

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20205608

· 论 著 ·

呼吸道合胞病毒毛细支气管炎患儿中 TREM-1/DAP12 通路关键信号节点的表达

彭程¹, 黎金雨², 赵云³, 余莉⁴

(1. 四川省广安市人民医院儿科, 四川 广安 638000; 2. 四川省遂宁市第一人民医院儿科, 四川 遂宁 629000; 3. 成都儿童专科医院儿科, 四川 成都 610015; 4. 四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨呼吸道合胞病毒(RSV)毛细支气管炎患儿中 TREM-1/DAP12 蛋白的表达及该通路炎症反应的潜在关联。**方法** 选取 2017 年 1 月—2019 年 1 月四川省广安市人民医院 RSV 毛细支气管炎患儿作为病例组(分为轻症组和重症组),选取同期体检的健康儿童作为对照组,对血清中炎症因子含量及外周血单个核细胞(PBMCs)中 TREM-1、DAP12 表达进行检测。构建 RSV 感染人支气管上皮(NHBE)细胞的体外细胞模型,将人支气管上皮细胞(NHBE)分为对照组、RSV 感染组、RSV + siRNA-Control 组和 RSV + siRNA-TREM-1 组,并对细胞中 TREM-1、DAP12 的表达及上清液中炎症因子含量进行检测。**结果** 轻症组、重症组儿童血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)等炎症因子含量、PBMCs 中 TREM-1、DAP12 表达量均高于对照组,且重症组高于轻症组(均 $P < 0.05$)。RSV 感染组、RSV + siRNA-Control 组 TREM-1、DAP12 表达量均高于对照组、RSV + siRNA-TREM-1 组(均 $P < 0.05$)。RSV + siRNA-TREM-1 组上清液中炎症因子含量均低于 RSV 感染组、RSV + siRNA-Control 组(均 $P < 0.05$)。**结论** TREM-1/DAP12 信号通路在 RSV 毛细支气管炎患儿中高表达。RSV 诱导 NHBE 细胞高表达 TREM-1,沉默 TREM-1 可以下调 DAP12 表达,抑制炎症因子分泌。

[关键词] 髓系细胞触发受体-1; DNAX 活化蛋白 12; 呼吸道合胞病毒; 毛细支气管炎; 人支气管上皮细胞
[中图分类号] R725.6

Expression of the key proteins in TREM-1/DAP12 signaling pathway in children with respiratory syncytial virus bronchiolitis

PENG Cheng¹, LI Jin-yu², ZHAO Yun³, YU Li⁴ (1. Department of Pediatrics, Guangan People's Hospital, Guangan 638000, China; 2. Department of Pediatrics, Suining First People's Hospital, Suining 629000, China; 3. Department of Pediatrics, Chengdu Children's Hospital, Chengdu 610015, China; 4. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate expression of TREM-1/DAP12 protein in children with respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis as well as potential relationship between this pathway and inflammation. **Methods** From January 2017 to January 2019, children with RSV bronchiolitis in Guangan People's Hospital of Sichuan Province were selected as case group (they were divided into mild group and severe group), healthy children who had physical examination during the same period were selected as control group, levels of inflammatory factors in serum and expression of TREM-1 and DAP12 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were detected. In vitro cell model of human bronchial epithelial (NHBE) cells infected by RSV was constructed, NHBE cells were divided into control group, RSV-infected group, RSV + siRNA-Control group and RSV + siRNA-TREM-1 group. Expression of TREM-1 and DAP12 in cells as well as level of inflammatory factors in supernatant were detected. **Results** Serum levels of inflammatory factors such as interleukin-1 β (IL-1 β) and expression levels of TREM-1 and DAP12 in PBMCs

[收稿日期] 2019-07-16

[作者简介] 彭程(1975-),男(汉族),四川省广安市人,副主任医师,主要从事小儿呼吸系统疾病研究。

[通信作者] 彭程 E-mail: pengcheng201905@163.com

in children in mild and severe groups were both higher than those in control group, and severe group were higher than mild group (all $P < 0.05$). The expression of TREM-1 and DAP12 in RSV-infected group and RSV + siRNA-Control group were both higher than control group and RSV + siRNA-TREM-1 group (both $P < 0.05$). Levels of inflammatory factors in supernatant of RSV + siRNA-TREM-1 group were all lower RSV-infected group and RSV + siRNA-Control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** TREM-1/DAP12 signaling pathway is highly expressed in children with RSV bronchiolitis. RSV induces overexpression of TREM-1 in NHBE cells, and silencing TREM-1 can down-regulate DAP12 expression and inhibit the secretion of inflammatory factors.

