

بررسی اثر کلسترول بر فعال سازی مسیر سیگنالینگ TGF- β / Smad3C در سلول های ستاره ای کبد و نقش آن در پیشرفت فیبروز کبدی

رضا آفرین^۱، حسین باباحمدی رضایی^۲، سید حمید یاقوتی^۳، نرگس محمد تقوایی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: فیبروز کبدی، اغلب به فعال شدن سلول های ستاره ای کبد (HSCs یا Hepatic stellate cells) و تشکیل بیش از حد زخم در کبد نسبت داده می شود؛ چرا که این سلول ها باعث تولید بیش از حد ماتریکس خارج سلولی می شوند. مراحل پیشرفته ی این بیماری، اغلب منجر به سیروز کبد و سرطان کبد می شود. این مطالعه با هدف بررسی نقش کلسترول بر فعال سازی سلول های ستاره ای کبد انجام شد.

روش ها: سلول ها 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 غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از کلسترول به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس، میزان بیان ژن های Transforming growth factor beta (TGF- β) و Collagen 1 α و نیز سطح پروتئین Smad3C برای ارزیابی فیبروز کبدی مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: میزان بیان ژن های TGF- β و Collagen 1 α در غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلسترول نسبت به گروه شاهد به صورت معنی داری افزایش یافت. همچنین، سطح پروتئین Smad3C پس از گذشت ۲ ساعت از تیمار سلول ها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار کلسترول، نسبت به گروه شاهد به صورت معنی داری افزایش یافت.

نتیجه گیری: 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 Collagen 1 α می شود. در نتیجه، کلسترول می تواند زمینه ی پیشرفت فیبروز کبدی را فراهم کند.

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

ارجاع: آفرین رضا، باباحمدی رضایی حسین، یاقوتی سید حمید، محمد تقوایی نرگس. بررسی اثر کلسترول بر فعال سازی مسیر سیگنالینگ TGF- β / Smad3C در سلول های ستاره ای کبد و نقش آن در پیشرفت فیبروز کبدی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۱۹): ۲۱۸-۲۱۳.

اغلب منجر به سیروز کبدی می شود. همچنین، می تواند با کارسینوم سلول های کبدی (Hepatocellular carcinoma یا HCC) و نارسایی کبدی همراه باشد (۳). بنابراین، شناسایی عوامل پرو فیبروتیک جدید که باعث پیشرفت فیبروز کبدی می شوند، بسیار مهم است. در روند فیبروز کبدی، فعال شدن سلول های ستاره ای کبد (Hepatic stellate cells یا HSC) نقشی اساسی دارند (۴). HSC ها توسط عوامل رشد (از جمله Platelet-driven growth factor یا PDGF و Transforming growth factor beta یا TGF- β)،

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 می شود. از علت های اصلی فیبروز کبدی، می توان به عفونت های ویروسی هپاتیت (از جمله هپاتیت B و هپاتیت C)، سوء مصرف الکل و بیماری های خود ایمنی و اختلالات متابولیک ارثی اشاره کرد (۱-۲). فیبروز کبدی، یک مرحله ی جدایی ناپذیر در توسعه ی بیماری های مزمن کبدی است و

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات آنرواسکلروزیس و گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات هایپرلیپیدمی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

نویسنده ی مسؤل: نرگس محمد تقوایی؛ استادیار، مرکز تحقیقات هایپرلیپیدمی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
Email: ntghvaie@gmail.com

