

[文章编号] 1671-587X(2026)02-0359-07

DOI:10.13481/j.1671-587X.20260207

## 小鼠川崎病模型血清外泌体中 *miR-328-3p* 和 *miR-671-5p* 表达水平及其意义

李 迪<sup>1</sup>, 苏 杨<sup>1</sup>, 张 勇<sup>2</sup>, 王姣琦<sup>3</sup>, 张小飞<sup>1</sup>, 赵雪冰<sup>1</sup>

(1. 吉林大学中日联谊医院儿科, 吉林 长春 130033; 2. 吉林大学基础医学院法医学系, 吉林 长春 130021; 3. 吉林大学中日联谊医院神经内科, 吉林 长春 130033)

**[摘 要]** **目的:** 探讨川崎病小鼠血清外泌体中微小 RNA(*miR*)-328-3*p* 和 *miR*-671-5*p* 表达水平与川崎病的相关性及其在静脉注射免疫球蛋白 (IVIG) 治疗后的变化, 为川崎病的早期诊断及疗效评价提供潜在生物标志物。**方法:** 12 只 4 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组和 IVIG 组, 每组 4 只。模型组和 IVIG 组小鼠腹腔注射干酪乳杆菌细胞壁提取物 (LCWE) 构建川崎病模型, 对照组小鼠腹腔注射等体积生理盐水; IVIG 组小鼠第 5 天腹腔注射 IVIG 干预。4 周后, 取各组小鼠心脏组织, 采用 HE 染色法观察各组小鼠心脏组织病理形态表现。取各组小鼠血液并分离外泌体, 采用粒径检测、透射电子显微镜检测及 Western blotting 法对外泌体进行鉴定。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组小鼠血清外泌体中 *miR*-328-3*p*、*miR*-134-5*p* 和 *miR*-671-5*p* 表达水平。**结果:** HE 染色, 对照组小鼠心肌结构规整, 冠状动脉无炎症细胞浸润; 模型组小鼠局部冠状动脉可见弥漫性炎症细胞浸润; IVIG 组小鼠心肌组织中炎症细胞浸润较模型组明显减少。外泌体鉴定, 透射电子显微镜观察到直径为 30~150 nm 的球形或椭圆形囊泡, 粒径主峰在 150 nm 内, 外泌体标志物 CD9 和 CD63 呈阳性表达。RT-qPCR 法, 与对照组比较, 模型组小鼠血清外泌体中 *miR*-328-3*p* 表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ), *miR*-671-5*p* 表达水平明显降低 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, IVIG 组小鼠血清外泌体中 *miR*-328-3*p* 表达水平明显降低 ( $P<0.05$ ), *miR*-671-5*p* 表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 3 组小鼠血清外泌体中 *miR*-134-5*p* 表达水平比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。**结论:** *miR*-328-3*p* 表达上调和 *miR*-671-5*p* 表达下调均与川崎病有关联, IVIG 治疗后可逆转此异常表达, 提示二者有望作为川崎病诊断和疗效评估的潜在分子生物标志物。

**[关键词]** 川崎病; 外泌体; 生物标志物; 微小 RNA-328-3*p*; 微小 RNA-671-5*p*; 静脉注射免疫球蛋白

**[中图分类号]** R725.4 **[文献标志码]** A

## Expression levels of *miR*-328-3*p* and *miR*-671-5*p* in serum exosomes of Kawasaki disease model mice and their significance

LI Di<sup>1</sup>, SU Yang<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>, WANG Jiaoqi<sup>3</sup>, ZHANG Xiaofei<sup>1</sup>, ZHAO Xuebing<sup>1</sup>

(1. Department of Pediatrics, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, China;

2. Department of Forensic, School of Basic Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China;

[收稿日期] 2025-05-06 [录用日期] 2025-07-06

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目 (YDZJ202501ZYTS7436)

[作者简介] 李 迪 (1987—), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事小儿心血管和儿童保健方面的研究。

[通信作者] 张小飞, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: xiaofei@jlu.edu.cn)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

