

· 论 著 ·

DOI: 10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2020.04.10

## 动脉粥样硬化患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞 上 Kv1.3 通道的活性变化

邵劲松, 胡 锴, 王红瑞, 王立伟, 徐 博

**[摘要]:**目的 探讨动脉粥样硬化性心血管疾病(ACVD)患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Tregs)的 Kv1.3 通道活性与该疾病的关系,并验证依普利酮(EPL)对动脉粥样硬化有逆转作用。方法 收集 ACVD 患者(n=70)及正常人志愿者(n=20)全血样本。免疫磁珠分选外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs, CCK-8 技术检测 EPL 对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 增殖抑制的影响。分组进行培养:正常人外周血的 Control 组、ACVD 患者外周血组(ACVD 组)、ACVD 患者+EPL 组(ACVD+EPL 组)。RT-qPCR 检测各组培养体系中的 Kv1.3(钾通道)、KCa3.1(钙通道)和内质网钙释放激活的钙通道(CRAC)基因的表达;In-cell western blotting 技术检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 的 Kv1.3 通道蛋白质水平的表达。结果 EPL 的最适浓度为 30 μmol; ACVD 组 Kv1.3 通道的 mRNA 和蛋白质的表达分别是正常对照组 3.35 倍和 1.83 倍(P<0.01), ACVD+EPL 组 Kv1.3 通道的 mRNA 和蛋白质的相对表达分别是 ACVD 组 62.09%(P<0.01); ACVD 组 KCa3.1 和 CRAC 通道 mRNA 的表达分别是正常对照组的 2.18、2.22 倍(P<0.01), ACVD+EPL 组 KCa3.1 和 CRAC 通道 mRNA 的表达是 ACVD 组的 61.01%、76.68%(P<0.01)。结论 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的三种离子通道在 ACVD 中均有高表达, EPL 可抑制 Kv1.3 通道的活性, 推测醛固酮受体拮抗剂可能通过抑制 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 上的 Kv1.3 通道的激活, 抑制了 T 淋巴细胞的活性, 以抑制动脉粥样硬化病变中炎症作用的发生发展。

**[关键词]:** 动脉粥样硬化性心血管疾病; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs; Kv1.3 通道; 抑制; 依普利酮

### Inhibitory effects of eplerenone on Kv1.3 and other channels of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg in patients with atherosclerotic cardiovascular disease

Shao Jinsong, Hu Kai, Wang Hongrui, Wang Liwei, Xu Bo

Department of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Shaanxi xi'an 710032, China

Corresponding author: Xu Bo, Email: xumingjun1985@126.com

**[Abstract]: Objective** To investigate the effect of Kv1.3 channel expression on the activity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs in patients with atherosclerotic cardiovascular disease (ACVD), and to verify the reversal effect of eplerenone. **Methods** Blood samples of 70 cases of atherosclerotic cardiovascular disease as ACVD group and 20 cases of normal people as control group were collected in our hospital. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs separated from peripheral blood were sorted by immune magnetic bead, and the purity were tested by flow cytometry. The minimum effective concentration of EPL incubation on the proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs was found by CCK-8 technique. RT-qPCR technique was used to detection the expression of channel gene, such as Kv1.3, KCa3.1 and CRAC on the membrane of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs. ICW technique was used to detection the protein expression of Kv1.3 channels on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs. **Results** Compared with normal group, ACVD group showed higher expression of mRNA for Kv1.3 channel, KCa3.1 channel and CRAC channel (P<0.01), as well as higher expression of protein for Kv1.3 channel (P<0.01). Compared with ACVD group, EPL+ACVD group showed lower expression for Kv1.3 channel (P<0.01), both in gene and protein. **Conclusion** The three ion channels of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs are highly expressed in ACVD. EPL can inhibit the activity of Kv1.3 channel. It is speculated that aldosterone receptor antagonists may inhibit the activation of Kv1.3 channel on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs. Inhibiting the activity of T lymphocytes can inhibit the occurrence and development of inflammation in ACVD.

