蛋白表达水平

KD 患儿血清 MCP-1、IL-8 蛋白明显高于两个对照组 ($P < 0.05$), 且 CAL 亚组 MCP-1 蛋白较 NCAL 组高 ($P < 0.05$); 发热对照组血清 MCP-1、IL-8 蛋白明显高于正常对照组 ($P < 0.05$)。见表 4~5。

表 5 两组 KD 患儿血清 MCP-1 及 IL-8 蛋白浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	MCP-1	IL-8
NCAL 组	29	245 $\pm$ 55	987 $\pm$ 235
CAL 组	16	305 $\pm$ 54	1110 $\pm$ 246
t 值		0.729	0.319
P 值		<0.001	0.105

2.3 sTREM-1、MCP-1 及 IL-8 之间的相关性分析

KD 患儿血清 sTREM-1 与 MCP-1 水平呈正相关 ($r=0.529$, $P<0.05$), 见图1; 血清 sTREM-1 与 IL-8 水平无显著相关性 ($r=0.282$, $P>0.05$); MCP-1 与 IL-8 水平无显著相关性 ($r=0.23$, $P>0.05$)。

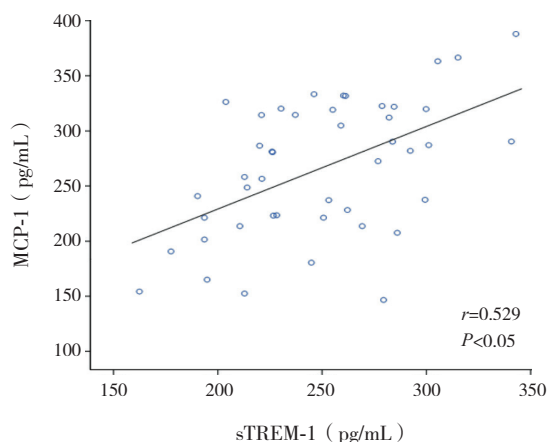


图1 KD 患儿 sTREM-1 与 MCP-1 的相关性分析

3 讨论

TREM-1 属于免疫球蛋白超家族的成员, 高表达于单核/巨噬细胞及中性粒细胞的表面, 是与炎症反应密切相关的跨膜受体, 在机体受细菌和病原微生物侵袭时, 其表达明显上调^[7]。TREM-1 是一种能识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 的受体, 当 PAMPs 分泌时, 可介导机体对组织降解及微生物感染作出反应, 最终放大免疫反应并促进细胞因子的产生^[8-10]。研究表明, TREM-1 的胞内部分很短, 缺乏内在的信号基序, 具体配体尚未明确, 当与衔接蛋白 DAP12 交联后, 可使 DAP12 胞浆区免疫受体酪氨酸激活基序中的酪氨酸激酶发生磷酸化, 促使钙离子内流, 活化核转录因子 κ B、激活子蛋白-1 及 ETS 样蛋白 1 等, 从而活化下游信号通路, 导致多种炎症趋化因子和细胞因子如 MCP-1、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子- α 和活性氧大量释放, 使中性粒细胞快速脱颗粒并发生吞噬作用^[11-13]。这些释放的炎性物质可损伤血管, 同时又能反过来再次作用于机体, 介导机体产生更多的细胞因子和

炎性介质, 使炎症扩大甚至失去控制, 并介导内皮损伤, 可能在 KD 血管炎及冠脉损害中发挥重要作用。

TREM-1 从细胞膜表面裂解后形成可溶性形式 sTREM-1, 在机体感染过程中, 细胞表面 TREM-1 受体逐渐增多, 从细胞表面脱落释放入体液中的 sTREM-1 也增多, 故 sTREM-1 的表达在一定程度上可反映炎症的严重程度, 其变化趋势被报道与急性胰腺炎、牙周炎等多种炎症性疾病的转归有密切关系^[14-15]。本研究通过 ELISA 检测发现, 川崎病患儿急性期血清 sTREM-1、DAP12 蛋白浓度较正常对照组及发热对照组明显增高, 表明 TREM-1 活化参与了川崎病急性期血管炎的形成, 且 CAL 组血清 sTREM-1 水平高于 NCAL 组, 推测 TREM-1 异常活化可能参与了 KD 冠状动脉损害的形成, 检测血清 sTREM-1 水平对川崎病早期诊断及冠状动脉损害的预测可能有重要作用。本研究进一步用荧光定量 PCR 法检测单个核细胞中 TREM-1、DAP12 的表达量, 发现川崎病患儿 TREM-1 mRNA、DAP12 mRNA 表达较两对照组明显升高, 且 CAL 组 TREM-1 mRNA 高于 NCAL 组, 表明 TREM-1 基因表达水平的改变可能参与了 KD 的发生发展过程, 这与蛋白表达水平结果一致, 进一步表明 TREM-1 活化在 KD 血管炎形成及进一步发展成冠状动脉损害过程中可能有重要的作用。

