网络出版时间: 2019 - 12 - 2 13: 42 网络出版地址: http: //kns. cnki. net/kcms/detail/34. 1065. r. 20191126. 1716. 014. html

褪黑素对肝星状细胞中 PI3K/AKT 信号通路的影响

陈艳梅,洪汝涛,岳彩飞

摘要 **目的** 探究褪黑素对转化生长因子-β1(TGF-β1)诱导的肝星状细胞系(HSC-T6)中 PI3K/AKT 信号通路的影响。**方法** 将 HSC-T6 细胞分成 5 组:对照组、模型组、褪黑素低浓度组(1 nmol/L)、褪黑素中浓度组(1 μmol/L)、褪黑素高浓度组(0. 1 mmol/L)。培养箱培养 24 h 后,用无血清培养基培养,除对照组外,其余各组均加入 TGF-β1,在三组不同浓度的褪黑素组加入对应浓度的褪黑素,药物作用 48 h。MTT 检测褪黑素对 HSC-T6 细胞增殖的影响;细胞免疫组化检测褪黑素对 HSC-T6 细胞中 P-AKT 蛋白表达的影响;Western blot 检测褪黑素对 HSC-T6 细胞中 PI3K 和 P-AKT 蛋白表达的影响;qPCR 检测褪黑素对 HSC-T6 细胞中 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)mRNA 表达的影响。**结果** 与对照组相比,TGF-β1 能显著诱导 HSC-T6 细胞增殖($P < 0. 01$),增强 PI3K 和 P-AKT 蛋白的表达($P < 0. 01$),增强 α-SMA mRNA 的表达($P < 0. 01$);与模型组相比,褪黑素高浓度组能显著抑制 HSC-T6 细胞增殖($P < 0. 01$),褪黑素能明显抑制 PI3K 和 P-AKT 蛋白的表达较模型组($P < 0. 01$ 或 $P < 0. 05$),褪黑素能明显抑制 α-SMA mRNA 的表达较模型组($P < 0. 01$)。**结论** 褪黑素能显著抑制 HSC-T6 细胞增殖,其作用机制可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词 褪黑素;肝纤维化;肝星状细胞;PI3K/AKT 信号通路

中图分类号 R 575. 2

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2019)12 - 1908 - 05

doi:10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2019. 12. 014

肝纤维化(hepatic fibrosis,HF)是多种致病因素长期刺激肝脏引起的代偿反应,其病理特征是肝内细胞外基质(extracellular matrix,ECM)过度沉积,最终进展为肝硬化、肝癌[1]。目前尚无有效治疗肝纤维化的药物。研究[2]证实,肝纤维化可以逆转。肝星状细胞(hepatic stellate cells,HSCs)的活化是引起肝纤维化的关键过程[3]。TGF-β1 是最强的促纤维细胞因子[4]。研究[5-6]证实,阻断 PI3K/AKT 信号通路,能抑制肝纤维化。褪黑素(melatonin,Mel)是胺类激素,具有抗氧化、抗炎、抗纤维化等作用[7]。课题组前期研究[8]证明褪黑素对 CCl_4 诱导的肝纤维化大鼠具有保护作用,但具体机制尚不清楚。该研究选用细胞实验检测褪黑素对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞增殖和 PI3K/AKT 信号通路的影响,探究褪黑素抗肝纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和细胞 TGF-β1(美国 PeproTech 公司);MTT、DMSO、褪黑素(美国 Sigma 公司);胎牛血清(杭州四季青生物有限公司);DMEM 高糖培养基(南京 Wisent 生物技术有限公司);β-actin 小鼠单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);抗 PI3K 兔单克隆抗体、抗 P-AKT 兔单克隆抗体、抗 AKT 兔单克隆抗体(美国 CST 公司);DBA 染色液、免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);青霉素/链霉素、胰酶消化酶、BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);HSC-T6 细胞(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 细胞培养 HSC-T6 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的高糖 DMEM 完全培养基中,细胞置于 37 ℃、含 5% CO_2 的培养箱中培养,每隔 24 h 换 1 次培养基,当细胞融合达 70% ~80% 时传代培养,选用对数生长期阶段的细胞进行实验。

