

褪黑素对 PDGF-BB 诱导的 HSC-T6 细胞增殖的影响及机制

张玉洁, 洪汝涛, 揭磊

摘要 目的 探究褪黑素(Mel)对血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)诱导的肝星状细胞-T6(HSC-T6)增殖的影响及机制。方法 将HSC-T6细胞分为对照组、模型组、实验组(Mel 1 nmol/L, 1 μmol/L, 0.1 mmol/L), MTT实验检测Mel对PDGF-BB激活的HSC-T6细胞增殖的影响; 实时荧光定量PCR(qPCR)实验检测PDGF-BB、PDGFR-β mRNA的表达; 免疫组化及Western blot检测α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶1/2(p-ERK1/2)蛋白的表达。结果 与对照组比较, PDGF-BB能显著诱导HSC-T6细胞增殖, 明显上调HSC-T6细胞PDGF-BB、PDGFR-β mRNA及α-SMA、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白的表达; 与模型组比较, Mel能够抑制PDGF-BB激活的HSC-T6细胞增殖, 同时抑制PDGF-BB、PDGFR-β mRNA表达, 并下调α-SMA、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白的表达。结论 Mel可显著抑制PDGF-BB诱导的HSC-T6细胞的增殖与活化, 其作用机制可能与抑制PDGF-BB、PDGFR-β表达, 进而抑制ERK1/2信号通路相关。

关键词 褪黑素; 肝纤维化; 肝星状细胞; 血小板衍生生长因子-BB; ERK1/2

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)12-1828-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.002

肝纤维化是肝脏对各种急慢性刺激的病理反应, 急性或者自限性损伤时, 这种病理改变是短暂的、可逆的。当损伤持续存在则会导致大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM)积聚, 瘢痕组织逐渐替代肝实质, 最终发展为肝硬化, 导致不良预后和高死亡率^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)在肝纤维进展中起重要作用, 慢性肝损伤时, HSCs被激活, 增殖并产生大量ECM, 因此抑制HSCs活化和增殖是治疗和预防肝纤维化的治疗策略。多种细胞因子和生长因子介导了HSCs的激

活^[2], 其中血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)是一种多功能多肽生长因子, 是目前已知的促进HSCs增殖与活化最强的细胞因子之一, 在活化的HSCs增殖、趋化、迁移和细胞存活中发挥重要作用^[3]。位于HSCs质膜上的PDGF特异性受体(platelet derived growth factor receptor, PDGFR)是PDGF跨膜传递的关键环节。PDGF与具有酪氨酸激酶活性的PDGFR结合后可使其酪氨酸发生构形改变从而激活Ras蛋白(ratsarcoma, Ras)信号被传递到胞内, 引起细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)磷酸化级联反应, 激活的ERK1/2转位到细胞核, 促使HSCs增殖活化、胶原表达^[4]。褪黑素(melatonin, Mel)是由松果体分泌的活性物质, 能消除自由基, 抗氧化, 促进骨形成和保护、调节生殖系统、心血管系统、免疫系统或体重^[5]。课题组前期研究^[6-7]证实了Mel对四氯化碳所致肝纤维化大鼠具有保护作用, 但其相关机制尚不明确。该研究继续以体外培养的HSC-T6细胞为研究对象, 观察Mel对PDGF-BB激活的HSC-T6细胞增殖及ERK1/2信号通路的影响, 探讨其抗肝纤维化的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与试剂 HSC-T6系购自南京凯基生物科技发展有限公司; DMEM高糖培养基购自南京Wisent生物公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物公司; Mel、MTT购自美国Sigma公司; PDGF-BB购自美国PeproTech公司; TRIzol购自美国Invitrogen公司; RNA抽提试剂盒购自美国Thermo公司; PCR试剂盒购自大连TaKaRa公司; 引物购自上海生工生物工程有限公司; 免疫组化试剂盒、DAB染色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 抗α-SMA抗体北购自京博奥森公司; 抗ERK1/2抗体购自武汉三鹰公司; 抗p-ERK1/2抗体购自美国CST公司; DM-SO、BCA试剂盒、胰酶消化酶、青霉素/链霉素购自上海碧云天生物技术有限公司。

2018-07-26 接收

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(编号: KJ2013A155)

作者单位: 安徽医科大学附属第一医院消化内科, 合肥 230022

作者简介: 张玉洁, 女, 硕士研究生;

