

·实验研究 Experimental research·

转化生长因子 $\beta 1$ 及其受体与高碘促成纤维细胞增殖作用的相关性研究

华浅近, 祖茂衡, 胡琳, 庄银苹

【摘要】目的 研究转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 及其受体 I (TGF- βR I) 与高碘促成纤维细胞增殖作用的相关性, 探索布-加综合征 (BCS) 隔膜组织形成机制。**方法** 实验分为 5 组, 空白对照组、溶剂组、KI 组、TGF- βR I 抑制剂 (SD-208) 组和 SD-208 和碘化钾 (KI) 共同作用组。采用 CCK-8 法检测 TGF- βR I 抑制剂对高碘培养环境中成纤维细胞增殖率的影响; 采用免疫印迹法检测不同浓度 (0、250、500、1 000、2 000、3 000 $\mu\text{g/L}$) 碘离子对成纤维细胞 TGF- $\beta 1$ 、TGF- βR I 蛋白表达的影响。**结果** ① 在 1 000 $\mu\text{g/L}$ 碘培养环境中, KI 与 SD-208 共同作用组成纤维细胞增殖率 (1.29 ± 0.41) 高于 SD-208 组 (0.52 ± 0.10), 而低于 KI 组 (1.70 ± 0.03), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。② 1 000 $\mu\text{g/L}$ 和 2 000 $\mu\text{g/L}$ 高碘组成纤维细胞 TGF- $\beta 1$ 蛋白相对表达量高于其他各组 ($P < 0.05$)。各组间成纤维细胞 TGF- βR I 蛋白相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** ① 高碘因素可能通过提高成纤维细胞 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达而促进成纤维细胞增殖; ② 高碘导致的成纤维细胞增殖可能与 BCS 隔膜形成相关。

【关键词】 布-加综合征; 成纤维细胞; 碘; 细胞因子类; 隔膜阻塞

中图分类号: R543.6 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2014)-05-0431-04

The effect of TGF- $\beta 1$, TGF- βR I and high concentration iodine in the promotion of fibroblast proliferation: correlation study HUA Qian-jin, ZU Mao-heng, HU Lin, ZHUANG Yin-ping.
Department of Interventional Radiology, the 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 study the relationship between transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), transforming growth factor- β receptor I (TGF- βR I) and high concentration iodine in promoting fibroblast proliferation so as to explore the pathogenesis of the membranous formation in Budd-Chiari syndrome. **Methods** The experiment included five groups: blank control group, solvent group, KI group, TGF- βR I inhibitor group (SD-208) and SD-208 plus KI combination group. ① Fibroblasts were cultured in high content of iodine and treated with TGF- βR I inhibitor then the fibroblast proliferation activity was determined by CCK-8 assay. ② The protein expressions of TGF- $\beta 1$ and TGF- βR I of fibroblasts in different concentrations of iodine (0, 250, 500, 1 000, 2 000 and 3 000 $\mu\text{g/L}$) were determined by Western-blot method. **Results** ① When the culture solution was of 1 000 $\mu\text{g/L}$ iodine concentration, the cell proliferation rate of the SD-208 plus KI combination group ($A: 1.29 \pm 0.41$) was significantly higher than that of the control group (0.52 ± 0.10), but significantly lower than that of the KI group (1.70 ± 0.03) with $P < 0.05$. ② Fibroblast TGF- $\beta 1$ protein relative expression levels in the groups with the iodine concentration of 1 000 $\mu\text{g/L}$ and 2 000 $\mu\text{g/L}$

were significantly higher than those of the other groups ($P < 0.05$). No significant difference in fibroblast TGF- βR I protein relative expressions existed between each other groups ($P > 0.05$). **Conclusion** ① High concentration of iodine may promote the proliferation of fibroblasts through raising TGF- $\beta 1$ protein expression. ② The

基金项目: 江苏省科技创新与成果转化专项基金资助项目 (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.2014.05.016

