论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1756-03

白细胞介素-10对肾小管上皮细胞转分化的影响

常 颖[1],甘 华[1],吕智美[2],杜晓刚[1],王喜超[1] (重庆医科大学附属第一医院:[1]肾内科,[2]内分泌科,重庆 400016)

摘 要:目的 研究白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)对高糖诱导的人近端肾小管上皮细胞(HK-2细胞)转分化(epithelial to mesenchymal transition,EMT)的影响。**方法** 将培养的HK-2细胞通过完全随机设计分为5组:① 对照组:5.5 mmol/L的D-葡萄糖组;② 高糖组:30 mmol/L的D-葡萄糖组;③ 30 mmol/L的D-葡萄糖+1 ng/ml IL-10组;④ 30mmol/L的D-葡萄糖+5 ng/ml IL-10组;⑤ 30 mmol/L的D-葡萄糖+25 ng/ml IL-10组。培养48 h后,RT-PCR法检测各组细胞CTGF mRNA的表达;免疫细胞化学法和Western blot法检测各组细胞α-SMA的表达;ELISA法检测各组细胞FN的分泌。**结果** 在高糖中加入1、5、25 ng/ml的IL-10作用后,与高糖组相比HK-2细胞CTGF、α-SMA和FN表达减少,且均有统计学差异($P<0.05$)。**结论** IL-10可以抑制高糖环境下的肾小管EMT。

关键词: 白细胞介素-10;肾小管;上皮细胞转分化;结缔组织生长因子
中图法分类号: R322.61;R329.25;R392.11 **文献标识码:** A

Inhibitory effect of IL-10 on renal tubular epithelial to mesenchymal transition *in vitro*

CHANG Ying[1], GAN Hua[1], LU Zhi-mei[2], DU Xiao-gang[1], WANG Xi-chao[1] ([1]Department of Nephrology, [2]Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of interleukin-10 (IL-10) on high glucose induced epithelial to mesenchymal transition in human renal tubular cells. **Methods** Human renal proximal tubular cell line HK-2 cells were divided randomly into 5 groups. Group 1 served as control, and its HK-2 cells were incubated with 5.5 mmol/L D-glucose. The cells of group 2 were cultured with 30 mmol/L D-glucose. For the cells of groups 3, 4 and 5, 1, 5 or 25 ng/ml IL-10 was added in their culture media beside the presupplement of 30 mmol/L D-glucose. In 48 h after culture, RT-PCR was used to detect the mRNA expression of connective tissue growth factor (CTGF), immunocytochemical assay and Western blot analysis were used to measure the expression of alpha-smooth muscle actin (α-SMA), and ELISA was used to determine the secretion of fibronectin (FN) in the supernatant. **Results** Compared with group 2, CTGF, α-SMA and FN were all lower in groups 3, 4 and 5 ($P<0.05$). **Conclusion** IL-10 can inhibit the renal tubular epithelial to mesenchymal transition induced by high glucose concentration.

Key words: interleukin-10; renal tubule; epithelial to mesenchymal transition; connective tissue growth factor

肾脏纤维化是多种慢性肾脏疾病的最终结局。研究表明肾间质纤维化时出现肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)[1]。抑制肾小管EMT已成为改善肾间质纤维化的重要方法。白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)是一种多功能的抗炎因子,近年来研究报道IL-10能抑制慢性肾脏疾病的纤维化进程[2]。IL-10是通过何种机制抑制肾脏纤维化目前尚不明了。本研究拟探讨IL-10对高糖诱导的肾小管上皮转分化的影响,阐明其可能的作用机制,为肾间质纤维化的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 HK-2细胞

人近端肾小管上皮细胞株(human kidney proximal tubular epithelial cell-2,HK-2,CRL-2190)购于美国组织培养物细胞库(ATCC)。

1.2 主要试剂

DMEM培养液(HyClone公司),标准胎牛血清(HyClone公司),D-葡萄糖(Sigma公司),IL-10(PeproTech公司),兔抗人α-平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,α-SMA)抗体(Santa Cruz公司),鼠抗人β-actin抗体(Novus Biological),SP-

作者简介:常 颖,女,重庆市人,硕士,医师,主要从事肾间质疾病方面的研究。E-mail: chang1982@163.com
通信作者:甘 华,电话:(023)89013622,E-mail: zxg0233@sina.com
收稿日期:2007-12-04;修回日期:2008-02-25

9002 工作液试剂盒(北京中杉公司), DAB 显色试剂盒(北京中杉公司),Trizol(Invitrogen 公司),通用型 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司), DNA 标准(TaKaRa 公司),聚合酶链反应引物(上海生工公司合成),FN ELISA 试剂盒(晶美生物公司)。

