

· 实验研究 Experimental research ·

碘离子调控血管内皮细胞迁移机制研究

王 丹, 祖茂衡, 魏 宁, 胡 琳, 方 林

【摘要】 目的 研究碘离子(I^-)对血管内皮细胞(VEC)迁移及细胞分裂周期蛋白 42(Cdc42)表达的影响,探讨细胞迁移与 Budd-Chiari 综合征隔膜形成机制。**方法** 将体外培养的 VEC 分为空白对照组和不同 I^- 浓度实验组,用 Transwell 法检测各组细胞迁移数, I^- 与 Cdc42 抑制剂 ML141 作用后 VEC 迁移情况。采用 Western blot 技术检测不同 I^- 浓度培养环境中 Cdc42 表达。**结果** 一定浓度的 I^- 可以促进 VEC 迁移($P<0.05$);ML141 可抑制 VEC 迁移;100 $\mu\text{g/L}$ I^- 组、300 $\mu\text{g/L}$ I^- 组、500 $\mu\text{g/L}$ I^- 组 VEC Cdc42 相对表达量高于其它各组($P<0.05$)。**结论** 碘能促进 VEC 迁移,该效应可能与调整 Cdc42 表达有关。

【关键词】 Budd-Chiari 综合征;碘离子;血管内皮细胞;细胞迁移

中图分类号:R543.6 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2016)-06-0524-05

The role of iodine ions in regulating the migration of vascular endothelial cells WANG Dan, ZU Mao-heng, WEI Ning, HU Lin, FANG 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 effect of iodine ion (I^-) on the migration of vascular endothelial cell (VEC) and on the expression of cell division cycle 42 (Cdc42), and to discuss the relationship between cell migration and the membranous formation in Budd-Chiari syndrome. **Methods** VECs that were cultured *in vitro* were divided into the blank control group and four experimental groups of different I^- concentration (100 $\mu\text{g/L}$ I^- , 300 $\mu\text{g/L}$ I^- , 500 $\mu\text{g/L}$ I^- and 1000 $\mu\text{g/L}$ I^- respectively). The number of cell migration and the migration situation of VEC after the interaction of I^- with Cdc42 inhibitor (ML141) in each group were assessed by Transwell chamber motility assay. Using Western blot method the expressions of Cdc42 in different I^- concentration culture environment were determined. **Results** Certain concentration of I^- could stimulate the migration of VEC ($P<0.05$). ML141 could inhibit the migration of VEC; the relative expressions of VEC Cdc42 of 100 $\mu\text{g/L}$ I^- , 300 $\mu\text{g/L}$ I^- and 500 $\mu\text{g/L}$ I^- groups were significantly higher than those of other groups ($P<0.05$). **Conclusion** Iodine can promote VEC migration, and this effect may be related to the regulation of Cdc42 expression. (J Intervent Radiol, 2016, 25: 524-528)

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

Budd-Chiari 综合征 (BCS) 指肝静脉和 (或) 其开口以上下腔静脉阻塞所导致的门静脉和 (或) 下腔静脉高压临床症候群^[1-2]。我国 BCS 以下腔静脉膜性阻塞型 (MOVC) 为主^[3], 其病理特征是下腔静脉下方肝静脉开口处隔膜形成^[4], 病理学研究发现隔膜上下两面为血管内皮细胞 (VEC)^[5], 而隔膜形

成机制尚不清楚。流行病学研究显示 MOVC 型 BCS 患者分布与水源性高碘地区分布相符^[6], 患者血碘及尿碘均高于正常值^[7]。有研究发现高碘能刺激 VEC 膜受体——血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR) 2 (Tyr1214) 磷酸化水平上调^[8-9], 提示高碘有可能激活 VEGFR2 (Tyr1214)-细胞分裂周期蛋白 42 (Cdc42)-P38MAPK-MAPKAPK2 信号通路, 从而介导 VEC 迁移。本研究通过体外用不同浓度碘离子 (I^-) 培养 VEC, 检测 VEC 迁移数及 Cdc42 相对表达量, 探讨 I^- 在 VEC 迁移过程中的作用机制。

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2016.06.014

基金项目: 江苏省科技创新与成果转化专项基金 (BL2012021)

