

# 大鼠动脉粥样硬化斑块中 T 淋巴细胞亚群及 Kv1.3 通道蛋白的表达\*

巩燕 刘磊 王焱 肖国胜 李源 常贺 习丹

**[摘要]** 目的 探究 Kv1.3 通道蛋白与动脉粥样硬化(AS)模型中活化的 T 淋巴细胞间的关系。方法 Wistar 雄性大鼠 24 只,随机分为对照组( $n=10$ )和 AS 组( $n=14$ ),采用高脂饲料喂养方法建立 AS 模型。分别于实验开始前、实验第 8 周、实验第 12 周观察各组大鼠体重变化。于第 12 周处死大鼠前取血,检测血清中总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-L)、高密度脂蛋白(HDL-L)和甘油三酯(TG)的水平。通过病理 HE 染色及免疫组织化学方法观察 AS 斑块内 T 淋巴细胞亚群分布和 Kv1.3 通道蛋白表达的改变。结果 AS 组体重、TC、LDL-C 较对照组明显升高( $P$ 均 $<0.05$ );HDL-C 和 TG 两组无差异。AS 组主动脉管壁可见明显斑块形成,对照组血管壁各层的组织结构正常。AS 组动脉斑块部位内膜下及中膜层可见 CD4<sup>+</sup>与 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞聚集,以 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞聚集为主。在病变部位 Kv1.3 通道蛋白表达增加。对照组血管内膜、中膜中未见 T 淋巴细胞聚集及 Kv1.3 通道蛋白的表达。结论 Kv1.3 通道可能在调节 AS 斑块部 T 淋巴细胞亚群的激活中起着重要作用。

**[关键词]** 心血管病学;动脉粥样硬化;T 淋巴细胞亚群;Kv1.3 通道

DOI: CNKI: 42-1421/R.20110812.0938.012

网络出版时间: 2011-8-12 09:38

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/42.1421.R.20110812.0938.012.html>

中图分类号 R543.5 文献标识码 A 文章编号 1007-2659(2011)04-0339-04

**The voltage-gated potassium Kv1.3 channel expression changes in the subsets T lymphocyte in atherosclerotic plaque of Wistar rats.** GONG Yan, LIU Lei, WANG Yan, XIAO Guo-sheng, LI Yuan, CHANG He, XI Dan. Center for Heart, Zhongshan Hospital, Xiamen Medical Collage, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the relationship between Kv1.3 ion channel protein and activated T lymphocyte in atherosclerotic(AS) plaque. **Methods** Twenty-four male Wistar rats were randomly assigned to control group( $n=10$ ) and AS model group( $n=14$ ). AS model rats were established after being fed with high-cholesterol diet and vitamin D3 for 12 weeks, and the rats were weighted at the beginning of the experiment as well as the 8th and 12th weeks. Before killed at the 12th weeks, the rats' blood was taken for triglyceride(TG), total cholesterol(TC), low and high density lipoprotein level(LDL-L, HDL-L) testing. Then rats were scarified, their aorta were isolated and dyed with hematoxylin-eosin for immunohistochemical analysis. By using Image-Pro<sup>®</sup> Plus system, the mean Integrated option density(IOD) of the area of interesting(AOI) in aorta were quantified. **Results** ①The weight of AS group was significantly higher than that of the control group; ②The concentration of TC, LDL-L in AS group was significantly higher than that in control group( $P<0.05$ ), while the HDL-L was higher( $P>0.05$ ), the TG was lower( $P>0.05$ ); ③The aortic intima was found thicker in the AS group, proliferation was found in medial smooth muscle cell and was less orderly arranged, dot-flake calcification was observed in some specimen in AS group, while the morphology of aorta was relatively normal and cells were relatively orderly arranged in control group, Inflammatory cell infiltration and smooth muscle cell proliferating were not found in control group. In AS group, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T lymphocyte tended to aggregate in subintima and media of aorta. In the same area of AS plaque, CD4<sup>+</sup>T lymphocyte were found much more, and Kv1.3 ion channel expression was quite positive in the same area, which was brown, and showed dot-flake distribution. T lymphocyte and Kv1.3 ion channel protein expression were negative in the aorta of control group. **Conclusions** Kv1.3 channel might play a role in the activation of T lymphocyte in atheromatous plaque, which possibly accelerates the development of atherosclerosis in rat. [*Chinese Journal of Cardiac Pacing and Electrophysiology* 2011 25(4):339-342]

