

$\alpha 7$ 尼古丁受体介导 100 Hz 电针调节自然杀伤细胞活性的实验研究*胡志苹, 黄志华, 黄 诚[△]

(赣南医学院基础医学院, 江西赣州 341000)

摘要:目的 在已有的实验基础上,进一步寻求 $\alpha 7$ 尼古丁受体($\alpha 7$ nAChR)介导 100 Hz 电针(EA)调节自然杀伤细胞(NK)细胞活性的新证据。**方法** 应用 $\alpha 7$ nAChR 抗体和特异性的 $\alpha 7$ nAChR 拮抗剂 α -银环蛇毒(α -Bgt),探讨 $\alpha 7$ nAChR 在 EA 对 NK 细胞活性中的作用。**结果** 与 100 Hz EA 组相比,100 Hz EA + $\alpha 7$ nAChR 抗体组脾脏 NK 细胞活性明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 100 Hz EA 组相比,1.5 和 3.0 μg α -Bgt + 100 Hz EA 组均 NK 细胞活性明显增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** $\alpha 7$ nAChR 介导了 100 Hz EA 调节免疫功能的作用,这为进一步明确和扩展 EA 的临床应用提供理论和实践依据。

关键词:电针;自然杀伤细胞活性; $\alpha 7$ 尼古丁受体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.05.026

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)05-0582-02

New evidences of $\alpha 7$ nAChR participating in 100 Hz EA regulating NK cells activity*Hu Zhiping, Huang Zhihua, Huang Cheng[△]

(Basic Medicine College, Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

Abstract: Objective On the basis of previous experiments, we try further to seek the new evidences of $\alpha 7$ nAChR participating in 100 Hz electroacupuncture (EA) regulating natural killer (NK) cells activity. **Methods** $\alpha 7$ nAChR antibody and the specific $\alpha 7$ nAChR antagonist α -bungarotoxin (α -Bgt) were used to study the effect of $\alpha 7$ nAChR on NK cell activity in 100 Hz EA mice. **Results** Compared with 100 Hz EA group, 100 Hz EA plus $\alpha 7$ nAChR-Ab group showed a significant enhanced in NK cell activity ($P < 0.05$). 100 Hz EA treated with 1.5 or 3.0 μg α -Bgt groups had higher NK cell activity than 100 Hz EA group ($P < 0.01$). **Conclusion** $\alpha 7$ nAChR is involved in 100 Hz EA modulation for immune function, which provide the theoretical and practical basis for further clarifying and expanding the clinical application of EA.

Key words: electroacupuncture; natural killer cell activity; $\alpha 7$ nAChR

$\alpha 7$ 尼古丁受体(Alpha 7 nicotinic receptor, $\alpha 7$ nAChR)在抗炎免疫反应中扮演着重要的角色。有实验表明,乙酰胆碱(acetyl choline, ACh)可抑制体外培养的脂多糖刺激引起的巨噬细胞释放 TNF、IL-6、IL-1 β 及 IL-18,刺激迷走神经可抑制大鼠肝脏 TNF 的合成,降低炎症免疫反应^[1],进一步的实验发现乙酰胆碱是通过与巨噬细胞膜上 $\alpha 7$ nAChR 结合而发挥抑制炎症细胞因子的合成及分泌的作用^[2]。小鼠外周血与脾组织的淋巴细胞可表达 mAChRs 和 nAChRs^[3],本实验也发现小鼠免疫细胞上有 $\alpha 7$ nAChR 的表达^[4]。以上实验结果提示, $\alpha 7$ nAChR 可能参与了电针(electroacupuncture, EA)调节免疫功能的作用,但其作用机制不清楚。为此,本研究应用 $\alpha 7$ nAChR 抗体和特异性的 $\alpha 7$ nAChR 拮抗剂 α -银环蛇毒(α -bungarotoxin, α -Bgt),进一步证实 $\alpha 7$ nAChR 在电针对 NK 细胞活性中的作用,旨在为 EA 的临床应用提供理论基础和参考。

1 材料与方 法

1.1 材料 雄性昆明小鼠,体质量 18~22 g,由江西中医学院实验动物中心提供,自然照明,自由饮水、饮食。实验严格按照赣南医学院医学伦理委员会的相关规定。 α -Bgt(T0195)购自 Sigma 公司; $\alpha 7$ nAChR 抗体(SC-5544)购自 Santa Cruz 生物科

