

Kv1.3通道在哮喘患者外周血T淋巴细胞中的表达及对Th2细胞因子的影响

史莹,毛山,叶亮,谷伟*

南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)呼吸科,江苏 南京 210006

[摘要] 目的:检测Kv1.3钾通道在哮喘患者外周血T淋巴细胞中的表达水平,研究Kv1.3钾通道阻滞剂对哮喘患者外周血T淋巴细胞增殖及产生Th2细胞因子的影响,从而探讨Kv1.3钾通道阻滞剂应用于治疗哮喘患者慢性气道炎症的可能。方法:分离哮喘患者及健康对照者的外周血T淋巴细胞,检测T细胞中Kv1.3钾通道的mRNA及蛋白水平,并检测Kv1.3钾通道抑制剂ShK对T细胞增殖及产生Th2细胞因子的作用。结果:哮喘患者外周血T淋巴细胞的Kv1.3水平较健康对照者明显增高,Kv1.3钾通道抑制剂ShK能明显抑制T淋巴细胞的增殖及产生Th2细胞因子的能力。结论:Kv1.3可能是哮喘患者T细胞参与气道炎症的形成及发展的重要蛋白。选择性阻断Kv1.3钾通道可能成为哮喘未来治疗的方向之一。

[关键词] 哮喘;Kv1.3钾通;T淋巴细胞

[中图分类号] R562.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)10-1361-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20181006

Expression and function of Kv1.3 channel in peripheral blood T lymphocytes of asthma patients

Shi Ying, Mao Shan, Ye Liang, Gu Wei*

Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Nanjing Hospital of NMU, Nanjing First Hospital, Nanjing 210006, China

[Abstract] **Objective:** To detect the expression and function of Kv1.3 channel in peripheral blood T lymphocytes of asthma patients, to study the effect of Kv1.3 channel blockers on the proliferation of T lymphocytes and the production of Th2 cytokines in peripheral blood of asthmatic patients, and to explore the possibility of Kv1.3 channel blockers in treating chronic airway inflammation in patients with asthma. **Methods:** T lymphocytes were isolated from peripheral blood of asthma patients and healthy controls. Then, we detected the mRNA levels of Kv1.3 in T cells. We detected the effect of Kv1.3 channel inhibitors ShK on T cell proliferation and the production of Th2 cytokines. **Results:** The Kv1.3 level of peripheral blood T lymphocytes in patients with asthma was significantly higher than that of healthy controls. ShK significantly inhibited the proliferation and Th2 cytokines production ability of T lymphocytes. **Conclusion:** Kv1.3 may play important roles in inflammation in asthma. Selective blocking of Kv1.3 channels may be one of the future treatments of asthma.

[Key words] asthma; Kv1.3 channel; T lymphocyte

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(10):1361-1364]

在支气管哮喘的慢性气道炎症过程中,T淋巴细胞的作用日益受到重视。哮喘气道内浸润的T细胞主要是分化的CC趋化因子7(C-C chemokine receptor type 7, CCR7)效应记忆T细胞^[1](effector memory T cells, T_{EM})。T_{EM}细胞可通过释放Th2细胞

因子如白介素(interleukin, IL)-4和IL-5参与哮喘气道的病理生理过程^[2-4],针对T_{EM}细胞而不影响CCR7⁺的初始T细胞和中央记忆型T细胞(T_{CM})的药物有可能对T_{EM}细胞介导的疾病如支气管哮喘起治疗作用,同时能避免引起免疫抑制。

Kv1.3通道是T_{EM}细胞活化的主要钾离子通道,其表达水平增高能促进T淋巴细胞活化和增殖,并刺激T淋巴细胞释放细胞因子^[5-6]。推测哮喘患者

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(JQX16028)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sykxss@163.com