3. Department of Neurology, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the correlation between the expression levels of microRNA(*miR*)-328-3*p* and *miR*-671-5*p* in serum exosomes of the mice with Kawasaki disease and Kawasaki disease as well as their changes after intravenous immunoglobulin (IVIG) treatment, and to provide the potential biomarkers for the early diagnosis and efficacy evaluation of Kawasaki disease. **Methods:** Twelve 4-week-old SPF grade male C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, and IVIG group, with 4 mice in each group. The mice in model group and IVIG group were intraperitoneally injected with *Lactobacillus casei* cell wall extract (LCWE) to establish the Kawasaki disease models, while the mice in control group were intraperitoneally injected with equal volume of normal saline; the mice in IVIG group were intraperitoneally injected with IVIG for intervention on the 5th day. Four weeks later, the heart tissue of the mice in various groups was collected, and HE staining was used to observe the pathomorphology of the heart tissue of the mice in various groups; the blood of the mice in various groups was collected and the exosomes were isolated. Particle size detection, transmission electron microscopy, and Western blotting method were used to identify the exosomes. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of *miR*-328-3*p*, *miR*-134-5*p*, and *miR*-671-5*p* in the serum exosomes of the mice in various groups. **Results:** The HE staining results showed that in control group, the myocardial structure of the mice was regular, and there was no inflammatory cell infiltration in the coronary arteries; in model group, diffuse inflammatory cell infiltration was observed in the local coronary arteries of the mice; compared with model group, the inflammatory cell infiltration in the myocardium tissue of the mice in IVIG group was significantly reduced. The exosome identification results showed that spherical or oval vesicles with a diameter of 30–150 nm were observed under transmission electron microscope, the main peak of particle size was within 150 nm, and the exosome markers CD9 and CD63 were positively expressed. The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression level of *miR*-328-3*p* in the serum exosomes of the mice in model group was significantly increased ( $P<0.05$ ), and the expression level of *miR*-671-5*p* was significantly decreased ( $P<0.05$ ); compared with model group, the expression level of *miR*-328-3*p* in the serum exosomes of the mice in IVIG group was significantly decreased ( $P<0.05$ ), and the expression level of *miR*-671-5*p* was significantly increased ( $P<0.01$ ); there was no statistically significant difference in the expression level of *miR*-134-5*p* in the serum exosomes of the mice among the three groups ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** The up-regulation of *miR*-328-3*p* expression and the down-regulation of *miR*-671-5*p* expression are both associated with Kawasaki disease, and this abnormal expression can be reversed after IVIG treatment, suggesting that both of them may serve as the potential molecular biomarkers for the diagnosis and efficacy evaluation of Kawasaki disease.

**KEYWORDS** Kawasaki disease; Exosomes; Biomarker; MicroRNA-328-3*p*; MicroRNA-671-5*p*; Intravenous immunoglobulin

川崎病是儿童最常见的获得性心脏病,其引发的血管炎性改变常累及冠状动脉。若未能得到及时的诊治,约25%的患儿可并发冠状动脉病变<sup>[1]</sup>,进而增加冠状动脉瘤患病风险,诱发冠状动脉血栓形成和心肌梗死,甚至猝死<sup>[2]</sup>。近年来,川崎病日益受到重视,但其诊断目前仍主要根据临床表现和超声影像学检查来确定。鉴于冠状动脉形态学改变常在病程后期显现,川崎病的诊断难点在于寻找早期血清生物学标志物以提高诊断敏感性。在治疗方面,

静脉注射免疫球蛋白(intravenous immunoglobulin, IVIG)是川崎病的标准疗法。然而,即使及时接受IVIG治疗,仍有多达20%的患儿临床症状无法得到有效缓解,出现反复或持续发热<sup>[3]</sup>。评估IVIG疗效是临床工作面临的挑战之一。

研究<sup>[4-7]</sup>表明:川崎病的发病与免疫系统异常激活有密切关联,涉及血清中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-17、IL-22和IL-23等多种

