

褪黑素调控自噬抑制肝星状细胞增殖的作用及机制研究

陈涤非¹, 揭磊¹, 黄启鸣¹, 徐德祥², 任晓非¹, 洪汝涛¹

摘要 目的 研究褪黑素(MEL)对血小板源性生长因子(PDGF-BB)诱导的肝星状细胞(HSCs)增殖的影响,并探索其与自噬水平调控的相关性。方法 HSC-T6共设置5组:对照组、模型组、MEL(低、中、高)处理组。培养24 h后细胞贴壁,换用无血清的DMEM培养基,使细胞同步化于G₀期,再培养24 h后除对照组外各组加入PDGF-BB(终浓度为10 ng/ml),MEL处理组加入MEL(低剂量组为1 nmol/L,中剂量组1 μmol/L,高剂量组为0.1 mmol/L),孵育48 h。细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测MEL对PDGF-BB激活的HSCs增殖的影响。Western blot测定HSCs的微管相关蛋白1轻链3b(LC3b)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)蛋白表达水平。实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)测定HSCs LC3b mRNA、α-SMA mRNA表达水平。透射电镜观察HSCs的超微结构以了解自噬水平。结果 与对照组比较,PDGF-BB能诱导HSCs的增殖($P < 0.01$)。与模型组比较,MEL能抑制PDGF-BB激活的HSCs增殖($P < 0.01$);与对照组比较,模型组LC3b、α-SMA蛋白表达明显增强(均 $P < 0.05$),LC3b mRNA、α-SMA mRNA表达明显增强($P < 0.05$, $P < 0.01$),与模型组比较,MEL能抑制这种作用(LC3b: $P < 0.05$, $P < 0.01$; α-SMA: $P < 0.01$)。透射电镜显示,与对照组比较,模型组自噬溶酶体显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,MEL处理组自噬溶酶体显著减少($P < 0.01$)。结论 HSCs的增殖可能与自噬激活有关,MEL抑制HSCs增殖可

能与其下调自噬水平相关。

关键词 褪黑素;肝纤维化;肝星状细胞;自噬;PDGF-BB

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1910-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.018

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是各类致病因素引起肝脏损伤-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(extracellular matrix, ECM)的过度沉积,是多种慢性肝病向肝硬化进展的共同基础^[1]。研究^[2]表明,活化的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)在HF发展的进程中起到举足轻重的作用。研究^[3]表明,血小板源性生长因子-BB(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)是较强致炎因子之一,在HSCs激活中起重要作用。在这一过程中,溶酶体发挥积极作用^[4]。有文献^[5]提示,自噬在HF进展中发挥重要作用,但其具体机制还不清楚。HF作为肝病发展的共同通路,逆转HF是至关重要的,如果通过调节细胞自噬,减少HSCs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HF。该课题组前期研究表明,在肝组织中,褪黑素(melatonin, MEL)可以抑制自噬从而减轻HF^[6]。目前自噬与HSCs增殖关系及MEL对其抑制作用除该课题组外尚未见报道,该研究将进一步研究MEL抑制HSCs增殖与抑制自噬水平的相关性。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 HSC T-6(永生系细胞,武汉普诺赛公司);DMEM高糖培养基、胎牛血清(杭州四

2023-07-04 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202004j070-20039)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院消化内科,安徽省消化疾病重点实验室,合肥 230022

²安徽医科大学毒理系,安徽省重点实验室,合肥 230032

作者简介:陈涤非,男,硕士研究生;

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

levels and IL-6 content in liver tissue of APAP 4 - hour group increased; serum ALT level, liver index, HMGB1 protein content and IL-6 content in liver tissue increased in APAP 12 - hour group. Compared with APAP 4 - hour group, serum ALT level, liver index, TLR4, HMGB1, NF-κB protein content, MCP-1, IL-1β, TNF-α, IL-6 gene level and IL-6 content in liver tissue decreased in APAP + TAK-242 4 - hour group. Compared with APAP 12 - hour group, the levels of TLR4, HMGB1 protein and MCP-1, IL-1β, TNF-α genes in APAP + TAK-242 12 - hour group decreased. **Conclusion** Inhibition of TLR4 may inhibit TLR4/HMGB1 pathway to reduce the inflammatory response in the early stage of acetaminophen-induced acute liver injury in mice.