1.3 MTT 实验 选用对数生长期的 HSC-T6 细胞,用胰酶消化,使细胞脱落,先计数细胞个数,测出浓度,再将其稀释成 3×10^4 个/ml 的细胞悬液,以每孔 200 μl 铺板于 96 孔板中。为了防止干燥,边缘各孔均加入 200 μl PBS。将细胞分成 5 组:对照组、模型组、褪黑素低浓度组(1 nmol/L)、褪黑素中浓度组(1 μmol/L)、褪黑素高浓度组(0. 1 mmol/L),静置 5 min 后把板置于培养箱中。培养 24 h 后,吸净培养基,先用 PBS 清洗,再换用无血清的培养基,除对照组外,其余各组均加入 TGF-β1(10 ng/ml),在三组不同浓度的褪黑素组加入对应浓度的褪黑素,将板置于 37 ℃ 培养箱中。药物作用 48 h 后,吸净上清液,用 PBS 清洗后,每孔先加入 180 μl

2019 - 07 - 18 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学研究项目(编号:KJ2013A155)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

作者简介:陈艳梅,女,硕士研究生;

洪汝涛,男,主任医师,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:hongrutaoah@ aliyun. com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

无血清的培养基，再加入 20 μl 浓度为 5 mg/ml 的 MTT，反应 4 h 后，吸净上清液，每孔加入 150 μl DMSO，把板置于震荡器中震荡 10 min，充分溶解孔内的结晶，用酶标仪测定波长 490 nm 处各孔的光密度（optical density，OD）。

1.4 细胞免疫组化实验 选用对数生长期的 HSC-T6 细胞，用胰酶消化，使细胞脱落，先计数细胞个数，测出浓度，再将其稀释成 0.4×10^5 个/ml 的细胞悬液，把无菌的直径为 15 mm 的细胞爬片置于 24 孔板中，将已稀释的细胞悬液以每孔 500 μl 铺板于 24 孔板内的细胞爬片上。将细胞分成 5 组（同前），静置 5 min 后把板置于培养箱中。培养 24 h 后，吸净培养基，先用 PBS 清洗，再换用无血清的培养基，除对照组外，其余各组均加入 TGF-β1（10 ng/ml），在三组不同浓度的褪黑素组加入对应浓度的褪黑素，将板置于 37 ℃培养箱中。药物作用 48 h 后，吸净上清液，用 PBS 洗 3 次，每次 3 min，为了固定细胞爬片上的细胞，滴加 95% 乙醇反应 20 min，用 PBS 洗 3 次，每次 3 min，将细胞爬片置于载玻片上，滴加 0.3% Triton X-100 孵育 15 min，用 PBS 洗 3 次，每次 3 min，滴加 3% H_2O_2 孵育 10 min，用 PBS 洗 3 次，每次 3 min，滴加血清孵育 15 min，滴加一抗（P-AKT 1∶100），置于 4 ℃冰箱中过夜，次日置于 37 ℃恒温箱中复温 30 min 后，用 PBS 洗 3 次，每次 3 min，滴加二抗，置于 37 ℃恒温箱中孵育 15 min，用 PBS 洗 3 次，每次 3 min，滴加辣根酶，置于 37 ℃恒温箱中孵育 15 min，用 PBS 洗 3 次，每次 3 min，滴加 DAB 显色液，苏木精复染 10 s 后，用自来水冲洗，晾干后用中性树胶封片。HSC-T6 细胞出现棕黄色或黄褐色为阳性显色，将显微镜调至 200 倍，镜下观察细胞的染色情况，随机拍摄 6 个不连续的视野，并将其保存。用 Image-ProPlus 6.0 软件测定每张图片中阳性区域的 OD 值，并得出每张爬片的平均 OD 值，最后用这个值来分析蛋白阳性表达的情况。