洪汝涛, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hongru-taoah@sina.com

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HSC-T6 复苏后培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 隔天换液, 3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 实验 取对数生长期 HSC-T6 细胞以 5×10^3 个/孔的浓度接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μ l。分 5 组: 对照组、模型组、实验组 (Mel 1 nmol/L 组、1 μ mol/L 组和 0.1 mmol/L 组), 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后, 更换为不含血清培养基, 除去对照组外均加入 PDGF-BB (10 ng/ml) 作用 30 min 后, 在实验组加入对应浓度的 Mel, 对照组加等体积磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 药物作用 48 h 后弃上清液, 加 MTT (5 mg/ml) 作用 4 h 弃去上清液, 每孔加入 150 μ l DMSO, 将 96 孔培养板置于摇床上震荡 10 min, 酶标仪检测 490 nm 波长处各孔吸光度 (optical density, OD) 值。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 实验 取对数生长期 HSC-T6 细胞接种于 6 孔板内, 培养 24 h 后除对照组外均加入 PDGF-BB (10 ng/ml) 作用 30 min 后, 在实验组加入对应浓度的 Mel, 对照组加等体积 PBS, 作用 48 h 后, TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 按逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增步骤, GAPDH 为内参。引物序列为: PDGF-BB 上游引物: 5'-TGCTGTGGCAGAGGAAACCA-3', 下游引物: 5'-GTGCGTCCAGAACAAGCTA-3', 长度为 20 bp; PDGFR- β 上游引物: 5'-TGCTGTGGCAGAGGAAACCA-3', 下游引物: 5'-GTGCGTCCCAGAACAAGCTG-3', 长度为 20 bp。扩增条件为: 95 °C 预变性 30 s, 然后 95 °C 5 s、60 °C 30 s, 共 40 个循环, 所测得每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数 (cycle threshold, Ct) 值按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析结果。

1.2.4 细胞免疫组化实验 取无菌细胞爬片置于 24 孔板内, 对数生长期 HSC-T6 细胞消化后以 2×10^4 个/孔的浓度接种于细胞爬片上, 培养 24 h 后除对照组外均加入 PDGF-BB (10 ng/ml) 作用 30 min 后, 在实验组加入对应浓度的 Mel, 对照组加等体积 PBS, 作用 48 h 后, 弃去上清液后用 PBS 洗 3 次 (3 min /次), 加入 95% 乙醇溶液作用 30 min 固定细胞, PBS 洗 3 次 (3 min /次), 取出细胞爬片置于载玻片上, 滴加 0.3% TRITON X-100 作用 15 min, PBS

洗 3 次 (3 min /次), 滴加 3% H₂O₂ 作用 10 min, PBS 洗 3 次 (3 min /次), 滴加一抗后置于 4 °C 冰箱孵育 18 h 后按免疫组化试剂盒进行二抗孵育, 再滴加 DAB 试剂显色, 棕黄色为阳性蛋白染色, 苏木精复染 10 s 后冲洗晾干、封片, 镜下观察, 每张图片随机选取 6 个视野, 放大至 200 倍拍照, 用 Image-Pro Plus 软件分析结果。

1.2.5 Western blot 实验 取对数生长期 HSC-T6 细胞消化后接种于培养瓶, 培养 24 h 后除对照组外均加入 PDGF-BB (10 ng/ml) 作用 30 min 后, 在实验组加对应浓度的 Mel, 对照组加等体积 PBS, 作用 48 h 后抽提总蛋白二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法定量后取 10 μ l 样品上样电泳, 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后, 转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 加一抗 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)、p-ERK 1/2 (1 : 2 000), 置于 4 °C 冰箱过夜, 次日室温孵育 30 min 后用 PBST 洗涤 3 次 (10 min /次), 加二抗 (1 : 80 000), 室温孵育 1 h、30 min 后加 ECL 显色液显影。 β -actin 作为内参, 用 ImageJ 软件分析结果, 蛋白表达水平以 (磷酸化蛋白/非磷酸化蛋白) 与 (非磷酸化蛋白/ β -actin) 的平均灰度比值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 采用单因素方差分析 (one-way analysis of variances, ANOVA) 比较分析多组间均数。各组实验重复 3 次以上, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mel 对 PDGF-BB 激活的 HSC-T6 细胞增殖的影响 MTT 结果显示, 与对照组比较, 模型组 OD 值明显增加 ($F = 16.741, P < 0.01$); 与模型组比较, Mel 1 nmol/L 组、1 μ mol/L 组、0.1 mmol/L 组 OD 值呈逐渐下降趋势, 其中 0.1 mmol/L 组下降明显 ($F = 16.741, P < 0.01$)。Mel 抑制 PDGF-BB 激活的 HSC-T6 细胞增殖达半数抑制率 (50% inhibition-rate, IC₅₀) 的浓度约为 0.949 μ mol/L。见表 1。