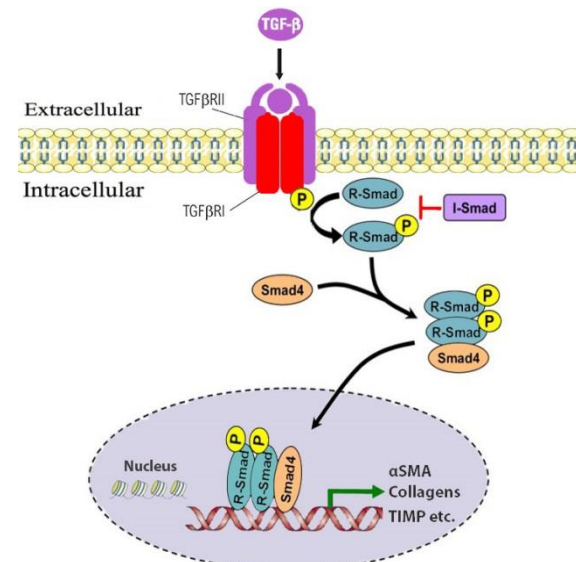
به تازگی، مشاهده شده است که تجمع کلسترول آزاد در سلول‌های ستاره‌ای کبد، نقش مهمی در پاتوژنز فیبروز کبدی دارد و تجمع کلسترول، می‌تواند باعث فعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبد شود (۱۰). از طرفی، مشاهده شده است که تجمع کلسترول آزاد باعث حساسیت بیشتر سلول‌های ستاره‌ای کبد به $TGF-\beta$ می‌شود (۱۱)، اما نقش کلسترول روی مسیر سیگنالینگ $TGF-\beta$ به واسطه $Rsmad$ ها 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 $TGF-\beta$ ، $Collagen1\alpha$ و مسیر سیگنالینگ $Smad3C$ در سلول‌های ستاره‌ای کبد پرداخته شد.

روش‌ها

کشت و تیمار HSCها: مطالعه‌ی حاضر، با مجوز کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جنیدی شاپور 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 ریتینوئید و فیبروز 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 $TGF-\beta$ 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

سیتوکین‌های التهابی (نظیر Interleukin 1 beta یا $IL1\beta$ 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 فعال‌کننده‌ی HSCها، سیتوکین $TGF-\beta$ نقش اصلی را بازی می‌کند. $TGF-\beta$ ، 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 $TGF-\beta$ به واسطه‌ی گیرنده‌ی نوع یک خود است. در سطح سلولی، $TGF-\beta$ دارای دو نوع گیرنده‌ی غشایی نوع ۱ و ۲ ($T\beta RI$ و $T\beta RII$) با فعالیت سرین ترئونین کینازی می‌باشد. به دنبال قرار گرفتن $TGF-\beta$ بر روی $T\beta RII$ ، این گیرنده باعث فسفریله و فعال کردن $T\beta RI$ 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 هترومیک Smad پیدا می‌کنند و در نهایت، برای رونویسی ژن‌هایی نظیر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن وارد هسته می‌شوند و به این ترتیب، سیتوکین $TGF-\beta$ زمینه‌ی پیشرفت فیبروز کبدی را فراهم می‌کند (۹) (شکل ۱).



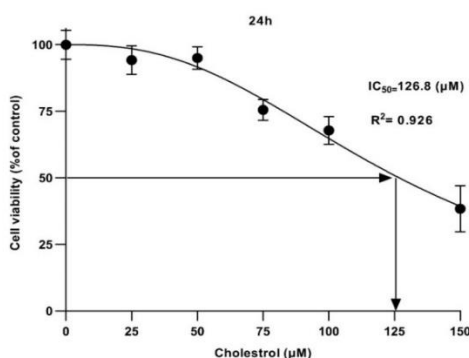
شکل ۱. نحوه‌ی فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ Transforming growth factor beta ($TGF-\beta$ /Smad) در سلول‌های ستاره‌ای کبد و نقش آن در پیشرفت فیبروز کبدی

(PVDF) (Millipore، ایالات متحده) تحت شرایط دمایی 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 (TBST) Tris-buffered saline with 0.1% Tween 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 \pm انحراف معیار و با استفاده از آزمون‌های ANOVA و Tukey به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism 9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر کلسترول بر زنده ماندن سلول‌های ستاره‌ای کبد: به منظور دستیابی به غلظت‌های مناسب از کلسترول برای تیمار سلولی، آزمایش MTT در زمان ۲۴ ساعت انجام شد. بدین منظور، ابتدا سلول‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومولار از کلسترول تیمار شدند. در غلظت ۱۵۰ میکرومولار کلسترول، درصد بقای سلولی نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P < 0/001$). 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.

