

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002955

# 褪黑素对 PDGF 诱导肝纤维化的影响及其可能机制

岳彩飞<sup>1</sup>,洪汝涛<sup>2</sup>

(1. 中国科学技术大学附属第一医院消化内科,合肥 230001;2. 安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022)

**【摘要】目的:**探讨褪黑素(melatonin,Mel)对血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor,PDGF)诱导的肝星状细胞-T6 (hepatic stellate cell-T6,HSC-T6)中 JAK2/STAT3 信号通路的影响。**方法:**将 HSC-T6 细胞分为 6 组:对照组、模型组、实验组 (Mel 1 nmol/L,Mel 1 μmol/L,Mel 0.1 mmol/L)、抑制剂组 (AG490 为 JAK2/STAT3 通路的抑制剂),实时荧光聚合酶链式反应检测 HSC-T6 中 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)、I 型胶原(collagen type I ,collagen-I) mRNA 表达,免疫组化检测 HSC-T6 细胞中 JAK-2、P-JAK2、STAT3、P-STAT3 蛋白表达。**结果:**与对照组比较,PDGF 能明显激活 HSC-T6 增殖,明显上调 HSC-T6 中 α-SMA、collagen-I mRNA 及 JAK-2、P-JAK2、STAT3、P-STAT3 表达;与模型组比较,褪黑素及 JAK2/STAT3 通路抑制剂可抑制 PDGF 诱导的 HSC-T6 增殖,明显下调 α-SMA、collagen-I mRNA 及 JAK-2、P-JAK2、STAT3、P-STAT3 表达。**结论:**褪黑素可抑制 PDGF 诱导的 HSC-T6 活化与增殖,其机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路有关,这可能是褪黑素改善肝纤维化的机制之一。

**【关键词】**褪黑素;肝星状细胞;JAK2/STAT3;肝纤维化**【中图分类号】**R575.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-04-07

## Effect of melatonin on liver fibrosis induced by platelet-derived growth factor and its possible mechanism

Yue Caifei<sup>1</sup>,Hong Ruta<sup>2</sup>

(1. Department of Gastroenterology ,The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China;2. Department of Gastroenterology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University)

**【Abstract】****Objective:** To investigate the effect of melatonin (Mel) on the JAK2/STAT3 signaling pathway of hepatic stellate cell-T6 (HSC-T6) induced by platelet-derived growth factor (PDGF). **Methods:** HSC-T6 cells were divided into 6 groups: control group, model group, experimental groups (Mel 1 nmol/L, Mel 1 μmol/L, Mel 0.1 mmol/L) and inhibitor group (AG490 JAK2/STAT3 pathway inhibitor). Real-time fluorescent polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression of α-smooth muscle actin (α-SMA) and collagen type I (collagen-I) in HSC-T6, and the protein expression detection of JAK-2, P-JAK2 and STAT3, P-STAT3 proteins in HSC-T6 cells was made by immunohistochemistry. **Results:** Compared with the control group, PDGF significantly activated the proliferation of HSC-T6, and significantly up-regulated the expression of α-SMA, collagen-I mRNA and JAK-2, P-JAK2, STAT3 and P-STAT3 in HSC-T6. Compared with model group, Mel and JAK2/STAT3 pathway inhibitor inhibited PDGF induced HSC-T6 proliferation, and significantly down-regulated the expressions of α-SMA, collagen-I mRNA and JAK-2, P-JAK2, STAT3 and P-STAT3. **Conclusion:** Mel can inhibit the activation and proliferation of HSC-T6 induced by PDGF, and the mechanism may be related to the inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway, which may be one of the mechanisms of melatonin improving liver fibrosis.

**【Key words】**melatonin;hepatic stellate cells;JAK2/STAT3;liver fibrosis

肝纤维化是各类致病因素引起肝脏发生损伤-修复反应的结果,其主要病理改变为肝内弥漫性细

胞外基质过度沉积,是多种慢性肝病向肝硬化进展的共同基础<sup>[1]</sup>。近年来,相关研究已经明确,肝纤维化甚至早期肝硬化是可以逆转的<sup>[2]</sup>。在肝纤维化发生过程中,肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)首先激活并增殖,产生大量细胞外基质<sup>[3]</sup>,如 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)、I型/II

**作者介绍:**岳彩飞,Email:2441754086@qq.com,**研究方向:**慢性肝病。**通信作者:**洪汝涛,Email:hongruthah@un.com。**优先出版:**<https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20211221.1314.006.html>

(2021-12-23)

