DOI: 10.22122/jims.v39i619.13838 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۱۹/هفته‌ی سوم خرداد ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۲۵ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۳/۲۱

بررسی اثر کلسترول بر فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF-β / Smad3C در سلول‌های ستاره‌ای کبد و نقش آن در پیشرفت فیبروژنز کبدی

رضا آفرین[۱]، حسین بابااحمدی رضایی[۲]، سید حمید یاقوتی[۳]، نرگس محمد تقوایی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: فیبروز کبدی، اغلب به فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبد (Hepatic stellate cells یا HSCs) و تشکیل بیش از حد زخم در کبد نسبت داده می‌شود؛ چرا که این سلول‌ها باعث تولید بیش از حد ماتریکس خارج سلولی می‌شوند. مراحل پیشرفته‌ی این بیماری، اغلب منجر به سیروز کبد و سرطان کبد می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی نقش کلسترول بر فعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبد انجام شد.

روش‌ها: سلول‌ها در محیط کشت Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) همراه با ۱۰ درصد از Fetal bovine serum (FBS) کشت داده شدند و با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از کلسترول به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس، میزان بیان ژن‌های Transforming growth factor beta (TGF-β) و Collagen1α و نیز سطح پروتئین Smad3C برای ارزیابی فیبروزکبدی مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان بیان ژن‌های TGF-β و Collagen1α در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلسترول نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت. همچنین، سطح پروتئین Smad3C پس از گذشت ۲ ساعت از تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار کلسترول، نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: کلسترول با افزایش سطح پروتئین Smad3C و فعال کردن مسیر سیگنالینگ TGF-β باعث افزایش پروتئین‌های اصلی درگیر در تولید ماتریکس خارج سلولی از جمله Collagen1α می‌شود. در نتیجه، کلسترول می‌تواند زمینه‌ی پیشرفت فیبروز کبدی را فراهم کند.

واژگان کلیدی: فیبروز کبدی؛ کلسترول؛ Transforming growth factor beta

ارجاع: آفرین رضا، بابااحمدی رضایی حسین، یاقوتی سید حمید، محمد تقوایی نرگس. **بررسی اثر کلسترول بر فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF- β / Smad3C در سلول‌های ستاره‌ای کبد و نقش آن در پیشرفت فیبروژنز کبدی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۱۹): ۲۱۸-۲۱۲.

مقدمه

بیماری فیبروز کبدی، یک پاسخ به بهبود زخم ناشی از آسیب مزمن کبدی است و با تجمع بسیار زیاد ماتریکس خارج سلول (Extra cellular matrix یا ECM) مشخص می‌شود. از علت‌های اصلی فیبروز کبدی، می‌توان به عفونت‌های ویروسی هپاتیت (از جمله هپاتیت B و هپاتیت C)، سوء مصرف الکل و بیماری‌های خود ایمنی و اختلالات متابولیک ارثی اشاره کرد (۲-۱). فیبروز کبدی، یک مرحله‌ی جدایی ناپذیر در توسعه‌ی بیماری‌های مزمن کبدی است و اغلب منجر به سیروز کبدی می‌شود. همچنین، می‌تواند با کارسینوم سلول‌های کبدی (Hepatocellular carcinoma یا HCC) و نارسایی کبدی همراه باشد (۳). بنابراین، شناسایی عوامل پرو فیبروتیک جدید که باعث پیشرفت فیبروز کبدی می‌شوند، بسیار مهم است. در روند فیبروژنز کبدی، فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبد (Hepatic stellate cells یا HSC) نقشی اساسی دارند (۴). HSCها توسط عوامل رشد (از جمله Platelet-drived growth factor یا PDGF و Transforming growth factor beta یا TGF-β)،

