

·实验研究 Experimental research·

高碘促成纤维细胞增殖作用与成纤维细胞生长因子及其受体的关系

华浅近, 祖茂衡, 滕飞, 王磊, 胡琳

【摘要】目的 研究高碘促成纤维细胞增殖作用与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、成纤维细胞生长因子 2 型受体(FGFR2)的关系,探索高碘因素在布-加综合征(BCS)隔膜组织形成过程中的作用机制。**方法** ① 将体外培养的成纤维细胞分成对照组、溶媒组、KI 组、FGFR 抑制剂组和 KI 与 FGFR 抑制剂共同作用组,采用 CCK-8 法检测各组成纤维细胞增殖率。② 采用免疫印迹法检测不同碘浓度(0、250、500、1 000、2 000、3 000 $\mu\text{g/L}$)培养环境中 bFGF、FGFR2 蛋白表达量。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),多个实验组与 1 个对照组比较采用最小显著差法(LSD)。**结果** ① 在 1 000 $\mu\text{g/L}$ 碘浓度组,KI 与 FGFR 抑制剂共同作用组成纤维细胞增殖率(1.06 ± 0.13)高于 FGFR 抑制剂组(0.40 ± 0.12),而低于 KI 组(1.73 ± 0.09),组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。② 在 500、1 000 $\mu\text{g/L}$ 碘浓度组,FGFR2 蛋白相对表达量高于其他碘浓度组,而 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组高于 500 $\mu\text{g/L}$ 组,组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。各碘浓度组间 bFGF 蛋白相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** ① 高碘因素可能通过上调 FGFR2 蛋白表达量而引起成纤维细胞增殖;② 高碘导致的成纤维细胞增殖可能与隔膜形成相关。

【关键词】 布-加综合征;碘;成纤维细胞;隔膜;实验研究

中图分类号:R543.5 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2013)-12-1016-05

Research on the relationship between bFGF, FGFR2 and the fibroblast proliferation promoted by high density iodine HUA Qian-jin, ZU Mao-heng, TENG Fei, WANG Lei, HU Lin. Department of Interventional Radiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu Province 221002, China

Corresponding author: ZU Mao-heng, E-mail: cjr.zumaoheng@vip.163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between fibroblast proliferation promoted by high density iodine and basic fibroblast growth factor (bFGF) as well as fibroblast growth factor receptor type 2 (FGFR2), and to explore the mechanism of high density iodine in causing the formation of membrane in Budd-Chiari syndrome (BCS). **Methods** ① The fibroblasts, which were cultured in high density of iodine in vitro, were divided into 5 groups: control group, solvent group, KI group, FGFR inhibitor group and combination group (FGFR inhibitor together with KI). The proliferation rate of fibroblasts of each group was determined by CCK-8 assay. ② The FGFR2 protein expression level of bFGF and FGFR cultured in different concentrations of iodine (0, 250, 500, 1 000, 2 000 and 3 000 $\mu\text{g/L}$) was determined by Western-blot method. Quantitative data difference between groups was analyzed by one-way ANOVA method. LSD method was used to compare the experimental group with control group. Statistical significant was given in P values, the difference was considered to be statistically significant when $P < 0.05$. **Results** ① In iodine density of 1 000 $\mu\text{g/L}$, the proliferation rate of fibroblasts in combination group was (1.06 ± 0.13), which was higher than that in FGFR inhibitor group (0.40 ± 0.12) and lower than that in KI group (1.73 ± 0.09), the difference was statistically significant ($P < 0.05$). ② The

FGFR2 protein expression level of fibroblasts in iodine density of 500 $\mu\text{g/L}$ and 1 000 $\mu\text{g/L}$ was higher than those in other iodine densities. The FGFR2 protein expression level in 1 000 $\mu\text{g/L}$ group was higher than that in 500 $\mu\text{g/L}$ group

基金项目:江苏省科技创新与成果转化专项基金资助(BL2012021);徐州医学院研究生科技创新工程研究项目(XYLC-1220)

