

甘林望,李乾程,高利超,等. 大蒜素通过 JAK2/STAT3 信号通路改善高糖诱导的人腹膜间皮细胞-间充质转化 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 39-47.

Gan LW, LI QC, Gao LC, et al. Allicin improves human peritoneal mesenchymal cell-mesenchymal transformation induced by high glucose through the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 39-47.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.006

大蒜素通过 JAK2/STAT3 信号通路改善高糖诱导的人腹膜间皮细胞-间充质转化

甘林望¹,李乾程²,高利超¹,刘琦¹,李莹¹,王玉洁¹,欧三桃^{1*}

(1.西南医科大学附属医院肾病内科/四川省肾脏疾病临床医学研究中心,四川 泸州 646000;

2.西南医科大学附属医院呼吸内科,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨大蒜素改善高糖诱导的人腹膜间皮细胞-间充质转化的相关机制。方法 培养人腹膜间皮细胞(human peritoneal mesothelial cells,HPMCs)后将其进行两次分组,分组1:①对照组;②8.5 mmol/L D-葡萄糖诱导组(8.5 mmol/L DG组);③17 mmol/L D-葡萄糖诱导组(17 mmol/L DG组);④34 mmol/L D-葡萄糖诱导组(34 mmol/L DG组);⑤68 mmol/L D-葡萄糖诱导组(68 mmol/L DG组)。其中除对照组外,其余组分别用8.5、17、34、68 mmol/L的D-葡萄糖诱导48 h。分组2:①对照组;②34 mmol/L D-葡萄糖诱导组(HG组);③34 mmol/L D-葡萄糖+低剂量大蒜素诱导组(AL-L组);④34 mmol/L D-葡萄糖+中剂量大蒜素诱导组(AL-M组);⑤34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组(AL-H组);⑥34 mmol/L D-葡萄糖+JAK2抑制剂诱导组(JAK2组)。其中HG组用34 mmol/L的D-葡萄糖诱导48 h,AL-L组、AL-M组、AL-H组用34 mmol/L的D-葡萄糖预处理6 h后分别用10、20和40 ng/mL大蒜素诱导48 h,JAK2组加入1 μmol/L AG490预处理6 h后用34 mmol/L的D-葡萄糖诱导48 h。ELISA检测HPMCs上清的IL-6、TNF-α和IL-1β的含量;CCK-8检测细胞增殖并观察形态;Western blot检测JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、N-cadherin、E-cadherin、Vimentin、α-SMA、MCP-1、p65、p-p65蛋白的表达情况。结果 与对照组相比,高糖诱导组HPMCs的相对存活率明显降低($P<0.01$),细胞形态表现异常,促进上皮细胞-间充质转分化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)发生的α-SMA、N-cadherin和Vimentin表达明显上调,抑制EMT发生的E-cadherin蛋白表达明显下调,JAK2/STAT3信号通路被激活从而导致EMT的发生($P<0.01$);而大蒜素能明显促进高糖诱导后的HPMCs增殖,恢复异常的细胞形态,调节与EMT发生的相关蛋白水平从而改善HPMCs的上皮间质转分化;与高糖诱导组相比,大蒜素处理组HPMCs的促炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α明显降低,促炎症蛋白p-p50和MCP1表达明显下调,表明大蒜素能改善EMT引起的炎症。结论 大蒜素可通过抑制JAK2/STAT3信号通路调节EMT发生的标志蛋白、炎症信号蛋白及炎症因子水平从而改善高糖诱导的EMT及炎症。

【关键词】 人腹膜间皮细胞;EMT;大蒜素;JAK2/STAT3信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2023)11-0039-09

Allicin improves human peritoneal mesenchymal cell-mesenchymal transformation induced by high glucose through the JAK2/STAT3 signaling pathway

GAN Linwang¹, LI Qiancheng², GAO Lichao¹, LIU Qi¹, LI Ying¹, WANG Yujie¹, OU Santao^{1*}

(1. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University/Sichuan Clinical Research Center for Nephrology, Luzhou 646000, China. 2. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of allicin in improving human peritoneal mesenchymal cell-mesenchymal transformation induced by high glucose. **Methods** Human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) were