[**Key words**] triggering receptor expressed on myeloid cells-1; DNAX-activating protein 12; respiratory syncytial virus; bronchiolitis; human bronchial epithelial cell

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是小儿毛细支气管炎最常见的病原体,RSV 感染患儿较副流感病毒、肺炎支原体等非 RSV 感染患儿的预后差,目前尚无有效的预防和治疗措施。RSV 感染后炎症调节紊乱是影响病毒清除与疾病病程的重要原因,主要表现为炎症细胞的不断浸润以及细胞因子的大量分泌,在发挥抗病毒作用的同时,也会导致严重的肺损伤^[1]。因此,深入探讨 RSV 感染后炎症紊乱的病理机制具有重要的临床意义。

髓系细胞触发受体-1(triggering receptor expressed on myeloid cells-1, TREM-1)可以与下游接头分子 DNAX 活化蛋白 12(DNAX-activating protein 12, DAP12)相互作用,激活炎症信号通路^[2-4]。TREM-1 在不同种类微生物感染中可能发挥不同作用,如在流感病毒感染模型中 TREM-1 基因缺失可降低炎症水平^[5];在铜绿假单胞菌感染中发现 TREM-1 基因缺失可促进炎症因子分泌^[6]。但是, TREM-1 在 RSV 毛细支气管炎患儿中的表达及作用目前尚无报道,因此,本文旨在探讨 TREM-1、DAP12 在 RSV 毛细支气管炎患儿中的表达,并构建 RSV 感染人支气管上皮(normal human bronchial epithelial cells, NHBE)细胞模型,以深入研究相关机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取 2017 年 1 月—2019 年 1 月四川省广安市人民医院 RSV 毛细支气管炎患儿为病例组,共 67 例。纳入标准:(1)年龄 ≤ 2 岁;(2)符合《毛细支气管炎诊断、治疗与预防专家共识(2014 年版)》中的诊断标准^[7];(3)采用鼻咽拭子采集呼吸道分泌物,病原学检查为 RSV 单一感染;(4)入院前 1 个月内未经糖皮质激素、免疫抑制剂等药物治疗;(5)入院前病程在 3 d 内。排除标准:合并肺结核、免疫缺陷病、先天性疾病等。

根据入院 lowell 评分,将病例组分为轻症组(临床评分 ≤ 9 分,共 39 例)和重症组(临床评分 ≥ 10 分,共 28 例)。选取同期体检的健康儿童作为对照组,共 35 例。本研究已获四川省广安市人民医院伦理委员会的批准,且研究对象监护人均已签署知情同意书。

1.2 血清中炎症因子含量的检测 治疗前,经肘正中静脉穿刺采集静脉血 0.5 mL,分离血清,分装后保存于 -80°C 冰箱。使用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司)检测血清中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)、高迁移率族蛋白 1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)含量。

1.3 外周血单个核细胞中 TREM-1、DAP12 mRNA 的检测 治疗前,经肘正中静脉穿刺采集 EDTA 抗凝静脉血 2 mL,使用人外周血单个核细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司)分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。使用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 PBMCs 中 TREM-1、DAP12 mRNA 表达量。以 GAPDH 作为内参基因,引物序列为: TREM-1 上游引物, 5'-GAACTCCGAGCTG-CAACTAAA-3'; 下游引物, 5'-TCTAGCGTG-TAGTCACATTTTAC-3'。DAP12 上游引物, 5'-GAGACCGAGTCGCCTTATCA-3'; 下游引物, 5'-GTCATGATTTCGGGCTCATT-3'。

1.4 PBMCs 中 TREM-1、DAP12 蛋白质的检测 蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)检测 PBMCs 中 TREM-1、DAP12 蛋白质表达量。常规进行蛋白提取、电泳、转印等步骤,一抗(英国 Abcam 公司)稀释比例为: TREM-1(1:1 000)、DAP12(1:500)、GAPDH(1:3 000)。上述试验均在四川省广安市

人民医院完成。

1.5 细胞学试验

1.5.1 主要试剂 NHBE 细胞、人喉癌上皮细胞 (Hep-2 细胞) 均购自美国 ATCC; RSV 病毒 (A 亚型) 购自广州博特生物工程有限责任公司; DMEM 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; Lipofectin-2000TM 购自美国 Invitrogen 公司。

