

IL-6 联合 sIL-6R 对人甲状腺细胞增殖及相关基因表达的影响

郑仁东 茅晓东 张会峰 曹琳 孙洪平 刘超

【摘要】 目的 探讨白细胞介素-6(IL-6)联合可溶性IL-6受体(sIL-6R)对人甲状腺细胞增殖及相关基因表达的影响。**方法** 通过手术标本获得甲状腺组织,采用甲状腺细胞培养技术,提取并培养甲状腺细胞。以不同浓度(0、1、5、10、20 $\mu\text{g/L}$)的IL-6分别联合sIL-6R 100 $\mu\text{g/L}$ 干预细胞 24、48 h,予以IL-6单克隆抗体进行阻断。以MTT法检测IL-6干预后的细胞活力,并在显微镜下观察细胞形态学变化;以RT-PCR测定IL-6、IL-6受体及糖蛋白 130 的表达,实时定量 PCR 检测IL-6干预后甲状腺细胞的钠-碘转运体(NIS)、甲状腺过氧化物酶(TPO)、甲状腺球蛋白(TG)、促甲状腺激素受体(TSHR)基因的表达。**结果** 甲状腺细胞表达IL-6、糖蛋白 130,但几乎不表达IL-6受体。IL-6联合sIL-6R培养 24、48 h后,甲状腺细胞活力显著增加($F=65.28, 78.47$; P 均 <0.05),而使用IL-6单克隆抗体进行阻断,发现随着IL-6单克隆抗体浓度的增加,甲状腺细胞活性亦显著下降($F=60.15, P<0.05$);随着IL-6浓度的增加,甲状腺细胞数量越多,体积越大。IL-6能够抑制NIS、TPO、TG基因的表达($t=6.92\sim 12.12, P$ 均 <0.05),而对TSHR基因无明显影响。**结论** IL-6联合sIL-6R能够促进甲状腺细胞增殖,同时也能够抑制甲状腺相关基因的表达。

【关键词】 白细胞介素-6;可溶性白细胞介素-6受体;甲状腺细胞;增殖;基因;炎症

Effects of IL-6 plus sIL-6R on cell proliferation and expression of related genes in human thyroid cells Zheng Rendong, Mao Xiaodong, Zhang Hui Feng, Cao Lin, Sun Hongping, Liu Chao. Endocrine and Diabetes Center, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Branch of China Academy of Chinese Medical Science, Nanjing 210028, China

Corresponding author: Liu Chao, Email: liuchao@nfm.cn.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of interleukin-6 (IL-6) and soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) on cell proliferation and related genes expression in human thyroid cells. **Methods** Thyroid tissues were obtained by surgery, and the thyroid cells were isolated and cultured by thyroid culture technology. Cells were cultured with different concentrations of IL-6 (0, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g/L}$, respectively) plus 100 $\mu\text{g/L}$ sIL-6R for 24 or 48 h. Cell viability was detected by MTT method after blocked by IL-6 monoclonal antibody in thyroid cells. The expression of IL-6, IL-6 receptor and glycoprotein 130 were detected by RT-PCR. The gene expression of sodium iodide transporter (NIS), thyroid peroxidase (TPO), thyroglobulin (TG) and thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) were detected by real-time quantitative PCR. **Results** Thyroid cells expressed IL-6, glycoprotein 130 but not IL-6 receptor. IL-6 plus sIL-6R increased the viability of thyroid cell after 24 h, 48 h ($F=65.28, 78.47$; all $P<0.05$), but IL-6 monoclonal antibody decreased the cell activity in dose dependent manner ($F=60.15, P<0.05$). With the increase of IL-6 concentration, the cell number and volume increased. IL-6 inhibited the gene expression of NIS, TPO and TG ($t=6.92\sim 12.12$, all $P<0.05$), but not TSHR. **Conclusion** IL-6 plus sIL-6R can promote the proliferation of thyroid cells, but also can inhibit the expression of genes in thyroid cells.

