LCWE诱导的小鼠川崎病模型中sEPCR、 vWF、α-SMA、SM22α的表达与冠状动脉 病变的观察

庞现勇^{1,2},钱翠平^{1,2},郑丽云^{1,2},王琼琼^{1,2},赵 胜^{1,2*}

¹安徽医科大学儿童医学中心,安徽 合肥 ²安徽医科大学第五临床医学院,安徽 合肥

收稿日期: 2025年5月25日; 录用日期: 2025年6月17日; 发布日期: 2025年6月27日

摘要

目的:观察LCWE诱导川崎病模型小鼠血浆中可溶性内皮细胞蛋白C受体(Soluble endothelial cell protein C receptor, sEPCR)、血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)、 α -平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α -SMA)、平滑肌22 α (smooth muscle 22 α , SM22 α)的表达水平及与炎症反应和 冠状动脉病变的关系。方法: 4~6周龄C57BL/6雄性小鼠16只,分为模型组和对照组。模型组分为大、 中、小三个剂量组,三组分别单次腹腔注射三种浓度(0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml)的干酪乳杆菌 细胞壁提取物(Lactobacillus casei cell wall extract, LCWE) 1 ml来制备川崎病模型小鼠,对照组注射等 容量PBS缓冲液。注射14 d后,采用ELISA方法检测4组小鼠血浆sEPCR、vWF、α-SMA、SM22α表达水 平。采用苏木精 - 伊红染色法(HE染色法)检查冠状动脉及周围心肌组织、腹主动脉的病理变化。结果: 与对照组相比,模型组小鼠冠状动脉及周围心肌组织、腹主动脉组织出现病理改变,且随着LCWE注射剂 量的增加,浸润冠状动脉及周围心肌组织、腹主动脉组织的炎性细胞数量明显增加,炎症评分随着LCWE 注射剂量的升高而升高;模型组小鼠血浆中sEPCR、vWF含量较对照组升高(P < 0.05), LCWE注射剂量 越大则升高越明显: α -SMA、SM22 α 含量较对照组明显降低(P < 0.05) LCWE注射剂量越大则降低越明 显。将四组小鼠的炎症评分与血浆中四种生物标志物含量进行相关性分析发现:炎症评分与血浆中 sEPCR、vWF的含量呈正相关,与 α -SMA、SM22 α 的含量呈负相关。结论:LCWE可以诱发小鼠腹主动脉 和心肌损伤,并可能诱发小鼠动脉平滑肌细胞由收缩型向合成型转换,小鼠血浆中sEPCR、vWF、 α -SMA、 SM22 α 的表达水平与LCWE注射剂量存在相关性。

关键词

川崎病,血管炎,冠状动脉损伤,小鼠,sEPCR, vWF, α -SMA, SM22 α

文章引用: 庞现勇, 钱翠平, 郑丽云, 王琼琼, 赵胜. LCWE 诱导的小鼠川崎病模型中 sEPCR、vWF、α-SMA、SM22α 的 表达与冠状动脉病变的观察[J]. 临床医学进展, 2025, 15(6): 1639-1645. DOI: 10.12677/acm.2025.1561899

^{*}通讯作者。

Observation of sEPCR, vWF, α -SMA, and SM22 α Expression with Coronary Artery Lesions in the LCWE-Induced Mouse Model of Kawasaki Disease

Xianyong Pang^{1,2}, Cuiping Qian^{1,2}, Liyun Zheng^{1,2}, Qiongqiong Wang^{1,2}, Sheng Zhao^{1,2*}

¹Children's Medical Center of Anhui Medical University, Hefei Anhui ²Fifth Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei Anhui

