

网络出版时间: 2018-9-25 14:31 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180921.1451.005.html>

褪黑素对 PDGF-BB 激活的 HSCs 自噬作用的研究

揭磊, 洪汝涛, 张玉洁

摘要 目的 探究褪黑素对血小板源性生长因子 BB (PDGF-BB) 激活的肝星状细胞 (HSCs) 自噬作用的影响。方法 HSCs (HSC-T6) 被分为 5 组: 对照组、模型组和实验组 (分为 3 组: 褪黑素 1 nmol/L、1 μ mol/L 和 0.1 mmol/L 组), 培养 24 h 贴壁后以无血清培养基培养, 模型组及不同实验组加入血小板源性生长因子 (PDGF-BB), 实验组加入不同浓度的褪黑素, 培养 48 h。MTT 检测褪黑素对 HSCs 增殖的影响; Western blot 检测 PDGF 及褪黑素对 HSCs 自噬的作用。结果 相对于实验组, 褪黑素能抑制 HSCs 的增殖 ($P < 0.05$)。PDGF-BB 能明显上调 HSCs α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3 II 型 (LC3 II) 及血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 的表达, 与模型组相比, 褪黑素能抑制 HSCs α -SMA、Beclin1、LC3 II 及 PDGFR 的表达 ($P < 0.05$)。结论 褪黑素可抑制 HSCs 的活化, 可能通过抑制 HSCs 内自噬表达发挥作用。

关键词 肝纤维化; 肝星状细胞; 褪黑素; 自噬; 血小板源性生长因子

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)11-1677-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.005

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是肝脏对多种慢性损伤后的共同病理阶段, 最终发展为肝硬化甚至肝癌^[1-2]。目前临床上尚无很有效治疗措施。研究^[3]表明, 肝纤维化是可以逆转的。肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSCs) 在肝纤维化发展中起到关键作用^[4]。研究^[5]表明, PDGF 是最强致炎因子之一, PDGF-BB 及其受体在 HSCs 激活中起到关键作用。自噬是一种代谢过程, 可维持细胞正常功能。研究^[6]表明, 自噬可激活 HSCs, 导致肝纤维化。褪黑素是松果体分泌的一种活性物质。课题组前期研究^[7-9]表明褪黑素对四氯化碳所致肝纤维化大鼠具有保护作用, 其机制可能与抑制 TGF- β 1/Smad 信号

通路及抑制 HSCs 的增殖有关。该课题通过研究 HSCs 自噬水平及褪黑素干预, 进一步探究褪黑素抗纤维化作用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及试剂 HSCs 系 (HSC-T6) (南京凯基生物科技发展有限公司); 褪黑素 (美国 Sigma 公司); PDGF-BB (美国 PeproTech 公司); DMEM 高糖培养基 (南京 Wisent 生物公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物公司); MTT (美国 Sigma 公司); 抗 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司); 抗 Beclin1 抗体、抗微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain-3, LC3) 抗体 (美国 Abcam 公司); 抗 β -actin 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司); DMSO、PMSF、青霉素/链霉素、胰酶消化酶、BCA 试剂盒、PVDF 膜 (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 细胞培养 HSC-T6 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱内培养, 每隔 24 h 换液, 待细胞融合至 70%~80% 时传代, 并取对数生长期细胞进行相关实验。按实验需求, 将细胞分为 5 组, 即: 模型组及实验组 (3 组) 加入 PDGF-BB (10 ng/ml)^[10], 实验组分别加入不同浓度的褪黑素 (1 nmol/L、1 μ mol/L、0.1 mmol/L)。对照组加入等量 PBS。

1.3 MTT 实验 取对数生长期 HSC-T6 细胞, 经胰酶消化后, 置于 DMEM 重悬, 调整细胞浓度为 5×10^3 个/孔, 接种于 96 孔板内, 每孔 200 μ l。分为 5 组: 对照组、模型组、实验组 (褪黑素 1 nmol/L、1 μ mol/L、0.1 mmol/L 组), 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱内培养 24 h 后, 更换为无血清培养基培养, 除对照组外, 其余各组均加入 PDGF-BB (10 ng/ml) 作用 30 min, 后在实验组分别加入相应浓度的褪黑素, 对照组加入等体积的 PBS。药物作用 48 h 后弃去上清液, 加入 MTT (5 mg/ml) 作用 4 h。后弃去上清液, 每孔加入 150 μ l DMSO, 将 96 孔培养板置于摇

