

·运动人体科学·

力竭运动应激对小鼠 T 淋巴细胞钾离子通道 Kv1.3 的调节作用

傅涛¹, 王丽春², 郝选明¹

(1. 华南师范大学 体育科学学院, 广东 广州 510006; 2. 中国医学科学院
中国协和医科大学医学生物学研究所病毒免疫室, 云南 昆明 650118)

摘 要: 为了观察力竭运动应激后对小鼠外周血 T 淋巴细胞钾离子通道表达以及对细胞调节性容积减少(regulatory volume decrease, RVD)的影响, 探讨力竭运动应激导致的免疫抑制的可能机制。复制小鼠力竭模型后从外周血中分离出 T 淋巴细胞, 测定其淋巴细胞转化功能, 采用 RT-PCR、Western blot 分别从基因和蛋白质水平揭示力竭运动应激对小鼠外周血 T 细胞 Kv1.3 表达的调节作用, 采用细胞成像系统测定 T 淋巴细胞在低渗透压时细胞容积的变化。结果显示力竭运动应激小鼠 T 淋巴细胞功能受抑制($P < 0.05$), 小鼠外周血 T 淋巴细胞 Kv1.3 mRNA 和蛋白质表达水平明显下调($P < 0.05$), 力竭运动应激会影响 RVD 的调节能力。结果说明, 力竭运动应激导致小鼠外周血 T 淋巴细胞 Kv1.3 mRNA 和蛋白质表达水平明显下调, RVD 调节能力下降, 提示力竭运动应激条件下免疫功能的抑制可能与钾通道有关。

关键词: 运动生物化学; Kv1.3 免疫抑制; 力竭运动应激

中图分类号: G804.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7116(2010)05-0099-05

Functions of exhausting exercise stress in regulating the potassium ion channels (Kv1.3) of T lymphocytes of mice

FU Tao¹, WANG Li-chun², HAO Xuan-ming¹

(1. School of Physical Education, South China Normal University, Guangzhou 510006, China; 2. Peking Union Medical College, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 680118, China)

Abstract: In order to observe the effects of exhausting exercise stress on the expression of the potassium ion channels of T lymphocytes in the peripheral blood of mice and the regulatory volume decrease (RVD) of cells, and to probe into a possible mechanism of immunosuppression caused by exhausting exercise stress, the authors separated T lymphocytes from the peripheral blood after having duplicated the mouse exhausting model, measured its lymphocyte transformation functions, revealed the functions of exhausting exercise stress in regulating the expression of Kv1.3 of T lymphocytes in the peripheral blood of mice from the change of the levels of genes and proteins respectively by using RT-PCR and Western blot, measured the change of T lymphocyte volume under a hypotonic condition by using a cell imaging system, and revealed the following findings: exhausting exercise stress suppressed the functions of T lymphocytes of mice ($P < 0.05$); the Kv1.3 mRNA and protein expression level of T lymphocytes in the peripheral blood of mice were regulated down significantly ($P < 0.05$); exhausting exercise stress would affect the regulating ability of RVD. The said findings indicated that exhausting exercise stress caused the significant decrease of the KV1.3 mRNA and protein expression level of T lymphocytes in the peripheral blood of mice, and the weakening of the regulating ability of RVD, which suggested that the suppression of immune functions under an ex-

收稿日期: 2009-06-05

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2006BAK12B02)。

作者简介: 傅涛(1976-), 女, 博士, 在读博士后, 研究方向: 运动免疫学。通讯作者: 郝选明教授。

hausting exercise stress condition may be related to the potassium channels.

Key words: exercise biochemistry; Kv1.3 immunosuppression; exhausting exercise stress

运动与健康的关系历来是一个引人注目的研究领域,20 世纪六七十年代就有一些运动医学工作者报道运动员在经受大运动量训练后,或在比赛期间容易感染各种细菌和病毒性疾病,提示运动训练可能影响机体的免疫系统^[1-2]。Pedersen^[3]把这一免疫功能的抑制期定义为“open window”期。在这一特殊的“open window”期,各种致病因子尤其是病毒轻易地进入宿主体内,引起机体感染。这些结论是依据运动训练强度和运动量与临床症状之间的统计分析而获得的,缺乏客观的实验依据,涉及该方面研究的报道还相对较少。

