



# 动脉粥样硬化中钾通道 Kv1.3 阻断剂对巨噬细胞极化的影响

李升旗 (邵阳市第二人民医院电生理室 湖南邵阳 422001)

**摘要:** **目的** 探究动脉粥样硬化中钾通道 Kv1.3 阻断剂对巨噬细胞极化的影响效果。**方法** 对 THP-1 单核细胞进行培养,应用 100 μg/L 佛波酯诱导其分化为巨噬细胞,洗涤后接种在 6 孔板中分为甲组与乙组,甲组中加入 10ng/L 的 LPS 与 20 μg/L 的 IFN-γ 进行 24h 诱导分化,乙组应用 300nmol/L 的 E314 抗体,在 37℃ 的环境中孵育 2h 后,后续操作与乙组相同,对甲、乙两组患者的细胞形态学变化进行观察、细胞上清液中 IL-10、IL-12 表达水平进行检查,同时对巨噬细胞分型进行鉴定。**结果** 经过流式细胞术鉴定检查结果显示,甲组与乙组细胞分型分别为 M1 型与 M2 型,经 ELLISA 检查结果显示,甲组的 IL-12 表达水平高于乙组,IL-10 表达水平低于乙组,组间比较差异存在统计学意义, P<0.05。**结论** 在体外诱导巨噬细胞分化过程中加入钾通道 Kv1.3 阻断剂后,可朝着 M2 型抗炎方向发展,同时对巨噬细胞上存在的 Kv1.3 通道阻断后,也可使分化的巨噬细胞朝着具有抗炎作用的 M2 型方向发展。

**关键词:** 动脉粥样硬化 钾通道 Kv1.3 阻断剂 巨噬细胞极化

**中图分类号:** R543.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2017) 16-077-02

动脉粥样硬化不同阶段中巨噬细胞所发挥的作用也有所差异,同时根据巨噬细胞表面所标记差异也可分为,经典激活的 M1 型巨噬细胞,在脂质核心区具有较多,对炎症反应具有促进作用<sup>[1]</sup>;代替激活的 M2 型巨噬细胞,在易损斑块周围与肩部存在较多,对炎症反应具有抑制作用。根据研究表明<sup>[2]</sup>,巨噬细胞膜主要存在于电压依赖性钾通道,动脉粥样硬化的发展在 Kv1.3 钾通道中占有主导地位。因此,本次研究对钾通道 Kv1.3 中对巨噬细胞分化方向的调控,对动脉粥样硬化疾病预防与控制的临床应用价值,现将研究结果汇报如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 实验材料

本次研究选取的实验材料包括 THP-1 单核细胞、RP-MI1640 培养基、胎牛血清、脂多糖、佛波酯、多聚甲醛;抗体包括兔抗人 hKv1.3E314 抗体、鼠抗人 CD206-PE 抗体、鼠抗人 iNOS 抗体、驴抗鼠 alexafluo647-APC 二抗(青、链霉素)以及 ELLISA 试剂盒等材料。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养方法

在含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 RP-MI1640 培养基中接种 THP-1 单核细胞中,在浓度大于  $1 \times 10^5$  /ml 的单核细胞浓度中保持,并将其置于温度为 37℃、CO<sub>2</sub> 浓度在 5%,以及饱和湿度的培养箱中进行培养,半量换液的间隔时间为 2d。

#### 1.2.2 巨噬细胞诱导分化

经 10d 培养后,将生长旺盛的 THP-1 单核细胞进行收集,并换至于 RP-MI1640 无血清培养基中,并加入 100 μg/L 的 PMA,将培养基放置于温度为 37℃、CO<sub>2</sub> 浓度在 5%,以及饱和湿度的培养箱内进行诱导,诱导时间为 72h,将诱导后的细胞分为两组甲组与乙组,甲组中加入 10ng/L 的 LPS 与 20 μg/L 的 IFN-γ 进行 24h 诱导分化,乙组应用 300nmol/L 的 E314 抗体,在 37℃ 的环境中孵育 2h 后,然后加入 10ng/L 的 LPS 与 20 μg/L 的 IFN-γ 进行 24h 诱导分化,乙组应用 300nmol/L 的 E314 抗体,在 37℃ 的环境中孵育 2h 诱导其使分化。

#### 1.3 检测指标

应用倒置相差显微镜对甲乙两组的细胞形态学变化进行观察,应用流式细胞术对巨噬细胞的分型进行鉴别,同时应用 ELLISA 检测法对细胞上清液中 IL-10 与 IL-12 的表达水平进行检验。

#### 1.4 统计学分析

计数资料以 (n, %) 描述,行卡方检验,计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述,行 t 检验,以 SPSS19.0 软件对组间数据进行统计分析,若 P<0.05,则组间数据比较差异存在统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 THP-1 单核细胞与巨噬细胞培养结果

镜下观察 THP-1 单核细胞时可见,生长状态良好,呈现为悬浮生长,聚集成团;镜下观察巨噬细胞可见,细胞体积增大,生长状态良好,贴壁生长、胎体形状包括卵圆形、多角形、不规则形等,也可见伪足。