Received: May 25th, 2025; accepted: Jun. 17th, 2025; published: Jun. 27th, 2025

Abstract

Objective: To observe the expression levels of soluble endothelial cell protein C receptor (sEPCR), von Willebrand factor (vWF), α -smooth muscle actin (α -SMA), and smooth muscle 22 α (SM22 α) in the plasma of a Kawasaki disease (KD) mouse model induced by Lactobacillus casei cell wall extract (LCWE), and to explore their relationship with inflammatory response and coronary artery lesions. Methods: Sixteen 4~6-week-old male C57BL/6 mice were divided into a model group and a control group. The model group was further subdivided into three subgroups based on LCWE dosage: lowdose (0.25 mg/mL), medium-dose (0.5 mg/mL), and high-dose (1.0 mg/mL). Each subgroup received a single intraperitoneal injection of 1 mL of LCWE at the corresponding concentration to establish the KD mouse model, while the control group was injected with an equal volume of PBS buffer. Fourteen days after injection, ELISA was used to measure plasma levels of sEPCR, vWF, α -SMA, and SM22 α in all groups. Pathological changes in the coronary arteries, surrounding myocardial tissue, and abdominal aorta were examined using hematoxylin-eosin (HE) staining. Results: Compared with the control group, the model group exhibited pathological alterations in the coronary arteries, surrounding myocardial tissue, and abdominal aorta. As the LCWE dosage increased, the number of inflammatory cells infiltrating these tissues significantly rose, and the inflammation score increased accordingly. Plasma levels of sEPCR and vWF were elevated in the model group (P < 0.05), with higher LCWE doses leading to greater increases, while α -SMA and SM22 α levels were significantly reduced (P < 0.05), with larger LCWE doses resulting in more pronounced decreases. Correlation analysis between inflammation scores and plasma biomarker levels revealed that inflammation scores positively correlated with sEPCR and vWF levels but negatively correlated with α -SMA and SM22 α levels. Conclusion: LCWE can induce abdominal aortic and myocardial injury in mice and may promote the transition of arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. The expression levels of sEPCR, vWF, α -SMA, and SM22 α in mouse plasma are dose-dependent on LCWE injection.

Keywords

Kawasaki Disease, Vasculitis, Coronary Artery Injury, Mouse, sEPCR, vWF, α -SMA, SM22 α

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Open Access

1. 引言

川崎病(KD)是一种急性全身性血管炎,主要影响5岁以下儿童,临床表现为发热、皮疹、结膜充血等。川崎病虽多为自限性的,但部分患者可并发冠状动脉损伤(CAL)甚至动脉瘤(CAA)。川崎病病因未明,研究显示其与遗传和环境因素相关,亚裔人群发病率较高[1]。因此,探明川崎病的病理生理机制,特别是其导致血管内皮损伤的原因,对于预防和治疗 KD 导致的冠状动脉炎症(CAL)具有重要意义。

可溶性内皮细胞蛋白 C 受体(sEPCR)是血浆中的一种重要的生物标志物,主要反映血管炎症损伤,由血浆内金属蛋白酶溶解内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR)导致其与细胞膜分离后脱落形成[2]。vWF 是一种凝血相关蛋白,在凝血初期起关键作用,vWF 同时也作为血管内皮炎症的"桥梁分子",可以促进炎症细胞激活和炎症介质释放[3]。因此,血浆 sEPCR、vWF 的含量升高可提示动脉内皮损伤的存在。

在血管炎过程中会伴随着血管平滑肌细胞(VSMC)的表型转化,在健康动脉中,大多数 VSMC 保持 收缩表型,这使它们能够调节血管张力并维持血流动力学平衡,在血管炎发生时产生的氧化或机械刺激 等应激信号会导致 VSMC 的增殖和分化,表型由收缩型变为合成型[4]。α-SMA、SM22α 都是肌动蛋白相 关蛋白,在收缩性 VSMC 中含量丰富,被广泛用作识别 VSMC 表型转化的标志物[5],血浆 α-SMA 和 SM22α 的含量变化可以反映动脉血管平滑肌的表型变化。

本研究旨在分析 LCWE 诱导的川崎病样血管炎小鼠模型中血浆 sEPCR、vWF、a-SMA、SM22a 的含量变化,初步研究这四种生物标志物在 KD 所致 CAL 中所产生的作用及其可能的机制。

