

# 重组人 IL-6 对近曲肾小管上皮细胞增殖及生物学表型的影响

詹林达<sup>1</sup>, 梁蔚文<sup>2</sup>, 魏菁<sup>2</sup>, 邹和群<sup>1</sup>

(中山大学 1. 附属第五医院肾内科, 广东 珠海 519000; 2. 附属第二医院林百欣医学研究中心, 广东 广州 510120)

**摘要**【目的】观察重组人白细胞介素 6(rIL-6)在体外对人近曲肾小管上皮细胞株(HK-2)增殖及生物学表型的影响。探讨 rIL-6 对 HK-2 细胞作用的时间-效应及剂量-效应关系。【方法】用 MTT 比色法检测 rIL-6 对细胞增殖的影响;用流式细胞术检测 rIL-6 对细胞周期及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)阳性细胞百分率的影响;倒置显微镜观察 rIL-6 对 HK-2 细胞形态改变的影响。【结果】MTT 比色法示, rIL-6 在 10~50 ng/mL 作用浓度范围内促进 HK-2 细胞增殖,呈剂量、时间依赖效应; rIL-6 作用浓度为 100~200 ng/mL 时抑制细胞增殖,随作用浓度增加抑制作用加强( $F=201.582, P<0.001$ ), ( $F=43.943, P<0.001$ )。rIL-6 影响 HK-2 细胞的 DNA 合成。HK-2 细胞有基础量的  $\alpha$ -SMA 表达, 25 ng/mL rIL-6 与 HK-2 孵育 1~48 h 后,  $\alpha$ -SMA 阳性细胞百分率高峰出现在 48 h ( $F=442.22, P<0.001$ )。rIL-6 干预下, HK-2 细胞形态由卵圆型渐转变为长棱型、长条型。【结论】rIL-6 可促进 HK-2 细胞增殖及生物学表型的转化,但大剂量的 rIL-6 可抑制 HK-2 细胞增殖。

**关键词** 重组人白细胞介素 6; 人近曲肾小管上皮细胞;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

中图分类号: R692

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)02-0188-04

## Proliferation and Changed Phenotype of Human Proximal Tubular Epithelial Cells Activated by Recombinant Human Interleukin-6

ZHAN Lin-da<sup>1</sup>, LIANG Wei-wen<sup>2</sup>, WEI Jing<sup>2</sup>, ZOU He-qun<sup>1</sup>

(1. Department of Nephrology, The Fifth Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Zhuhai 519000, China;  
2. LIN Bai-xin Research Center, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】The study was aimed to determine the in vivo proliferation and phenotype changes of human proximal tubular epithelial cells (HK-2) responding to recommended human interleukin-6-induced. 【Methods】Cell proliferation was measured by MTT assay. The positive cells percentage of  $\alpha$ -smooth muscle-actin ( $\alpha$ -SMA) were analyzed by flow cytometry. The morphologic transforming of HK-2 cells was observed by light microscopy. 【Results】Incubation for 48 hours with 10~50 ng/mL rIL-6 caused concentration and time-dependent stimulation of HK-2 cells proliferation, whereas rIL-6 inhibited HK-2 cells proliferation at 100~200 ng/mL respectively ( $F=201.582, P<0.001$ ), ( $F=43.943, P<0.001$ ). The DNA synthesis of HK-2 cells was influenced by rIL-6. A basal level of  $\alpha$ -SMA positive cells percentage existed in native HK-2 cells. Incubation for 1~48 hours with 25 ng/mL rIL-6 resulted in the maximal response at 48 hours ( $F=442.22, P<0.001$ ). The HK-2 cells morphological transformation was observed after incubation with rIL-6. 【Conclusion】The results indicate that rIL-6 could enhance HK-2 cell proliferation and contribute to HK-2 cell phenotype changes. In contrast, excessive rIL-6 could inhibit HK-2 cells proliferation. This could be a new discovered mechanism for how rIL-6 exhibits pathophysiological effects on tubular cells ultimately leading to tubulointerstitial fibrosis.