【Key words】 Interleukin-6; Soluble interleukin-6 receptor; Thyroid cells; Proliferation; Gene; Inflammation

炎症反应和甲状腺疾病之间存在密切关联,自身免疫性甲状腺疾病患者易发生甲状腺功能减退症,形成甲状腺结节,甚至发生甲状腺肿瘤。在炎症反应状态下,各类炎症因子、趋化因子的持续存在以及由其引发的级联反应能够诱导细胞增殖,趋化炎症反应细胞聚集,增加活性氧簇的产生,导致氧化损伤,最终导致甲状腺功能的丧失^[1]。研究发现,白细胞介素(IL)-6 与甲状腺疾病关系较为密切,甲状腺细胞能够分泌IL-6,且在炎症反应刺激下,分泌的IL-6水平亦明显升高^[2]。另一方面,研究报道,研究IL-6能够抑制甲状腺细胞分泌T₃、T₄^[3]。因此,研究IL-6对甲状腺细胞的增殖及相关基因表达的影响,对甲状腺疾病的防治有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM/F-12 培养液为美国 Invitrogen 公司产品,实时定量 PCR 试剂盒 ABsolute QPCR SYBR Green FluoresceinMix 为日本公司产品。IL-6、可溶性白细胞介素-6 受体(sIL-6R)、IL-6单克隆抗体、MTT 试剂购自美国 Sigma 公司;引物购自 Invitrogen 公司。甲状腺细胞由取自甲状腺良性结节手术患者的正常甲状腺组织培养获得,Hela 细胞作为阳性对照。本研究已获得医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 甲状腺细胞培养 根据文献进行原代甲状腺细胞培养^[4]。原代培养获得细胞应用 Ham's F-12培养基进行培养,其中添加 10% 胎牛血清、1% MEM、5 U/L促甲状腺激素和甘氨酸-组氨酰赖氨酸、胰岛素、生长抑素、转铁蛋白、氢化可的松。每隔 2 ~ 3 d更换 1 次培养液,观察甲状腺细胞的生长情况。

1.2.2 细胞形态观察 不同浓度的IL-6 (0、5、10、20 μg/L)与sIL-6R (100 μg/L)联合培养的处于对数

生长期的甲状腺细胞,于48 h后观察细胞的形态变化,倒置显微镜拍摄(200 ×)。

1.2.3 细胞活力实验 采用 MTT 检测细胞活力。进行预培养 24 h 后,以不同浓度 (0、1、5、10、20 μg/L)的IL-6分别联合sIL-6R 100 μg/L干预细胞 24、48 h;另外, sIL-6R 100 μg/L及IL-6 20 μg/L联合培养,同时加入不同浓度的IL-6单克隆抗体 (0、0.1、1、5、10 μg/ml)进行阻断干预48 h,在干预结束前4 h加入 0.5 g/L MTT,继续孵育4 h,弃上清,以 DMSO溶解结晶,读取 490 nm下的吸光度。

1.2.4 PCR 依照 Rneasy mini kit 使用说明提取甲状腺细胞总 RNA。提取的总 RNA 经过 RNase-free Dnase I 处理后,用紫外分光光度计检测纯度和浓度。用不含核酸降解酶的双蒸水调节 RNA 浓度为 0.5 μg/μl,作为 cDNA 合成的模板,具体操作参照 PrimerScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒。参考 ABsolute QPCR SYBR Green FluoresceinMix 试剂盒操作步骤进行目的基因的扩增,反应体系为 20 μl (1 μl cDNA,10 μl SYBR Premix EX Taq,1 μl primer,7 μl ddH₂O)。

半定量逆转录 PCR 扩增条件(IL-6、IL-6受体及糖蛋白 130):95℃ 预变性10 min,95℃ 变性30 s,58 ~ 60℃ 退火30 s,72℃延伸60 s,35 个循环,最后 72℃延伸10 min。

实时定量 PCR 反应条件[(钠-碘转运体(NIS)、甲状腺过氧化物酶(TPO)、甲状腺球蛋白(TG)、促甲状腺激素受体(TSHR)] :95℃预变性15 min,95℃变性15 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,50 个循环。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 mRNA 的表达水平。选择 β-actin、18s RNA作为内参。引物序列见表 1。

