

• 实验研究 Experimental research •

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

滕 飞, 祖茂衡, 华浅近, 王 磊

【摘要】目的 探讨血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)增殖过程中碘离子与血管内皮生长因子(VEGF)及其受体的关系。方法 ① 采用 CCK-8 法检测碘离子与 VEGF 抑制剂作用后 VEC 的增殖率。② 采用蛋白质印迹技术(Western 印迹法)检测碘离子对血管内皮生长因子受体 2(VEGFR-2)磷酸化的影响。结果 ① 在 300 $\mu\text{g/L}$ 碘离子环境中,使用 VEGF 抑制剂并不能抑制 VEC 的增殖($P < 0.05$)。② 一定浓度的碘离子可促进 VEGFR-2(Tyr1214)磷酸化水平上调($P < 0.05$)。③ 碘离子对 VEGFR-2(Tyr1175, Tyr951 位点)的磷酸化无影响。结论 ① 碘离子促进 VEC 增殖并不依赖于 VEGF 对膜受体的刺激,碘离子可视为促 VEC 增殖的独立因素。② 碘离子通过刺激膜受体 VEGFR-2(Tyr1214)磷酸化水平上调,介导 VEC 迁移。③ 碘离子对 VEGFR-2 的 Tyr1175 位点的磷酸化无影响,其对 VEC 的促增殖效应并不是通过作用于膜受体。

【关键词】布-加综合征; 血管内皮细胞; 碘离子; 实验研究

中图分类号:R543.6 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2013)-06-0486-04

The relationship between iodide ion and vascular endothelial growth factor together with its receptor in vascular endothelial cell proliferation TENG Fei, ZU Mao-heng, HUA Qian-jin, WANG Lei. Department of Interventional Radiology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu Province 221006, China

Corresponding author: ZU Mao-heng, E-mail: zmh5011@sina.com

【Abstract】Objective To explore the relationship between iodide ion and vascular endothelial growth factor (VEGF) as well as its receptor in vascular endothelial cells (VEC) proliferation. Methods (1) The detection of the proliferation rate of vascular endothelial cell after it reacted to iodide ion and VEGF inhibitor was performed by using CCK-8 kit. (2) The detection of the influence of iodide ion on the phosphorylation of VEGFR-2 was carried out by using Western Blot technique. Results (1) The VEGF inhibitor could not suppress the proliferation of vascular endothelial cell in concentration of 300 $\mu\text{g/L}$ of iodide ion ($P < 0.05$). (2) A certain concentration of iodide ion could stimulate the phosphorylation of VEGF-2 (Tyr1214) ($P < 0.05$). (3) Iodide ion could not affect the phosphorylation of VEGF-2 (Tyr1175 and Tyr951 loci). Conclusion (1) Iodide ion can stimulate the proliferation of VEC, and it does not depended on the stimulation of membrane receptor from VEGF. Therefore, iodide ion can be regarded as an independent element in stimulating the proliferation of vascular endothelial cell. (2) The iodide ion can mediate the migration of vascular endothelial cell through stimulating the phosphorylation of VEGF-2 (Tyr1214). (3) The iodide ion has no effect on the phosphorylation of VEGFR-2 (Tyr1175). The stimulation of iodide ion to the proliferation of VEC is accomplished not by way of acting on the membrane receptor. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 486-489)

【Key words】Budd-Chiari syndrome; vascular endothelial cell; iodide ion; experimental study

基金项目: 国家自然科学基金主任基金资助项目(81141074)