\* 国家自然科学基金资助课题(项目编号:30871045/H0215)

作者单位:厦门大学医学院 厦门大学附属中山医院 厦门心脏中心 (福建厦门 361004)

作者简介:巩燕(1969-),女(满族),北京人,副主任医师,副教授,医学博士,研究方向心电生理。

cyte in atheromatous plaque, which possibly accelerates the development of atherosclerosis in rat. [*Chinese Journal of Cardiac Pacing and Electrophysiology* 2011 25(4):339-342]

**[Key words]** Cardiology; Atherosclerosis; T lymphocyte; Kv1.3 potassium channel

动脉粥样硬化( atherosclerosis , AS) 是以免疫活动为特征的慢性炎症性疾病,阐明其发生机制和寻求更为有效的治疗措施仍是巨大的挑战。近年的实验研究表明, T 淋巴细胞的募集和活化,单核/巨噬细胞和炎症因子在局部血管壁的浸润是 AS 发生的始动环节<sup>[1,2]</sup>,并贯穿于其进展的各阶段。T 淋巴细胞表面的电压门控的离子通道 Kv1.3 通道在该类细胞的激活、增殖、分化和细胞因子分泌中发挥了重要作用,且 Kv1.3 通道相对限制性的分布于中枢神经系统与免疫系统,已经报道其可以作为免疫调节的靶点<sup>[3]</sup>,其表达和功能的变化可能成为该类细胞免疫效应改变的主要机制,也可称为不同状态的 T 淋巴细胞对药物敏感性差异的原因。笔者研究大鼠 AS 局部病理斑块 T 淋巴细胞亚群的情况,并检测在 T 淋巴细胞密集部位 Kv1.3 通道蛋白表达情况。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组 Wistar 雄性大鼠 24 只,体重 220 ~ 250 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,随机分为对照组 10 只和 AS 组 14 只。对照组给予正常基础饲料,实验开始喂养时对照组每只大鼠给予与 AS 组维生素 D3 等剂量生理盐水注射。普通饮用水喂养 12 周。AS 组给予高脂高胆固醇饮食及普通饮用水喂养 12 周。实验开始喂养时每只大鼠给予 360 万 IU/Kg 维生素 D3 腹腔内注射。促进 AS 饲料是在正常饲料基础上加入 3% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、10% 猪油、5% 蛋黄粉、5% 白糖、10% 全脂奶粉、0.2% 丙基硫咪啶、66.3% 基础饲料,每天称重并观察老鼠饮食体重变化。建模用高脂饲料由江苏省苏州双狮实验动物饲料科技有限公司提供,维生素 D3 由上海通用药业股份有限公司提供。于喂养第 8,12 周测大鼠体重。

1.2 病理切片制作及 HE 染色 喂养至第 12 周处死大鼠,取主动脉。取材前所有大鼠均禁食 24 h,给予戊巴比妥钠 30 mg/kg 行腹腔麻醉,沿主动脉起始处直至主动脉分叉处剥离全长主动脉,打开胸腔,充分暴露大鼠心脏,从心室处行插管,用红色生化管采集动脉血液用于血脂检测。并保持主动脉血管环的完整,将动脉外膜处理后于主动脉起始处,主动脉弓,胸主动脉,腹主动脉剪切 0.5 cm 血管环,4% 多聚甲醛固定,其余主动脉置于 -80℃ 冰箱保存。固定的血管环石蜡包埋,以 5μm 行连续切片涂于载玻片上,60℃ 烘箱中烘干过夜,行全自动病理 HE 染色。

1.3 血脂检测 各组大鼠处死取材前,自心脏心室处插管,用红色生化管采集动脉血 10 ml 用于血脂检测。应用全自动生化分析仪(XL20)检测血清中总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-L)、高密度脂蛋白(HDL-L)和甘油三酯(TG)的水平。TC、LDL-L、HDL-L 和 TG 试剂盒购于北京北化康临床试剂有限公司。在厦门大学附属中山医院检验科完成。