的慢性气道炎症可能与外周血T淋巴细胞过表达Kv1.3通道有关。本研究拟通过检测稳定期哮喘患者外周血T细胞活化时Kv1.3通道的表达,分析Kv1.3通道在哮喘患者T细胞活化中的作用,探讨Kv1.3通道作为哮喘免疫治疗靶点的可能性。

1 对象和方法

1.1 对象

2016年1—6月在本院首次就诊的哮喘患者50例,肺功能检测第1s用力呼气量(FEV₁)>60%预计值,半年内未使用静脉或口服糖皮质激素,未使用免疫抑制剂。选择体检中心健康对照者50例,两组在年龄,性别上匹配。本研究获得了本院伦理委员会的批准,并获得入选者的知情同意。

哮喘组排除标准:排除慢性阻塞性肺病、支气管扩张、肺结核、支气管肺癌等其他呼吸系统疾病,肺栓塞、肺动脉高压、肺间质性疾病和肺癌;依从性差;妊娠或哺乳期女性;近期有丧失行为能力的精神疾病病史;2周内无证据表明有呼吸道感染或相关症状(评估应延迟)。

胎牛血清(杭州四季青公司),TRIzol(Invitrogen公司,美国),反转录试剂盒(TaKaRa公司,大连),Kv1.3通道的特异性阻断剂stichodaetyla向日葵神经毒素(stichodactyla helianthus neurotoxin, ShK)(Bechem公司,美国)。CCK-8试剂盒(上海碧云天公司)。β-actin上游引物:5'-GGAGATTACTGCCCTG-GCTCCTA-3',下游引物:5'-GACTCATCGTACTCCT-GCTTGCTG-3';Kv1.3上游引物:5'-GGAAGCTCC-GGGAACAAGTG-3',下游引物5'-TGCCAGCCCATG-GATTCTC-3';IL-4上游引物:5'-CTGACGGCA-CAGAGCTATTGA-3',下游引物:5'-TATGCGAAG-CACCTTGGAAGC-3';IL-5上游引物:5'-GAGCA-CAGTGTTGAAAGAGACCTT-3',下游引物:5'-AT-GACAGGTTTTGGAATAGCATTT-3'(上海赛百盛公司合成)。

1.2 方法

1.2.1 分离人外周血T淋巴细胞

无菌采集外周静脉血5 mL,枸橼酸钠抗凝,Ficoll(北京索莱宝科技)密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,之后应用免疫磁珠阴性分选法分离出T淋巴细胞,以含10%胎牛血清的RPMI1640完全培养液调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL,接种于培养瓶。

1.2.2 CCK-8法测Kv1.3对T淋巴细胞增殖的影响

将100 mL细胞悬液接种于96孔培养板中,设空

白孔,将细胞分为对照组、OVA(Sigma公司,美国)组和ShK组。对照组仅加CD3单抗(eBioscience公司,美国);OVA组加CD3和OVA(终浓度为100 μg/mL);ShK组除加CD3单抗外,还加入OVA和不同浓度Kv1.3抑制剂ShK。37℃培养72 h后,向每孔中加入10 mL的CCK-8溶液,37℃4 h,在酶标仪上于450 nm处测定吸光度值。

1.2.3 Kv1.3对哮喘患者外周血T淋巴细胞生成的IL-4和IL-5影响

将100 mL细胞悬液接种于24孔培养板中,CD3单抗处理后,分为对照组、OVA组和ShK组。OVA组仅加OVA(终浓度为100 μg/mL)。ShK组除加OVA外,还加入不同浓度ShK。5 h后提取mRNA。

1.2.4 实时定量PCR测Kv1.3、IL-4和IL-5的表达

按TRIzol说明书操作步骤提取细胞RNA,用紫外分光光度计分别测定样品浓度,反转录的反应条件为37℃15 min,85℃5 s,保存cDNA待做Real-time PCR用。Real-time PCR反应体系的反应条件为:95℃10 s 1个循环;95℃5 s,60℃31 s,40个循环;95℃15 s,60℃30 s,95℃15 s。PCR完成后产物行2%琼脂糖凝胶电泳。结果分析使用相对的 ΔC_T 表示: ΔC_T 处理组= C_T 处理组- C_T 内参处理组, ΔC_T 对照组= C_T 对照组- C_T 内参对照组, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ 处理组- ΔC_T 对照组,差别倍数= $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。