Key words acetaminophen; TLR4; liver injury; inflammation; mice; inbred ICR

季青生物有限公司); PDGF-BB(美国 PeproTech 公司); 抗微管相关蛋白 1 轻链 3b(microtubule-associated protein 1 light chain-3b, LC3b)抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)兔抗鼠单克隆抗体、抗 β -actin 抗体(美国 Abcam 公司); 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、青霉素、链霉素、胰酶消化酶、双重缩氨酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)试剂盒、聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(上海碧云天生物技术有限公司); MEL(美国 Sigma 公司); 细胞计数试剂盒-8(cell counting Kit-8, CCK-8)、山羊抗小鼠辣根酶标记 IgG(H+L)、4%多聚甲醛、1%四氧化钨(合肥 Biosharp 生物科技公司)。

1.2 细胞培养 细胞培养 HSC-T6 细胞株复苏后培养于含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM 培养基中, 置 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养至 70%~80% 融合后传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 CCK-8 实验 用 3~4 代细胞, 共设置 5 组: 对照组、模型组、MEL(低、中、高剂量)处理组。HSCs 接种于 96 孔培养板(浓度 5×10^4 /L), 每孔设 6 个复孔, 培养 24 h 后细胞贴壁, 约 70%~80% 细胞融合, 换用无血清的 DMEM 培养基, 以使细胞同步化于 G₀ 期, 再培养 24 h 后除对照组外各组加入 PDGF-BB(终浓度 10 ng/ml)、MEL 处理组加入 MEL(低剂量组为 1 nmol/L, 中剂量组为 1 μ mol/L, 高剂量组为 0.1 mmol/L), 孵育 48 h 后加入 CCK-8(10 g/L)20 μ l, 继续 37 °C 培养 2 h, 小心吸弃培养液。酶标仪测波长为 570 nm 处的吸光度(A)值。

1.4 Western blot 实验 同上述 CCK-8 分组, 将细胞接种于培养瓶中, 于恒温培养箱中培养, 待细胞长至单层 80% 左右时, 同步化处理, 各分组加入处理因素(PDGF-BB 和 MEL, 浓度同 CCK-8), 培养 48 h, 小心吸弃培养液, 加入 PBS 反复吹打细胞至细胞基本脱落, 离心(650 r/min, 5 min), 弃去上清液, 加入细胞裂解液并反复吹打细胞使细胞与裂解液充分混匀, 静置 30 min 离心, 提取总蛋白。蛋白定量后每组上样 10 μ g, 进行 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜封闭。将一抗稀释至所需浓度(兔抗鼠 LC3b 1:2 000、兔抗鼠 α -SMA 1:1 000、 β -actin 1:3 000), 4 °C 孵育过夜。洗膜 3 次后, 加入二抗, 将其浓度稀释至 1:8 000, 洗脱二抗, ECL 发光显色。同时检测 β -actin 表达作为内参。拍照扫描后

Image J 图像分析软件进行灰度值分析, 计量以平均吸光度值 \times 面积来表示, 以 LC3 b/内参 β -actin 的灰度值比值作为相对表达量。