1.5.2 细胞与病毒培养 NHBE 细胞、Hep-2 细胞均使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中静置培养。将 RSV 病毒接种至 Hep-2 细胞, 培养 3~5 d 后收集细胞, 反复冻融获取病毒悬液, 根据 Reed-muench 法测定半数组织培养感染剂量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)。细胞学试验均于四川大学华西第二医院完成。

1.5.3 RSV 感染 将 NHBE 细胞接种于 6 孔板, 待汇合度达到 80% 左右时, 弃去培养基, PBS 洗涤 2 次, 依次加入滴度为 0、50、100、500 TCID₅₀ 的 RSV 病毒悬液, 放置于 37℃ 培养箱中吸附 2 h, 弃去上层悬液, PBS 洗涤 2 次, 加入培养基继续培养 48 h, 然后收集细胞, WB 检测不同滴度 RSV 诱导时 NHBE 细胞中 TREM-1 蛋白质的表达。此外, 在滴度为 100 TCID₅₀ 的诱导条件下, 分别培养 0、24、48、72 h, 然后收集细胞, WB 检测不同诱导时间 NHBE 细胞中 TREM-1 蛋白质的表达。

1.5.4 RNA 干扰质粒的构建与转染 参照文献^[8]报道, 设计针对人 TREM-1 的 siRNA 序列, 具体序列为: siRNA-TREM-1 正义链, 5'-CCGGTG GCAGATAATAAGGGACGGCTCGAGCCGTCC CTTATTATCTGCCTTTTTG-3'; siRNA-TREM-1 反义链, 5'-AATTCAAAAAGGCAGATAATA AGGGACGGCTCGAGCCGTCCCTTATTATCT GCCA-3'。siRNA-Control 正义链, 5'-CCGGTGG GAAGTACGGAGTAAACGCTCGAGCGTTTA CTCCGTA CTCCCTTTTTG-3'; siRNA-Control 反义链, 5'-AATTCAAAAAGGGAAGTACG GAGTAAACGCTCGAGCGTTTACTCCGTA CTCCCA-3'。将上述寡核苷酸单链退火后, 克隆至 pGenesil-1.1 质粒。使用 Lipofectin-2000TM 将测序正确的 siRNA-Control 质粒和 siRNA-TREM-1 质粒转染至 NHBE 细胞。

1.5.5 试验分组 细胞学试验分为 4 组: 对照组、RSV 感染组、RSV + siRNA-Control 组、RSV + siRNA-TREM-1 组。对照组、RSV 感染组使用未进行

转染的 NHBE 细胞, RSV + siRNA-Control 组和 RSV + siRNA-TREM-1 组分别使用 siRNA-Control 质粒和 siRNA-TREM-1 质粒转染的 NHBE 细胞。对照组不进行 RSV 感染, 其余 3 组均使用滴度为 100 TCID₅₀ 的 RSV 感染, 诱导时间为 48 h。

1.5.6 检测指标 RSV 感染 48 h 后, 收集各组细胞及上清液, 使用 qRT-PCR 检测各组细胞中 TREM-1、DAP12 mRNA 表达, 使用 WB 检测各组细胞中 TREM-1、DAP12 蛋白表达水平, 使用 ELISA 检测细胞上清液中炎症因子的含量, 包括 IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-17、HMGB1。

使用免疫荧光染色检测各组细胞中 TREM-1 蛋白表达水平, 具体步骤为: 4% 多聚甲醛固定 30 min, 封闭 1 h, 滴加抗 TREM-1 抗体 (1:50) 4℃ 过夜。二抗孵育、DAPI 染色、封片等步骤后拍照。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。所有计量资料均采用均数 \pm 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。P \leq 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基本资料 病例组共 67 例 RSV 毛细支气管炎患儿, 其中轻症组 39 例, 重症组 28 例。轻症组中男性 21 例, 女性 18 例, 平均年龄 (9.16 \pm 4.22) 个月; 重症组中男性 13 例, 女性 15 例, 平均年龄 (9.45 \pm 4.63) 个月。对照组共 35 例健康儿童, 其中男性 18 例, 女性 17 例, 平均年龄 (9.28 \pm 4.06) 个月。三组儿童性别、年龄比较, 差异均无统计学意义 (均 P > 0.05)。