T 细胞是机体免疫系统中主要的调节性和效应性细胞,它在体内正常水平的维持,是机体具有正常防御功能和完备免疫功能的基础。免疫细胞功能的执行,都是在其激活后产生的,而淋巴细胞的激活有赖于钾通道的功能^[4],因此,运动应激后各种因素对免疫功能的调节机制可以通过观察钾通道的变化来进行研究。

本研究利用 RT-PCR、Western blot 等分子生物学实验方法证实力竭运动应激小鼠外周血 T 淋巴细胞电压门控式 K⁺通道(Kv1.3) mRNA 和蛋白质表达水平明显下调,T 淋巴细胞对 ConA 引起的细胞转化功能明显受到抑制,同时力竭运动应激会影响 T 淋巴细胞 RVD 的调节能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1)实验动物:正常雌性 Balb/c 小鼠 18 只,体重 18~20 g,4~6 周龄,购自昆明医学院实验动物中心。

2)主要试剂:Taq DNA 聚合酶、AMV 逆转录酶、dNTP、核酸分子量标准-DL2000 购自大连宝生物公司;兔抗小鼠 Kv1.3 抗体、辣根过氧化物酶标 HRP-兔抗鼠 IgG 购自华美生物工程公司;引物由北京三博远志生物技术公司合成;淋巴细胞分离液购自北京鼎国生物技术公司;Fast RNA Micro Kit 购自上海华舜生物公司。刀豆蛋白 A(ConA)、1640 粉末、台盼蓝、MTT 购自 Sigma 公司;其余试剂市售分析纯级产品。96 孔板:Caster 公司;抗凝管:江西奥格兰医疗器械公司;尼龙毛呢:中国医学科学院、中国协和医科大学医学生物学研究所免疫室提供。

1.2 方法

实验动物分为 3 组:急性力竭组、2 周力竭组和安静对照组,每组 6 只。

1)力竭模型的复制。

急性力竭运动应激模型的复制:急性力竭组 Balb/c 小鼠 3 d 适应性训练,每次 15 min,水温 33 ℃,水深 35 cm,小鼠游动过程中用玻璃棒搅拌水造成波浪,以确保运动量。急性力竭运动后,次日处死,取外周血。

2 周力竭运动应激模型的复制:2 周力竭组 Balb/c 小鼠 3 d 适应性训练,每次 15 min,水温 32 ℃,水深 35 cm,小鼠游动过程中用玻璃棒搅拌水造成波浪,以确保运动量。以后连续 2 周每天游泳至力竭状态,最后一次力竭后次日处死,取外周血。

安静对照组不施以任何处理,饲养方式、条件相同的情况下,与急性力竭组、2 周力竭组的小鼠同时处死,取外周血。

2)外周血 T 淋巴细胞的分离。

用摘除眼球法分别采血收集于 2 mL 的抗凝管中,用淋巴细胞分离液分离出外周血单个核细胞,按照文献[5]的方法分离 T 淋巴细胞。

3)细胞总 RNA 的提取和 RT-PCR。

用 Fast RNA Micro Kit 分别从力竭运动应激组和对照组外周血 T 淋巴细胞中提取总 RNA,紫外分光光度计对其定量,1%非变性的琼脂糖电泳鉴定其完整性。将安静对照组和力竭运动应激组总 RNA 各取 5 μg 利用 Random 引物,经 AMV 逆转录酶于 42 ℃ 1 h,迅速在冰水中冷却 2 min,逆转录为 cDNA。取逆转录产物 5 μL,分别进行扩增,Kv1.3 和内参照 β-actin 进行 PCR 扩增所用引物序列分别为 Kv1.3(369 bp): sense: TggCTgAACgACAAggTAA; antisense: CTgCgATggCACAAAgAg; β-actin(643bp):sense: CCAAggCCAACgCgAg-AAgATgAC; antisense: AgggTACATggTggTgCCgCCAgAC。Kv1.3 PCR 反应条件:预变性 95 ℃ 3 min;循环变性 94 ℃ 45 s;复性 53 ℃ 1 min;延伸 72 ℃ 1 min,30 个循环后,于 72 ℃继续延伸 7 min。β-actin PCR 反应条件:预变性 95 ℃ 3 min;循环变性 94 ℃ 45 s;复性 62 ℃ 1 min;延伸 72 ℃ 1.5 min,23 个循环后,于 72 ℃继续延伸 7 min。反应结束后,取 5 μL 反应液进行 1%琼脂糖凝胶电泳,并扫描图像测定电泳产物灰度,Kv1.3 mRNA 表达水平与其 β-actin 灰度的比值表示。