1.4 免疫组织化学染色 将 5 μm 连续切片的血管环标本

涂布于经多聚赖氨酸(1:10 稀释)处理的载玻片上,取连续的 6 片石蜡标本切片分别涂布于 3 片载玻片上。将涂好的玻片置于 60℃ 烘箱中烘干过夜,脱蜡水化,去除内源性过氧化物酶,正常血清封闭 30 min 后分别在不同的玻片上加入 CD4、CD8 及 Kv1.3 抗体,4℃ 冰箱孵育过夜。复温冲洗 1 抗,将 1:100 稀释的 2 抗加入到标本中孵育 30 min 后,加入辣根过氧化物酶反应 30 min 后,DAB 试剂盒显色;苏木精复染。免疫组织化学法 CD4、CD8 抗体由 Biolegend 公司提供,试验中以 1:100 比例稀释后使用。Kv1.3 抗体购自 Novus 公司的粉末状抗体,以 1:200 比例加入双蒸水配为储存液后 -4℃ 保存,免疫组化实验中储存液再以 1:100 比例加入双蒸水稀释后使用。鼠 ABC 检测试剂盒由美国 VECTOR 公司提供,2 抗稀释比例为 1:100。DAB 试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。免疫组化抗体稀释液由购自福州迈新生物技术有限公司。PBS 粉末购自福州迈新生物技术有限公司,并以 1:2 000 加入蒸馏水配置成溶液使用。

1.5 Image-Pro® Plus 图像分析 在 Image-Pro® Plus 图像分析系统上,每张切片随机取 5 个高倍视野,在相同的条件下进行分析,测定观察部位的灰度平均值和平均光灰度。选取图片上具有染料色调的区域(area of interesting, AOI),测量该区域的总的光密度(Integrated option density, IOD)。选择并测量有效统计区域的面积,计算选择区域内的光密度平均值/面积(density mean)。

1.6 统计学处理 计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间数据比较采用 t 检验,以 P < 0.05 为差异有显著性。所有数据用 SPSS15.0 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 两组大鼠体重变化的比较 各组大鼠的体重随饲养时间延长而逐渐增加,第 8 周和第 12 周 AS 组体重较对照组增加(P < 0.05)。见表 1。

表 1 两组体重变化情况比较( $\bar{x} \pm s$  g)

组别	n	实验前	第 8 周	第 12 周
对照组	10	234.2 ± 3.0	293.1 ± 14.3	352.3 ± 21.1
AS 组	14	233.6 ± 2.3	363.2 ± 21.7*	429.1 ± 20.3*

注:与正常对照组比较,\* P < 0.05

2.2 主动脉局部斑块形成情况比较 对照组血管壁内膜完整,内膜、中膜、外膜组织结构正常,无脂质沉积,无斑块形成;AS 组 HE 染色可见血管内斑块形成,动脉内膜增厚、少量炎性细胞浸润及平滑肌细胞增生,斑块内可见泡沫细胞、脂质沉积及片状钙盐沉积,内弹力板破坏,中膜平滑肌细胞明显增生,排列紊乱(图 1)。AS 模型建立成功。

2.3 两组血脂比较 AS 组 TC、LDL 高于对照组(P < 0.05),HDL 高于、TG 低于对照组,但未达统计学差异(P > 0.05)。见表 2。

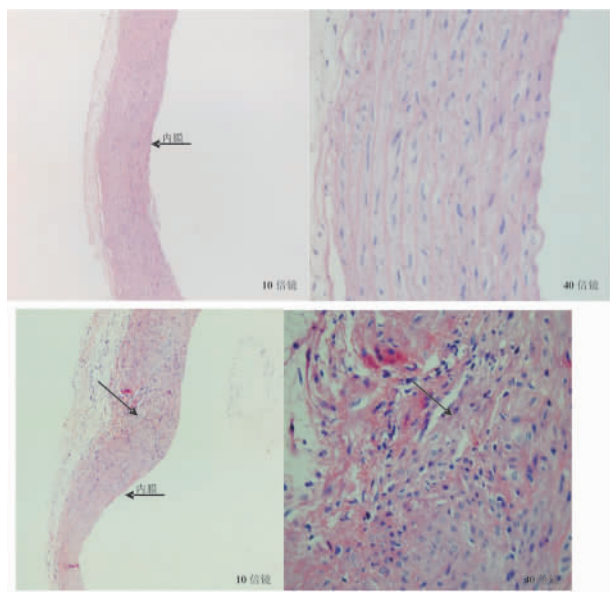


图 1 两组血管组织切片比较 上图为对照组 血管壁各层的组织结构无异常; 下图为 AS 组 血管壁内形成斑块。斑块位置见箭头所示

2.4 与病理切片同一部位的 T 淋巴细胞亚群分布情况比较 对照组血管内膜, 中膜中未见 T 淋巴细胞聚集及 Kv1.3 通道蛋白表达; AS 组大鼠在出现斑块病变的部位的动脉内膜下可见 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞聚集, CD4<sup>+</sup> T 淋巴显色较 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞明显 而在同一部位的 Kv1.3 免疫组化的染色情况示 Kv1.3 通道蛋白表达明显(图 2)。