炎性细胞因子, 但上述细胞因子通常缺乏疾病特异性。因此, 探讨用于川崎病早期诊断和 IVIG 疗效评估新的生物标志物十分重要。本课题组前期研究<sup>[8]</sup>通过生物信息学分析川崎病相关基因表达数据发现: 血清外泌体微小 RNA (microRNA, *miR*)-328、*miR*-575、*miR*-134 和 *miR*-671-5p 有望作为川崎病诊断及 IVIG 疗效预测的潜在生物标志物。目前, 外泌体的研究主要集中在癌症、神经退行性疾病和心血管疾病等领域, 如外泌体 *miR*-192 和 *miR*-30e 等分子已被用于心血管疾病的诊断<sup>[9-10]</sup>, 但针对川崎病的外泌体研究尚未见报道。本研究通过建立干酪乳杆菌细胞壁提取物 (*Lactobacillus casei* cell wall extract, LCWE) 诱导的川崎病血管炎小鼠模型, 观察其心脏组织病理形态表现, 并结合透射电子显微镜、粒径分析和 Western blotting 法对外泌体进行鉴定, 采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测外泌体中 *miR*-328-3p、*miR*-134-5p 和 *miR*-671-5p 表达水平, 从而阐明 *miR*-328-3p 和 *miR*-671-5p 在川崎病模型中的表达差异及 IVIG 干预后的变化规律, 以期验证这 2 种外泌体 miRNA 作为川崎病诊断和 IVIG 疗效评估的潜在生物学标志物提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、主要试剂和仪器** 4 周龄 SPF 级别雄性 C57BL/6J 小鼠 12 只, 购自上海杰思捷实验动物有限公司, 实验动物使用许可证号: SYXK(吉)2019-0015。动物饲养和实验在吉林大学基础医学院动物生物安全二级实验室进行。环境条件为温度 (26±2) °C, 相对湿度 50%, 饲养期间小鼠自由摄食饮水。动物实验方案经吉林大学实验动物伦理委员会审批批准 [批准号: (2022 年) 研审第 (174) 号]。干酪乳杆菌种购自中国典型培养物保藏中心。MRS 培养基购自上海源叶生物科技有限公司, 核糖核酸酶 RNase A 和脱氧核糖核酸酶 DNase I 购自上海碧云天生物技术有限公司, 胰蛋白酶和鼠李糖购自上海源叶生物科技有限公司, 静脉注射人免疫球蛋白购自山东泰邦生物制品有限公司, 苏木精染液和伊红染液购自珠海贝索生物技术有限公司, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量检测试剂盒和 TRIzol 试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, PrimeScript™ II 1st Strand cDNA 合成试剂盒购自北京宝日医生物技术

有限公司, Bulge-Loop™ miRNA RT-qPCR 起始试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司, CD63 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, CD9 抗体购自上海艾博抗贸易有限公司。离心机 (型号: 5810R) 购自德国艾本德国际贸易有限公司, 超声破碎仪 (型号: Biopulverizer) 购自美国 Biospec 公司, 石蜡包埋机 (型号: KD-BM) 购自浙江科迪仪器设备有限公司, 超速离心机 (型号: Optima XE) 购自美国贝克曼库尔特有限公司, 粒径检测器 (型号: NS300) 购自英国马尔文帕纳科仪器有限公司, 透射电子显微镜 (型号: JEM-1230) 购自日本电子株式会社, RT-qPCR 仪 (型号: ViiA7) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 电泳仪 (型号: EPS300) 购自上海天能科技有限公司。

**1.2 LCWE 的制备** 将干酪乳杆菌在 MRS 培养基中培养 30~32 h, 经磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤后, 使用 4% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 溶液裂解。依次使用 DNase I、RNase A 和胰蛋白酶进行孵育处理<sup>[11]</sup>。处理后, 样品经超声破碎和离心获得 LCWE。采用比色苯酚-硫酸测定法测定 LCWE 浓度, 以确保后续实验注射剂量合理且准确。