2. 材料与方法

2.1. LCWE 的萃取

查阅文献使用经典的造模方法[6],在无菌条件下,用 MRS 肉汤溶解冻干菌种,在 37℃厌氧培养 48 h。 传代培养后进行离心,从而获得细菌沉淀物。用 4%的十二烷基硫酸钠(SDS)裂解细菌。离心、洗涤,只留 下沉淀物。随后依次向沉淀物中加入脱氧核糖核酸酶(DNase I)、核糖核酸酶(RNase)以及胰蛋白酶进行消化 处理。最后加入等体积的 PBS 缓冲液重新悬浮沉淀物,进行超声破碎和低温高速离心,取上清液得到LCWE。

采用苯酚 - 硫酸比色法测定上清液中的单糖浓度,以此评估 LCWE 的含量,并把 LCWE 的浓度调整为1 mg/mL 留作备用。

2.2. 实验动物的分组与处理

小鼠在标准环境中饲养。随机分为对照组与模型组,模型组分为大、中、小三个剂量组,三组分别 单次腹腔注射三种浓度(0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml)的干酪乳杆菌细胞壁提取物(LCWE) 1 ml 来制备 川崎病血管炎模型小鼠,对照组注射等量 PBS 缓冲液。每日观察小鼠一般生命情况,第 14 天称体重,取 血后小鼠自然死亡并解剖。所有动物实验流程符合《实验动物护理和使用指南》(2011 年第 8 版,美国国 立卫生研究院出版)。

2.3. 腹腔注射 LCWE

在进行腹腔注射操作前,保双手已佩戴好防咬手套,以保障安全。用一只手稳固而轻柔地按住小鼠的颈部皮肤,确保其头部固定,同时用另一只手轻轻夹住小鼠的尾巴,以控制其身体。将小鼠缓慢翻转,使其腹部朝上,头部自然向下倾斜,形成一个便于注射的姿势。避免小鼠受到惊吓或不适。在准备好注射姿势后,取已装载 LCWE 或 PBS 溶液的注射器,以大约 45 度的角度,将针头轻轻刺入小鼠的腹部。刺入时需确保角度适中,避免过深或过浅。刺入后,开始缓慢而稳定地推注溶液,同时注意观察注射器的回抽情况,以确保针头未误入血管,避免血液回流。过程中防止溶液误入皮下组织,形成皮丘或肿胀,

影响实验结果。如发现小鼠出现异常反应,如剧烈挣扎、呼吸急促等,应立即停止操作,并采取相应措施。操作结束后,需将小鼠妥善安置,观察其恢复情况。

2.4. 标本收集(见图 1)

向小鼠腹腔中注射 4%水合氯醛溶液(0.1 mL/10g)对小鼠实施麻醉。使用 1 ml 的注射器穿刺心脏,采 集约 1~1.5 ml 血液,采集后立即放入 4000 转/分钟的离心机中离心 30 分钟以分离血浆层(之后将其放入 ~80℃冰箱中以便于后续的 ELISA 检测)。将小鼠固定在解剖台上,沿着中线切开皮肤,暴露腹腔、胸腔, 分离并剪下心脏组织、腹主动脉和两个肾脏,样本用 4%的甲醛溶液固定,置于室温下保存,用于后续组 织病理学检测。

2.5. 苏木精 - 伊红染色(见图 2)

将小鼠的心脏组织、胸主动脉和腹主动脉样品取出后,依次进行乙醇脱水、二甲苯溶液透明化处理, 再进行石蜡包埋。对心脏组织进行连续冷冻切片(间隔尺寸为 10 mm),确保切片厚度在 3~5 μm 之间,而 后进行苏木精-伊红染色,最后通过 BZ-X710 显微镜采集图像。

2.6. 酶联免疫吸附法(ELISA) (见表 1, 图 3)

把保存在-80℃冰箱中的小鼠血浆取出后放置于室温下,按照 ELISA 试剂盒说明书的要求严格进行 检测,制作标准曲线并测量吸光度(OD),然后分别算出 sEPCR、vWF、α-SMA、SM22α 的含量。

2.7. 统计学分析

通过 SPSS 26.0 软件分析数据、Graphpad Pism9.5 软件制作图表。符合正态分布的计量资料以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较使用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 P < 0.05为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 小鼠一般情况