2.2 各组儿童血清中炎症因子含量的比较 轻症组和重症组儿童血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-17、HMGB1 含量均高于对照组, 且重症组 IL-1 β 、IL-8、IL-17、HMGB1 含量高于轻症组, 差异均具有统计学意义 (均 P < 0.05)。见表 1。

2.3 各组儿童 PBMCs 中 TREM-1、DAP12 mRNA 及其蛋白的表达变化 轻症组和重症组儿童 PBMCs 中 TREM-1、DAP12 mRNA 及蛋白表达量均高于对照组, 且重症组高于轻症组, 差异均具有统计学意义 (均 P < 0.05)。见图 1、图 2。

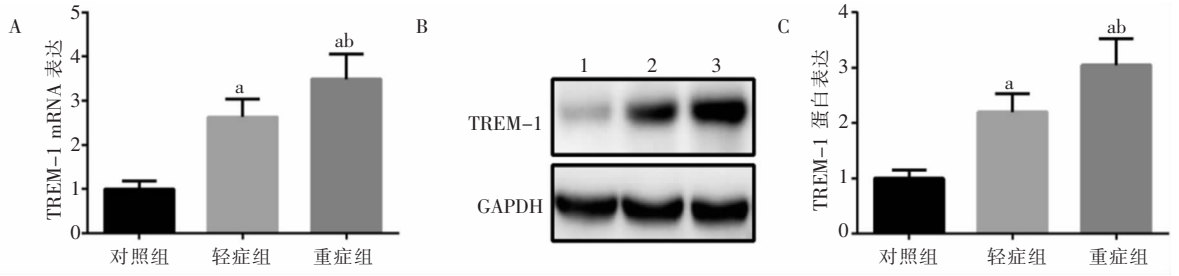
2.4 RSV 诱导 NHBE 细胞表达 TREM-1 蛋白情况 随着 RSV 浓度和诱导时间的增加, NHBE 细胞中 TREM-1 的表达量逐渐升高, RSV 浓度为 100 TCID₅₀ 以及诱导时间为 48 h 时, TREM-1 的表达量达到最高。见图 3。

表 1 各组儿童血清中炎症因子含量的比较(pg/mL)

Table 1 Comparison of serum levels of inflammatory factors in children of each group (pg/mL)

组别	例数	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-17	HMGB1
轻症组	39	14.22 \pm 3.65 ^a	28.61 \pm 6.73 ^a	35.09 \pm 8.13 ^a	71.44 \pm 15.06 ^a	20.56 \pm 7.33 ^a
重症组	28	19.40 \pm 3.57 ^{ab}	30.04 \pm 7.25 ^a	72.60 \pm 14.91 ^{ab}	83.59 \pm 16.77 ^{ab}	28.48 \pm 6.95 ^{ab}
对照组	35	12.48 \pm 3.09	17.92 \pm 4.88	17.46 \pm 5.28	45.38 \pm 10.20	14.70 \pm 5.41
<i>F</i>		33.190	37.130	253.400	61.900	33.700
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

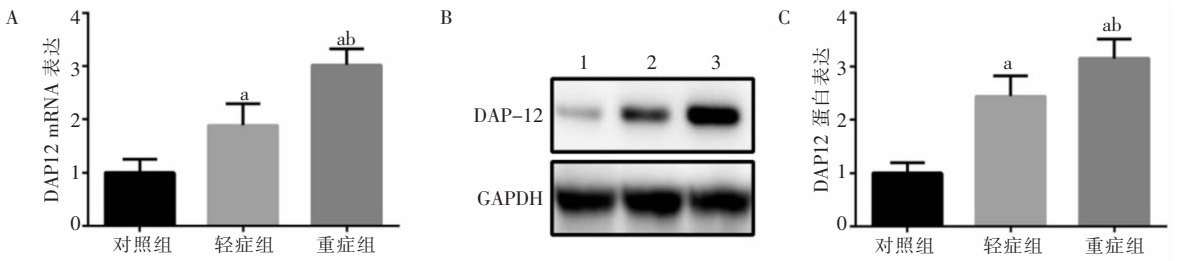
注: a 表示与对照组比较, $P < 0.05$; b 表示与轻症组比较, $P < 0.05$ 。



A: qRT-PCR 检测 TREM-1 mRNA 表达; B, C: WB 检测 TREM-1 蛋白表达。1: 对照组; 2: 轻症组; 3: 重症组。a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与轻症组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 各组 PBMCs 中 TREM-1 mRNA 和蛋白表达水平

