

褪黑素对人腹膜间皮细胞上皮-间质转化的作用及机制

刘珊, 张明霞, 刘伦志

(湖北民族大学附属民大医院肾内科, 湖北省肾脏病临床医学研究中心, 湖北 恩施 445000)

摘要 目的 探讨褪黑素对人腹膜间皮细胞上皮-间质转化(EMT)的作用及机制。方法 培养人腹膜间皮细胞株HMrSV5, 构建核心蛋白聚糖(DCN)过表达和敲减质粒。将细胞分为正常对照组、TGF- β 1组、TGF- β 1+褪黑素组、TGF- β 1+褪黑素+siDCN组、TGF- β 1+褪黑素+siNC组、TGF- β 1+DCN组。采用CCK-8法检测细胞增殖存活率;采用蛋白免疫印迹和实时定量PCR检测DCN、TGF- β 1、Smad2、E-cadherin蛋白和mRNA表达水平。结果 CCK-8结果显示,TGF- β 1+褪黑素组、TGF- β 1+褪黑素+siDCN组、TGF- β 1+DCN组细胞存活率均较TGF- β 1组高,TGF- β 1+褪黑素组较TGF- β 1+褪黑素+siDCN组细胞存活率更高(均 $P < 0.05$)。蛋白免疫印迹及实时定量PCR表明,TGF- β 1组较对照组DCN和E-cadherin表达明显下调,TGF- β 1+褪黑素组与TGF- β 1+褪黑素+siDCN组较TGF- β 1组DCN、E-cadherin蛋白及mRNA表达上调,TGF- β 1、Smad2蛋白及mRNA表达下调;TGF- β 1+褪黑素组较TGF- β 1+褪黑素+siDCN组进一步上调E-cadherin、DCN蛋白及mRNA表达,进一步下调TGF- β 1、Smad2蛋白及mRNA表达(均 $P < 0.05$)。结论 褪黑素可延缓人腹膜间皮细胞EMT进程,DCN基因可能是抑制该细胞发生EMT的一个重要靶点。

关键词 褪黑素;人腹膜间皮细胞;核心蛋白聚糖;上皮-间质转化

中图分类号 R656.4 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)03-0235-05

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240229.1551.008>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2024.03.008

Effect and mechanism of melatonin on the epithelial-mesenchymal transition of human peritoneal mesenchymal cells

LIU Shan, ZHANG Mingxia, LIU Lunzhi

(Department of Nephrology, Minda Hospital of Hubei Minzu University, Hubei Provincial Clinical Medical Research Center for Nephropathy, Enshi 445000, China)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of melatonin on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human peritoneal mesothelial cells. **Methods** A human peritoneal mesoepithelial cell line (HMrSV5) was cultured. Decorin (DCN) overexpression and knockout plasmids were constructed. The cells were divided into the normal, TGF- β 1, TGF- β 1+melatonin, TGF- β 1+melatonin+siDCN, TGF- β 1+melatonin+siNC, and TGF- β 1+DCN groups. The cell proliferation and survival rates were determined using Cell Counting Kit-8 (CCK-8). The protein and mRNA expression levels of DCN, TGF- β 1, Smad2, and E-cadherin were detected by Western blotting and real-time polymerase chain reaction (PCR), respectively. **Results** The CCK-8 assay showed that the cell survival rates were higher in the TGF- β 1+melatonin, TGF- β 1+melatonin+siDCN, and TGF- β 1+DCN groups than the TGF- β 1 group ($P < 0.05$). The cell survival rate was higher for the TGF- β 1+melatonin group than the TGF- β 1+melatonin+siDCN group ($P < 0.05$). Western blotting and real-time PCR showed DCN and that E-cadherin were significantly down-regulated in the TGF- β 1 group compared with the control group ($P < 0.05$). Compared with the TGF- β 1 group, the TGF- β 1+melatonin and TGF- β 1+melatonin+siDCN groups showed up-regulated E-cadherin and DCN expression levels and down-regulated TGF- β 1 and Smad2 expression levels ($P < 0.05$). Compared with the TGF- β 1+melatonin+siDCN group, the TGF- β 1+melatonin+siDCN group showed up-regulated E-cadherin and DCN expression levels and down-regulated TGF- β 1 and Smad2 expression levels ($P < 0.05$). **Conclusion** Melatonin can delay the EMT of human peritoneal mesoepithelial cells, and the DCN gene may be an important target to inhibit the EMT of these cells.

