

特异性 Kv1.3 通道阻断剂对大鼠动脉粥样硬化的影响

任涛¹ 王焱¹ 常贺¹ 李刚¹ 秦鹏¹ 唐以军

(十堰市太和医院 湖北医药学院附属太和医院 湖北 十堰 442000)

摘要 目的 研究特异性 Kv1.3 通道阻断剂对高脂喂养大鼠主动脉粥样硬化(AS)发生的影响。方法 构建 AS 大鼠模型, Wistar 大鼠被随机分为正常对照(Control)组, AS 组, AS 药物治疗(AS+ShK(L5))组($n=10$)。利用组织病理学方法观察三组大鼠主动脉组织病变;通过实时荧光定量 PCR、Western 印迹法检测大鼠主动脉组织 Kv1.3 通道和相关炎症因子表达水平;通过 ELISA 法检测大鼠外周血炎症因子水平。结果 与 Control 组比较, AS 组总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和甘油三酯(TG)水平均显著增高, 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平显著降低, 而 AS 组和 AS+ShK(L5)组之间血脂水平均无差异($P>0.05$)。大鼠主动脉组织 HE 染色显示 AS 组大鼠主动脉内膜增厚, 中层平滑肌排列紊乱, 炎症细胞浸润; AS+ShK(L5)组较 AS 组主动脉组织病变有所减轻。mRNA 水平, AS 组 Kv1.3 通道和炎症因子干扰素(IFN- γ)、白介素(IL-2、IL-10、IL-4、IL-1 β)的表达量明显高于 Control 组, 而在 AS+ShK(L5)组的表达量明显低于 AS 组。蛋白水平中 AS 组 Kv1.3 通道和炎症因子(IFN- γ 、IL-2 和 IL-10)的表达量明显高于 Control 组, 而 AS+ShK(L5)组的表达量明显低于 AS 组。AS 组大鼠外周血炎症因子(IL-2、IFN- γ 和 IL-10)的水平较 Control 组升高, 而 AS+ShK(L5)组较 AS 组有所降低。结论 特异性 Kv1.3 通道阻断剂 ShK(L5)能有效地抑制免疫细胞的活化, 降低炎症因子的表达水平, 从而减轻病变血管组织的炎症反应, 同时可降低外周血炎症因子的水平, 特异性 Kv1.3 通道阻断剂 ShK(L5)对 AS 的发生有一定的抑制作用。

关键词 动脉粥样硬化; T 淋巴细胞; 巨噬细胞; Kv1.3 钾通道; 细胞因子; 钾通道阻滞剂

(中图分类号) R544.1 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2017)02-0294-04; doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.02.015

T 细胞的功能活化与其细胞膜上离子通道的电活动密切相关^[1,2]。T 细胞膜上主要存在 3 种离子通道蛋白:电压门控 K⁺通道(主要为 Kv1.3 通道), Ca²⁺激活 K⁺通道(主要为 Kca3.1 通道, 也称 I_{KCa1}通道), 钙离子释放活化的钙离子通道。其中 Kv1.3 通道是效应性 T 细胞活化的关键^[2,3]。人类的 Kv1.3 通道由位于染色体 1p13.3 的 Kv1.3 基因(又称 KCNA3 基因)编码, 含 523 个氨基酸, 其结构由 4 个相同的 α 亚基组成, 每个亚基包括 1 个 N-末端、6 个跨膜片段(S1-S6)和 1 个 C-末端^[4], 其相对限制性地分布在免疫系统和中枢神经系统, 在免疫系统表达于外周血 T 细胞、胸腺细胞、白血病细胞系, 鼠胸腺细胞、外周血 T 细胞、巨噬细胞等, 人类 T 细胞发育早期即有 Kv1.3 通道的表达。鉴于 T 细胞和巨噬细胞在 AS 发生和发展中所发挥的重要作用, 而它们的增殖、活化和分泌功能又都受到 Kv1.3 通道的调控, 因此推测 Kv1.3 通道在动脉粥样硬化(AS)的进程中可能同样发挥着关键作用, 推测使用特异性 Kv1.3 通道阻断剂阻断免疫细胞(T 细胞和巨噬细胞)膜上 Kv1.3 通道可能同样能有效地抑制 AS 病变中免疫细胞的活化及其相关炎症因子的分泌, 从而减轻病变血管组织的炎症反应。因此本实验采用大鼠 AS 模型, 并给予注射 Kv1.3 通道特异性阻断剂:海葵神经毒素(ShK)的衍生物-ShK(L5), 又名 ShK-470, 以此来观察特异性 Kv1.3 通道阻断剂 ShK(L5)对大鼠 AS 发生的影响, 并探讨 T 细胞和巨噬细胞膜表面 Kv1.3 通道作为靶点对 AS 进行免疫调节治疗的可行性。