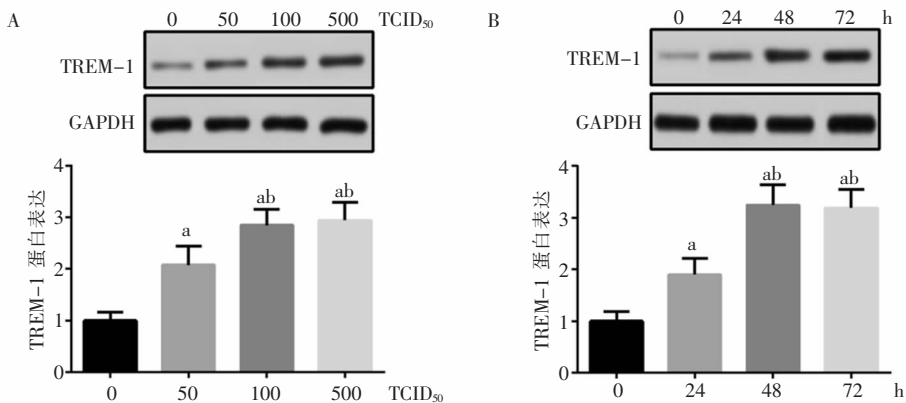
Figure 1 Expression level of TREM-1 mRNA and protein in PBMCs of each group



A: qRT-PCR 检测 DAP12 mRNA 表达; B, C: WB 检测 DAP12 蛋白表达。1: 对照组; 2: 轻症组; 3: 重症组。a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与轻症组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 各组 PBMCs 中 DAP12 mRNA 和蛋白表达水平

Figure 2 Expression level of DAP12 mRNA and protein in PBMCs of each group



A: WB 检测不同感染滴度下 TREM-1 的蛋白表达; B: WB 检测不同感染时间下 TREM-1 的蛋白表达。a: 与 0 TCID₅₀ (或 0 h) 比较, $P < 0.05$; b: 与 50 TCID₅₀ (或 24 h) 比较, $P < 0.05$ 。

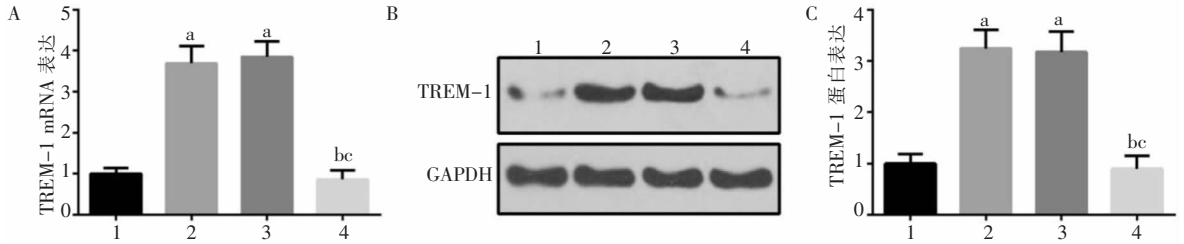
图 3 RSV 诱导 NHBE 细胞表达 TREM-1 蛋白水平

Figure 3 Expression level of TREM-1 protein in NHBE cells induced by RSV

2.5 TREM-1 沉默对 TREM-1 表达的抑制效果

RSV 感染组、RSV + siRNA-Control 组中 TREM-1 mRNA 和蛋白量均高于对照组和 RSV + siRNA-TREM-1 组, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见

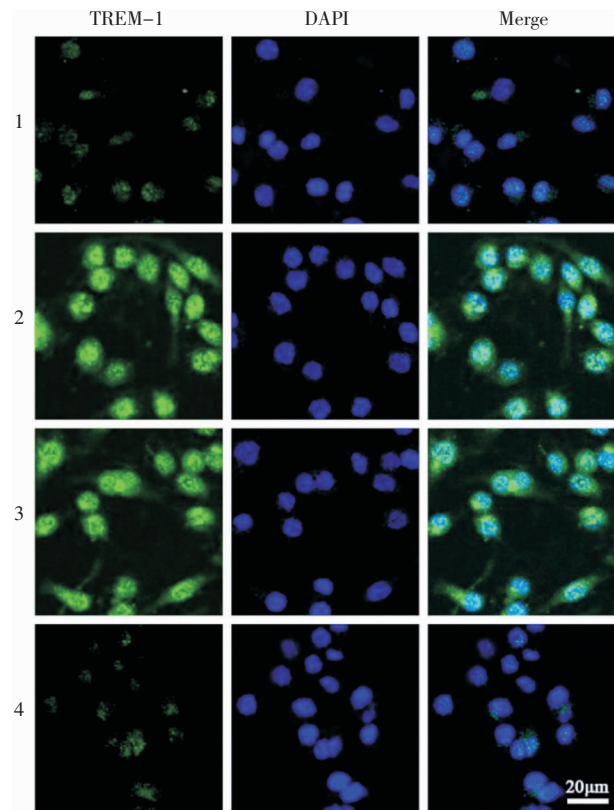
图 4。RSV 感染组、RSV + siRNA-Control 组的荧光强度强于对照组和 RSV + siRNA-TREM-1 组, 见图 5。