Keywords melatonin; human peritoneal mesothelial cell; decorin; epithelial-mesenchymal transdifferentiation

腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)是终末期肾脏

病(end-stage kidney disease, ESKD)的主要肾脏替代疗法之一,目前全球约有11%的ESKD患者选择PD^[1]。PD液中的高糖、低pH值等多种因素可导致PD患者发生腹膜纤维化(peritoneal fibrosis, PF),PF是PD患者发生腹膜超滤衰竭及退出PD的重要原因^[2],因此,延缓PF对保证PD患者长期有效透析至关重要。

基金项目:湖北省教育厅科学研究计划(B2021155)

作者简介:刘珊(1979-),女,主治医师,硕士。

通信作者:刘珊, E-mail: 1021352602@qq.com

收稿日期:2023-05-16

网络出版时间:2024-03-04 15:51:55

转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)是腹膜上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的关键诱导物,而EMT在PF的发生和进展中起重要作用^[3]。核心蛋白聚糖(decorin, DCN)的一个特定结构域可与TGF-β结合,从而阻止TGF-β与其他受体结合^[4]。在腹膜间皮细胞中,褪黑素能够逆转脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的EMT过程^[5]。本研究拟通过人腹膜间皮细胞HMrSV5明确褪黑素是否参与调控DCN, DCN是否是治疗PF的潜在靶点,并探讨其治疗PF的可能机制,为相关临床研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞:人腹膜间皮细胞株HMrSV5由武汉大学生物典藏库CCTCC提供。用含10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 g/mL)的DMEM/F12培养基培养。细胞密度达80%时进行传代。

1.1.2 质粒构建:DCN (human) -shRNA及DCN (NM-001920.5) 过表达重组质粒均由载基生物有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 分组:(1) 正常对照组,不加任何处理;(2) TGF-β1组,采用TGF-β1诱导细胞;(3) TGF-β1+褪黑素组, TGF-β1对细胞进行诱导后,利用褪黑素干预;(4) TGF-β1+褪黑素+siDCN组,对细胞进行TGF-β1诱导后,采用褪黑素干预,并进行DCN敲减质粒转染;(5) TGF-β1+褪黑素+siNC组,对细胞进行TGF-β1诱导后,采用褪黑素干预,并进行DCN空载质粒转染;(6) TGF-β1+DCN组,对细胞采用TGF-β1诱导后,进行DCN过表达质粒转染。

1.2.2 质粒转染及药物处理:用脂质体转染试剂Lipofectamine[®] 3000转染DCN-shRNA和DCN过表达质粒,并按照分组情况加入TGF-β1 (10 ng/mL) 和褪黑素(1 nmol/L)继续培养24 h。

1.2.3 CCK-8检测:消化并调整细胞浓度,接种于96孔板并培养过夜。分别加入CCK-8 (10 μL/孔)并孵育1.5 h,酶标仪上测定吸光度值(OD_{450 nm})。

1.2.4 Western blotting:加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取总蛋白,100 °C变性5 min;取等量蛋白行SDS-PAGE凝胶电泳分离,转移至PVDF膜;5%BSA

封闭1 h后,加入相应的一抗,4 °C孵育过夜;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育1.5 h;加入发光液后,凝胶成像仪进行曝光拍照,统计灰度值并计算相对表达量。