1.3 统计学方法

同一刺激和干预时间的样本重复3次,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS11.5统计学软件,使用单因素方差分析和LSD法进行数据统计, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 哮喘患者较健康者外周血T淋巴细胞Kv1.3的mRNA表达明显增高

提取哮喘患者及健康者外周血T淋巴细胞的mRNA,检测Kv1.3的水平。哮喘组与健康组对比,Kv1.3的mRNA表达较对照组增高了228%(图1)。

2.2 哮喘患者较健康者外周血T淋巴细胞Kv1.3的蛋白表达明显增高

Western blot结果显示,哮喘患者较健康者外周血T淋巴细胞Kv1.3的蛋白表达明显增高,哮喘组的Kv1.3/GAPDH灰度比值为 2.75 ± 0.29 ,对照组的Kv1.3/GAPDH灰度比值为 6.32 ± 0.67 ,差异有统计学意义(图2)。

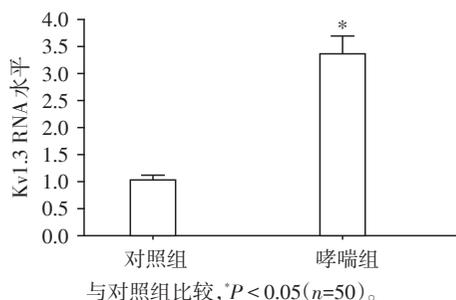


图1 哮喘患者外周血T淋巴细胞Kv1.3的mRNA表达
Figure 1 Kv1.3 mRNA expression of peripheral blood T lymphocytes in asthmatic patients

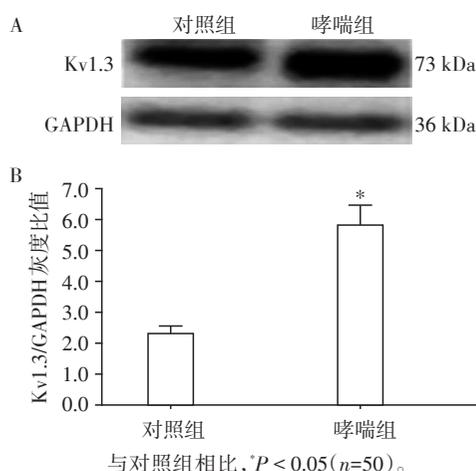


图2 哮喘患者外周血T淋巴细胞Kv1.3的蛋白表达
Figure 2 Kv1.3 protein expression of peripheral blood T lymphocytes in asthmatic patients

2.3 Kv1.3阻滞剂ShK对哮喘患者外周血T淋巴细胞增殖的影响

与对照组相比, OVA组的吸光度值明显增高, 低、中、高浓度的ShK组吸光度值分别较OVA组减少30.0%、47.7%及59.2%(图3)。

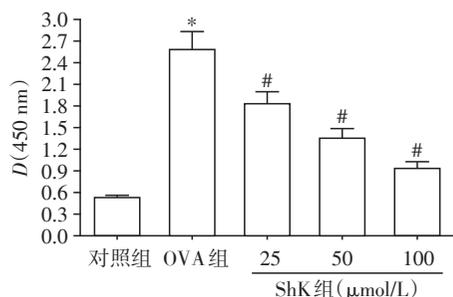


图3 Kv1.3阻滞剂ShK对哮喘患者外周血T淋巴细胞增殖的影响
Figure 3 Effects of Kv1.3 blocker ShK on peripheral blood T lymphocyte proliferation in asthmatic patients