技有限公司。对小鼠进行分组,每组 9 只。(1)为检测 $\alpha 7$ nAChR 抗体的作用,实验分 6 组:对照组、IgG 组、 $\alpha 7$ nAChR 抗体组、100 Hz EA 组、100 Hz EA + IgG 和 100 Hz EA + $\alpha 7$ nAChR 抗体组;(2)为检测特异性的 $\alpha 7$ nAChR 拮抗剂 α -Bgt 的作用,实验分 9 组:对照组、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -Bgt 组、3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -Bgt 组、扎针组(needle 组)、扎针 + 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -Bgt 组、扎针 + 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -Bgt 组、100 Hz EA 组、100 Hz EA + 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -Bgt 组和 100 Hz EA + 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -Bgt 组。

1.2 方 法

1.2.1 EA 刺激 分别给予小鼠双后肢的足三里和三阴交插针,并与 HANSEA 刺激仪相连,对照组于穴位附近扎针后不通电流,处理时间与 100 Hz EA 组相同,刺激强度以 0.5、1.0、1.5 mA 方式递增各刺激 10 min,共 30 min,每天 1 次,连续刺激 3 d。

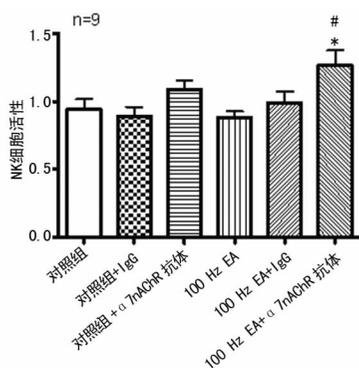
1.2.2 脾脏 NK 细胞杀伤活性检测 靶细胞的制备:细胞培养 24 h 后,1 000 r/min,离心时间 5 min,弃上清液,加入 2 mL RPMI-1640 培养液重悬,用苔盼蓝染色检测细胞活性应大于 90%;细胞浓度调至 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。效应细胞的制备:无菌取脾,用 100 目不锈钢筛机械分离,Hank's 液洗 2 次,以 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液重悬,用苔盼蓝染色检测细胞活性

应大于 90%，调整细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。效-靶细胞作用：96 孔培养板中各加入 100 μL YAC-1 细胞及效应细胞，效-靶比为 20 : 1，另设效应细胞孔及靶细胞孔，均为 3 复孔，将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 温箱中培养 20 h，每孔加 10 μL MTT(5 mg/mL)，37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中培养 4 h。结果观察：取出培养板，2 000 r/min，离心 5 min，弃上清液，加二甲基亚砜 150 μL ，震荡 5 min，酶标仪 570 nm 读取光密度(OD)值，计算 NK 细胞的杀伤活性 = $[1 - (\text{实验孔 OD 值} - \text{效应细胞 OD 值}) / \text{靶细胞对照孔 OD 值}] \times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 采用 Prism5.0 统计软件进行分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据分析采用单因素方差分析并继之以 Newman-Keuls 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

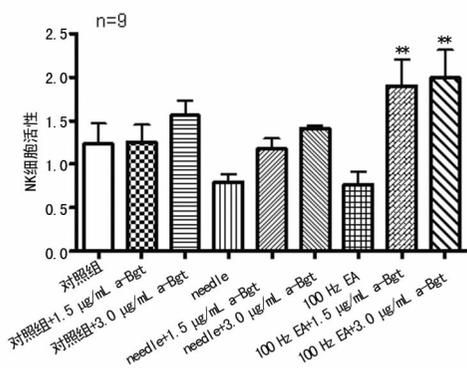
2 结 果

2.1 $\alpha 7\text{nAChR}$ 抗体对 100 Hz EA 作用脾脏 NK 细胞活性的影响 在 EA 前，预先给予小鼠抗 $\alpha 7\text{nAChR}$ 抗体后，观察 100 Hz EA 对小鼠 NK 细胞活性的影响。结果显示，分别与 100 Hz EA 组和 100 Hz EA + IgG 组相比，100 Hz EA + $\alpha 7\text{nAChR}$ 抗体组的 NK 细胞活性均明显增强，差异有统计学意义($P < 0.05$)，见图 1。



*: $P < 0.05$, 与 100 Hz EA 比较; #: $P < 0.05$, 与 100 Hz EA + IgG 组比较。

图 1 $\alpha 7\text{nAChR}$ 抗体对 100 Hz EA 作用脾脏 NK 细胞活性的影响



** : $P < 0.01$, 与 100 Hz EA 组比较。

图 2 $\alpha 7\text{nAChR}$ 特异性拮抗剂 $\alpha\text{-Bgt}$ 对 100 Hz EA 作用脾脏 NK 细胞活性的影响

2.2 特异性的 $\alpha 7\text{nAChR}$ 拮抗剂 $\alpha\text{-Bgt}$ 对 100 Hz EA 作用脾脏 NK 细胞活性的影响 在 EA 前，分别给予小鼠不同剂量的特异性 $\alpha 7\text{nAChR}$ 拮抗剂 $\alpha\text{-Bgt}$ 后，观察 100 Hz EA 对小鼠 NK 细胞