1.2.5 实时PCR:氯仿、异丙醇法提取总RNA。琼脂糖凝胶电泳分析RNA纯度,分光光度计下测定RNA浓度。按照试剂盒(NovoScript[®] Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix,中国诺沃蛋白科技有限公司)说明书行逆转录获得cDNA。根据试剂盒(NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus,中国诺沃蛋白科技有限公司)说明书配制实时荧光定量PCR反应体系,并对DCN、E-cadherin、TGF-β1、Smad2进行PCR扩增,引物序列见表1。用2^{-ΔΔCt}法计算相对表达量。GAPDH作为内参照。

表1 PCR引物序列
Fig.1 Sequences of the PCR primers

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>GAPDH</i>	
F	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG
R	TCGGGGTCATTGATGGCAACAATA
<i>DCN</i>	
F	TCTCTCTAGTTGGATCAAGTGACT
R	TCTGAAGGTGGATGGCTGTAT
<i>Smad2</i>	
F	GCTGAGTGCCTAACTGATACTG
R	GATTAACAGACTGAGCCAGAAGAG
<i>E-cadherin</i>	
F	GGGTTATTCTCCCATCAGC
R	GTCACCTTCAGCCATCCTGT
<i>TGF-β1</i>	
F	GAGCCCTGGACACCAACTAT
R	AAGTTGGCATGCTAGCCCTT

1.3 统计学分析

各组实验重复3次以上。采用GraphPad Prism5和SPSS 25.0统计软件进行分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组比较采用t检验,多个实验组与对照组比较采用Dunnnett检验,两两比较采用单因素方差分析,在满足方差齐性条件下采用LSD法两两比较。P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8实验结果

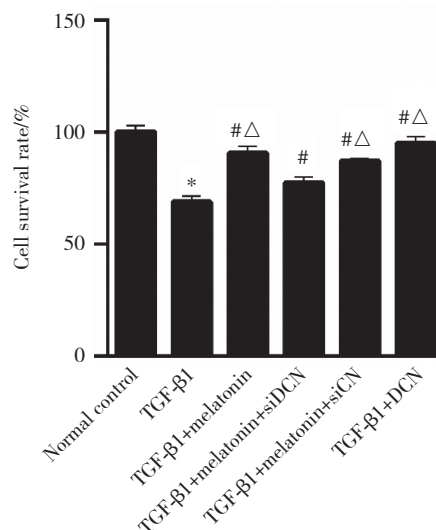
TGF- β 1组细胞存活率低于其他各组,TGF- β 1+褪黑素组与TGF- β 1+DCN组细胞存活率高于TGF- β 1+褪黑素+siDCN组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1。

2.2 Western blotting结果

与正常对照组比较,TGF- β 1组DCN和E-cadherin蛋白表达均下调,TGF- β 1、Smad2蛋白表达均上调($P < 0.05$)。与TGF- β 1组比较,TGF- β 1+褪黑素组、TGF- β 1+褪黑素+siDCN组及TGF- β 1+DCN组DCN和E-cadherin蛋白表达均上调,TGF- β 1、Smad2蛋白均下调($P < 0.05$)；且TGF- β 1+褪黑素/DCN组较TGF- β 1+褪黑素+siDCN组DCN和E-cadherin蛋白表达明显上调,TGF- β 1、Smad2蛋白表达明显下调($P < 0.05$)。见图2。