1.5 Western blot 实验 选用对数生长期的 HSC-T6 细胞，用胰酶消化后，加入培养基使细胞制成细胞悬液，将其接种于培养皿内。将细胞分成 5 组（同前），把皿置于培养箱中。培养 24 h 后，吸净培养基，先用 PBS 清洗，再换用无血清的培养基，除对照组外，其余各组均加入 TGF-β1（10 ng/ml），在三组不同浓度的褪黑素组加入对应浓度的褪黑素，将皿置于 37 ℃培养箱中。药物作用 48 h 后，提取细胞的总蛋白，用 BCA 法测定蛋白浓度，加热使蛋白变性，配制分离胶、浓缩胶，加样，电泳分离目的蛋白后，将目的蛋白转移到 PVDF 膜上，丽春红染色 PVDF 膜上的目的蛋白，用双蒸水洗 3 次，每次 5 min，5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h，用双蒸水洗 3 次，每次 5 min，滴加一抗（PI3K 1∶1 000，AKT 1∶1 000，P-AKT 1∶2 000，β-actin 1∶1 000），置于 4 ℃冰箱中的慢摇床上孵育过夜，次日置于室温复温 30 min 后，先用 PBST 洗 3 次，每次 7 min，再用 PBS 洗 1 次，每次 7 min，滴加二抗（1∶60 000），置于摇床上室温孵育 2 h 后，先用 PBST 洗 3 次，每次 7 min，再用 PBS 洗 1 次，每次 7 min，将显影仪内的温度降至 -40 ℃，滴加显影液显影，拍摄并保存显影的结果。用 Image-ProPlus 6.0 图像分析软件来分析结果，以 β-actin 为内参，以 PI3K/β-actin 的灰度比作为 PI3K 的相对表达量，以 P-AKT/AKT 的灰度比作为 P-AKT 的相对表达量。

1.6 定量 PCR（qPCR）实验 选用对数生长期的 HSC-T6 细胞，用胰酶消化后接种于培养瓶内。将细胞分成 5 组（同前），把瓶置于培养箱中。培养 24 h 后，吸净培养基，先用 PBS 清洗，再换用无血清的培养基，除对照组外，其余各组均加入 TGF-β1（10 ng/ml），在三组不同浓度的褪黑素组加入对应浓度的褪黑素，将瓶置于 37 ℃培养箱中。药物作用 48 h 后，提取细胞的总 RNA，用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度。消化残留的 DNA：加入无酶水 3 μl，RQ/Rnase 10 × Recation Buffer 1 μl，RQ/Rnase-Free Dnase 2 μl，RNA 4 μl，离心混匀，置于 37 ℃ PCR 仪上，反应 30 min，加入 1 μl 终止液 RQ/Dnase Stop Solution，置于 70 ℃ PCR 仪上，反应 10 min；逆转录：加入 10 × buffer 和 10 mmol/L dNTP 各 2 μl，RNase 0.5 μl，AMV 逆转录酶 0.75 μl，随机引物 1 μl、无酶水 2.75 μl，离心混匀，置于 42 ℃ PCR 仪上，反应 60 min，置于 95 ℃ PCR 仪上，继续反应 5 min；PCR 扩增：加入无酶水 7 μl，PCR 反应 Mix 10 μl，正向引物、反向引物、cDNA 各 1 μl，震荡混匀，加入 96 孔板中扩增。PCR 扩增条件：95 ℃预变性 10 min，95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 30 s，循环扩增共 40 次，末次循环结束后，分析电脑上的溶解曲线（检测引物的质量），并记录 CT 值，选取 β-actin 作为内参，选用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来分析目的基因的表达。α-SMA 引物序列如下：F：5′-GGAGATGGCGTGACTCA-CAA-3′，R：5′-CGCTCAGCAGTAGTCACGAA-3′；β-actin：F：5′-CACCCGCGATACAACCTTC-3′，R：5′-CCCATACCCACCATCACACC-3′。

