Sema4D在川崎病血管内皮间质转化中的作用及机制

黄君华[1],张书婉[2*]（[1]西安医学院医学技术学院临床与血液学检验教研室,西安　710021;[2]西安市儿童医院检验科;*通讯作者,E-mail:shuwan0103@163.com）

摘要： *目的*　探讨信号素4D(Sema4D)在川崎病(KD)血管内皮间质转化(EndMT)中的作用及其分子机制。　*方法*　为观察Sema4D对EndMT的作用,将人冠状动脉内皮细胞(HCAEC)分为HC组、KD组和KD+VX15/2503(为Sema4D中和抗体)组;HC组与KD组分别用20%健康儿童混合血清与20%KD患儿混合血清干预,KD+VX15/2503组用20%经VX15/2503预处理的KD患儿混合血清干预;采用RT-qPCR检测三组细胞EndMT的内皮标志物(CD31、VE-cadherin和ZO-1)与间质标志物(α-SMA和Vimentin)的mRNA表达。为探究PlexinB受体对Sema4D介导的EndMT的影响,将HCAEC分为KD组、KD+si-ctrl组、KD+si-PlexinB1组和KD+si-PlexinB2组,采用RT-qPCR检测EndMT标志物的mRNA表达。为分析Sema4D对NLRP3炎症小体和NF-κB的影响,将HCAEC分为KD组、rhSema4D组、rhSema4D+si-ctrl组、rhSema4D+si-PlexinB1组和rhSema4D+si-PlexinB2组,采用RT-qPCR检测NLRP3炎症小体相关基因(NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β和IL-18)mRNA表达,Western blot检测NF-κB p65磷酸化(p-p65)水平。为探究NLRP3对Sema4D介导的EndMT的影响,将HCAEC分为KD+si-ctrl组、KD+si-NLRP3组、rhSema4D+si-ctrl组和rhSema4D+si-NLRP3组,采用RT-qPCR检测EndMT标志物的mRNA表达。为验证NF-κB通过激活NLRP3介导EndMT,将HCAEC分为PBS组、BAY11-7082(NF-κB抑制剂)组、PBS+rhSema4D组和BAY11-7082+rhSema4D组及OE-ctrl+PBS组、OE-ctrl+rhSema4D组、OE-ctrl+BAY11-7082+rhSema4D组和OE-NLRP3+BAY11-7082+rhSema4D组,采用RT-qPCR检测EndMT标志物及NLRP3表达。　*结果*　与HC组相比,KD组内皮标志物(CD31、VE-cadherin和ZO-1)降低、间质标志物(α-SMA和Vimentin)升高(均$P<0.05$);KD+VX15/2503组逆转上述变化(均$P<0.05$)。与KD+si-ctrl组相比,KD+si-PlexinB2组CD31、VE-cadherin和ZO-1表达升高、α-SMA和Vimentin表达降低(均$P<0.05$),而KD+si-PlexinB1组各指标变化差异无统计学意义。与rhSema4D+si-ctrl组相比,rhSema4D+si-PlexinB2组NLRP3炎症小体相关基因表达及NF-κB p-p65水平均降低($P<0.05$),rhSema4D+si-PlexinB1组各指标变化差异无统计学意义。与rhSema4D+si-ctrl组相比,rhSema4D+si-NLRP3组CD31、VE-cadherin和ZO-1表达增高、α-SMA和Vimentin表达下降(均$P<0.05$)。与PBS+rhSema4D组相比,BAY11-7082+rhSema4D组CD31、VE-cadherin和ZO-1表达升高、α-SMA和Vimentin及NLRP3表达降低(均$P<0.05$)。与OE-ctrl+BAY11-7082+rhSema4D组相比,OE-NLRP3+BAY11-7082+rhSema4D组CD31、VE-cadherin和ZO-1表达降低、α-SMA和Vimentin表达升高(均$P<0.05$)。　*结论*　Sema4D通过PlexinB2受体激活NF-κB/NLRP3信号轴,诱导冠状动脉内皮细胞发生EndMT。

关键词： 川崎病;　血管内皮间质转化;　信号素4D;　神经丛素B2;　核因子κB;　NLRP3
中图分类号： R725.4　**文献标识码：** A　**文章编号：** 1007-6611(2026)08-0904-11　**DOI:**10.13753/j.issn.1007-6611.2026.08.007

Role and mechanism of Sema4D in endothelial-to-mesenchymal transition in Kawasaki disease

HUANG Junhua[1], ZHANG Shuwan[2*] ([1]*Department of Clinical and Hematology, School of Medical Technology, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China*;[2]*Department of Clinical Laboratory, Xi'an Children's Hospital*;**Corresponding author, E-mail: shuwan0103@163.com*)

Abstract: *Objective*　To investigate the role of Sema4D in endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) in Kawasaki disease (KD) and its underlying molecular mechanisms. *Methods*　To observe the effect of Sema4D on EndMT, human coronary artery endothelial cells (HCAECs) were divided into HC group, KD group and KD+VX15/2503 group. The HC group was treated with 20% pooled serum from healthy children, the KD group was treated with 20% pooled serum from children with KD, and the KD+VX15/2503 group was treated with 20% pooled KD serum after pre-treatment with the Sema4D neutralizing antibody VX15/2503. RT-qPCR was performed to detect the mRNA expressions of endothelial markers (CD31, VE-cadherin, ZO-1) and mesenchymal markers (α-SMA, Vimentin) related to EndMT in cells. To investigate the role of PlexinB receptors in Sema4D-induced EndMT, HCAECs were divided into KD group, KD+si-ctrl group, KD+si-PlexinB1 group and KD+si-PlexinB2 group, and RT-qPCR was used to measure the mRNA expressions of EndMT markers. To analyze the regulatory effect of Sema4D on the NLRP3 inflammasome and NF-κB signaling,

基金项目：陕西省自然科学基础研究计划项目(2024JC-YBQN-0869);西安市科技计划项目(24YXYJ0064);西安市卫生健康委员会科研项目(2023qn12)
作者简介：黄君华,男,1985-08生,硕士,副教授,E-mail:huangjunhua1985@163.com
收稿日期：2025-12-25

HCAECs were also divided into KD group, rhSema4D group, rhSema4D+si-ctrl group, rhSema4D+si-PlexinB1 group and rhSema4D+si-PlexinB2 group; RT-qPCR was used to detect the mRNA expressions of NLRP3 inflammasome-related genes (NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1β and IL-18), and Western blot was used to assess NF-κB p65 phosphorylation (p-p65) level. To explore whether NLRP3 participates in Sema4D-mediated EndMT, HCAECs were divided into KD+si-ctrl group, KD+si-NLRP3 group, rhSema4D+si-ctrl group and rhSema4D+si-NLRP3 group; RT-qPCR was carried out to quantify the mRNA expressions of EndMT markers. To verify that NF-κB triggers EndMT by activating NLRP3, HCAECs were divided into two sets of groups: PBS group, BAY11-7082 (inhibitor of NF-κB) group, PBS+rhSema4D group, BAY11-7082+rhSema4D group, and OE-ctrl+PBS group, OE-ctrl+rhSema4D group, OE-ctrl+BAY11-7082+rhSema4D group, OE-NLRP3+BAY11-7082+rhSema4D group; RT-qPCR was used to measure EndMT markers and NLRP3 expression. *Results* Compared with HC group, the KD group showed decreased expressions of endothelial markers (CD31, VE-cadherin and ZO-1) and increased expressions of mesenchymal markers (α-SMA and Vimentin, all $P<0.05$); these changes were reversed in KD+VX15/2503 group ($P<0.05$). Compared with KD+si-ctrl group, the KD+si-PlexinB2 group exhibited increased CD31, VE-cadherin and ZO-1 expressions, and decreased α-SMA and Vimentin expressions (all $P<0.05$), whereas no significant differences were observed in KD+si-PlexinB1 group. Compared with rhSema4D+si-ctrl group, the rhSema4D+si-PlexinB2 group showed reduced expressions of NLRP3 inflammasome-related genes and p-p65 level ($P<0.05$), while the rhSema4D+si-PlexinB1 group showed no significant differences. Compared with rhSema4D+si-ctrl group, the rhSema4D+si-NLRP3 group exhibited increased CD31, VE-cadherin and ZO-1 expressions, and decreased α-SMA and Vimentin expressions ($P<0.05$). Compared with PBS+rhSema4D group, the BAY11-7082+rhSema4D group showed increased expressions of CD31, VE-cadherin, and ZO-1, and decreased expressions of α-SMA, Vimentin and NLRP3 ($P<0.05$). Compared with OE-ctrl+BAY11-7082+rhSema4D group, the OE-NLRP3+BAY11-7082+rhSema4D group exhibited decreased CD31, VE-cadherin and ZO-1 expressions, and increased α-SMA and vimentin expressions ($P<0.05$). *Conclusion* Sema4D induces EndMT in coronary artery endothelial cells by activating the NF-κB/NLRP3 signaling axis via its receptor PlexinB2.