1.5 qRT-PCR 实验 同上述 CCK-8 分组, 将细胞接种于培养瓶中, 融合度为 80% 左右时同步化处理 24 h 后分别加入各处理因素(PDGF-BB 和 MEL, 浓度同 CCK-8)培养 48 h 后使用 TRIzol 试剂提取 HSCs 总 RNA, 用紫外分光光度法测定 RNA 水平, A₂₆₀/A₂₈₀ 鉴定 RNA 纯度。分别提取 1 μ g 总 RNA, 经 RNA 反转录酶催化合成 cDNA 第一链反转录体系: MgCl₂ 25 mmol/L 2.2 μ l, 10 \times PCR Buffer II 1.0 μ l, dNTP 10 mmol/L 2.0 μ l, Oligo(dt)18 50 μ mol/L 0.5 μ l, RNase Inhibitor 20 U/ μ l 0.25 μ l, RNase-free H₂O 1.85 μ l, 50 ng/ μ l RNA 2.0 μ l, 总体积 10 μ l。反转录条件: 25 °C 10 min, 48 °C 60 min, 95 °C 5 min, 以此为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增, PCR 反应系统采用 SYBRG, 按操作程序进行, 反应总体积为 20 μ l, 反应条件为 50 °C 120 s, 1 个循环; 95 °C 600 s, 1 个循环; 55 °C 15 s, 40 个循环。60 °C 60 s, 标记荧光, 得出各样本的初始拷贝数。所用引物序列为: LC3b, 上游 CCCAGACATCAGGGAGTAATGG, 下游 TCTATCGGATACTTCAGCGTCA; GAPDH, 上游 CGGAGTCAACGGATTTGGTCTGAT, 下游 AGCCTTC-TCCATGGTGGTGAAGAC; α -SMA, 上游 CCCAGACA-TCAGGGAGTAATGG, 下游 TCTATCGGATACTTCA-GCGTCA。实验过程中以 GAPDH 内参基因作为实时荧光 RT-PCR 的质控。每组样本一式 2 份, 在指数期内设定参数值, 得到每个 PCR 反应的循环域(cyclethreshold, Ct)值, 即模板 cDNA 经 PCR 扩增后达到某一荧光强度的循环次数。以每例细胞的目的片段与含内参抗体片段的 Ct 值作为该标本基因表达的相对数值, 以对照组的表达量为 100% 计算其余各组的表达量。

1.6 透射电镜观察 HSCs 的超微结构 同上述 CCK-8 分组, 将生长状态良好的 HSCs 均匀接种于 6 孔板中。融合度为 80% 左右时同步化处理 24 h 后分别加入各处理因素(PDGF-BB 和 MEL, 浓度同 CCK-8)培养 48 h。干预完成后, 各组细胞分别按细胞传代培养的方法将细胞制成细胞悬液。1 000 r/min 离心 5 min, 使细胞沉淀到离心管底部。弃掉上清液 PBS, 洗涤后加入 4% 多聚甲醛固定液固定 2 h。1 000 r/min 离心 5 min 沉淀细胞, 弃掉多聚甲醛固定液, 留取细胞沉淀。沿着离心管的壁用勾针轻轻的把离心沉淀的细胞团勾离管壁, 加入 1% 四

氧化钬进行处理。勾针轻轻取出细胞团,小心切成约 1 mm³ 的小块。脱水包埋浸透 4 h。对固化的细胞小块进行超薄切片,厚度 70 nm。枸橼酸铅染色。通过透射电镜(Talos L120C G2 美国赛默飞公司)观察 HSCs 超微结构,每组内每个样本挑选 3 个视野进行计数,以图片下方 2 μm 标尺为标准,统计每张图片内自噬溶酶体个数。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析。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 ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MEL 对 PDGF-BB 激活的 HSCs 细胞增殖的影响 结果显示:与对照组比较,PDGF-BB 促进模型组 HSCs 活化、增殖($P < 0.01$);与模型组比较,MEL 可以抑制 HSCs 增殖($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 MEL 对激活的 HSCs 增殖的影响 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	OD ₄₅₀	抑制率(%)	F 值	P 值
对照	1.727 ± 0.078	-		
模型	1.878 ± 0.065**	-		
MEL				
1.0 nmol/L	1.674 ± 0.040##	11.985		
1.0 μmol/L	1.407 ± 0.059##	31.787		
0.1 mmmol/L	1.307 ± 0.009##	39.196	143.4	<0.01