**1.3 小鼠川崎病模型建立和动物分组** 选取 4 周龄大小 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 12 只适应性饲养 1 周后, 将小鼠随机分为 3 组, 即对照组、模型组和 IVIG 组, 每组 4 只。模型组和 IVIG 组小鼠于第 0 天腹腔注射 0.5 mg LCWE (溶于 0.5 mL 生理盐水) 以诱导川崎病模型, 对照组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。实验第 5 天, IVIG 组小鼠腹腔注射 IVIG (2 mg·g<sup>-1</sup>), 对照组和模型组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。干预 4 周后, 各组小鼠经异氟烷麻醉后, 摘眼球取血, 并取小鼠心脏组织。取出心脏组织用 PBS 缓冲液清洗后, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h。全血样本于 4 °C、1 900 g 离心 10 min, 收集上清液, 再次以 3 000 g 离心 10 min, 取上清, 保存于 -80 °C 备用<sup>[12]</sup>。

**1.4 HE 染色观察各组小鼠心脏组织病理形态表现** 取各组小鼠心脏组织, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 制成厚度为 4 μm 的切片。切片经脱蜡、水化后, 进行标准苏木精和伊红染色, 中性树胶封片。于光学显微镜下观察各组小鼠心脏组织病理形态表现。

### 1.5 粒径检测仪检测各组小鼠血清外泌体粒径

采用等体积预冷的PBS缓冲液稀释各组小鼠血清样品, 4℃、1 500 g离心5 min。将上清液转移到新的EP管中, 4℃、10 000 g离心30 min。最后, 将上清液于4℃、100 000 g超速离心70 min。将沉淀重悬于PBS缓冲液中, 即获得血清外泌体。采用粒径检测仪检测外泌体的粒径分布。

### 1.6 透射电子显微镜观察血清外泌体超微结构形态表现

取100 μL外泌体悬浮液加入铜网中, 用2% 锇酸于4℃下固定2 h后, 用PBS缓冲液洗涤网状物, 并用分级乙醇脱水。最后用丙酮处理, 分别用丙酮和包埋剂的混合物(体积比2:1、1:1和1:2)浸泡。观察前将其暴露于包埋剂中24 h, 并分别用醋酸铀酰和醋酸铅染色。于透射电子显微镜下观察血清外泌体超微结构。

### 1.7 Western blotting法检测各组小鼠血清外泌体中CD9和CD63表达情况

取外泌体沉淀, 加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液于冰上裂解30 min后, 12 000 g离心15 min取上清。采用BCA法测定蛋白浓度, 调整至每孔20~30 μg。蛋白样品和上样缓冲液混合煮沸5 min, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)后转至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。加入5%脱脂牛奶封闭1 h, 分别加入CD9和CD63一抗(1:1 000稀释), 于4℃过夜。加入二抗(1:5 000)室温孵育1 h, 经增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)显影, 观察CD9和CD63蛋白表达情况。

### 1.8 RT-qPCR法检测各组小鼠血清外泌体中miR-328-3p、miR-134-5p和miR-671-5p表达水平

使用TRIzol试剂提取各组小鼠血清外泌体RNA。以DEPC水为对照, 采用分光光度计测定RNA浓度和纯度。取等量总RNA, 使用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA合成试剂盒将RNA逆转转录为cDNA, 并使用miRNA RT-qPCR起始试剂盒进行RT-qPCR扩增。反应条件: 95℃预变性2 min; 95℃变性15 s、60℃退火/延伸60 s, 共40个循环; 95℃、15 s, 60℃、60 s, 95℃、15 s建立PCR产物熔解曲线。引物由上海三光生物工程技术服务有限公司(中国上海)合成, 引物序列: 通用储备引物, GTGCAGGGTCCGAGGT; miR-328-3p F, 5'-CTGGCCCTCTCTGCCC-3', miR-328-3p R, 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGTCCGAGGTATT-