A: qRT-PCR 检测 TREM-1 mRNA 转录水平; B, C: WB 检测 TREM-1 蛋白表达。1: 对照组; 2: RSV 感染组; 3: RSV + siRNA-Control 组; 4: RSV + siRNA-TREM-1 组。a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 RSV 感染组比较, $P < 0.05$; c: 与 RSV + siRNA-Control 组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 各组 NHBE 细胞中 TREM-1 mRNA 转录和蛋白表达水平

Figure 4 Expression level of TREM-1 mRNA transcription and protein in NHBE cells of each group



1: 对照组; 2: RSV 感染组; 3: RSV + siRNA-Control 组; 4: RSV + siRNA-TREM-1 组。

图 5 免疫荧光染色检测各组 NHBE 细胞中 TREM-1 表达情况

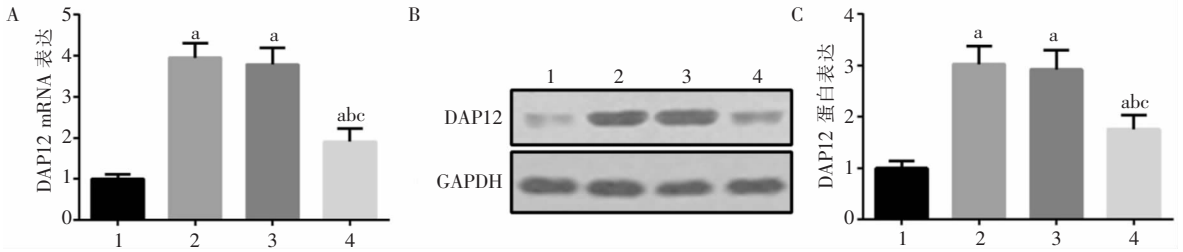
Figure 5 Expression of TREM-1 in NHBE cells by immunofluorescence staining of each group

2.6 TREM-1 沉默对 DAP12 表达的影响

RSV 感染组、RSV + siRNA-Control 组中 DAP12 mRNA 和蛋白表达量均高于对照组和 RSV + siRNA-TREM-1 组, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。RSV + siRNA-TREM-1 组中 DAP12 mRNA 和蛋白表达量高于对照组, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 6。

2.7 TREM-1 沉默对炎症因子分泌的影响

RSV 感染组、RSV + siRNA-Control 组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-17、HMGB1 含量均高于对照组, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。RSV + siRNA-TREM-1 组的上述炎症因子含量均低于 RSV 感染组、RSV + siRNA-Control 组, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。RSV + siRNA-TREM-1 组的 IL-8、IL-17、HMGB1 炎症因子含量高于对照组, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见表 2。



A: qRT-PCR 检测 DAP12 mRNA 表达; B, C: WB 检测 DAP12 蛋白表达。1: 对照组; 2: RSV 感染组; 3: RSV + siRNA-Control 组; 4: RSV + siRNA-TREM-1 组。a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 RSV 感染组比较, $P < 0.05$; c: 与 RSV + siRNA-Control 组比较, $P < 0.05$ 。

图 6 各组 NHBE 中 DAP12 mRNA 和蛋白表达水平

Figure 6 Expression level of DAP12 mRNA and protein in NHBE of each group

表 2 各组细胞上清液中炎症因子含量的比较 (pg/mL)

Table 2 Comparison of levels of inflammatory factors in cell supernatant of each group (pg/mL)