为进一步研究 TREM-1 激活后如何启动 KD 血管炎症反应, 本研究用 ELISA 检测下游 MCP-1、IL-8 蛋白的表达, 发现 MCP-1、IL-8 在 KD 组表达明显增高。MCP-1 属于一种趋化因子, 可介导单个核细胞向血管壁迁移并进入动脉壁, 从而可能在 KD 的血管损伤中发挥重要作用, 本研究还发现 CAL 组血清 MCP-1 水平高于 NCAL 组, 提示 MCP-1 与 CAL 的发生可能也有一定的相关性, 这与国内外一些研究一致^[16]。血清 MCP-1 水平可能是诊断 KD 及预测 CAL 发生的一项重要依据。IL-8 也是一种细胞趋化因子, 在机体受到外源病原体感染时能趋化及激活多种细胞, 从而在 KD 血管炎症的发病过程中具有重要的作用。本研究发现, IL-8 蛋白浓度在 KD 两亚组间并没有显著的区别, IL-8 不能早期预测 CAL 的发生。对于这一结果, 我们分析可能是有其它机制参与并抑制了 IL-8 的进一步分泌。另外, 本研究对 KD 急性期血

清sTREM-1、MCP-1及IL-8之间的相关性进行分析,发现仅sTREM-1与MCP-1存在中等程度的正相关关系,这表明sTREM-1与MCP-1在KD血管炎形成及冠状动脉损害的发病机理中可能发挥了一定的协同作用。由于本研究病例较少,进一步积累更多的病例可能会有进一步发现。

由于KD患儿在早期症状不典型时常常被误诊为呼吸道感染,本研究为了进一步探究TREM-1信号通路在KD早期诊断中的价值,将呼吸道感染所致发热设为发热对照组。研究显示,KD急性期及发热对照组的TREM-1信号通路的表达高于正常对照,表明TREM-1信号通路表达增高并非是KD特异性表现,但KD组高于发热对照组,表明TREM-1信号通路在KD早期诊断中可能有重要的作用。

本文首次从基因转录及蛋白表达水平证实KD急性期TREM-1、DAP12的表达及下游相关炎症因子MCP-1、IL-8蛋白水平明显增高,表明TREM-1异常活化可能导致前炎细胞因子及趋化因子过度产生,而TREM-1/DAP12信号通路中炎症因子的过度表达可能是导致KD血管炎发生及冠状动脉损害的原因之一。另外,检测血清TREM-1/DAP12信号通路中细胞因子的表达可望作为KD早期诊断的指标,且血清sTREM-1、MCP-1蛋白水平在预测KD是否合并冠状动脉损害中可能也有重要价值。

[参 考 文 献]

- [1] Dimitriades VR, Brown AG, Gedalia A. Kawasaki disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2014, 16(6): 423.
- [2] Yeung RS. Kawasaki disease: update on pathogenesis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2010, 22(5): 551-560.
- [3] Gerding R. Kawasaki disease: a review[J]. *J Pediatr Health Care*, 2011, 25(6): 379-387.
- [4] Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway[J]. *Immunol Lett*, 2008, 116(2): 111-116.
- [5] Japaness Circulation Society Joint Research Group. Guidelines for diagnosis and management of cardiovascular sequelae in Kawasaki disease[J]. *Pediatr Int*, 2005, 47(6): 711-732.
- [6] Belay ED, Maddox RA, Holman RC, et al. Kawasaki syndrome and risk factors for coronary artery abnormalities: United States, 1994-2003[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2006, 25(3): 245-249.
- [7] Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes[J]. *J Immunol*, 2000, 164(10): 4991-4995.
- [8] Ornatowska M, Azim AC, Wang X, et al. Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(6): L1377-1384.
- [9] Schenk M, Bouchon A, Seibold F, et al. TREM-1-expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10): 3097-3106.
- [10] Kuai J, Gregory B, Hill A, et al. TREM-1 expression is increased in the synovium of rheumatoid arthritis patients and induces the expression of pro-inflammatory cytokines[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48(11): 1352-1358.
- [11] Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M. The TREM receptor family and signal integration[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(12): 1266-1273.
- [12] Fortin CF, Lesur O, Fulop T Jr. Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4[J]. *Int Immunol*, 2007, 19(1): 41-50.
- [13] Radsak MP, Salih HR, Rammensee HG, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival[J]. *J Immunol*, 2004, 172(8): 4956-4963.
- [14] Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, et al. Increased levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in patients with acute pancreatitis[J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(7): 2048-2053.
- [15] Bisson C, Massin F, Lefevre PA, et al. Increased gingival crevicular fluid levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM)-1 in severe periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2012, 39(12): 1141-1148.
- [16] Hamada H, Suzuki H, Abe J, et al. Inflammatory cytokine profiles during Cyclosporin treatment for immunoglobulin-resistant Kawasaki disease[J]. *Cytokine*, 2012, 60(3): 681-685.

(本文编辑: 俞燕)