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

2.2 MEL 对 PDGF-BB 激活的 HSCs LC3b 蛋白的影响 Western blot 结果显示模型组 HSCs 中 LC3b 蛋白表达水平相对于对照组明显增加($P < 0.05$);相对于模型组,在 MEL 干预的处理组中,LC3b 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 MEL 对 PDGF-BB 激活的 HSCs α-SMA 蛋白的影响 Western blot 结果显示模型组 HSCs 中 α-SMA 蛋白表达水平相对于对照组明显增加($P < 0.05$);相对于模型组,在 MEL 干预的处理组中,α-SMA 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$; $P < 0.01$)。见图 2。

2.4 MEL 对 PDGF-BB 激活的 HSCs LC3b mRNA 表达水平的影响 qRT-PCR 结果显示模型组 HSCs 中 LC3b mRNA 表达水平相对于对照组显著增加($P < 0.01$);相对于模型组,在 MEL 干预的处理组中,LC3b mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$)。见图 3。

2.5 MEL 对 PDGF-BB 激活的 HSCs α-SMA mRNA

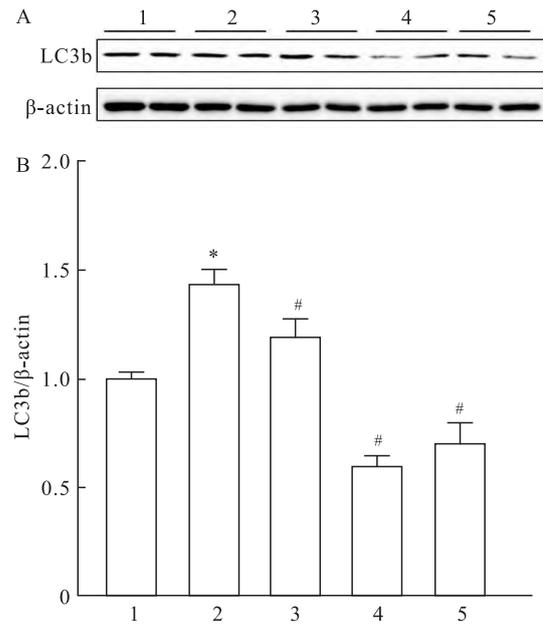


图 1 MEL 对 LC3b 蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 HSCs 中 LC3b 蛋白水平表达;B: 各组 HSCs 中 LC3b 蛋白的表达;1:对照组;2:模型组;3:MEL 低剂量组;4:MEL 中剂量组;5:MEL 高剂量组;与对照组比较:* $P < 0.05$;与模型组比较:## $P < 0.05$

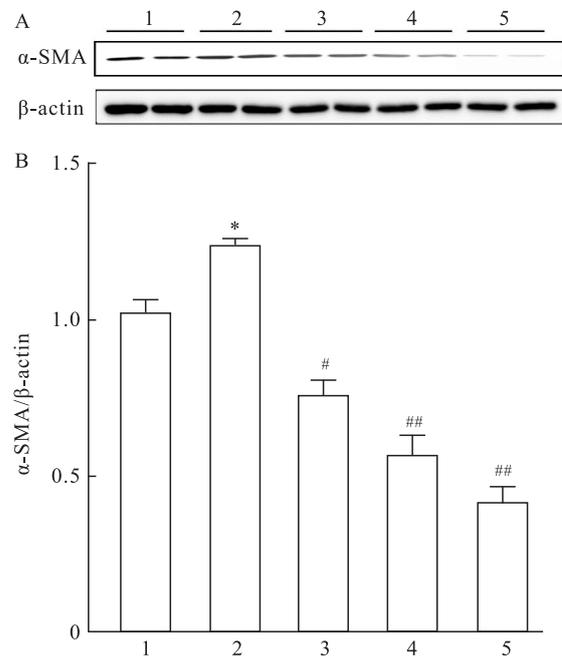


图 2 MEL 对 α-SMA 蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 HSCs 中 α-SMA 蛋白水平表达;B: 各组 HSCs 中 α-SMA 蛋白的表达;1:对照组;2:模型组;3:MEL 低剂量组;4:MEL 中剂量组;5:MEL 高剂量组;与对照组比较:* $P < 0.05$;与模型组比较:## $P < 0.05$,### $P < 0.01$