### 2.2 流式细胞术检测结果

应用流式细胞术检查结果显示,甲组巨噬细胞为 iNOS 抗体强阳性,表现为 M1 型,乙组细胞为 CD206 抗体强阳性,为 M2 型。

### 2.3 ELLISA 检测结果

取甲、乙两组巨噬细胞,根据 ELLISA 试剂盒说明书中所标注的检测步骤,严格对细胞上清液中 IL-10 与 IL-12 表达水平进行检测,检测结果显示,甲组的 IL-12 表达水平高于乙组,IL-10 表达水平低于乙组,组间比较差异存在统计学意义, P<0.05。见表 1 所示。

表 1 甲、乙两组 IL-10 与 IL-12 表达水平对比 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	IL-10	IL-12
甲组	10.78 ± 1.51	40.36 ± 3.87
乙组	34.24 ± 3.25	6.58 ± 1.36
t	34.6402	43.5754
P	<0.05	<0.05

## 3 讨论

动脉粥样硬化早期动脉内膜受损,单核巨噬细胞易诱导迁移至动脉内膜下,并出现浸润现象,转变吞噬氧化低密度脂蛋白形成泡沫细胞<sup>[3]</sup>。在动脉粥样硬化发展过程中慢性炎症反应也参与其中,可使稳定性斑块转变为不稳定性斑块,导致斑块内部损伤,大量单核巨噬细胞聚集,也是主要的斑块局部炎性细胞<sup>[4]</sup>。在动脉粥样硬化的发生发展过程中巨噬细胞活化也发挥着重要作用,对于炎症进程的发展过程中 M1 型巨噬细胞发挥着促进作用,而 M2 型巨噬细胞对炎症进程具有延缓作用。根据研究表明<sup>[5]</sup>,在急性冠状动脉综合征中单核巨噬细胞的活化过程中电压依赖性钾通道,特别是钾通道 Kv1.3 发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。

本次实验过程中通过对炎症因子对巨噬细胞体外诱导分化的模拟,对易损斑块形成过程中巨噬细胞的分化作用进行模拟,同时应用钾通道 Kv1.3 阻断剂的应用,对巨噬细胞的分化方向加以干预。本次研究中通过 ELLISA 试验结果显示,甲组细胞促炎性因子的分泌增加,流式结果提示, iNOS 百分比高,对 M1 型巨噬细胞所具有的优势进一步加以验证,研究

(下转第 79 页)



好的远视力<sup>[1-5]</sup>。而我们的这些病例中,非矫正远视力为0.6以上,最佳矫正视力达0.8以上,人工晶体的旋转均在5°以内,残余散光与预计残余散光无明显差异,这些结果与国内学者报道相似,均达到预期目的。但因例数过少,观察时间短,还需日后增加例数并延长随访时间。额外提到,在我们的病例中,有一例患者行双眼AcrySof Toric人工晶体植入,但术后最佳矫正视力右眼0.05,左眼0.4。散瞳检查晶体轴位及眼底,晶体轴位偏转度数双眼均小于2°,双眼底可见黄斑变性并黄斑前膜(右眼重于左眼),术后验光结果显示残余散光与预计残余散光无明显差异,故眼底病变应该是影响术后视力的主要原因。另外,本研究例4患者的术前散光为2.13D,术后残余散光为1.75D,但人工晶体的旋转度数为3°,故术后残余散光应该不是由晶体的旋转所引起。而术后验光非矫正远视力与最佳矫正远视力相差0.1,且按照我们的目的保留有0.75D的近视度数,患者本人也无视物模糊、变形等不适,故我们怀疑此次验光结果的准确性。当然需要进一步确认需再次验光。

AcrySof Toric人工晶体根据不同的型号可以矫正不同范围的角膜规则性散光。目前T3型号的Toric人工晶体的使用还远低于T4、T5的使用。其原因可能为T3型号的Toric IOL矫正的是范围在0.75-1.5之间的角膜散光。而现在手术方法的设计,可以通过在陡峭子午线上做切口也可一定程度的降低角膜散光<sup>[6]</sup>,且低度数的近视散光对视物造成的影响因人而异,所以对角膜低度散光是否需要Toric矫正且获益情况分析有待进一步研究。

我们的初步观察结果表明:AcrySof Toric人工晶体可使术眼有良好的远视力,在囊袋内有较好的旋转稳定性,可以更舒适更长久的视物而不引起视物疲劳,提高了白内障患者术后的生活质量。但是,目前我们所观察的例数有限,随访

时间稍短,其疗效尚需大量的临床研究及长期随访确定。我们认为选择合适的病例,准确的术前轴位标记,人工晶体度数的准确计算及手术的完美是使AcrySof Toric达到最好效果的必要保证。

#### 参考文献

[1]Paul J. Carey, MSc, Antonio Leccisotti, MD, PhD, Victoria E. McGilligan, PhD, Ed A. Goodall, PhD, C.B. Tara Moore, PhD. Assessment of toric intraocular lens alignment by a refractive power/corneal analyzer system and slitlamp observation. J Cataract Refract Surg 2010; 36:222-229 Q 2010 ASCRS and ESCRS

[2]Ernest P. Evaluation of clinical outcomes with the toric IOL: 1-year results. Paper presented at: American Society of Cataract and Refractive Surgery Symposium & Congress; April 28 - May 2, 2007; San Diego, Calif.