1 厦门大学附属中山医院厦门心脏中心

通讯作者:王焱(1967-)男,教授,主任医师,博士,硕士生导师,主要从事动脉粥样硬化形成及其影响因素的研究。

第一作者:任涛(1979-)男,硕士,主治医师,主要从事动脉粥样硬化形成及其影响因素的研究。

1 材料与方法

1.1 大鼠 AS 实验动物模型的建立及实验分组 (1)造模 Wistar 成年健康雄性大鼠 30 只, 体重 180~200 g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供。动物合格证号: SCXK(沪)2007-0005, 喂养高脂饲料并注射维生素 D3 针剂造模。(2)动物分组: Control 组给予标准大鼠饲料喂养, 并于喂食前 1 d 腹腔注射和 AS 组维生素 D3 同体积的生理盐水。AS 组给予高脂饲料喂养, 并于喂食开始前 1 d 腹腔注射维生素 D3 针剂, 注射剂量为 70 IU/kg。AS+ShK(L5)组给予高脂饲料喂养, 并于喂食开始前 1 d 腹腔注射同 AS 组量的维生素 D3, 同时每天给予 Kv1.3 通道特异性阻断剂 ShK(L5)皮下注射, 注射剂量为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。各组大鼠饲养 80 d 后麻醉处死, 取血、取主动脉组织等。

1.2 血脂水平检测 分别使用试剂盒(南京建成)检测三组大鼠血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量。

1.3 主动脉组织苏木素伊红(HE)染色 血管经甲醛固定后, 常规石蜡包埋, 切片, 用二甲苯脱蜡, 经各级乙醇至水洗盐酸酒精分化 30 s, 苏木素(福州迈新生物)染色 5 min, 自来水浸泡 15 min, 伊红(福州迈新生物)染色 2 min, 常规脱水, 透明, 封片, 镜下阅片及拍照采图。

1.4 实时荧光定量 PCR 法检测相关炎症因子基因在血管组织中的表达 Trizol(Invitrogen 美国)法提取血管组织总 RNA, 测定 RNA 浓度, 逆转录酶 ReverTra Ace 试剂盒(TOYOBO, 日本)反转录为 cDNA, 实时荧光定量 PCR 检测相关炎症因子表达, 引物(Invitrogen 美国)见表 1。相对定量法对比各组各因子表达变化。

1.5 Western 印迹方法检测相关炎症因子蛋白在血管组织中的表达 Trizol 中抽提蛋白(按其说明书操作), 测定蛋白浓度(BCA 法 碧云天)制胶, 上样, 电泳, 转膜(4℃下, 恒压 100 V,

表1 实时荧光定量 PCR 各基因引物序列

基因	引物序列	引物大小 (bp)	编号
GAPDH	正义链: 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCGA-3'; 反义链: 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'	105	AB017801
Kv1.3	正义链: 5'-GCTCTCCCGCCATTCTAAG-3'; 反义链: 5'-TCGTCTGCCTCAGCAAAGT-3'	141	NM_019270
IL-2	正义链: 5'-CAAGCATGTACAGCATGCAGC-3'; 反义链: 5'-ATCGATCCCTCTCAGGAGCAC-3'	152	NM_053836
IFN- γ	正义链: 5'-GAAAGACAACCAGGCCATCAG-3'; 反义链: 5'-TCATGAATGCATCCTTTTTTGC-3'	101	NM_138880
IL-4	正义链: 5'-AACACCACGGAGAACGAGCTCATC-3'; 反义链: 5'-AGTGAGTTCAGACCGCTGACACCT-3'	152	NM_201270
IL-10	正义链: 5'-GCCAAGCCTTGTGACAGAAATGA-3'; 反义链: 5'-TCCCAGGGAATTCAAATGCT-3'	101	NM_012854
IL-1 β	正义链: 5'-CAGCAATGGTCGGGAC-3'; 反义链: 5'-ATAGGTAAGTGGTGCCT-3'	248	NM_031512

