

• 实验研究 Experimental research •

血管内皮细胞增殖过程中碘离子与 MEK1 表达及磷酸化关系的研究

胡 琳, 祖茂衡, 华浅近, 王 丹

【摘要】 目的 研究血管内皮细胞(VEC)增殖过程中碘离子(I⁻)与丝裂原活化蛋白激酶 1(MEK1)表达及其磷酸化的关系,探讨高碘促 VEC 增殖效应的作用通路。方法 ① 将体外培养的 VEC 分为空白对照组和不同碘离子浓度的实验组。② 采用蛋白质印迹技术(Western blot)检测不同碘离子浓度培养环境中 MEK1 蛋白表达量及磷酸化水平。结果 ① 在 300 μg/L 碘离子浓度组,MEK1 蛋白相对表达量高于其他组($P < 0.05$)。② 500 μg/L、1 000 μg/L 碘离子浓度可促进 MEK1(Ser298 位点)磷酸化水平上调($P < 0.05$)。③ 各实验组 MEK1(Thr286 位点)磷酸化水平下调($P < 0.05$)。结论 碘促 VEC 增殖可能与胞外信号调节激酶(ERK)通路的激活有关。

【关键词】 布加综合征; 血管内皮细胞; 碘离子

中图分类号:R543.5 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2015)-02-0150-04

The relationship between iodine ion and the expression of both MEK1 and its phosphorylation during the course of vascular endothelial cell proliferation HU Lin, ZU Mao-heng, HUA Qian-jin, WANG Dan. 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 iodine ion and the expression of both MEK1 and its phosphorylation during the course of vascular endothelial cell (VEC) proliferation, and to explore the pathway of the promoting effect of iodine ion on VEC proliferation. Methods ① The vascular endothelial cells cultured in vitro were divided into the control group (without any treatment) and four KI groups (treated with 100 μg/L KI, 300 μg/L KI, 500 μg/L K and 1 000 μg/L KI, respectively). ② The effects of iodine ion concentration (100 μg/L, 300 μg/L, 500 μg/L and 1 000 μg/L, respectively) on the expression of MEK1 and its phosphorylation were determined using Western Blot method. Results ① The expression of MEK1 in 300 μg/L KI group was higher than that in other groups ($P < 0.05$). ② The MEK1 phosphorylation levels at Ser298 site in iodine ion concentration of 500 μg/L and 1 000 μg/L groups were significantly increased ($P < 0.05$). ③ The MEK1 phosphorylation levels at Thr286 site in all different iodine ion concentration groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Conclusion The promotion effect of iodine ion on vascular endothelial cell proliferation is related to the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signal transduction. (J Intervent Radiol, 2015, 24; 150-153)

【Key words】 Budd-Chiari syndrome; vascular endothelial cell; iodine ion

我国布加综合征(Budd-Chiari syndrome, BCS)以下腔静脉隔膜阻塞型(membranous obstruction of

the inferior vena cava, MOVC)为主,其特征是下腔静脉和(或)肝静脉开口处隔膜形成。病理学研究发现隔膜组织主要由血管内皮和纤维组织构成^[1-2]。同时流行病学研究显示该型患者分布与水源性高碘地区分布相符^[3]。针对碘离子(I⁻)与血管内皮细胞(VEC)增殖的关系,研究显示碘不促进 VEC 合成血管内皮生长因子(VEGF)^[4],且高碘环境未诱导 VEGF 受体

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2015.02.015

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)

作者单位:221002 江苏 徐州 徐州医学院附属医院介入放射科
通信作者:祖茂衡 E-mail: cjr.zumaoheng@vip.163.com

(VEGFR)与 VEC 增殖有关的位点磷酸化改变^[5]。但细胞增殖检测显示碘促 VEC 增殖可能与 MEK1 激活有关^[6],提示高碘促 VEC 增殖效应可能发生于细胞质。

本研究在体外用不同浓度 I⁻培养 VEC,检测 MEK1 的表达及调控增殖相关位点 Ser298、Thr286 的磷酸化水平,探讨高碘促 VEC 增殖效应的作用通路。