【基金项目】四川省肾脏疾病临床医学研究中心2020年度开放课题(2019YFS0537-16)。

【作者简介】甘林望(1984—),男,硕士,主治医师,研究方向:血液净化。E-mail:ganlinwang1010@163.com

【通信作者】欧三桃(1976—),女,博士,主任医师,研究方向:慢性肾脏病、血管病变。E-mail:ousantao@163.com

divided into the following groups. Group 1: ①Control group; ②8.5 mmol/L D-glucose group (8.5 mmol/L DG group); ③17 mmol/L D-glucose group (17 mmol/L DG group); ④34 mmol/L D-glucose group (34 mmol/L DG group); ⑤68 mmol/L D-glucose group (68 mmol/L DG group). Except in the control group, the groups were treated with the corresponding concentrations of D-glucose for 48 h. Group 2: ①Control group; ②34 mmol/L D-glucose group (HG group); ③34 mmol/L D-glucose + low dose allicin group (AL-L group); ④34 mmol/L D-glucose + medium dose allicin group (AL-M group); ⑤34 mmol/L glucose + high-dose allicin group (AL-H group); ⑥34 mmol/L D-glucose + JAK2 inhibitor group (JAK2 group). The HG group was treated with 34 mmol/L D-glucose for 48 h. AL-L, AL-M and AL-H groups were pretreated with 34 mmol/L D-glucose for 6 h and then treated with 10, 20 and 40 ng/mL allicin for 48 h, respectively. The JAK2 group was pretreated with 1 μ mol/L AG490 for 6 h and then treated with 34 mmol/L D-glucose for 48 h. IL-6, TNF- α , and IL-1 β contents in HPMC culture supernatants were determined by ELISA. A CCK-8 assay was used to assess cell proliferation and morphology. JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, N-cadherin, E-cadherin, Vimentin, α -SMA, MCP-1, p65 and p-p65 protein expression was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the relative survival rate of HPMCs in the high glucose induced group was significantly reduced ($P < 0.01$), cell morphology was abnormal, expression of α -SMA, N-cadherin and Vimentin that promote epithelial-mesenchymal transition was significantly upregulated, and expression of E-cadherin, which inhibits EMT, was significantly downregulated. The JAK2/STAT3 signaling pathway was activated, leading to EMT ($P < 0.01$). Allicin significantly promoted HPMC proliferation induced by high glucose, reversed the abnormal cell morphology, regulated the expression of EMT-related proteins, and improved epithelial-mesenchymal transition of HPMCs. Compared with the high glucose group, proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in HPMCs in the allicin treatment group were significantly decreased and expression of proinflammatory proteins p-p50 and MCP1 was significantly downregulated, indicating that allicin improved the inflammation caused by EMT. **Conclusions** Allicin improved EMT and inflammation induced by high glucose by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway to regulate the expression EMT markers, inflammatory signaling proteins, and proinflammatory factors.

[Keywords] human peritoneal mesothelial cells; EMT; allicin; JAK2/STAT3 signaling pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性肾病(chronic kidney disease,CKD)是影响人们健康的重要疾病,据统计我国成人患CKD的比例已超过10%,其中终末期肾病(end-stage renal disease,ESRD)患者约为300万^[1]。腹膜透析(peritoneal dialysis,PD)具有保护肾功能、维持血流动力学稳定、改善贫血等优点,已成为治疗ESRD的主要方式之一。而当腹膜长期处于生物不相容性的高糖透析液时其组织结构容易损伤而引起结构重塑,使腹膜纤维化(peritoneal fibrosis,PF)透析效能下降,超滤衰竭发生从而制约腹膜透析技术在临床上的应用^[2]。人腹膜间皮细胞的上皮细胞-间充质转分化是长期处于腹膜透析患者的腹膜组织中很常见的病理特征,是导致腹膜纤维化始动使腹膜超滤衰竭的主要原因之一^[3]。EMT表现为上皮细胞表型逐渐消失,成纤维细胞的标志物增加,合成细胞外基质的能力提升等特征,其病理过程复杂,与多种细胞因子和信号通路密切相关^[4]。截至目前,对于EMT在纤维化的作用被广泛研究,但腹膜间皮细胞发生EMT的分子机制尚未清楚。

大蒜素(allicin,AL)是大蒜由水蒸气蒸馏而得到的一种挥发油,是大蒜主要的有效成分^[5]。研究

发现大蒜素在抗氧化、抗肿瘤、降血脂、提升机体免疫力等方面发挥作用^[6]。大蒜素的抗纤维化作用是近年来新发现的药理作用之一。研究表明大蒜素可抑制胃癌、卵巢癌等多种癌症的上皮间质转化,抑制癌症迁移和侵袭^[7-8]。许宁宁^[9]的研究结果表明大蒜素可通过抑制炎症反应和肾组织纤维化保护慢性肾功能衰竭的大鼠。因此,大蒜素影响部分组织纤维化的过程,但目前其对于腹膜纤维化的影响尚不清楚。本研究通过分析D-葡萄糖(D-glucose,DG)对细胞形态及细胞增殖、EMT发生及JAK2/STAT3信号通路的影响,阐明其介导EMT发生的分子机制;同时,通过分析高糖诱导后进行大蒜素处理是否能改善EMT和炎症,为减少腹膜间皮细胞的损伤及改善腹膜透析相关性腹膜炎的预后提供理论依据,为大蒜素在临床上的应用提供理论及实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人腹膜间皮细胞株 HMrSV5,购自 Procell 公司,货号:CP-H180。

1.2 主要试剂与仪器

葡萄糖 (Solarbio, 货号: G8150, 规格: 250 g); 大蒜素 (Solarbio, 货号: SA8720, 规格: 20 mg)。ELISA 检测试剂盒 (上海茁彩生物科技有限公司, 货号: ZC-32420, ZC-32446, ZC-35733); 肌动蛋白 (β -actin)、酪氨酸蛋白激酶 2 (JAK2)、磷酸化的酪氨酸蛋白激酶 2 (p-JAK2)、磷酸化的信号转导和转录激活因子 (p-STAT3)、信号转导和转录激活因子 (STAT3)、E-钙粘蛋白 (E-cadherin)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、E-钙粘蛋白 (N-cadherin)、p65、p-p65、波形蛋白 (Vimentin)、 α -平滑肌肌动蛋白抗体 (α -SMA) (abclonal, 货号: AC026, A19629, AP0531, AP0705, A19566, A20798, A7277, A19083, A19653, AP0123, A19607, A17910); 生物素化山羊抗兔 IgG (abcam, 货号: ab6721); 人腹膜间皮细胞完全培养基 (Procell, 货号: CM-H180); 胰酶 (Hyclone, 货号: SH30042.01); 胎牛血清 (TRAN, 货号: P20522); 双抗 (Basalmedia, 货号: S110JV); CCK-8 试剂盒 (Biosharp, 货号: BS350A); 无菌 PBS 溶液 (Servicebio, 货号: G4202)。倒置生物显微镜 (LEICA, 型号 DM11); 台式低速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司, 型号 TDZ4-WS); CO₂ 培养箱 (三洋电机国际贸易有限公司, 型号: MCO-15AC); 掌上离心机 (赛洛捷克, 型号: S1010E); 酶标仪 (Molecular Devices, 型号: spectra max PLUS 384); 垂直电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司, 型号: JY-SCZ4⁺); 电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司, 型号: JY200C); 水平脱色摇床 (江苏科析仪器有限公司, 型号: TY-80A); 化学发光凝胶成像仪 5200 (上海天能科技有限公司); 电子恒温水浴锅 (北京中兴伟业仪器有限公司生产, 型号: DZKW-4)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