表达水平的影响 qRT-PCR 结果显示模型组 HSCs 中 α-SMA mRNA 表达水平相对于对照组明显增加

($P < 0.05$); 相对于模型组, 在 MEL 干预的处理组中 α -SMA mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。见图 4。

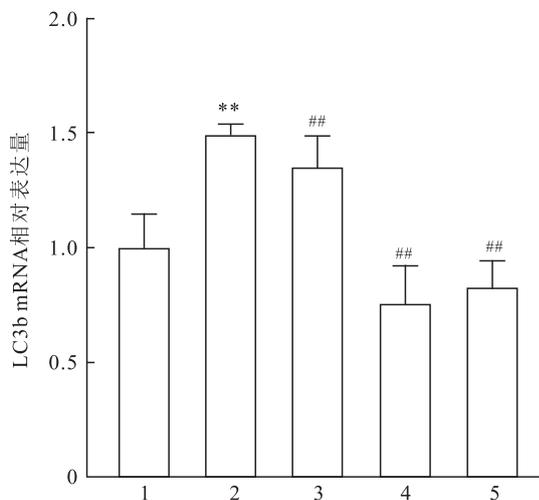


图3 MEL对LC3b mRNA表达的影响

1: 对照组; 2: 模型组; 3: MEL 低剂量组; 4: MEL 中剂量组; 5: MEL 高剂量组; 与对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

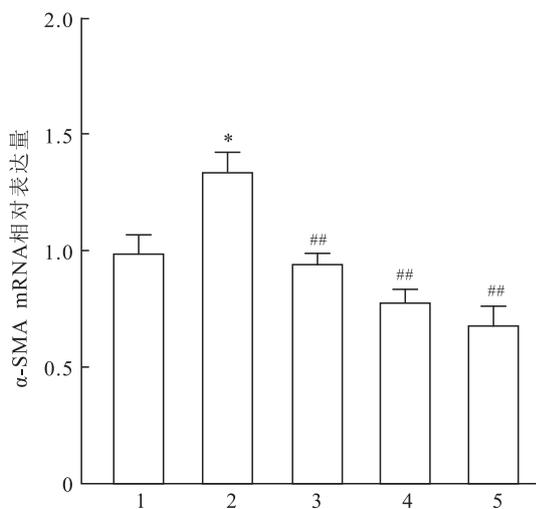


图4 MEL对 α -SMA mRNA表达的影响

1: 对照组; 2: 模型组; 3: MEL 低剂量组; 4: MEL 中剂量组; 5: MEL 高剂量组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

2.6 MEL对PDGF-BB激活的HSCs自噬溶酶体的影响 图5A双核膜结构清晰,核周隙正常,核内染色质未见明显凝集。胞质内可见少量自噬溶酶体。图5B双核膜结构清晰,核周隙正常,核内染色质未见凝集,胞质内可见大量自噬溶酶体。图5C双核膜结构清晰,核周隙正常,核内染色质可见轻度边集化。胞质内可见少量自噬溶酶体。图5D双核膜结构清晰,核周隙正常,核内染色质未见明显凝