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2013.12.014

作者单位:221000 徐州医学院附属医院介入科

通信作者:祖茂衡 E-mail: cjr.zumaoheng@vip.163.com

($P < 0.05$). The difference in bFGF protein expression level between each other group was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion** ① High density of iodine may promote the proliferation of fibroblasts by adjusting the protein expression level of FGFR2 upward. ② The proliferation of fibroblasts caused by high iodine density may result in the formation of membrane in Budd-Chiari syndrome. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 1016-1020)

【Key words】 Budd-Chiari syndrome; iodine; fibroblast; membrane; experimental study

我国布加-综合征(Budd-Chiari syndrome, BCS)以下腔静脉和(或)肝静脉开口处隔膜阻塞型为主,其特征是下腔静脉和(或)肝静脉开口处隔膜形成,而隔膜的形成功能机制至今尚未明确^[1]。病理学研究发现成纤维细胞为该隔膜主要构成成分之一,隔膜组织中成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)的表达明显高于正常血管壁组织^[2]。此外,国内流行病学研究发现 BCS 的发病率与饮用水中碘含量呈正相关^[3],同时一定浓度的高碘培养环境能促进成纤维细胞、血管内皮细胞增殖^[4-5]。

本研究以 CCK-8 检测法^[6]检测 FGFR 抑制剂 SU5402 与适宜浓度碘离子共同作用下成纤维细胞的增殖情况,应用免疫印迹法检测不同浓度碘离子培养环境中成纤维细胞的碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、FGFR2 蛋白表达的情况,探讨高碘促成纤维细胞增殖作用与 bFGF、FGFR2 的关系及与下腔静脉隔膜形成的相关性。

1 材料与方法

1.1 细胞株培养

HFL1 人肺成纤维细胞(目录号 GNHu28)购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞培养于 Corning 培养皿中,采用 F12K 培养基(Sigma 公司),加 10%胎牛血清(Gibco 公司)。于 37℃、5% CO₂ 条件的培养箱中静置培养,至细胞贴壁生长汇合即可传代,每周传代 2 次,选取第 5~6 代细胞用于实验。

1.2 细胞增殖检测

取对数生长期的成纤维细胞,胰酶消化后制成细胞悬液,用细胞计数板作细胞计数,测定细胞密度,再用培养基稀释至 5×10^4 个/ml。将细胞悬液接种至 96 孔板中,每孔约 5 000 个细胞,分为 5 组:①空白对照组(每孔 100 μ l 细胞悬液,20 μ l F12K 培养基);②溶媒组(每孔 100 μ l 细胞悬液,19 μ l F12K 培养基,1 μ l DMSO);③ KI 组(每孔 100 μ l

细胞悬液,15 μ l F12K 培养基,5 μ l KI);④ SU5402 组(每孔 100 μ l 细胞悬液,15 μ l F12K 培养基,5 μ l SU5402);⑤ SU5402 和 KI 共同作用组(每孔 100 μ l 细胞悬液,10 μ l F12K 培养基,5 μ l SU5402,5 μ l KI)。以上各组均设 6 个复孔,其中③、⑤组的碘浓度为 1 000 μ g/L,④、⑤组的 SU5402 终浓度为 100 μ mol/L。随后于 37℃、5% CO₂ 条件的培养箱中静置培养 16 h,更换新的 F12K 培养基,每孔再加入 CCK-8 工作液(日本同仁)10 μ l,孵育 40 min。以 F12K 培养基加 CCK-8 工作液孔作为本底调零,于 450 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值,间接反映细胞数量,各组 A 值去除 1 个最高值和 1 个最低值。以上实验重复 3 次。

1.3 bFGF、FGFR2 蛋白表达

取对数生长期成纤维细胞 1:6 传代,培养 48 h 后换液,设空白对照组和碘离子组。空白对照组直接用 F12K 培养基培养。碘离子组:在 F12K 培养基中分别加入碘化钾,使碘离子终浓度分别为 250、500、1 000、2 000 和 3 000 μ g/L,再将细胞置于培养箱中孵育 12 h。采用 Western 印迹法检测 bFGF、FGFR2 蛋白表达。用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测蛋白浓度、SDS-PAGE 电泳、转膜和免疫反应。bFGF、FGFR2 一抗(Abcam 公司)均以 1:500 稀释,二抗稀释比均为 1:1 000。显色方法为 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐/氯化硝基四氮唑蓝(BCIP/NBT)发色显色法。以上条带均以 β -actin 作为内参照。扫描后采用 IPP6.0 图像分析软件对特异性条带进行半定量分析,以 bFGF/ β -actin、FGFR2/ β -actin 的灰度值比值评定 bFGF 及 FGFR2 的蛋白表达水平。以上实验重复 3 次。