将人腹膜间皮细胞 HMrSV5 解冻离心后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮细胞在培养皿中进行接种, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.3.2 细胞分组及处理

分组 1: 培养人腹膜间皮细胞后将其随机分为 5 组: ①对照组; ②8.5 mmol/L DG 组: 8.5 mmol/L D-葡萄糖诱导组; ③17 mmol/L DG 组: 17 mmol/L D-葡萄糖诱导组; ④34 mmol/L DG 组: 34 mmol/L D-葡萄糖诱导组; ⑤68 mmol/L DG 组: 68 mmol/L D-葡萄糖诱导组。除对照组外, 其余各分别用 8.5、

17、34、68 mmol/L 的 D-葡萄糖诱导 48 h。分组 2: 培养人腹膜间皮细胞后将其随机分为 6 组: ①对照组; ②HG 组: 34 mmol/L D-葡萄糖诱导组; ③AL-L 组: 34 mmol/L D-葡萄糖+低剂量大蒜素诱导组; ④AL-M 组: 34 mmol/L D-葡萄糖+中剂量大蒜素诱导组; ⑤AL-H 组: 34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组; ⑥JAK2 组: 34 mmol/L D-葡萄糖+JAK2 抑制剂诱导组。对照组不做任何处理, HG 组用 34 mmol/L 的 D-葡萄糖诱导 48 h, AL-L 组、AL-M 组、AL-H 组用 34 mmol/L 的 D-葡萄糖预处理 6 h 后分别用 10、20 和 40 ng/mL 大蒜素诱导 48 h, JAK2 组加入 1 μ mol/L AG490 预处理 6 h 后用 34 mmol/L 的 D-葡萄糖诱导 48 h。

1.3.3 CCK-8 分析

取对数生长期的 HMrSV5 细胞, PBS 洗涤, 胰蛋白酶消化后收集, 250 r/min 离心 5 min, 吸除上清液, 加入适量培养基使其成为单细胞悬液; 细胞计数后调节细胞密度为 4×10^4 /mL, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 37℃、5% CO₂ 恒温培养。待细胞贴壁后, 根据 1.3.2 进行分组并处理, 用无血清培养基 1:10 稀释 CCK-8 试剂, 加入已稀释 CCK-8 工作液每孔 110 μ L; 并轻轻晃动培养板数次, 37℃、5% CO₂ 恒温继续培养 2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光值, 根据公式细胞相对存活率 = (各组 OD 值/对照组平均 OD 值) \times 100%, 细胞抑制率 = (1 - 实验组平均 OD/对照组平均 OD) \times 100% 计算相应的细胞存活率及抑制率, 并在光镜下观察细胞形态并拍照。

1.3.4 ELISA 试剂盒检测

根据 ELISA 试剂盒说明书检测各组细胞上清中白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素-1 β (IL-1 β) 的含量。

1.3.5 蛋白免疫印迹 (Western blot)

使用总蛋白提取试剂盒提取各组人腹膜间皮细胞的总蛋白, 并用 BCA 法进行定量。各组取等量蛋白质用的 SDS-PAGE 进行分离, 分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h 后, 加入 β -actin、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、E-cadherin、MCP-1、N-cadherin、p65、p-p65、Vimentin、 α -SMA 抗体, 4℃ 孵育过夜后 TBST 清洗, 然后二抗孵育, TBST 清洗, ECL 暗室显色。显色后的蛋白使用 Bio-Rad 全功能成像系统采集图像, Image-Pro Plus 软件分析光密度, 以 β -actin 为内参, 计算各组蛋白质的相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行统计分析,数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。对于各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),对于组间均数的比较采用最小显著差数(LSD)法,以 $P<0.05$ 作为评定差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 HG 诱导对 HPMCs 及 JAK2/STAT3 信号通路的影响

2.1.1 HG 诱导对 HPMCs 增殖的影响

与对照组相比,4种浓度的葡萄糖都能不同程度地抑制 HPMCs 的增殖。其中 8.5 mmol/L D-葡萄糖诱导组具有显著性的统计意义($P<0.05$),其余3组有极显著性的统计意义($P<0.01$)。34 mmol/L

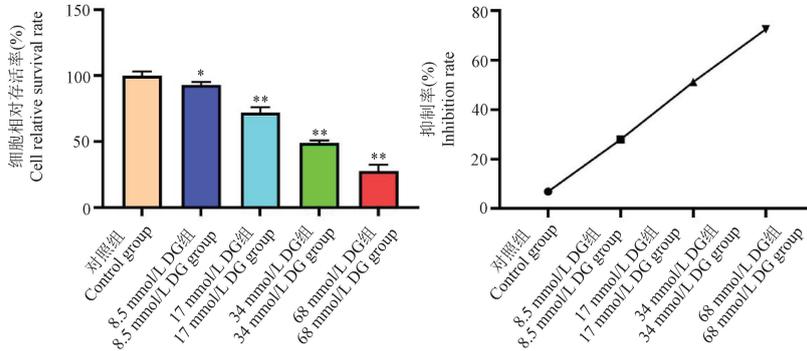
D-葡萄糖诱导组细胞的相对存活率是对照组的一半,其可以明显抑制 HPMCs 增殖,但不会过度抑制,所以选择 34 mmol/L D-葡萄糖为后续高糖诱导模型的浓度(见图 1)。