1.7 统计学处理 运用 SPSS 16.0 统计软件对数

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

据进行分析，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用单因素方差分析（ANOVA）来分析多组间比较，用 LSD 分析两组间比较，$P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测褪黑素对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞增殖的影响 结果显示，与对照组相比，TGF-β1 能显著诱导 HSC-T6 细胞增殖（$F = 11.886$，$P < 0.01$）；与模型组相比，各浓度褪黑素组均能抑制 HSC-T6 细胞增殖，且褪黑素的浓度越高，抑制作用越明显（$F = 11.886$，$P < 0.01$）。见表 1。

表 1 褪黑素对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞增殖的影响（$n = 5$，$\bar{x} \pm s$）

组别	OD_{490}	抑制率（%）
对照	0.451 ± 0.032	-
模型	0.641 ± 0.054**	-
褪黑素		
1.0 nmol/L	0.622 ± 0.053	2.964
1.0 μmol/L	0.594 ± 0.041	7.332
0.1 mmol/L	0.475 ± 0.035##	25.897

与对照组比较：** $P < 0.01$；与模型组比较：## $P < 0.01$

2.2 细胞免疫组化检测褪黑素对 HSC-T6 细胞中 P-AKT 蛋白表达的影响 P-AKT 蛋白主要表达于 HSC-T6 细胞胞质。与对照组相比，模型组中 P-AKT 蛋白的表达明显增多（$F = 42.019$，$P < 0.01$）；与模型组相比，各浓度褪黑素组中 P-AKT 蛋白的表达明显减少（$F = 42.019$，$P < 0.01$），且褪黑素的浓度越高，P-AKT 蛋白表达减少越明显。见图 1。

2.3 Western blot 检测褪黑素对 HSC-T6 细胞中 PI3K 和 P-AKT 蛋白表达的影响 与对照组相比，模型组中 PI3K 和 P-AKT 蛋白的表达明显增多（$F = 9.466$、$F = 63.672$，$P < 0.01$）；与模型组相比，各浓度褪黑素组中 PI3K 和 P-AKT 蛋白的表达均明显减少（$F = 9.466$、$F = 63.672$，$P < 0.01$ 或 $P < 0.05$），且褪黑素的浓度越高，PI3K 和 P-AKT 蛋白表达减少越明显。见图 2、3。

2.4 qPCR 检测褪黑素对 HSC-T6 细胞中 α-SMA mRNA 表达的影响 与对照组相比，模型组中 α-SMA mRNA 的表达明显增多（$F = 70.672$，$P < 0.01$）；与模型组相比，各浓度褪黑素组中 α-SMA mRNA 的表达均明显减少（$F = 70.672$，$P < 0.01$），且褪黑素的浓度越高，α-SMA mRNA 表达减少越明显。见图 4。

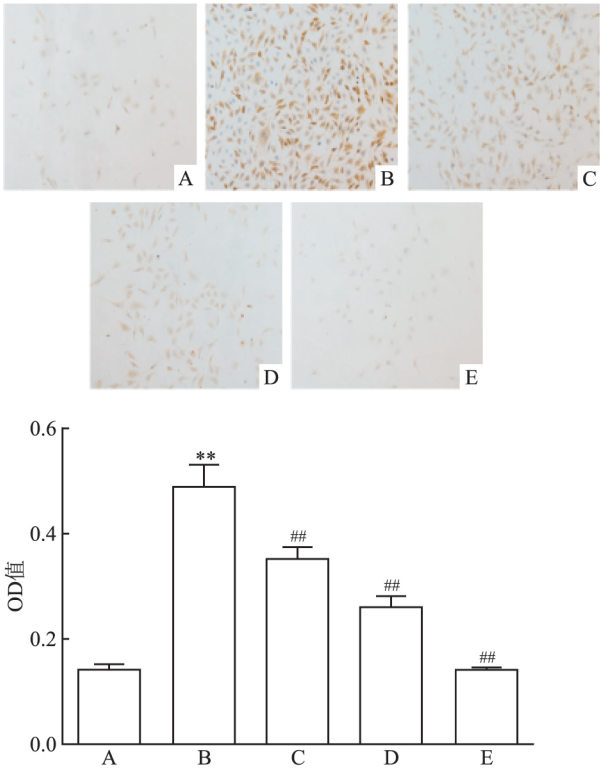

图 1 褪黑素对 HSC-T6 细胞中 P-AKT 蛋白表达的影响 ICC ×200
A：对照组；B：模型组；C：褪黑素低浓度组；D：褪黑素中浓度组；E：褪黑素高浓度组；与对照组比较：** $P < 0.01$；与模型组比较：## $P < 0.01$