与对照组相比,腹腔注射 LCWE 3 d 后,三组模型组小鼠均出现毛发脱落,反应迟钝,饮食减少的表现。

3.2. 小鼠解剖结果

与对照组相比,模型组小鼠腹主动脉管径增粗,且随 LCWE 注射浓度增高,管径增粗更明显。



Figure 1. Anatomical images of the abdominal aorta in PBS-injected and LCWE-injected mice 图 1. PBS 注射组和 LCWE 注射组小鼠腹主动脉解剖图片

3.3. HE 染色结果

光镜下,对照组小鼠冠状动脉内膜光滑完整,内皮细胞排列整齐,未见炎症细胞浸润或组织损伤。 而 LCWE 注射组小鼠冠状动脉内膜粗糙不平,内皮细胞排列无序,部分细胞肿胀或脱落。血管周围组织 可见炎症细胞浸润。且随 LCWE 注射浓度的升高,炎症细胞浸润程度,内皮损伤的程度更加明显。



Figure 2. HE staining results of the heart and coronary arteries (light microscope, ×100) 图 2. 心脏及冠状动脉 HE 染色结果(光学显微镜, ×100)

3.4. ELISA 检测结果

ELISA 结果显示,与对照组相比,模型组小鼠血浆中 sEPCR、vWF 表达水平升高, α -SMA、SM22 α 表达水平降低(P < 0.05)。见表 1、图 3。

Table 1. Comparison of expression levels of sEPCR, vWF, α -SMA, SM22 α in plasma among the four groups of mice ($\overline{x} \pm s$, n = 4) 表 1. 四组小鼠血浆中 sEPCR、vWF、 α -SMA、SM22 α 表达水平比较($\overline{x} \pm s$, n = 4)

	control	0.25 mg	0.5 mg	1 mg
sEPCR (ng/ml)	105.7 ± 10.43	132.0 ± 5.58	173.3 ± 11.88	233.7 ± 23.76
vWF (ng/ml)	9.89 ± 2.68	17.19 ± 2.04	27.98 ± 6.17	48.05 ± 2.71
α-SMA (pg/ml)	26.61 ± 3.72	16.33 ± 4.45	7.56 ± 1.10	3.39 ± 0.58
SM22α (ng/ml)	6.64 ± 0.35	4.99 ± 0.17	1.85 ± 0.23	0.99 ± 0.41





Figure 3. Bar chart comparison of sEPCR, vWF, α -SMA, and SM22 α expression levels in plasma of four groups of mice. (control is the PBS injection group, A, B, C is the LCWE injection groups with 0.25 mg/mouse, 0.5 mg/mouse, 1 mg/mouse respectively)

图 3. 四组小鼠血浆中 sEPCR、vWF、α-SMA、SM22α 表达水平的柱状图比较(contol 为 PBS 注射组, A、B、C 组 为 0.25 mg/只、0.5 mg/只、1 mg/只 LCWE 注射组)

4. 讨论

川崎病是一种好发于 5 岁以内儿童,以发热伴皮肤、黏膜、淋巴结、血管损伤的疾病[7]。目前已证 实 IL-1、IL-6、TNF-α 以及 NF-κB 等炎症因子,能够促进川崎病炎症反应与内皮损伤,是川崎病患者发 生冠状动脉病变(CAL)时内皮细胞功能障碍的重要因素。抑制这些炎症因子的表达或者拮抗其作用,能够 减少动脉内皮细胞的损伤[8]。因此,探讨 KD 血管炎血管内皮损伤标志物和血管平滑肌细胞表型转换标 志物的作用机制,对精准抗炎治疗和改善 CAL 的预后有重要意义。

LCWE 可导致小鼠产生动脉血管炎,其与人类川崎病血管炎所观察到的组织病理学、临床表现、免疫特征非常相似,是目前构建川崎病样血管炎小鼠模型常用的方法之一[9]。本研究结果显示:LCWE 注射组小鼠较对照组小鼠腹主动脉管径明显增粗(见图 1);病理切片提示 LCWE 注射组小鼠冠状动脉及其周围被大量炎性细胞浸润,冠状动脉内膜欠光滑,内皮细胞排列紊乱,而对照组却没有相应改变(见图 2)。随着 LCWE 注射量的增加,炎症越明显;酶联免疫吸附法检测四组小鼠血浆中 sEPCR、vWF、α-SMA、SM22α 含量的结果显示,与对照组小鼠比较,模型组的 sEPCR、vWF 表达水平明显升高,并且在模型组中,随着注射 LCWE 的注射量增加, α-SMA、SM22α 的表达水平明显降低,并且在模型组中,随着注射 LCWE 的注射量增加,α-SMA、SM22α 的表达水平也随之减低(见表 1,图 3)。