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

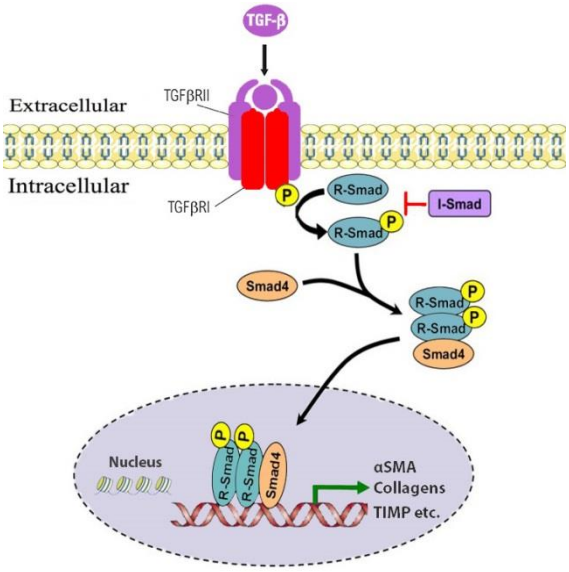
۲- استادیار، مرکزتحقیقات آترواسکلروزیس و گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات هایپرلیپیدمی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: نرگس محمد تقوایی؛ استادیار، مرکز تحقیقات هایپرلیپیدمی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
Email: ntaghvaiie@gmail.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

سیتوکین‌های التهابی (نظیر Interleukin 1 beta یا IL1β و Alpha tumor necrosis factor یا αTNF)، کموکاین‌ها و محصولات استرس اکسیداتیو فعال می‌شوند. سپس، HSCهای فعال شده، یک ماتریکس خارج سلولی در کبد تولید می‌کنند که با رسوب کلاژن، زمینه‌ی پیشرفت فیبروز کبدی فراهم می‌شود (۶-۵). در میان عوامل فعال کننده‌ی HSCها، سیتوکین TGF-β نقش اصلی را بازی می‌کند. TGF-β، یک سیتوکین پروفیبروتیک اصلی در کبد می‌باشد که با فعال‌سازی بیشتر سلول‌های ستاره‌ای کبد و تبدیل آن‌ها به میوفیبروبلاست، باعث افزایش بیان کلاژن نوع یک (بیشترین نوع کلاژن تولید شده در مراحل ابتدایی فیبروز کبدی) و تجمع بیش از اندازه‌ی ماتریکس خارج سلولی می‌شود (۸-۷). مسیر سیگنالینگ فعال شده توسط TGF-β به واسطه‌ی گیرنده‌ی نوع یک خود است. در سطح سلولی، TGF-β دارای دو نوع گیرنده‌ی غشایی نوع ۱ و ۲ (TβRI و TβRII) با فعالیت سرین ترئونین کینازی می‌باشد. به دنبال قرار گرفتن TGF-β بر روی TβRII، این گیرنده باعث فسفریله و فعال کردن TβRI می‌شود که این گیرنده نیز با فعالیت کینازی خود، Smad2/3 (Rsmad) را در ناحیه‌ی C ترمینالشان فسفریله می‌کند؛ به این ترتیب، Smad2/3 توانایی اتصال به Smad4 (Co-Smad) را برای تشکیل کمپلکس هترومریک Smad پیدا می‌کنند و در نهایت، برای رونویسی ژن‌هایی نظیر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن وارد هسته می‌شوند و به این ترتیب، سیتوکین TGF-β زمینه‌ی پیشرفت فیبروز کبدی را فراهم می‌کند (۹) (شکل ۱).