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

Western blot 检测丝裂原活化蛋白激酶 1 (MEK1)蛋白表达及磷酸化:取对数生长期内皮细胞 1:5 传代,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。随后根据加入浓度不同 I⁻,将细胞分 5 组:① 空白对照组,直接使用 DMEM 培养基培养;② 高碘组,向 DMEM 培养基中分别加入碘化钾,使 I⁻终浓度分别为 100、300、500 和 1 000 μg/L。再将细胞于培养箱中孵育 12 h。用冰 PBS 洗涤 3 次,每个皿中加入 80 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 法测蛋白浓度并分装。取等量样品加入上样缓冲液煮沸 5 min 后上样、电泳、转膜和免疫反应。MEK1、p-MEK1 (Ser298)、p-MEK1 (Thr286)一抗均以 1:1 000 稀释,二抗稀释比亦为 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 MEK1、p-MEK1(Ser298)、p-MEK1(Thr286)各自与 β-actin 的灰度值的比值评定 MEK1 及 p-MEK1(Ser298、Thr298)蛋白表达水平。以上实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

用 SPSS16.0 软件行统计分析,计量数据结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组之间比较采用独立样本 *t* 检验,多组之间比较采用单因素方差分析

(one-way ANOVA),多组之间两两比较采用 LSD 法或 Tamhane's T2 法。以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

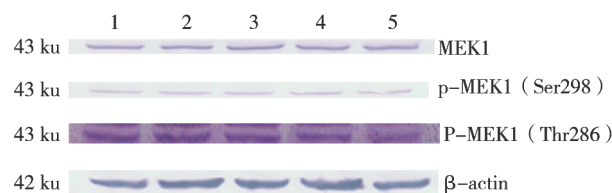
2.1 I⁻对 MEK1 蛋白表达的影响

各碘浓度组与空白组比较,300 μg/L 组 MEK1 蛋白相对表达量较空白对照组明显提高,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 1、图 1。

表 1 不同浓度碘环境中 MEK1 总蛋白及 Ser298、Thr286 位点磷酸化蛋白的表达

组别	标本数	蛋白相对表达量		
		MEK1	p-MEK1 (Ser298)	p-MEK1 (Thr286)
空白对照组	3	0.459 ± 0.118	0.148 ± 0.007	0.217 ± 0.005
KI 组(μg/L)				
100	3	0.463 ± 0.007	0.138 ± 0.006	0.202 ± 0.004 ^a
300	3	0.549 ± 0.007 ^a	0.142 ± 0.009	0.169 ± 0.002 ^{ab}
500	3	0.449 ± 0.008	0.181 ± 0.004 ^a	0.162 ± 0.001 ^{ab}
1 000	3	0.463 ± 0.014	0.190 ± 0.007 ^a	0.167 ± 0.002 ^a

注:与空白对照组比较 ^a*P* < 0.05;组间比较 ^b*P* < 0.05;KI:碘化钾



注:泳道1为空白对照组,泳道2~5分别为碘离子浓度100 μg/L、300 μg/L、500 μg/L、1 000 μg/L组

图 1 MEK1、p-MEK1(Ser298)、p-MEK1(Thr286)在各组中的表达

2.2 I⁻对 Ser298 位点磷酸化的影响

与空白对照组比较,500 μg/L 组和 1 000 μg/L 组的 MEK1 (Ser298) 蛋白磷酸化水平上调 (*P* < 0.05),500 μg/L 组和 1 000 μg/L 组的组间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.3 I⁻对 Thr286 位点磷酸化的影响

各离子组与空白对照组比较,MEK1(Thr286)蛋白磷酸化水平下调(*P* < 0.05);碘浓度 300 μg/L 组、500 μg/L 组、1 000 μg/L 组与 100 μg/L 组比较,磷酸化水平下调 (*P* < 0.05);300 μg/L 组、500 μg/L 组、1 000 μg/L 组组间两两比较,仅 500 μg/L 组较 300 μg/L 组磷酸化水平下调,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

3 讨论

3.1 I⁻与 VEC 增殖作用及增殖途径的探讨

与国外不同,我国 BCS 患者以 MOVc 型多见,

隔膜由不含弹性蛋白的纤维组织表面覆盖内皮细胞构成^[7],并与下腔静脉管壁相延续^[1]。国内流行病学调查显示 MOVC 型患者分布与水源性高碘地区分布相符,患者尿碘水平亦高于正常人^[3]。目前研究显示患者血清中碘含量明显高于正常人(未发表资料)。在体外培养 VEC 发现一定浓度的 I⁻能够促进其增殖^[8-9],我们认为 I⁻可能是引起下腔静脉隔膜形成的重要因素之一。

我们的前期研究发现 MOVC 型 BCS 患者下腔静脉血中 VEGF 含量明显高于非 BCS 对照组^[10],但体外高碘培养的 VEC 并未出现 VEGF 的高表达^[4],且 I⁻对细胞膜受体 VEGFR-2 的总表达量无影响,同时介导细胞增殖的 VEGFR-2 Tyr1175 位点的磷酸化水平未出现上调^[5],提示 I⁻促 VEC 增殖效应不依赖于 VEGF 和 VEGFR 的高表达。VEC 增殖检测发现 I⁻促增殖效应可能与 MEK1 的激活有关^[6],以此为切入点,我们推测 I⁻可能直接作用于细胞质,激活 ERK 通路引起细胞增殖效应。