2.1.2 HG 诱导对 HPMCs 形态学变化的影响

如图 2 所示,光镜下观察 HPMCs 形态学变化发现正常条件培养下对照组 HPMCs 汇合后形态表现为卵圆石状或铺路石状。在给予不同浓度的 D-葡萄糖处理后,与对照组相比 4 种 D-葡萄糖诱导组 HPMCs 的形态均有不同比例呈现异常的梭形,而且浓度越高,异常形态比例越大。

2.1.3 HG 诱导对 HPMCs 发生 EMT 的影响

通过 Western blot 检测不同浓度的 D-葡萄糖对 EMT 相关蛋白表达的影响。与对照组比,34 mmol/L D-葡萄糖诱导组显著下调 E-cadherin 的表达($P<$

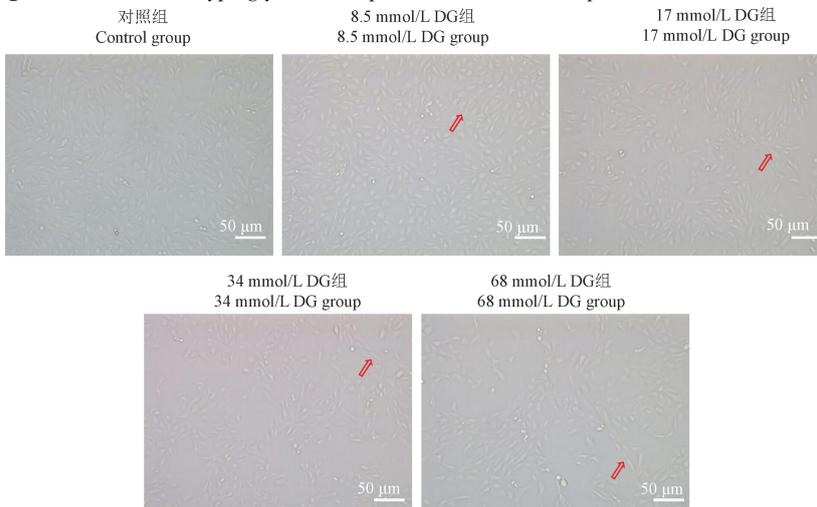


注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 1 高糖诱导对人腹膜间皮细胞增殖的影响

Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 1 Effects of hyperglycemia on proliferation of human peritoneal mesothelial cells



注:异常梭形细胞(↑)。

图 2 高糖诱导对人腹膜间皮细胞形态学变化的影响

Note. Abnormal spindle cells(↑).

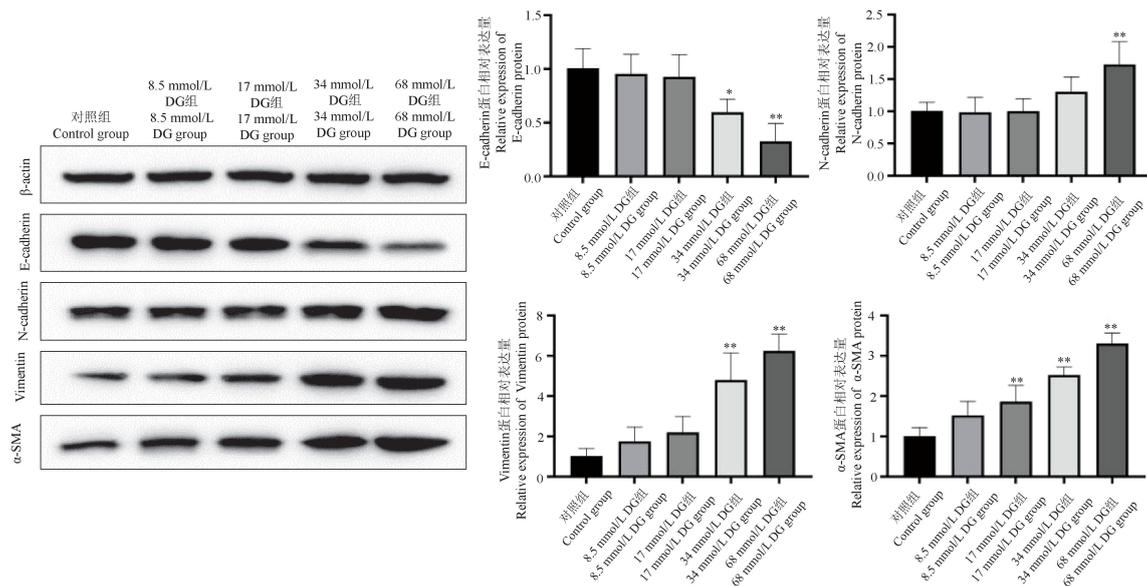
Figure 2 Effects of high glucose induction on morphological changes of human peritoneal mesothelial cells

0.05), 68 mmol/L D-葡萄糖诱导组明显下调 E-cadherin 和上调 N-cadherin 的表达 ($P < 0.01$); 34 mmol/L D-葡萄糖和 68 mmol/L D-葡萄糖诱导组明显上调 Vimentin 的表达, 17 mmol/L D-葡萄糖、34 mmol/L D-葡萄糖和 68 mmol/L D-葡萄糖诱导组均