شکل ۱. نحوه‌ی فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ Transforming growth factor beta (TGF-β) TGF-β/Smad در سلول‌های ستاره‌ای کبد و نقش آن در پیشرفت فیبروژنز کبدی

به تازگی، مشاهده شده است که تجمع کلسترول آزاد در سلول‌های ستاره‌ای کبد، نقش مهمی در پاتوژنز فیبروز کبدی دارد و تجمع کلسترول، می‌تواند باعث فعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبد شود (۱۰). از طرفی، مشاهده شده است که تجمع کلسترول آزاد باعث حساسیت بیشتر سلول‌های ستاره‌ای کبد به TGF-β می‌شود (۱۱)، اما نقش کلسترول روی مسیر سیگنالینگ TGF-β به واسطه‌ی Rsmadها که می‌تواند باعث افزایش تولید و تجمع ماتریکس خارج سلولی شود، به طور کامل بررسی نشده است. از این رو، در این مطالعه، به بررسی نقش کلسترول بر بیان ژن‌های TGF-β، Collagen1α و مسیر سیگنالینگ Smad3C در سلول‌های ستاره‌ای کبد پرداخته شد.

روش‌ها

کشت و تیمار HSCها: مطالعه‌ی حاضر، با مجوز کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز (IR.AJUMS.MEDICINE.REC.1398.031) طراحی و انجام شد. در این مطالعه، کلسترول از شرکت Sigma، Fetal bovine serum (FBS) از شرکت Gibco، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین و محیط کشت Dulbecco's modification of Eagle medium (DMEM) از شرکت Bio-Idea خریداری شدند. در این مطالعه، از رده‌ی سلولی LX2 استفاده شد. این رده‌ی سلولی یک نوع از سلول‌های ستاره‌ای کبد انسان به صورت طبیعی و نامیرا (Immortalized human hepatic stellate cell) است. این رده‌ی سلولی، ویژگی‌های کلیدی سیگنالینگ سیتوکین‌ها، متابولیسم رتینوئید و فیبروژنز را حفظ می‌کند و این باعث می‌شود که این رده‌ی سلولی برای مطالعات مبتنی بر تشخیص و درمان فیبروز کبدی انسان بسیار مناسب باشد. از آن جایی که یکی از اهداف این مطالعه، سنجش میزان بیان عامل رشد TGF-β بود، به منظور جلوگیری از اثرات سایر عوامل رشد موجود در محیط کشت DMEM low glucose، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط Starvation قرار داده شدند. سپس، تیمار سلول‌ها با کلسترول به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. برای انجام آزمایش، دو گروه شاهد و مورد (تیمار با کلسترول) در نظر گرفته شد.

تکنیک MTT assay: به منظور بررسی اثر غلظت‌های متفاوت کلسترول بر میزان بقای رده‌ی سلولی LX2، در هر چاهک ظرف‌های ۹۶ خانه، حدود ۵۰۰۰ سلول از رده‌ی سلولی مورد نظر کشت و ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس، سلول‌های هر خانه با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار (۱۲) از کلسترول تیمار شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند. محیط سلول‌ها تعویض شد و ترکیب MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر

به سلول‌ها اضافه و برای ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس، محیط حاوی MTT حذف و برای حل شدن کریستال‌های فورمازان ۱۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) به هر چاهک اضافه شد. در نهایت، جذب نمونه‌ها در ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه Enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELISA reader) مشخص شد.

تکنیک Real-Time PCR: پس از جمع‌آوری سلول‌ها، توتال RNA با استفاده از کیت شرکت کیاژن (آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و با استفاده از دستگاه نانودراپ میزان جذب نوری (Optical density یا OD) طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ خوانش و عدد ۲/۱ به دست آمد. سپس، سنتز Complementary DNA (cDNA) از روی توتال RNA انجام شد. واکنش Real-time PCR برای سنجش میزان بیان ژن‌های TGF-β، Collagen1α با استفاده از کیت "RealQ Plus 2x Master Mix Green" low Rox (Ampliqon, Denmark) و با استفاده از دستگاه Applied Biosystems QuantStudio3 انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر می‌باشند که از شرکت سیناکلون (ایران) خریداری شدند.