作者单位: 221002 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

1 材料与方法

1.1 细胞株培养

将 EA.hy926 人脐静脉内皮细胞融合细胞(购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,目录号 GNHu39)培养于 Corning 培养皿,使用 DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司),加 10% 胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司),置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,至细胞贴壁生长汇合即作传代。

1.2 检测方法

取对数生长期内皮细胞 1:5 传代,常规培养至 80% 细胞汇合,随后向含 FBS 的 DMEM 培养基中分别加入碘化钾(KI)(高碘组),使 I⁻ 终浓度分别为 100 μg/L、300 μg/L、500 μg/L、1 000 μg/L,空白对照组未加入 KI;将细胞于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h,然后消化内皮细胞,离心弃去培养液,用不含 FBS 的 DMEM 培养基重悬,调整细胞浓度至 1×10⁵/ml。取细胞悬液 100 μl 加入 Transwell 小室,下室中加入含 FBS 的 DMEM 培养液 500 μl,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 6 h 后,室温下用 4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,显微镜下随机选取 5 个视野,观察迁移至下室细胞数并摄影(×200),计数每个视野平均细胞数。实验重复 3 次。

将 Cdc42 抑制剂 ML141 制成溶液,终浓度为 1 μmol/L,使用溶媒为二甲亚砜(DMSO)。取对数生长期内皮细胞 1:5 传代,常规培养至 80% 细胞汇合,分别加入 4.5 ml DMEM、0.5 ml FBS(空白对照组);4.5 ml DMEM、0.5 ml FBS、25 μl DMSO(溶媒组);500 μg/L I⁻、4.5 ml DMEM、0.5 ml FBS、25 μl KI(KI 组);500 μg/L I⁻、4.5 ml DMEM、0.5 ml FBS、25 μl KI、25 μl ML141(ML141 联合 KI 组);500 μg/L I⁻、4.5 ml DMEM、0.5 ml FBS、25 μl ML141(ML141 组)。将各组细胞于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h,然后消化内皮细胞,离心弃去培养液,用不含血清 DMEM 培养基重悬,调整细胞浓度至 1×10⁵/ml。取细胞悬液 100 μl 加入 Transwell 小室,下室中加入含 FBS 的 DMEM 培养液 500 μl,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 6 h 后,室温下用 4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,

显微镜下随机选取 5 个视野,观察迁移至小室下层细胞数并摄影(×200),计数每个视野平均细胞数。实验重复 3 次。

取对数生长期 VEC 传代,常规培养至 80% 细胞汇合,再以不加血清 DMEM 培养基饥饿培养 24 h,随后向 DMEM 培养基中分别加入 KI,使 I⁻ 终浓度分别为 100 μg/L、300 μg/L、500 μg/L、1 000 μg/L,空白对照组未加入 KI,将细胞置培养箱中饥饿培养 24 h;用冰磷酸缓冲液(PBS)洗涤 3 次,每个培养皿加入 100 μl 含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解液提取细胞总蛋白;采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度并分装。取等量样品加入十二烷基磺酸钠(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 1:1 000 稀释,二抗稀释比为 1:1 000。显色用 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐(BCIP)/氯化硝基四氮唑蓝(NBT)法。以上条带均以 β-actin(美国 Bioworld 公司)作为内参照。扫描后采用 IPP 6.0 图像分析软件对特异性条带进行半定量分析,以 Cdc42 与 β-actin 灰度值比值评定 Cdc42 蛋白表达水平。以上实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。检测结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间两两比较用方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高碘环境下 VEC 迁移