表 1 不同基因引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)
白细胞介素-6	上游引物: 5'-ATGAAGCTCTTCTCCACAAGCGC-3'	630
	下游引物: 5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'	
白细胞介素-6 受体	上游引物: 5'-CATTGCCATTGTCTGAGGTTTC-3'	251
	下游引物: 5'-AGTAGTCTGTATTGCTGATGTC-3'	
糖蛋白 130	上游引物: 5'-CATGCTTTGGGTGGAATGGAC-3'	326
	下游引物: 5'-CATCAACAGGAAGTTGGTCCC-3'	
钠-碘转运体	上游引物: 5'-TCTCTCAGTCAACGCCTCT-3'	298
	下游引物: 5'-ATCCAGGATGGCCACTTCTT-3'	
甲状腺球蛋白	上游引物: 5'-GAGCCCTACCTCTTCTGGCA-3'	324
	下游引物: 5'-ATCCAGGATGGCCACTTCTT-3'	
促甲状腺激素受体	上游引物: 5'-AGCCACTGCTGTGCTTTTAAG-3'	131
	下游引物: 5'-CCAAAACCAATGATCTCATCC-3'	
甲状腺过氧化物酶	上游引物: 5'-GTCTGTCAGGCTGGTTATGG-3'	242
	下游引物: 5'-CAATCACTCCGCTTGTGGC-3'	
β-actin	上游引物: 5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA-3'	192
	下游引物: 5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA-3'	
18s RNA	上游引物: 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3'	110
	下游引物: 5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'	

1.3 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析。两组间比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

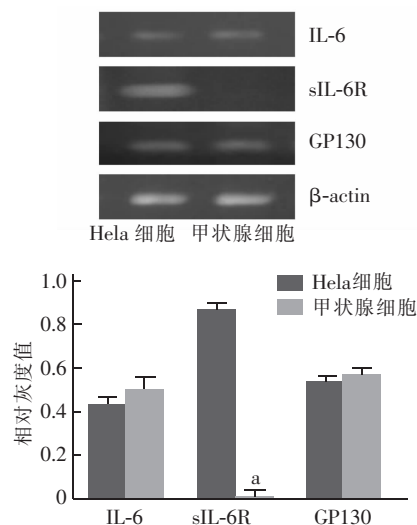
2.1 IL-6、IL-6受体及糖蛋白 130 在甲状腺细胞中的表达 以 HeLa 细胞作为阳性对照,RT-PCR 检测发现,甲状腺细胞几乎不表达 IL-6 受体,但能够表达 IL-6 和糖蛋白 130 (图 1)。

2.2 IL-6 对甲状腺细胞增殖的作用 在无 sIL-6R 存在的情况下,不同浓度 IL-6 对甲状腺细胞活性的影响无统计学意义 (图 2A)。当与 sIL-6R 联合培养后,随着 IL-6 浓度的增加,培养 24 h (图 2B) 及 48 h (图 2C) 后,甲状腺细胞活性均显著增加,且呈剂量性 ($F = 65.28, 78.47; P$ 均 < 0.05)。进一步使用 IL-6 单克隆抗体进行阻断,发现与未加入单克隆抗体组相比,甲状腺细胞活性下降,且随着 IL-6 单克隆抗体 ($0 \sim 10$ mg/L) 浓度的增加,甲状腺细胞活性逐渐下降,且呈剂量依赖性 ($F = 60.15, P < 0.05$, 图 2D)。