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2013.06.011

作者单位: 221006 徐州医学院附属医院介入科

通信作者: 祖茂衡 E-mail: zmh5011@sina.com

布-加综合征(Budd-Chiari syndrome, BCS)是由肝静脉阻塞和(或)其开口以上的下腔静脉阻塞性病变引起,以门脉高压和(或)下腔静脉高压为特点

的肝后性门脉高压症,在我国下腔静脉隔膜阻塞(membranous obstruction of inferior vena cava, MOVc)型多见,其发病特征是下腔静脉肝静脉开口上方处隔膜形成,而隔膜的上下面均为血管内皮组织。国内流行病学调查显示,MOVc 型 BCS 患者分布地区的饮用水中碘含量超过正常标准^[1]。另外,有研究表明 BCS 患者血碘及尿碘均高于正常值^[2],且一定浓度的碘离子可促进 VEC 增殖^[3]。本研究通过体外培养血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC),探讨碘离子在 VEC 增殖过程中的作用机制,为 MOVc 型 BCS 患者下腔静脉隔膜形成原因的基础研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株培养

EA.hy926 人脐静脉内皮细胞融合细胞(目录号 GNHu39)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,使用 DMEM 高糖培养基(GIBCO 公司),加 10%胎牛血清(GIBCO 公司),置于 37℃、5% CO₂ 条件的培养箱中培养,至细胞贴壁生长汇合即可传代。

1.2 检测方法

1.2.1 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期的 VEC,胰酶消化后制成细胞悬液,用细胞计数板计数细胞,测定细胞密度,再用培养基稀释至 5×10^4 个/ml。将 VEGF 抑制剂 DMH4(Sigma 公司)制成溶液,浓度为 4.8 mg/ml,按要求使用溶媒为二甲基亚砜(DMSO)。将分析纯 KI 配制成碘离子浓度为 7.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的工作溶液。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(每孔加入 100 μl 细胞悬液,20 μl DMEM);②溶媒组(每孔加入 100 μl 细胞悬液,19 μl DMEM,1 μl DMSO);③KI 组(每孔加入 100 μl 细胞悬液,15 μl DMEM,5 μl KI);④DMH4 和 KI 共同作用组(每孔加入 100 μl 细胞悬液,10 μl DMEM,5 μl DMH4,5 μl KI);⑤DMH4 组(每孔加入 100 μl 细胞悬液,15 μl DMEM,5 μl DMH4)。以上各组均设 8 个复孔。其中③、④组碘离子终浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{L}$,④、⑤组 DMH4 终浓度为 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。随后置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h,更换新的 DMEM,每孔再加入 CCK-8 工作液 10 μl ,孵育 30 min。以 1 个 DMEM 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,各组 A 值均需去除 1 个最高值和 1 个最低值。各实验组的细胞相对增殖率

以各实验组 A 值与空白对照组 A 值的比值表示。以上实验重复 3 次。

1.4.2 Western 印迹法检测 VEGFR-2 磷酸化 取对数生长期 VEC 传代后,常规培养至 70% 细胞汇合,再以不加血清的 DMEM 培养基饥饿培养 24 h。随后根据加入碘离子的浓度不同,将细胞分为 5 组:①空白对照组:直接使用 DMEM 培养基培养。②碘离子组:向 DMEM 培养基中分别加入碘化钾,使碘离子终浓度分别为 100、300、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。加入碘离子后将细胞置培养箱中孵育 1 h。用冰 PBS 洗涤 3 次,每个培养皿加入 60 μl 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,使用 BCA 法测总蛋白浓度,并分装。取等量样品加入 SDS 上样缓冲液煮沸 5 min 后进行上样、电泳、转膜和免疫反应。一抗均以 1:500 稀释比稀释,二抗稀释比为 1:1 000。显色方法用 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(bioworld 公司)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,用 VEGFR-2/ β -actin, Phospho-VEGFR-2/ β -actin 的灰度值比值评定 VEGFR-2 及 Phospho-VEGFR-2(Tyr1175、Tyr1214、Tyr951)蛋白的表达水平。以上实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件行统计分析。检测结果以均值 \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)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 碘离子和 VEGF 抑制剂 DMH4 共同作用下 VEC 的增殖情况