明显上调 α -SMA 的表达 ($P < 0.01$) (见图 3)。

2.1.4 HG 诱导对 HPMCs 中 JAK2/STAT3 信号通路的影响

结果见图 4, 与对照组比较, 34 mmol/L D-葡萄糖诱导组显著上调 p-JAK2 的表达 ($P < 0.05$), 68

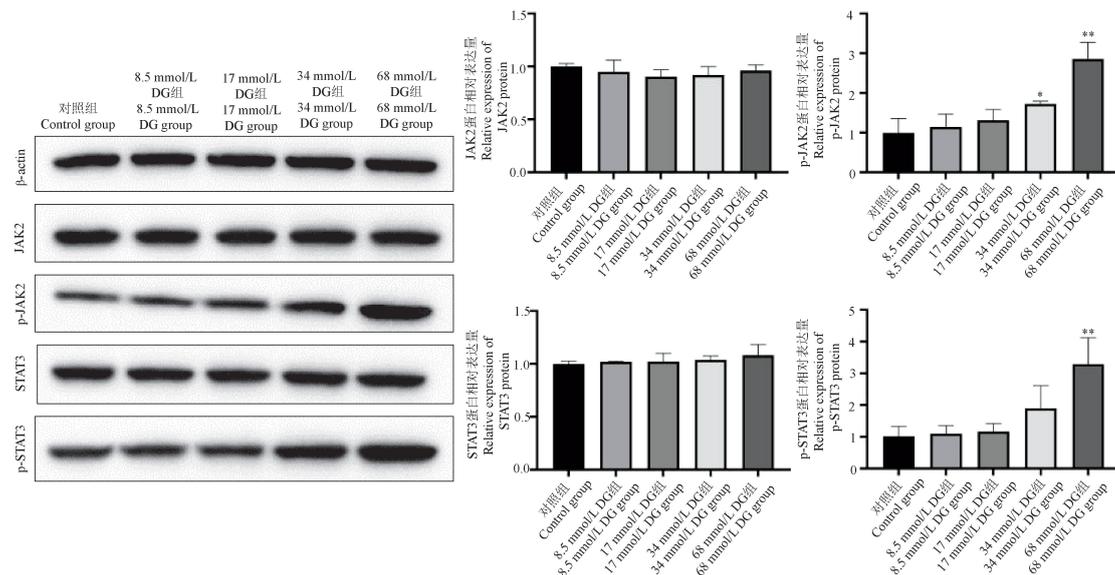


注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 高糖诱导对 EMT 发生标志蛋白表达的影响

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Effects of high glucose induction on the expression of EMT marker protein



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 高糖诱导对 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Effects of high glucose induction on the expression of JAK2/STAT3 signaling pathway related proteins

mmol/L D-葡萄糖诱导组明显上调 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达 ($P < 0.01$); JAK2 和 STAT3 蛋白表达在对照组与四种不同浓度的 D-葡萄糖诱导组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 大蒜素对 HG 诱导的 EMT 及其引起的炎症的影响

2.2.1 大蒜素对 HG 诱导的 EMT 中 HPMCs 增殖的影响

通过 CCK-8 检测不同浓度的大蒜素对 HPMCs 增殖的影响,结果表明 HG 的诱导明显下调 HPMCs 的相对存活率。相比于 HG 诱导组,实验中设置的不同浓度的大蒜素及均能明显上调 HPMCs 的相对存活率 ($P < 0.01$)。其中 34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组的促增殖作用最佳并接近于对

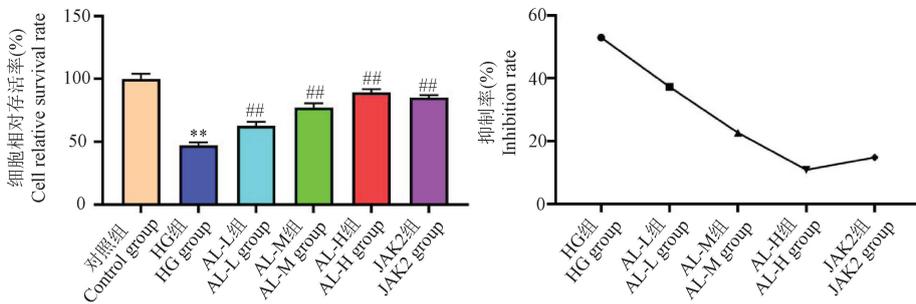
照组和 34 mmol/L D-葡萄糖+JAK2 抑制剂诱导组 (见图 5)。

2.2.2 大蒜素对 HG 诱导的 EMT 中 HPMCs 形态学变化的影响

观察 HPMCs 形态学变化发现 HG 的诱导后异常梭形的 HPMCs 比例增多。而与 HG 诱导组相比,3 种浓度的大蒜素均能使异常的 HPMCs 减少,并且大蒜素的浓度越高,异常形态细胞的比例就越少,其中 34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组的细胞形态与对照组更接近 (见图 6)。

2.2.3 大蒜素对 HG 诱导的 EMT 发生的影响

HG 诱导后 E-cadherin 蛋白表达明显下调, N-cadherin、Vimentin 和 α -SMA 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$), 而经 3 种浓度的大蒜素处理后, E-cadherin