4)膜蛋白的提取和 Western Blot。

按照参考文献[6]分别从实验组和对照组提取膜蛋白,提取后用 Lowry 法测蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳。

将细胞悬液室温 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清后溶于 1 mL 缓冲液 A[1 mmol/L KCl、5 mmol/L NaCl、3 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L HEPES、1 mmol/L DTT、20 mmol/L PMSF(pH=7.4)、0.5 μg/mL Leupeptin]中, 于室温液氮罐中反复冻融 3 次; 5 000 r/min 4 °C 离心, 驱除核及未裂解的细胞。取上清 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取沉淀溶于 1 mL 缓冲液 B[1 mmol/L KCl、5 mmol/L NaCl、3 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L HEPES、1 mmol/L DTT、0.5 μg/mL Leupeptin、20 mmol/L PMSF(pH=7.4)、1 mmol/L EDTA]中; 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取沉淀溶于缓冲液 C[0.5 mg/mL Leupeptin、50 mmol/L Tris-Cl(pH=7.0)、20 mmol/L PMSF]中提取后用 Lowry 法测蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳。参照[7]方法, SDS-PAGE 电泳后, 蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转至硝酸纤维素膜上, 以 2%BSA 封闭非特异性结合位点, 室温条件与兔抗小鼠 Kv1.3 抗体(1:1 500(体积比))结合 1 h, 经 TTBS 洗涤 3 次后, 加入 HRP-羊抗兔 IgG(1:1 000(体积比))室温结合 1 h, 充分洗膜, DAB 显色, 扫描。Kv1.3 蛋白的表达水平与其 β-actin 灰度的比值表示。

5)T 淋巴细胞转化实验。

用完全 RPMI1640 培养液调细胞浓度至 1.0×10^6 mL⁻¹, 在 96 孔培养板中培养细胞, 每孔为 100 μL 细胞悬液, 同时加入不同质量浓度的 ConA 20 μL, 使其终质量浓度分别为 0、1.0、2.0、4.0 μg/mL, 每种质量浓度均为 3 复孔。于 CO₂ 细胞培养箱中 (37 °C, 体积分数 95% 空气, 体积分数 5% CO₂) 培养 44 h; 每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT, 继续培养 4 h 后, 每孔加入 100 μL DMSO, 在 490 nm 波长处测定其 OD 值。

6)细胞调节性容积减少(RVD)。

将细胞悬液置于载玻片和盖玻片之间, 用多聚赖氨酸将细胞固定后, 将细胞放于等渗液中 2 min, 然后置于低渗液中(50%)30 min。以细胞置于低渗液中的时间为零点, 细胞处于等渗液中的时间段为-120~0 s。在显微镜下观察细胞的变化, 图像信号可通过 CCD 转换成数字信号传输到监视器中, 呈现在屏幕上。由软件对细胞的体积做实时监测。每 1 min 拍照 1 次, 并记录此后 30 min 内细胞体积的变化。以在等渗液中的体积为 1, 以不同时间点细胞的平均体积与等渗液中的体积的比值为纵坐标, 横坐标为时间点作图。

7)统计学处理。

数据以均数 ± 标准差表示, 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理, 方差分析(ANOVA)和回归系数比较作统计学处理, 两组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果及分析

2.1 小鼠外周血 T 淋巴细胞 Kv1.3 mRNA 表达水平

如前所述, 分别从对照组和实验组小鼠外周血中提取总 RNA, 各取经 5 μL 用 1% 琼脂糖非变性凝胶电泳鉴定, 可见分别处在 3 kb、1.5 kb 和 750 bp 左右的 3 条带, 28 S 和 18 S 条带清晰, 且 28S:18S>1, 该完整性可以满足后续实验要求。利用 RT-PCR 技术得到 369 bp 的 Kv1.3 目的基因片段和 643 bp 的 β-actin 片段。结果分析显示, 小鼠急性力竭应激后, Kv1.3 mRNA 水平比正常对照组下调, 小鼠 2 周力竭应激后, Kv1.3 mRNA 水平比正常对照组明显下调, 其表达量差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 运动应激对外周血 T 淋巴细胞钾通道 Kv1.3 蛋白表达的抑制作用

