维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)04－0425－04

高碘诱导甲状腺细胞凋亡及其机制研究

刘东方[1]，邓华聪[1]，雄　波[2]，侯　平[2]，许政平[3]

(1.重庆医科大学临床学院内分泌科，重庆　400016；2.重庆壁山县人民医院，重庆　402760；
3.重庆医科大学第二临床学院内分泌科，重庆　400010)

【摘　要】目的：探讨高碘对正常甲状腺细胞凋亡作用及其相关机制。方法：用不同浓度的碘化钠(NaI)在加或不加白细胞介素 β_1(IL－1β)和甲巯咪唑(MMI)的情况下干预培养的人正常甲状腺细胞，观察细胞形态的变化，用流式细胞仪检测细胞的凋亡率，免疫组化分析凋亡相关蛋白 Fas、FasL、p53 的表达情况。结果：用高浓度碘干预的甲状腺细胞变圆、脱壁、逐渐死亡，流式细胞仪检测显示甲状腺细胞随碘的剂量增加凋亡率增加，IL－1β 进一步促进了高碘导致的凋亡，而 MMI 可阻断高碘导致的甲状腺细胞凋亡，高碘处理后凋亡蛋白 Fas、FasL 表达明显增加，而 p53 却没有明显变化。结论：高碘呈剂量依赖式的诱导甲状腺细胞的凋亡，IL－1β 可促进高碘的这种作用。高碘导致的甲状腺细胞凋亡主要通过 Fas/FasL 途径，而非 p53 介导。高碘的甲状腺细胞凋亡作用并不是由碘离子(I^-)引起，而是与活跃的碘分子(I_2)及其形成的各种化合物密切相关。

【关键词】高碘；甲状腺细胞；凋亡；凋亡机制

【中国图书分类法分类号】R581.4　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－12－15

Induction of apoptosis in thyroid cells by iodide excess and its mechanism

LIU Dongfang, et al

(*Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the role of excessive iodide in inducing apoptosis in thyroid cells and its mechanism. *Methods*: Normal primary thyroid cells were cultured in NaI of different concentrations with or without IL－1β and methimazole. The morphological changes in thyroid cells were observed by light microscopy and apotosis rate was determined by flow cytometry techique. In the meantime Fas, FasL, p53 level were determined by histochemistry. *Results*: Thyroid cells treated with iodide excess underwent the morphological changes and apoptosis. There was a gradually increased apotosis rate and Fas/FasL protein expression accompanying increase in iodide concentrations. No changes in p53 protein expression was shown. IL－1β enhanced the effect of iodide cytotoxicity, whereas methimazole inhibited the role of iodide inducing apotosis. *Conclusion*: These data indicate that excess molecular iodide induces apoptosis in thyroid cell through Fas/FasL channel, but independent of p53.

【Key words】Iodide excess; Thyroid cell; Apoptosis; Apoptosis mechanism

碘是人体必需的微量元素，是合成甲状腺激素的原料。低碘对人体的危害已得到充分的认识，我国自 1994 年开始立法在全民实行碘化食盐使碘缺乏病得到了有效控制，但近年随着补充碘剂防治碘缺乏病(IDD)工作的逐步强化和普及，我国自身免疫性甲状腺疾病(AITD)包括 Graves 病、桥本氏甲状腺炎(HT)、原发性甲状腺功能减退症的发病出现普遍增加的趋势，而且几个大型的调查研究已证实了这一点[1]。医生们高度怀疑 AITD 发病率的增加与补碘存在密切关系。既往研究表明凋亡在 AITD 发病中起重要作用[2,3]，本研究探讨 NaI(碘盐中补碘的主要形式)在诱导甲状腺细胞凋亡中的作用及其凋亡机制。

1　材料和方法

1.1　主要试剂

鼠抗人 Fas、FasL、P53 单克隆抗体、SP9000 染色试剂盒、DAB 显色试剂购自北京中山试剂公司，NaI 由北方同正公司提供，白细胞介素 IL－1β 和促甲状腺激素(TSH)、Ⅰ型胶原酶、甲巯咪唑、MEM 和 dispase 购自 Sigma 试剂公司，胎牛由 Hyclone 提供。

作者介绍：刘东方(1969－　)，女，博士，副教授，
主要研究方向：自身免疫性甲状腺疾病的发病机理。

基金项目：重庆市卫生局(2001－1－15)