2.4 Kv1.3阻滞剂ShK抑制哮喘患者外周血T淋巴细胞产生IL-4和IL-5

哮喘患者外周血淋巴细胞在OVA的刺激下, 分泌IL-4和IL-5的水平明显增高, ShK能浓度依赖性地抑制OVA引起的IL-4和IL-5分泌(图4)。

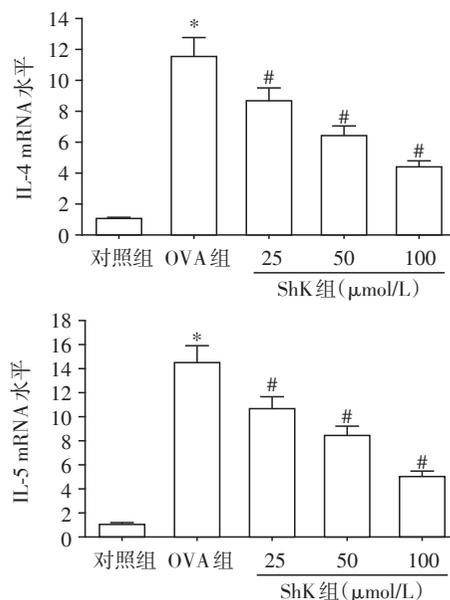


图4 Kv1.3抑制剂ShK对哮喘患者外周血T淋巴细胞产生Th2细胞因子的影响
Figure 4 Effects of Kv1.3 inhibitor ShK on the production of Th2 cytokines in peripheral blood T lymphocytes of asthmatic patients

3 讨论

T淋巴细胞在哮喘气道炎症的形成过程中起重要作用, 研究表明哮喘患者气道壁浸润的T淋巴细胞活化后, 可通过细胞增殖分化及分泌Th2细胞因子参与哮喘气道炎症, 而这种气道炎症是导致患者气道高反应性及最终气道重塑的病理基础。

根据T细胞活化状态, 可分为3种T细胞亚型: 初始T细胞、T_{CM}细胞和T_{EM}细胞。T细胞表面表达的两种主要的钾通道是Kv1.3和IKCal, 这些通道提供必要的钾外流来平衡钙离子的内流^[7]。静息状态下, 两种钾通道表达水平低。在受到抗原的刺激后, T_{EM}过表达Kv1.3^[8]。而T_{CM}和CCR7⁺的初始T细胞活化后则过表达IKCal^[9]。这种钾通道表达的不同导致初始T细胞/T_{CM}和T_{EM}对选择性阻断Kv1.3和IKCal的反应不同。

T淋巴细胞的功能活动与其细胞膜上离子通道的电活动密切相关。Kv1.3钾通道是T_{EM}持续活化的

关键,在其激活、迁移、增殖及细胞因子分泌中起重要作用。本研究发现哮喘患者外周血T淋巴细胞表达Kv1.3量较健康者明显增加,提示哮喘患者外周血T淋巴细胞具有较强的增殖功能及较强的分泌细胞因子的作用。这种T淋巴细胞功能的增强都有可能促进哮喘患者气道炎症的形成。同时研究还发现Kv1.3抑制剂对哮喘稳定期患者抗原引起的T淋巴细胞增殖功能有明显抑制作用,提示阻断Kv1.3可能减轻哮喘患者气道内的T细胞浸润状况。

既往研究发现,阻断Kv1.3能抑制哮喘动物模型的气道高反应性、气道炎症及Th2细胞因子^[10-11]。Th2细胞因子IL-4和IL-5在哮喘患者气道炎症中起重要作用。IL-4和IL-5基因敲除动物气道反应性及气道炎症均明显减轻^[12-13]。为了进一步研究Kv1.3对IL-4和IL-5的影响,以哮喘患者外周血T淋巴细胞为研究对象,发现Kv1.3抑制剂能剂量依赖性地抑制抗原引起的哮喘患者T细胞IL-4和IL-5的分泌。提示阻断Kv1.3可能改变哮喘患者的Th2细胞因子过多的状况,从而有潜在的减轻哮喘患者慢性气道炎症的作用。