30 ~ 60 min) 根据蛋白质分子量大小调整转膜时间, 封闭、孵育兔抗鼠一抗 (白介素 (IL)-2、干扰素 (IFN)- γ 、IL-10: Abcam, 美国)、孵育羊抗兔二抗 (Abcam, 美国), 显影和定影。光密度测定: 采用扫描仪扫描图像, 用 Qualityone 图像处理软件 (Bio-Rad) 进行蛋白印迹条带的定量分析, 测定目的条带的光密度值及 β -actin 光密度值, 以两者光密度比值代表目的蛋白的相对表达量。计算每例标本中目的蛋白与参照蛋白相对表达量的值。

1.6 ELISA 法测定血清中各炎症因子浓度 取出试剂盒 (IFN- γ 、IL-2 和 IL-10, 欣博盛生物), 平衡至室温, 加样品或标准品, 加入生物素化抗体工作液, 洗板, 加酶结合物, 洗板, 加入显色底物 TMB 100 μ l/孔, 避光孵育 15 min。加入终止液 100 μ l/孔, 混匀后即测量 OD450 值, 制备标准曲线计算浓度。以上均严格按照试剂盒方法操作。

1.7 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 三组大鼠血脂水平比较 AS 组与 Control 组以及 AS+ShK (L5) 组与 Control 组相比, TC、LDL-C 和 TG 水平均显著增高, 而 HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$), 而 AS 组和 AS+ShK (L5) 组之间各血脂指标水平的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表2 各组血脂水平的变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L, $n = 10$)

组别	TC	TG	HDL-C	LDL-C
Control 组	2.16 \pm 0.47	1.84 \pm 0.36	3.10 \pm 0.63	0.84 \pm 0.28
AS 组	4.10 \pm 1.18 ¹⁾	2.69 \pm 0.65 ¹⁾	2.11 \pm 0.40 ¹⁾	2.22 \pm 0.90 ¹⁾
AS+shK (L5) 组	3.76 \pm 1.33 ¹⁾	2.77 \pm 0.63 ¹⁾	2.22 \pm 0.37 ¹⁾	2.02 \pm 0.89 ¹⁾

与 Control 组比较: 1) $P < 0.05$; 与 AS 组比较: 2) $P < 0.05$, 下表同

表3 各组大鼠主动脉组织 Kv1.3 通道及相关炎症因子实时荧光定量 PCR 结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	Kv1.3	IFN- γ	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-10
Control 组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
AS 组	2.80 \pm 1.49 ¹⁾	3.01 \pm 1.43 ¹⁾	2.82 \pm 1.97 ¹⁾	2.66 \pm 1.61 ¹⁾	2.28 \pm 1.18 ¹⁾	2.04 \pm 1.27 ¹⁾
AS+shK (L5) 组	1.37 \pm 0.24 ²⁾	1.63 \pm 0.32 ²⁾	0.19 \pm 0.11 ²⁾	1.15 \pm 0.91 ²⁾	0.50 \pm 0.29 ²⁾	0.82 \pm 0.35 ²⁾

2.4 Western 印迹实验结果 通过 Western 印迹相对灰度分析发现 Kv1.3 通道在 AS 组表达量高于 Control 组 ($P < 0.01$), 炎症因子 IL-2、IFN- γ 和 IL-10 在 AS 组表达量同样高于 Control 组 ($P < 0.05$); 而 AS+ShK (L5) 组较 AS 组上述蛋白的表达量有不同程度的降低 ($P < 0.05$), 见图 2, 表 4。