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 方法

1.2.1 甲状腺细胞培养：取血 FT3、FT4、STSH、TRAb、TPO、TG 等指标均正常因创伤死亡的正常人和甲状腺腺瘤旁正常甲状腺组织，去掉包膜，剪成 $1mm^3$ 小块，离心去掉上清液，加入含有Ⅰ型胶原酶和 dispase 的 MEM 中 37℃ 水浴消化 2h，每隔 5min 摇晃 1 次，将消化后的悬浊液过 200 目筛网，Hank's 液洗涤 2 次，将细胞接种至培养瓶，24h 后洗涤去掉未附壁细胞，人工传至 3 代进行实验。

1.2.2 培养 3 代的甲状腺细胞给予 0，10mg/L，100mg/L 的 NaI（正常情况下血液含碘 30～60μg/L，甲状腺内 I^- 浓度为血清的 20～40 倍，相当于甲状腺局部的碘浓度是 600～2400μg/L）、500pg/L～1000pg/L 的 IL－1β 以及 NaI 100mg/L 联合 IL－1β，NaI 100mg/L 联合他巴唑（MMI）10^3μg/L 处理 48h，并作空白对照，观察细胞形态的变化，0.25% 胰酶 EDTA 消化后行流式细胞仪碘化吡啶（PI）单染测定细胞凋亡率。

1.2.3 同一代细胞用 0.25% 胰酶 EDTA 消化按 5×10^5/ml 接种至放有小玻片的 24 孔板，分别给予 0、10、100mg/L 的 NaI 培养 48h（NaI 浓度和分组参见文献[4]），免疫组化观察细胞 Fas、FasL、P53 表达情况。同时给予 500pg/L 和 1000pg/L IL－1β 刺激 48h 在加或不加 NaI100mg/L 的情况下行免疫组化检查观察细胞上述抗原表达情况，计数 100 个细胞蛋白表达阳性率，每组记数五张玻片，计算阳性表达率。

1.3 统计学处理

用 SPSS10.0 软件处理，各处理组间比较用方差分析 F 检验和 q 检验。

2 结 果

2.1 NaI 处理后细胞形态光镜下的改变（见图 1）。

用 400 倍光学显微镜观察，甲状腺细胞经 NaI100mg/L 作用 48h 后细胞逐渐变圆，部分细胞脱壁。

2.2 NaI 对甲状腺细胞凋亡率的影响

由表 1 可见，对甲状腺细胞凋亡率以 IL－1β1000pg/L 联合 NaI100mg/L（NaI100IL）最高，次为 NaI 100mg/L 组，NaI 10mg/L 细胞凋亡率也显著高于对照组（$P<0.05$），在 NaI 组加入甲巯咪唑 10^3 联合培养（NaI100MMI），细胞的凋亡率显著下降，接近空白对照水平，IL－1β1000pg/L 没有明显的致甲状腺细胞凋亡作用，但 IL－1β500pg/L 有轻度的促进甲状腺细胞凋亡作用。

2.3 NaⅠ和 IL－1β 诱导凋亡相蛋白表达情况（见图 3）

P53 在各组均没有表达，Fas 在正常甲状腺细胞表达甚少，经过高浓度 NaⅠ和 IL－1β 处理过后其表达水平明显增加。FasL 在正常未处理组已有表达，高浓度 NaⅠ和 IL－1β 作用后表达量进一步增加。方差分析显示各组存在明显差异，具体见表 2。

表 1 各种处理因素对甲状腺细胞凋亡率的影响（$\bar{x}\pm s$）

处理因素	凋亡率
0	1.30 ± 0.69^{④⑤⑥⑨}
NaⅠ 10(mg/L)	12.54 ± 1.33^{②⑤⑥⑧⑨}
NaⅠ 100(mg/L)	24.81 ± 1.69^{②⑥⑧⑩}
NaⅠ 100(mg/L)+IL－1β 1000(pg/L)	43.95 ± 7.52^{②④⑤⑥⑧⑩}
IL－1 β500(pg/L)	2.21 ± 0.87^{④⑤⑥}
IL－1 β1000(pg/L)	6.94 ± 0.93^{①③⑤⑥⑦}
NaⅠ 100(mg/L)+MMⅠ10^3(μg/L)	4.10 ± 0.87^{③④⑥}

附：F 检验显示各处理因素之间细胞凋亡率存在明显差异（$P<0.001$），进一步用 q 检验进行两组间比较，①与对照组相比 $P<0.05$，②$P<0.01$；③与 NaⅠ 10(mg/L) 相比 $P<0.05$，④$P<0.01$；⑤与 NaⅠ 100(mg/L) 相比 $P<0.001$；⑥与 NaⅠ 100(mg/L)+IL－1β 1000(pg/L) 相比 $P<0.001$；⑦与 IL－1β 500(pg/L) 相比 $P<0.05$，⑧$P<0.001$；⑨与 NaⅠ 100(mg/L)+MMI10^3 相比 $P<0.05$，⑩$P<0.001$。