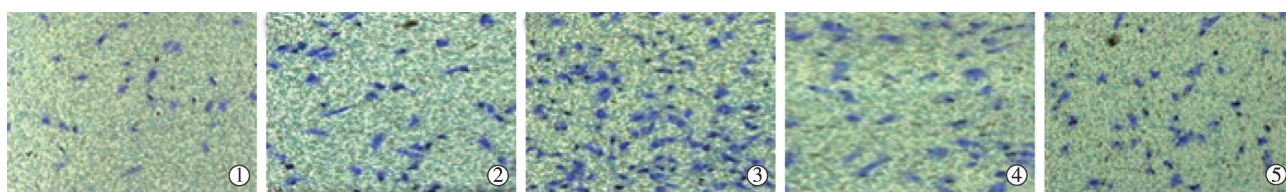
高碘环境下 VEC 迁移实验结果见表 1、图 1。空白对照组与各高碘组间差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 I⁻ 可促进 VEC 迁移。100 μg/L I⁻ 组与 300 μg/L I⁻ 组、500 μg/L I⁻ 组间差异有统计学意义($P < 0.05$),与 1 000 μg/L I⁻ 组差异无统计学意义($P > 0.05$),300 μg/L I⁻ 组与 500 μg/L I⁻ 组差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 I⁻ 浓度 300~500 μg/L 可能是促进 VEC 迁移的最佳浓度,超过这一浓度, I⁻ 促进 VEC 迁移能力下降。

表 1 不同浓度 I⁻ 环境中 VEC 迁移数

($\bar{x} \pm s$)

组别	空白对照组	100 μg/L I ⁻ 组	300 μg/L I ⁻ 组	500 μg/L I ⁻ 组	1 000 μg/L I ⁻ 组
例数	15	15	15	15	15
迁移细胞数/个	17.53±8.45	51.13±10.41 ^a	75.67±14.83 ^a	94.00±31.00 ^a	46.20±14.56 ^a

注:^a与空白对照组比较, $P < 0.05$



①空白对照组;②100 µg/L I⁻组;③300 µg/L I⁻组;④500 µg/L I⁻组;⑤1 000 µg/L I⁻组

图1 不同浓度 I⁻环境中 VEC 迁移镜下显示(×200)

2.2 I⁻和 ML141 共同作用下 VEC 迁移

I⁻和 ML141 共同作用下 VEC 迁移实验结果见表 2、图 2。空白对照组与溶媒组间 VEC 迁移细胞数差异无统计学意义($P>0.05$),提示 ML141 溶媒 DMSO 对本实验无影响。与空白对照组相比, KI 组 VEC 迁移数显著增高($P<0.05$), ML141 组和 ML141 联合 KI 组 VEC 迁移细胞数显著降低($P<0.05$),提示 I⁻在 500 µg/L 环境中刺激细胞迁移, ML141 通过抑制 Cdc42 活性对 VEC 迁移产生抑制作用。ML141 联合 KI 组 VEC 迁移细胞数低于 KI 组、高于

ML141 组,差异有统计学意义($P<0.05$),提示 I⁻抑制 Cdc42 活性并促进 VEC 迁移能力降低。

2.3 I⁻对 Cdc42 表达量影响

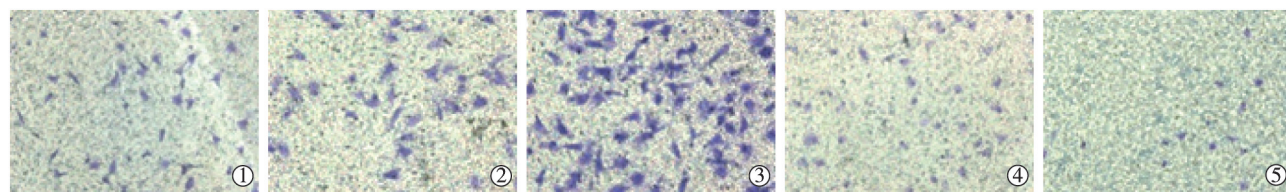
与空白对照组比较, Cdc42 相对表达量除在 1 000 µg/L I⁻组未升高($P>0.05$)外,其余各高碘组均上调,差异有统计学意义($P<0.05$); 300 µg/L I⁻组、500 µg/L I⁻组与 100 µg/L I⁻组比较, Cdc42 相对表达量上调($P<0.05$); 300 µg/L I⁻组和 500 µg/L I⁻组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示一定浓度 I⁻可促进 Cdc42 相对表达量上调(表 3、图 3)。

表2 不同条件影响 VEC 迁移细胞数

($\bar{x}\pm s$)

参数	空白对照组	溶媒组	KI 组	ML141 联合 KI 组	ML141 组
例数	15	15	15	15	15
迁移细胞数/个	34.80±10.05	32.13±8.26 ^a	76.73±12.99 ^b	26.07±9.63 ^{bc}	16.20±5.66 ^{bed}