型胶原(collagen type I / II , collagen- I / II )蛋白等<sup>[4]</sup>,因此抑制 HSC 的激活和增殖是治疗和预防肝纤维化的重要方法。HSC 激活由大量炎性细胞因子和生长因子介导,其中血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是 HSC 中最有效的有丝分裂增殖细胞因子之一<sup>[5]</sup>,PDGF 通过与 HSC 质膜上的 PDGF 受体特异性结合,能够激活 JAK2/STAT3 信号通路,致使 HSC 活化增殖。本实验以体外培养的肝星状细胞-T6(hepatic stellate cell-T6, HSC-T6)为对象,通过观察褪黑素对 PDGF 诱导的 HSC 上 JAK2/STAT3 信号通路的影响,探讨其抗肝纤维化分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

DMEM 购自美国 Hyclone 公司;HSC 购自南京凯基生物科技发展公司;胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;褪黑素购自美国 Sigma 公司;PDGF 购自美国 PeproTech 公司;PCR 试剂盒购自美国 Thermo 公司;DMSO、胰酶消化液、青霉素/链霉素购自上海碧云天生物技术有限公司;Anti-JAK2 antibody、Anti-P-JAK2 antibody、Anti-STAT3 antibody、Anti-P-STAT3 antibody、Anti-GAPDH antibody 购自英国 Abcam 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 HSC-T6 细胞采用含 10% 胎牛血清,1% 双抗(青-链霉素混合液)的 DMEM 高糖培养基,置于 37°C,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养,第 2 天换液,2~3 d 传代 1 次,收集对数期细胞进行后续实验。分组:对照组加入无菌的 PBS,模型组加入浓度为 10 ng/mL 的 PDGF,Mel 低浓度组加入适量 PDGF 和浓度为 1 nmol/L 的 Mel;Mel 中浓度组加入适量 PDGF 和浓度为 1 μmol/L 的 Mel;Mel 高浓度组加入适量 PDGF 和浓度为 0.1 mmol/L 的 Mel;抑制剂组加入适量 PDGF 和 AG490。分组完成后,放入培养箱中 48 h 备用。

1.2.2 实时荧光聚合酶链式反应检测 α-SMA、collagen- I mRNA 的表达 各组作用 48 h 后,通过 Trizol 方法提取各组细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 进行扩增,以 GAPDH 作为内参,扩增后以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算 α-SMA 和 collagen- I mRNA 的表达。实时荧光聚合酶链式反应引物序列为:collagen- I 上游引物:5'-TACAGCACCGCTTGTGGATG-3',下游引物:5'-TTGGGATGGAGGGACTTAA-3';α-SMA 上游引物:5'-AACACGGCATCATCACCAAC-3',下游引物:5'-CACAGCCTGAAT AGCCACATAC-3';GAPDH 上游引物:5'-GGAGTCTACTGGCGTCTTCAC-3',下游引物:5'-ATGAGC-CCTTCCACGATGC-3'。

1.2.3 细胞免疫组化实验 将各组制成的细胞爬片用 PBS 洗去培养基,再用 4% 甲醛固定 30 min,PBS 洗 3 min × 3 次;加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,湿盒孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,PBS 冲洗 3 min × 3 次,1% BSA 封闭 1 h,PBS 洗 3 min × 3 次;滴加一抗后湿盒孵育于 4°C 冰箱过夜;滴加 HRP 标记广谱二抗,湿盒孵育,室温下放置 20 min 后 PBS 冲洗 3 min × 3 次;再滴加 DAB 染色,观察有颜色改变时,立即用自来水洗去染色液;苏木素复染 3 min,1% 盐酸酒精分化,显微镜下观察,控制染色程度。自来水冲洗 10 min,放入 65°C 烘箱中烘干水分;将细胞爬片置于二甲苯中透明 3 min × 2 次,中性树胶封片,放入 65°C 烘箱中 15 min,镜下观察,采集分析相关部位,放大 200 倍拍照,用 Image-Pro Plus 软件分析结果。

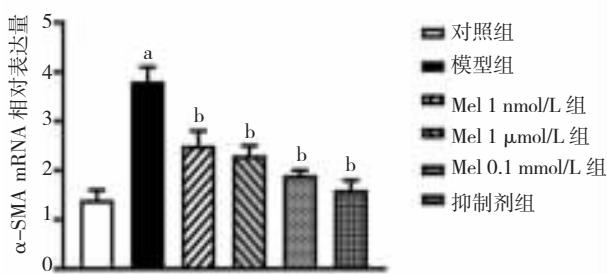
### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,3 组以上计量资料对比采用单因素方差分析,2 组间的比较采用 LSD-t 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