组别	例数	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-17	HMGB1
RSV 感染组	10	92.30 \pm 10.70 ^a	59.67 \pm 8.75 ^a	224.89 \pm 20.17 ^a	42.56 \pm 5.20 ^a	154.82 \pm 13.93 ^a
RSV + siRNA-Control 组	10	89.99 \pm 11.89 ^a	63.45 \pm 10.10 ^a	233.87 \pm 24.40 ^a	45.05 \pm 4.75 ^a	144.26 \pm 16.92 ^a
RSV + siRNA-TREM-1 组	10	48.17 \pm 9.50 ^{bc}	34.36 \pm 7.96 ^{bc}	101.81 \pm 18.95 ^{abc}	28.69 \pm 4.17 ^{abc}	63.05 \pm 14.66 ^{abc}
对照组	10	43.18 \pm 6.91	33.21 \pm 5.47	66.59 \pm 9.77	17.56 \pm 3.61	48.67 \pm 7.31
F		70.500	38.220	199.000	82.090	159.100
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: a 表示与对照组比较, $P < 0.05$; b 表示与 RSV 感染组比较, $P < 0.05$; c 表示与 RSV + siRNA-Control 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

TREM-1 是 Bouchon 等人于 2000 年首次发现的跨膜糖蛋白, 是炎症级联反应中的重要调节因子。尽管目前尚未明确鉴定出 TREM-1 配体, 但间接证据表明损伤相关分子模式 (DAMPs) 和病原相关分子模式 (PAMPs) 可活化 TREM-1, 从而诱导炎症因子分泌^[9]。此外, TREM-1 其他功能的发现, 如促进 T 细胞增殖, 激活抗原呈递细胞, 表明 TREM-1 蛋白在调节宿主对病原微生物的免疫反应中发挥更重要的作用^[10]。

最初研究^[11]认为 TREM-1 主要表达于巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、淋巴细胞等免疫细胞表面, 仅在脓毒症等细菌感染疾病中发挥免疫效应。但近年研究^[12-13]发现, TREM-1 也表达于气道上皮细胞、软骨细胞等组织细胞表面, 参与病毒感染以及无菌性炎症。Yuan 等^[14]在研究人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 在巨噬细胞中的隐匿机制时发现, HIV 可通过 NF κ B 信号通路诱导巨噬细胞高表达 TREM-1, 增强其抗凋亡能力, 而沉

默 TREM-1 表达则可上调 Caspase 3 表达, 下调 Bcl-2 表达, 促进巨噬细胞凋亡, 认为靶向沉默 TREM-1 可能提高 HIV 的清除率。然而, TREM-1 在其他种类病毒感染中的作用仍知之甚少, 在 RSV 毛细支气管炎患儿中的表达情况及作用机制尚无报道。

炎症因子的大量释放是 RSV 感染与机体免疫屏障相互作用的结果, 也是加重肺部病理损伤的原因之一, 血清中炎症因子含量与患儿预后密切相关^[15]。因此, 本文首先对 RSV 毛细支气管炎患儿血清中炎症因子含量进行检测, ELISA 法检测结果表明 RSV 毛细支气管炎患儿血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-17、HMGB1 含量均显著升高, 而且与病情程度有关。此外, 本研究进一步发现 TREM-1 mRNA 和蛋白在 PBMCs 中的表达量也显著升高, 与炎症因子的升高趋势一致, 提示 TREM-1 可能参与 RSV 致炎机制。TREM-1 的胞浆结构域缺乏信号基序, 其功能效应主要依赖于下游接头分子 DAP12 传递^[16], 因此, TREM-1 与 DAP12 的表达趋势常保持一致, 本文研究结果显示, DAP12 mRNA 和蛋白在 PBMCs 中高表达, 也证实了上述结论。TREM-1/DAP12 信号通路介导炎症因子释放的因果关系并

不恒定,两者可能相互作用,共同诱导炎症级联扩大。部分研究结果可间接支持这一结论,例如:HMGB1 可能是 TREM-1 的配体^[17];NF- κ B 不仅是 TREM-1/DAP12 诱导炎症因子释放的下游信号通路,也可上调 TREM-1 表达,沉默 NF- κ B p65 可抑制 HIV 相关蛋白 Tat 或者 gp120 对 TREM-1 表达的诱导作用^[14]。

为了进一步证实上述结论,本文构建了 RSV 感染 NHBE 的体外细胞模型,结果发现 RSV 可通过浓度和时间依赖的方式诱导 TREM-1 高表达。以往研究大多认为,TREM-1 主要通过炎症细胞发挥生物学效应,如增强细胞迁移能力,促进炎症因子分泌等^[18]。本文通过 RNA 干扰技术对 TREM-1 进行沉默,发现 TREM-1 沉默可以下调 DAP12 表达,降低炎症因子分泌,进一步证实 TREM-1 是 RSV 感染后炎症失调的关键分子,为 RSV 毛细支气管炎治疗提供了新的靶点。