2.3 IL-6 对甲状腺细胞生长的形态学观察 sIL-6R 联合不同浓度 IL-6 培养甲状腺细胞 48 h 后,随着 IL-6 浓度的增加,甲状腺细胞数量增加,体积增大 (图 3, 封 4)。

2.4 IL-6 对甲状腺细胞相关基因表达的影响 实时定量 PCR 分析发现,使用 IL-6 20 $\mu\text{g/L}$ 进行细胞培养,发现 IL-6 能够显著抑制 NIS、TPO 及 TG 基因的

表达 ($t = 8.66, 12.12, 6.92, P$ 均 < 0.05),但对 TSHR 基因无显著影响 (图 4)。

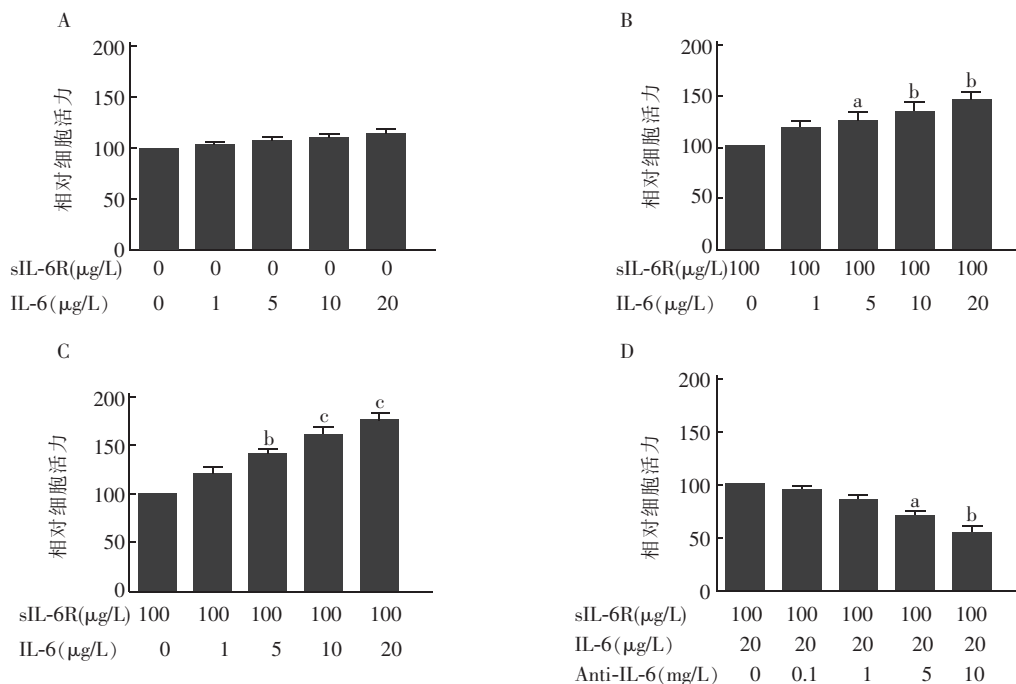


注:IL-6:白细胞介素-6;IL-6R:白细胞介素-6受体;GP130:糖蛋白 130;与 HeLa 细胞相比,^a $P < 0.001$

图 1 甲状腺细胞中 IL-6、IL-6R 及糖蛋白 130 基因的表达

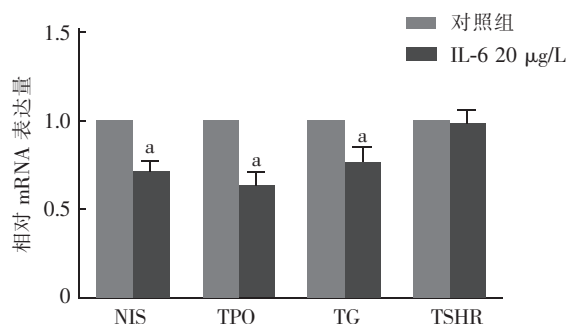
3 讨论

炎症反应在甲状腺疾病的发病机制中扮演十分重要的角色。研究发现,Graves 病和桥本甲状腺炎患者血清炎症反应因子 IL-6 水平明显升高^[5-6]。IL-6 与甲状腺癌的生长、侵袭、转移密切相关^[7]。由此可见,IL-6 可能参与了甲状腺疾病的发生、发展。