ERK 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)家族的一员,是调节细胞生长、发育及分裂的信号网络的枢纽。Ras/Raf-1/MEK1/ERK1/2 是 ERK 通路的主要途径^[11],Raf-1 是 MAPK 级联反应的启动蛋白,一旦被上游蛋白 Ras 激活,可与 MEK1 结合并使之磷酸化,活化的 MEK1 连接并激活 ERKs,ERKs 进入细胞核,直接激活大量的转录因子^[12],发挥细胞增殖效应。

3.2 I⁻与 MEK1、p-MEK1(Ser298、Thr286)蛋白表达的关系及意义

MEK1 是调控 ERK 通路级联反应的核心,300 $\mu\text{g/L}$ 组的 MEK1 蛋白高表达,提示 I⁻可能通过提高 MEK1 的蛋白表达量来发挥 VEC 增殖效应。其激活是通过磷酸化实现的,MEK1 存在多个磷酸化位点,其中两个重要位点 Ser298 和 Thr286 的磷酸化对 MEK1 活性的影响截然不同,并对随后的酶促级联反应有不同的调控作用。

本研究的 Western blot 结果显示,I⁻浓度 500 $\mu\text{g/L}$ 组和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组较对照组的 Ser298 位点磷酸化水平明显上调,提示高浓度 I⁻能让 Ser298 位点的磷酸化水平上调。碘对体外培养的 VEC 有刺激增殖的作用,这种作用与 I⁻浓度及作用时间有关,高浓度 I⁻组细胞数量及细胞活性明显升高所需的作用时间短于低浓度 I⁻组,低浓度 I⁻组需延长作用时间才显示出细胞数量及活性的明显升高^[9],高碘对 VEC 的作用呈现出剂量-时间-效应关系。鉴于本实验中 I⁻

作用 12 h 后即提取各组蛋白以备用,我们推测 100 和 300 $\mu\text{g/L}$ 组在延长培养时间后 Ser298 的磷酸化水平也较对照组上调。位点 Ser298 位于 MEK1 第 IX 至 X 催化区之间的多聚脯氨酸序列中,Ser298 的磷酸化可最大化 Raf-1 和 MEK1 的结合作用,并增强 MEK1 的活化^[13]。活化的 MEK1 通过其 N 端区域与 ERKs 直接连接,催化 ERK 的亚功能区 8“TEY 盒”中的 Tyr 和 Thr 残基双特异性磷酸化,激活 ERK,随后发挥细胞增殖效应。MEK1 不仅仅是 ERK 的激活物,还可能是 ERK 在胞质中的锚定器,当信号通路无活性时,它将 ERK 固定在胞质中,一旦有信号刺激 ERKs 磷酸化及二聚体化,可激活 ERKs 并将其转移到胞核或其他活化位点,再进一步磷酸化下游底物。

与对照组比较,各实验组 Thr286 磷酸化水平下调;与 100 $\mu\text{g/L}$ 组比较,300、500 和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组 Thr286 磷酸化水平下调;500 $\mu\text{g/L}$ 组较 300 $\mu\text{g/L}$ 组 Thr286 磷酸化水平下调。Thr286 的磷酸化直接灭活 MEK1^[14],引起随后 MEK1 和 ERK 的解偶联^[15],从而使 MAPK 级联反应终止。所以在细胞周期中,Thr286 可能是终止细胞有丝分裂的调控点^[14]。本研究中,各实验组较对照组的差异及实验组组间的差异提示 I⁻可引起 MEK1 (Thr286) 磷酸化水平的下调,并且在一定浓度范围内,随着 I⁻浓度的增高,ERK 通路的负向调控作用逐渐减弱。