**[Key words]:** Atherosclerotic cardiovascular disease; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs; Eplerenone; Kv1.3 channel; Inhibition

作者单位: 710032 西安,空军军医大学基础医学系学员六大队(邵劲松、胡 锴);044500 运城市,石家庄飞行学院第三训练旅单位(王红瑞);710032 西安,解放军空军军医大学第一附属医院心血管外科(王立伟、徐 博)

通讯作者: 徐 博, Email, xumingjun1985@126.com

动脉粥样硬化(atherosis, AS)是引起心血管相关疾病的主要原因,动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ACVD)主要包括冠心病、中风和周围动脉疾病<sup>[1]</sup>,现严重威胁着人类的健康和幸福。目前 AS 发病机理仍没有定论,德国病理学家 Virchow 于 1863 年所提出,认为 AS 病变主要是因血浆脂质水平增高所引起,即脂质浸润学说<sup>[2]</sup>。该学说认为 ACVD 的发生与脂质代谢障碍的发生有关,其本质是脂质随血浆附着在动脉壁引起炎症反应的发生。炎症反应是刺激纤维组织的分化,导致粥样斑块的形成的主要原因。醛固酮(aldosterone, ALD)是引起炎症反应的重要因素,降低 ALD 受体的活性可有效控制 AS 的发生和发展。ALD 参与心血管重构的进程,心血管重构后期正是炎症修复的重要表现<sup>[3]</sup>。多种免疫细胞和/或炎症因子的分泌可直接或间接促进心血管重构的进程<sup>[4]</sup>,这些细胞因子可以刺激细胞免疫 T 淋巴细胞的活化。电压门控通道 Kv1.3(钾通道)在人外周血 T 淋巴细胞中可使细胞膜保持的静息电位,以维持 Ca<sup>2+</sup>持续内流的状态,在活化 T 淋巴细胞和促进炎性分子分泌的过程中发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。Kv1.3 通道是 T 淋巴细胞膜上重要的离子通道,且被认为是各种免疫性疾病治疗的新靶标<sup>[6]</sup>。依普利酮(Eplerenone, EPL)是新一代的 ALD 受体拮抗剂,其毒副作用小,特异性强<sup>[7]</sup>。ACVD(失代偿)时, Kv1.3 通道是否具有对 T 淋巴细胞的活化作用未见报道,本研究拟探究 Kv1.3 通道对 ACVD 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Tregs)活性的影响在延缓疾病发生发展的过程中发挥的关键作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例筛选条件及分组

**1.1.1 实验组及给药组病例入选标准** 确定性冠心病包括心肌梗死史、稳定型心绞痛。

**1.1.2 实验组及给药组病例排除标准** ①急、慢性感染,炎症性疾病;②自身免疫性疾病;③近期不稳定型心绞痛及急性心肌梗死(3个月内);④风湿性疾病近期(3个月内)有风湿活动;⑤糖尿病、甲状腺功能亢进或其它内分泌疾病;⑥近期使用影响免疫反应药物(如皮质类固醇);⑦严重肝、肾功能不全;⑧肿瘤;⑨妊娠。

**1.1.3 分组及两组病例组成** 按照是否诊断为 ACVD 患者分为 ACVD 组(n=70)和正常志愿者的 Control 组(n=20)。ACVD 组男性 38 例,女性 32 例,年龄 46~79(68.12±12.11)岁;Control 组男女各

10 例,年龄 45~69(50.02±16.21)岁。两组患者基线一致(P>0.05)。

**1.2 主要仪器及试剂** CT15RE 型低温高速离心机(Hitachi, 日本), Midi 型磁力分选器(MACS, 德国), 25LS 型分选柱(MACS, 德国), 0.5~10、20~200 和 100~1 000 μl 型移液枪(EPPendorf, 德国), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cell solation kit, 人淋巴细胞分离液(LTS1077, Sigma), 胎牛血清、RPMI1640 培养基(Hyclone), SYBR 试剂盒(Life), KCNN1.3 小鼠抗人, IRDye<sup>®</sup> 800CW Goat anti-mouse(LI-COR)等。

**1.3 免疫磁珠分离 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs** 收集 ACVD 组及 Control 组的外周血 5~10 ml, 用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)按照 1:1 的比例稀释, 将稀释液缓缓的平铺于 1077 分离液(SIGMA)上, 离心, 吸取中间云状细胞团并充分冲洗。使用试剂盒双阴性分选获得 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs。

**1.4 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 的分组与培养** 用完全培养基[10%胎牛血清(10 μl/ml), rmlL-2(2.5×10<sup>6</sup> IU/ml), TGF-β<sub>1</sub>(2 μg/ml)及 1%双抗]混悬上述细胞, 并均匀的种在 3 个 10 cm 的培养皿(用含 10 μg/ml Anti-CD3, 10 μg/ml HSP60 包皿)中, 将 Control 组、ACVD 组和 ACVD+EPL 组的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 三组细胞培养 48 h, 待测。