1.4 统计学分析

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。检测结果以均数 \pm 标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),多个实验组与 1 个对照组比较采用最小显著差法(LSD),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FGFR 抑制剂对成纤维细胞增殖的影响

空白对照组 (1.06 ± 0.13) 与溶媒组 (1.02 ± 0.11) 间细胞增殖率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。KI 组 (1.73 ± 0.09) 细胞增殖率明显高于对照组, SU5402 组 (0.40 ± 0.12) 细胞增殖率明显低于对照组, SU5402 和 KI 共同作用组 (1.18 ± 0.10) 细胞增殖率高于对照组, 但低于 KI 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

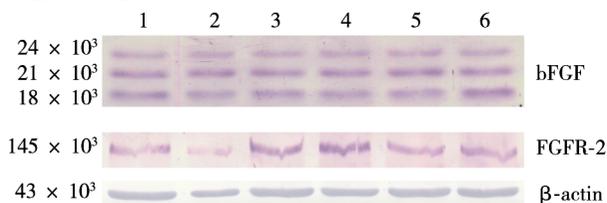
2.2 不同碘浓度对 bFGF、FGFR2 蛋白表达的影响

各碘浓度组与空白对照组比较, bFGF 蛋白相对表达量差无统计学意义 ($P > 0.05$)。500 和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 碘浓度组 FGFR2 蛋白相对表达量较空白对照组明显提高, 且 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组明显高于 500 $\mu\text{g/L}$ 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1、图 1 ~ 3。

表 1 不同浓度碘环境中 bFGF、FGFR2 蛋白相对表达量

组别	标本数	蛋白相对表达量	
		bFGF	FGFR2
空白对照组	3	4.438 ± 0.071	0.596 ± 0.022
碘浓度 ($\mu\text{g/L}$)			
250	3	4.549 ± 0.032	0.573 ± 0.027
500	3	4.546 ± 0.052	0.902 ± 0.024^a
1 000	3	4.421 ± 0.103	1.071 ± 0.050^a
2 000	3	4.441 ± 0.045	0.568 ± 0.037
3 000	3	4.531 ± 0.081	0.615 ± 0.017