Keywords: Kawasaki disease; endothelial-to-mesenchymal transition; semaphorin 4D; plexinB2; NF-κB; NLRP3

川崎病（Kawasaki disease，KD）是一种病因未明的儿童急性全身性血管炎[1]，其引发的冠状动脉损伤（coronary artery lesions，CAL）可导致动脉瘤、冠脉血栓、血管狭窄甚至猝死，是儿童获得性心脏病的主要原因[2]。炎症反应和血管重塑共同参与KD的发生发展[3]。近年来，血管内皮间质转化（endothelial-to-mesenchymal transition，EndMT）被认为是KD相关CAL的重要机制之一[4,5]，但目前关于KD中EndMT的刺激因子及其分子调控机制尚不明确。

信号素4D（semaphorin 4D，Sema4D）是一种重要的免疫炎症调节分子，通过与其受体神经丛素PlexinB1或PlexinB2结合激活下游信号，参与炎症及心血管疾病的病理过程[6]。本课题组前期研究发现，KD患儿血清可溶性Sema4D水平显著升高，且与CAL严重程度及血清炎症因子水平正相关；Sema4D能够促进内皮细胞炎症反应[7]。然而，Sema4D是否直接参与KD相关EndMT及其下游信号轴尚待阐明。核因子κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）是炎症反应的核心转录因子，可被多种上游信号激活并调控NOD样受体家族含pyrin结构域蛋白3（NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3，NLRP3）炎症小体相关基因（NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β和IL-18）的表达；NLRP3炎症小体活化后促进IL-1β和IL-18等促炎因子成熟与分泌，在KD冠脉损伤中发挥关键作用。但NF-κB/NLRP3信号轴在KD血管内皮细胞中参与调控EndMT过程尚缺乏证据。

本研究以KD患儿血清诱导的人冠状动脉内皮细胞（human coronary artery endothelial cell，HCAEC）为模型，探讨Sema4D是否通过PlexinB2受体偶联NF-κB/NLRP3炎症小体信号轴驱动EndMT，以期为寻找KD靶向干预策略、延缓或逆转CAL进展提供新的理论依据与实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

HCAEC购自美国Sciencell公司；胎牛血清购自美国Gibco公司；重组人Sema4D蛋白（rhSema4D）购自美国R&D公司；Sema4D中和抗体（VX15/2503）购自美国MCE公司；RNA提取试剂盒和RNeasy mini逆转录试剂盒购自德国Qiagen公司；Lipofectamine 3000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司；抗p-p65、抗p65及HRP标记二抗购自美国Abcam公司；RPMI-1640培养基购自苏州赛业生物科技有限公司；BeyoFast™ SYBR Green qPCR试剂盒和NF-κB抑制剂（BAY11-7082）购自上海碧云天生物技术有限公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科

技有限公司；小干扰RNA（siRNA）和过表达质粒及其对照序列由上海生工生物工程有限公司合成。超微量紫外分光光度计购自美国DeNovix公司；ABI 7500基因扩增仪购自美国ABI公司；蛋白免疫印迹相关仪器购自美国Bio-Rad公司；CO_2培养箱购自美国Thermofisher公司。人血清来源于西安市儿童医院确诊且未接受治疗的KD患儿（10例）和健康体检儿童（10例）。所有血清经56 ℃水浴灭活30 min，将10份KD患儿血清等体积混合，制备成KD混合血清；同时，将10份健康儿童血清等体积混合，制备成健康儿童（HC）混合血清；于-80 ℃贮存备用。本研究已获得西安市儿童医院伦理委员会批准（批准编号：20230613-16）。

1.2　细胞分组及处理方式

为明确Sema4D在KD血清诱导HCAEC发生EndMT中的作用，将HCAEC分为HC组、KD组和KD+VX15/2503组。HC组和KD组分别在含20%健康儿童血清和20%KD血清的培养基中培养24 h。KD+VX15/2503组：KD血清中加入Sema4D中和抗体VX15/2503（终浓度10 μg/mL）预处理30 min，取处理后血清配制成含20%血清的培养基培养细胞24 h。采用反转录荧光定量PCR（reverse transcription quantitative real-time PCR，RT-qPCR）检测内皮标志物（CD31、VE-cadherin和ZO-1）和间质标志物（α-SMA和Vimentin）等反映EndMT的标志物mRNA表达。

为进一步探究Sema4D诱导EndMT的浓度及时间依赖性，设置rhSema4D终浓度分别为0，500，1 000，1 500 ng/mL，每个浓度均分别刺激HCAEC 0，8，16，24 h；其中0 h对照组为对数生长期的细胞加入相应浓度rhSema4D后即刻收集，不进行孵育培养。所有组别均在含20% KD血清的培养基中培养，达到对应刺激时长后收集细胞，RT-qPCR检测CD31和α-SMA的mRNA表达。

为探索PlexinB受体对Sema4D介导的EndMT的影响，将HCAEC分为KD组、KD+si-ctrl组、KD+si-PlexinB1组和KD+si-PlexinB2组。KD组处理同上；KD+si-ctrl组、KD+si-PlexinB1组和KD+si-PlexinB2组分别转染无效siRNA、si-PlexinB1和si-PlexinB2后，在含20% KD血清的培养基中培养24 h。采用RT-qPCR检测CD31、VE-cadherin、ZO-1、α-SMA和Vimentin的mRNA表达。

为明确Sema4D/PlexinB2对NLRP3炎症小体活化和NF-κB磷酸化的影响，将HCAEC分为KD组、rhSema4D组、rhSema4D+si-ctrl组、rhSema4D+si-PlexinB1组和rhSema4D+si-PlexinB2组。KD组处理同上；rhSema4D组：在含20%KD血清和1 500 ng/mL rhSema4D的培养基中培养24 h；rhSema4D+si-ctrl组、rhSema4D+si-PlexinB1组和rhSema4D+si-PlexinB2组分别转染无效siRNA、si-PlexinB1和si-PlexinB2后，培养条件同rhSema4D组。RT-qPCR检测NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β和IL-18的mRNA表达，Western blot检测p65和p-p65蛋白表达水平。此外，为进一步确定Sema4D在NLRP3炎症小体活化和NF-κB磷酸化中的作用，另比较KD组和KD+VX15/2503组NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β和IL-18的mRNA表达及p65和p-p65蛋白表达。

为验证NLRP3在Sema4D介导的EndMT中的作用，将HCAEC分为KD+si-ctrl组、KD+si-NLRP3组、rhSema4D+si-ctrl组和rhSema4D+si-NLRP3组。KD+si-ctrl组和rhSema4D+si-ctrl组处理同上；KD+si-NLRP3组：转染si-NLRP3后，在含20%KD血清的培养基中培养24 h；rhSema4D+si-NLRP3组：转染si-NLRP3后，培养条件同rhSema4D组。采用RT-qPCR检测CD31、VE-cadherin、ZO-1、α-SMA和Vimentin的mRNA表达。