2018-07-26 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目 (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: 揭磊, 男, 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@sina.com

床上震荡 10 min, 用酶标仪检测 490 nm 波长处各孔吸光度(optical density, OD) 值。

1.4 Western blot 实验 取对数生长期 HSC-T6 细胞消化后接种于培养瓶, 恒温培养箱内培养 24 h 后, 除对照组外, 其余各组均加入 PDGF-BB(10 ng/ml) 作用 30 min, 在实验组加对应浓度的褪黑素, 对照组加等体积 PBS。作用 48 h 后提取总蛋白, 利用 BCA 法予以蛋白定量, 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 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 用 PBS 洗 5 min $\times$ 3 次, 加抗 α -SMA、Beclin1、LC3、血小板衍生生长因子受体- β (platelet derived growth factor receptor- β , PDGFR- β) 一抗(1:2 000), 抗 β -actin 一抗(1:3 000), 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 次日室温孵育 30 min 后用 PBST 洗涤 10 min $\times$ 3 次, 加二抗(1:80 000), 室温孵育 1.5 h 后, 用 PBST 洗涤 10 min $\times$ 3 次, 加 ECL 显色液显影。 β -actin 作为内参, 用 IPWIN 6.0 软件分析结果, 蛋白表达水平以目的蛋白/ β -actin 的平均灰度比值表示。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 各组实验重复 3 次以上, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间比较采用单因素方差分析(One-way analysis of variances, ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 褪黑素对 PDGF-BB 激活的 HSC-T6 细胞增殖的影响 MTT 结果显示, 与对照组相比, PDGF-BB 激活了 HSCs, 促进其增殖, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与对照组相比, 褪黑素可抑制 HSCs 的增殖。见表 1。

表 1 褪黑素对 PDGF-BB 激活的 HSC-T6 细胞增殖的影响($n=9$, $\bar{x} \pm s$)

组别	OD ₄₉₀	抑制率 (%)	F 值	P 值
对照组	0.696 $\pm$ 0.047	—	—	—
模型组(10 ng/ml)	0.869 $\pm$ 0.056 **	—	—	< 0.001
治疗组				
1.0 nmol/L	0.788 $\pm$ 0.026 ##	9.278	—	< 0.001
1.0 mmol/L	0.710 $\pm$ 0.026 ##	18.287	—	< 0.001
0.1 mmol/L	0.645 $\pm$ 0.045 ##	25.803	39.017	< 0.001

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

2.2 褪黑素对 HSC-T6 细胞 α -SMA 表达的影响

Western blot 结果显示, 相对于对照组, PDGF-BB

激活的 HSC-T6 细胞 α -SMA 表达水平增高, 差异有统计学意义($F = 13.954$, $P < 0.05$); 而相对于模型组, 褪黑素可降低 HSC-T6 细胞 α -SMA 的表达($F = 13.954$, $P < 0.05$)。见图 1。