与空白对照组比较 $^aP < 0.05$



注:泳道 1 为空白对照组;泳道 2 ~ 6 分别为碘浓度 250、500、1 000、2 000 和 3 000 $\mu\text{g/L}$ 组

图 1 bFGF、FGFR2 蛋白在各组中的表达

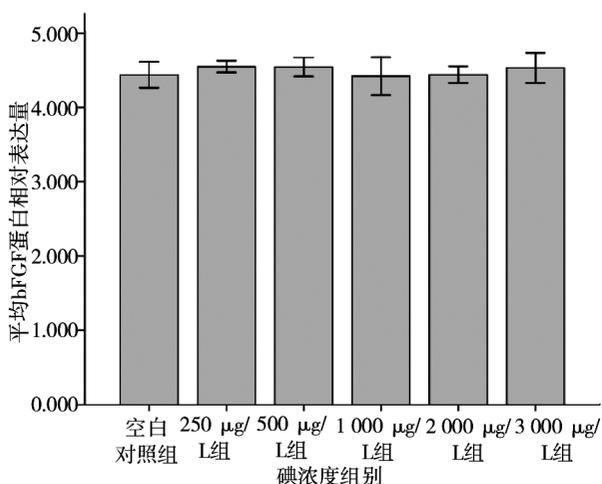


图 2 不同碘浓度对 bFGF 蛋白相对表达量的影响

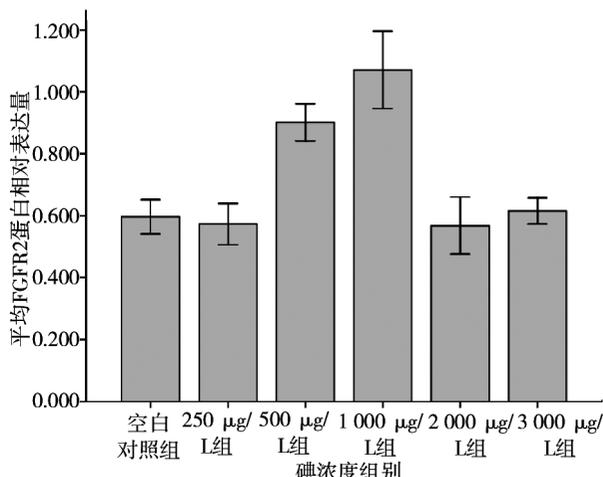


图 3 不同碘浓度对 FGFR 蛋白相对表达量的影响

3 讨论

3.1 高碘促成纤维细胞增殖的作用途径

国内流行病学调查显示,隔膜型 BCS 患者分布地区的饮用水中碘含量超过正常标准,并且 BCS 患者尿碘高于正常人,同时一定浓度的碘能促进成纤维细胞增殖^[5]。bFGF 是 FGF 家族中最具代表性的成员,它作为重要的促有丝分裂原对成纤维细胞有明显的促增殖作用,能趋化血管内膜的各类细胞并促进其增殖和迁移,在损伤修复过程促进细胞胶原酶的产生从而加速胶原分解,并通过促进基底膜纤维的重新排布使基质层纤维有序排布,达到减少瘢痕形成的作用^[7]。FGFR 是一类穿膜的酪氨酸激酶受体,介导 FGF 信号传递入细胞,分 1 ~ 6 个亚型,其中 FGFR1、2 为 bFGF 高亲和力受体。FGF/FGFR 途径在细胞增殖和分化、创伤愈合和肿瘤细胞的分裂增殖中起重要作用^[8]。

本研究用的 SU5402 是 2-[(1-2-二氢-2-氧代-3H-吡啶-3-亚基)甲基]-4-甲基-1H-吡咯-3-丙酸,能靶向作用于 FGFR1 激酶结构域铰链区的 ATP 结合位点,由于 FGFR 之间的结构和序列相似,可通过与 ATP 结合而抑制 FGFR2 的磷酸化,从而也抑制 FGFR2 的活性^[9-10]。本文结果显示, KI 组细胞增殖率明显高于对照组,与刘小琴等^[5]发现的碘离子浓度 $\leq 3 000 \mu\text{g/L}$ 具有促进成纤维细胞增殖和抑制细胞凋亡作用的结果相符。而对于高碘促成纤维细胞增殖的机制少见报道。腾飞等^[11]在体外以高碘环境培养血管内皮细胞,发现碘离子促进血管内皮细胞增殖并非通过提高血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及其受体 (VEGFR) 的蛋白表达量实现,同时发现高碘能刺

激血管内皮细胞膜受体 VEGFR-2(Tyr1214)磷酸化水平上调而介导血管内皮细胞迁移。血管内皮细胞和成纤维细胞均为 BCS 隔膜的主要成分,高碘培养环境能引起两者的增殖,本研究以高碘对 BCS 隔膜另一主要成分的成纤维细胞增殖机制为切入点进行研究,结果显示 SU5402 组细胞增殖率明显低于对照组,表明成纤维细胞增殖依赖于 FGFR1 和(或)FGFR2 作用。SU5402 联合 KI 共同作用组细胞增殖率低于 KI 组,但仍高于对照组,表明高碘对成纤维细胞的促增殖作用不仅通过对 FGF/FGFR 途径刺激实现,还通过其他途径实现,具体机制有待进一步研究。

3.2 高碘与 bFGF、FGFR2 蛋白表达的关系及意义

FGFR2 是 bFGF 的高亲和力受体,在 bFGF 促进细胞增殖和迁移过程中起至关重要的作用^[7]。FGFR2 与多种肿瘤的发生发展密切相关,而被认为是肿瘤治疗的重要靶点,但其在血管内隔膜形成过程中的作用尚少见报道。