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 ، Collagen1 α 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 Collagen1 α

5'-GGAATGAAGGGACACAGAGGTT- 3'

توالی برگشت ژن Collagen1 α

5'-AGTAGCACCATCATTTCCACGA- 3'

توالی رفت ژن GAPDH

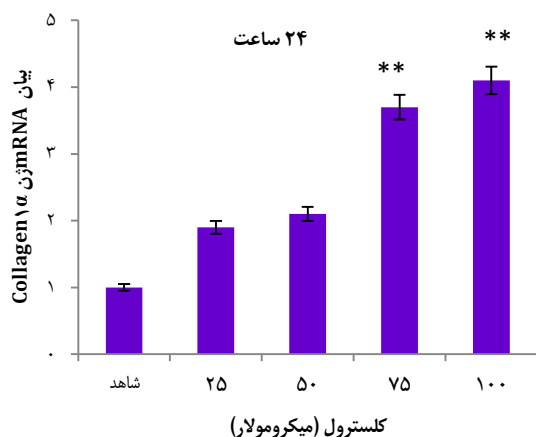
5'-GACAGTCAGCCGCATCTTCT- 3'

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 مهارکننده‌ی پروتئاز Bicinchoninic acid assay (Sigma Aldrich) تجزیه شدند. از روش (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

کبدی است (۱۴). در حال حاضر، بسیاری از مکانیسم‌ها و عوامل زمینه‌ساز فیروز کبدی ناشناخته مانده است. بنابراین، شناخت مسیرهای مولکولی و عوامل جدیدی که می‌توانند زمینه‌ساز فیروز کبدی شوند، بسیار حایز اهمیت است، تا امکان کشف راه‌های درمانی مؤثری برای فیروز کبدی وجود داشته باشد.

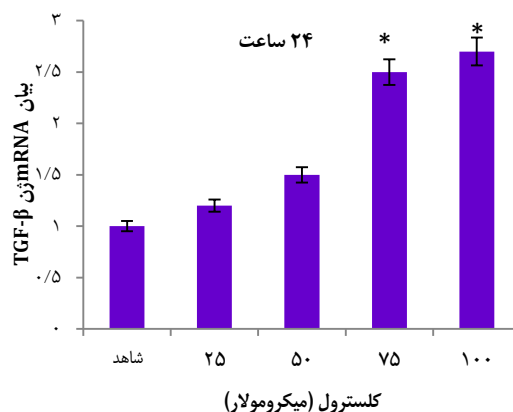


شکل ۴. بیان Messenger RNA (mRNA) $\alpha 1$ Collagen در حضور کلاسترول در رده‌ی سلولی LX2: نتایج حاصل از سه بار تکرار به صورت میانگین \pm انحراف معیار و تغییرات بیان mRNA $\alpha 1$ Collagen در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد گزارش شده است. مطابق شکل بیان $\alpha 1$ Collagen در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلاسترول نسبت به گروه شاهد، افزایش بیان معنی‌داری پیدا کرده است. $P < 0/050$ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. از $\alpha 1$ Glycerlaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) به عنوان ژن مرجع استفاده شده است ($P < 0/010$).

نتایج حاصل از این مطالعه، نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار از کلاسترول، باعث مرگ بیش از نیمی از سلول‌های ستاره‌ای در محیط کشت می‌شود و به همین دلیل، از غلظت‌های پایین‌تر از IC50 برای تیمار سلولی استفاده شد. همچنین، نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های $\alpha 1$ Collagen و β TGF در حضور غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از کلاسترول در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد افزایش قابل توجهی داشته است که این افزایش بیان، به ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار کلاسترول بسیار بیشتر بود. مطالعات نشان می‌دهند که مسیر سیگنالینگ β TGF یکی از مهم‌ترین مسیرهای سیگنالینگ درگیر در پیشرفت و پاتوژنز بیماری فیروز 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 می‌شود و از این طریق، زمینه را برای پیشرفت بیماری فیروز کبدی فراهم می‌کند (۱۶).

بیان mRNA ژن‌های β TGF و $\alpha 1$ Collagen در حضور

کلاسترول: به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های β TGF و $\alpha 1$ Collagen، سلول‌ها با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از کلاسترول به مدت ۲۴ ساعت تیمار و انکوبه شدند. نتایج حاصل از آنالیز تکنیک Real-Time PCR نشان داد که میزان بیان ژن‌های β TGF و $\alpha 1$ Collagen در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار از کلاسترول نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نداشتند ($P > 0/050$)، اما در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از کلاسترول به صورت معنی‌داری افزایش بیان یافتند ($P < 0/050$) (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۳. بیان Messenger RNA (mRNA) β TGF

(Transforming growth factor beta) در حضور کلاسترول در رده‌ی سلولی LX2: نتایج حاصل از سه بار تکرار به صورت میانگین \pm انحراف معیار و تغییرات بیان mRNA β TGF در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد گزارش شده است. مطابق شکل، بیان ژن β TGF در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلاسترول نسبت به گروه شاهد، افزایش بیان معنی‌داری پیدا کرده است. $P < 0/050$ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. از $\alpha 1$ Glycerlaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) به عنوان ژن مرجع استفاده شده است ($P < 0/050$).