综上所述,本研究通过 I⁻促 VEC 增殖的作用通路,探讨 MOVC 型 BCS 的可能发病机制,本研究中不同浓度 I⁻可以促进 MEK1 蛋白高表达及 MEK1 (Ser298、Thr286) 的磷酸化水平改变,提示 I⁻促 VEC 增殖效应最终是通过 ERK 通路的激活来实现的。但本研究不能确定 I⁻是否直接作用于 MEK1,且 100 $\mu\text{g/L}$ 组与 300 $\mu\text{g/L}$ 组延长 I⁻培养细胞时间是否能上调 Ser298 位点的磷酸化水平需跟进观察。作为 MAPK 家族成员,ERK 通路与其他细胞内信息传递通路相互联系和作用,是调节细胞生长、发育及分裂的信息网络的中枢,其各级酶促级联反应易受其他通路及各种细胞因子的调控,I⁻促 VEC 增殖效应是否经其他通路激活 ERK 通路也有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 王 俊,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.
- [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] 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] 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.
- [6] 李鹏飞, 滕 飞, 庄银萍, 等. 碘促进血管内皮细胞增殖作用与 MEK1 相关性及碘对血管内皮细胞表达 VEGF 影响的实验研究[J]. 当代医学, 2012, 18: 13 - 15.
- [7] Riemens SC, Haagsma EB, Kok T, et al. Familial occurrence of membranous obstruction of the inferior vena cava: arguments in favor of a congenital etiology[J]. J Hepatol, 1995, 22: 404 - 409.
- [8] 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.
- [9] 刘 伦, 焦 波, 郭成浩. 碘伏对血管内皮细胞增殖的影响 [J]. 山东医药, 2007, 47: 46 - 47.
- [10] 韩新强, 祖茂衡. VEGF 在下腔静脉隔膜型布-加综合征患者中异常表达的意义分析[J]. 当代医学, 2010, 16: 672 - 674.
- [11] 赵明哲, 刘靖华, 李玉花, 等. ERK 信号通路的信号转导调控机制[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009, 29: 15 - 19.
- [12] Coles LC, Shaw PE. PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf - 1 kinase during cross - cascade activation of the ERK pathway[J]. Oncogene, 2002, 21: 2236 - 2244.
- [13] Frost JA, Steen H, Shapiro P, et al. Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins [J]. EMBO J, 1997, 16: 6426 - 6438.
- [14] Sharma P, Sharma M, Amin ND, et al. Phosphorylation of MEK1 by cdk5/p35 down-regulates the mitogen-activated protein kinase pathway[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 528 - 534.
- [15] Ramos-Miguel A, García-Sevilla JA. Crosstalk between cdk5 and MEK-ERK signalling upon opioid receptor stimulation leads to upregulation of activator p25 and MEK1 inhibition in rat brain [J]. Neuroscience, 2012, 215: 17 - 30.

(收稿日期: 2014-07-09)

(本文编辑: 李 欣)

·消 息·

上海市疾病预防控制中心第二届肿瘤介入治疗 专业委员会成立

上海市疾病预防控制中心第二届肿瘤介入治疗专业委员会成立会议, 于 2015 年 1 月 30 日下午在复旦大学附属中山医院顺利召开。会上, 上海市疾病预防控制中心肿瘤科郑莹主任介绍了此次肿瘤介入治疗专业委员会换届过程和结果, 并提出上海市疾病预防控制中心工作重点及对新一届肿瘤介入治疗专业委员会的工作要求。接着, 第一届肿瘤介入治疗专业委员会主任委员程永德教授作了热情洋溢的讲话, 他回顾了 2000 年上海市疾控中心介入治疗专题组成立 10 多年来发展情况及开展的一系列工作, 特别是在疾控中心的支持下, 团结上海市肿瘤介入治疗领域的专家编辑、出版了《上海市常见恶性肿瘤介入治疗指南》, 并于 2013 年由科学出版社正式出版了《常见恶性肿瘤介入治疗指南》。该书发行后不仅受到上海介入界的欢迎, 也得到其他省市、自治区肿瘤介入专家的好评, 认为这是一个创举, 带了一个好头。最后, 第二届肿瘤介入治疗专业委员会主任委员颜志平教授致辞, 他高度赞扬以程永德主任委员为首的上一届肿瘤介入治疗专业委员会的工作成绩, 感谢程永德教授的让贤风格。并表示将带领新一届专业委员会成员, 在前任良好工作的基础上, 在疾控中心领导的支持帮助下, 在副主任委员、顾问及全体委员同仁的共同努力下积极开展工作, 充分发挥肿瘤介入诊疗技术的作用, 为上海乃至全国的肿瘤防治工作作出应有的贡献。

郑莹主任宣布第二届肿瘤介入治疗专业委员会领导成员名单:

主任委员: 颜志平; 副主任委员: 茅爱武、欧阳强、杨继金、吴春根; 秘书: 李文涛、刘玉金; 名誉主任委员: 程永德; 顾问: 田建明、王建华、王小林、程英升。

主任委员颜志平教授为 18 位委员颁发了聘书。会后接着召开了上海市 2015 年首届介入治疗沙龙。

(刘玉金供稿)