作者单位: 221002 徐州医学院附属医院介入放射科 (华浅近、祖茂衡、胡琳); 徐州医学院医学影像学院布-加综合征实验室 (庄银苹)

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

proliferation of fibroblasts caused by high concentration of iodine may be related to the membranous formation in Budd-Chiari syndrome. (J Intervent Radiol, 2014, 23: 431-434)

【Key words】 Budd-Chiari syndrome; fibroblast; iodine; cytokine; membranous obstruction

隔膜阻塞型布-加综合征 (Budd - Chiari syndrome, BCS) 的特征是下腔静脉和(或)肝静脉开口处隔膜形成,而隔膜的形成机制至今尚未阐明^[1]。近年来国内流行病学研究发现,BCS 高发区饮用水碘含量超标,其发病率与水碘含量呈正相关^[2]。基础研究发现,BCS 的隔膜组织主要由成纤维细胞、内皮细胞、胶原纤维等构成^[3];一定浓度的高碘培养环境能促进成纤维细胞、内皮细胞增殖^[4]。另外,隔膜组织中转生长因子 β 受体 (transforming growth factor- β receptor, TGF- β R) 表达明显高于正常血管壁组织^[5]。

本研究在体外高碘环境中培养成纤维细胞,研究高碘促成纤维细胞增殖作用与 TGF- β 1、TGF- β R I 的相关性,以探讨 BCS 隔膜形成的机制。

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,使用 F12K 培养基(美国 Sigma 公司),加 10%胎牛血清(美国 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,选取第 5~6 代细胞用于实验。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测细胞增殖情况 取对数生长期的成纤维细胞,经胰酶消化后制备成细胞悬液。用细胞计数板作细胞计数,测定细胞密度,再使用培养基稀释至 5×10^4 个/ml。将 TGF- β R I 抑制剂 SD-208(Sigma 公司)用二甲基亚砜(DMSO)溶解后再加入双蒸水配成 8.5 mg/L 工作溶液。将分析纯碘化钾(KI)配制成 I 浓度为 24 mg/L 的工作溶液。将细胞悬液接种至 96 孔板中(密度约为 5 000 个/孔),分为 5 组:①空白对照组(每孔加入 100 μ l 细胞悬液和 20 μ l F12K 培养基),②溶媒组(每孔加入 100 μ l 细胞悬液、19 μ l F12K 培养基和 1 μ l DMSO),③ KI 组(每孔加入细胞悬液 100 μ l、F12K 培养基 15 μ l 和 KI 5 μ l),④ SD-208 组(每孔加入细胞悬液 100 μ l、F12K 培养基 15 μ l 和 SD-208 5 μ l),⑤ SD-208 和 KI 共同作用组(联合组,每孔

加入细胞悬液 100 μ l、F12K 培养基 10 μ l、SD-208 5 μ l、KI 5 μ l)。以上各组均作 6 个复孔。其中③、⑤组 I-终浓度为 1 000 μ g/L,④、⑤组 SD-208 终浓度为 1 μ mol/L。随后于培养箱中静置培养 16 h,更换新的 F12K 培养基,每孔再加入 CCK-8 工作液 10 μ l,孵育 40 min。以 1 个 F12K 培养基加 CCK-8 工作液孔作为本底调零,于 450 nm/L 波长处测定各孔吸光度(A)值,间接反映细胞数量,各组 A 值均去除 1 个最高值和 1 个最低值。以上实验重复 3 次。

1.2.2 Western 印迹法检测 TGF- β 1、TGF- β R I 蛋白表达 取对数生长期成纤维细胞 1:6 传代,培养 48 代后换液,设空白对照组和高碘组。空白对照组直接使用 F12K 培养基培养;高碘组在 F12K 培养基中分别加入碘化钾,使 I-终浓度分别为 250、500、1 000、2 000 和 3 000 μ g/L,再将细胞于培养箱中孵育 12 h。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,使用 BCA 法测蛋白浓度、SDS-PAGE 电泳、转膜和免疫反应。TGF- β 1 一抗 (Abcam 公司)以 1:500 稀释,TGF- β R I 一抗 (Abcam 公司)以 1:250 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 TGF- β 1/ β -actin, TGF- β R I / β -actin 的灰度值比值评定 TGF- β 1 及 TGF- β R I 蛋白表达水平。以上实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS16.0 软件。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 不同条件影响成纤维细胞的增殖情况