1.3　细胞培养及分组

HK-2 细胞用含 10% FCS 的 DMEM 培养液传代培养,培养条件为 37 ℃、5% CO_2。无血清培养液培养 24 h,使细胞同步于静止期。将 HK-2 细胞通过完全随机设计分成 5 组:①对照组:5.5 mmol/L 的 D-葡萄糖组;②高糖组:30 mmol/L 的 D-葡萄糖组;③30 mmol/L 的 D-葡萄糖 + 1 ng/ml IL-10 组;④30 mmol/L 的 D-葡萄糖 + 5 ng/ml IL-10 组;⑤30 mmol/L 的 D-葡萄糖 + 25 ng/ml IL-10 组。其中后 3 组统称为高糖 + IL-10 组。以 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,接种于 96 孔培养板、12 孔培养板及 100 ml 培养瓶中,加入干预因素作用 48 h 后收集细胞用于各项检测,每项实验重复 3 次。

1.4　免疫细胞化学法检测 α-SMA 的表达

倾去预置玻片的 12 孔培养板中的培养液,PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min。取出细胞爬片, 5% 山羊血清封闭。滴加一抗 α-SMA(1/100),4 ℃过夜,滴加二抗, DAB 显色。阴性者苏木精复染。采用生物医学图像分析系统进行图像分析,用平均吸光度表示阳性物质的相对含量。

1.5　RT-PCR 法检测结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)mRNA 的表达

用 Trizol 试剂提取实验各组培养瓶中的总 RNA。10 μl 反应体系合成 cDNA。以逆转录产物为模板,CTGF 和 β-actin 同等条件扩增。CTGF 引物正义链: 5′-ACCCAACTATGATT-AGAGCCA-3′,反义链: 5′-CCGTCGGTACATACTCCACA-3′。β-actin 引物正义链:5′-CACCAACTGGGACGACAT-3′,反义链:5′-ACAGCCTGGATAGCAACG-3′。反应参数如下:预变性 94 ℃ 2 min,变性 94 ℃ 30 s,退火 56 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 2 min,35 个循环,最后 72 ℃继续延伸 5 min。取 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统分析。计算 CTGF 与内参照 β-actin 吸光度值的比值。

1.6　Western blot 法检测 α-SMA 蛋白的表达

收集各组细胞提取总蛋白。聚丙烯酰胺凝胶上样 30 μl/孔,电泳,转膜,封闭,加入一抗 α-SMA(1/200)、β-actin(1/2 000)孵育过夜,洗涤后加二抗(1/2 500),ECL 发光试剂曝光、显影。化学发光分析系统进行灰度分析。

1.7　ELISA 法检测纤连蛋白(fibronectin,FN)的分泌

按 ELISA 试剂盒说明书的步骤测定 96 孔板中各组细胞上清液中的 FN 的浓度。

1.8　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　免疫细胞化学法检测 α-SMA 蛋白的表达

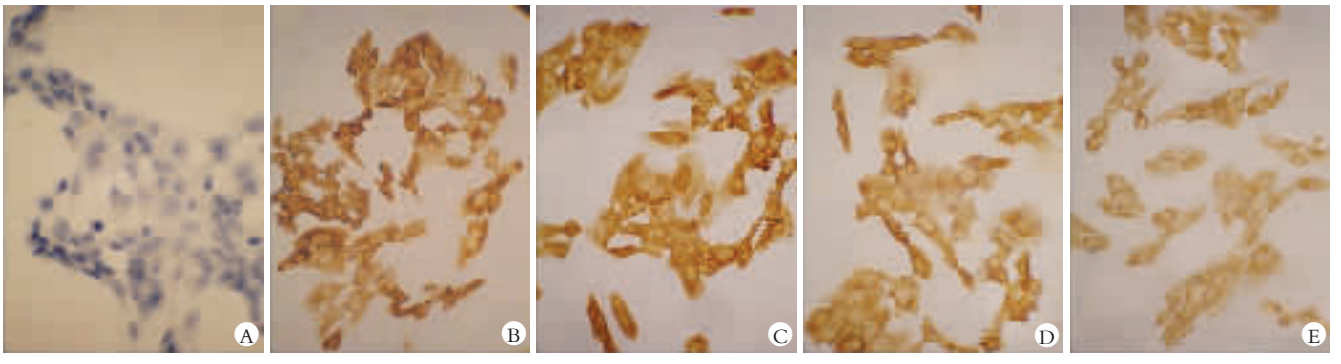
α-SMA 的表达:对照组,细胞细胞质未见棕黄色颗粒,α-SMA 表达为阴性,其吸光度值为(0.067 ± 0.015);高糖组,细胞质内见棕黄色颗粒,其吸光度值为(0.613 ± 0.051),较对照组增加($P < 0.05$);在高糖中分别加入 1、5、25 ng/ml 的 IL-10 后,细胞质内棕黄色颗粒的吸光度值分别为(0.437 ± 0.025)、(0.360 ± 0.044)、(0.207 ± 0.025),较高糖组减少($P < 0.05$),较对照组增加 ($P < 0.05$),其程度变化与 IL-10 的浓度有关。见图 1。