CGCACTGGATACGACACGGAA-3'; miR-134-5p F, 5'-GGCTGTGACTGGTTGA-CCA-3', miR-134-5p R, 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGACCCCCTC-3'; miR-671-5p F, 5'-AGGAAGCCCTGGAGGGG-3', miR-671-5p R, 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGTACGACCTCCAG-3'; miR-39 F, 5'-GGCCTCACCGGGTGTAATCAG-3', miR-39 R, 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGT-CCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAAG-CT-3'。将cel-miR-39作为对照引入, cel-miR-39是人工合成的线虫miRNA, 在人类基因组中不存在, 不会与目标miRNA发生交叉反应, 故使用已知浓度的cel-miR-39作为外参<sup>[13]</sup>。采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算各组小鼠血清外泌体中miR-328-3p、miR-134-5p和miR-671-5p表达水平。

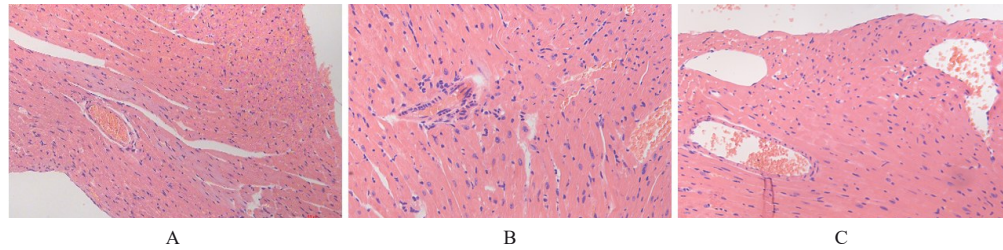
**1.9 统计学分析** 采用GraphPad Prism 5软件进行统计学分析。各组小鼠血清外泌体中miR-328-3p、miR-134-5p和miR-671-5p表达水平符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2组间样本均数比较采用两独立样本t检验, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 若差异显著则进一步采用Tukey法进行事后检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠心脏组织病理形态表现** 对照组小鼠心肌结构规整, 冠状动脉局部无炎症细胞浸润。模型组小鼠冠状动脉壁及周围可见明显的弥漫性炎症细胞浸润, 提示川崎病模型小鼠成功制备。IVIG组小鼠冠状动脉壁及周围组织仍可见炎症细胞浸润, 但与模型组比较, 浸润程度明显减轻, 提示IVIG治疗减轻了川崎病小鼠心脏组织炎症。见图1。

**2.2 血清外泌体的形态、粒径和标志物表达** 提取外泌体后, 采用透射电子显微镜观察外泌体颗粒, 可见球形或椭圆形囊泡结构, 大小较均一, 其直径为30~150 nm。粒径检测仪结果显示: 颗粒粒径主峰在150 nm以内, 初步确认提取的颗粒为外泌体。Western blotting法检测结果显示: 外泌体标志物CD9和CD63在所提取的外泌体样品中均呈阳性表达。见图2。

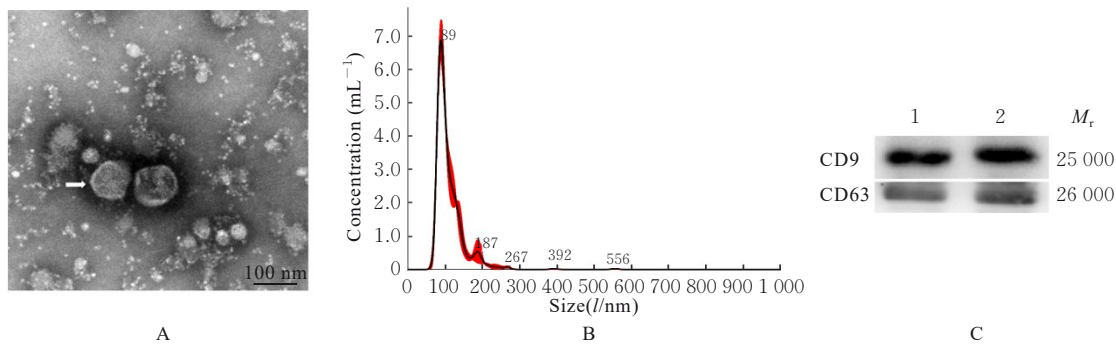
**2.3 各组小鼠血清外泌体中miR-328-3p、miR-134-5p和miR-671-5p表达水平** 以cel-miR-39为外参, RT-qPCR法结果显示: 与对照组比较, 模型



A: Control group; B: Model group; C: IVIG group.