2.2 三组大鼠主动脉组织 HE 染色结果 HE 染色显示 Control 组大鼠主动脉血管壁结构清晰, 内膜、中层和外膜分界清楚。内皮细胞覆盖管腔, 细胞连续、完整。中层血管平滑肌排列整齐、规则, 明显可见呈环形弹力膜, 外膜为疏松结缔组织。AS 组大鼠主动脉管壁三层结构已无明确界线, 部分内皮细胞损伤脱落, 内膜有轻度增厚, 中层弹力膜有断裂, 血管内皮细胞 (VSMCs) 增生, 排列紊乱, 有少量炎症细胞浸润。AS+ShK (L5) 组大鼠主动脉管壁内膜、中层和外膜尚可辨认, 内膜有轻度局部增厚, 中膜弹力膜以及 VSMCs 排列紊乱程度较 AS 组大鼠明显减轻, 炎症细胞的浸润也减少, 见图 1。

2.3 实时荧光定量 PCR 结果 Kv1.3 通道在 AS 组表达量明显高于 Control 组 ($P < 0.01$), 炎症因子 IL-2、IL-4、IFN- γ 、IL-10 和 IL-1 β 在 AS 组表达量同样高于 Control 组 ($P < 0.05$); 而 AS+ShK (L5) 组较 AS 组上述基因的表达量有不同程度的降低 ($P < 0.05$), 见表 3。

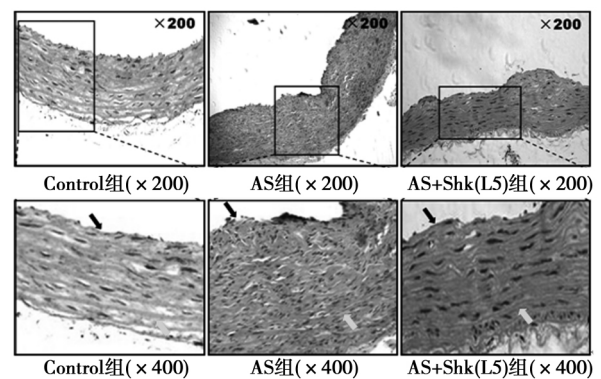
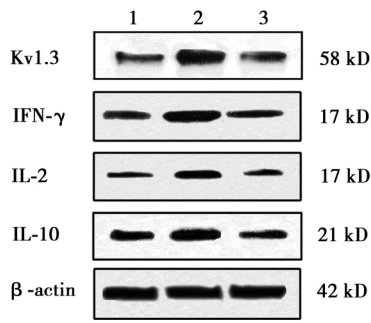


图1 各组大鼠主动脉组织病理学观察 (HE)

2.5 大鼠外周炎症因子的检测结果 ELISA 发现, 与 Control 组相比, AS 组炎症因子 IFN- γ 、IL-2 和 IL-10 的水平明显增高 ($P < 0.05$), 而 AS+ShK (L5) 组较 AS 组这些炎症因子的水平均有不同程度降低 ($P < 0.05$), 见表 5。



1~3: Control 组、AS 组、AS+Shk(L5) 组

图 2 各组大鼠主动脉组织 Kv1.3 通道及相关炎症因子 Western 印迹结果

表 4 各组大鼠主动脉组织 Kv1.3 通道及相关炎症因子 Western 印迹结果 ($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

组别	Kv1.3	IFN- γ	IL-2	IL-10
Control 组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
AS 组	2.63 \pm 0.99 ¹⁾	2.74 \pm 1.31 ¹⁾	2.67 \pm 1.46 ¹⁾	2.05 \pm 1.02 ¹⁾
AS+shK(L5) 组	1.42 \pm 0.26 ²⁾	1.41 \pm 0.44 ²⁾	0.95 \pm 0.32 ²⁾	1.23 \pm 0.34 ²⁾

表 5 各组血浆炎症因子水平的比较 ($\bar{x} \pm s$ $n=10$ $\mu\text{g/ml}$)