توالی رفت ژن TGF-β

5'-GTGGACATCAACGGGTTCACT- 3'

توالی برگشت ژن TGF-β

5'-CTCCGTGGAGCTGAAGCAATA- 3'

توالی رفت ژن Collagen1α

5'-GGAATGAAGGGACACAGAGGTT- 3'

توالی برگشت ژن Collagen1α

5'-AGTAGCACCATCATTTCCACGA- 3'

توالی رفت ژن GAPDH

5'- GACAGTCAGCCGCATCTTCT - 3'

توالی برگشت ژن GAPDH

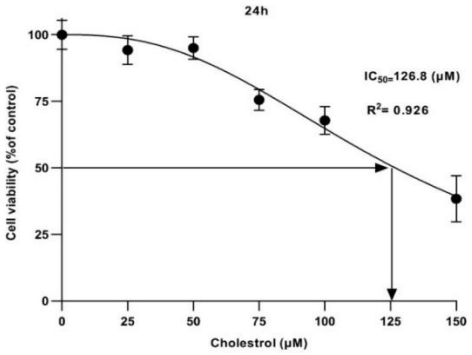
5'-GCCCAATACGACCAAATCCGT- 3'

تکنیک Western blotting: برای انجام تکنیک Western blot، ابتدا سلول‌ها روی یخ قرار داده شدند. سپس، سلول‌ها برای استخراج توتال پروتئین در بافر RIPA همراه با یک مهار کننده‌ی پروتئاز (Sigma Aldrich) تجزیه شدند. از روش Bicinchoninic acid assay (BCA) برای تعیین غلظت پروتئین‌ها استفاده شد. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌های پروتئینی (۳۰ میکروگرم در هر لاین) بر روی الکتروفورز ژل ۱۰ درصد Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) جدا شدند. الکتروفورز تحت شرایط ۱۳۰ ولت به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. سپس، انتقال پروتئین‌ها از ژل بر روی غشای Polyvinylidene fluoride or polyvinylidene difluoride (PVDF) (Millipore، ایالات متحده) تحت شرایط دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت انجام شد (۱۳). پس از انتقال، غشا به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در ۵ درصد شیر بدون چربی یا آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumin یا BSA) (برای پروتئین‌های فسفریله) در محلول نمکی بافر Tris با ۰/۱ درصد Tris-buffered saline with 0.1% Tween (TBST) مسدود شد و با آنتی‌بادی اولیه (۱:۱۰۰۰) در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در مدت یک شب انکوبه شدند. سپس، غشا سه بار در TBST شسته شد و با آنتی‌بادی ثانویه انکوبه شد (۱:۱۰۰۰۰). در نهایت با استفاده از معرف ECL، آشکارسازی باندها در دستگاه ChemiDoc انجام شد. برای محاسبه‌ی بیان هر پروتئین، از نرم‌افزار Image J استفاده شد.

واکاوی آماری: تمام آزمایش‌ها، سه بار تکرار شدند. داده‌های حاصل به صورت میانگین ± انحراف معیار و با استفاده از آزمون‌های ANOVA و Tukey به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism 9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