2.3 实时PCR结果

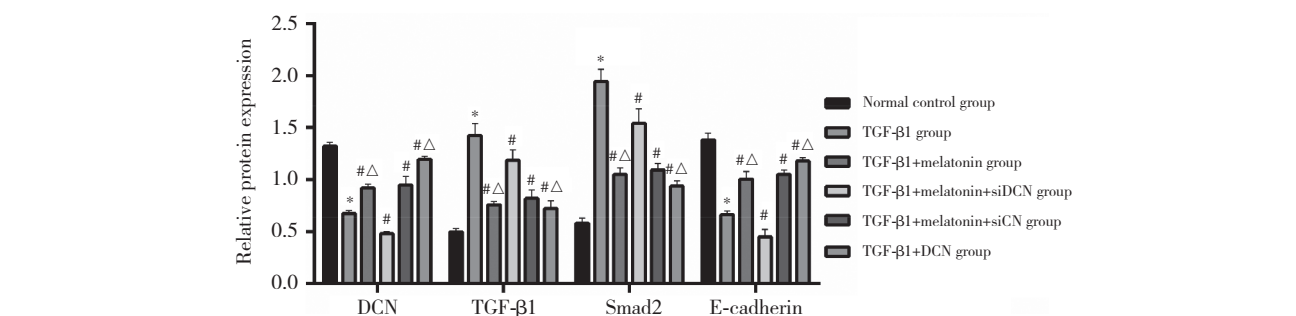
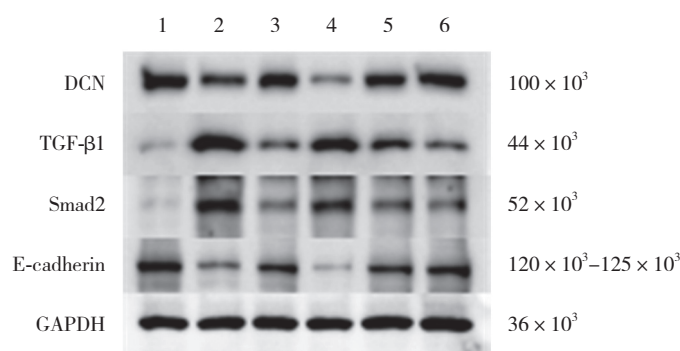
验证已构建DCN过表达质粒和筛选敲减质粒,分别确定为DCN(NM-001920.5)与DCN(human)-shRNA2(图3)。与正常对照组比较,TGF- β 1组DCN、E-cadherin



* $P < 0.05$ vs. normal control group; # $P < 0.05$ vs. TGF- β 1 group; $\Delta P < 0.05$ vs. TGF- β 1+melatonin+siDCN group.

图1 各组HMrSV5细胞CCK-8实验结果

Fig.1 Results of CCK-8 experiment on HMrSV5 cells in each group



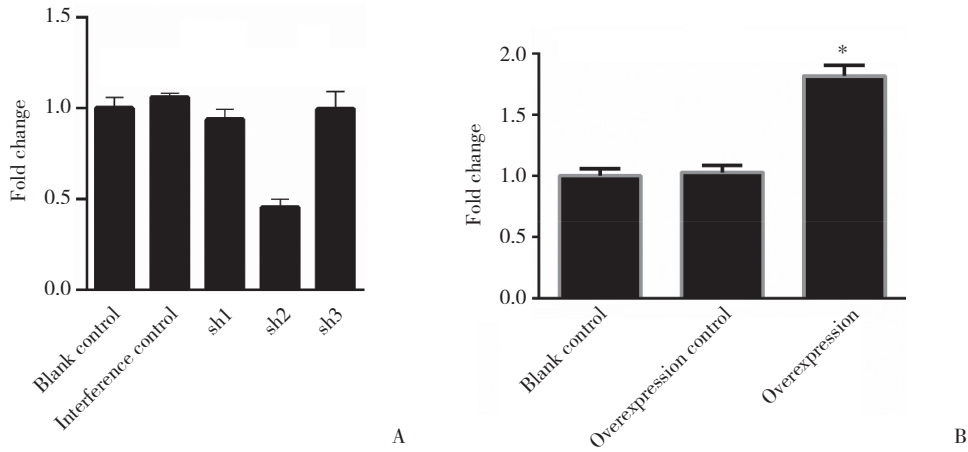
1, normal control group; 2, TGF- β 1 group; 3, TGF- β 1+melatonin group; 4, TGF- β 1+melatonin+siDCN group; 5, TGF- β 1+melatonin+siCN group; 6, TGF- β 1+DCN group. * $P < 0.05$ vs. normal control group; # $P < 0.05$ vs. TGF- β 1 group; $\Delta P < 0.05$ vs. TGF- β 1+melatonin+siDCN group.