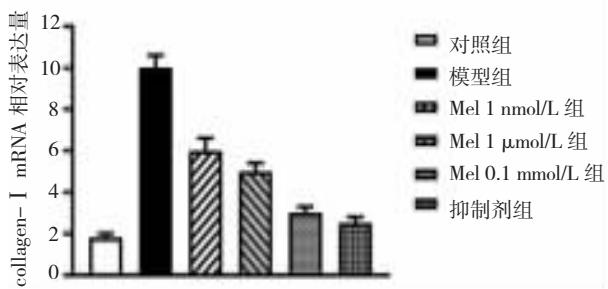
### 2.1 Mel 对 PDGF 诱导的 HSC-T6 中 α-SMA、collagen- I mRNA 表达的影响

各组 HSC-T6 中 α-SMA mRNA 表达量分别为 0.012 9 ± 0.002 5、0.038 0 ± 0.003 6、0.022 7 ± 0.001 8、0.022 2 ± 0.002 0、0.018 3 ± 0.001 1、0.015 7 ± 0.003 1,方差分析 6 组差异有统计学意义 ( $F=36.244, P=0.000$ );各组 HSC-T6 中 collagen- I mRNA 表达量分别为 0.002 6 ± 0.000 3、0.201 0 ± 0.001 8、0.116 0 ± 0.001 9、0.009 0 ± 0.001 0、0.005 2 ± 0.000 4、0.004 5 ± 0.000 6,方差分析 6 组差异有统计学意义 ( $F=80.349, P=0.000$ )。与对照组相比,模型组 α-SMA、collagen- I mRNA 表达量明显升高,差异具有统计学意义(均  $P=0.000$ );与模型组比较,褪黑素低、中、高剂量组以及抑制剂组 α-SMA、collagen- I mRNA 表达量均回降,差异均具有统计学意义(均  $P=0.000$ )(图 1、图 2)。



注:a,与对照组比较, $P<0.05$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$

图 1 Mel 对 PDGF 诱导的 HSC-T6 中 α-SMA mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



注:a,与对照组比较, $P<0.05$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$

图 2 Mel 对 PDGF 诱导的 HSC-T6 中 collagen-I mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

## 2.2 细胞免疫组化检测 Mel 对 PDGF 诱导的 HSC-T6 细胞中 P-JAK2、P-STAT3 蛋白表达

各组中 P-JAK2 蛋白表达量分别为  $0.5176 \pm 0.027$ 、 $0.3336 \pm 0.0408$ 、 $0.2406 \pm 0.0130$ 、 $0.2163 \pm 0.0095$ 、 $0.1653 \pm 0.0133$ 、 $0.1433 \pm 0.0081$ , 方差分析 6 组差异有统计学意义 ( $F=31.164, P=0.000$ ); 各组中 P-STAT3 蛋白表达量分别为  $0.1570 \pm 0.0138$ 、 $0.4523 \pm 0.0469$ 、 $0.3273 \pm 0.0107$ 、 $0.2593 \pm 0.0132$ 、 $0.1476 \pm 0.0172$ 、 $0.1370 \pm 0.0180$ , 方差分析 6 组差异有统计学意义 ( $F=85.836, P=0.000$ )。与对照组比较, 模型组中 P-JAK2、P-STAT3 蛋白表达差异有统计学意义 (均  $P=0.000$ ); 与模型组比较, 褪黑素低、中、高实验组及抑制剂组 P-JAK2、P-STAT3 蛋白表达差异有统计学意义 (均  $P=0.000$ ), 并且随着褪黑素浓度增加 P-JAK2、P-STAT3 表达的抑制作用逐渐增强(图 3、图 4)。