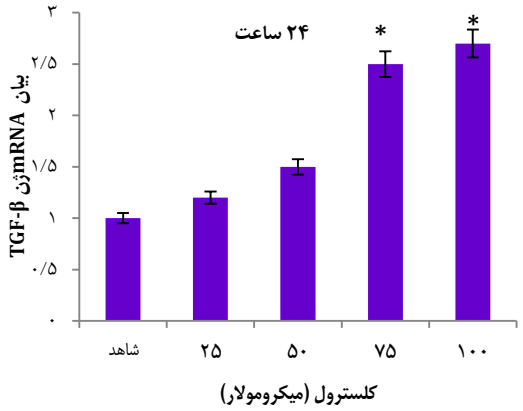
یافته‌ها

اثر کلسترول بر زنده ماندن سلول‌های ستاره‌ای کبد: به منظور دست‌یابی به غلظت های مناسب از کلسترول برای تیمار سلولی، آزمایش MTT در زمان ۲۴ ساعت انجام شد. بدین منظور، ابتدا سلول‌ها با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار از کلسترول تیمار شدند. در غلظت ۱۵۰ میکرومولار کلسترول، درصد بقای سلولی نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P < ۰/۰۰۱$). به همین دلیل، برای بررسی بیان ژن‌ها، غلظت‌های پایین‌تر IC50 مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲. نمودار نتایج میزان بقای سلول‌های ستاره‌ای کبد تیمار شده با غلظت‌های متفاوت کلسترول به مدت ۲۴ ساعت. میزان IC50 برابر ۱۲۶/۸ میکرومولار به دست آمد که نشان می‌دهد در غلظت‌های بالاتر از IC50، میزان بقای سلول‌های ستاره‌ای کبد به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. واکاوی نتایج با نرم‌افزار GraphPad Prism 9 انجام شد.

بیان mRNA ژن‌های TGF-β و Collagen1α در حضور کلسترول: به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های TGF-β و Collagen1α، سلول ها با غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از کلسترول به مدت ۲۴ ساعت تیمار و انکوبه شدند. نتایج حاصل از آنالیز تکنیک Real-Time PCR نشان داد که میزان بیان ژن های TGF-β و Collagen1α در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار از کلسترول نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نداشتند (P > ۰/۰۵۰)، اما در غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از کلسترول به صورت معنی‌داری افزایش بیان یافتند (P < ۰/۰۵۰) (شکل‌های ۳ و ۴).

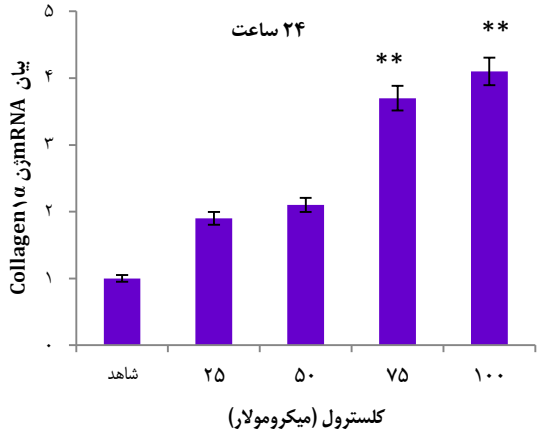


شکل ۳. بیان Messenger RNA (mRNA) ژن TGF- (Transforming growth factor beta) در حضور کلسترول در رده‌ی سلولی LX2: نتایج حاصل از سه بار تکرار به صورت میانگین ± انحراف معیار و تغییرات بیان mRNA ژن TGF-β در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد گزارش شده است. مطابق شکل، بیان ژن TGF-β در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلسترول نسبت به گروه شاهد، افزایش بیان معنی‌داری پیدا کرده است. P < ۰/۰۵۰ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. از ژن Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) به عنوان ژن مرجع استفاده شده است (*P < ۰/۰۵۰).

سطح پروتئین Smad3C در حضور کلسترول: به منظور دست‌یابی به زمان مناسب برای ارزیابی سطح فسفریلاسیون پروتئین Smad3C، تکنیک Western blot در زمان‌های متفاوت انجام شد و مشاهده گردید پس از گذشت ۲ ساعت از تیمار سلول ها با کلسترول (غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومولار)، بیشترین سطح افزایش فسفریلاسیون پروتئین Smad3C حاصل می‌شود (شکل ۵).