**1.5 流式细胞术验证 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs** 离心收集不同组的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs, RPMI-1640(含胎牛血清, 细胞刺激剂、离子霉素、高尔基阻断剂)混悬细胞; 留下层细胞, 浓度调整到 1×10<sup>6</sup>/ml; 饥饿处理; 分别加 FITC Mouse Anti-Human CD3、APC Mouse Aniti-Human CD4、PE-CyTM7 Mouse Anti-Human CD25、PE Mouse Anti-Human CD127 各 10 μl, 加细胞表面抗原染色法标记, 流式细胞仪检测, 通过 CellQuest 软件对所有染色的细胞进行数据分析, 并记录阳性细胞的百分比。

**1.6 RT-qPCR 检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 上 Kv1.3、KCa3.1、激活钙释放 Ca<sup>2+</sup>(CRAC)通道 mRNA 表达**

收集各组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs, 10<sup>7</sup>/ml 细胞 trizol 法提取细胞总 RNA, 检测总 RNA 的浓度及纯度。逆转录, 于 PCR 扩增仪上进行 Cycle2: (1)65℃5 min; 25℃5 min; 42℃60 min; 70℃5 min; Cycle3 (1)4℃, ∞。PCR 扩增, 于冰上配扩增体系(H<sub>2</sub>O, 6.4 μl, SYBR 10 μl, Primer 0.8 μl)加样品 1.8 μl。设定扩增程序 Cycle1(1)50℃2 min; Cycle2(1)95℃2 min; Cycle3(40)95℃15 s, 60℃15 s; Cycle4(1)60℃15 s; Cycle5(1)95℃15 s。基因序列如表 1 所示。

**1.7 ICW 检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 蛋白的表达** 收集

表 1 基因序列

基因	上游 5'—3'	下游 5'—3'
GAPDH	GGCAGCCTGTTGGCCAAGAA	GGCAGCCTGTTGGCCAAGAA
Kv1.3	GGCAGCCTGTTGGAAAAGAA	GGCAGCCTGTTGGAAAAGAA
KCa3.1	ACTGGAGTCATGGGTGTCTG	ATGAGACTCCTTCTCGGAG
CARC	TCTCCGTTGAAGAAGACCCC	GGCAGCCTGTTGGAAAAGAA

各组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs 用上述 1640 培养基混悬, 分别布于 U 型黑壁 96 孔板中, 37 °C, 5% 的培养箱放置 10 min; 待细胞静置于底部后固定, 于室温 30 r/min 摇床 30 min; 去上清, 重新加入封闭液, 轻摇; 孵育一抗(KCNN1.3 小鼠抗人, ab105522)于 4 °C 轻摇过夜; 孵育二抗, 避光轻摇 1 h, 于 Odyssey 双红外激光检测仪上进行检测, 中等扫描质量, 调整分辨率、焦距及亮度, 分别为 169 μm、3.0 mm、5。

1.8 数据统计分析 本实验使用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析, 使用单因素方差分析, 进行 t 检验, P < 0.05 认为有显著性差异, 具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 流式检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 的纯度 三组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs 的纯度均超过 80 % 故具有研究代表性, 且三组不具有统计学差异。流式结果见图 1。

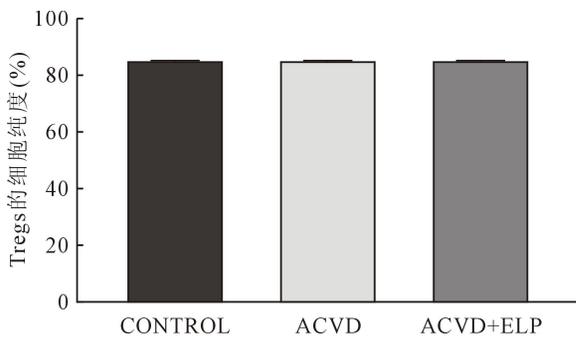


图 1 流式检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 的纯度 (n=20)

2.2 CCK-8 法检测 EPL 的最佳浓度 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs 给药孵育 48 h 后给予 CCK-8 试剂孵育(37 °C, 5%CO<sub>2</sub>)4 h 于紫外分光光度计上检测, 得到下图的曲线, 如图 2 所示, 0、0.3、1、3、10、30、100 μmol 的 EPL 对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs CCK-8 染色的 OD 值抑制率曲线, n = 1, 2, 3……30 μmol 的 EPL 大约抑制 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 增殖达 53.26%, 故 30 μmol EPL 为最佳浓度。