为验证NF-κB在Sema4D/PlexinB2/NLRP3通路中的作用，将HCAEC分为PBS组、BAY11-7082（NF-κB抑制剂）组、PBS+rhSema4D组和BAY11-7082+rhSema4D组。PBS组和BAY11-7082组：在含20%KD血清的培养基中分别加入PBS或BAY11-7082（终浓度10 μmol/L）培养24 h；PBS+rhSema4D组和BAY11-7082+rhSema4D组：在rhSema4D组培养基中分别加入PBS或BAY11-7082（终浓度10 μmol/L）培养24 h。采用RT-qPCR检测CD31、VE-cadherin、ZO-1、α-SMA、Vimentin及NLRP3的mRNA表达。

为明确NF-κB通过激活NLRP3从而促进EndMT，将HCAEC分为OE-ctrl+PBS组、OE-ctrl+rhSema4D组、OE-ctrl+BAY11-7082+rhSema4D组和OE-NLRP3+BAY11-7082+rhSema4D组。OE-ctrl+PBS组和OE-ctrl+rhSema4D组：转染空载体OE-ctrl后，分别在含PBS或rhSema4D（终浓度1 500 ng/mL）的培养基中培养24 h；OE-ctrl+BAY11-7082+rhSema4D组和OE-NLRP3+BAY11-7082+rhSema4D组：分别转染空载体OE-ctrl或NLRP3过表达载体OE-NLRP3后，在含20%KD血清、1 500 ng/mL rhSema4D和BAY11-7082（终浓度10 μmol/L）的培养基中培养24 h。采用RT-qPCR检测CD31、VE-cadherin、ZO-1、α-SMA

和Vimentin的mRNA表达。

1.3 细胞培养及干预准备

HCAEC在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中，37 ℃、5% CO_2培养箱内常规培养。细胞融合到70%~80%时接种到6孔板；当90%融合时，将培养基更换为含20%KD血清或20%HC血清的RPMI-1640培养基，继续在37 ℃、5% CO_2培养箱内培养24 h，收集HCAEC。每个组别实验重复3次。HCAEC的siRNA（包括靶向PlexinB1的si-PlexinB1、靶向PlexinB2的si-PlexinB2、靶向NLRP3的si-NLRP3及阴性对照si-ctrl）和过表达质粒（包括NLRP3过表达载体OE-NLRP3及空载体对照OE-ctrl）转染按照Lipofectamine试剂盒说明书进行，转染4 h，更换为含20%KD血清的RPMI-1640培养基，继续培养24 h，收集细胞。

1.4 反转录荧光定量PCR（RT-qPCR）检测内皮间质转化、NLRP3炎症小体相关分子的表达

细胞培养至适当周期，去除上清液并提取总RNA，分光光度计测定RNA浓度及纯度，并稀释至1 μg/μL。按照逆转录试剂盒说明书配制反应体系，反应条件：37 ℃ 15 min（逆转录），85 ℃ 5 s（逆转录酶失活），获得cDNA。引物名称及序列见表1。按照PCR试剂盒说明书制备反应体系：SYBR green qPCR Mix 10 μL、无酶超纯水4.4 μL、cDNA模板4 μL、上下游引物各0.8 μL。每个样本设3个复孔，反应条件：95 ℃ 10 min，1个循环；95 ℃ 15 s、58 ℃ 30 s、72℃ 40 s，40个循环。反应结束后得到各孔*Ct*值，用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各组相应目的基因表达量。

表1 引物名称和序列

Table 1 Primer name and sequences

引物名称	引物序列（5′-3′）	
CD31	F:TGCAGTGGTTATCATCGGAGTG	R:CGTTGTTGGAGTTCAGAAGTG
VE-cadherin	F:GCACCAGTTTGGCCAATATA	R:GGGTTTTTGCATAATAAGCAGG
ZO-1	F:CCTTCAGCTGTGGAAGAGGA	R:TGCTCAACTCCTTCGGGAAT
α-SMA	F:CAGGGCTGTTTTCCCATCCAT	R:GCCATGTTCTATCGGGTACTTC
Vimentin	F:GCCCTAGACGAACTGGGTC	R:GGCTGCAACTGCCTAATGAG
NLRP3	F:GTTCTGAGCTCCAACCATTCT	R:CACTGTGGGTCCTTCATCTTT
ASC	F:CAGAGTACAGCCAGAACAGGACAC	R:GTGGTCTCTGCACGAACTGCCTG
caspase-1	F:TGAAGGACAAACCGAAGG	R:GAAGAGCAGAAAGCGATA
IL-1β	F:TGGGCCTCCTCTCCTACT	R:CTTCCCCCATTCATCCCAGG
IL-18	F:ATAGCCAGCCTAGAGGTA	R:ATCAGGAGGATTCATTTC
GAPDH	F:AATGACCCCTTCATTGAC	R:TCCACGACGTACTCAGCG

1.5 Western blot检测细胞p65、p-p65的蛋白表达

细胞培养至适当周期，于培养板中加入含磷酸酶抑制剂的RIPA（400 μL/孔），冰上裂解30 min，收集细胞，13 000 r/min离心30 min，定量上清液蛋白，按比例加入上样缓冲液，100 ℃煮沸10 min使蛋白变性。等体积法每孔上样10 μL，SDS-PAGE分离（160 mA，40 min），转膜（恒流400 mA，35 min）。5%脱脂牛奶封闭1 h，TBST洗3次，一抗p65（1∶5 000）、p-p65（1∶5 000）、β-actin（1∶5 000）比例稀释，4 ℃过夜，TBST洗3次，加入含辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶5 000）室温孵育1 h，TBST洗3次，加入ECL显影。在成像仪中采集图像，原始图像用Image J软件定量分析。

1.6 统计学分析

采用GraphPad Prism 7.0软件进行统计分析，所有实验重复至少3次。计量资料以均数±标准差（$\bar{X}\pm S$）表示，两组间比较用*t*检验，多组间比较用单因素方差分析及Bonferroni事后检验。不同浓度及不同时点的rhSema4D对CD31和α-SMA mRNA表达量的数据分析采用双因素重复测量方差分析，同一组内不同时点的比较采用Bonferroni法，同一时点的组间比较采用Tukey法；同一组内CD31和α-SMA的mRNA表达量的时间趋势分析采用单因素方差分析的线性趋势检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

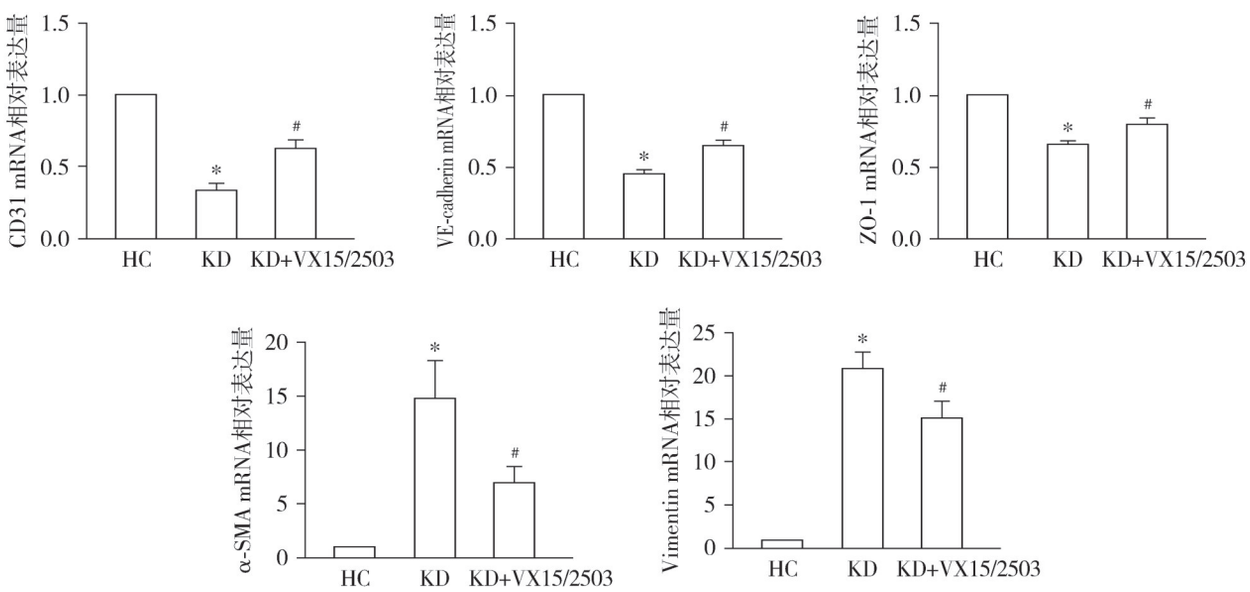
2 结果

2.1 Sema4D对KD血清诱导的EndMT的影响

RT-qPCR结果显示，与HC组相比，KD组HCAEC中内皮标志物（CD31、VE-cadherin和ZO-1）mRNA表达水平下调，而间质标志物（α-SMA和Vimentin）mRNA表达水平上调（均$P<0.01$）；与KD组相比，