表 2 Fas 和 FasL 在各种处理因素下免疫组化阳性表达情况（以阳性百分率表示，$\bar{x}\pm s$）

	FAS	FASL
0	1.59 ± 0.62^{④⑤⑥⑩}	23.01 ± 8.40^{③⑨⑤⑥}
NaⅠ 10(mg/L)	15.69 ± 1.83^{②⑤⑥⑧}	32.85 ± 2.69^{①⑤⑥⑧}
NaⅠ 100(mg/L)	33.09 ± 3.993^{②④⑥⑧}	44.86 ± 4.1^{②④⑥⑧⑩}
NaⅠ 100(mg/L)+IL－11000(pg/L)	53.39 ± 4.92^{②④⑤⑧}	88.90 ± 5.57^{②④⑤⑧⑩}
IL－1β 500(pg/L)	7.44 ± 2.43^{①④⑤⑥⑩}	22.33 ± 4.08^{③⑨⑤⑥}
IL－1β 1000(pg/L)	16.03 ± 2.68^{②⑤⑥⑧}	30.08 ± 3.73^{⑦⑤⑥}

附：①与对照组相比 $P<0.05$，②<0.01；③与 NaⅠ 10mg/L 相比 $P<0.05$，④<0.01；⑤与 NaⅠ 100mg/L 相比 $P<0.01$；⑥与 NaⅠ 100mg/L+IL－1β1000pg/L 相比 $P<0.01$；⑦与 IL－1β 500pg/lp<0.05，⑧$P<0.01$；⑨与 IL－1β 1000pg/L 相比 $P<0.05$，⑩<0.01。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 1 经 NaⅠ100mg/L 作用 48h 后甲状腺细胞变圆,并逐渐脱壁死亡(×400)