图 1 各组小鼠心脏组织病理形态表现(HE, ×400)

Fig. 1 Pathomorphology of cardiac tissue of mice in various groups (HE, ×400)

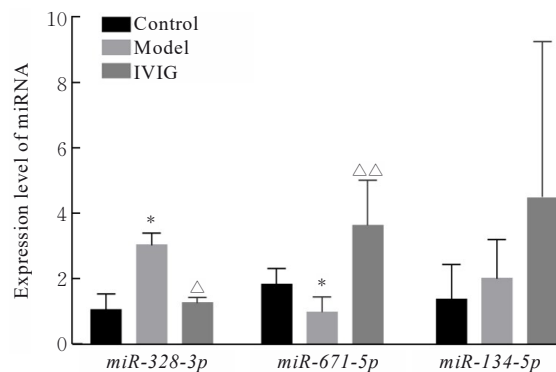


A: Morphology; B: Particle size; C: Expressions of CD9 and CD63 (Lane 1: Sample 1; Lane 2: Sample 2).

图 2 血清外泌体的形态、粒径和标志物表达情况

Fig. 2 Morphology, particle size, and marker expressions of serum exosomes

组小鼠血清外泌体中 *miR-328-3p* 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), *miR-671-5p* 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, IVIG 组小鼠血清外泌体中 *miR-328-3p* 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), *miR-671-5p* 表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。3 组小鼠血清外泌体中 *miR-134-5p* 表达水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3。



\* $P < 0.05$  compared with control group;  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  compared with model group.

图 3 各组小鼠血清外泌体中 miRNA 表达水平

Fig. 3 Expression levels of miRNA in serum exosomes of mice in various groups

### 3 讨论

川崎病是常见的儿童继发性心脏病<sup>[14]</sup>, 其主要病理改变为冠状动脉炎症, 易并发冠状动脉瘤、持续性血管重塑和心肌纤维化等<sup>[15-18]</sup>。目前, IVIG 是治疗川崎病的常规有效方法。研究<sup>[19]</sup>显示: IVIG 可通过与抗原结合, 激活细胞内信号通路、免疫反应和补体系统, 形成膜攻击复合物, 介导抗体依赖性的细胞毒性作用。然而, 约 20% 患者对 IVIG 治疗无反应。因此, 深入探讨川崎病致病机制并寻找相关的有效生物标志物具有重要临床意义。

本研究成功建立了 LCWE 诱导的川崎病血管炎小鼠模型。小鼠心脏组织 HE 染色显示: 模型组小鼠冠状动脉存在大量的炎症细胞浸润; 经 IVIG 治疗后, IVIG 组小鼠冠状动脉局部浸润的炎症细胞较模型组明显减少。炎症细胞浸润与血管损伤有密切关联, 研究<sup>[20]</sup>发现: 炎症细胞浸润数量与血管损伤严重性呈正相关关系。上述结果验证了本研究川崎病模型的成功构建和 IVIG 的治疗效果。

外泌体是一类细胞外囊泡, 含有多种核酸和蛋白质<sup>[21]</sup>, 可将其内容物导入靶细胞并调控基因表

达。miRNA是一类长度为17~25个核苷酸的单链非编码RNA,可稳定存在于微囊泡中,逃避核糖核酸酶降解。目前,外泌体miRNA在骨关节炎<sup>[22]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[23]</sup>和癌症<sup>[24]</sup>等领域作为潜在生物标志物已被广泛研究。