本研究的 Western 印迹结果显示,碘浓度 500 和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组的 FGFR2 蛋白表达明显提高,且 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组明显高于 500 $\mu\text{g/L}$ 组,提示高碘离子能促进成纤维细胞 FGFR2 蛋白表达且呈浓度相关性。碘离子对成纤维细胞的增殖和凋亡具有双向效应,较低浓度的碘离子对成纤维细胞增殖起明显的促进作用,随着碘离子浓度的升高促进作用逐渐消失,碘离子浓度较高时成纤维细胞增殖活性受到抑制,高碘对成纤维细胞的作用呈现出剂量-效应关系^[5],本研究发现碘浓度 2 000 和 3 000 $\mu\text{g/L}$ 组的 FGFR2 蛋白表达低于 500 和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组,与空白对照组无明显差异,说明高碘对成纤维细胞 FGFR2 蛋白表达的影响也存在剂量-效应关系。bFGF 通过与其低亲和力受体硫酸肝素蛋白多糖(HSPG)结合,再通过 HSPG 结合到 FGFR 上。研究表明,2 个 FGFR2 蛋白分子与 1 个 HSPG 分子结合,FGFR2 的 Y657 位点发生二聚化,并发生自磷酸化而活化形成稳定的二聚体^[12]。FGFR2 活化后可磷酸化成纤维细胞生长因子受体底物 2(FRS2)^[13],募集生长因子受体结合蛋白 2(Grb2),而后激活蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)、Ras/Raf/MEK/ERK 等信号转导途径,通过细胞信号转导通路的活化而参与调控细胞增殖、分化等生物学功能。FGFR2 蛋白表达量的提高将强化上述作用过程,导致包括成纤维细胞在内的多种细胞增殖条件发生紊乱,刺激细胞内的多种信号转导通路^[14]。因此,高碘可能通过上调

FGFR2 蛋白表达量对成纤维细胞产生促增殖作用,而具体作用机制和激活的信号转导通路还需深入研究。各碘浓度组成纤维细胞 bFGF 蛋白表达量无明显差异,提示高碘促成纤维细胞增殖作用并非通过提高 bFGF 蛋白表达量实现,高碘对 HSPG、FRS2、Grb2 蛋白表达及对 bFGF 降解胶原作用是否有影响还需进一步证实。

3.3 高碘与 BCS 隔膜组织形成的相关性

目前研究发现,我国隔膜型 BCS 病例的地理分布和水源性高碘地区分布基本相符,并且患者尿碘水平明显高于正常人^[3],这些研究均证实了 BCS 患者体内的高碘环境。近年发现高碘能刺激 BCS 隔膜主要成分之一的内皮细胞膜受体 VEGFR-2(Tyr1214)磷酸化水平上调而介导肌动蛋白重塑、张力纤维形成及 VEC 迁移。本研究发现,高碘因素可提高 FGFR2 蛋白表达量并促进其增殖,这与 BCS 隔膜组织检测到增殖的成纤维细胞、高表达的 FGFR 结果相一致。我们推测由于肝静脉开口处的血流切应力、膈肌损伤等因素引起了肝静脉开口处血管壁损伤^[15],暴露出内皮下层的血管内皮细胞、成纤维细胞,而患者血液中高碘因素引起损伤处血管内皮细胞、成纤维细胞增殖及血管内皮细胞向管腔内迁移,促进 BCS 隔膜的形。

然而,不同类型 BCS 的发病机制不同,本研究主要针对隔膜阻塞型 BCS 的隔膜形成机制,而不能解释以肝静脉血栓、闭塞、狭窄形成为特点的单纯肝静脉病变型 BCS 发病机制,单纯肝静脉病变型 BCS 发病机制的研究主要针对血栓形成原因,如 JAK2-V617F 基因突变、凝血因子 V 基因 G1691A 突变、红细胞增多症等^[1]。此外,在体外高碘环境单一培养成纤维细胞无法模拟出动态变化的人体血液内环境及隔膜的多种细胞及组织成分,本研究发现了高碘能上调 FGFR2 蛋白表达量,但具体作用机制和所激活的下游信号转导通路还需深入研究。

[参考文献]

- [1] Cheng D, Xu H, Lu ZJ, et al. Clinical features and etiology of Budd-Chiari syndrome in Chinese patients: a single-center study[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28: 1061-1067.
- [2] 白卫星,李天晓,翟水亭,等.布-加综合征隔膜组织病理学与相关因素研究[J].介入放射学杂志,2008,17:463-467.
- [3] 肖培瑞,蔺新英,郭成浩,等.布-加综合征分布与饮用水碘含量关系研究[J].环境与健康杂志,2010,27:618-620.
- [4] 王晓磊,徐丽雅,张海涛,等.不同碘浓度对培养血管内皮细

胞增殖的影响 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2007, 45: 310 - 312.