集,胞质内自噬溶酶体数量显著降低。

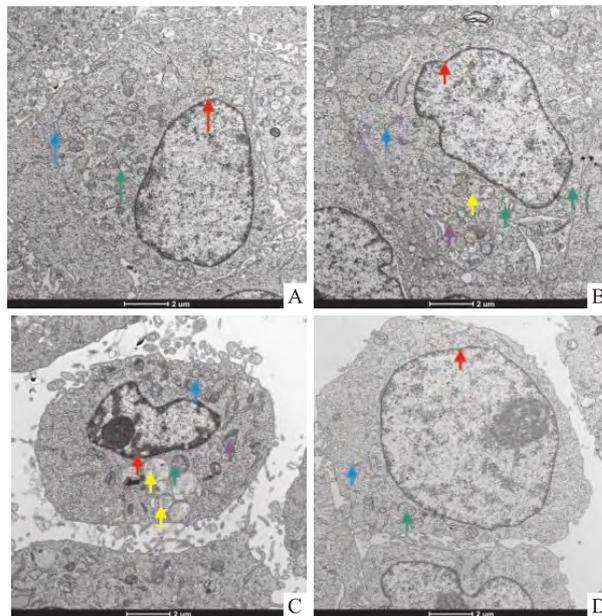


图5 各组HSCs超微结构 $\times 50\ 000$

A: 对照组; B: 模型组; C: MEL 中剂量组; D: MEL 高剂量组

透射电镜结果显示模型组HSCs中自噬溶酶体相对于对照组明显增加 ($P < 0.05$); 相对于模型组, 在 MEL ($1\ \mu\text{mol/L}$; $0.1\ \text{mmol/L}$) 干预的处理组中自噬溶酶体显著减少 ($P < 0.01$), 与模型组比较, MEL ($1\ \text{nmol/L}$) 差异无统计学意义。见图 6。

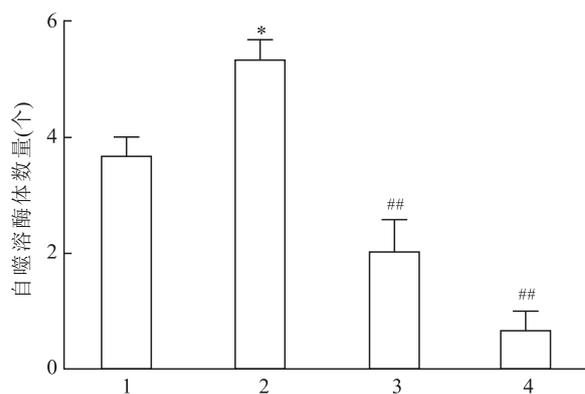


图6 MEL对自噬溶酶体数量表达的影响

1: 对照组; 2: 模型组; 3: MEL 中剂量组; 4: MEL 高剂量组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

肝纤维化是多种慢性肝病引起的病理过程,肝硬化是HF的最终结局,并伴随多种并发症及肝功能紊乱,具有很高的病死率^[6]。近年来,相关研

究^[7]表明, HF 甚至是早期肝硬化是可以逆转的。相关研究^[8]表明, HSCs 是 ECM 形成的主要来源, 且 HSCs 激活转化为肌成纤维细胞是 HF 发生发展的中心环节。HSCs 的激活伴有 NF- κ B 转录因子的激活及 cymb 基因表达增强, 而 cymb 蛋白可结合 α -SMA 基因调控区, 表达 α -SMA。所以 α -SMA 作为 HSCs 活化的主要标志物, 与 HSCs 活化的程度及数量呈正相关^[9]。CCK-8 实验目前是一种方便、快速和准确的细胞代谢活性评估工具, 可以用于定量评估细胞增殖和存活率。该实验采用 HSC-T6 进行体外培养, 用 PDGF-BB 激活 HSCs, 通过 CCK-8 和有关分子生物学实验, 从细胞和分子水平表明, HSCs 数量和活性明显增强, HSCs α -SMA 蛋白质、mRNA 表达水平明显增高, 说明 PDGF-BB 已活化 HSCs, 为后续实验提供了基础。

自噬是真核细胞中广泛存在的一种代谢过程。正常细胞中, 胞内衰老的细胞器及其他结构被自噬体吞噬并转运至线粒体进行 β 氧化, 提供能量。微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)/Atg8 是目前研究中被最广泛使用的分子标志物。它参与了自噬体膜的形成, 包括可相互转化的两种形式 LC3 I 和 LC3 II。新合成的 LC3 经过加工形成可溶形式的 LC3 I, 后者经过泛素化加工修饰, 与自噬体膜结合, 成为膜结合形式的 LC3 II^[10]。因而 LC3 II 的含量或者 LC3 II/LC3 I 的比例与自噬体的数量呈正相关, 在某种程度上反映了细胞的自噬活性。自噬的关键是自噬小体的形成, 在透射电镜观察到自噬小体结构是检测自噬的金标准。