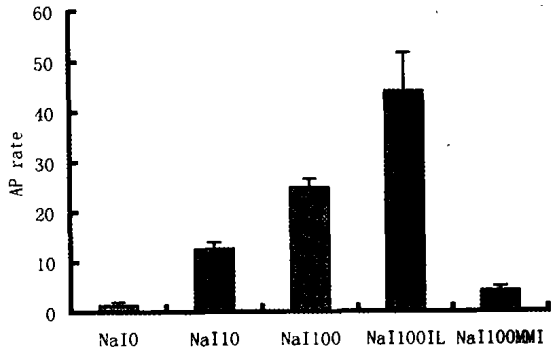


图 2 各种处理因素作用下甲状腺细胞凋亡率

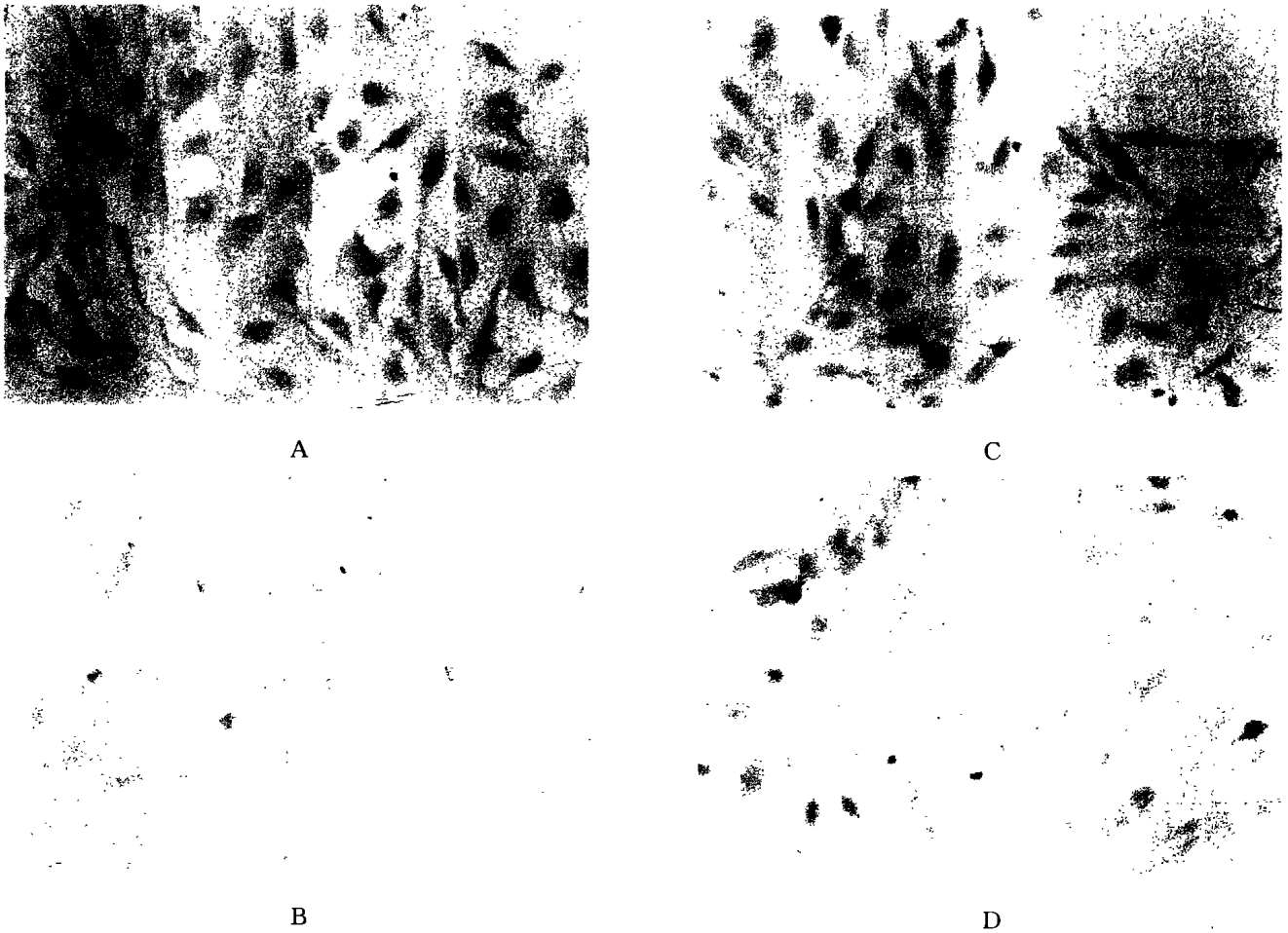


图 3 NaⅠ作用前后 Fas 和 FasL 表达的情况。A 为未处理组的 Fas 表达情况;B 为经 NaⅠ100mg/L 和 IL-1β 作用后的 Fas 表达情况;C 为未处理组的 FasL 表达情况;D 为经 NaⅠ100mg/L 和 IL-1β1000pg/ml 作用后的 FasL 表达情况

3 讨 论

AITD 发病率的增加在遗传易感性基础上与高碘的环境因素密切相关,但其机制不清。本研究发现,经高碘处理过的正常甲状腺细胞体变圆、缩小、核碎裂,并逐渐脱壁,最后死亡。进一步用流式细胞仪检测发现高浓度的碘化钠增加了甲状腺细胞的凋亡率。

凋亡是发生于体内的一种经常性事件,在维持机体的发育、生长和内环境的稳定中起重要作用,但是不适当的凋亡增加或减少都将引起各种疾病。正常甲状腺细胞分裂较少,凋亡也很少。既往研究发现,在桥本氏甲状腺炎、Graves'病患者凋亡明显增加,各种凋亡调控蛋白表达异常,其中 Fas/FasL 系统在诱发免疫细胞凋亡及在 AITD 发病中的作用近

维普资讯 http://www.cqvip.com

年成为了研究的热点[2,3]。Fas 是广泛表达于各种组织的细胞膜受体,与组织内环境的稳定和免疫反应有关,FasL 是 Fas 抗原的配体,属于肿瘤坏死因子超家族成员,FasL 可诱导表达 Fas 的细胞发生自溶,这种细胞溶解作用主要是通过一系列信号传递而实现的,其中主要是一种蛋白水解酶 Caspase,一些蛋白如 P53、bcl、Bax 通过对 Caspase 的调节而对凋亡起调控作用。本研究发现,在未经处理的正常甲状腺细胞已有一定量的 FasL 表达,但 Fas 的表达几乎为零,经过 NaI 作用 48h,Fas 和 FasL 的表达都明显增加,且表达强度与 NaI 的浓度存在明显的正相关。IL-1β 能显著增加高碘对甲状腺细胞凋亡的促进作用,单独应用 IL-1β 增加细胞的凋亡率不明显,其 Fas 和 FasL 的表达量有轻度增加。Giordano 和 Sera 等的研究表明 Fas 经 IL-1β 处理后表达明显增加[2,3],但 Stroke 等同时用免疫印迹和免疫组化均没有证实 IL-1β 增加 Fas、FasL 的表达[5]。出现这种结果的差异性本研究作者以为可能与细胞的纯度和培养液中碘浓度有关。因为细胞中如果没有纯化传代混有其它如淋巴细胞等免疫性细胞势必增加 Fas 的表达,但如培养液中碘的含量较高也将增加 IL-1β 对细胞凋亡的影响。在体研究已表明 IL-1β 是一种在桥本甲状腺炎(HT)和 Graves'甲状腺组织中表达显著高于正常甲状腺的细胞因子,在 HT 的组织中表达尤其高,人们推测 IL-1β 在 HT 的发病中起重要作用[2]。从本研究可以看出 IL-1β 的致病作用与高碘的环境因素有密切关系,免疫异常和环境因素共同作用促进了 AITD 的发生发展这个结果可以部分解释临床上高碘加重 AITD,增加 AITD 复发等现象,为补碘个体化原则提供了理论依据。