2.2 Mel 对 PDGF-BB 诱导的 HSC-T6 细胞中 PDGF-BB 和 PDGFR- β mRNA 表达的影响 对照

组 HSC-T6 细胞中 PDGF-BB 和 PDGFR-β mRNA 表达呈相对低水平; 而模型组表达明显高于对照组 ($F_{PDGF-BB} = 506.659, F_{PDGFR-\beta} = 608.315, P < 0.01$); Mel 作用后可明显抑制升高的 PDGF-BB 和 PDGFR-β mRNA 水平 ($F_{PDGF-BB} = 506.659, F_{PDGFR-\beta} = 608.315, P < 0.01$) 且随 Mel 浓度增加抑制作用增强。见图 1、2。

表 1 Mel 对 PDGF-BB 激活的 HSC-T6 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	OD ₄₉₀ 值	抑制率(%)	F 值
对照	0.517 ± 0.039		
模型	0.660 ± 0.034 [#]		16.741
实验			
1 nmol/L	0.482 ± 0.135 [*]	27.023	16.741
1 μmol/L	0.318 ± 0.054 ^{**}	51.773	16.741
0.1 mmol/L	0.232 ± 0.039 ^{**}	64.824	16.741

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05, ^{**} P < 0.01$

2.3 细胞免疫组化实验检测 Mel 对 PDGF-BB 诱导的 HSC-T6 细胞中 α-SMA、ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达的影响 α-SMA 和 ERK1/2 蛋白主要表达于 HSC-T6 细胞胞质中、p-ERK1/2 蛋白主要表达于 HSC-T6 细胞核中。与对照组比较: 细胞中 α-SMA、ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达明显增强 ($F_{\alpha-SMA} = 19.182, F_{ERK1/2} = 27.612, F_{p-ERK1/2} = 211.068, P < 0.01$); 与模型组比较: Mel 作用后 HSC-T6 细胞增殖被抑制, α-SMA、ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达下降, 且随着 Mel 浓度增加对 ERK1/2、p-ERK1/2 表达的抑制作用逐渐增强。见

图 3、4、5。

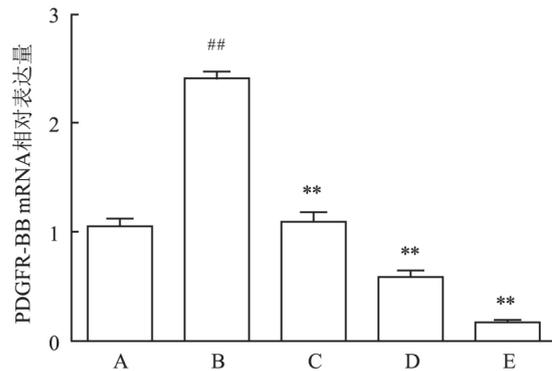


图 1 Mel 对 PDGF-BB mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: 对照组; B: 模型组; C: Mel 1 nmol/L 组; D: Mel 1 μmol/L 组; E: Mel 0.1 mmol/L 组; 与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

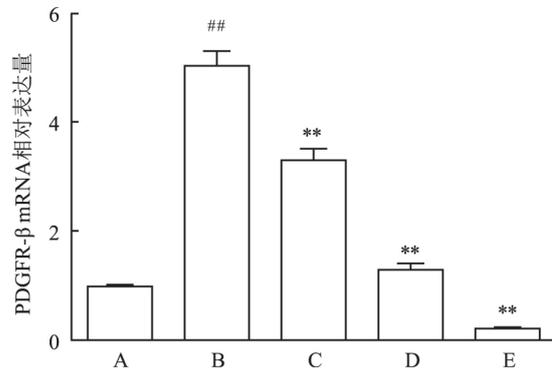


图 2 Mel 对 PDGFR-β mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: 对照组; B: 模型组; C: Mel 1 nmol/L 组; D: Mel 1 μmol/L 组; E: Mel 0.1 mmol/L 组; 与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