图2 各组HMrSV5细胞DCN、E-cadherin、TGF- β 1、Smad2 蛋白表达情况

Fig.2 Expression of DCN, E-cadherin, TGF- β 1, and Smad2 protein in HMrSV5 cells of each group

mRNA表达下调,TGF- β 1、Smad2 mRNA表达上调(均 $P < 0.05$)。与TGF- β 1组对比,TGF- β 1+褪黑素或DCN组DCN、E-cadherin mRNA表达上调,TGF- β 1、Smad2 mRNA表达下调(均 $P < 0.05$)；且TGF- β 1+褪黑素组

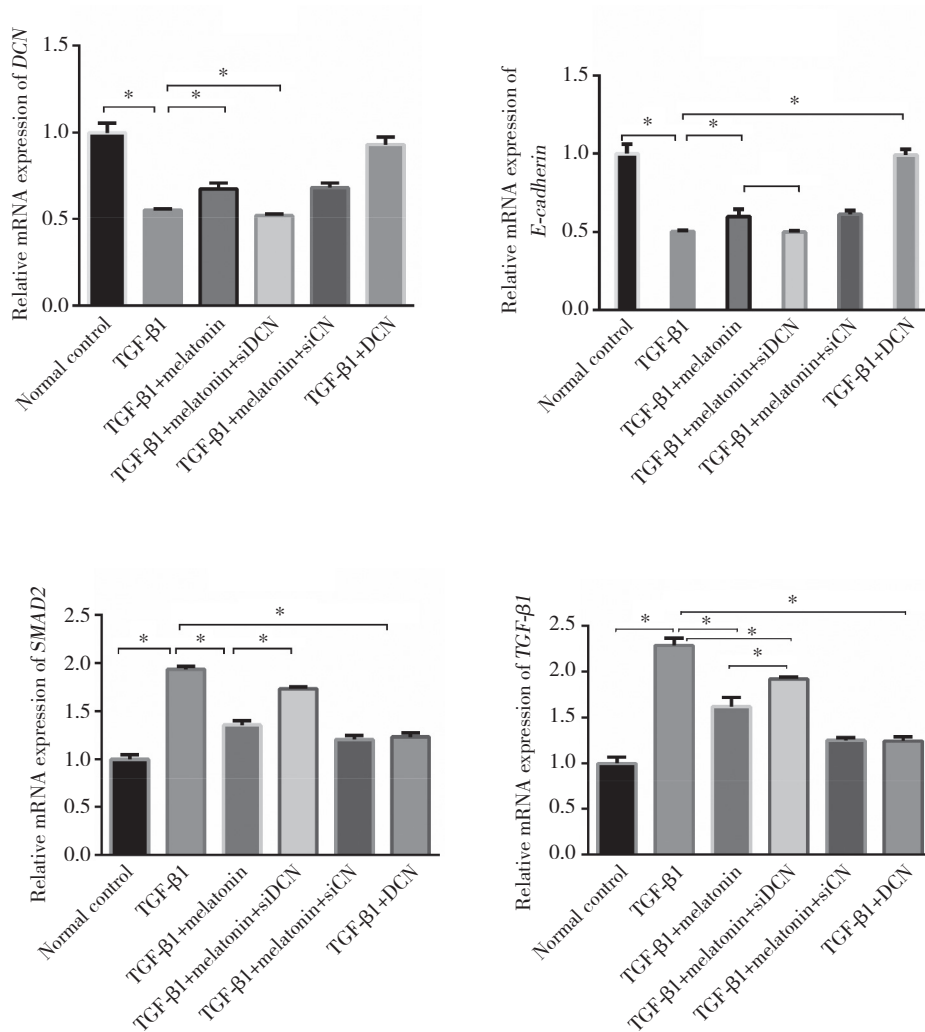
与TGF- β 1+DCN组较TGF- β 1+褪黑素+siDCN组DCN、E-cadherin mRNA表达明显上调,TGF- β 1、Smad2 mRNA表达明显下调(均 $P < 0.05$)。见图4。