KD+VX15/2503组HCAEC中CD31、VE-cadherin、ZO-1 mRNA表达水平明显升高(P<0.05)，α-SMA、Vimentin mRNA表达水平明显降低(P<0.05，见图1)。

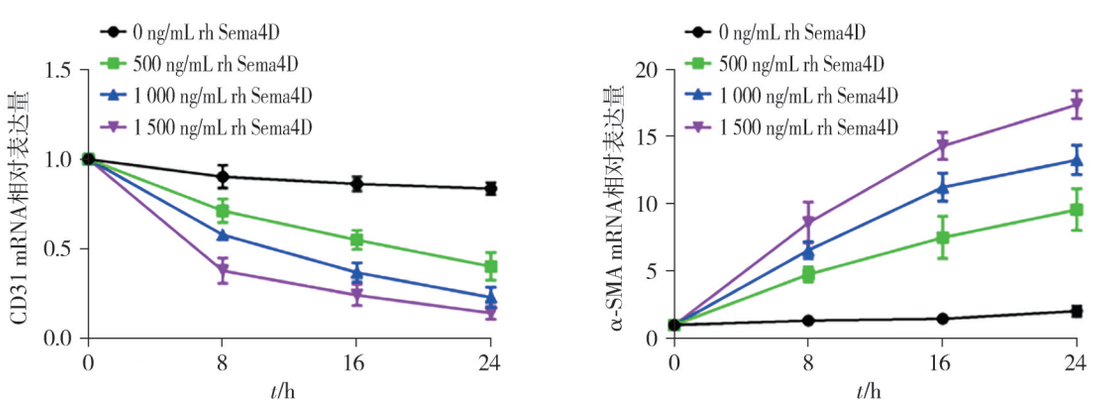
双因素重复测量方差分析显示，浓度与时间对CD31和α-SMA mRNA表达的交互作用均有统计学意义(CD31：$F_{(9,18)}$=20.75，P<0.001；α-SMA：$F_{(9,18)}$=88.15，P<0.001)，浓度主效应有统计学意义(CD31：$F_{(3,6)}$=299.9，P<0.001；α-SMA：$F_{(3,6)}$=275.3，P<0.001)，时间主效应也有统计学意义(CD31：$F_{(3,6)}$=464.0，P<0.001；α-SMA：$F_{(3,6)}$=291.3，P<0.001)。经Bonferroni事后多重比较检验，500，1 000，1 500 ng/mL各浓度组细胞在8，16，24 h各时间点的CD31和α-SMA mRNA表达差异均有统计学意义(P<0.05)；经Tukey事后多重比较检验，同一时间点各浓度组间CD31和α-SMA mRNA表达差异亦均具有统计学意义(P<0.05)。为验证CD31和α-SMA mRNA表达随时间的变化，在各浓度组内采用单因素方差分析的线性趋势检验，结果显示时间线性趋势均有统计学意义(P<0.05)，说明CD31 mRNA表达量随时间呈进行性下降，α-SMA mRNA表达量呈进行性升高(见图2)。综上，Sema4D可促进KD血清诱导的EndMT，后续实验采用1 500 ng/mL刺激24 h作为干预条件。



注：与HC组比较，*P<0.05；与KD组比较，#P<0.05

图1　Sema4D对人冠状动脉内皮细胞发生内皮间质转化的影响

Figure 1　Effects of Sema4D on Endothelial-to-Mesechgmal transition in human coronary artery endothelial cells of endothelial cells



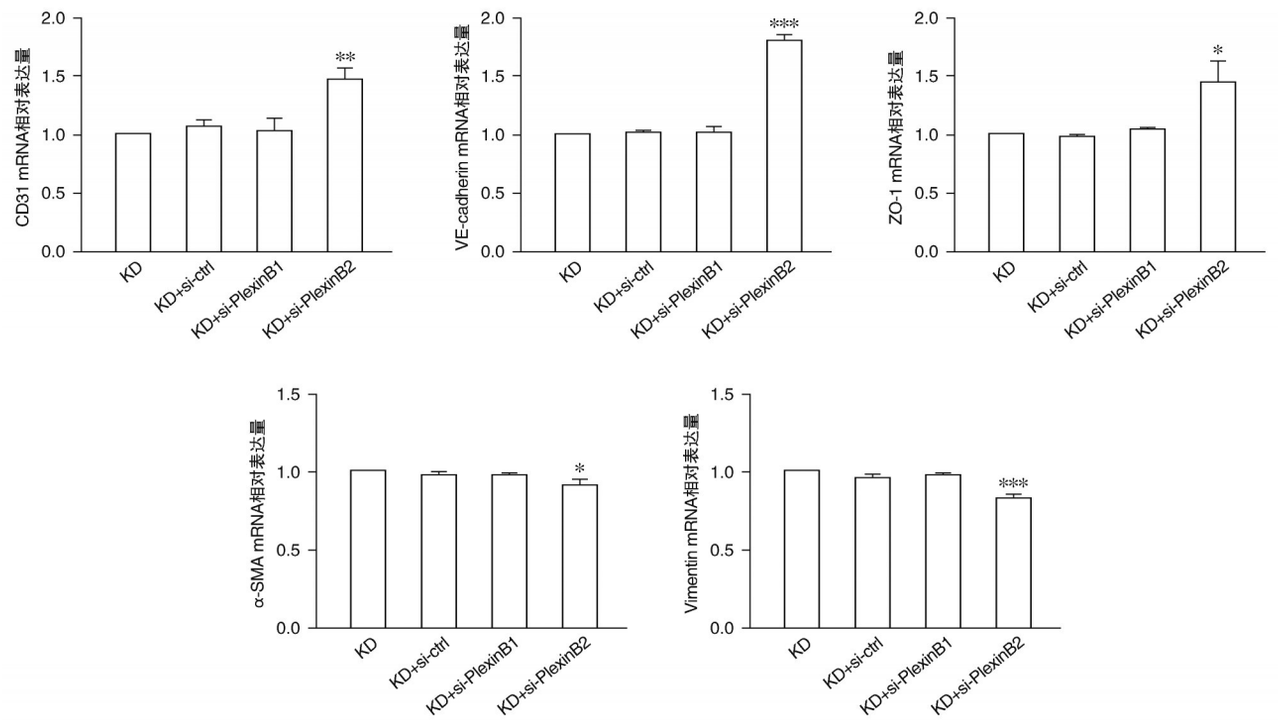
注：经双因素重复测量方差分析，浓度与时间的交互作用、浓度主效应和时间主效应均有统计学差异，P<0.001。

图2　梯度浓度rhSema4D刺激HCAEC不同时间CD31和α-SMA mRNA表达

Figure 2　Effects of gradient concentrations of rhSema4D on CD31 and α-SMA mRNA expression in human coronary artery endothelial cells over time