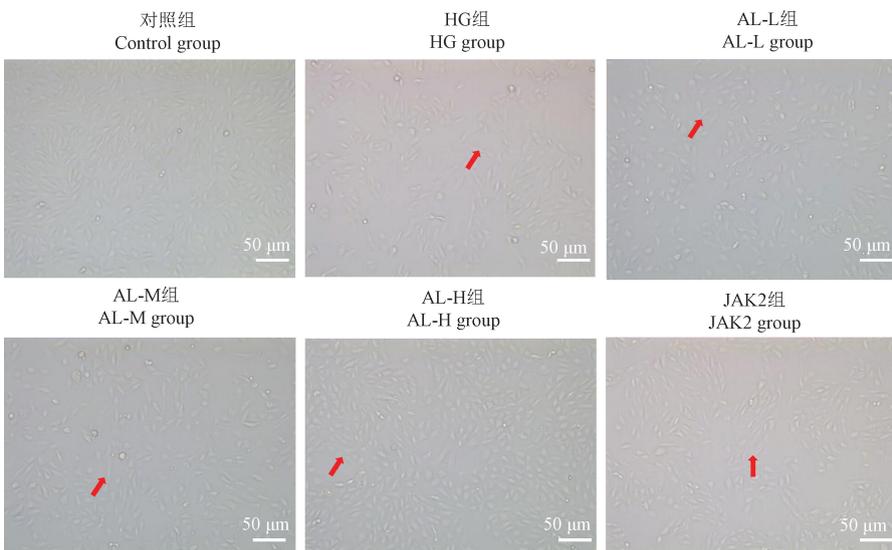


注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 HG 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 5 大蒜素对高糖诱导的 EMT 中人腹膜间皮细胞增殖的影响

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$. Compared with HG group, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Effects of allicin on proliferation of human peritoneal mesothelial cells in EMT induced by high glucose



注:异常梭形细胞(↑)。

图 6 大蒜素对高糖诱导的 EMT 中人腹膜间皮细胞形态学变化的影响

Note. Abnormal spindle cells(↑).

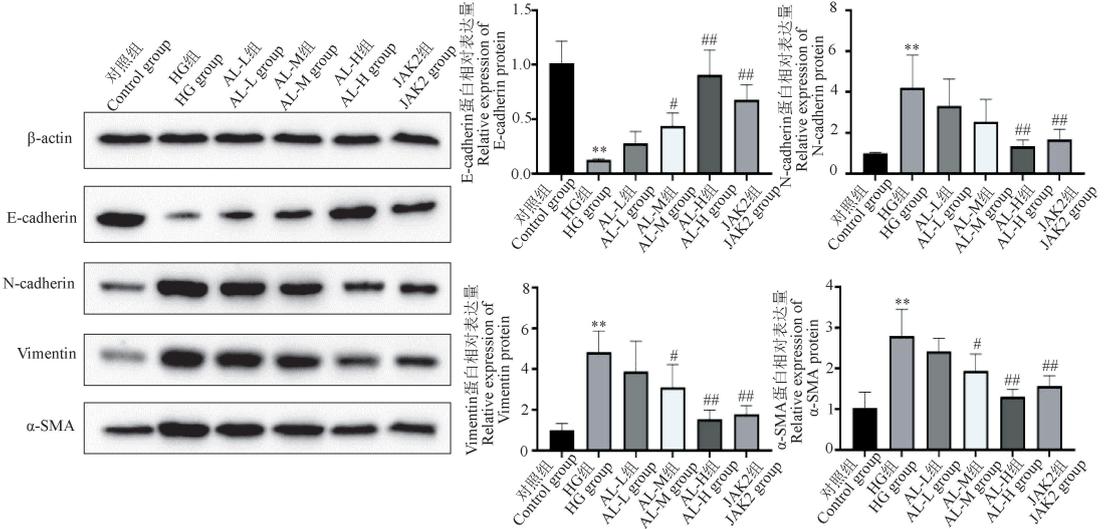
Figure 6 Effects of allicin on morphological changes of human peritoneal mesothelial cells in EMT induced by high glucose

蛋白表达上调, N-cadherin、Vimentin 和 α -SMA 蛋白表达下调。其中 34 mmol/L D-葡萄糖+中剂量大蒜素诱导组的 E-cadherin、Vimentin 和 α -SMA 蛋白表达与 HG 诱导组有显著性差异 ($P < 0.05$), 34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组、34 mmol/L D-葡萄糖+JAK2 诱导组的 EMT 发生相关蛋白表达与 HG 诱导组有极显著差异 ($P < 0.01$)。34 mmol/L D

-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组的 EMT 发生相关蛋白的水平与对照组更接近 (见图 7)。

2.2.4 大蒜素对 HG 诱导的 EMT 引起的炎症的影响

如图 8 所示, HG 诱导后 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量明显升高 ($P < 0.01$), 而用 3 种浓度的大蒜素及 JAK2 抑制剂处理后含量明显降低 ($P < 0.01$)。