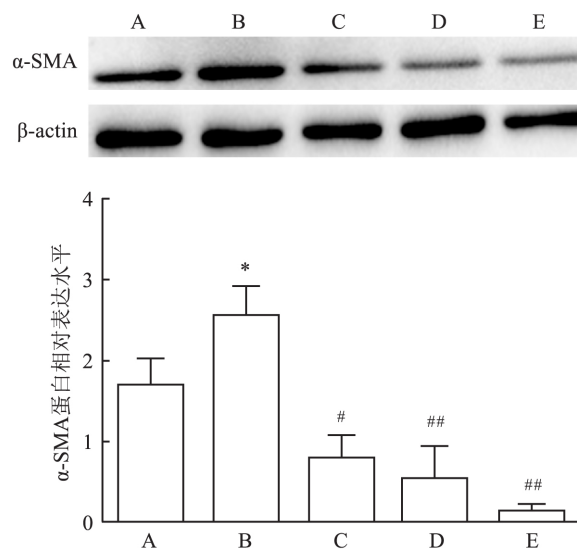


图 1 褪黑素对 α -SMA 表达的影响

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

2.3 褪黑素对 HSC-T6 细胞 Beclin1、LC3 II 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示, 在 PDGF-BB 激活的 HSC-T6 细胞中, Beclin1 蛋白和 LC3 II 蛋白表达水平相对于对照组明显增加($F = 6.205$, 48.283 , $P < 0.05$); 相对于模型组, 在褪黑素干预的各治疗组中, Beclin1 蛋白和 LC3 II 蛋白表达显著减低($F = 6.205$, 48.283 , $P < 0.05$)。见图 2。

2.4 褪黑素对 HSC-T6 细胞 PDGFR 表达的影响

Western blot 结果显示, 在 PDGF-BB 激活的 HSC-T6 细胞中, PDGFR 表达相对于对照组显著增高($F = 18.848$, $P < 0.01$); 相对于模型组, 褪黑素干预的 HSC-T6 细胞中, PDGFR 表达明显降低($F = 18.848$, $P < 0.05$)。见图 3。

3 讨论

肝纤维化是肝脏受到慢性损伤时产生多种炎症介质, 激活 HSCs, 产生大量细胞外基质的病理过程。该过程中, 肝实质细胞被纤维组织所替代, 最终发展为肝硬化, 甚至肝癌, 严重威胁人类健康。相关研究^[3]表明, 肝纤维化发生发展过程中, 经适当的干预, 其病理过程可被阻止, 甚至逆转。因此, 积极开