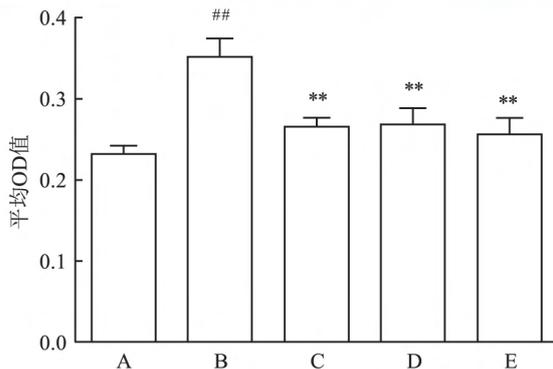
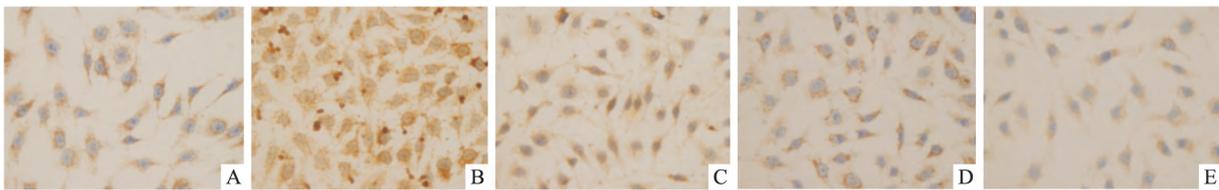


图 3 免疫组化法检测 Mel 对 α-SMA 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$) ICC × 200

A: 对照组; B: 模型组; C: Mel 1 nmol/L 组; D: Mel 1 μmol/L 组; E: Mel 0.1 mmol/L 组; 与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

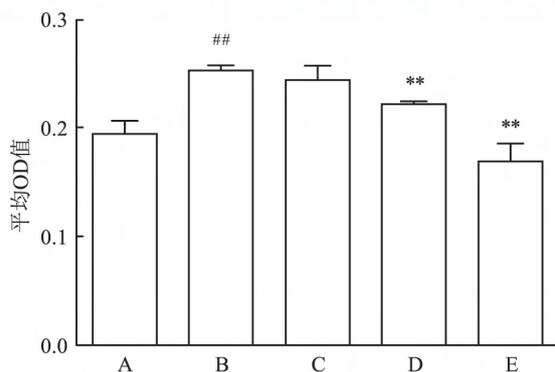
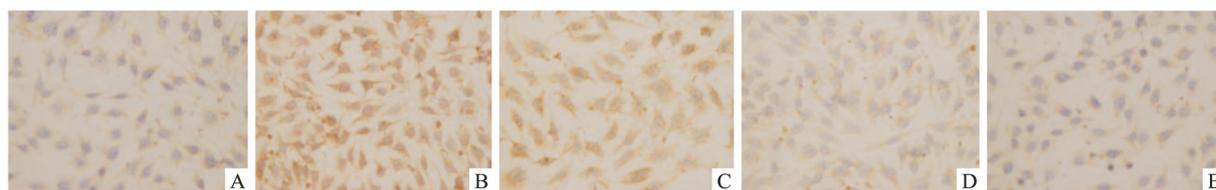


图4 免疫组化法检测 Mel 对 ERK1/2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$) ICC $\times 200$
A: 对照组; B: 模型组; C: Mel 1 nmol/L 组; D: Mel 1 $\mu\text{mol/L}$ 组; E: Mel 0.1 mmol/L 组; 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