A, *DCN* (human) -shRNA screening. * $P < 0.05$, *DCN* (human) -shRNA2 group vs. blank control group, interference control group, *DCN* (human) -shRNA1 group, *DCN* (human) -shRNA3 group; B, verification of *DCN* overexpression plasmid. * $P < 0.05$, *DCN* (NM-001920.5) group vs. blank control group or overexpression group.

图3 *DCN* (human) -shRNA筛选及*DCN*过表达质粒验证

Fig.3 *DCN* (human) -shRNA screening and verification of *DCN* overexpression plasmid



* $P < 0.05$.

图4 各组HMrSV5细胞*DCN*、*E-cadherin*、*TGF-β1*、*Smad2* mRNA表达情况

Fig.5 Expressions of *DCN*, *E-cadherin*, *TGF-β1*, and *Smad2* mRNA on HMrSV5 cells in each group

3 讨论

ESKD肾脏替代治疗中,由于肾移植资源有限,故患者被迫选择血液透析或PD。延缓PF是维持PD的重要保障,而抑制TGF- β 活化是防治PF的关键。研究^[6]表明,褪黑素能靶向TGF- β 信号轴发挥抗纤维化作用,而其是否能调控PF及其作用机制尚缺乏有效的实验基础。本研究通过药物、靶点、通路的有机结合,进一步研究了褪黑素对纤维化环境中人腹膜间皮细胞的作用及其机制。

褪黑素是人松果体分泌的主要激素,具有水溶性和脂溶性,可高效透过各种生物膜发挥抗氧化、抗凋亡和细胞保护等作用。褪黑素可减轻非酒精性脂肪肝小鼠肝脏炎症反应、球囊化和纤维化^[7];在腹膜间皮细胞中,褪黑素能逆转LPS诱导的EMT过程^[5]。本研究结果显示,褪黑素可使TGF- β 1诱导的HMrSV5细胞存活率明显提高,且明显下调TGF- β 1表达,上调E-cadherin表达,提示褪黑素可抑制纤维化环境中HMrSV5细胞的TGF- β 活化及EMT进展。

DCN是富含亮氨酸的小分子蛋白多糖,普遍存在于细胞外基质。DCN的某个特定结构域可与TGF- β 结合,从而阻止TGF- β 与其他受体结合^[4]。DCN作为生长因子的负性调节剂,在维持内环境稳定、基质形成、器官发育、细胞增殖分化过程中起重要作用^[7],并参与心脏、肝、骨骼肌、肺、腹膜等多种组织、器官纤维化的调控^[8-13]。DCN可调控包括TGF- β 在内的多种生长因子的生物利用度,从而改善PF。研究显示,TGF- β 1诱导的DCN基因沉默HMrSV5细胞被褪黑素处理后,可上调E-cadherin并下调TGF- β 1、Smad2蛋白及mRNA表达;而TGF- β 1诱导的HMrSV5细胞被褪黑素及DCN过表达处理后,比TGF- β 1诱导的沉默DCN基因细胞DCN、E-cadherin蛋白及mRNA表达进一步上调,TGF- β 1、Smad2蛋白及基因表达进一步下调。表明褪黑素可靶向激活DCN结合过度活化的TGF- β 1,同时抑制Smad2信号通路,部分逆转EMT,从而延缓PF。

综上所述,本研究发现,褪黑素可通过调控DCN/TGF- β 途径抑制Smad2通路,改善纤维化环境中的人腹膜间皮细胞EMT,提高细胞存活率。以上结果为PF的预防及治疗提供了新的靶点及干预思路。

参考文献:

- [1] TEITELBAUM I. Peritoneal dialysis [J]. N Engl J Med, 2021, 385 (19): 1786-1795. DOI: 10.1056/nejmra2100152.
- [2] 姜娜, 谢伟珍, 顾乐怡, 等. 继发性腹膜透析腹膜超滤衰竭发病机制的研究进展[J]. 中华肾脏病杂志, 2023, 39 (1): 42-47. DOI: 10.3760/cma.j.cn441217-20220509-00514.
- [3] ZHANG Y, HUANG QY, CHEN YH, et al. Parthenolide, an NF- κ B inhibitor, alleviates peritoneal fibrosis by suppressing the TGF- β /smad pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78: 106064. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.106064.
- [4] JÄRVINEN TAH, RUOSLAHTI E. Generation of a multi-functional, target organ-specific, anti-fibrotic molecule by molecular engineering of the extracellular matrix protein, decorin [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176 (1): 16-25. DOI: 10.1111/bph.14374.
- [5] SHI SS, ZHANG YQ, WEN WB, et al. Molecular mechanisms of melatonin in the reversal of LPS-induced EMT in peritoneal mesothelial cells [J]. Mol Med Rep, 2016, 14 (5): 4342-4348. DOI: 10.3892/mmr.2016.5744.
- [6] HAN YS, YOON YM, GO G, et al. Melatonin protects human renal proximal tubule epithelial cells against high glucose-mediated fibrosis via the cellular prion protein-TGF- β -smad signaling axis [J]. Int J Med Sci, 2020, 17 (9): 1235-1245. DOI: 10.7150/ijms.42603.
- [7] MIGUEL FM, PICADA JN, SILVA JB, et al. Melatonin attenuates inflammation, oxidative stress, and DNA damage in mice with non-alcoholic steatohepatitis induced by a methionine- and choline-deficient diet [J]. Inflammation, 2022, 45 (5): 1968-1984. DOI: 10.1007/s10753-022-01667-4.
- [8] THU VT, KIM HK, LONG LT, et al. NecroX-5 exerts anti-inflammatory and anti-fibrotic effects via modulation of the TNF α /DCN/TGF β 1/Smad2 pathway in hypoxia/reoxygenation-treated rat hearts [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2016, 20 (3): 305. DOI: 10.4196/kjpp.2016.20.3.305.
- [9] JANG YO, CHO MY, YUN CO, et al. Effect of function-enhanced mesenchymal stem cells infected with decorin-expressing adenovirus on hepatic fibrosis [J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5 (9): 1247-1256. DOI: 10.5966/sctm.2015-0323.
- [10] SHI YF, ZHANG Q, CHEUNG PY, et al. Effects of rhDecorin on TGF- β 1 induced human hepatic stellate cells LX-2 activation [J]. Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj, 2006, 1760 (11): 1587-1595. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.09.012.
- [11] CABELLO-VERRUGIO C, SANTANDER C, COFRÉ C, et al. The internal region leucine-rich repeat 6 of decorin interacts with low density lipoprotein receptor-related protein-1, modulates transforming growth factor (TGF)- β -dependent signaling, and inhibits TGF- β -dependent fibrotic response in skeletal muscles [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (9): 6773-6787. DOI: 10.1074/jbc.M111.312488.
- [12] LIU DM, KONG FX, YUAN Y, et al. Decorin-modified umbilical cord mesenchymal stem cells (MSCs) attenuate radiation-induced lung injuries via regulating inflammation, fibrotic factors, and immune responses [J]. Int J Radiat Oncol, 2018, 101 (4): 945-956. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2018.04.007.
- [13] 李洁, 杨波, 杨洪涛. 扶肾颗粒调节decorin干扰腹膜胶原稳定性的作用机制概述[J]. 内蒙古中医药, 2020, 39 (2): 129-131. DOI: 10.16040/j.cnki.cn15-1101.2020.02.081.

(编辑 王又冬)