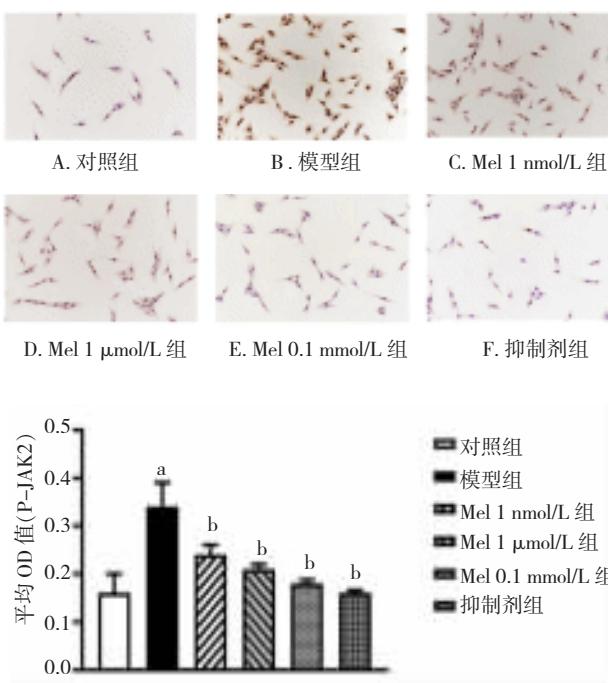
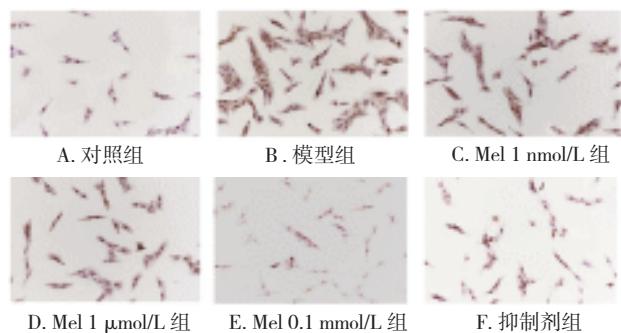


图 3 Mel 对 PDGF 诱导的 HSC-T6 中 P-JAK2 蛋白表达的影响 (ICC,  $200\times$ ,  $\bar{x} \pm s, n=3$ )



注:a,与对照组比较, $P<0.05$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$

图 4 免疫组化检测 Mel 对 P-STAT3 蛋白表达的影响 (ICC,  $200\times$ ,  $\bar{x} \pm s, n=3$ )

## 3 讨 论

肝纤维化是不同病因慢性肝损伤引起的纤维性瘢痕形成过程。正常情况下, 处于静息状态或未激活状态的 HSC 位于肝脏窦周间隙, 其主要功能是广泛摄取和储存维生素 A<sup>[6]</sup>。但在病理状态如慢性刺激或肝脏损伤情况下, HSC 中的视黄醇脂滴减少, 细胞被激活分化为肌成纤维细胞<sup>[7]</sup>, 维生素 A 合成减少, 并合成多种细胞外基质, 如  $\alpha$ -SMA、collagen-I / II 等<sup>[8]</sup>。近年研究表明, HSC 是细胞外基质形成的主要来源, 且 HSC 的激活转化为肌成纤维细胞是肝纤维化发生发展的中心环节<sup>[9]</sup>。PDGF 家族包括其配体和受体, 在组织修复和细胞外基质的形成中起关键作用。国内外多项研究表明, PDGF-B 和 PDGF-D 具有促进 HSC 迁移并向肌成纤维细胞转化作用, 从而分泌过多的细胞外基质<sup>[10]</sup>。现已证实 HSC 上 PDGFR- $\beta$  缺失降低  $\alpha$ -SMA 和 collagen-I 表达, 从而缓解肝纤维化<sup>[11]</sup>。此外, 选择性阻断 PDGFR 可降低活化星状细胞的增殖、分化和迁移<sup>[12]</sup>。 $JAK2/STAT3$  信号通路参与细胞增殖、分化、凋亡及免疫调节等过程<sup>[13]</sup>。该通路被激活后, STAT3 发生磷酸化, 诱导相应基因表达, 使 HSC 活化, 最终导致肝纤维化。

Mel 主要由松果体分泌, 是一种神经内分泌激素。近年研究显示, 在急性肝损伤模型中, Mel 有细

胞保护作用;在慢性肝损伤模型中,Mel 发挥抗纤维化作用<sup>[14-15]</sup>。虽然褪黑素在肝纤维化中的作用及内在机制已取得一些进展,但是,目前对其参与肝纤维化进程的具体机制还不完全清楚。肝纤维化作为肝病发展的共同通路和关键时期,逆转肝纤维化至关重要,如果通过使用褪黑素调节肝纤维化,减少 HSC 活化,增强对肝细胞的保护和再生,就可以减缓病程甚至逆转肝纤维化。查阅国内外文献发现,此类研究除本课题组外,国内外未见报道。本课题组前期初步研究证实,Mel 对急性酒精性肝损伤、四氯化碳所致的大鼠肝纤维化具有保护作用<sup>[16]</sup>。在前期研究的基础上,进一步阐明褪黑素抑制肝纤维化作用是否与抑制 HSC 中 JAK2-STAT3 信号通路有关,为开发 Mel 作为防治肝纤维化药物提供实验基础。