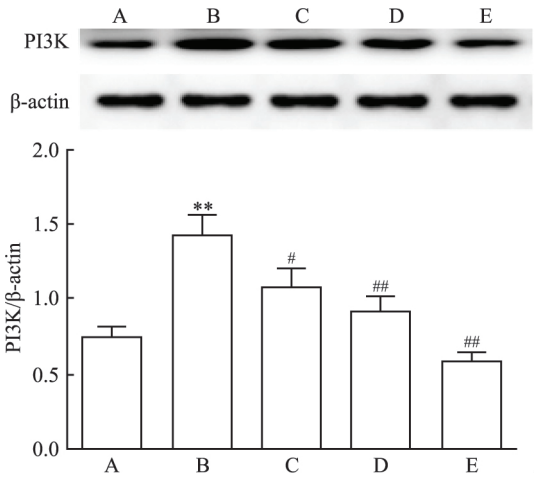

图 2 褪黑素对 HSC-T6 细胞中 PI3K 蛋白表达的影响
A：对照组；B：模型组；C：褪黑素低浓度组；D：褪黑素中浓度组；E：褪黑素高浓度组；与对照组比较：** $P < 0.01$；与模型组比较：# $P < 0.05$，## $P < 0.01$

3 讨论

肝纤维化是一种复杂的肝细胞修复反应，各种致病因素（如病毒、药物和酒精等）长期持续损害肝

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

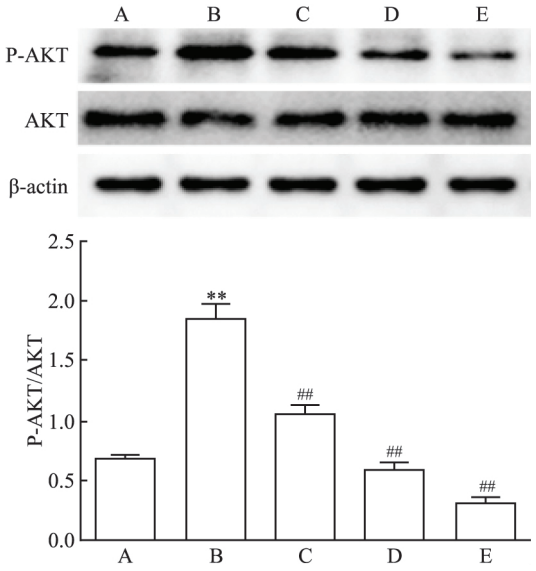

图3 褪黑素对 HSC-T6 细胞中 P-AKT 蛋白表达的影响

A:对照组;B:模型组;C:褪黑素低浓度组;D:褪黑素中浓度组;E:褪黑素高浓度组;与对照组比较:$^{**}P<0.01$;与模型组比较:$^{\#\#}P<0.01$

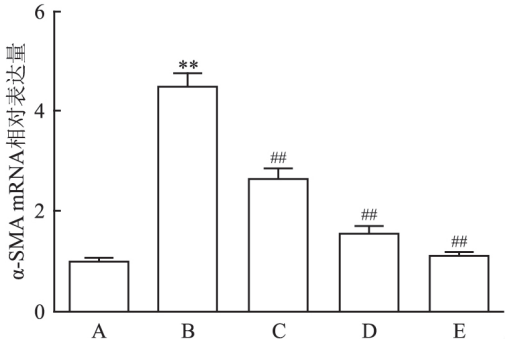

图4 褪黑素对 HSC-T6 细胞中 α-SMA mRNA 表达的影响

A:对照组;B:模型组;C:褪黑素低浓度组;D:褪黑素中浓度组;E:褪黑素高浓度组;与对照组比较:$^{**}P<0.01$;与模型组比较:$^{\#\#}P<0.01$