2.3 RT-qPCR 检测各组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs Kv1.3、KCa3.1 和 CRAC 通道的 mRNA 表达 ACVD 组的

Kv1.3、KCa3.1、CRAC 通道的 mRNA 表达是 Control 组 3.35、2.18、2.22 倍 (P < 0.01), ACVD+EPL 组是 ACVD 组的三组离子通道的 mRNA 表达 62.09%、61.01%、76.68% (P < 0.01)。将 Control 组结果标化, ACVD 组与 Control 组比较主要观察 AS 性心血管疾病患者的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs 上 Kv1.3、KCa3.1、CRAC 通道 mRNA 表达, 以及 EPL 培养后各基因的相对表达。见图 3。

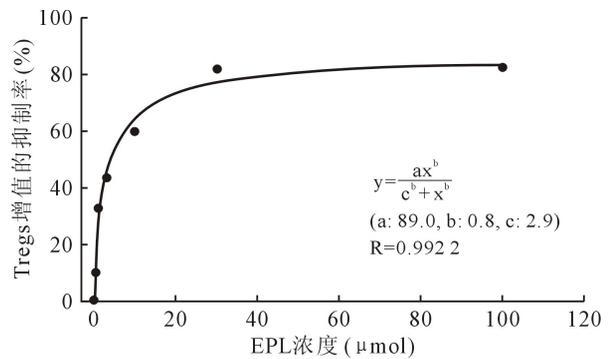
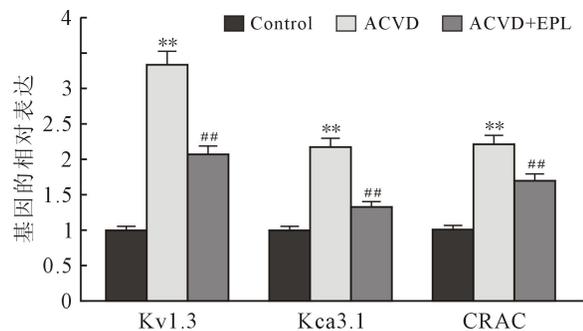


图 2 不同浓度 EPL 对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs 增殖的抑制率

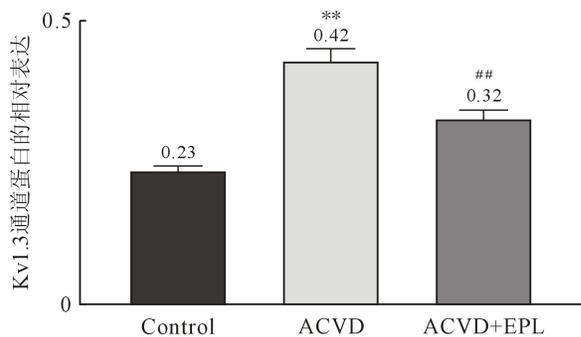


注: \*\* P < 0.01 为 ACVD 组 vs. Control 组, ## P < 0.01 为 ACVD+EPL 组 vs. ACVD 组。

图 3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs 上相关离子通道的 mRNA 表达

2.4 In-cell western blotting 检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs Kv1.3 通道蛋白的表达 ACVD 者的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs Kv1.3 通道蛋白的表达是正常人 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs Kv1.3 通道蛋白的表达的 1.83 倍 (P < 0.01)。ACVD 外周血中的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs 给予 EPL 后, Kv1.3 通道蛋白的表达下降了 26.19% (P < 0.01)。

见图 4。



注: \*\*  $P < 0.01$  为 ACVD 组 vs. Control 组, ##  $P < 0.01$  为 ACVD+EPL 组 vs. ACVD 组。

图 4  $CD4^+CD25^+$ Tregs Kv1.3 通道蛋白的表达

### 3 讨论

AS 是由脂质代谢障碍引起的慢性炎症性疾病, 动脉管壁失去弹性形成斑块或破裂, 心功能降低, 即为 ACVD<sup>[8]</sup>。有研究发现, 粥样斑块的形成与病理状态下的免疫细胞激活和动脉管壁释放的炎性因子相互作用的结果<sup>[9]</sup>。ACVD 是 2013 年提出的一个新概念, 其中危害人类最严重的是各种常见的 ACVD<sup>[10]</sup>。在炎症反应中, 免疫系统肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 过度激活也是导致 AS 的重要原因, 故血管紧张素转化酶抑制剂 (angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI) 类及  $\beta$ -受体阻滞剂被经典用于预防和逆转 ACVD, 大量研究表明 ALD 通过其 RAAS 信号转导通路在 AS 引起的心功能衰弱的发生发展中起关键作用<sup>[11]</sup>。ACEI 类及  $\beta$ -受体阻滞剂可减少 ALD 在 AS 时的释放, EPL 是第二代 ALD 受体拮抗剂, 具有选择性高, 毒副作用小的优势。