本课题组前期研究<sup>[8]</sup>利用生物信息学分析方法发现:血清外泌体中*miR-328-3p*、*miR-575*、*miR-134-5p*和*miR-671-5p*可能成为川崎病诊断和IVIG疗效预测的生物标志物。为了进一步验证该生物信息学分析结果,本研究使用川崎病模型小鼠进行了验证,采用透射电子显微镜、粒径检测和Western blotting法鉴定各组小鼠血清分离的外泌体,并采用RT-qPCR法检测外泌体中*miR-328-3p*、*miR-134-5p*和*miR-671-5p*表达水平,结果显示:模型组小鼠外泌体血清中*miR-328-3p*表达水平明显升高,经IVIG治疗后其表达水平明显降低;*miR-671-5p*的表达则完全相反。研究<sup>[25-27]</sup>显示:在心肌肥厚小鼠模型、心房颤动犬模型及并发心房颤动的风湿病患者中,*miR-328-3p*表达均上调,提示*miR-328-3p*在心脏疾病中具有心肌定位特性和病理功能。另一方面,*miR-671-5p*与炎症性疾病有密切关联,其在骨关节炎患者中表达下调<sup>[28]</sup>,而其模拟物可改善IL-1 $\beta$ 诱导的细胞凋亡和增殖抑制,延缓小鼠骨关节炎进展<sup>[28]</sup>。研究<sup>[29]</sup>显示:在2个医院的多中心测试中,*miR-671-5p*可有效区分川崎病患者和其他发热性疾病患者(如腺病毒感染和EB病毒感染等)及健康个体,且其作为标志物的假阳性率和假阴性率均较低。上述结果与本研究观察到的*miR-671-5p*在川崎病模型中的特异性表达变化一致。然而,本研究中*miR-134-5p*在对照组、模型组及IVIG组小鼠血清外泌体中表达水平比较差异无统计学意义,与前期生物信息学预测<sup>[8]</sup>不完全一致,这可能是由于LCWE诱导的小鼠模型与人川崎病的致病机制存在种属差异。

综上所述,本研究进一步证实了外泌体miRNA在川崎病中作为生物标志物的潜在价值。川崎病模型小鼠血清外泌体中*miR-328-3p*表达水平升高,*miR-671-5p*表达水平降低,IVIG治疗可逆转上述变化,伴随冠状动脉病变的改善,提示这2个miRNAs可能作为川崎病辅助诊断及疗效评估的候选分子标志物。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

李迪参与实验操作和论文撰写,苏杨和张勇参与数据采集及分析,王姣琦参与论文指导,张小飞参与实验设计、论文审阅和修改,赵雪冰参与文献整理和论文撰写。

#### [参考文献]

- [1] NEWBURGER J W, TAKAHASHI M, GERBER M A, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association[J]. Circulation, 2004, 110(17): 2747-2771.
- [2] HARTOPO A B, SETIANTO B Y. Coronary artery sequel of Kawasaki disease in adulthood, a concern for internists and cardiologists [J]. Acta Med Indones, 2013, 45(1): 69-75.
- [3] RIFE E, GEDALIA A. Kawasaki disease: an update[J]. Curr Rheumatol Rep, 2020, 22(10): 75.
- [4] CAPITTINI C, EMMI G, MANNARINO S, et al. An immune-molecular hypothesis supporting infectious aetiopathogenesis of Kawasaki disease in children [J]. Eur J Immunol, 2018, 48(3): 543-545.
- [5] HARA T, NAKASHIMA Y, SAKAI Y, et al. Kawasaki disease: a matter of innate immunity [J]. Clin Exp Immunol, 2016, 186(2): 134-143.
- [6] HU P, JIANG G M, WU Y, et al. TNF- $\alpha$  is superior to conventional inflammatory mediators in forecasting IVIG nonresponse and coronary arteritis in Chinese children with Kawasaki disease [J]. Clin Chim Acta, 2017, 471: 76-80.
- [7] 韦铭菲, 史俊展, 姚泽伟, 等. 川崎病性冠状动脉瘤破裂出血致急性心包压塞死亡一例[J]. 郑州大学学报(医学版), 2024, 59(1): 144-147.
- [8] ZHANG X F, XIN G D, SUN D J. Serum exosomal miR-328, miR-575, miR-134 and miR-671-5p as potential biomarkers for the diagnosis of Kawasaki disease and the prediction of therapeutic outcomes of intravenous immunoglobulin therapy [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3): 2420-2432.
- [9] SUN F Y, YUAN W F, WU H, et al. LncRNA KCNQ1OT1 attenuates sepsis-induced myocardial injury via regulating miR-192-5p/XIAP axis [J]. Exp Biol Med, 2020, 245(7): 620-630.
- [10] WANG Z S, ZHANG J Y, ZHANG S L, et al. miR-30e and miR-92a are related to atherosclerosis by