空白对照组与溶媒组间 VEC 增殖率差异无统计学意义(1.00 ± 0.08 比 0.94 ± 0.06 , P > 0.05),提示 DMH4 的溶媒 DMSO 对本实验无影响。与空白对照组相比,DMH4 组 VEC 的增殖率显著降低(1.00 ± 0.08 比 0.57 ± 0.07 , P < 0.05),提示 DMH4 作为 VEGF 抑制剂,通过抑制 VEGF 的活性,对 VEC 增殖产生抑制作用。与空白对照组相比,KI 组细胞增殖率显著增高(1.00 ± 0.08 比 1.52 ± 0.12 , P < 0.05),提示在 300 $\mu\text{g}/\text{L}$ 碘离子环境中,碘离子刺激了细胞的增殖。而 DMH4 和 KI 共同作用组与空白对照组相比,增殖率亦显著提高(1.50 ± 0.13 比

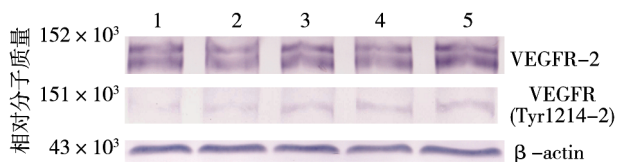
$1.00 \pm 0.00, P < 0.05$), 但与 KI 组无明显差异 ($P > 0.05$), 提示将 VEGF 的活性抑制后, 在 $300 \mu\text{g/L}$ 碘离子环境中, 细胞增殖率仍然增高。这些结果表明, $300 \mu\text{g/L}$ 碘离子环境能刺激 VEC 增殖; 在 $300 \mu\text{g/L}$ 碘离子环境中, 可抑制 VEGF 活性, 但并不能抑制 VEC 增殖。

2.2 碘离子对 VEGFR-2 的表达量及对 Tyr951、Tyr1175、Tyr1214 位点磷酸化水平的影响

Western 印迹法显示各碘离子组与空白对照组比较, VEGFR-2 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 各浓度碘离子组组间比较差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1、图 1。表明碘离子对内皮细胞膜受体 VEGFR-2 的总表达量无明显影响。

表 1 碘离子影响下 VEGFR-2 总蛋白及 Tyr1214 位点磷酸化蛋白的表达 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	相对表达量	
	VEGFR-2 总蛋白	Tyr1214 磷酸化蛋白
空白对照组	3.85 ± 1.41	0.04 ± 0.00
碘离子组		
100 $\mu\text{g/L}$	3.99 ± 1.73	0.10 ± 0.01
300 $\mu\text{g/L}$	3.38 ± 0.80	0.18 ± 0.01
500 $\mu\text{g/L}$	3.50 ± 1.45	0.18 ± 0.01
1 000 $\mu\text{g/L}$	3.51 ± 0.71	0.21 ± 0.04



注: 泳道 1 为空白对照组; 泳道 2 为 $I^- 100 \mu\text{g/L}$ 组; 泳道 3 为 $I^- 300 \mu\text{g/L}$ 组; 泳道 4 为 $I^- 500 \mu\text{g/L}$ 组; 泳道 5 为 $I^- 1 000 \mu\text{g/L}$ 组

图 1 碘离子对 VEGFR-2 表达量及 Tyr1214 位点磷酸化水平的影响

各碘离子组与空白对照组比较, VEGFR-2 (Tyr1214 位点) 磷酸化水平上调 ($P < 0.05$)。碘浓度 300、500、1 000 $\mu\text{g/L}$ 组与 100 $\mu\text{g/L}$ 组比较, 磷酸化水平上调 ($P < 0.05$)。碘浓度 300、500 和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组间两两比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1、图 1。表明不同浓度碘离子对内皮细胞膜受体 VEGFR-2 (Tyr1214) 磷酸化水平有不同程度的上调。