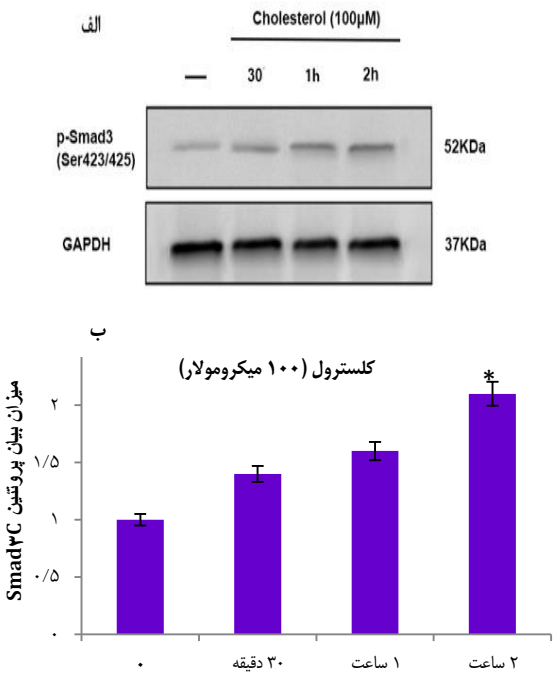
بحث

فیبروز کبدی که ناشی از آسیب هپاتوسیت‌ها و فعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبد است، یکی از عوامل مرگ و میر در بیماری‌های مزمن کبدی است (۱۴). در حال حاضر، بسیاری از مکانیسم‌ها و عوامل زمینه‌ساز فیبروز کبدی ناشناخته مانده است. بنابراین، شناخت مسیرهای مولکولی و عوامل جدیدی که می‌توانند زمینه ساز فیبروز کبدی شوند، بسیار حایز اهمیت است، تا امکان کشف راه‌های درمانی مؤثری برای فیبروز کبدی وجود داشته باشد.



شکل ۴. بیان Messenger RNA (mRNA) ژن Collagen1α در حضور کلسترول در رده‌ی سلولی LX2: نتایج حاصل از سه بار تکرار به صورت میانگین ± انحراف معیار و تغییرات بیان mRNA ژن Collagen1α در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد گزارش شده است. مطابق شکل بیان ژن Collagen1α در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلسترول نسبت به گروه شاهد، افزایش بیان معنی‌داری پیدا کرده است. P < ۰/۰۵۰ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. از ژن Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) به عنوان ژن مرجع استفاده شده است (P < ۰/۰۱۰).**

نتایج حاصل از این مطالعه، نشان داد که غلظت های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار از کلسترول، باعث مرگ بیش از نیمی ار سلول های ستاره‌ای در محیط کشت می‌شود و به همین دلیل، از غلظت‌های پایین تر از IC50 برای تیمار سلولی استفاده شد. همچنین، نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های TGF-β و Collagen1α در حضور غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از کلسترول در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد افزایش قابل توجهی داشته است که این افزایش بیان، به ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار کلسترول بسیار بیشتر بود. مطالعات نشان می دهند که مسیر سیگنالینگ TGF-β یکی از مهم ترین مسیرهای سیگنالینگ درگیر در پیشرفت و پاتوژنز بیماری فیبروز کبدی است (۱۶-۱۵) که با فعال شدن بیش از حد این مسیر سیگنالینگ، در نهایت منجر به تولید و تجمع بیش از حد ماتریکس خارج سلولی می شود و از این طریق، زمینه را برای پیشرفت بیماری فیبروز کبدی فراهم می‌کند (۱۶).



شکل ۵. اثر زمان‌های متفاوت بر سطح فسفریلاسیون پروتئین Smad3C القا شده با کلسترول (غلظت ۱۰۰ میکرومولار) در رده‌ی سلولی LX2: شکل الف- میزان بیان پروتئین Smad3C به صورت کیفی در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار کلسترول در زمان‌های متفاوت. شکل ب- افزایش نسبی بیان پروتئین Smad3C در حضورکلسترول. تجزیه و تحلیل باندها با استفاده ازآزمون‌های One-way ANOVA و Tukey انجام شد. نتایج حاصل از سه بار تکرار به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. P < ۰/۰۵۰ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. از پروتئین Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) به عنوان شاهد داخلی استفاده گردید (*P < ۰/۰۵۰).