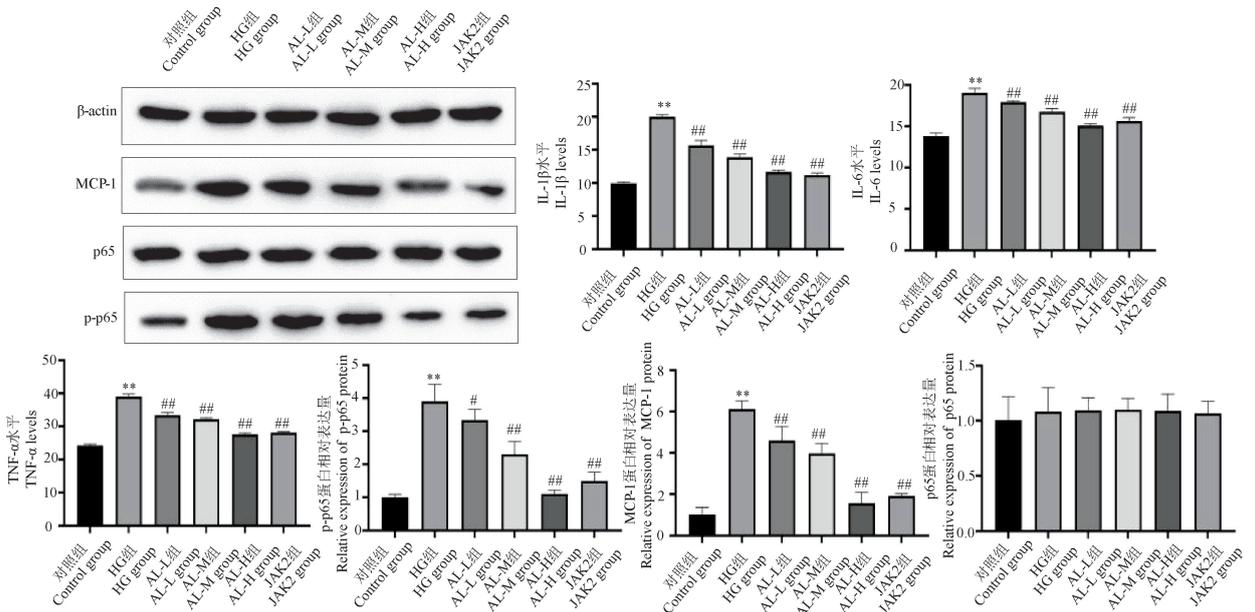


注:与对照组比较, ** $P < 0.01$;与 HG 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 7 大蒜素处理后 HG 诱导的 EMT 发生标志蛋白的表达情况

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$. Compared with HG group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 7 Expression of marker protein of HG induced EMT after allicin treatment



注:与对照组比较, ** $P < 0.01$;与 HG 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 8 大蒜素处理对炎症因子含量及炎症信号蛋白表达的影响

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$. Compared with HG group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 8 Effects of allicin treatment on the content of inflammatory factors and expression of inflammatory signaling proteins

其中 34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平与对照组更接近。HG 诱导后 MCP-1 和 p-p65 蛋白的表达明显上调,经不同浓度的大蒜素及 JAK2 抑制剂处理后 MCP-1 蛋白表达明显下调($P < 0.01$),34 mmol/L D-葡萄糖+低剂量大蒜素诱导组 p-p65 蛋白的表达显著下调($P < 0.05$),34 mmol/L D-葡萄糖+中剂量大蒜素诱导组、34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组和 34 mmol/L D-葡萄糖+JAK2 抑制剂诱导组 p-p65 蛋白的表达明显下调($P < 0.01$)。p65 蛋白的表达在不同组间均无统计学意义($P > 0.05$)。34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组的炎症信号蛋白的水平与对照组更接近。

3 讨论

上皮间质转分化是一种有助于伤口愈合的现象,但其会造成一些纤维化的疾病,比如腹膜纤维化^[10]。在 PD 患者中,防止 EMT 的发生可以改善腹膜纤维化,保护腹膜的功能^[11]。人腹膜间皮细胞是导致腹膜纤维化的主动参与者,其通过 EMT 转变为成纤维细胞,对腹膜纤维化起到了重要作用^[12]。发生 EMT 时,腹膜间皮细胞丧失黏附性及细胞间的紧密连接,获得侵袭及迁移的能力,进而侵入腹膜间皮下紧密带,并合成致炎因子、致血管生成因子和细胞外基质^[3,13]。本研究中用 D-葡萄糖诱导后明显抑制了 HPMCs 的增殖,并使其细胞形态呈现异常的梭形,同时,与 EMT 的发生相关的上皮细胞标志 E-cadherin 表达下调,间充质细胞标志 α -SMA、N-cadherin 和 Vimentin 表达上调,这与 Liu 等^[14]和赵星旭等^[15]研究结果一致,揭示此时 HPMCs 发生了上皮间质转分化;而经大蒜素处理后,HPMCs 增殖明显提高,异常形态细胞比例减少,促进 EMT 发生的间充质细胞蛋白表达显著降低,抑制 EMT 发生的上皮细胞蛋白表达显著升高,揭示大蒜素能通过影响 HPMCs 的增殖及形态和调节 EMT 发生蛋白的平衡可以显著改善 EMT。

JAK/STAT 信号通路是介导细胞因子信号转导的关键通路,其通过参与调节上皮细胞间的黏附影响上皮细胞癌恶性病变中细胞 EMT 的发生^[16]。阻断 JAK2/STAT3 信号通路时腹膜间皮细胞 EMT 的发生被抑制^[17]。磷酸化的 STAT3 形成二聚体后进入细胞核,促进纤维化和与促炎症因子相关的靶基因的表达^[18]。本研究中经 D-葡萄糖诱导后,磷酸

化的 JAK2 和 STAT3 的表达明显上调,揭示高糖诱导激活了 JAK2/STAT3 信号通路促进了 HPMCs 的上皮间质转分化。

炎症是腹膜纤维化的关键因素,其与纤维化相互诱导、相互促进^[19-20]。研究表明由免疫性细胞分泌的 IL-1、IL-6、TNF- α 等促炎因子和 IL-4、IFN- β 、TGF- β 等抗炎因子在免疫反应和慢性炎症中发挥着关键的作用^[21]。细胞核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路被激活后会使得 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等细胞炎症因子表达上调从而加剧炎症反应^[22]。而 NF- κ B 是由 p50 和 p65 亚基组成的异源性二聚体,是一种重要的胞浆内表达的多功能核转录因子,其激活后参与机体的慢性炎症、免疫反应等过程^[23]。MCP1 是机体内炎症级联的起始细胞因子,其分泌受到 IL-1、TNF- α 等信号分子的诱导^[24]。本研究中用高糖诱导后 HPMCs 的促炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 明显升高,磷酸化的 p50 比例升高,MCP1 表达明显上调,揭示此时 HPMCs 的炎症加重,而大蒜素明显缓解了 HPMCs 的炎症反应。