脏,引起 HSCs 活化,分泌大量 ECM 并过度沉积,破坏肝脏结构,从而导致肝纤维化[3]。若不有效治疗,肝纤维化最终将进展为肝硬化、肝癌。有研究[2]表明,肝纤维化是可以逆转的。因此,研发安全有效的抗肝纤维化药物有重要的临床意义。

褪黑素是松果体分泌的胺类激素,具有调节免疫、抗氧化、抗炎、抗纤维化等功能。Lebda et al[9]研究表明,褪黑素能增强抗氧化活性,减少促炎细胞因子和纤维化基因表达,减少 HSCs 增殖,从而抗肝纤维化。Kang et al[10]研究表明,褪黑素能增强线粒体自噬和线粒体生物合成,从而抗肝纤维化。本课题组前期研究[8]表明,褪黑素具有抗肝纤维化作用,但具体机制尚不明确。

HSCs 是一种间质细胞,位于肝脏 Disse 间隙。在正常情况下,HSCs 处于静止状态,其主要功能是储存和代谢 VitA,合成和分泌少量的 ECM。当各种致病因素引起肝脏损伤时,在 TGF-β 和血小板衍生生长因子(PDGF)等多种细胞因子作用下,HSCs 活化,转化为肌成纤维细胞,表达大量的 α-SMA,合成过多的胶原蛋白,使 ECM 在肝脏过度沉积,从而导致肝纤维化[11]。α-SMA 是 HSCs 活化的标志。因此,抑制 HSCs 活化与增殖成为抗肝纤维化的重要靶点。MTT 结果显示,TGF-β1 能显著诱导 HSC-T6 细胞增殖,而高浓度褪黑素能显著抑制 HSC-T6 细胞增殖;qPCR 结果显示,TGF-β1 能增强 HSC-T6 细胞中 α-SMA mRNA 的表达,而褪黑素能明显抑制 α-SMA mRNA 的表达。推测褪黑素可能通过抑制 HSC-T6 细胞增殖,抑制 ECM 合成,从而抗肝纤维化。

PI3K/AKT 信号通路在肝纤维化发生发展中起重要的作用[12]。PI3K 是磷脂酰肌醇-3-激酶,由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 组成,具有丝氨酸 /苏氨酸蛋白激酶和磷脂酰肌醇激酶的双重活性。AKT 是一种丝氨酸 /苏氨酸蛋白激酶。当细胞外的配体与相应的受体结合后,激活 PI3K,改变 p85 和 p110 复合体的构象,使磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(简称 PIP2)生成磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(简称 PIP3)。PIP3 与 AKT 结合后,使 AKT 从胞质转移到胞膜。PDK1 磷酸化 AKT 的 Thr308 位点,PDK2 磷酸化 AKT 的 Ser473 位点,从而活化 AKT[13]。有研究[12]证实,积雪草酸通过抑制 PI3K/AKT 信号通路,抑制 HSCs 活化和 ECM 合成,从而抗肝纤维化。细胞免疫组化和 Western blot 结果显示,TGF-β1 能明显增强 HSC-T6 细胞中 PI3K 和 P-AKT 蛋白的表达,而褪黑素能明显抑制 PI3K 和 P-AKT 蛋白的表达。推测褪黑素可能通过抑制 PI3K/AKT 信号通路,从而抑制 HSC-T6 细胞增殖。

综上,褪黑素能抑制 HSC-T6 细胞活化与增殖,抑制 ECM 合成,可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。本实验仅为初步研究,具体机制仍需进一步探究。

参考文献

[1] Weiskirchen R, Tacke F. Liver fibrosis: from pathogenesis to novel therapies [J]. Dig Dis, 2016, 34(4):410-22.

[2] Xu D D, Li X F, Li Y H, et al. TIPE2 attenuates liver fibrosis by

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

reversing the activated hepatic stellate cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498(1):199 - 206.