TGF-β، یک عامل رشد پلیوتروپیک است که محدوده‌ی وسیعی از عملکردهای اساسی بیولوژیک شامل رشد سلول، تمایز، مهاجرت و آپوپتوز را تنظیم می‌کند. اختلال در مسیر سیگنالینگ آن، باعث بروز بیماری‌های مختلف مانند فیبروز کبدی و قلبی می‌شود (۱۷). از طرفی، مشاهده شده است که تجمع کلسترول آزاد در سلول های ستاره ای کبد، باعث افزایش سطح پروتئین TLR4 در غشا می‌شود. TLR4 در سلول‌های ستاره‌ای کبدی، بیان ژن پایین‌دست Bambi را تنظیم می‌کند (۱۸). با افزایش سیگنالینگ TLR4، بیان ژن Bambi کاهش می‌یابد و باعث افزایش حساسیت بیشتر سلول های ستاره ای شکل به TGF-β می شود و در نهایت، باعث افزایش سیگنالینگ TGF-β و تولید بیشتر ماتریکس خارج سلولی و پیشرفت فیبروز کبدی می‌شود (۱۹).

یک رژیم غذایی پرچرب حاوی کلسترول بالا، می‌تواند باعث التهاب کبد و زمینه‌ساز فیبروز کبدی شود (۱۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز مشخص گردید زمانی که سلول‌های ستاره‌ای کبد، در معرض غلظت‌های متفاوت از کلسترول قرار می‌گیرند، میزان بیان ژن‌های TGF-β و Collagen1α که از عوامل اصلی تولید و تجمع ماتریکس خارج سلولی می‌باشند، افزایش بیان معنی‌داری نسبت به گروه شاهد پیدا کردند. که این تولید بیش از حد ماتریکس خارج سلولی، نقش مهمی در پیشرفت و پاتوژنز بیماری فیبروز کبدی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کلسترول با افزایش سطح پروتئین Smad3C و فعال کردن مسیر سیگنالینگ TGF-β باعث افزایش پروتئین های اصلی درگیر در تولید ماتریکس خارج سلولی از جمله Collagen1α می‌شود. در نتیجه، کلسترول می‌تواند زمینه‌ی پیشرفت فیبروز کبدی را فراهم کند.

تشکر و قدردانی

نتایج گزارش شده در این مطالعه، حاصل طرح تحقیقاتی ثبت شده در دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز با شماره‌ی طرح HLRC-9804 می‌باشد. تمامی امور مربوط به اجرای این مطالعه، در مرکز تحقیقات هایپرلیپیدمی دانشکده‌ی پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز انجام شده است. از استادان محترم و کارشناسان دلسوزی که در انجام این طرح همکاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

References

1. Aydin MM, Akcali KC. Liver fibrosis. Turk J Gastroenterol 2018; 29(1): 14-21.
2. Dobie R, Wilson-Kanamori JR, Henderson BEP, Smith JR, Matchett KP, Portman JR, et al. Single-cell transcriptomics uncovers zonation of function in the mesenchyme during liver fibrosis. Cell Rep 2019; 29(7): 1832-47.
3. Alegre F, Pelegrin P, Feldstein AE. Inflammasomes in liver fibrosis. Semin Liver Dis 2017; 37(2): 119-27.
4. Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. Mol Aspects Med 2019; 65: 37-55.
5. Lim BJ, Lee WK, Lee HW, Lee KS, Kim JK, Chang HY, et al. Selective deletion of hepatocyte platelet-derived growth factor receptor alpha and development of liver fibrosis in mice. Cell Commun Signal 2018; 16(1): 93.
6. Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker AN. TGF-beta in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-updated 2019. Cells 2019; 8(11).