**Key words:** human recombinant interleukin-6 (rIL-6); human proximal tubular epithelial cells;  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):188-191]

肾小球肾炎、糖尿病肾病、高血压肾小球硬化

皆会出现多种小球功能失调,一旦小球损伤达到

收稿日期 2005-11-22

作者简介 詹林达(1966-),男,湖北谷城人,博士生,主治医师, E-mail: zhanlinda@126.com

阈值点,肾脏病变便呈持续性、不可逆性进展,近年来研究强调了肾小管间质慢性纤维化在肾脏疾病进展中的作用<sup>[1]</sup>,而小管上皮-肌成纤维细胞转分化(tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation, TEMT)是肾间质纤维化的重要因素<sup>[2]</sup>。IL-6 是重要的炎症因子,在体内通过复杂的细胞因子网络系统,对多种细胞、组织发挥生物活性作用,已有研究表明,免疫炎症反应导致肾小球、小管、间质病变时,肾细胞 IL-6 的表达增加<sup>[3]</sup>,然而,IL-6 对肾小管上皮细胞有何影响、是否对小管上皮转分化具有调节作用,目前尚不完全清楚。我们以人近曲肾小管上皮细胞(HK-2)为研究对象,观察 IL-6 作用时细胞生长、形态和功能的变化,以探讨 IL-6 对人近曲肾小管上皮细胞的作用及其可能机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 试 剂 rhIL- $\alpha$  (英国 Peprtech 公司)溶于含 1 g/L 牛血清白蛋白的 PBS 中;小鼠抗人 -SMA 单克隆抗体为第一抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 为第二抗体(武汉博士德公司);MTT (上海生工公司)。流式细胞仪胞内抗原检测 Caltag 试剂盒(澳大利亚 Caltag 公司),FACScalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.1.2 细 胞 细胞培养:成人肾脏 HK-2 细胞株由中日友好医院娄晋宁教授惠赠。本研究中以含体积分数 10%胎牛血清(FCS)的 RPMI1640 培养液进行培养和传代。

### 1.2 方 法

1.2.1 MTT 法测定细胞增殖 生长至 80%的细胞经胰酶消化后制成  $3 \times 10^4$ /mL 细胞悬液,接种细胞悬液 100  $\mu$ L 到 96 孔板(按刺激物作用时间不同,分为 5 块板),则每孔细胞数为  $3 \times 10^3$ ,置 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,换成无血清培养液培养 24 h 使细胞处于静止期,分别加入含不同浓度 IL-6 (10、25、50、100、200 ng/mL)的体积分数为 1% FCS 培养液,同时设只加培养液的空白对照和含细胞但不加 IL-6 的正常对照。每种浓度设 5 个复孔,实验重复 2 次。分别继续培养 30 min、1、6、12、24、48 h,每孔加 MTT 20  $\mu$ L (MTT 37  $^{\circ}$ C 温浴中溶解于 0.01 mol/L, pH 7.4 5 mg/mL PBS,过滤除菌,置棕色小瓶 4  $^{\circ}$ C 保存)溶液孵育 4 h 后,弃去培养

液,每孔滴加二甲基亚砷(DMSO)200  $\mu$ L,溶液变为紫蓝色,微型混合振荡器 37  $^{\circ}$ C 振荡 15 min;用酶标仪测定 492 nm 波长的吸光值。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期 生长至 80%的细胞经胰酶消化传代于 25 mL 的培养瓶,换成无血清培养液培养 24 h 使细胞处于静止期,分别加入含不同浓度 IL-6 (10、25、50、100、200 ng/mL)的体积分数为 1% FCS 培养液,继续培养 24 h 后,消化、收集细胞,调整细胞浓度为  $3 \times 10^6$ /mL,取细胞悬液 0.5 mL,体积分数 70%冰乙醇 2 mL 固定, -20  $^{\circ}$ C 过夜,离心,倒掉上清,PBS 冲洗 2 遍,加核糖核酸酶 50  $\mu$ L,450  $\mu$ L PI 染液,置 4  $^{\circ}$ C 避光 30 min 后上机测试,每组实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞仪检测 -SMA 阳性细胞百分率 生长至 80%的细胞经胰酶消化传代于 25 mL 的培养瓶,换成无血清培养液培养 24 h 使细胞处于静止期,加入 25 ng/mL IL-6 的体积分数为 1% FCS 培养液,继续培养细胞 1、6、12、24、48 h 后,消化、收集细胞,冰冻 PBS 清洗 2 次,离心,倒掉上清,加 100  $\mu$ L A 液(多聚甲醛),室温放置 15 min, PBS 2 mL 洗 1 次,加 100  $\mu$ L B 液(Caltag 破膜剂), 10  $\mu$ L 一抗,摇匀,4  $^{\circ}$ C 避光 20 min, PBS 2 mL 洗 1 次,0.5 mL PBS 重悬,加 10  $\mu$ L FITC 标记二抗,上机检测。以 FITC 标记的 IgG 单克隆抗体作为同型对照,以正常同型鼠 IgG2 替代一抗作阴性对照。实验重复 3 次。