目前的研究发现,钙离子拮抗剂、大环内酯类、非甾体类抗炎药、他汀类药物均具有抑制Kv1.3钾通道的作用^[14-17]。鉴于Kv1.3钾通道在调节T细胞功能中的重要作用,这些潜在的Kv1.3钾通道阻滞剂有可能对抑制哮喘的慢性气道炎症有效,可能成为未来治疗哮喘的新方向。

[参考文献]

- [1] Syed F, Blakemore SJ, Wallace DM, et al. CCR7 (EBI1) receptor down-regulation in asthma: differential gene expression in human CD4⁺ T lymphocytes [J]. QJM, 1999, 92(8):463-471
- [2] Holgate ST. Pathogenesis of asthma [J]. Clin Exp Allergy, 2008, 38(6):872-897
- [3] Medoff BD, Thomas SY, Luster AD. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs [J]. Annu Rev Immunol, 2008, 26:205-232
- [4] Schuijs MJ, Willart MA, Hammad H, et al. Cytokine targets in airway inflammation [J]. Curr Opin Pharmacol, 2013, 13(3):351-361
- [5] Kazama I. Physiological significance of delayed rectifier K⁺ channels (Kv1.3) expressed in T lymphocytes and their pathological significance in chronic kidney disease [J]. J Physiol Sci, 2015, 65(1):25-35
- [6] Hu L, Pennington M, Jiang Q, et al. Characterization of the functional properties of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 in human CD4⁺ T lymphocytes [J]. J Immunol, 2007, 179(7):4563-4570
- [7] Cahalan MD, Chandy KG. The functional network of ion channels in T lymphocytes [J]. Immunol Rev, 2009, 231(1):59-87
- [8] Beeton C, Pennington MW, Wulff H, et al. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases [J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(4):1369-1381
- [9] Wulff H, Calabresi PA, Allie R, et al. The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS [J]. J Clin Invest, 2003, 111(11):1703-1713
- [10] Matheu MP, Beeton C, Garcia A, et al. Imaging of effector memory T cells during a delayed-type hypersensitivity reaction and suppression by Kv1.3 channel block [J]. Immunity, 2008, 29(4):602-614
- [11] Tarcha EJ, Chi V, Muñoz-Ellías EJ, et al. Durable pharmacological responses from the peptide ShK-186, a specific Kv1.3 channel inhibitor that suppresses T cell mediators of autoimmune disease [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 342(3):642-653
- [12] Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, et al. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice [J]. Clin Exp Allergy, 1994, 24(1):73-80
- [13] Trifilieff A, Fujitani Y, Coyle AJ, et al. IL-5 deficiency abolishes aspects of airway remodelling in a murine model of lung inflammation [J]. Clin Exp Allergy, 2001, 31(6):934-942
- [14] Kazama I, Maruyama Y, Murata Y. Suppressive effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac sodium, salicylate and indomethacin on delayed rectifier K⁺-channel currents in murine thymocytes [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2012, 34(5):874-878
- [15] Kazama I, Maruyama Y. Differential effects of clarithromycin and azithromycin on delayed rectifier K⁽⁺⁾-channel currents in murine thymocytes [J]. Pharm Biol, 2013, 51(6):760-765
- [16] Kazama I, Maruyama Y, Matsubara M. Benidipine persistently inhibits delayed rectifier K⁺-channel currents in murine thymocytes [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2013, 35(1):28-33
- [17] Kazama I, Baba A, Maruyama Y. HMG-CoA reductase inhibitors pravastatin, lovastatin and simvastatin suppress delayed rectifier K⁺-channel currents in murine thymocytes [J]. Pharmacol Rep, 2014, 66(4):712-717

[收稿日期] 2018-03-15