组别	IFN- γ	IL-2	IL-10
Control 组	0.08 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01
AS 组	0.14 \pm 0.04 ¹⁾	0.15 \pm 0.07 ¹⁾	0.13 \pm 0.05 ¹⁾
AS+shK(L5) 组	0.10 \pm 0.02 ²⁾	0.09 \pm 0.02 ²⁾	0.09 \pm 0.01 ²⁾

3 讨论

AS 是一种发生在血管壁的慢性炎症疾病,众多炎症细胞和炎症介质参与了 AS 的发生、发展过程⁽¹⁾,而免疫反应在此过程中发挥着重要作用^(5,6)。AS 的各种危险因素最终都会损伤动脉内膜,而 AS 病变的形成是动脉对内膜损伤作出的炎症-纤维增长性反应的结果。在长期高血脂症的情况下,增高的脂蛋白中主要是氧化修饰低密度脂蛋白(ox-LDL)和胆固醇对动脉内膜造成功能性损伤,从而启动了 AS 的进程。基于以上关于 AS 发病机制研究的重要理论,结合目前 AS 疾病模型研究的进展⁽⁷⁻⁹⁾,本实验选择了喂食高脂饲料的建模方案。虽然基因敲除小鼠 AS 实验模型(如 ApoE^{-/-}或 LDLr^{-/-}小鼠)在 AS 研究中已经比较成熟,但小鼠 T 细胞膜上表达的离子通道类型与人类和大鼠不同,且细胞膜电位并不是由 Kv 通道所调控^(10,11),不适合作为评价 Kv1.3 通道阻断剂疗效的实验动物模型⁽¹²⁾,因此本实验选择了大鼠高脂饮食辅以维生素 D3 负荷腹腔注射的建模方法。本文结果表明 AS 实验模型已成功构建。

本实验选择了 Kv1.3 通道特异性阻断剂 ShK 的衍生物——ShK(L5)⁽¹³⁾,又名 Shk-170。ShK(L5)对 Kv1.3 通道阻断的选择性比对 Kv1.1 通道高 100 倍,比对其他通道高出 250 倍以上⁽¹⁴⁾。小分子多肽 ShK(L5)作为一种代表性的 Kv1.3 通道特异性阻断剂已被用于众多体内动物实验^(14,15)。根据 ShK(L5)在大鼠体内药代动力学实验数据,按 10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 连续给药即可达到 300 pmol/L 的稳定有效血药浓度水平。为确保足量给药,参照已有动物实验中 ShK(L5)的给药方

案⁽¹⁵⁾,本实验药物治疗组大鼠每天给予 ShK(L5)皮下注射,注射剂量为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,持续 8 w 时间。

本实验发现大鼠主动脉组织局部 Kv1.3 通道无论在 mRNA 水平,还是在蛋白水平,AS 组大鼠的表达量均明显高于 Control 组,且给予大鼠 ShK(L5)治疗后可显著降低 Kv1.3 通道的表达量。通过对主动脉组织内炎症因子检测,发现 AS 组大鼠 IL-2、IFN- γ 以及 IL-4 的基因和蛋白的表达量同样明显高于 Control 组,而在 AS+ShK(L5)组大鼠这些炎症因子的表达量明显降低。效应记忆性 T 细胞(TEM)在许多慢性自身免疫炎症性疾病中发挥着关键作用,且表达高水平的 Kv1.3 通道^(15,16-18),而这些中央记忆性 T 细胞(TCM)细胞在抗原沉积和炎症免疫反应局部发挥直接效应功能是通过向炎症组织局部分泌大量的炎症因子得以实现,这些炎症因子包括 IFN- γ 、IL-4 和 IL-2。初始 T 细胞⁽¹⁹⁾和 TCM 细胞仅能产生非常少量的 IFN- γ 和 IL-4;而 TEM 细胞则可迅速大量产生这些炎症因子⁽²⁰⁾。已有实验表明 ShK(L5)在 IC₅₀ \approx 200 pmol/L 时可呈剂量依赖性抑制 GAD65-specific CD4⁺ TEM 细胞的钙信号,并可抑制 TEM 细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2⁽¹⁵⁾。