空白对照组与溶媒组细胞增殖率差异无统计学意义($P > 0.05$);KI 组细胞增殖率明显高于对照组,SD-208 组细胞增殖率明显低于对照组,联合组细胞增殖率高于对照组但低于 KI 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 不同条件影响成纤维细胞的增殖情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	成纤维细胞增殖率(A 值)
空白对照组	18	1.06 \pm 0.13
溶媒组	18	1.02 \pm 0.11
KI 组	18	1.70 \pm 0.03 ^a
SD-208 组	18	0.52 \pm 0.10 ^a
联合组	18	1.29 \pm 0.41 ^a

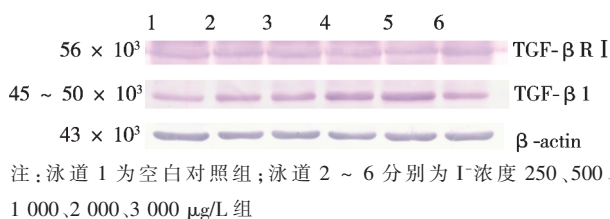
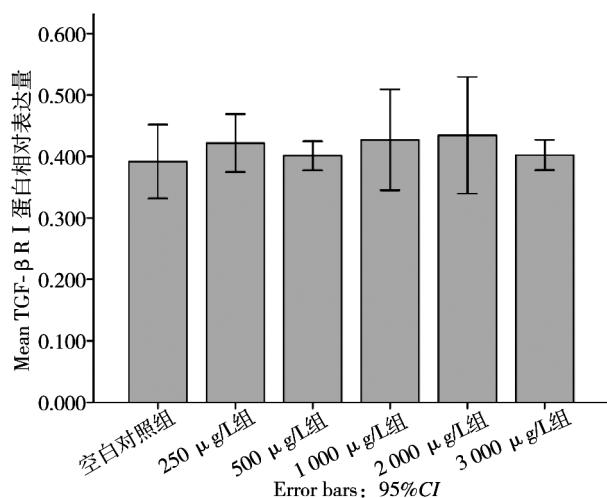
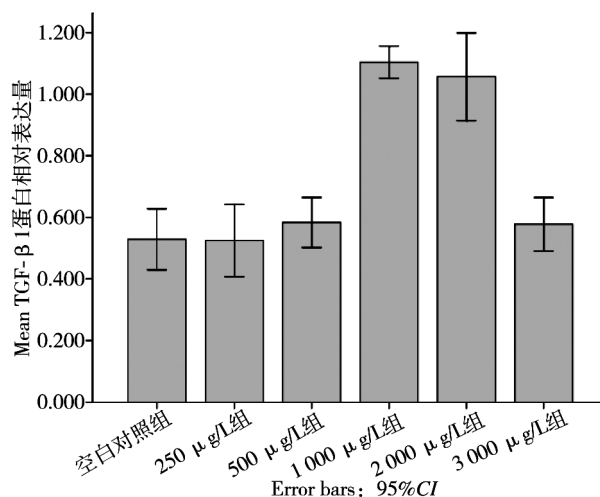
注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

2.2 不同浓度 I 对 TGF- β 1、TGF- β R I 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,不同 I 浓度组的 TGF- β R I 蛋白相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 但 1 000、2 000 $\mu\text{g/L}$ I 浓度组的 TGF- β 1 蛋白相对表达量明显提高 ($P < 0.05$), 1 000 $\mu\text{g/L}$ 与 2 000 $\mu\text{g/L}$ I 浓度组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2, 图 1 ~ 3。