2.2 PlexinB2受体对Sema4D介导的EndMT的影响

与KD+si-ctrl组相比，KD+si-PlexinB2组CD31、VE-cadherin、ZO-1 mRNA表达水平明显升高（$P<0.05$），α-SMA、Vimentin mRNA表达水平明显降低（$P<0.05$）；而KD+si-PlexinB1组与KD+si-ctrl组相比，上述内皮及间质标志物mRNA表达水平差异均无统计学意义（见图3），说明川崎病中Sema4D通过结合PlexinB2促进HCAEC的EndMT。



注：与KD+si-ctrl组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

图3 敲减PlexinB受体对Sema4D介导的内皮间质转化的影响

Figure 3 Effects of knockdown of PlexinB receptors on Sema4D-mediated EndMT

2.3 Sema4D/PlexinB2对NLRP3炎症小体活化的影响

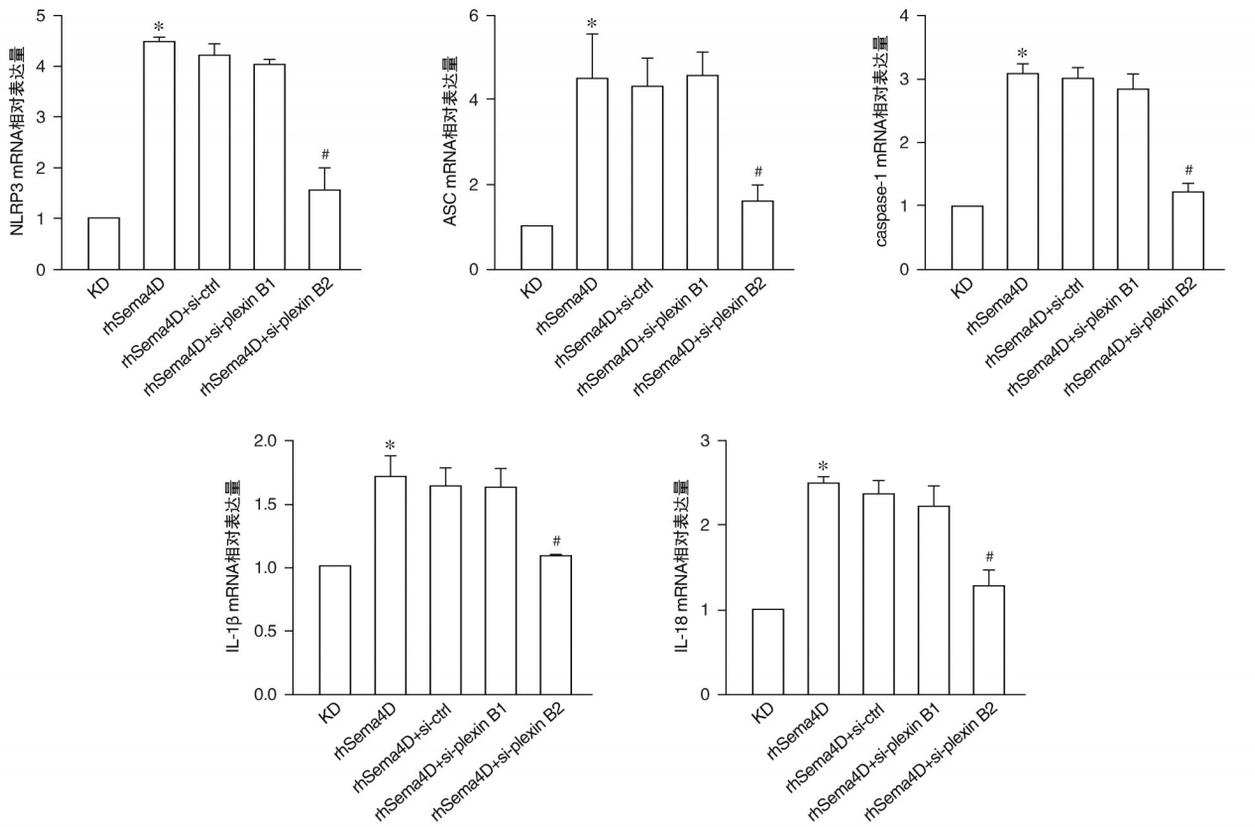
与KD组相比，rhSema4D组NLRP3炎症小体相关基因（NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β和IL-18）的mRNA表达水平明显上调（$P<0.05$）。与rhSema4D+si-ctrl组相比，rhSema4D+si-PlexinB2组NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β和IL-18的mRNA表达水平明显降低（$P<0.05$）；而rhSema4D+si-PlexinB1组与rhSema4D+si-ctrl组相比，上述基因mRNA表达水平差异无统计学意义。与KD组相比，KD+VX15/2503组HCAEC中上述基因的表达较KD组明显下调（$P<0.01$，见图4），说明Sema4D通过PlexinB2激活NLRP3炎症小体。

2.4 NLRP3对Sema4D介导的EndMT的影响

与rhSema4D+si-ctrl组相比，rhSema4D+si-NLRP3组HCAEC中CD31、VE-cadherin、ZO-1 mRNA表达水平明显升高，α-SMA、Vimentin的mRNA表达水平明显降低（$P<0.01$，见图5），说明NLRP3参与了Sema4D介导的HCAEC的EndMT过程。

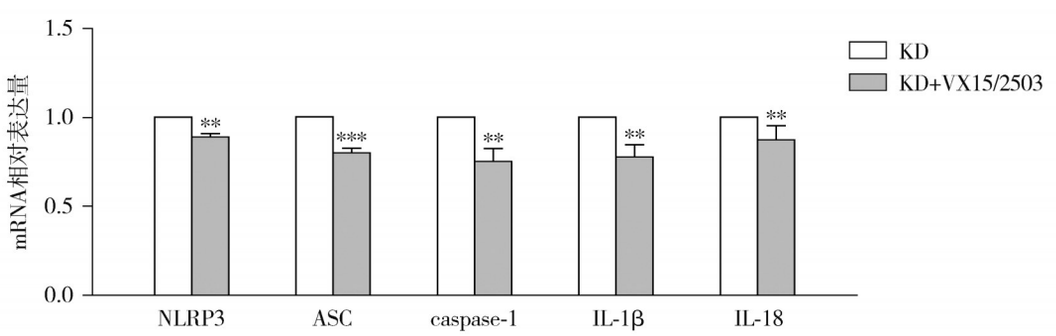
2.5 Sema4D/PlexinB2对NF-κB磷酸化的影响

Western blot结果显示，与KD组相比，rhSema4D组HCAEC中NF-κB磷酸化（p-p65）水平明显升高，而总p65蛋白表达水平无明显变化。与rhSema4D+si-ctrl组相比，rhSema4D+si-PlexinB2组HCAEC中p-p65蛋白表达水平明显降低（$P<0.05$，见图6）；而rhSema4D+si-PlexinB1组与rhSema4D+si-ctrl组相比，p-p65蛋白表达水平差异无统计学意义。另外，KD+VX15/2503组HCAEC中p-p65蛋白表达水平较KD组也明显下降（$P<0.05$，见图6）。以上结果说明Sema4D通过PlexinB2促进HCAEC中NF-κB磷酸化。