[3]Edward Holland, MD, Stephen Lane, MD, Jeffrey D. Horn, MD, Paul Ernest, MD, Robert Arleo, MD, Kevin M. Miller, MD, The AcrySof Toric Intraocular Lens in Subjects with Cataracts and Corneal Astigmatism, 2010 by the American Academy of Ophthalmology Published by Elsevier Inc, ISSN 0161-6420/10/\$ - see front matter doi:10.1016/j.optha.2010.07.033

[4]Bauer NJ, de Vries NE, Webers CA, et al. Astigmatism management in cataract surgery with the AcrySof toric intraocular lens. J Cataract Refract Surg 2008;34:1483-8.

[5]Mendicutte J, Irigoyen C, Aramberri J, et al. Foldable toric intraocular lens for astigmatism correction in cataract patients. J Cataract Refract Surg 2008;34:601-7.

[6]Gegge HS. Arcuate relaxing incisions guided by corneal topography for postkeratoplasty astigmatism: vector and topographic analysis[J]. Cornea, 2006, 25(5):545-557.

(上接第76页)

组手术的鼻侧穹肉结膜大部分都被切除,导致杯状细胞匮乏,黏蛋白分泌也不充足,对泪腺导管造成损伤,结膜也无法保持湿润状态<sup>[4]</sup>。此外,丝裂霉素的细胞毒副作用导致角膜上皮细胞坏死,眼球表面也变得十分粗糙,从而影响到泪膜功能<sup>[5]</sup>。而翼状胬肉切除术联合角膜缘干细胞移植术(B组)能够提供健康的上皮,并利用干细胞的增殖分化和向心修复作用修复受损的角膜上皮,从而能够重建角膜缘。而且术后的移植片比较完整,愈合面也比较光滑,泪膜具有较高的稳定性,对杯状细胞的刺激较小<sup>[6]</sup>。

综上所述,翼状胬肉切除术合并角膜缘干细胞移植是最理想的翼状胬肉手术方式,而且手术操作简便,对泪膜的影响较小,干眼症的发生率也比较低。

(上接第77页)

结果表明,在体外环境下LPS对巨噬细胞的刺激作用对炎症发展方向具有一定的控制作用。乙组加入钾通道Kv1.3阻断剂后,ELLSIA试验结果显示,抗炎因子IL-10分泌增加,流式结果提示,CD206百分比明显升高,研究结果表明,通道阻断剂对于巨噬细胞朝着M2型巨噬细胞分化效果显著。

综上所述,通过体外诱导巨噬细胞分化过程中,炎症因子可使分化方向朝着M1型方向分析,具有炎症促进作用,加入Kv1.3通道阻断剂后,炎症细胞可使诱导分化方向转变为M2型抗炎方向。因此,通过对巨噬细胞Kv1.3通道的阻断,可促使巨噬细胞朝着M2型巨噬细胞方向发展,使其具备抗炎作用。

#### 参考文献

#### 参考文献

[1]李辰,岳辉,周清,等.3种不同翼状胬肉术后干眼症的临床观察[J].中国现代医学杂志,2016,26(15):131-135.

[2]黄海,杨秋艳,杨甜,等.翼状胬肉切除联合不同移植术式术后干眼症的临床观察[J].中国现代药物应用,2017,11(07):17-19.

[3]董洁玉,张海江,霍鸣,等.翼状胬肉不同术式术后干眼的观察[J].中国实用眼科杂志,2014,32(08):1015-1018.

[4]张东兴,马建辉.不同术式治疗小梁切除术后伴翼状胬肉的效果观察[J].中国综合临床,2015,31(01):106-107.

[5]陈潇,陈洪涛,赵明,等.三种不同手术方式对翼状胬肉治疗效果的观察[J].吉林医学,2014(21):4713-4714.

[6]王丹,汪锐,张启明,等.三种手术方式治疗翼状胬肉的临床观察[J].山东大学耳鼻喉眼学报,2016,30(02):94-97.

[1]谭艳美,孟磊,汪江波等.巨噬细胞极化与动脉粥样硬化[J].中国动脉硬化杂志,2016,24(2):207-212.

[2]祝甜甜,段菊,张刘强等.巨噬细胞极化在动脉粥样硬化中的作用和药物靶标[J].中国药理学通报,2014(6):748-751.

[3]刘雪琴.阻断Kv1.3对动脉粥样硬化中炎症因子诱导的巨噬细胞极化的影响[D].山东大学,2016.

[4]储莉,刘伏元,王烈成等.巨噬细胞极化及其在老年下肢动脉粥样硬化发生中的相关性[J].实用医学杂志,2015(6):944-946,947.

[5]储莉.巨噬细胞极化及其在兔动脉粥样硬化发生中的相关性研究[D].安徽医科大学,2015.

[6]周瑶瑶.巨噬细胞极化与动脉粥样硬化[J].心血管病学进展,2014,35(1):21-24.