注:^a与空白对照组比较, $P>0.05$; ^b与空白对照组比较, $P<0.05$; ^c与 KI 组比较, $P<0.05$; ^d与联合组比较, $P<0.05$



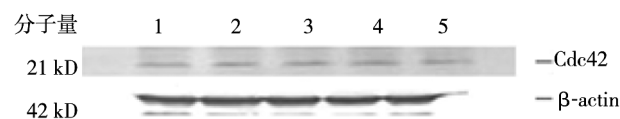
①空白对照组;②溶媒组;③KI 组;④ML141 联合 KI 组;⑤ML141 组

图2 不同条件影响 VEC 迁移(×200)

表3 不同浓度 I⁻环境中 Cdc42 相对表达量

参数	空白对照组	100 µg/L I ⁻ 组	300 µg/L I ⁻ 组	500 µg/L I ⁻ 组	1 000 µg/L I ⁻ 组
例数	3	3	3	3	3
Cdc42 蛋白相对表达量	0.207±0.011	0.267±0.012 ^a	0.632±0.022 ^{ac}	0.645±0.075 ^{ac}	0.296±0.076 ^b

注:^a与空白对照组比较, $P<0.05$; ^b与空白对照组比较, $P>0.05$; ^c与 100 µg/L I⁻组比较, $P<0.05$



注:泳道 1 为空白对照组;泳道 2~5 分别为 100 µg/L I⁻组、300 µg/L I⁻组、500 µg/L I⁻组、1 000 µg/L I⁻组

图3 不同浓度 I⁻对 Cdc42 蛋白表达的影响

3 讨论

大量研究表明, BCS 临床表现、类型及病因学在中国与西方国家之间差异明显, 西方国家以血栓形

成为主要病因的肝静脉阻塞型为主, 而中国以 MOVIC 型为主^[10-11]。流行病学研究发现 MOVIC 型 BCS 患者分布与水源性高碘地区分布相符, 且患者血清及尿碘含量偏高^[6-7], 提示患者面临体内外高碘环境。有研究以 I⁻刺激体外培养的 VEC 显示, 一定浓度的 I⁻能促进细胞增殖^[12]。我们研究认为, I⁻在下腔静脉隔膜形成过程中可能起着重要作用。

根据人体代谢规律, 碘在肠道被还原为 I⁻后能被肠道迅速吸收进入血浆, 经门静脉进入肝脏, 进入

肝脏的 I^- 一部分经肝静脉进入下腔静脉, 另一部分由肝脏贮入胆汁中, 再进入肠道, 在肠道中重新被吸收, 形成肝肠循环。可见, 人体循环系统中肝静脉开口处 I^- 浓度最高, 这与 MOVC 型 BCS 患者隔膜好发部位肝静脉开口上方基本一致^[4,13]。

下腔静脉内 VEC 增殖使得与血管走向平行的管壁增厚, 而下腔静脉隔膜与管壁呈垂直相交走向, 由此推测下腔静脉隔膜形成过程中 VEC 异常增殖和迁移同时存在。研究发现, I^- 促进血管内皮细胞增殖, 并非通过提高血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 及其受体 VEGFR 表达实现; I^- 可视为促 VEC 增殖的独立因素, 高碘促 VEC 增殖效应是通过 ERK 信号转导通路激活实现的^[14]。但一定浓度的 I^- 是否影响 VEC 迁移及 I^- 在 VEC 迁移过程中的机制尚未明确。前期研究显示, 高碘可刺激血管内皮细胞膜受体 VEGFR2 (Tyr1214) 磷酸化水平上调^[8-9], 我们认为 I^- 可直接作用于促细胞迁移的 VEGFR2 (Tyr1214)-Cdc42-P38MAPK-MAPKAPK2 细胞内信号转导通路。

细胞迁移是一个多步骤过程, 可概括为层形足板延伸、新的黏附形成、胞体收缩和细胞尾部脱离等步骤^[15], 而细胞运动过程离不开细胞极性和肌动蛋白骨架重构。Cdc42 是一种鸟苷三磷酸 (GTP) 酶, 为 Rho 家族成员之一。目前研究认为, Rho 家族蛋白主要通过影响细胞形态和细胞迁移来对肿瘤细胞生长和增殖起作用, 其异常激活直接参与肿瘤进展^[16]。有研究证实, Cdc42 与细胞肌动蛋白骨架重塑和细胞运动有关, 且对细胞丝状伪足和侵袭性伪足形成有重要作用, 进而影响细胞侵袭迁移能力^[17-18]。