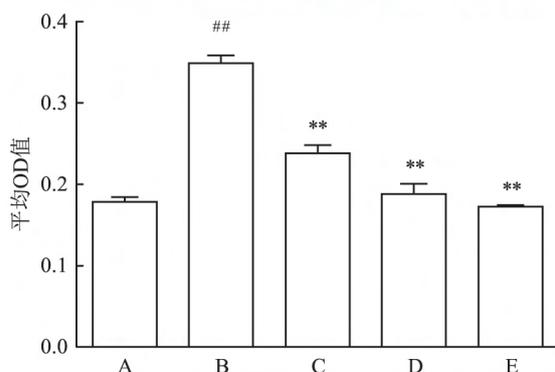
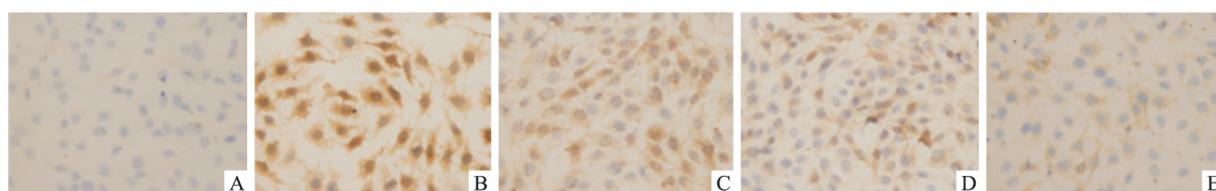


图5 免疫组化法检测 Mel 对 p-ERK1/2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$) ICC $\times 200$
A: 对照组; B: 模型组; C: Mel 1 nmol/L 组; D: Mel 1 $\mu\text{mol/L}$ 组; E: Mel 0.1 mmol/L 组; 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

2.4 Western blot 检测 Mel 对 PDGF-BB 诱导的 HSC-T6 细胞中 α -SMA、ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达的影响 与对照组比较: PDGF-BB 可诱导 HSC-T6 细胞内 α -SMA、ERK1/2 蛋白表达,同时上调 ERK1/2 磷酸化水平 ($F_{\alpha\text{-SMA}} = 14.210$, $F_{\text{ERK1/2}} = 105.055$, $F_{\text{p-ERK1/2}} = 191.438$, $P < 0.01$); Mel 作用后 HSC-T6 细胞内 α -SMA 和 ERK1/2 蛋白的表达量较模型组下降;总 ERK1/2 与磷酸化 ERK1/2 比值显示 Mel 作用后 HSC-T6 细胞内 ERK1/2 磷酸化水平被抑制 ($F_{\text{p-ERK1/2}} = 191.438$, $P < 0.01$)。见图 6、7。

3 讨论

肝纤维化作为多种慢性肝病的共同结局,其主要发生机制是 ECM 的过度增多和异常沉积,若无

有效的治疗,会出现严重的肝功能障碍,甚至进展为肝硬化和肝癌危及生命。激活的 HSCs 是细 ECM 过量产生的主要因素。因此,抑制 HSCs 的增殖与活化成为目前抗肝纤维化研究的重要方向。

PDGF-BB 是已知的最强的促进 HSCs 激活的细胞因子之一,PDGF 信号传导是驱动肝纤维发展的关键因素之一,位于 HSCs 质膜上的 PDGFR 是 PDGF 跨膜传递的关键环节^[8]。PDGF 与 PDGFR 结合后将细胞外信号传递到胞内引发 ERK1/2 的磷酸化级联反应,ERK1/2 属于丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 家族主要成员,ERK1/2 信号通路是多种细胞因子调控细胞增殖的重要途径。活化的 ERK1/2 转位到胞核中,调节激活转录因子,介导细胞周期蛋白表达使 HSCs

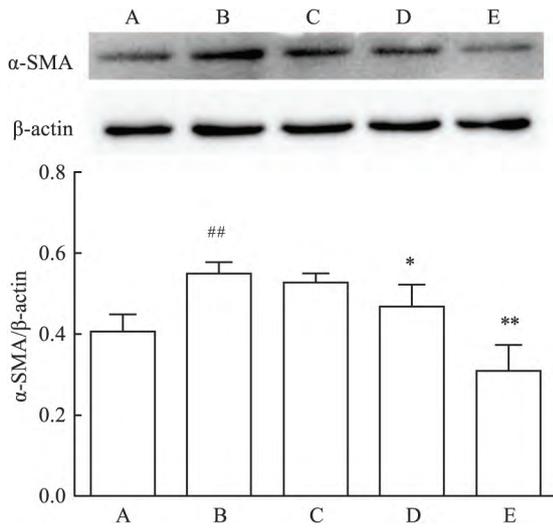


图6 Western blot 检测 Mel 对 α -SMA 蛋白表达的的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: 对照组; B: 模型组; C: Mel 1 nmol/L 组; D: Mel 1 μ mol/L 组; E: Mel 0.1 mmol/L 组; 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