分别从安静对照组、急性力竭应激组和 2 周力竭应激组小鼠外周血 T 淋巴细胞提取膜蛋白, 按照参考文献的方法提取膜蛋白, 进行 Westernblot 实验。对 Westernblot 结果进行灰度值分析显示, 急性力竭应激组和 2 周力竭应激组比安静对照组在分子质量为 6×10^5 μ 的目的蛋白 Kv1.3 表达水平明显下调, 其中 2 周力竭应激组下调更为明显。说明运动应激对外周血 T 淋巴细胞钾通道 Kv1.3 蛋白表达的抑制作用。

2.3 运动应激对外周血 T 淋巴细胞增殖的抑制作用

MTT 实验显示, 无论对照组还是实验组小鼠的外周血 T 淋巴细胞在不同质量浓度的 ConA 刺激下, 随着 ConA 质量浓度的增加, OD 值均明显增加, 呈剂量效应关系。急性力竭应激组小鼠 T 细胞的增殖能力低于对照组($P < 0.05$, ANOVA, $n=6$ 只), 2 周力竭应激组小鼠, T 细胞的增殖能力明显低于对照组($P < 0.05$, ANOVA, $n=6$ 只), 说明运动应激使外周血 T 淋巴细胞的转化受到明显的抑制, 特别是较长期的力竭应激组(见图 1)。

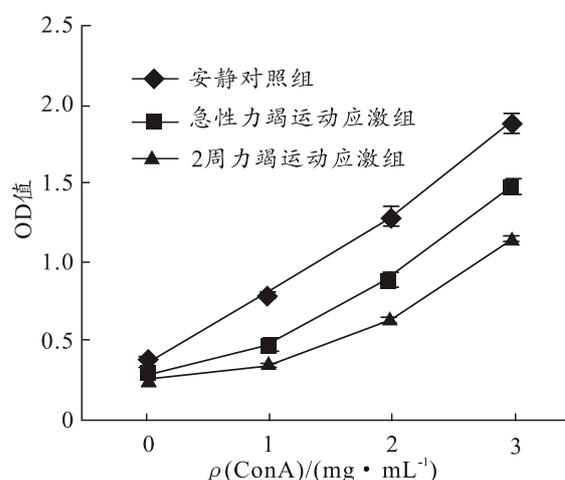


图 1 运动应激对外周血 T 淋巴细胞增殖的抑制

2.4 低渗液对小鼠外周血 T 淋巴细胞 RVD 的影响

安静对照组小鼠外周血 T 细胞在加入 50% 低渗液后, 体积迅速胀大, 在 3 min 内达到最大(1.276 ± 0.031), 此后逐渐回缩, 在 13 min 内降低到最低(1.035 ± 0.025), 最高点与最低点相比, 体积减小 24.1% ($P < 0.001$, $n = 54$, ANOVA)。RVD 率 = $(V_{max} - V_{min}) / (V_{max} - V_0) \times 100\%$, V_{max} 为细胞在低渗环境下的体积峰值; V_{min} 为细胞在低渗环境下所恢复的最小体积, V_0 为细胞在等渗环境中的体积。细胞 RVD 率为(87.32 ± 5.28)%, 细胞体积的减小与时间的回归方程为: $y = 1.296 - 0.0168x$, 相关系数 $r = -0.951$ ($P < 0.001$, $n = 54$, ANOVA), 说明安静对照组小鼠外周血 T 细胞在低渗液中体积会逐渐回缩(见图 2)。

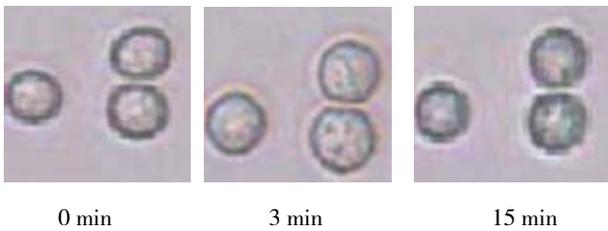


图 2 安静对照组外周血 T 细胞在低渗(50%)状态下不同时间点细胞体积的变化(400X)

急性力竭组小鼠外周血 T 细胞在加入 50% 低渗液后, 体积也迅速胀大, 在 3 min 内达到最大(1.230 ± 0.017), 此后逐渐回缩, 在 19 min 内降低到最低(1.057 ± 0.019), 最高点与最低点相比, 体积减小 17.3% ($P < 0.001$, $n = 38$, ANOVA)。细胞 RVD 率为(62.68 ± 3.72)%, 细胞体积的减小与时间的回归方程为: $y = 1.210 - 0.007x$, 相关系数 $r = -0.829$ ($P < 0.05$, $n = 38$, ANOVA), 说明急性力竭组小鼠外周血 T 细胞在低渗液中体积会逐渐回缩, 但调节能力比安静对照组小鼠差(见图 3)。