2.5 CD4、CD8 及 Kv1.3 抗体的半定量分析 对照组三种抗体平均光密度均为零 符合在切片观察上, 三种抗体显色均为阴性的结果。AS 组三种抗体的平均光密度值分别为 CD4 抗体: 0.610 0 ± 0.053 56, CD8 抗体: 0.445 5 ± 0.037 27, kv1.3 抗体: 0.663 5 ± 0.049 84。因各组间不具有比较意义, 故未行统计学意义比较。

免疫组化半定量分析在 AS 组的斑块的同一位置上 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞较 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞聚集得多, Kv1.3 通道蛋白在同病变处表达上调。

表 2 两组血脂比较(  $\bar{x} \pm s$  mmol/L)

组别	n	TG	TC	HDL-L	LDL-L
对照组	10	1.21 ± 0.28	2.55 ± 0.25	1.32 ± 0.11	1.79 ± 0.13
AS 组	14	0.64 ± 0.14	4.71 ± 0.55*	1.47 ± 0.13	3.72 ± 0.46*

注: 与对照组比较, \* P < 0.05

### 3 讨论

研究表明 T 淋巴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<sup>[4]</sup>, 其中 Kv1.3 通道是效应性 T 淋巴细胞持续活化的关键<sup>[5-6]</sup>, 激活状态下, Kv1.3 通道在记忆性效应 T 淋巴细胞(T<sub>EM</sub>) 上表达的数量显著上调( ~ 1500/细胞), 并在维持 T 淋巴细胞激活、基因表达和细胞增殖中发挥重要作用<sup>[7-9]</sup>。Kv1.3 通道通过介导和控制 K<sup>+</sup> 外流使细胞膜内呈负电位, 促进细胞外的钙离子进入胞内。胞内钙离子浓度变化可作为第二信使, 通过对细胞核 DNA 转录的调节影响细胞的功能, 调节细胞因子表达, 细胞黏附性, 细胞迁移等。因此, Kv1.3 通道的表达增加可以做为淋巴细胞活化的标志。近年证明 ACS 患者外周血淋巴细胞上 Kv1.3 通道蛋白的表达明显高于正常人, Kv 电流的幅度较正常人明显升高<sup>[10]</sup>, 这一研究虽然首次提示了 AS 和 Kv1.3 之间的直接相关性, 但对 AS 病程中病变局部的 T 细胞亚群情况, 以及病变局部 Kv1.3 通道的情况仍不明确, 而且目前国内外对于动脉粥样硬化 T 淋巴细胞的研究主要也局限在外周血, 这也是本实验研究的重点。

本实验采用高脂饲料喂养联合维生素 D3 腹腔注射的方法制造 AS 模型。两组大鼠的体重随饲养时间延长而逐渐增加, AS 组大鼠体重在实验 8 周后和 12 周后的体重明显增高( P < 0.05), 12 周后大鼠血脂变化情况示 AS 组大鼠血清 TC、LDL-L 与对照组比较明显升高( P < 0.05), 而 HDL-L 较对照组升高, TG 较对照组降低( 但统计学分析提示 P > 0.05)。主动脉的 HE 染色结果显示 AS 动物模型建立成功, 并且再次证明了体重增加和血脂代谢紊乱这两项 AS 的危险因素。

免疫组化结果显示, AS 组的病变处组织内, CD4<sup>+</sup> 与 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的聚集, CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞聚集相对明显, 而有相关文献报道的在 AS 的发生及发展中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞 [T helper (Th) 1, Th2, regulatory T, Th17 cells] 发挥着重要的作用, 本实验的结果则证实在 AS 病程中, 病变斑块的局部 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞仍有相当数量的聚集; 而斑块中的 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞在不同个体中聚集数量变化范围较大, 目前研究认为 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞在 AS 中的作用机制尚未完全明确, 更有待进一步的研究。同时, 免疫组化结果显示, 在 T 淋巴细胞聚集的部位, Kv1.3 通道蛋白的表达明显增加。对照组动脉壁内无 T 淋