活性的影响。结果显示，与 100 Hz EA 组相比，100 Hz EA + 1.5 μg $\alpha\text{-Bgt}$ 组和 100 Hz EA + 3.0 μg $\alpha\text{-Bgt}$ 组均明显增强了 NK 细胞活性，差异有统计学意义($P < 0.01$)，见图 2。

3 讨 论

ACh 作为神经递质在中枢和外周神经系统发挥信息传递的作用。近年来的研究显示，胆碱能系统在机体免疫调节中起重要作用。小鼠淋巴细胞表达 ACh、ChAT、mAChRs 和 nAChRs^[3]，淋巴细胞合成和释放的 ACh 可通过作用于免疫细胞上的 mAChRs 和 nAChRs 来发挥免疫调节作用^[5]，mAChRs 和 nAChRs 参与了对细胞因子的调节作用(如 IL-6)^[6]，这些证据均支持胆碱能系统参与了免疫功能调节过程。

在小鼠上存在 16 种不同的 nAChRs 亚单位($\alpha 1\text{-}7$ 、 $\alpha 9\text{-}10$ 、 $\beta 1\text{-}4$ 、 δ 、 ϵ 、 γ)，他们组成了多种具有不同结构和药理性质的同构五聚体和异构五聚体^[7]。在淋巴细胞和巨噬细胞上主要表达 nAChRs 中的 $\alpha 2$ 、 $\alpha 5\text{-}7$ 、 $\alpha 10$ 和 $\beta 2$ 亚单位^[8]。在这些 nAChRs 的亚单位中，对 $\alpha 7\text{nAChR}$ 的研究较多^[9-10]。 $\alpha 7\text{nAChR}$ 对免疫细胞起负反馈调节作用，这种作用主要是通过抑制 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-6 等细胞因子的合成和释放来实现的，而且发现在 $\alpha 7\text{nAChR}$ 基因敲除小鼠血清中的致炎性细胞因子含量明显升高^[11-12]。因此，目前认为 $\alpha 7\text{nAChR}$ 是胆碱能系统调节免疫反应的关键受体，它的兴奋介导了大部分的 ACh 在免疫系统中的效应^[13]。

有研究表明，EA 可提高刺激副交感神经的作用效果^[14]。课题组前期研究结果提示， $\alpha 7\text{nAChR}$ 可能参与了 100 Hz EA 对小鼠 NK 细胞活性的调节作用。因此，本实验选择 $\alpha 7\text{nAChR}$ 作为研究 EA 通过胆碱能系统调节免疫功能的切入点。结果显示，连续 3 d 给予 100 Hz EA 刺激后，小鼠 NK 细胞活性明显降低。如预先给予抗 $\alpha 7\text{nAChR}$ 的抗体后，再进行 100 Hz EA 刺激，小鼠的 NK 细胞活性显著升高；同样，进一步应用特异性的 $\alpha 7\text{nAChR}$ 拮抗剂 $\alpha\text{-Bgt}$ 的实验也观察到 100 Hz EA 可显著地升高 NK 细胞活性^[15]。以上结果提示，小鼠免疫细胞上的 $\alpha 7\text{nAChR}$ 在 100 Hz EA 调节 NK 细胞活性中发挥重要作用。

参考文献:

[1] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin[J]. Nature, 2000, 405 (6785): 458-462.
 [2] Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation[J]. Nature, 2003, 421(6921): 384-388.
 [3] Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy [J]. J Pharmacol Sci, 2008, 106(2): 186-192.
 [4] 黄诚, 韩立民. $\alpha 7$ 尼古丁受体参与 100HzEA 调节小鼠 NK 细胞活性[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1079-1081.
 (下转第 586 页)

放 TLR4 的内源性激活物,并进一步使 TLR4 触发级联免疫炎症反应^[9-13]。有实验证实,ICH 后血肿周围脑组织 TLR4 mRNA 表达量逐渐升高,72 h 达到高峰,持续到术后第 7 天。杨继文等^[2]证实,在外来信号(如炎症、缺血等)刺激下也可以激活 TLR4 的表达,而 TLR4 通过上调其下游因子 NF- κ B 的表达调控了多种炎症因子的释放,从而使机体产生损伤。国外研究表明,敲除 TLR4 表达基因的老鼠,其炎症因子释放明显减少,其组织学损伤相对减轻。为此,本研究通过大鼠 ICH 模型,观察 TLR4 和 NF- κ B 的表达情况。免疫组织化学结果显示,随着时间的延续,与 Sham 组比较,模型组 TLR4 和 NF- κ B 均表达升高,脑组织损伤不断加重,神经功能损伤评分升高。Western blot 结果显示两者表达量与之相一致。提示激活 TLR4 可能是导致 ICH 后脑组织周围 NF- κ B 介导炎症反应的一个重要原因。