本文发现与 Control 组相比,AS 组炎症因子 IFN- γ 、IL-2 和 IL-10 的水平明显增高,而 AS+ShK(L5)组较 AS 组这些炎症因子的水平均有不同程度降低。经典的钾通道阻断剂 quinine 和 4-AP 均在能够阻断 Kv1.3 通道的浓度条件下,抑制人类外周血 T 细胞的增殖和 IL-2 的产生⁽²⁾。此外,也有研究进一步证明急性冠脉综合征(ACS)患者外周血 T 细胞 Kv1.3 通道电流幅度较正常人明显升高,同时 Western 印迹结果也表明 ACS 患者外周血 T 细胞 Kv1.3 通道蛋白的表达较正常人该蛋白的表达明显升高⁽²¹⁾,该研究首次提示了 AS 和 Kv1.3 通道之间的直接相关性。此外,另有研究证明 ACS 患者外周血 CD4⁺T 细胞及其亚型 CD4⁺CD28nullT 细胞活化后 Kv1.3 通道表达增加⁽²²⁾,特异性 Kv1.3 通道阻滞剂 rMgTx 呈浓度依赖性地抑制 CD4⁺T 细胞活化时 IFN- γ 、TNF- α 和颗粒酶 B mRNA 的表达⁽²³⁾。本实验的研究结果也证明了 ShK(L5)可有效降低 AS 大鼠外周血炎症因子水平,考虑脾脏及外周血中同样存在免疫细胞高表达 Kv1.3 通道情况,而 ShK(L5)同样可有效阻断这些免疫细胞的活化和分泌功能。

4 参考文献

- Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease (J). *N Engl J Med*, 1999; 340(2): 115-26.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages (J). *Nat Immunol* 2005; 6(11): 1123-32.
- Laurence A, O'Shea JJ. T(H)17 differentiation: of mice and men (J). *Nat Immunol* 2007; 8(9): 903-5.
- Cheng X, Yu X, Ding YJ, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome (J). *Clin Immunol* 2008; 127(1): 89-97.
- Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, et al. Innate and acquired immunity in atherosclerosis (J). *Nat Med* 2002; 8(11): 1218-26.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease (J). *N Engl J Med* 2005; 352(16): 1685-95.

- 7 Jensen BS ,Odum N ,Jorgensen NK *et al.* Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca²⁺-activated K⁺ channels (J). *Proc Natl Acad Sci U S A* ,1999; 96(19) : 10917-21.
- 8 Ghanshani S ,Wulff H ,Miller MJ *et al.* Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences (J). *J Biol Chem* 2000; 275(47) : 37137-49.
- 9 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) : 4563-70.
- 10 Lewis RS ,Cahalan MD. Subset-specific expression of potassium channels in developing murine T lymphocytes (J). *Science* ,1988; 239(4841 Pt 1) : 771-5.
- 11 Lewis RS ,Cahalan MD. Potassium and calcium channels in lymphocytes (J). *Ann Rev Immunol* ,1995; 13: 623-53.
- 12 Leonard RJ ,Garcia ML ,Slaughter RS *et al.* Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin (J). *Proc Natl Acad Sci U S A* ,1992; 89(21) : 10094-8.
- 13 Schmitz A ,Sankaranarayanan A ,Azam P *et al.* Design of PAP-1 ,a selective small molecule Kv1. 3 blocker ,for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases (J). *Mol Pharmacol* ,2005; 68(5) : 1254-70.
- 14 Beeton C ,Wulff H ,Standifer NE *et al.* Kv1. 3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases (J). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(46) : 17414-9.
- 15 Liuzzo G ,Biasucci LM ,Trotta G *et al.* Unusual CD4⁺CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events (J). *J Am Coll Cardiol* , 2007; 50(15) : 1450-8.
- 16 Beeton C ,Barbaria J ,Giraud P *et al.* Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation (J). *J Immunol* 2001; 166(2) : 936-44.
- 17 Beeton C ,Wulff H ,Barbaria J *et al.* Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis a model for multiple sclerosis (J). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(24) : 13942-7.
- 18 郭丽芬 ,张存泰 ,吴杰等. 急性冠状动脉综合征患者淋巴细胞电压依赖性钾通道的变化 (J). *中华心血管病杂志* ,2007; 35(9) : 818-21.
- 19 冯达应 ,张存泰 ,马业新等. 急性冠状动脉综合征患者外周血 CD4⁺及 CD4⁺CD28 null T 细胞活化后 IKCa1 通道的表达及意义 (J). *临床心血管病杂志* ,2009; 37(9) : 599-604.
- 20 Geerling RA ,de Bruin RW ,Scheringa M *et al.* Ketanserin reduces graft arteriosclerosis after allogeneic aorta transplantation in rats (J). *J Cardiovasc Pharmacol* ,1996; 27(3) : 307-11.
- 21 Pandiyan P ,Zheng L ,Ishihara S *et al.* CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells (J). *Nat Immunol* 2007; 8(12) : 1353-62.
- 22 Collison LW ,Workman CJ ,Kuo TT *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function (J). *Nature* 2007; 450(7169) : 566-9.
- 23 Ait-Oufella H ,Taleb S ,Mallat Z *et al.* Cytokine network and T cell immunity in atherosclerosis (J). *Semin Immunopathol* ,2009; 31 (1) : 23-33.