Western 印迹结果显示, 空白对照组未见 Tyr951、Tyr1175 位点的磷酸化蛋白印迹, 碘离子环境也没有诱导这 2 个位点的磷酸化改变。

3 讨论

流行病学调查显示, 我国报道的 MOVIC 型 BCS 病例地理分布状态与水源性高碘地区分布基本相符。BCS 患者尿碘测定显示碘水平明显高于正常对

照组。我们认为是饮水、饮食等使患者摄入了过量的碘, 这些碘在肠道被还原为碘离子后, 被肠道迅速吸收进入血浆, 经门静脉进入肝脏, 进入肝脏的碘, 一部分经肝静脉进入下腔静脉, 另一部分由肝脏装入胆汁中, 再进入消化道, 形成肝肠循环, 由此可见, 在人体循环系统中, 肝静脉开口处碘离子浓度最高。我们推测, 因含有高浓度碘离子的血流冲击下腔静脉管壁, 引起管壁血管内皮反复损伤、修复与增生, 最终形成隔膜样组织。因此, 我们认为碘离子可能是引起 BCS 患者下腔静脉隔膜形成的重要因素之一。

下腔静脉为纵行走向, 血管内皮增生也应该为纵行走向的管壁增厚, 然而下腔静脉隔膜与下腔静脉管壁成垂直相交走向, 由此我们认为下腔静脉隔膜形成在细胞层面除了存在 VEC 增殖外, 还存在 VEC 的横向迁移。

已有研究表明, 一定浓度的碘离子可促进 VEC 增殖。我们前期的实验显示, 碘离子未使 VEC 表达 VEGF 上调^[4], 说明碘离子促进 VEC 增殖的机制并不是通过促进 VEGF 表达上调实现的。为了明确碘离子是否与 VEGF 有协同作用, 本研究中使用 VEGF 抑制剂 DMH4 与适宜浓度的碘离子共同作用于细胞, 发现碘离子促进 VEC 增殖并不依赖于 VEGF 对膜受体的刺激, 将 VEGF 的活性抑制后, 碘离子仍能促进细胞增殖, 适宜浓度的碘离子可视为促 VEC 增殖的独立因素。因此, 我们考虑碘离子作为胞外刺激物, 引起细胞外环境改变, 直接或间接引起了膜受体的磷酸化。

VEGFR 是 VEC 的重要膜受体, 对于 VEC 的增殖和凋亡具有关键性的调节作用。VEGFR 家族中酪氨酸蛋白激酶受体包含有 3 种亚型, 即 VEGFR-1、VEGFR-2 和 VEGFR-3。VEGFR-2 主要分布在血管内皮细胞和淋巴管内皮细胞中, 具有很高的活性。研究表明第一信使刺激 VEC 增殖及凋亡、调控 VEC 迁移、调控 VEC 通透性的作用主要通过结合和激活 VEGFR-2 实现^[5]。

VEGFR-2 是一种 III 型跨膜蛋白激酶, 其激活通过磷酸化实现。VEGFR-2 存在多个磷酸化位点, 而不同位点的磷酸化可引起不同的下游信号蛋白激活, 引起细胞对应的生理或病理改变。其中几个重要的磷酸化位点分别为 Tyr951、Tyr1175 和 Tyr1214 等, 它们的下游通路各不相同^[6]。

我们将碘离子与 VEC 于体外共同培养, 观察碘离子对细胞膜产生的刺激作用, 发现 Tyr1175 位点

未检测出磷酸化蛋白印迹。由于 Tyr1175 位点及其下游信号通路介导 VEC 的促增殖效应,我们推测碘离子对 VEC 的促增殖效应并不是通过刺激膜受体 VEGFR-2,引起其 Tyr1175 位点磷酸化改变而实现的。碘离子对 VEC 的促增殖效应可能发生于细胞质,碘离子是否进入 VEC,直接对胞质内蛋白及信号转导通路产生影响还需深入研究。

针对调控 VEC 迁移的 2 个磷酸化位点,Tyr951 位点我们未检测出磷酸化印迹;而 Tyr1214 位点检测出磷酸化,并且实验组与对照组间磷酸化水平可见明显差异。说明碘离子可引起膜受体 VEGFR-2 (Tyr1214)磷酸化水平提高,结合 Grb2 的 SH2 结构域,进而激活 Cdc42/p38MAPK 信号通路,引起 VEC 胞内肌动蛋白重塑,张力纤维形成,VEC 迁移。