[5] 刘小琴, 郭成浩, 张海涛, 等. 碘对成纤维细胞细胞周期及凋亡的影响[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27: 568 - 570.

[6] 王涛, 李冰晴, 王津津, 等. CCK-8 检测法研究褪黑素对人 Tenon 囊成纤维细胞的抑制作用 [J]. 眼科新进展, 2007, 27: 576 - 580.

[7] Feng DF, Wang CY, Wang H, et al. bFGF - induced human periodontal ligament fibroblasts proliferation through t - type voltage-dependent Calcium channels [J]. Acta Odontol Scand, 2013, 71: 9 - 14.

[8] 伊海英, 孙晓艳, 付小兵, 等. 碱性成纤维细胞生长因子的研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33: 776 - 778.

[9] Li M, Firth JD, Putnins EE. An in vitro analysis of mechanical wounding - induced ligand - independent KGFR activation [J]. J Dermatol Sci, 2009, 53: 182 - 191.

[10] Yamauchi K, Mizushima S, Tamada A, et al. FGF8 signaling regulates growth of midbrain dopaminergic axons by inducing semaphorin 3 F[J]. J Neurosci, 2009, 29: 4044 - 4055.

[11] 滕飞, 祖茂衡, 华浅近, 等. 血管内皮细胞增殖过程中碘离子与血管内皮生长因子及其受体的关系 [J]. 介入放射学杂志, 2013, 22: 403 - 408.

[12] 计薇, 孙文靖, 张慧妹, 等. 人成纤维细胞生长因子受体 2 的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2011, 34: 186 - 195.

[13] Hadari YR, Gotoh N, Kouhara H, et al. Critical role for the docking - protein FRS2 alpha in FGF receptor - mediated signal transduction pathways [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 8578 - 8583.

[14] Katoh Y, Katoh M. FGFR2 - related pathogenesis and FGFR2 - targeted therapeutics (Review)[J]. Int J Mol Med, 2009, 23: 307 - 311.

[15] 周恒根, 徐浩, 祖茂衡, 等. 膈肌运动及血流动力学与下腔静脉膜性阻塞关系的研究 [J]. 介入放射学杂志, 2008, 17: 729 - 731.

(收稿日期:2013-05-04)
(本文编辑:侯虹鲁)

·消 息·

欢迎订阅 2014 年《介入放射学杂志》

《介入放射学杂志》是我国第一本有关介入放射学基础研究,临床应用等方面的学术性期刊。是中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),《中文核心期刊要目总览》临床医学/特种医学类核心期刊,中国科学引文数据库来源期刊。并已进入俄罗斯《文摘杂志》(AJ of VINITI)、荷兰《医学文摘》(EMBASE)等六个国际检索系统。据 2013 年版中国期刊引证研究报告,本刊 2012 年度核心影响因子为 0.900。杂志的宗旨是介绍介入放射学方面最新的学术成果和临床经验,范围涵盖神经介入、心脏介入、血管介入、肿瘤介入、非血管介入等各个方面。具有内容丰富、资料新颖、学术性强、编辑规范等特色,创刊以来受到国内外介入放射学界的重视与欢迎,对我国介入放射学事业起到了积极的推动和促进作用。2002 年曾被评为第三届华东地区优秀期刊。杂志为大 16 开铜版纸印刷,国内外公开发售。中国标准连续出版物号:ISSN 1008-794X,CN31-1796/R,可在全国各地邮局订购,邮发代号:4-634。也可直接向编辑部订购。为满足广大作者与读者的需要,本刊 2014 年为月刊,92 页,每月下旬出版,每期定价 15 元,全年 180 元。编辑部地址:上海市华山路 1328 号,邮政编码:200052,联系电话:021-62409496。