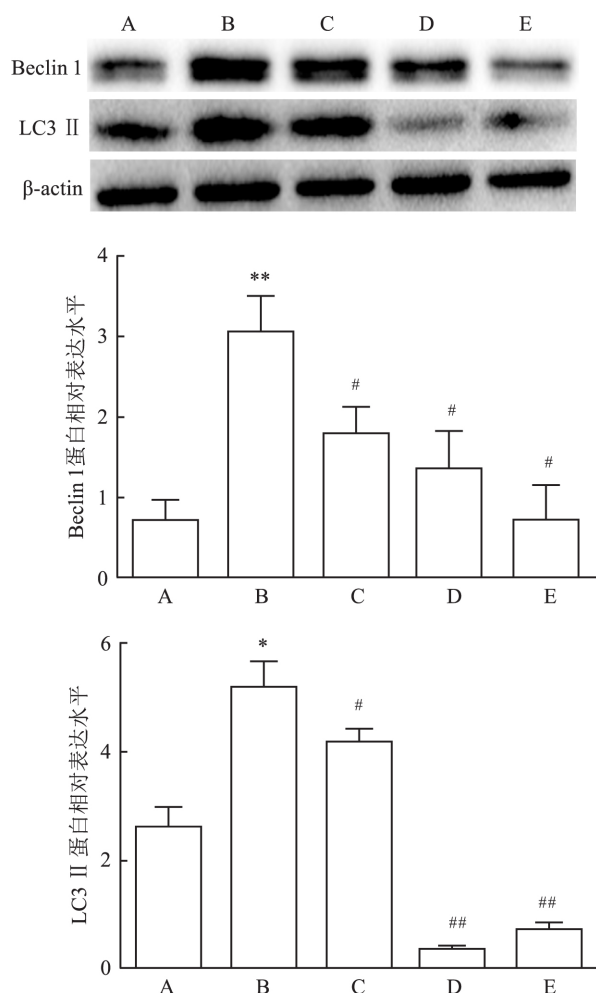


图2 褪黑素对 Beclin1 蛋白及 LC3 II 蛋白表达的影响

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

发安全有效的抗肝纤维化药物有重要的临床意义。

褪黑素具有抗炎抗氧化作用,同时也有抗纤维化作用。Lebda et al^[11] 结果显示,褪黑素可抑制炎症介质的分泌、对抗氧化应激、抑制纤维化进程等,从而起到抗肝纤维化作用。González-Fernández et al^[12] 研究表明,褪黑素具有抗纤维化作用,可能与抑制鞘氨醇激酶 1-1-磷酸鞘氨醇(SphK1-S1P) 信号通路有关。此外,本课题组前期研究^[7-9] 表明,褪黑素具有抗纤维化作用,可能与其抗氧化、抑制 TGF-β/Smad 信号通路有关。本实验通过体外培养 HSCs,以 PDGF-BB 激活及褪黑素干预,通过 MTT 法及 Western blot 法检测 HSCs 增殖、激活及其自噬表达水平,结果表明,褪黑素可抑制 HSCs 增殖及激活,可能是通过抑制 HSCs 内自噬水平发挥作用。

HSCs 是一种间质细胞,存在于肝脏狄氏间隙。正常情况下, HSCs 处于静止状态;但当肝脏受到损

伤产生炎症介质时,如 TGF-β、PDGF 等, HSCs 被激活,转化为肌成纤维样细胞(myofibroblast cells, MFC),分泌大量细胞外基质,进而促使肝纤维化的发展。其中 α-SMA 是 HSCs 激活的标志。目前,一些研究将抑制 HSCs 的激活作为抑制肝纤维化的靶点。本实验结果表明褪黑素可能通过抑制 HSCs 的激活和增殖发挥抗肝纤维化作用。

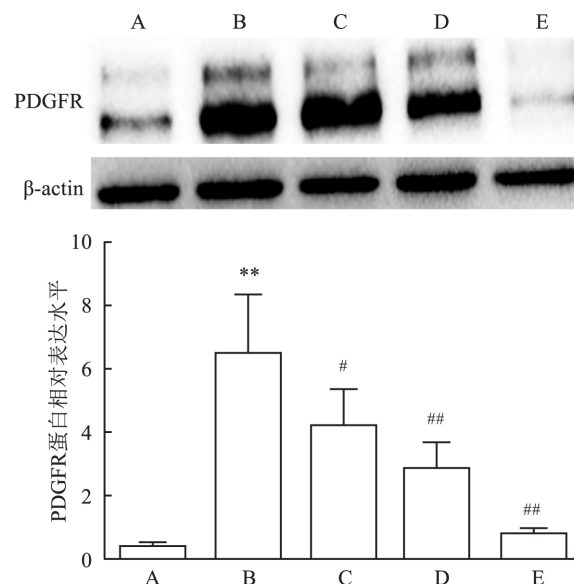


图3 褪黑素对 PDGFR 蛋白表达的影响

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

自噬是广泛存在于人体的一种代谢过程。人体的衰老细胞器、内膜等被自噬体吞噬,转运至线粒体,维持细胞新陈代谢。有研究^[13] 表明,自噬可促进 HSCs 的激活,导致肝纤维化。静息状态下, HSCs 中含有大量脂滴及维生素 A,为 HSCs 未被激活的标志。而在 HSCs 被激活时,细胞内的自噬体可吞噬脂滴,转运至线粒体进行 β 氧化,为 HSCs 的活化及其分泌大量胶原蛋白等提供能量。Shen et al^[14] 试验结果表明,虾青素可抑制 HSCs 的活化,其作用机制可能与虾青素抑制 HSCs 内自噬的水平有关。本实验结果表明,褪黑素可能通过抑制 HSCs 内自噬水平从而抑制其激活及增殖。

在 HSCs 激活过程中,PDGF-BB/PDGFR-β 信号通路扮演重要角色。PDGF-BB 与其受体 PDGFR-β 结合,启动该信号通路,诱导肝纤维化的发展。且在慢性肝损伤中,PDGF-BB 和 PDGFR-β 的表达相对于正常肝组织明显增加^[15]。有研究^[10] 表明,PDGF-BB 能激活 HSCs 并促进其增殖。本实验结果表明,