1.2.4 HK-2 细胞形态变化的观察 将 HK-2 细胞以  $1 \times 10^5$  接种于 6 孔板中,待细胞生长至 70%~80%融合时,用无血清 RPMI-1640 培养液培养 24 h,使细胞生长同步化。然后将细胞置于含体积分数 1% FCS 的 RPMI1640 培养液中,加入 25 ng/mL IL-6 培养 24 h、48 h,倒置相差显微镜下观察细胞形态改变,并拍照。

### 1.3 统计学处理

实验结果均数  $\pm$ 标准差用  $\bar{x} \pm s$  表示。SPSS11.0 进行数据处理。重复测量方差分析、单因素方差分析。

## 2 结 果

### 2.1 IL-6 对 HK-2 细胞增殖的影响

IL-6 对 HK-2 细胞增殖的影响作用,采用重复测量方差分析方法分析,不同时间组之间存在统

计学差异 ( $F=201.582, P<0.001$ ), 时间和剂量之间交互作用有统计学差异 ( $F=43.943, P<0.001$ )。结果显示, 在 10~50 ng/mL 作用浓度范围内, 促进 HK-2 细胞增殖, 呈剂量、时间依赖效应; 在 100~200 ng/mL 作用浓度范围内, 抑制细胞增殖, 随作用浓度增加抑制作用加强 (图 1)。

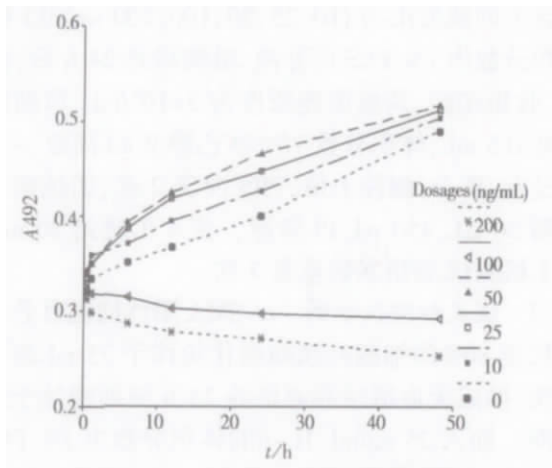


图 1 rIL-6 对 HK-2 细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of IL-6 on the proliferation of HK-2 cells (MTT assay, A492,  $\bar{x} \pm s, n=10$ )

2.2 IL-6 对 HK-2 细胞周期的影响

采用单因素方差分析, G0-G1 期, 不同剂量组存在统计学差异 ( $F=8.080, P<0.001$ ); G2-M 期, 不同剂量组存在统计学差异 ( $F=21.138, P<0.001$ ); 不同剂量组存在统计学差异 ( $F=11.224, P<0.001$ )。结果显示, 与 HK-2 孵育 24 h 后, 10~50 ng/mL IL-6 可使 S 期细胞增多, 100~200 ng/mL IL-6 可降低 S 期细胞数量 (图 2)。

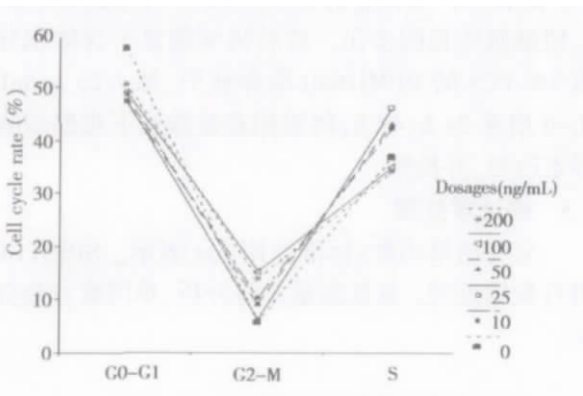


图 2 rIL-6 对 HK-2 细胞周期的影响

Fig.2 Effects of IL-6 on cell cycle of HK-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