ACVD 炎症学说被广泛的认可, 在炎症反应中, 免疫细胞被激活, 产生的炎性介质进一步促进了 AS 的发展和恶化<sup>[12]</sup>。T 淋巴细胞作用下的细胞免疫被激活, 其调控模式为: 活化后的 T 淋巴细胞, CRAC 通道打开,  $Ca^{2+}$  内流显著增加导致钙依赖性的蛋白激酶通路进行各种细胞因子合成<sup>[13]</sup>。钙离子激活, 使 T 细胞处于能被活化的状态<sup>[14]</sup>。选择性抑制 Kv1.3 通道会抑制 Tregs 的活化及其对相关细胞因子的分泌<sup>[15]</sup>。由于 Kv1.3 通道是 T 淋巴细胞上的主要作用通道, 因此 Kv1.3 通道是免疫炎症疾病发生和发展的关键离子通道<sup>[16]</sup>。

ACVD 外周血中的  $CD4^+CD25^+$ Tregs 的 Kv1.3、KCa3.1 及 CRAC 通道的 mRNA 的表达均较正常组显著增加, 给予 30  $\mu$ mol EPL 后, 其表达均被显著抑制,

其中 Kv1.3 通道抑制最为明显, 并且在 Kv1.3 通道蛋白质进行的检测结果中发现 ACVD 组的 Kv1.3 蛋白质的表达显著增加, EPL 可显著抑制其表达 ( $P < 0.01$ )。

综上所述, Kv1.3 等通道可调控 ACVD 外周血  $CD4^+CD25^+$ Tregs 的活化, 而 ALD 受体拮抗剂 EPL 对 ACVD 外周血  $CD4^+CD25^+$ Tregs 上的 Kv1.3 通道具有显著的抑制作用, 这一现象对揭示 Kv1.3 通道与 ALD 受体的关系具有重要意义。Kv1.3 通道对 ALD 抑制作用的具体机制仍需进一步深入研究, 这对临床 ACVD 的治疗提供了新的研究思路和治疗方向, T 淋巴细胞膜上的 Kv1.3 通道在炎症疾病的治疗和靶向地位作用值得深入探究。

### 参考文献:

- [1] Labarrere CA, Dicarolo HL, Bammerlin E, *et al*. Failure of physiologic transformation of spiral arteries, endothelial and trophoblast cell activation, and acute atherosclerosis in the basal plate of the placenta[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2017, 216(3): e1-e16.
- [2] Lv M, Chen Z, Hu G, *et al*. Therapeutic strategies of diabetic nephropathy: recent progress and future perspectives[J]. *Drug Discovery Today*, 2014, 20(3): 332-346.
- [3] Kosmala W, Marwick TH. Reply: effect of aldosterone antagonism on exercise tolerance in heart failure with preserved ejection fraction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(18): 2352-2353.
- [4] Cabezas-Cruz A, Espinosa PJ, Obregon DA, *et al*. Ixodes scapularis tick cells control anaplasma phagocytophilum infection by increasing the synthesis of phosphoenolpyruvate from tyrosine[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 375.
- [5] Fernandez-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, *et al*. Role of leptin in the activation of immune cells[J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 568343.
- [6] Somodi S, Balajthy A, Szilagyi O, *et al*. Analysis of the  $K^+$  current in human  $CD4^+$  T lymphocytes in hypercholesterolemic state[J]. *Cell Immunol*, 2013, 281(1): 20-26.
- [7] 郭真力, 孟军军, 杜晶, 等. 依普利酮对急性心肌梗死大鼠心肌炎症反应及心脏功能影响的研究[J]. *中国心血管病研究*, 2018, 16(4): 380-384.
- [8] Patton KK, Heckbert SR, Alonso A, *et al*. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a predictor of incident atrial fibrillation in the multi-ethnic study of atherosclerosis: the effects of age, sex and ethnicity[J]. *Heart*, 2013, 99(24): 1832-1836.
- [9] Thent ZC, Chakraborty C, Mahakkanukrauh P, *et al*. The molecular concept of atheromatous plaques[J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(11): 1250-1258.
- [10] Bahiru E, de Cates AN, Farr MR, *et al*. Fixed-dose combination therapy for the prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 3(3): CD009868.
- [11] Patel VB, Mori J, McLean BA, *et al*. ACE2 deficiency worsens epicardial adipose tissue inflammation and cardiac dysfunction in response to diet-induced obesity[J]. *Diabetes*, 2016, 65(1): 85-95.

(转第 256 页)