增殖,最终导致肝纤维化。干扰 ERK1/2 激活可以阻断 PDGF 诱导的 HSCs 活化^[9]。

Mel 是松果体的分泌的胺类激素,能够调节生物昼夜节律、炎症、氧化应激和细胞损伤。近年来有研究^[5]表明,Mel 对各种肝损伤模型均有较强的保护作用,本课题组前期研究证实了 Mel 对四氯化碳所致大鼠肝纤维化有保护作用,但其抗肝纤维化的具体分子机制尚不明确。目前有研究^[10]提示 Mel 对大鼠肝纤维化模型的 PDGF 有抑制作用,而其对 PDGF/ERK 信号通路的影响国内外尚未见相关报道。

本研究参考 Shajari et al^[11]的 Mel 通过视黄酸相关孤儿核受体介导 5-脂氧合酶抑制 HSCs 增殖实验中的 Mel 浓度,且前期课题组已在细胞活力实验^[12]中证实 Mel 浓度增加至 1 mmol/L,肝星状细胞增殖被显著抑制,所以选择 1 nmol/L、1 μ mol/L 和 0.1 mmol/L 作为实验组 Mel 的药物浓度。实验采用 PDGF-BB(10 ng/mL)作为 HSC-T6 细胞的激活剂,有研究^[13]显示用该浓度 PDGF-BB 刺激 HSCs 可表现出显著的增殖反应,本实验结果与之相符,MTT 实验结果显示,PDGF-BB 刺激后 HSC-T6 细胞显著增殖,Mel 可以显著抑制 PDGF-BB 刺激 HSC-T6 的增殖;qPCR 实验显示 Mel 能明显抑制 PDGF-BB 刺激的 HSC-T6 中 PDGF-BB 及 PDGFR- β mRNA 表达。

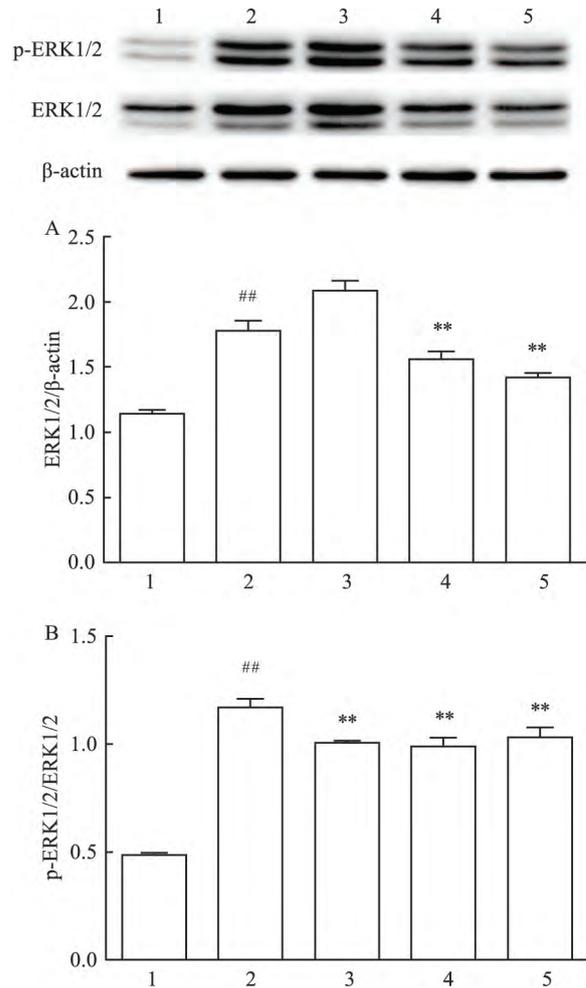


图7 Western blot 检测 Mel 对 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: ERK1/2/ β -actin; B: p-ERK1/2/ERK1/2; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: Mel 1 nmol/L 组; 4: Mel 1 μ mol/L 组; 5: Mel 0.1 mmol/L 组; 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

在免疫组化及 Western blot 实验中分析了 Mel 对 PDGF-BB 刺激的 ERK1/2 信号通路的影响,结果显示,PDGF-BB 刺激使 HSC-T6 细胞中 α -SMA、ERK1/2 蛋白表达显著增加,同时 ERK1/2 蛋白磷酸化水平上调,说明 PDGF/ERK1/2 信号通路被激活,Mel 干预后明显抑制了 α -SMA、ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达水平。提示 Mel 可能通过抑制 PDGF-BB、PDGFR- β 表达,抑制 ERK1/2 信号通路进而发挥抗肝纤维化作用,但其确切分子机制还有待于进一步研究。

参考文献

[1] Aydın M M, Akçalı K C. Liver fibrosis[J]. Turk J Gastroenterol, 2018, 29(1): 14-21.