2.3 IL-6 对 -SMA 阳性细胞百分率的影响

不同时间组存在统计学差异 ( $F=442.22, P<$

0.001)。结果显示, 25 ng/mL IL-6 与 HK-2 孵育 1~48 h 后, 各个时间点 -SMA 阳性细胞百分率分别为: 0 h 3.1  $\pm$ 0.1; 1 h 5.7  $\pm$ 0.6; 6 h 7.7  $\pm$ 0.5; 12 h 13.4  $\pm$ 0.8; 24 h 17.6  $\pm$ 1.2; 48 h 26.6  $\pm$ 1.2。刺激 48 h 时作用最显著 (图 3)。

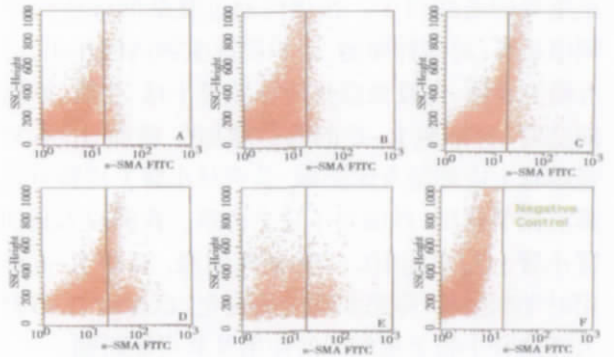


图 3 25 ng/ml IL-6 孵育 HK-2 细胞不同时间 -SMA 阳性细胞百分率流式细胞图

Fig.3 Flow cytometry of HK-2 cells treated with 25 ng/ml IL-6 for different time

A: Stimulation with 25 ng/mL IL-6 for 1 h; B: Stimulation with 25 ng/mL IL-6 for 6 h; C: stimulation with 25 ng/mL IL-6 for 12 h; D: Stimulation with 25 ng/mL IL-6 for 24 h; E: Stimulation with 25 ng/mL IL-6 for 48 h; F: Negative control

2.4 IL-6 对 HK-2 细胞形态的影响

在相差显微镜下观察, 对照组 HK-2 细胞为铺卵石样排列, 圆形、椭圆形或近立方形贴壁细胞, 细胞间连接紧密, 成片生长, 随着 rIL-6 作用时间的延长, 细胞肥大、变为梭形, 似成纤维细胞状生长。见图 4。



图 4 25 ng/mL IL-6 孵育 HK-2 细胞 24 h, 48 h 后的形态

Fig.4 The morphologic transforming of HK-2 cells treated with 25 ng/mL IL-6 for different time (200 $\times$ )

A: Negative control; B: Stimulation with 25 ng/mL IL-6 for 24 h; C: Stimulation with 25 ng/mL IL-6 for 48 h

3 讨论

3.1 IL-6 对 HK-2 细胞增殖和细胞周期的影响

IL-6 是与机体免疫、各种器官生理功能有关

的多向性细胞因子,依照不同的组织环境,通过复杂的细胞信号传导途径,调节细胞生长、分化、凋亡、转化及免疫反应<sup>[4]</sup>。在特发性肺纤维化患者,IL-6 促进成纤维细胞增殖而导致纤维化疾病的进展<sup>[5]</sup>。在门静脉分支高位结扎的动物模型中,IL-6 对肝脏增殖起重要作用<sup>[6]</sup>。而在大鼠的肝细胞癌模型中,IL-6 可抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[7]</sup>。多种刺激因素(如 IL-1、TNF- $\alpha$ )可以引起肾小管上皮细胞、系膜细胞 IL-6 表达增强,IL-6 在多种免疫介导的肾小球、小管损伤中起作用<sup>[8]</sup>。我们发现 IL-6 在低浓度组(作用浓度为 10~50 ng/mL),可明显地促进肾小管上皮细胞增殖,呈剂量、时间依赖效应;IL-6 在高浓度组(100~200 ng/mL)明显抑制细胞增殖。反映 IL-6 产生生物活性作用的复杂性、多样性。IL-6 对 HK-2 细胞周期动力学的影响,表现为低浓度组增加 G1 期进入 S 期细胞数量;高浓度组降低 G1 期进入 S 期细胞数量;S 期是细胞 DNA 合成期,与促进细胞增殖的结果一致。