研究^[1]表明, 自噬与 HF 发生发展有关, 但其与 HSCs 关系不甚清楚。正常情况下, HSCs 处于静息或者未激活状态, 胞质中聚集着包含视黄醇和三酰甘油的脂滴^[9]。当存在损伤因子的刺激时, HSCs 中的脂滴会被自噬过程所识别, 随之被溶酶体降解, 释放游离脂肪酸^[11], 后者为 HSCs 转化为肌成纤维细胞提供能量来源, 进而释放促纤维化因子, 如 α -SMA 和胶原蛋白^[4]。上述研究表明脂滴的降解与 HSCs 的激活有密切的关系。有体内研究^[12]表明, 抑制自噬可以引起脂滴在 HSCs 胞质内聚集, HSCs 处于沉默状态, 并且能减弱 HF。该实验结果显示, PDGF-BB 处理后活化的 HSCs LC3b 蛋白质、mRNA 表达水平明显增高, 初步说明 HSCs 自噬水平上调。进一步采用透射电镜对 PDGF-BB 激活的 HSCs 进行超微结构分析, 显示其自噬溶酶体数量显著增加,

提示 PDGF-BB 激活的 HSCs 自噬水平明显上调。

MEL 是一种具有多种生理功能的内源性激素, 特别是其抗氧化作用, 已被证明能够通过调节多条信号通路来抑制 HF 的发展, 包括影响 ECM 的合成和降解^[13]。该课题组前期体内实验^[6]表明 MEL 能抑制肝纤维化, 同时下调自噬水平。在此基础上, 该研究进一步探讨在 PDGF-BB 激活的 HSCs 中, MEL 抑制 HSCs 增殖与抑制自噬水平是否相关。该研究结果显示, PDGF-BB 处理的 HSCs 中, 细胞增殖和活性明显增强, α -SMA、LC3b 蛋白质、mRNA 表达明显增强, 细胞内自噬溶酶体数量明显增加, 说明 PDGF-BB 能活化 HSCs, 同时上调自噬水平, 而经 MEL 处理后, HSCs 增殖被抑制, 其内 α -SMA、LC3b 蛋白质、mRNA 表达水平明显下降, HSCs 内自噬溶酶体数量显著减少, 说明 MEL 能抑制 HSCs 活化且下调其自噬水平。因此, MEL 可以抑制 HSCs 的活化, 其机制可能与 MEL 下调 HSCs 的自噬水平相关, 这为治疗 HF 提供了新的临床思路。但该实验仅为初步研究, 有待于进一步深入研究。研究^[14]表明自噬参与 HF 的通路主要有 TGF- β 1/Smads 通路, P13K/AKT/mTOR 信号通路, RAF/MEK/ERK 信号通路, 但其确切的作用和功能机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈宵瑜, 杨长青. 肝纤维化发生机制研究新进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(1): 121-4.
- [2] Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 1-16.
- [3] 卢盛娟. 山芝麻酸甲酯对 PDGF-BB 刺激的肝星状细胞 ERK 信号通路的影响[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [4] Hung T M, Hsiao C C, Lin C W, et al. Complex cell type-specific roles of autophagy in liver fibrosis and cirrhosis[J]. Pathogens, 2020, 9(3): 225.
- [5] Maejima Y, Chen Y, Isobe M, et al. Recent progress in research on molecular mechanisms of autophagy in the heart[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 308(4): H259-68.
- [6] Jie L, Hong R, Zhang Y, et al. Melatonin alleviates liver fibrosis by inhibiting autophagy[J]. Curr Med Sci, 2022, 42(3): 498-504.
- [7] Wang Y Z, Zhang W, Wang Y H, et al. Repression of liver cirrhosis achieved by inhibitory effect of miR-454 on hepatic stellate cells activation and proliferation via Wnt10a[J]. J Biochem, 2019, 165(4): 361-7.
- [8] Ling L, Li G, Wang G, et al. Carvedilol improves liver cirrhosis in rats by inhibiting hepatic stellate cell activation, proliferation, invasion and collagen synthesis[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(2): 1605-12.
- [9] Liu Z, Mo H, Liu R, et al. Matrix stiffness modulates hepatic