表 2 不同浓度 I 对 TGF- β 1、TGF- β R I 蛋白表达的影响

组别	标本数	蛋白相对表达量	
		TGF- β R I	TGF- β 1
空白对照组 I 浓度	3	0.392 \pm 0.024	0.529 \pm 0.039
250 $\mu\text{g/L}$ 组	3	0.422 \pm 0.019	0.525 \pm 0.047
500 $\mu\text{g/L}$ 组	3	0.401 \pm 0.010	0.583 \pm 0.033
1 000 $\mu\text{g/L}$ 组	3	0.427 \pm 0.033	1.104 \pm 0.021 ^a
2 000 $\mu\text{g/L}$ 组	3	0.434 \pm 0.038	1.056 \pm 0.057 ^a
3 000 $\mu\text{g/L}$ 组	3	0.402 \pm 0.010	0.577 \pm 0.035

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$ 图 1 TGF- β 1、TGF- β R I 蛋白在不同 I 浓度中的表达图 2 不同 I 浓度对 TGF- β R I 蛋白相对表达量的影响图 3 不同 I 浓度对 TGF- β 1 蛋白相对表达量的影响

3 讨论

我们曾检测 74 例下腔静脉隔膜阻塞型 BCS 患者下腔静脉血液中 TGF- β 1 浓度, 发现明显高于非 BCS 患者^[6]。结合已发现的隔膜组织中 TGF- β R 表达明显高于正常血管壁组织的结果^[5], 我们认为 TGF- β 家族与 BCS 隔膜形成存在密切关系。TGF- β 是一类促进细胞增殖和转化的细胞因子超家族, 是目前公认的对纤维化最重要的调控因子^[7]。TGF- β 1 能促进成纤维细胞过度增殖、分化, 继而促进胶原蛋白等细胞外基质 (ECM) 在肺间质和肺泡间过度积聚^[8]。

本研究中使用的 SD-208 为 TGF- β R I 激酶抑制剂^[9-10], 结果显示 KI 组细胞增殖率明显高于对照组, 与张海涛等^[4]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。本文中 SD-208 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 TGF- β 1 和 (或) TGF- β R I 作用。联合组细胞增殖率低于 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 TGF- β /TGF- β R I 途径刺激而实现, 还存在其他作用途径。我们前期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 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、成纤维细胞生长因子受体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR) 关系发现, 高碘因素可通过对 FGF/FGFR 途径刺激而促进成纤维细胞增殖^[11]。

碘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。前期研究中发现高碘对成纤维细胞 FGFR2 蛋白

表达也存在剂量-效应关系^[11]。本研究中, Western 印迹结果显示, I 浓度 1 000 和 2 000 $\mu\text{g/L}$ 组 TGF- β 1 蛋白表达明显提高, 表明高碘可通过上调 TGF- β 1 蛋白表达量对成纤维细胞产生促增殖作用, 但 I 浓度 3 000 $\mu\text{g/L}$ 组的 TGF- β 1 蛋白表达量低于 1 000 $\mu\text{g/L}$ 和 2 000 $\mu\text{g/L}$ 组, 与对照组比较无明显差异, 说明高碘对成纤维细胞 TGF- β 1 蛋白表达的影响也存在剂量-效应关系。各组中成纤维细胞 TGF- β R I 蛋白表达量比较无明显差异, 表明高碘对成纤维细胞产生促增殖作用并非通过提高 TGF- β R I 蛋白表达量实现。高碘对 TGF- β R 其他亚型的蛋白表达是否存在影响还需进一步证实。