注：与KD组比较，$^{*}P<0.05$；与rhSema4D+si-ctrl组比较，$^{\#}P<0.05$。

A. 敲减受体后RT-qPCR检测HCAEC中NLRP3炎症小体相关基因的相对表达



注：与KD组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

B. VX15/2503中和Sema4D后RT-qPCR检测HCAEC中NLRP3炎症小体相关基因的相对表达

图4　Sema4D和PlexinB2对NLRP3炎症小体相关基因表达的影响

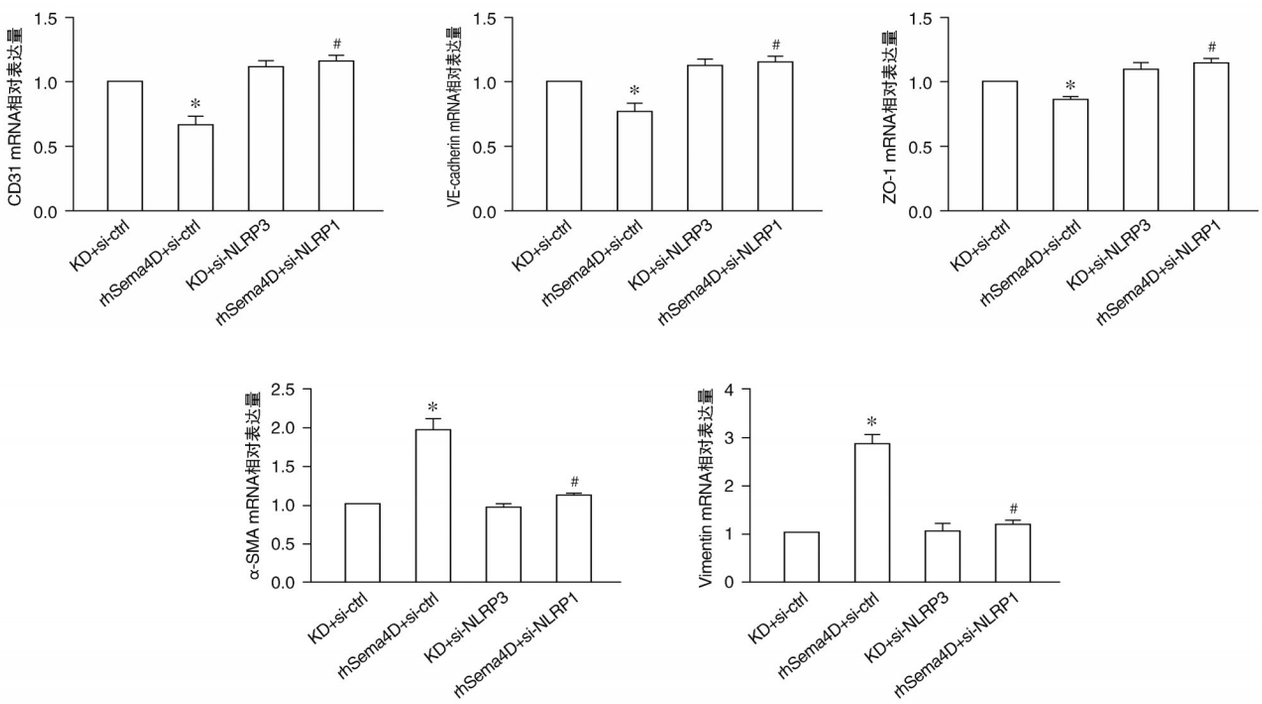
Figure 4　Effects of Sema4D and PlexinB2 on the expressions of NLRP3 inflammasome-related genes

2.6　NF-κB对NLRP3表达和EndMT的影响

与PBS+rhSema4D组相比，BAY11-7082+rhSema4D组HCAEC中CD31、VE-cadherin、ZO-1的mRNA表达水平明显升高（$P<0.01$），α-SMA、Vimentin的mRNA表达水平明显降低（$P<0.001$）；NLRP3 mRNA的表达水平也明显下降（$P<0.05$，见图7）。说明Sema4D通过NF-κB介导EndMT和NLRP3表达。

2.7　NF-κB对NLRP3促进的EndMT的影响

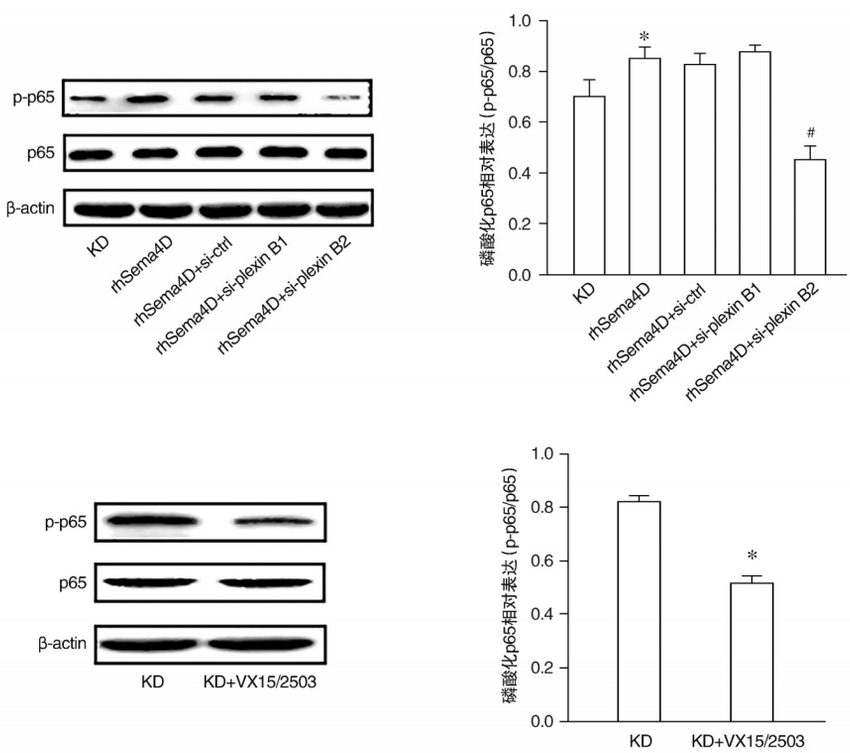
在回复实验中，用BAY11-7082抑制NF-κB后，与OE-ctrl+BAY11-7082+rhSema4D组相比，OE-NLRP3+BAY11-7082+rhSema4D组HCAEC中CD31、VE-cadherin、ZO-1的mRNA表达水平明显降低（$P<0.05$），α-SMA、Vimentin的mRNA表达水平明显升高（$P<0.05$，见图8），说明NF-κB通过激活NLRP3促进HCAEC发生EndMT。



注：与KD+si-ctrl组比较，*P<0.05；与rhSema4D+si-ctrl组比较，#P<0.05。NLRP3，NOD样受体家族含pyrin结构域蛋白3。

图5 敲减NLRP3对Sema4D介导的人冠状动脉内皮细胞内皮间质转化的影响

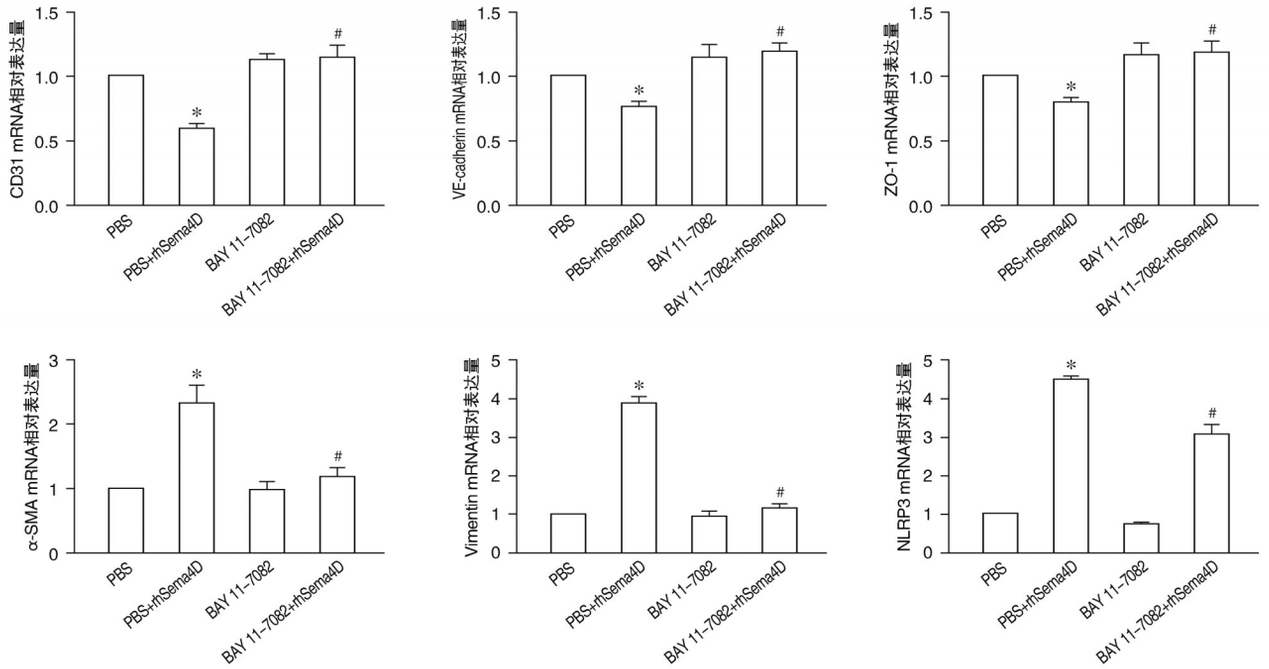
Figure 5 Effects of knockdown of NLRP3 on Sema4D-mediated EndMT