2.2　RT-PCR 法检测 CTGF mRNA 的表达

CTGF mRNA 的表达:实验各组在 189 bp 处均可见 β-actin 扩增带,在 298 bp 处可见 CTGF 扩增带。对照组、高糖组及 30 mmol/L D-葡萄糖 + 1 ng/ml IL-10 组、30 mmol/L 的 D-葡萄糖 + 5 ng/ml IL-10 组、30 mmol/L 的 D-葡萄糖 + 25 ng/ml IL-10 组吸光度比值分别为(0.177 ± 0.015)、(0.840 ± 0.046)、(0.620 ± 0.026)、(0.566 ± 0.025)、(0.353 ± 0.020),表明高糖 + IL-10 组 CTGF mRNA 水平高于对照组($P < 0.05$),低于高糖组($P < 0.05$),增加 IL-10 的刺激浓度,CTGF mRNA 的表达水平降低更加明显。见图 2。

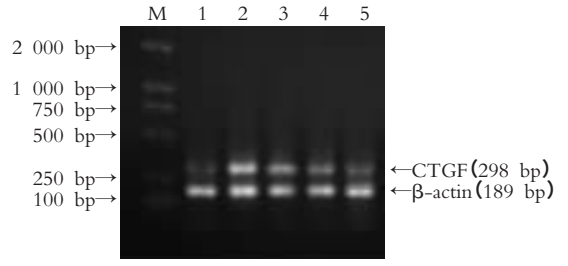
2.3　Western blot 法检测 α-SMA 蛋白的表达

结果显示,高糖 + IL-10 组和高糖组在 43×10^3 处可见 α-SMA 蛋白表达, 实验各组在 42×10^3 可见 β-actin 蛋白表达。对照组、高糖组及 30 mmol/L D-葡萄糖 + 1 ng/ml IL-10 组、30 mmol/L 的 D-葡萄糖 + 5 ng/ml IL-10 组、30 mmol/L 的 D-葡萄糖 + 25 ng/ml IL-10 组的积分光密度值分别为(0.008 ± 0.001)、(0.771 ± 0.078)、(0.561 ± 0.083)、(0.501 ± 0.067)、(0.306 ± 0.079),表明高糖 + IL-10 组 α-SMA 蛋白表达水平较对照组升高($P < 0.05$),较高糖组降低($P < 0.05$),并且 α-SMA 蛋白表达的高低与 IL-10 的浓度有关。见图 3。



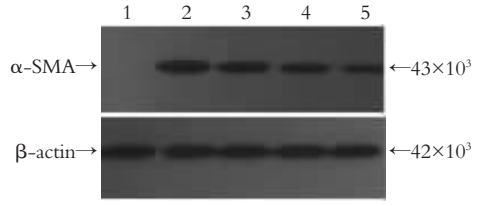
A:对照组; B:高糖组; C:30 mmol/L 的 D-葡萄糖 + 1 ng/ml IL-10 组;D:30 mmol/L 的 D-葡萄糖 + 5 ng/ml IL-10 组;E:30 mmol/L 的 D-葡萄糖 + 25 ng/ml IL-10 组

图 1　免疫细胞化学法检测 α-SMA 蛋白的表达　(S-P × 400)



M:DL 2000 标准;1:对照组; 2:高糖组;3:30 mmol/L 的 D-葡萄糖 +1 ng/ml IL-10 组;4:30 mmol/L 的 D-葡萄糖 +5 ng/ml IL-10 组; 5:30 mmol/L 的D-葡萄糖 +25 ng/ml IL-10 组

图 2 RT-PCR 法检测 CTGF mRNA 的表达



1:对照组;2:高糖组;3:30 mmol/L 的 D-葡萄糖 +1 ng/ml IL-10 组; 4:30 mmol/L 的 D-葡萄糖 +5 ng/ml IL-10 组;5:30 mmol/L 的 D-葡萄糖 +25 ng/ml IL-10 组