[3] Huang Y, Deng X, Liang J. Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis [J]. Exp Cell Res, 2017, 352(2):420 - 6.

[4] Xu F, Liu C, Zhou D, et al. TGF-β/SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis [J]. J Histochem Cytochem, 2016, 64(3):157 - 67.

[5] Bona S, Rodrigues G, Moreira A J, et al. Antifibrogenic effect of melatonin in rats with experimental liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride [J]. JGH Open, 2018, 2(4):117 - 23.

[6] Shajari S, Laliena A, Heegsma J, et al. Melatonin suppresses activation of hepatic stellate cells through RORα-mediated inhibition of 5-lipoxygenase [J]. J Pineal Res, 2015, 59(3):391 - 401.

[7] Hu W, Ma Z Q, Jiang S, et al. Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis [J]. J Pineal Res, 2016, 60(2):121 - 31.

[8] 汪玉荣,洪汝涛,谢园园. 褪黑素对大鼠肝纤维化的保护作用及其对 TGF-β1 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(9):1248 - 52.

[9] Lebda M A, Sadek K M, Abouzed T K, et al. Melatonin mitigates thioacetamide-induced hepatic fibrosis *via* antioxidant activity and modulation of proinflammatory cytokines and fibrogenic genes [J]. Life Sci, 2018, 192:136 - 43.

[10] Kang J W, Hong J M, Lee S M. Melatonin enhances mitophagy and mitochondrial biogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis [J]. J Pineal Res, 2016, 60(4):383 - 93.

[11] Delire B, Starkel P, Leclercq I. Animal models for fibrotic liver diseases: what we have, what we need, and what is under development [J]. J Clin Transl Hepatol, 2015, 3(1):53 - 66.

[12] Wei L W, Chen Q S, Guo A J, et al. Asiatic acid attenuates CCl_4-induced liver fibrosis in rats by regulating the PI3K/AKT/mTOR and Bcl-2/Bax signaling pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 60:1 - 8.

[13] 黄 成, 李 俊, 马陶陶. PI3K /Akt 信号通路与肝纤维化 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(8):1037 - 41.

Effect of melatonin on PI3K/AKT signaling pathway in hepatic stellate cells

Chen Yanmei, Hong Rutao, Yue Caifei

(*Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022)

Abstract ***Objective*** To investigate the effect of melatonin on PI3K/AKT signaling pathway in hepatic stellate cell line(HSC-T6) induced by transforming growth factor-β1(TGF-β1). ***Methods*** The HSC-T6 cells were divided into 5 groups: control group, model group, melatonin low concentration group (1 nmol/L), melatonin medium concentration group (1 μmol/L), melatonin high concentration group(0.1 mmol/L). After being cultured for 24 h, they were replaced with FBS-free medium and treated with TGF-β1 excepted the control group, three groups of different concentrations of melatonin were added with corresponding concentrations of melatonin. After drugs incubation for 48 h, the effect of melatonin on the proliferation of HSC-T6 cells was detected by MTT assay. The effect of melatonin on the protein expression of P-AKT was detected by immunohistochemistry. The effect of melatonin on the proteins expression of PI3K and P-AKT were detected by Western blot. The effect of melatonin on the mRNA expression of α-SMA was detected by qPCR. ***Results*** Compared with the control group, TGF-β1 could significantly induce the proliferation of HSC-T6 cells($P<0.01$), elevate the proteins expression of PI3K and P-AKT , and elevate the mRNA expression of α-SMA($P<0.01$). Compared with the model group, the high concentration of melatonin could significantly inhibit the proliferation of HSC-T6 cells($P<0.01$), melatonin could significantly inhibit the proteins expression of PI3K and P-AKT compare with the model group($P<0.01$ or $P<0.05$), melatonin could significantly inhibit the mRNA expression of α-SMA compare with the model group($P<0.01$). ***Conclusion*** Melatonin can inhibit the proliferation of HSC-T6 cells, which may be related to the inhibition of PI3K/AKT signaling pathway.

Key words melatonin; liver fibrosis; hepatic stellate cells; PI3K/AKT signaling pathway

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net