### 3.2 IL-6 对肾小管上皮-肌成纤维细胞转分化的影响

细胞转分化是细胞失去其特有的细胞表型,获得新的表型,转化为另一种细胞的过程。肾小管上皮细胞在病理条件下可以转化为肌成纤维细胞即 TEMT。 $\alpha$ -SMA 基因是肾脏固有细胞向分泌型肌成纤维细胞表型转化的标志<sup>[9]</sup>。肾小管-间质细胞转分化是肾间质纤维化进行性发展的关键环节<sup>[2]</sup>。在尿路梗阻性肾病转基因小鼠模型中,检测纤维细胞特异性蛋白-1 报道基因,证实大量间质纤维细胞来源于小管上皮细胞,进一步证明了 TEMT 在小管间质纤维化的重要性<sup>[10]</sup>。肾小球、小管、间质出现免疫炎症反应时,肾细胞 IL-6 的表达增加,参与疾病的进展<sup>[3]</sup>。在基因敲除的小鼠模型中,IL-6 通过促进细胞黏附分子、氧化应急物质表达增强,加重肾缺血再灌注损伤<sup>[11]</sup>。在系膜增殖性肾脏病变中,沉积的免疫复合物诱导 IL-6 产生,IL-6 进一步刺激细胞外基质的分泌,形成恶性循环,加重肾脏病变<sup>[12]</sup>。IL-6 能够激活血管平滑肌细胞,促进细胞增殖并产生趋化因子,加重动脉硬化<sup>[13]</sup>。本实验结果发现,IL-6 可以促进 HK-2 细胞形态学的改变、提高  $\alpha$ -SMA 阳性细胞百分率。提示 IL-6 可能是促进肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转分化的重要因子。

综上,可以设想进一步明确 IL-6 对小管上皮细胞的活化的调控机制,可以为纤维增殖性疾病提

供新的治疗途径。

### 参考文献:

- [1] NANGAKU M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure[J]. Intern Med, 2004, 43(1):9-17.
- [2] LAN HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003, 12(1):25-29.
- [3] DAHA M R. Mechanisms of mesangial injury in glomerular diseases[J]. J Nephrol, 2000, 13 Suppl 3:S89-95.
- [4] KAMIMURA D, ISHIHARA K, HIRANO T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model[J]. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003, 149:1-38.
- [5] MOODLEY Y P, SCAFFIDI A K, MISSO N L, et al. Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation[J]. Am J Pathol, 2003, 163(1):345-354.
- [6] KAIDO T, OE H, IMAMURA M. Interleukin-6 augments hepatocyte growth factor-induced liver regeneration; involvement of STAT3 activation [J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51(60):1667-1670.
- [7] MORAN D M, MAYES N, KONIARIS L G, et al. Interleukin-6 inhibits cell proliferation in a rat model of hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2005, 25(2):445-447.
- [8] LEONARD M, RYAN M P, WATSON A J, et al. Role of MAP kinase pathways in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells [J]. Kidney Int, 1999, 56(4):1366-1377.
- [9] JINDE K, NIKOLIC-PATERSON D J, HUANG X R, et al. Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis [J]. Am J Kidney Dis, 2001, 38(4):761-769.
- [10] IWANO M, PLIETH D, DANOFF T M, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3):341-350.
- [11] PATEL N S, CHATTERJEE P K, DI PAOLA R. Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312(3), 1170-1178.
- [12] 孙林,叶任高,曾丽霞,等.系膜增殖性肾炎患者肾小球细胞 IL-6、GP130 和 JunB mRNA 表达及其意义[J]. 中华肾脏病杂志,1998, 14(1):3-6.
- [13] WATANABE S, MU W, KAHN A, et al. Role of JAK/STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells[J]. Am J Nephrol, 2004, 24(4):387-392.

(编辑 黄小延)