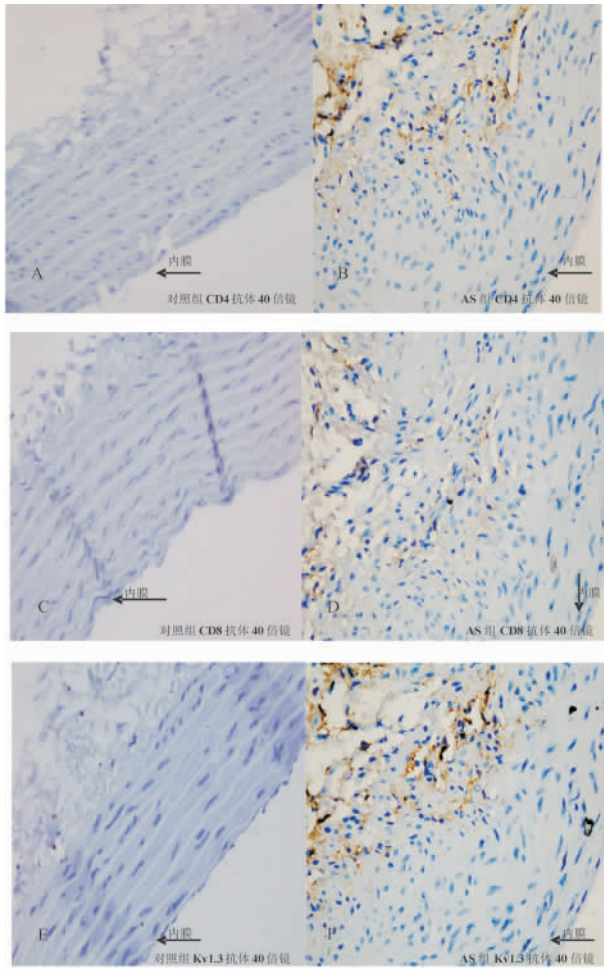


图2 两组 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞及 Kv1.3 蛋白表达情况比较(×40) A、B 分别示对照组及 AS 组 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞分布情况; C、D 分别示对照组及 AS 组 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞分布情况; E、F 分别示对照组及 AS 组 Kv1.3 蛋白分布情况。可见, 相比于对照组, AS 组 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞聚集, Kv1.3 蛋白表达量升高

巴细胞及其它炎性细胞的浸润,也无 Kv1.3 通道蛋白的表达,随后进行的免疫组化半定量分析与切片下观察的结果相一致。

通过上述实验,笔者发现在 AS 的发生和发展过程中,病变局部的 T 淋巴细胞明显聚集,同时斑块局部的 Kv1.3 通道蛋白表达上调。提示在 AS 的病程中,斑块局部 T 淋巴细胞表面的 Kv1.3 通道在细胞的活化中可能依然发挥着重要的作用, Kv1.3 通道表达上调及其此后引起的 T 淋巴细胞的活化可能会加速 AS 的发生与发展。

参考文献

- 1 Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword[J]. Nat Rev Immunol 2006 6(7):508
- 2 Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature 2002 420(6917):868
- 3 Lewis RS, Cahalan MD. Potassium and calcium channels in lymphocytes[J]. Ann Rev Immunol 1995 13:623
- 4 Sherer Y, Shoenfeld Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases[J]. Nat Clin Pract Rheumatol 2006 2:99
- 5 Roman MJ, Salmon JE. Cardiovascular manifestations of rheumatologic diseases[J]. Circulation 2007 116(20):2346
- 6 Panyi G, Varga Z, Gaspar R. Ion channels and lymphocyte activation[J]. Immunol Lett 2004 92(1-2):55
- 7 Hu L, Pennington M, Jiang Q, et al. Characterization of the functional properties of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 in human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes[J]. J Immunol 2007 179(7):4563
- 8 Wulff H, Calabresi PA, Allie R, et al. The voltage-gated Kv1.3 K<sup>+</sup> channel in effector memory T cells as new target for MS[J]. J Clin Invest 2003 111(11):1703
- 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<sup>+</sup> T lymphocytes[J]. J Immunol 2007 179(7):4563
- 10 郭丽芬, 张存泰, 吴杰, 等. 急性冠脉综合征患者 T 淋巴细胞电压依赖性钾离子通道上调[J]. 中华心血管病杂志 2007 35(9):818

(2010-10-19 收稿)

(李 晓 清 编 辑)