- [2] Wallace M C ,Friedman S L ,Mann D A. Emerging and disease-specific mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. *Semin Liver Dis* 2015 ,35(2) :107 -18.
- [3] 由淑萍 ,赵 军 ,马 龙 等. 肉苁蓉苯乙醇总苷对血小板衍生生长因子诱导的肝星状细胞增殖的影响及机制 [J]. *中国药理学通报* 2016 ,32(9) :1231 -5.
- [4] Li Y ,Ren H T. Endostatin inhibits fibrosis by modulating the PDGFR/ERK signal pathway: an *in vitro* study [J]. *J Zhejiang Univ Sci B* 2017 ,18(11) :994 -1001.
- [5] Hu W ,Ma Z ,Jiang S ,et al. Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis? [J]. *J Pineal Res* 2016 ,60(2) :121 -31.
- [6] Hong R T ,Xu J M ,Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *World J Gastroenterol* 2009 ,15(12) :1452 -8.
- [7] 洪汝涛 ,许建明 ,沈继龙 等. 褪黑素对大鼠肝纤维化的影响及部分机制研究 [J]. *中国药理学通报* 2012 ,28(8) :1141 -5.
- [8] Wang X ,Wu X ,Zhang A ,et al. Targeting the PDGF-B/PDGFR- β interface with destruxin A5 to selectively block PDGF-BB/PDGFR- β signaling and attenuate liver fibrosis [J]. *EBioMedicine* 2016 ,7: 146 -56.
- [9] He J ,Bai K ,Hong B ,et al. Docosahexaenoic acid attenuates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats [J]. *Int Immunopharmacol* 2017 ,53: 56 -62.
- [10] Czechowska G ,Celinski K ,Korolczuk A ,et al. Protective effects of melatonin against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats [J]. *J Physiol Pharmacol* 2015 ,66(4) :567 -79.
- [11] Shajari S ,Lalena A ,Heegsma J ,et al. Melatonin suppresses activation of hepatic stellate cells through ROR α -mediated inhibition of 5-lipoxygenase [J]. *J Pineal Res* 2015 ,59(3) :391 -401.
- [12] 谢园园 ,洪汝涛 ,汪玉荣. 褪黑素抑制肝星状细胞增殖的机制研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2017 ,52(9) :1327 -30.
- [13] Wilhelm A ,Aldridge V ,Haldar D ,et al. CD248/Endosialin critically regulates hepatic stellate cell proliferation during chronic liver injury *via* a PDGF-regulated mechanism [J]. *Gut* 2016 ,65(7) :1175 -85.

Effects of melatonin on the proliferation of HSC-T6 cells induced by PDGF-BB and its mechanism

Zhang Yujie ,Hong Rutao ,Jie Lei

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

Abstract Objective To investigate the molecular mechanism of anti-fibrosis of melatonin in HSC-T6 cells stimulated by PDGF-BB. **Methods** The HSC-T6 cells were divided into five groups: control group ,model group ,melatonin (1 nmol/L ,1 μ mol/L ,0.1 mmol/L) group. Cell proliferation was analyzed by MTT assay. The mRNA expression levels of PDGF-BB and PDGFR- β were detected by qPCR. The protein expression levels of α -SMA ,ERK1/2 and p-ERK1/2 were detected by immunohistochemical and Western blot. **Results** The effects of different doses of melatonin on HSC-T6 cells demonstrated that melatonin could significantly reduce the proliferation of PDGF-BB-induced HSC-T6 cells and suppress the mRNA expression levels of PDGF-BB and PDGFR- β . In addition ,melatonin could suppress the protein levels of α -SMA ,ERK1/2 and p-ERK1/2 in PDGF-BB-induced HSC-T6 cells. **Conclusion** These findings show that melatonin can inhibit the proliferation and activation of HSC-T6 cells. Its mechanism may be related to the inhibition of PDGF-BB ,PDGFR- β expression and the suppression of ERK1/2 signaling pathway.

Key words melatonin; liver fibrosis; hepatic stellate cells; platelet derived growth factor-BB; ERK1/2