图 3 急性力竭组外周血 T 细胞在低渗(50%)状态下不同时间点细胞体积的变化(400X)

2 周力竭组小鼠外周血 T 细胞在加入 50% 低渗液后, 体积也迅速胀大, 在 3 min 内达到最大(1.264 ± 0.019), 此后逐渐缓慢回缩, 在 28 min 内降低到最低(1.143 ± 0.028), 最高点与最低点相比, 体积减小 12.1%

($P < 0.01$, $n = 42$, ANOVA)。细胞 RVD 率为(43.84 ± 4.51)%, 细胞体积的减小与时间的回归方程为: $y = 1.264 - 0.0033x$, 相关系数 $r = -0.72$ ($P < 0.01$, $n = 42$, ANOVA), 说明两周力竭组小鼠外周血 T 细胞在低渗液中体积会逐渐缓慢回缩, 但调节能力比安静对照组和急性力竭组小鼠差(见图 4)。

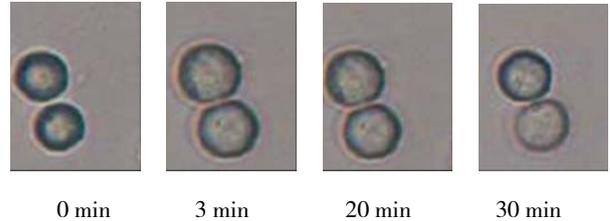


图 4 两周力竭组外周血 T 细胞在低渗(50%)状态下不同时间点细胞体积的变化(400X)

安静对照组、急性力竭组和 2 周力竭组小鼠外周血 T 细胞的体积变化(见图 5), 与安静对照组相比, 急性力竭组和 2 周力竭组小鼠外周血 T 细胞的 RVD 率有统计学差异($P < 0.05$, 见图 6)。

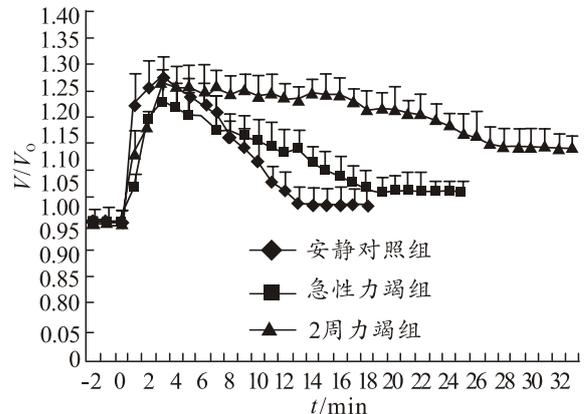


图 5 外周血 T 细胞在低渗状态下不同时间点细胞体积的变化

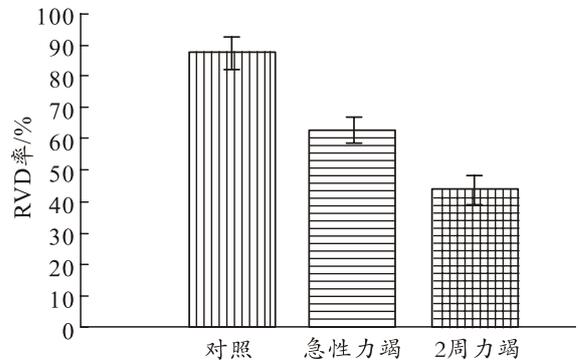


图 6 外周血 T 细胞在低渗状态下体积变化的 RVD 率

3 讨论

运动与免疫的关系非常复杂, 免疫系统对运动的

反应取决于运动类型、运动强度和运动的持续时间。短时间、高强度的运动可能暂时削弱免疫能力,持续强烈的训练加强这种抑制。

免疫细胞功能的执行,都是在其激活后产生的,而T淋巴细胞活化的启动和维持阶段需要钾通道的参与,钾离子通道是参与淋巴细胞功能调控的重要因素之一^[8]。那么在运动应激状态下,各种介导物质作用于T细胞,是否会通过影响细胞膜上的钾离子通道,从而影响T细胞免疫功能呢。因此我们设计了力竭运动的应激模型:急性力竭运动应激模型以及2周力竭运动应激模型,观察这两种力竭运动应激模型对机体免疫系统的影响途径,机制及其后果。