课题组前期实验已经证实 Mel 浓度增加至 1 mmol/L,HSC 增殖明显被抑制<sup>[16]</sup>,故采用 1 nmol/L、1 μmol/L 和 0.1 mmol/L 作为实验组 Mel 的药物浓度。该实验研究结果显示采用 PDGF 浓度为 10 ng/mL 可激活 HSC-T6 细胞,与 Wang Y 等<sup>[17]</sup>用该浓度 PDGF 激活 HSC 相一致。实验结果显示与对照组比较,PDGF 能明显激活 HSC-T6 增殖,明显上调HSC-T6 中 α-SMA、collagen-I mRNA 及 JAK-2、P-JAK2、STAT3、P-STAT3 的表达;与模型组比较,Mel 及 JAK2/STAT3 通路抑制剂可抑制 PDGF 诱导的HSC-T6 增殖,明显下调 α-SMA、collagen-I mRNA 及 P-JAK2、P-STAT3 表达。这一结果提示肝纤维化过程中 JAK2/STAT3 信号通路被激活,并且褪黑素能够抑制该通路。

综上所述,Mel 可抑制 PDGF 诱导的 HSC 活化增殖,其机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路有关,这可能是褪黑素改善肝纤维化机制之一。

## 参 考 文 献

- [1] Liu LW, You ZF, Yu HS, et al. Mechanotransduction-modulated fibrotic microniches reveal the contribution of angiogenesis in liver fibrosis[J]. Nat Mater, 2017, 16(12):1252-1261.
- [2] Zhang CY, Yuan WG, He P, et al. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(48):10512-10522.
- [3] Gao JH, Wei B, de Assuncao TM, et al. Hepatic stellate cell autophagy inhibits extracellular vesicle release to attenuate liver fibrosis [J]. J Hepatol, 2020, 73(5):1144-1154.
- [4] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Compr Physiol, 2013, 3(4):1473-1492.
- [5] Wang XQ, Wu XF, Zhang AH, 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, 7:146-156.
- [6] Higashi N, Senoo H. Distribution of vitamin A-storing lipid droplets in hepatic stellate cells in liver lobules: a comparative study[J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2003, 271(1):240-248.
- [7] Yu Y, Teng ZW, Mou ZM, et al. Melatonin confers heavy metal-induced tolerance by alleviating oxidative stress and reducing the heavy metal accumulation in *Exophiala pisciphila*, a dark septate endophyte (DSE)[J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1):40.
- [8] Yang YR, Bu FT, Yang Y, et al. LEFTY2 alleviates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by regulating the TGF-β1/Smad3 pathway[J]. Mol Immunol, 2020, 126:31-39.
- [9] DeRossi C, Bambino K, Morrison J, et al. Mannose phosphate isomerase and mannose regulate hepatic stellate cell activation and fibrosis in zebrafish and humans[J]. Hepatology, 2019, 70(6):2107-2122.
- [10] Thuy LTT, Hai H, Kawada N. Role of cytoglobin, a novel radical scavenger, in stellate cell activation and hepatic fibrosis[J]. Clin Mol Hepatol, 2020, 26(3):280-293.
- [11] Du ZP, Lin ZY, Wang ZH, et al. SPOCK1 overexpression induced by platelet-derived growth factor-BB promotes hepatic stellate cell activation and liver fibrosis through the integrin α5β1/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Lab Invest, 2020, 100(8):1042-1056.
- [12] Kikuchi A, Singh S, Poddar M, et al. Hepatic stellate cell-specific platelet-derived growth factor receptor-α loss reduces fibrosis and promotes repair after hepatocellular injury[J]. Am J Pathol, 2020, 190(10):2080-2094.
- [13] Chakraborty D, Šumová B, Mallano T, et al. Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis[J]. Nat Commun, 2017, 8(1):1130.
- [14] Zavodnik LB, Zavodnik IB, Lapshina EA, et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats[J]. Cell Biochem Funct, 2005, 23(5):353-359.
- [15] Tahan V, Ozaras R, Canbakan B, et al. Melatonin reduces dimethyl-nitrosamine-induced liver fibrosis in rats[J]. J Pineal Res, 2004, 37(2):78-84.
- [16] 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):1248-1252.
- [17] Wang YH, Sun YC, Zuo LQ, et al. ASIC1a promotes high glucose and PDGF-induced hepatic stellate cell activation by inducing autophagy through CaMKKβ/ERK signaling pathway[J]. Toxicol Lett, 2019, 300:1-9.

(责任编辑:冉明会)