综上所述,TREM-1/DAP12 信号通路在 RSV 毛细支气管炎患儿中高表达。RSV 诱导支气管上皮细胞高表达 TREM-1,沉默 TREM-1 可以下调 DAP12 表达,降低炎症因子分泌。

[参考文献]

[1] Russell CD, Unger SA, Walton M, et al. The human immune response to respiratory syncytial virus infection[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2017, 30(2): 481 - 502.

[2] Su VY, Yang KY, Chiou SH, et al. Induced pluripotent stem cells regulate triggering receptor expressed on myeloid cell-1 expression and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in endotoxin-induced acute lung injury[J]. *Stem Cells*, 2019, 37(5): 631 - 639.

[3] Kökten T, Gibot S, Lepage P, et al. TREM-1 inhibition restores impaired autophagy activity and reduces colitis in mice[J]. *J Crohns Colitis*, 2018, 12(2): 230 - 244.

[4] Subramanian S, Pallati PK, Sharma P, et al. TREM-1 associated macrophage polarization plays a significant role in inducing insulin resistance in obese population[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 85.

[5] Weber B, Schuster S, Zysset D, et al. TREM-1 deficiency can attenuate disease severity without affecting pathogen clearance[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(1): e1003900.

[6] Klesney-Tait J, Keck K, Li X, et al. Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 138 - 149.

[7] 《中华儿科杂志》编辑委员会,中华医学会儿科学分会呼吸学组. 毛细支气管炎诊断、治疗与预防专家共识(2014年版)[J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53(3): 168 - 171.

[8] Tang J, Dong Q. Knockdown of TREM-1 suppresses IL-1 β -induced chondrocyte injury via inhibiting the NF- κ B pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 1240 - 1245.

[9] Pelham CJ, Pandya AN, Agrawal DK. Triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family modulators: a patent review[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2014, 24(12): 1383 - 1395.

[10] Pelham CJ, Agrawal DK. Emerging roles for triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family signaling in inflammatory diseases[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014, 10(2): 243 - 256.

[11] Poukoulidou T, Spyridaki A, Mihailidou I, et al. TREM-1 expression on neutrophils and monocytes of septic patients: relation to the underlying infection and the implicated pathogen[J]. *BMC Infect Dis*, 2011, 11: 309.

[12] Rigo I, McMahon L, Dhawan P, et al. Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1, 25(OH)₂ vitamin D₃ [J]. *Innate Immun*, 2012, 18(2): 250 - 257.

[13] Ruiz-Pacheco JA, Vivanco-Cid H, Izaguirre-Hernández IY, et al. TREM-1 modulation during early stages of dengue virus infection[J]. *Immunol Lett*, 2014, 158(1-2): 183 - 188.

[14] Yuan Z, Fan X, Staitieh B, et al. HIV-related proteins prolong macrophage survival through induction of triggering receptor expressed on myeloid cells-1[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42028.

[15] Fan R, Wen B, Liu W, et al. Altered regulatory cytokine profiles in cases of pediatric respiratory syncytial virus infection[J]. *Cytokine*, 2018, 103: 57 - 62.

[16] Arts RJ, Joosten LA, van der Meer JW, et al. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors[J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 93(2): 209 - 215.

[17] El Mezayen R, El Gazzar M, Seeds MC, et al. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin[J]. *Immunol Lett*, 2007, 111(1): 36 - 44.

[18] Cao C, Gu J, Zhang J. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cell-1 (sTREM-1): a potential biomarker for the diagnosis of infectious diseases[J]. *Front Med*, 2017, 11(2): 169 - 177.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式:彭程,黎金雨,赵云,等. 呼吸道合胞病毒毛细支气管炎患儿中 TREM-1/DAP12 通路关键信号节点的表达[J]. *中国感染控制杂志*, 2020, 19(5): 433 - 439. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20205608.

Cite this article as: PENG Cheng, LI Jin-yu, ZHAO Yun, et al. Expression of the key proteins in TREM-1/DAP12 signaling pathway in children with respiratory syncytial virus bronchiolitis[J]. *Chin J Infect Control*, 2020, 19(5): 433 - 439. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20205608.