目前研究离子通道的手段主要有膜片钳、分子生物学、药理学以及调节性体积减小(regulatory volume decrease, RVD)。通过分子生物学的手段可以描述离子通道基因表达的高低,但不能直接反映离子通道的功能状态。RVD发生的机制主要与细胞内外的离子流动有关,可以间接反映离子通道的开放和关闭,而对于淋巴细胞来说,钾离子通道的开放和关闭直接反映了淋巴细胞的活化功能,因此可以将RVD^[9]作为判断钾通道功能的一个指标。正常细胞处于一定范围的低渗液中时,细胞体积增大,细胞依靠自身的调节机制可使其体积减小,此时细胞体积可以恢复至接近初始体积,这一对自身体积的调节过程称为RVD。

本实验采用RT-PCR和Western blot分子生物学实验技术研究力竭运动应激小鼠外周血T淋巴细胞Kv1.3表达的变化。结果证明,力竭运动应激促使小鼠外周血T淋巴细胞中Kv1.3的基因转录和蛋白表达均有明显下调。这从一个侧面提示运动应激有可能通过对离子通道的影响调节机体的免疫功能,说明钾通道参与了细胞的免疫抑制。

淋巴细胞转化实验证明小鼠急性力竭运动和2周力竭运动后,其脾淋巴细胞对ConA引起的细胞转化功能明显受到抑制,说明力竭运动应激后,T淋巴细胞对ConA的敏感性下降,功能受到抑制,两种力竭运动应激模型对免疫系统的影响均主要是通过降低T细胞体外活化的反应性来实现的。

当细胞处于低渗条件时,由于水分进入细胞,细胞体积胀大,启动了细胞内一系列调节机制,最终产生RVD作用。不同类型细胞的RVD机理并不完全相同。目前已知,淋巴细胞RVD主要K⁺通道开放,K⁺外流,带动水分外流所造成。测定淋巴细胞在低渗条

件下的RVD,已经作为一种观察钾离子通道功能的指标^[10]。有许多研究表明,多种淋巴细胞n型Kv的密度与其容积调节能力相关,阻断n型Kv后RVD也受到抑制。另外,通过转染Kv1.3,使原本缺乏Kv和RVD能力的CTLL22细胞系表达n型Kv后,可产生容积调节能力。许多细胞的RVD都是通过这种Ca²⁺非依赖机制实现的。本实验研究证明,在低渗环境中,力竭运动应激组小鼠细胞的RVD调节能力明显下降,特别是2周力竭运动应激组,以上结果从另一个侧面提示力竭运动应激会影响钾离子通道的功能。

参考文献:

- [1] Staats R, Balkow S, Sorichter S, et al. Change in per for in-positive peripheral blood lymphocyte (PBL) subpopulations following exercise[J]. Clin Exp Immunol, 2000, 120(3): 434-439.
- [2] Pedersen B K, Rohde T, Zacho M. Immunity in athletes[J]. J Sports Med Phys Fitness, 1996, 36(4): 236-245.
- [3] Shepherd R J, Shek P N. Effect of exercise and training on natural killer cell counts and cytolytic activity: meta-analysis[J]. Sports Med, 1999, 28(3): 177-195.
- [4] Beeton C, Wulff H, Singh S, et al. A novel fluorescent toxin to detect and investigate Kv1.3 channel up-regulation in chronically activated T lymphocytes[J]. J Biol Chem, 2003, 278(11): 9928-9937.
- [5] 季敬璋,吕建新. 免疫磁珠及尼龙毛分离纯化T淋巴细胞的比较研究[J]. 温州医学院学报, 2005, 35(1): 4-7.
- [6] <http://www.bioon.com> 膜蛋白的分离.
- [7] 萨姆布鲁克, E.F.弗里奇, T.曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2001: 1-773.
- [8] Richard S L, Michael D C. Potassium and calcium channels in lymphocytes[J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 623-653.
- [9] Florian L, Gillian L B, Markus R, et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms[J]. Physiological Reviews, 1998, 78: 247-306.
- [10] Cahalan M D, Wulff H, Chandy K G. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system[J]. J Clin Immunol, 2001, 21: 235-252.