隔膜组织活检、完整隔膜切除后病理学研究显示,隔膜组织表面为 VEC,其下为疏松纤维结缔组织,深层为致密结缔组织及弹力纤维^[7]。将临床病理及体外培养实验结合起来,我们认为,MOVC 型 BCS 患者可能存在肝静脉开口角度过大,使肝静脉开口处血流切应力改变^[8],此改变可造成开口处 VEC 损伤,再加上血液生化环境改变,如血碘浓度过高,进一步促使 VEC 向血管腔迁移;同时含有纤维细胞、弹性纤维等结缔组织的内皮下层暴露于血液后可引起损伤处的修复反应,静止状态的纤维细胞转变为功能活跃的成纤维细胞,继而成纤维细胞增生修复并分泌胶原纤维,最终形成隔膜组织的结缔组织层。结缔组织层是隔膜的另一个重要组成部分,而结缔组织层形成时成纤维细胞发挥了重要的作用,有研究证明碘离子亦可促进成纤维细胞增殖^[9],而成纤维细胞增殖及胶原纤维形成过程中,碘离子的具体作用机制有待进一步研究。

此外,不同类型的 BCS 发病机制不同,因此研究的切入点也因型而异。国内尚无统一分型标准,大致可分为 4 种类型^[10]:单纯肝静脉病变(I 型)、下腔静脉隔膜阻塞(II 型)、下腔静脉隔膜阻塞伴远端腔内血栓形成(III 型)和下腔静脉节段性病变(IV 型)。其中 II、III、IV 型在国内多见,我们认为发病原因应该是近心端隔膜形成在先,远心端血栓形成在后,因为反之则应首先出现肺栓塞。因此,这 3 种类型发病机制的研究均应侧重于隔膜形成机制。而单

纯肝静脉病变主要表现为肝静脉广泛(或局限性)血栓、闭塞、狭窄形成,此型 BCS 在国内相对较少,而国外报道较多。

综上所述,本研究结合国内 MOVC 型发病率较高的流行病学特点,以 VEGFR-2 磷酸化为切入点,从 VEC 增殖及迁移的角度阐述了 MOVC 型 BCS 的可能发病机制,为此型 BCS 的基础研究提供了新的思路,从临床活检结果等方面看对 BCS 发病因素的揭示是有意义的。但此研究尚不能完全解释以肝静脉血栓形成为特点的单纯肝静脉型 BCS 的发病机制。

[参考文献]

- [1] 郭成浩,边建朝,王 佺,等.山东省菏泽地区隔膜型布-加综合征外环境饮水多元素测定 [J]. 中国地方病学杂志, 2005, 24: 91 - 93.
- [2] 金鲁明,郭成浩,边建朝,等.山东菏泽布-加综合征病人尿碘水平的测定 [J]. 中国地方病防治杂志, 2005, 20: 238 - 240.
- [3] 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.
- [4] 李鹏飞,滕 飞,庄银萍,等.碘对血管内皮细胞表达 VEGF 影响的研究 [J]. 徐州医学院学报, 2012, 32: 442 - 444.
- [5] Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis [J]. J Biochem Mol Biol, 2006, 39: 469 - 478.
- [6] Matsumoto T, Mugishima H. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis [J]. J Atheroscler Thromb, 2006, 13: 130 - 135.
- [7] 王 佺,张 辉,郭成浩,等.下腔静脉隔膜阻塞型布-加综合征的病理学及病因学研究 [J]. 介入放射学杂志, 2008, 17: 500 - 503.
- [8] 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.
- [9] 孙本成,张 芮,王一兵,等.碘化钾对人体皮肤成纤维细胞增殖活性的影响 [J]. 山东大学学报:医学版, 2009, 47: 55 - 57, 61.
- [10] 徐 克,有 慧,苏洪英,等. Budd-Chiari 综合征血管病变的分型与临床研究 [J]. 中华放射学杂志, 2003, 37: 896 - 900.

(收稿日期:2012-12-02)

(本文编辑:侯虹鲁)