综上所述,高糖能使 EMT 发生蛋白、炎症相关蛋白及细胞因子的表达异常,激活 JAK2/STAT3 信号通路从而促进 EMT 的发生,而大蒜素能通过恢复 HPMCs 形态及增殖异常、调节与 EMT 发生及炎症相关的蛋白及因子的水平使其逐渐恢复正常从而改善 HPMCs 的上皮间质转分化及炎症。

参考文献:

- [1] 何叶梅,杨建波,温向琼,等.慢性肾脏病患者血清维生素水平的变化及意义[J].西部医学,2023,35(9):1325-1330.
- [2] 姚登湖,张明霞.钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂在腹膜透析中作用的研究进展[J].中国医药,2023,18(9):1427-1431.
- [3] Huang Y, Ma J, Fan Y, et al. Mechanisms of human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomal lncRNA GAS5 in alleviating EMT of HPMCs via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Aging, 2023, 15(10): 4144-4158.
- [4] Ni Y, Deng HF, Zhou L, et al. Ginsenoside Rb1 ameliorated bavachin-induced renal fibrosis via suppressing bip/eIF2 α /CHOP signaling-mediated EMT[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 872474.
- [5] Horn T, Bettray W, Noll U, et al. The sulfilimine analogue of allicin, S-allyl-S-(S-allyl)-N-cyanosulfilimine, is antimicrobial and reacts with glutathione[J]. Antioxidants, 2020, 9(11): 1086.
- [6] Zhuang F, Shi X, Qiao S, et al. Allicin promotes functional recovery in ischemic stroke via glutathione peroxidase-1 activation

- of Src-Akt-Erk [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 335.
- [7] 吴金兰, 万慧芳, 梁笑倾, 等. 大蒜素通过调控 GSK-3 β / β -Catenin 通路抑制卵巢癌细胞侵袭转移的研究 [J]. *实用癌症杂志*, 2023, 38(4): 523-528.
- [8] 徐丹, 李瑞阳, 李晶, 等. 大蒜素抑制胃癌细胞上皮-间质转化作用及其机制 [J]. *医药导报*, 2021, 40(3): 301-305.
- [9] 许宁宁. 大蒜素对慢性肾功能衰竭大鼠炎症反应及肾脏组织纤维化的影响 [J]. *天津中医药*, 2018, 35(7): 526-530.
- [10] 洪慧, 张林. 绿茶提取物表没食子儿茶素没食子酸酯对腹膜透析患者腹膜纤维化的防治作用及其机制研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(1): 49-54.
- [11] 胡清华, 罗绮媚, 钟少鑫, 等. NLRP3 炎症小体与腹膜透析患者腹膜纤维化的研究进展 [J]. *医学综述*, 2019, 25(6): 1047-1051, 1057.
- [12] López-Cabrera M. Mesenchymal conversion of mesothelial cells is a key event in the pathophysiology of the peritoneum during peritoneal dialysis [J]. *Adv Med*, 2014, 2014: 473134.
- [13] 张青云, 傅俊江, 陈汉春. 上皮间质转化介导肿瘤转移的分子机制 [J]. *生命科学研究*, 2018, 22(6): 503-510.
- [14] Liu J, Zeng L, Zhao Y, et al. Selenium suppresses lipopolysaccharide-induced fibrosis in peritoneal mesothelial cells through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 161(2): 202-209.
- [15] 赵星旭, 樊怡, 高利丽, 等. 人脐带间充质干细胞条件培养液对高糖诱导人腹膜间皮细胞-间充质转化的影响和机制 [J]. *中国血液净化*, 2020, 19(7): 466-470, 504.
- [16] Jin W. Role of JAK/STAT3 signaling in the regulation of metastasis, the transition of cancer stem cells, and chemoresistance of cancer by epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 217.
- [17] Mo M, Zeng Y, Zeng Y, et al. N-methylpiperazine-diepoxyvatodiolide ameliorates peritoneal fibrosis via suppressing TGF- β /smad and JAK/STAT signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 382: 110589.
- [18] 韦泽丰, 郑金花, 王自强. 微小 RNA-223 调控白细胞介素-6/信号转导与转录激活因子 3 信号通路改善慢性肾小球肾炎大鼠炎症反应和纤维化的机制研究 [J]. *临床内科杂志*, 2023, 40(7): 482-486.
- [19] Kadoya H, Hirano A, Umeno R, et al. Activation of the inflammasome drives peritoneal deterioration in a mouse model of peritoneal fibrosis [J]. *FASEB J*, 2023, 37(9): e23129.
- [20] Wu Z, Zuo X, Wang X, et al. The probiotic *Lactobacillus casei* Zhang-mediated correction of gut dysbiosis ameliorates peritoneal fibrosis by suppressing macrophage-related inflammation via the butyrate/PPAR- γ /NF- κ B pathway [J]. *Food Funct*, 2023, 14(15): 6840-6852.
- [21] 宋光永. 幽门螺杆菌感染依赖 NF- κ B 通路介导的炎症上清促进结肠上皮细胞发生 EMT 的作用机制研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2019.
- [22] Semmarath W, Srisawad K, Arjsri P, et al. Protective effects of proanthocyanidin-rich fraction from red rice germ and bran on lung cell inflammation via inhibition of NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Nutrients*, 2023, 15(17): 3793.
- [23] Wang Y, Liu Z, Zhang M, et al. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 exaggerates multiple organ injury, inflammation, and immune cell imbalance by activating the NF- κ B pathway in sepsis [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1117285.
- [24] 朱瑾, 王苑铭, 安小平, 等. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路研究黄连化浊胶囊对糖尿病大鼠胰岛 β 细胞及 MCP1、IRE1 α 表达的影响 [J]. *中药材*, 2023, 9(5): 1285-1289.

[收稿日期] 2023-02-08