为了明确 I^- 是否能促进 VEC 迁移及对 VEC 迁移的影响是否与 Cdc42 有关, 本研究采用不同浓度 I^- 体外培养 VEC, 发现一定浓度的 I^- 对 VEC 迁移呈明显促进作用, 且 $300 \sim 500 \mu\text{g/L}$ I^- 可能是促进 VEC 迁移的最佳浓度, 超过这一浓度, I^- 促进 VEC 迁移能力下降; 使用 Cdc42 抑制剂 ML141 后, VEC 迁移数较空白对照组、ML141 联合 KI 组减少, 表明抑制 Cdc42 后 I^- 对 VEC 迁移的促进作用减弱, 可见 I^- 促进 VEC 迁移的作用可能与 Cdc42 有关; Western blot 检测结果显示, $100 \mu\text{g/L}$ I^- 组、 $300 \mu\text{g/L}$ I^- 组和 $500 \mu\text{g/L}$ I^- 组 Cdc42 相对表达量比空白对照组明显升高, $300 \mu\text{g/L}$ I^- 组和 $500 \mu\text{g/L}$ I^- 组间比较差异无统计学意义, $1\ 000 \mu\text{g/L}$ I^- 组 Cdc42 相对表达量与空白对照组间差异无统计学意义, 提示 I^- 对 VEC Cdc42 表达具有双向效应, 与 I^- 对 VEC 迁移的促进

作用一致, $300 \sim 500 \mu\text{g/L}$ I^- 可能是促进 Cdc42 表达的最佳浓度。Cdc42 可以在鸟苷二磷酸 (GDP) 结合的非活性状态和 GTP 结合的活性状态之间循环^[19], 而 Cdc42 作用活性取决于活化态 Cdc42 的量和持续时间, 由此推测 I^- 可能是通过调节活化态 Cdc42 含量影响细胞迁移作用, I^- 较低浓度可升高活化态 Cdc42 所占比例, 随着 I^- 浓度升高, 活化态 Cdc42 所占比例降低。

综上, 本研究初步明确 I^- 通过提高 Cdc42 表达量促进 VEC 迁移, 为 MOVC 型 BCS 病因学研究提供了新方向。本研究着重在体外环境中观察 I^- 对 Cdc42 的影响, 尚不能完全说明体内环境下 VEC 迁移情况, 且控制细胞迁移的信号转导通路并非单独链, 而是复杂的网络。因此, 必需进一步研究探索 I^- 对 Cdc42 下游信号转导通路 Cdc42-P38MAPK-MAPKAPK2 的影响, 阐明 I^- 促进 VEC 迁移的机制, 从而揭示 I^- 与下腔静脉隔膜形成的关系, 为 BCS 临床治疗提供新思路 and 理论依据。

[参考文献]

- [1] Janssen HL, Garcia-Pagan JC, Elias E, et al. Budd-Chiari syndrome: a review by an expert panel[J]. J Hepatol, 2003, 38: 364-371.
- [2] 李麟荪. 评布加综合征定义与分型[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 75-78.
- [3] 祖茂衡. Budd-Chiari 综合征的影像综合诊断与介入治疗[J]. 中国医学计算机成像杂志, 2002, 8: 108-115.
- [4] 张文广. Budd-Chiari 综合征: 下腔静脉阻塞隔膜位置关系研究[D]. 郑州大学, 2011.
- [5] 王 佶, 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Teng F, Zu MH, Hua QJ. Correlations of iodide ions with vascular endothelial growth factor and its receptors during the proliferation of vascular endothelial cells[J]. Genet Mol Res, 2014, 13: 6439-6447.
- [9] 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.
- [10] Linnemann B, Lindhoff-Last E. JAK2 mutation and thrombosis-recommendations for screening[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2011, 136: 2454-2457.
- [11] 李胜利, 祖茂衡, 陆召军, 等. 布加综合征研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31: 1192-1195.
- [12] 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.