- targeting ABCA1[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(4): 3298-3304.
- [11] LEHMAN T J, WALKER S M, MAHNOVSKI V, et al. Coronary arteritis in mice following the systemic injection of group B *Lactobacillus casei* cell walls in aqueous suspension[J]. Arthritis Rheum, 1985, 28(6): 652-659.
- [12] ABE M, RASTELLI D D, GOMEZ A C, et al. IL-1-dependent electrophysiological changes and cardiac neural remodeling in a mouse model of Kawasaki disease vasculitis[J]. Clin Exp Immunol, 2020, 199(3): 303-313.
- [13] CHENG Y R, QU X Y, DONG Z N, et al. Comparison of serum exosome isolation methods on co-precipitated free microRNAs[J]. Peer J, 2020, 8: e9434.
- [14] ZHANG Q, HUA W, WANG Y, et al. Clinical features of Kawasaki disease in children with an atypical age of onset [J]. Hong Kong J Paediatr, 2021, 26(4): 204-210.
- [15] FUKAZAWA R, KOBAYASHI T, MIKAMI M, et al. Nationwide survey of patients with giant coronary aneurysm secondary to Kawasaki disease 1999-2010 in Japan[J]. Circ J, 2017, 82(1): 239-246.
- [16] GORDON J B, DANIELS L B, KAHN A M, et al. The spectrum of cardiovascular lesions requiring intervention in adults after Kawasaki disease [J]. JACC Cardiovasc Interv, 2016, 9(7): 687-696.
- [17] NAKAMURA Y, ASO E, YASHIRO M, et al. Mortality among Japanese with a history of Kawasaki disease: results at the end of 2009 [J]. J Epidemiol, 2013, 23(6): 429-434.
- [18] GORDON J B, KAHN A M, BURNS J C. When children with Kawasaki disease grow up: Myocardial and vascular complications in adulthood [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(21): 1911-1920.
- [19] STANGEL M, PUL R. Basic principles of intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment [J]. J Neurol, 2006, 253(Suppl 5): V18-V24.
- [20] TAKAHASHI K, OHARASEKI T, YOKOUCHI Y. Pathogenesis of Kawasaki disease [J]. Clin Exp Immunol, 2011, 164(Suppl 1): 20-22.
- [21] KELLER S, SANDERSON M P, STOECK A, et al. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function[J]. Immunol Lett, 2006, 107(2): 102-108.
- [22] 周孙欣, 霍娜, 李红坤, 等. 人滑膜间充质干细胞外泌体中miR-429修复骨关节炎软骨损伤的作用初探[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(7): 882-889.
- [23] LU M M, YUAN S F, LI S C, et al. The exosome-derived biomarker in atherosclerosis and its clinical application[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2019, 12(1): 68-74.
- [24] 张向前, 韩笑, 张坤. 血清外泌体LncRNA GAS5在胃癌患者中的表达水平及其临床意义[J]. 临床检验杂志, 2025, 43(5): 336-340.
- [25] LI C, LI X L, GAO X, et al. microRNA-328 as a regulator of cardiac hypertrophy[J]. Int J Cardiol, 2014, 173(2): 268-276.
- [26] LU Y J, ZHANG Y, WANG N, et al. microRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation[J]. Circulation, 2010, 122(23): 2378-2387.
- [27] NTOUMOU E, TZETIS M, BRAOUDAKI M, et al. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes [J]. Clin Epigenetics, 2017, 9: 127.
- [28] ZHANG B X, SUN M Q, WANG J Z, et al. miR-671 ameliorates the progression of osteoarthritis *in vitro* and *in vivo* [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(7): 152423.
- [29] JIA H L, LIU C W, ZHANG L, et al. Sets of serum exosomal microRNAs as candidate diagnostic biomarkers for Kawasaki disease[J]. Sci Rep, 2017, 7: 44706.