本研究进一步发现碘对甲状腺细胞的毒性作用是不依赖于 p53 的,在正常的甲状腺细胞中,没有看到 p53 的表达,经过高碘或/和 IL-1β 的作用,细胞的凋亡率虽然明显增加,但 p53 在各组均没有明显的表达。p53 基因编码的的产物属于一种转录因子,与肿瘤的发生、发展密切相关,它分为野生型和突变型,在放射性损伤或抗癌药干预的细胞中均可见野生型 p53 在细胞内聚集并进入核内,导致细胞核 DNA 的改变,从而诱发凋亡。本研究的结果提示 p53 在高碘导致的甲状腺细胞凋亡中不起作用,可以推测高碘对甲状腺细胞的凋亡作用可能并不是以 DNA 损害为首发环节,而可能与线粒体的改变有关,这与 Vitale 等结论相符合[6],但要得出明确的结论还需要进一步的研究。

本研究还证实,碘对甲状腺细胞的凋亡并不是通过其离子形式,而是通过其分子形式起作用。因为用甲巯咪唑血药浓度峰值的一半($10^3\mu g/L$)亦能阻断高碘对甲状腺细胞的毒性作用。甲巯咪唑在甲状腺中的治疗作用主要是通过抑制过氧化物酶(TPO),抑制碘的有机化,从而抑制甲状腺激素的合成,它并不抑制甲状腺碘的吸收。既然甲巯咪唑能够阻断高碘对甲状腺细胞的凋亡作用,我们推测碘对甲状腺细胞的凋亡作用是通过其结合碘而不是碘离子来实现的。分子碘(I_2)是一种活性很高的分子,可以和蛋白、脂质、核酸形成碘化物,当碘与膜脂质结合后会导致细胞和线粒体膜的完整性丧失,导致细胞的凋亡[7]。

总之,本研究证实高碘可以剂量依赖的方式增加甲状腺细胞的凋亡,并且在有 IL-1β 同时存在的情况下这种促凋亡作用得到了进一步的加强。这种凋亡的发生可能与 Fas/FasL 表达的增加有关,p53 在高碘诱导的甲状腺细胞凋亡中没有明显的作用。碘对甲状腺细胞的毒性作用是通过其分子形式形成各种碘化物而实现的。

参 考 文 献

[1] 吴世捷,谢福康,蔡 黎,等.碘摄入量增加对甲状腺功能亢进症发病率的影响[J].中华内分泌代谢杂志,2000;16:139-142.

[2] Giordano G, Stassi G, De maria R, et al. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hasimoto's thyroiditis[J]. Science, 1997;275:960-963.

[3] Sera N, Kawakami A, Nakashima T. Fas/FasLmediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease[J]. Clin exp immunol, 2001;124:197-207.

[4] Golstein J, Dumont JE. Cytotoxic effects of iodide on thyroid ceils: difference betweent rat thyoid FRTL-5 cell and dog thyroid responsiveness[J]. J Endocrinol Invest, 1996;19:119-128.

[5] Strokes TA, Rymaszewski M, Arscott P1, et al. Constitutive expression of FasL in thyrocytes[J]. Science, 1998;279:2015-2025.

[6] Vitale M, DI Matola T, D' ascoli F, et al. Iodide excess induces apoptosis in thyroid ceils through a p53 independent mechanism involving oxidative stress[J]. Endocrinology, 2000;141:598-605.

[7] Pereira A, Braekman JC, Dumont JE, et al. Identification of a Major iodolipid from the horse thyroid gland as 2-iodohexadecanal[J]. J Biol chem, 1990;265:17018-17021.