褪黑素干预可能通过抑制 PDGF-BB/PDGFR- β 信号通路而抑制 HSCs 激活及增殖。

综上所述,本实验利用 PDGF-BB 激活 HSCs,结果显示,PDGF-BB 能激活 HSCs、促进其增殖,该作用可能与 PDGF-BB 启动 PDGF-BB/PDGFR- β 信号通路,上调 HSCs 的自噬水平有关;而褪黑素可抑制 HSCs 的激活及增殖,其机制可能与褪黑素抑制 PDGF-BB/PDGFR- β 信号通路,进而抑制 HSCs 内自噬水平有关。这为肝纤维化的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Asgharzadeh F, Bargi R, Beheshti F, et al. Thymoquinone restores liver fibrosis and improves oxidative stress status in a lipopolysaccharide-induced inflammation model in rats[J]. *Avicenna J Phytomed* 2017, 7(6): 502–10.
- [2] Crosas-Molist E, Fabregat I. Role of NADPH oxidases in the redox biology of liver fibrosis[J]. *Redox Biol* 2015, 6: 106–11.
- [3] Ge P S. Treatment of patients with cirrhosis[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(8): 767–77.
- [4] Friedman S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury[J]. *J Biol Chem* 2000, 275(4): 2247–50.
- [5] 卢盛娟. 山芝麻酸甲酯对 PDGF-BB 刺激的 HSCsERK 信号通路的影响[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [6] Wang B, Yang H, Fan Y, et al. 3-methyladenine ameliorates liver fibrosis through autophagy regulated by the NF- κ B signaling pathways on hepatic stellate cell[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(64): 107603–11.
- [7] 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.
- [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- β 1 表达的影响[J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(9): 1248–52.
- [9] 谢园园, 洪汝涛, 汪玉荣. 褪黑素抑制 HSCs 增殖的机制研究[J]. *安徽医科大学学报* 2017, 52(9): 1327–31.
- [10] Lin X, Kong L N, Huang C, et al. Hesperetin derivative-7 inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell activation and proliferation by targeting Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Int Immunopharmacol* 2015, 25(2): 311–20.
- [11] 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.
- [12] González-Fernández B, Sánchez D I, Crespo I, et al. Inhibition of the SphK1/S1P signaling pathway by melatonin in mice with liver fibrosis and human hepatic stellate cells[J]. *Biofactors*, 2017, 43(2): 272–82.
- [13] Lee A Y, Lee J W, Kim J E, et al. Dihydroceramide is a key metabolite that regulates autophagy and promotes fibrosis in hepatic steatosis model[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2017, 494(3–4): 460–9.
- [14] Shen M, Chen K, Lu J, et al. Protective effect of astaxanthin on liver fibrosis through modulation of TGF- β 1 expression and autophagy[J]. *Mediators Inflamm* 2014, 2014: 954502.
- [15] Wang X Q, Wu X F, Zhang A H, 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]. *EBio-Medicine*, 2016, 7: 146–56.

Effect of melatonin on autophagy in PDGF-BB induced activated hepatic stellate cells

Jie Lei, Hong Rutao, Zhang Yujie

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

Abstract Objective To investigate the effect of melatonin on autophagy induced by platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) in hepatic stellate cells. **Methods** The HSC-T6 cells were divided into five groups: control group, model group and experimental groups (three groups, concentration of melatonin of 1 nmol/L, 1 μ mol/L and 0.1 mmol/L). After being cultured for 24 h, they were replaced with FBS-free medium and treated with PDGF-BB (10 ng/ml) excepted the control group, and different concentrations (1 nmol/L, 1 μ mol/L and 0.1 mmol/L) were added immediately in three experimental groups. After incubation for 48 h, MTT assay was performed to assess the proliferation of hepatic stellate cells, Western blot were performed to assess the levels of autophagy. **Results** Comparing with the model group, melatonin could inhibit the proliferation of hepatic stellate cells ($P < 0.05$). Additionally, in PDGF-BB treated group, the levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), Beclin1, microtubule-associated protein 1 light chain-3 II (LC3 II), platelet derived growth factor receptor (PDGFR) were up-regulated, which were down-regulated after administration of melatonin ($P < 0.05$). **Conclusion** Melatonin can alleviate the activation of hepatic stellate cells, which may relate to the level of autophagy.

Key words hepatic fibrosis; hepatic stellate cells; melatonin; autophagy; platelet derived growth factor