7. Li J, Wang Y, Ma M, Jiang S, Zhang X, Zhang Y, et al. Autocrine CTHRC1 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis by activating TGF-beta signaling. EBioMedicine 2019; 40: 43-55.
8. Altamirano-Barrera A, Barranco-Fragoso B, Mendez-Sanchez N. Management strategies for liver fibrosis. Ann Hepatol 2017; 16(1): 48-56.
9. Liu H, Dong F, Li G, Niu M, Zhang C, Han Y, et al. Liuweiwuling tablets attenuate BDL-induced hepatic fibrosis via modulation of TGF-beta/Smad and NF-kappaB signaling pathways. J Ethnopharmacol 2018; 210: 232-41.
10. Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, et al. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. Gastroenterology 2012; 142(1): 152-64.
11. Hou W, Syn WK. Role of metabolism in hepatic stellate cell activation and fibrogenesis. Front Cell Dev Biol 2018; 6: 150.
12. Lim SC, Parajuli KR, Duong HQ, Choi JE, Han SI. Cholesterol induces autophagic and apoptotic death in gastric carcinoma cells. Int J Oncol 2014; 44(3): 805-11.
13. Jiao YN, Wu LN, Xue D, Liu XJ, Tian ZH, Jiang ST, et al. Marsdenia tenacissima extract induces apoptosis and suppresses autophagy through ERK activation in lung cancer cells. Cancer Cell Int 2018; 18: 149.
14. Khomich O, Ivanov AV, Bartosch B. Metabolic hallmarks of hepatic stellate cells in liver fibrosis. Cells 2019; 9(1).
15. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-beta signaling in fibrosis. Growth Factors 2011; 29(5): 196-202.
16. Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. TGF-beta/SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis. J Histochem Cytochem 2016; 64(3): 157-67.
17. Piersma B, Bank RA, Boersema M. Signaling in fibrosis: TGF-beta, WNT, and YAP/TAZ converge. Front Med (Lausanne) 2015; 2: 59.
18. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, et al. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. Hepatology 2014; 59(1): 154-69.
19. Liu X, Hu H, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. Liver Int 2006; 26(1): 8-22.

DOI: *10.22122/jims.v39i619.13838* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 619, 3rd Week, June 2021**

Received: 24.01.2021 Accepted: 14.04.2021 Published: 19.06.2021

The Effect of Cholesterol on the Activation of TGF-β/Smad3C Signaling Pathway in Hepatic Stellate Cells and its role in the Progression of Liver Fibrogenesis

Reza Afarin[1], Hossein Babaahmadi-Rezaei[2], Seyed Hamid Yaghouti[3], Narges Mohammad-Taghvaei[3]

Original Article

Abstract

Background: Hepatic fibrosis is often attributed to activation of hepatic stellate cells (HSCs) and excessive scar formation in the liver. Because these cells overproduce extracellular matrix, the advanced stages of the disease often lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In this study, the role of cholesterol in the activation of hepatic stellate cells was investigated.

Methods: Cells were cultured in Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), and treated with 25, 50, 75, and 100 µM cholesterol concentrations for 24 hours. Then, gene expression transforming growth factor beta (TGF-β) and collagen1α, as well as Smad3C protein level were measured to assess liver fibrosis.

Findings: The expression of TGF-β and collagen1α genes increased significantly compared to the control group at 75 and 100 µM cholesterol concentrations. In addition, Smad3C protein level increased significantly compared to the control group after 4 hours of cell treatment with a concentration of 100 µM cholesterol.

Conclusion: Cholesterol increases the major proteins involved in the production of extracellular matrix, including collagen1α, by increasing the level of the Smad3C protein and activating the TGF-β signaling pathway. As a result, cholesterol can lead to the development of liver fibrosis.

Keywords: Liver fibrosis; Cholesterol; Transforming growth factor beta

Citation: Afarin R, Babaahmadi-Rezaei H, Yaghouti SH, Mohammad-Taghvaei N. **The Effect of Cholesterol on the Activation of TGF-β / Smad3C Signaling Pathway in Hepatic Stellate Cells and Its role in the Progression of Liver Fibrogenesis.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(619): 212-8.

1- MSc Student, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

2- Assistant Professor, Atherosclerosis Research Center AND Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

3- Assistant Professor, Hyperlipidemia Research Center AND Department of Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Narges Mohammad-Taghvaei, Assistant Professor, Hyperlipidemia Research Center AND Department of Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran; Email: ntaghvaiie@gmail.com