综上所述,TLR4 和 NF- κ B 的表达在大鼠 ICH 后血肿周围脑组织的继发性病理损伤过程中发挥重要作用,其表达的升高加重了脑的继发性炎症损伤,那么找到抑制 TLR4 和 NF- κ B 表达的药物,可为 ICH 防治策略提供可靠理论依据。

参考文献:

- [1] Cotena S, Piazza O, Tufano R. The use of erythropoietin in cerebral diseases[J]. *Panminerva Med*, 2008, 50(2): 185-192.
- [2] 杨继文, 龚树辉, 张利民, 等. 脑出血后炎症反应的研究进展[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2009, 17(4): 317-319.
- [3] Lively S, Schlichter LC. Age-related comparisons of evolution of the inflammatory response after intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Transl Stroke Res*, 2012, 3(1): 132-146.
- [4] Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, et al. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity

[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(15): 923-932.

- [5] Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, et al. Toll like receptor 4 in CNS pathologies[J]. *J Neurochem*, 2010, 114(1): 13-27.
- [6] 姚树桐, 刘秀华, 汤旭明, 等. 缺血后处理改善脑缺血再灌注大鼠软脑膜微循环[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(3): 451-455.
- [7] Fredrik DN, Alistair J, Dawid MA, et al. Early hemodynamic changes in experimental hemorrhage[J]. *Neurosurgery*, 1986, 65(5): 697-703.
- [8] 陈燕飞, 周丽, 高音. TLR4 对脑缺血再灌注小鼠海马 IRF-3 和 IFN- β 表达的影响[J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(5): 58-60.
- [9] 谷翠芝, 冯飞玲. TLR4 与中枢神经系统损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(3): 608-612.
- [10] Wu H, Chen G, Wyburn KR, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10): 2847-2859.
- [11] Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, et al. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(5): 923-932.
- [12] 叶欣, 万曙, 詹仁雅, 等. NF- κ B 信号通路和脑出血后的继发性脑损伤[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(2): 171-175.
- [13] Ribes S, Ebert S, Czesnik D, et al. Toll-like receptor pre-stimulation increases phagocytosis of Escherichia coli DH5 α and Escherichia coli K1 strains by murine microglial cells[J]. *Infect Immune*, 2009, 77(1): 557-564.

(收稿日期:2013-06-04 修回日期:2013-08-29)

(上接第 583 页)

- [6] Son YS, Park HJ, Kwon OB, et al. Antipyretic effects of acupuncture on the lipopolysaccharide -induced fever and expression of interleukin-6 and interleukin-1 beta mRNA in the hypothalamus of rats[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 319(1): 45-48.
- [7] Marubio LM, Changeux JP. Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function[J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 393(1/3): 113-121.
- [8] De Rosa MJ, Dionisio L, Agriello E, et al. Alpha7nicotinic acetylcholine receptor modulates lymphocyte activation[J]. *Life Sci*, 2009, 85(11/12): 444-449.
- [9] Fujii YX, Tashiro A, Arimoto K, et al. Diminished antigen-specific IgG1 and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M1 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice[J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 188(1/2): 80-85.
- [10] Chernyavsky AI, Arredondo J, Galitovskiy V, et al. Structure and function of the nicotinic arm of acetylcholine regulatory axis in human leukemic T cells[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2009, 22(2): 461-472.
- [11] Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, et al. Expression

and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells[J]. *Life Sci*, 2007, 80(24/25): 2314-2319.

- [12] Stuckenholtz V, Bacher M, Balzer-Geldsetzer M, et al. The α 7 nAChR agonist PNU-282987 reduces inflammation and MPTP-induced nigral dopaminergic cell loss in mice[J]. *J Parkinsons Dis*, 2013, 3(2): 161-172.
- [13] Gahring LC, Enioutina EY, Myers EJ, et al. Nicotinic receptor α 7 expression identifies a novel hematopoietic progenitor lineage[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57481.
- [14] Vukelic M, Qing X, Redecha P, et al. Cholinergic receptors modulate immune complex-induced inflammation in vitro and in vivo[J]. *J Immunol*, 2013, 191(4): 1800-1807.
- [15] Thomsen MS, Mikkelsen JD. The α 7 nicotinic acetylcholine receptor ligands methyllycaconitine, NS6740 and GTS-21 reduce lipopolysaccharide-induced TNF- α release from microglia[J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 251(1/2): 65-72.

(收稿日期:2013-09-22 修回日期:2013-11-12)