TGF- β 1 的过度表达可强化 TGF- β 1/Smads 信号转导通路, 能够刺激成纤维细胞有丝分裂促进其增殖, 并诱导其转化为肌成纤维细胞而产生 ECM^[12]。另一方面, 抑制基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9 等合成, 促进蛋白酶抑制剂的合成以阻止基质降解, 并调节细胞表面整合素的表达, 以增强新生基质与细胞的黏附和组合, 使新生基质得以稳定和积聚^[13]。TGF- β 1 的高表达可促进成纤维细胞的增殖和转化导致 ECM 合成和沉积, 稳定新生基质, 最终导致纤维化的发生。

本研究发现高碘通过提高成纤维细胞 TGF- β 1 蛋白表达量促进其增殖, 这与 BCS 隔膜组织检测到增殖的成纤维细胞、BCS 患者下腔静脉血液中高浓度 TGF- β 1 结果相一致。另外, 韩新强等^[14]发现下腔静脉隔膜阻塞型(MOVC)BCS 患者下腔静脉血液中 VEGF 的含量明显高于正常人, 而 TGF- β 1 在刺激成纤维细胞增殖时还能诱导成纤维细胞分泌内源性和外源性 VEGF^[15]。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肝静脉开口处血管壁损伤^[16], 而患者血液中高碘因素促进损伤处成纤维细胞 FGFR2 蛋白表达量^[11]和 TGF- β 1 分泌, 并通过细胞因子间的交互作用促进 VEGF 等表达提高, 进而共同促进细胞增殖、迁移。因此, 高碘导致的成纤维细胞增殖可能与隔膜形成存在相关性。

[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] 肖培瑞, 蔺新英, 郭成浩, 等. 布-加综合征地理分布与饮用水碘含量的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27: 130 - 133.
- [3] 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.
- [4] 张海涛, 李加美, 郭成浩, 等. 高碘对体外培养成纤维细胞增殖活性的影响[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24: 391 - 393.
- [5] Zhang XM, Li QL. Radical surgery for Budd-Chiari syndrome through exposure of the entire inferior vena cava of the hepatic segment[J]. Chin Med J, 2007, 120: 626 - 629.
- [6] 华浅近, 祖茂衡, 庄银苹, 等. 转化生长因子 131, 碱性成纤维细胞生长因子在下腔静脉隔膜阻塞型布-加综合征患者中的表达及意义[J]. 徐州医学院学报, 2013, 33: 442 - 444.
- [7] 李超, 徐月敏, 刘章顺. TGF- β 1 表达对成纤维细胞胶原分泌影响的实验研究 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2012, 17: 435 - 438.
- [8] Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, et al. Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling[J]. Biol Chem, 2005, 280: 3078 - 3087.
- [9] Uhl M, Aulwurm S, Wischhusen J, et al. SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and *in vivo* [J]. Cancer Res, 2004, 64: 7954 - 7961.
- [10] de Gouville AC, Boullay V, Krysa G, et al. Inhibition of TGF-beta signaling by an ALK5 inhibitor protects rats from dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis [J]. Br J Pharmacol, 2005, 145: 166 - 177.
- [11] 华浅近, 祖茂衡, 滕飞, 等. 高碘促成纤维细胞增殖作用与 bFGF, FGFR2 关系的研究 [J]. 介入放射学杂志, 2013, 22: 1021 - 1025.
- [12] Massagué J. How cells read TGF- β signals[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000, 1: 169 - 178.
- [13] 庞久玲, 刘爱东, 刘军. 转化生长因子 β 1 和基质金属蛋白酶在病理性瘢痕中的表达及意义 [J]. 实用医学杂志 2010, 26: 3175 - 3176
- [14] 韩新强, 祖茂衡. 血管性血友病因子、内皮素-1 和血管内皮生长因子在下腔静脉隔膜型布-加综合征中异常表达的意义 [J]. 中华放射学杂志, 2011, 45: 580 - 583
- [15] 李小平, 邱丹, 黄毅, 等. TGF- β 1 诱导人胎肺成纤维细胞分泌血管内皮生长因子以及布地奈德的调控作用[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31: 2695 - 2698
- [16] 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: 2013-10-22)

(本文编辑: 侯虹鲁)