(2015-04-06 修回)

(编辑 曹梦园)

香连片预防小鼠溃疡性结肠炎癌变的作用及机制

董跃滨 尚精娟 (上海市第七人民医院消化科,上海 200137)

(摘要) 目的 探讨香连片在小鼠溃疡性结肠炎(UC)癌变预防中的作用机制。方法 将60只小鼠随机分为空白组、模型组、香连片组和柳氮磺胺嘧啶组,每组15只,采用1,2-二甲基胍(DMH)/葡糖聚糖硫酸钠(DSS)复合法诱导小鼠UC癌变模型。采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测DKK-1和WTF-1 mRNA的表达,采用免疫组化法检测β-链蛋白(β-catenin)和增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白的表达。结果 与空白组比较,其余各组β-catenin及PANA蛋白表达均升高($P<0.05$);与模型组比较,香连组和对照组β-catenin和PANA蛋白表达均降低($P<0.05$);香连组和对照组β-catenin和PANA蛋白表达无统计学意义($P>0.05$)。与空白组比较,模型组DKK-1 mRNA表达降低,香连组和对照组表达升高,其他各组WTF-1 mRNA均表达升高($P<0.05$);与模型组比较,香连组和对照组DKK-1和WTF-1 mRNA表达均升高($P<0.05$);香连组和对照组DKK-1和WTF-1 mRNA表达无统计学意义($P>0.05$)。结论 香连片可以通过抑制β-catenin和PANA蛋白表达、提高DKK-1和WTF-1 mRNA表达阻断Wnt通路,发挥预防UC癌变的作用。

(关键词) 溃疡性结肠炎;癌变;香连片

(中图分类号) R574.63 **(文献标识码)** A **(文章编号)** 1005-9202(2017)02-0297-03;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.02.016

研究表明,香连片具有抗菌、抗胃肠炎、抗溃疡性结肠炎(UC)等药理作用^[1]。据报道,约5%的UC患者在疾病进展过程中发生癌变,其癌变机制尚不明确,但研究发现与患者病程、

严重程度和复发率密切相关^[2]。Wnt信号通路在结直肠癌的发病过程中发挥重要作用。β-链蛋白(β-catenin)在Wnt通路中发挥正向调节效应,核内β-catenin水平的升高能够激活下游效应基本的转录过程,是Wnt信号通路的激活标识,参与结直肠癌的进展^[3]。β-catenin已经作为结肠癌进展的常见标志物。DKK-1是一种外泌型的糖蛋白,在Wnt信号通路中发挥拮抗作用,能够特异性的抑制Wnt信号通路^[4]。本研究拟构建UC癌

第一作者:董跃滨(1962-),女,硕士,主任医师,主要从事溃疡性结肠炎发病机制的研究。