注:A:无 sIL-6R 联合培养状态下,不同浓度的 IL-6 对甲状腺细胞活性的影响;B:与 sIL-6R 100 $\mu\text{g/L}$ 联合培养 24 h 后,不同浓度的 IL-6 对甲状腺细胞活性的影响;C:与 sIL-6R 100 $\mu\text{g/L}$ 联合培养 48 h,不同浓度的 IL-6 对甲状腺细胞活性的影响;D:与 sIL-6R 100 $\mu\text{g/L}$ 及 IL-6 20 $\mu\text{g/L}$ 联合培养 48 h,不同浓度的 IL-6 单克隆抗体 ($0 \sim 10$ mg/L) 对甲状腺细胞活性的影响;IL-6:白细胞介素-6;sIL-6R:可溶性白细胞介素-6受体;Anti-IL-6:IL-6 单克隆抗体;分别与 sIL-6R 0 $\mu\text{g/L}$ + IL-6 0 $\mu\text{g/L}$ 组 (A)、sIL-6R 100 $\mu\text{g/L}$ + IL-6 0 $\mu\text{g/L}$ 组 (B)、sIL-6R 100 $\mu\text{g/L}$ + IL-6 0 $\mu\text{g/L}$ 组 (C)、sIL-6R 100 $\mu\text{g/L}$ + IL-6 20 $\mu\text{g/L}$ + Anti-IL-6 0 mg/L 组 (D) 相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$

图 2 IL-6 对甲状腺细胞活性的影响



注: NIS: 钠-碘转运体; TPO: 甲状腺过氧化物酶; TG: 甲状腺球蛋白; TSHR: 促甲状腺激素受体; 与对照组 (IL-6 0 µg/L + siIL-6R 100 µg/L) 相比, ^a $P < 0.05$

图 4 IL-6 对甲状腺细胞 NIS、TPO、TG 及 TSHR 基因表达的影响

一般认为, IL-6 的信号转导途径有两条: 经典通路与反式通路。经典通路是 IL-6 直接与细胞膜上的 IL-6 受体结合介导细胞信号转导, 而反式通路则是 IL-6 与血液中 sIL-6R 结合, 作用于细胞膜上的糖蛋白 130, 介导细胞信号转导^[8]。先前的研究发现, 甲状腺细胞很少表达 IL-6 受体^[3]。本研究也证实, 甲状腺细胞几乎不表达 IL-6 受体, 直接在培养液中加入 IL-6, 甲状腺细胞的增殖无明显变化, 而使用 IL-6 和 sIL-6R 联合培养后细胞出现明显增殖, 表明甲状腺细胞是通过反式途径发挥作用的。另外, 笔者尝试使用 IL-6 单克隆抗体对其增殖作用进行阻断, 发现其增殖明显受到抑制, 亦证实了 IL-6 对甲状腺细胞具有促增殖作用。

目前, IL-6 对甲状腺功能的影响仍未完全阐明。研究发现, 在 IL-6 和 sIL-6R 共同孵育下, 甲状腺细胞的摄碘功能受到明显抑制, 而且 T_3 及 T_4 水平明显降低^[3,9]。IL-6 在促甲状腺激素的作用下, 能够促进小鼠甲状腺细胞的增殖, 同时能够抑制甲状腺 NIS 与 TPO 的表达。本研究亦显示, IL-6 能够抑制人甲状腺细胞的 NIS 及 TPO 基因的表达。但也有临床研究发现, 桥本甲状腺炎患者血清 TPO 水平与血清 IL-6、干扰素- γ 及肿瘤坏死因子- α 呈显著正相关, 可能为 TPO 诱导体内 T 淋巴细胞活化产生大量炎症反应因子, 导致 IL-6 水平升高^[10]。

另外, IL-6 能够抑制促甲状腺激素促进甲状腺细胞生成 cAMP 的作用。Papanas 等^[11] 研究发现, 桥本甲状腺炎患者血清 IL-6 水平与甲状腺激素替代剂量呈正相关, 与 T_3 和 T_3/T_4 比值呈负相关。这些结果可能归因于 IL-6 对脱碘酶的抑制效应。提示桥本甲状腺炎患者炎症反应状态越重, IL-6 水平越高; 而高水平的 IL-6 又能够通过抑制甲状腺激素的合成而加重甲状腺功能减退。