注：与KD组比较，*P<0.05；与rhSema4D+si-ctrl组比较，#P<0.05。

图6 Sema4D和PlexinB2对NF-κB磷酸化表达的影响

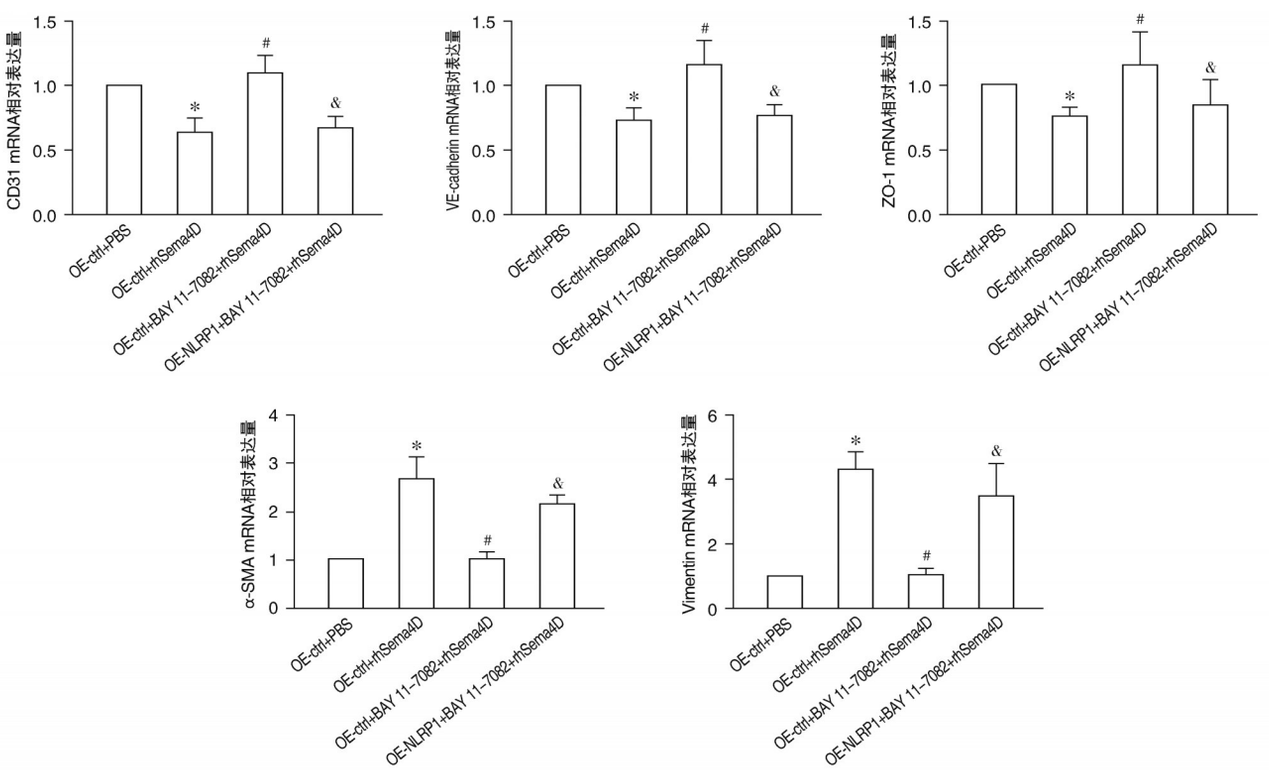
Figure 6 Effects of Sema4D and PlexinB2 on the phosphorylation of NF-κB



注：与PBS组比较，*P<0.05；与PBS+rhSema4D组比较，#P<0.05。NLRP3：NOD样受体家族含pyrin结构域蛋白3。

图7　抑制NF-κB对EndMT和NLRP3表达的影响

Figure 7　Effect of inhibition of NF-κB on EndMT and NLRP3 expression



注：与OE-ctrl+PBS组比较，*P<0.05；与OE-ctrl+rhSema4D组比较，#P<0.05；与OE-ctrl+BAY11-7082+rhSema4D组比较，&P<0.05。NLRP3：NOD样受体家族含pyrin结构域蛋白3；NF-κB：核因子κB；EndMT：内皮间质转化；PBS：磷酸盐缓冲液；rhSema4D：重组人信号素4D。

图8　过表达NLRP3回复NF-κB抑制剂对EndMT的缓解作用

Figure 8　Effect of NLRP3 overexpression on EndMT alleviated by NF-κB inhibitor

3 讨论

KD是儿童获得性心脏病的主要原因之一，其核心病理环节是CAL，但发病机制至今未明。近年来，EndMT被证实是CAL的关键因素[8,9]，然而介导这一过程的上游信号触发因子及具体分子信号轴仍未充分阐释[10,11]。本研究结果表明，免疫调节分子Sema4D可通过其特异性受体PlexinB2，依次激活NF-κB与NLRP3炎症小体，从而驱动HCAEC发生EndMT。这为理解KD发病机制提供了新线索，并为干预CAL提供了潜在新靶点。

本研究结果显示，KD患儿血清可诱导HCAEC发生EndMT，表现为内皮标志物（CD31、VE-cadherin、ZO-1）下调及间质标志物（α-SMA、Vimentin）上调。该结果与Qian等[12]、Qiu等[13]及He等[14]先前报道的KD病程中存在EndMT异常激活的现象一致，进一步支持EndMT是KD血管病变的共性病理机制。在此基础上，本研究进一步将始动因素指向Sema4D。通过中和抗体阻断与外源性Sema4D刺激实验，本研究显示Sema4D是介导该过程的关键因子，且其效应呈浓度与时间依赖性。这延续了本课题组前期工作，即KD急性期患儿血清中升高的可溶性Sema4D与炎症程度及CAL严重性呈正相关[15,16]，提示Sema4D在KD血管内皮损伤中可能发挥直接作用。

在受体机制方面，本研究显示PlexinB2具有特异性介导作用。尽管Sema4D已知可与PlexinB1和PlexinB2等多种受体结合[17]，但在本研究的EndMT模型（20%KD血清刺激培养HCAEC 24 h）中，敲减PlexinB2能显著逆转Sema4D的促EndMT效应，而敲减PlexinB1则无显著影响。该结果与Zhang等[18]在银屑病模型中的发现部分相似，其研究表明Sema4D/PlexinB2可激活NF-κB促进炎症；而另一方面，有研究在肿瘤模型中发现Sema4D/PlexinB1介导EMT[19]。这种差异可能反映了Sema4D信号轴的细胞类型与病理背景依赖性：在KD血管内皮细胞这一特定环境中，Sema4D倾向于通过PlexinB2启动EndMT，而非通过PlexinB1。这提示PlexinB2可能是干预KD内皮损伤的特异性靶点。