- stellate cell activation into tumor-promoting myofibroblasts *via* E2F3-dependent signaling and regulates malignant progression [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(12):1134–45.
- [10] Hung T M, Huang Y J, Lin Y C, et al. A critical role of autophagy in regulating the mesenchymal transition of ductular cells in liver cirrhosis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1–12.
- [11] Mu M, Zuo S, Wu R M, et al. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation *via* inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 4107–15.
- [12] Wilhelm A, Aldridge V, Haldar D, et al. CD248/endothelin critically regulates hepatic stellate cell proliferation during chronic liver injury *via* a PDGF-regulated mechanism[J]. *Gut*, 2016, 65(7): 1175–85.
- [13] Choi H S, Kang J W, Lee S M. Melatonin attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis *via* inhibition of necroptosis [J]. *Transl Res*, 2015, 166(3): 292–303.
- [14] Wang H, Liu Y, Wang D, et al. The upstream pathway of mTOR-mediated autophagy in liver diseases [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1597.

Effects and mechanisms of melatonin on autophagy and inhibition of hepatic stellate cell proliferation

Chen Difei¹, Jie Lei¹, Huang Qiming¹, Xu Dexiang², Ren Xiaofei¹, Hong Rutao¹
 (¹*Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Disease of Anhui Province, Hefei 230022;* ²*Dept of Toxicology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anhui Province, Hefei 230032*)

Abstract *Objective* To investigate the effects of melatonin (MEL) on the proliferation of hepatic stellate cells (HSCs) induced by platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and explore its correlation with the regulation of autophagy levels. *Methods* The HSC-T6 cells were divided into the following groups: control group, model group and MEL (low, medium and high) treatment groups. After 24 hours culture, the cells adhered to the wall and were changed into serum-free DMEM medium to synchronize the cells to the G₀ stage. After 24 hours culture, all groups were given with PDGF-BB (10 ng/ml) excepted the control group. Besides, melatonin of different concentrations (1 nmol/L, 1 μ mol/L and 0.1 mmol/L) were added immediately in three treated groups. After incubated for 48 hours, the effect of MEL on the proliferation of hepatic stellate cells activated by PDGF-BB was detected by CCK-8 method. The protein expression levels of LC3b and α -SMA in hepatic stellate cells were determined by Western blot. The expression levels of LC3b mRNA and α -SMA mRNA in hepatic stellate cells were determined by qRT-PCR. The ultrastructure of HSCs was observed by transmission electron microscopy to understand the autophagy level. *Results* Compared with control group, PDGF-BB could induce the proliferation of HSCs ($P < 0.01$). Compared with model group, MEL inhibited the proliferation of HSCs activated by PDGF-BB ($P < 0.01$). Compared with the control group, LC3b and α -SMA protein expressions significantly increased in the model group (all $P < 0.05$), and LC3b mRNA and α -SMA mRNA expressions significantly increased in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, MEL could inhibit such effects (LC3b: $P < 0.05$, $P < 0.01$; α -SMA: $P < 0.01$). Transmission electron microscopy (TEM) showed that compared with the control group, autopolysome significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with model group, autopolysome significantly decreased in MEL treatment group ($P < 0.01$). *Conclusion* The up-regulation of autophagy level can promote the proliferation of hepatic stellate cells and the inhibition of hepatic stellate cell proliferation by MEL may be related to the down-regulation of autophagy level.

Key words melatonin; liver cirrhosis; hepatic stellate cells; autophagy; PDGF-BB