综上,我们推测: sEPCR、vWF、α-SMA、SM22α 这四种生物标志物可能参与了川崎病血管炎的炎症过程, sEPCR、vWF 可能参与了 KD 所致 CAL 中血管内皮损伤的过程; α-SMA、SM22α 可能参与了 KD 所致 CAL 中血管平滑肌表型转换的过程。本研究结果表明,检测这四种炎症介质的变化,或许可以 作为一种间接指标来评价川崎病血管炎的炎症程度,可能对川崎病的治疗有指导意义。

参考文献

[1] Gordon, J.B., Daniels, L.B., Kahn, A.M., Jimenez-Fernandez, S., Vejar, M., Numano, F., *et al.* (2016) The Spectrum of Cardiovascular Lesions Requiring Intervention in Adults after Kawasaki Disease. *JACC: Cardiovascular Interventions*,

9, 687-696. https://doi.org/10.1016/j.jcin.2015.12.011

- [2] Chiappetta, S., Ripa, M., Galli, L., Razzari, C., Longo, V., Galli, A., et al. (2016) Soluble Endothelial Protein C Receptor (sEPCR) as an Inflammatory Biomarker in Naive HIV-Infected Patients during ART. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 71, 1627-1631. <u>https://doi.org/10.1093/jac/dkw010</u>
- [3] Yang, J., Wu, Z., Long, Q., Huang, J., Hong, T., Liu, W., *et al.* (2020) Insights into Immunothrombosis: The Interplay among Neutrophil Extracellular Trap, Von Willebrand Factor, and ADAMTS13. *Frontiers in Immunology*, **11**, Article ID: 610696. <u>https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.610696</u>
- [4] Cao, G., Xuan, X., Hu, J., Zhang, R., Jin, H. and Dong, H. (2022) How Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Switching Contributes to Vascular Disease. *Cell Communication and Signaling*, 20, Article No. 180. https://doi.org/10.1186/s12964-022-00993-2
- [5] Shen, X., Xie, X., Wu, Q., Shi, F., Chen, Y., Yuan, S., *et al.* (2024) S-Adenosylmethionine Attenuates Angiotensin II-Induced Aortic Dissection Formation by Inhibiting Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch and Autophagy. *Biochemical Pharmacology*, 219, Article ID: 115967. <u>https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115967</u>
- [6] Hara, T., Yamamura, K. and Sakai, Y. (2021) The Up-to-Date Pathophysiology of Kawasaki Disease. *Clinical & Translational Immunology*, 10, e1284. <u>https://doi.org/10.1002/cti2.1284</u>
- [7] Hosseininasab, A., Pashang, F., Rezaei Zadeh Rukerd, M., Mirkamali, H., Nakhaie, M. and Sayyadi, A. (2023) Kawasaki Disease in Children: A Retrospective Cross-Sectional Study. *Rheumatology*, 61, 152-160. <u>https://doi.org/10.5114/reum/163170</u>
- [8] Paniz-Mondolfi, A.E., van den Akker, T., Márquez-Colmenarez, M.C., Delgado-Noguera, L.A., Valderrama, O. and Sordillo, E.M. (2020) Kawasaki Disease Seasonality in Venezuela Supports an Arbovirus Infection Trigger. *Journal of Medical Virology*, 92, 2903-2910. <u>https://doi.org/10.1002/jmv.26381</u>
- [9] Noval Rivas, M. and Arditi, M. (2020) Kawasaki Disease: Pathophysiology and Insights from Mouse Models. *Nature Reviews Rheumatology*, 16, 391-405. <u>https://doi.org/10.1038/s41584-020-0426-0</u>