由此可见, IL-6 对甲状腺细胞具有显著的增殖作用, 对相关基因 NIS 及 TPO 的表达具有显著抑制作用, 结合相关的临床发现, IL-6 可能与炎症反应状态下甲状腺肿大及甲状腺功能受抑制有一定关系。

因此, 进一步认识 IL-6 在甲状腺疾病中的作用, 有助于甲状腺疾病的诊断和预后判断。通过对甲状腺疾病分子机制及 IL-6 信号转导通路的认识, 以减少 IL-6 表达或阻断 IL-6 信号转导通路为靶点, 如使用 IL-6 单克隆抗体或受体抗体降低 IL-6 的生理效应, 可减轻甲状腺炎性反应状态, 应用于临床甲状腺疾病的治疗。

目前, 关于 IL-6 对甲状腺细胞的影响, 需要探究的问题很多, 不仅包括其增殖与基因调节, 还包括其对甲状腺细胞摄碘功能及甲状腺激素分泌功能, 以及对甲状腺细胞信号转导通路的影响。

参 考 文 献

- [1] Lumachi F, Basso SM, Orlando R. Cytokines, thyroid diseases and thyroid cancer[J]. Cytokine, 2010, 50 (3): 229-233. DOI: 10.1016/j.cyt.2010.03.005.
- [2] Linkov F, Ferris RL, Yurkovetsky Z, et al. Multiplex analysis of cytokines as biomarkers that differentiate benign and malignant thyroid diseases[J]. Proteomics Clin Appl, 2008, 2 (12): 1575-1585. DOI: 10.1002/prca.200780095.
- [3] Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, et al. Interleukin-6 (IL-6) inhibits thyroid function in the presence of soluble IL-6 receptor in cultured human thyroid follicles[J]. Endocrinology, 1996, 137 (11): 4857-4863.
- [4] 兰玲, 崔岱, 施秉银, 等. 人甲状腺成体干细胞的分离、培养及诱导分化[J]. 中华医学杂志, 2012, 92 (12): 806-810. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2012.12.005.
- [5] 李红林, 高美华, 郑云会, 等. 细胞因子 IFN- γ 、IL-6、IL-17 和 TGF- β 1 在 Graves 病发病中的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2015 (2): 253-256. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2015.02.022.
- [6] Siemińska L, Wojciechowska C, Kos-Kudła B, et al. Serum concentrations of leptin, adiponectin, and interleukin-6 in postmenopausal women with Hashimoto's thyroiditis[J]. Endokrynol Pol, 2010, 61 (1): 112-116.
- [7] Provatopoulou X, Georgiadou D, Sergeantanis TN, et al. Interleukins as markers of inflammation in malignant and benign thyroid disease[J]. Inflamm Res, 2014, 63 (8): 667-674. DOI: 10.1007/s00011-014-0739-z.
- [8] Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8 (9): 1237-1247. DOI: 10.7150/ijbs.4989.
- [9] Murai H, Murakami S, Ishida K, et al. Elevated serum interleukin-6 and decreased thyroid hormone levels in postoperative patients and effects of IL-6 on thyroid cell function *in vitro* [J]. Thyroid, 1996, 6 (6): 601-606. DOI: 10.1089/thy.1996.6.601.
- [10] Nielsen CH, Brix TH, Leslie RG, et al. A role for autoantibodies in enhancement of pro-inflammatory cytokine responses to a self-antigen, thyroid peroxidase [J]. Clin Immunol, 2009, 133 (2): 218-227. DOI: 10.1016/j.clim.2009.07.014.
- [11] Papanas N, Papazoglou D, Papatheodorou K, et al. Thyroxine replacement dose in patients with Hashimoto disease: a potential role for interleukin-6 [J]. Cytokine, 2006, 35 (3-4): 166-170. DOI: 10.1016/j.cyt.2006.07.017.

(收稿日期: 2016-01-10)