在下游机制层面，本研究表明NF-κB与NLRP3炎症小体发挥关键衔接与执行作用。NF-κB是KD炎症反应的核心转录因子[20]，本研究结果显示Sema4D/PlexinB2能显著增强HCAEC中NF-κB p65磷酸化，从而将Sema4D信号与KD已知的炎症中枢NF-κB联系起来。本研究进一步显示激活的NF-κB可上调NLRP3炎症小体各组分的表达。NLRP3炎症小体在KD冠脉损伤中发挥重要作用[21]。Li等[22]报道KD患儿血清NLRP3水平与KD冠脉瘤风险相关，Anzai等[23]的动物实验也证实NLRP3缺失可减轻冠脉病变。本研究在此基础上推进，在KD-EndMT模型中证明NLRP3是EndMT进程的关键调控分子：敲减NLRP3可有效阻断EndMT表型，而过表达NLRP3则可逆转NF-κB抑制剂对EndMT的抑制作用。这些结果共同说明，在KD血管内皮细胞中，NF-κB位于NLRP3上游，并通过调控NLRP3的表达进而影响EndMT进程。因此，本研究提出的“Sema4D/PlexinB2/NF-κB/NLRP3”轴，从机制上串联了KD中免疫信号激活、炎症放大与血管表型转化三个环节。

尽管本研究初步阐释了上述信号轴的调控作用，但仍存在若干局限。首先，本研究检测手段较为单一，绝大多数指标仅采用RT-qPCR检测mRNA转录水平；基因转录水平无法完全反映EndMT过程中蛋白表达、细胞表型及功能的变化。其次，研究主要基于体外细胞模型，虽然采用了临床KD患儿混合血清进行诱导，以增强实验的病理相关性，但体外细胞培养环境仍无法完全模拟体内复杂的免疫微环境、血流动力学及细胞间相互作用。再次，所有实验均为24 h短期干预，未能模拟KD慢性期或远期后遗症的长期病理过程。最后，本研究样本量有限，仅采用10例KD患儿血清且未对患儿进行更细致的临床亚型分层分析。

基于以上局限，未来研究可从以下几个方面展开：首先，通过蛋白表达、细胞形态和功能学实验及利用KD小鼠模型开展基因敲除、抗体阻断或药物抑制实验，多维度验证“Sema4D/PlexinB2/NF-κB/NLRP3”信号轴对EndMT的调控作用。其次，开展大样本、多中心的前瞻性队列研究，评估血清Sema4D与EndMT相关循环标志物对CAL发生与转归的预测价值；此外，需进一步厘清该轴中尚未明确的机制环节，例如Sema4D/PlexinB2结合后激活NF-κB的具体信号转导过程、NLRP3炎症小体调控EndMT的具体方式。最后，基于已有针对Sema4D及NLRP3的抑制剂，评估其在KD治疗中的潜在应用价值，并探索其与现有标准疗法的协同作用。

综上所述，本研究表明Sema4D是驱动川崎病

HCAEC发生EndMT的关键调控因子，并阐明其通过PlexinB2受体激活NF-κB/NLRP3的具体机制。该结果不仅为理解KD冠状动脉损伤的分子机制提供了新的理论依据，也提示Sema4D及其下游信号分子可作为干预血管重塑、改善KD患儿远期心血管预后的潜在新靶点。

参考文献：

[1] 吕爱婷，叶岚，储晨，等. 儿童川崎病严重冠状动脉病变合并心肌梗死41例分析[J]. 中华儿科杂志，2025，63(2)：157-162.

[2] Jone PN, Tremoulet A, Choueiter N, *et al*. Update on diagnosis and management of Kawasaki disease: a scientific statement from the American Heart Association[J]. Circulation, 2024, 150(23): e481-e500.

[3] Agrafiotou A, Sapountzi E, Margoni A, *et al*. Immunophenotype of Kawasaki disease: insights into pathogenesis and treatment response[J]. Life(Basel), 2025, 15(7):1012.

[4] Kim J, Shimizu C, He M, *et al*. Endothelial cell response in Kawasaki disease and multisystem inflammatory syndrome in children [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(15):12318.

[5] Suzuki A, Miyagawa-Tomita S, Komatsu K, *et al*. Immunohistochemical study of apparently intact coronary artery in a child after Kawasaki disease[J]. Pediatr Int, 2004, 46(5):590-596.

[6] Wang L, Li X, Song Y, *et al*. The emerging roles of semaphorin4D/CD100 in immunological diseases[J]. Biochem Soc Trans, 2020, 48(6):2875-2890.

[7] Huang J, Wu S, Cao S, *et al*. Neutrophil-derived semaphorin 4D induces inflammatory cytokine production of endothelial cells via different plexin receptors in Kawasaki disease[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020:6663291.

[8] Shimizu C, Oharaseki T, Takahashi K, *et al*. The role of TGF-beta and myofibroblasts in the arteritis of Kawasaki disease[J]. Hum Pathol, 2013, 44(2):189-198.

[9] Ni C, Qiu H, Zhang S, *et al*. CircRNA-3302 promotes endothelial-to-mesenchymal transition via sponging miR-135b-5p to enhance KIT expression in Kawasaki disease[J]. Cell Death Discov, 2022, 8(1):299.

[10] Shimizu C, Kim J, He M, *et al*. RNA sequencing reveals beneficial effects of atorvastatin on endothelial cells in acute Kawasaki disease[J]. J Am Heart Assoc, 2022, 11(14):e025408.

[11] Shimizu C, Jain S, Davila S, *et al*. Transforming growth factor-beta signaling pathway in patients with Kawasaki disease[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(1):16-25.

[12] Qian G, Wang Y, Yao H, *et al*. Involvement of USP7 in aggravating Kawasaki disease by promoting TGFβ2 signaling mediated endothelial-mesenchymal transition and coronary artery remodeling[J]. Int Immunopharmacol, 2025, 146:113823.

[13] Qiu H, Ni C, Jia C, *et al*. CircRNA7632 down-regulation alleviates endothelial cell dysfunction in Kawasaki disease via regulating IL-33 expression[J]. Cell Stress Chaperones, 2023, 28(4): 363-374.

[14] He M, Chen Z, Martin M, *et al*. miR-483 targeting of CTGF suppresses endothelial-to-mesenchymal transition: therapeutic implications in Kawasaki disease[J]. Circ Res, 2017, 120(2): 354-365.

[15] 黄君华，刘蓓，黄凤霞，等. 可溶性CD100在川崎病急性期和恢复期的变化及其意义[J]. 标记免疫分析与临床，2020，27(11)：1877-1880.

[16] 黄君华，谢小娟，赵传梅，等. 川崎病内皮细胞高表达IL-1β促进中性粒细胞活化和分泌Sema4D[J]. 山西医科大学学报，2024，55(1)：65-70.

[17] Vreeken D, Bruikman CS, Stam W, *et al*. Downregulation of endothelial plexin A4 under inflammatory conditions impairs vascular integrity[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8:633609.

[18] Zhang C, Xiao C, Dang E, *et al*. CD100-Plexin-B2 promotes the inflammation in psoriasis by activating NF-κB and the inflammasome in keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2018, 138 (2):375-383.

[19] Zhang C, Qiao H, Guo W, *et al*. CD100-plexin-B1 induces epithelial-mesenchymal transition of head and neck squamous cell carcinoma and promotes metastasis[J]. Cancer Lett, 2019, 455: 1-13.

[20] 孙文娟，孙永红. NF-κB信号通路在儿童川崎病心脏损伤中的研究进展[J]. 中国当代儿科杂志，2023，25(3)：250-252.

[21] Shahi A, Afzali S, Firoozi Z, *et al*. Potential roles of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of Kawasaki disease[J]. J Cell Physiol, 2023, 238(3):513-532.

[22] Li M, Liu D, Cheng Z, *et al*. Serum NLRP3: a potential marker for identifying high-risk coronary arterial aneurysm in children with Kawasaki disease[J]. Cytokine, 2024, 180:156667.

[23] Anzai F, Watanabe S, Kimura H, *et al*. Crucial role of NLRP3 inflammasome in a murine model of Kawasaki disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2020, 138:185-196.

（责任编辑：马艳霞）