图 3 Western blot 法检测 α-SMA 蛋白的表达

2.4 ELISA 法检测 FN 的分泌

FN 的分泌:对照组、高糖组、30 mmol/L D-葡萄糖 + 1 ng/ml IL-10 组、30 mmol/L 的 D-葡萄糖 +5 ng/ml IL-10 组、30 mmol/L 的 D-葡萄糖 +25 ng/ml IL-10 组 FN 的分泌量分别为 (9.99 ± 1.68)、(55.22 ± 1.77)、(38.49 ± 1.55)、(31.74 ± 0.56)、(22.81 ± 0.52) μg/L,表明高糖 + IL-10 组 FN 的分泌量较对照组增加($P<0.05$),较高糖组减少($P<0.05$),并且其分泌量与 IL-10 的浓度有关。

3 讨论

肾小管 EMT 是肾间质纤维化的重要发病机制之一[3],在肾脏中有超过 1/3 的成纤维细胞起源于肾小管上皮细胞[4]。研究表明[5],肾小管 EMT 的发生首先是丧失上皮细胞的黏附特性,继而重新表达间充质细胞表型,因此间充质细胞表型 α-SMA 蛋白表达增加已成为 EMT 的标志。肾小管 EMT 后,一方面导致肾小管细胞丢失,肾小管萎缩;另一方面可分泌大量胶原基质,如Ⅰ型胶原、FN 以促进肾间质纤维化。

IL-10 是一个有多种功能的细胞因子,它能抑制单核巨噬细胞提呈抗原及分泌炎性细胞因子,使得与 T 细胞作用有关的细胞免疫反应受抑制,但它也能促进免疫球蛋白的产生及类别转化,增强体液免疫反应。研究发现[6], IL-10 可以有效降低 FGS/Kist 小鼠转化生长因子(transforming growth factor-beta 1, TGF-β1)的表达,减轻肾小球硬化,减少蛋白尿。将 rAAV1-IL-10 质粒转染进 5/6 肾切除大鼠中也发现 IL-10 可以使肾脏表达 TGF-β1 和Ⅰ、Ⅲ胶原减少,肾脏炎症和肾间质纤维化减轻[2]。IL-10 的上述作用是否与其对肾小管 EMT 的作用有关,IL-10 是否可以抑制肾小管 EMT 目前尚少见报道。在本实验中观察到高糖可以刺激肾小管 EMT,这与既往研究相一致。通过检测不同浓度 IL-10 对高糖诱导下的 HK-2 细胞表达 α-SMA 和 FN 的影响,发现 IL-10 可以抑制高糖诱导下的 α-SMA 及 FN 表达增加,说明外源性的 IL-10 可以抑制肾小管 EMT,提示 IL-10 减轻肾纤维化的作用部分是通过抑制转分化来实现的。

CTGF 是引起肾间质纤维化的重要细胞因子[7,8]。它在高糖环境中的表达增加[9,10],是公认的能促进肾小管 EMT 的因素之一。在本实验中我们观察到在高糖刺激下,CTGF 表达升高与 α-SMA 及 FN 表达增加相一致,也说明了 CTGF 能够介导肾小管 EMT。在高糖环境中加入 IL-10 干预后发现 CTGF 表达降低,表明 IL-10 可以通过 CTGF 通路抑制肾小管 EMT。

综上所述,本研究证实了 IL-10 可以通过抑制 CTGF而抑制高糖诱导的肾小管 EMT,为肾间质纤维化的防治研究提供了新的思路和理论基础。

参考文献:

[1] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(1): 1 – 12.

[2] Mu W, Ouyang X S, Agarwal A, *et al*. IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(12): 3651 – 3660.

[3] Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis[J]. J Mol Med, 2004, 82(3): 175 – 181.

[4] Kalluri R, Neilson E G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis[J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1776 – 1784.

[5] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis[J]. Am J Pathol, 2001, 59(4): 1465 – 1475.

[6] Choi Y K, Kim Y J, Park H S, *et al*. Suppression of glomerulosclerosis by adenovirus-mediated IL-10 expression in the kidney[J]. Gene Ther, 2003, 10(7): 559 – 568.

[7] Okada H, Kikuta T, Kobayashi T, *et al*. Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1): 133 – 143.

[8] Wahab N A, Mason R M. A critical look at growth factors and epithelial-to-mesenchymal transition in the adult kidney. Interrelationships between growth factors that regulate EMT in the adult kidney[J]. Nephron Exp Nephrol, 2006, 104(4): e129 – e134.

[9] Kobayashi T, Inoue T, Okada H, *et al*. Connective tissue growth factor mediates the profibrotic effects of transforming growth factor-beta produced by tubular epithelial cells in response to high glucose[J]. Clin Exp Nephrol, 2005, 9(2): 114 – 121.

[10] Burns W C, Twigg S M, Forbes J M, *et al*. Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(9): 2484 – 2494.

(编辑 汪勤俭)