سطح پروتئین Smad3C در حضور کلاسترول: 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 سلول‌ها با کلاسترول (غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومولار)، بیشترین سطح افزایش فسفریلاسیون پروتئین Smad3C حاصل می‌شود (شکل ۵).

بحث

فیروز کبدی که ناشی از آسیب هپاتوسیت‌ها و فعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبد است، یکی از عوامل مرگ و میر در بیماری‌های مزمن

مشاهده شده است که تجمع کلسترول آزاد در سلول‌های ستاره‌ای کبد، باعث افزایش سطح پروتئین TLR4 در غشا می‌شود. TLR4 در سلول‌های ستاره‌ای کبدی، بیان ژن پایین دست Bambi را تنظیم می‌کند (۱۸). با افزایش سیگنالینگ TLR4، بیان ژن Bambi کاهش می‌یابد و باعث افزایش حساسیت بیشتر سلول‌های ستاره‌ای شکل به TGF- β می‌شود و در نهایت، باعث افزایش سیگنالینگ TGF- β و تولید بیشتر ماتریکس خارج سلولی و پیشرفت فیبروز کبدی می‌شود (۱۹).

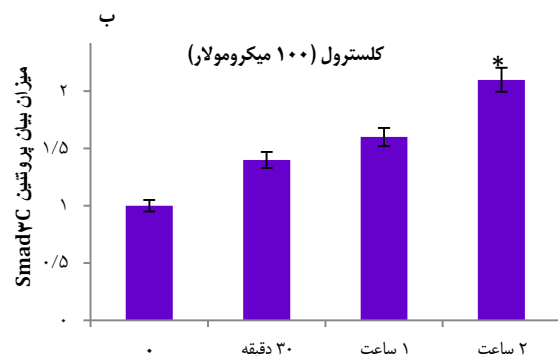
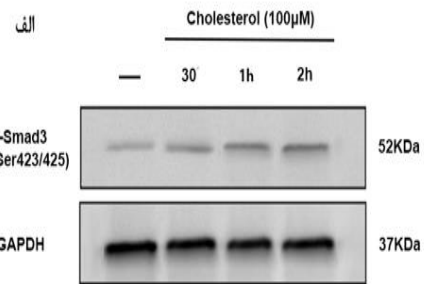
یک رژیم غذایی پرچرب حاوی کلسترول بالا، می‌تواند باعث التهاب کبد و زمینه‌ساز فیبروز کبدی شود (۱۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز مشخص گردید زمانی که سلول‌های ستاره‌ای کبدی، در معرض غلظت‌های متفاوت از کلسترول قرار می‌گیرند، میزان بیان ژن‌های TGF- β و Collagen1 α که از عوامل اصلی تولید و تجمع ماتریکس خارج سلولی می‌باشند، افزایش بی‌معنی‌داری نسبت به گروه شاهد پیدا کردند. که این تولید بیش از حد ماتریکس خارج سلولی، نقش مهمی در پیشرفت و پاتورژن 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 پروتئین‌های اصلی درگیر در تولید ماتریکس خارج سلولی از جمله Collagen1 α 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.



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 حضور کلسترول. تجزیه و تحلیل باندها با استفاده از آزمون‌های One-way ANOVA و Tukey انجام شد. نتایج حاصل از سه بار تکرار به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. $P < 0/050$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. از پروتئین Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) به عنوان شاهد داخلی استفاده گردید ($P < 0/050$).

TGF- β ، یک عامل رشد پلی‌تروپیک 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،

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.

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 Afarin¹, Hossein Babaahmadi-Rezaei², Seyed Hamid Yaghouti³,
Narges Mohammad-Taghvaei³

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 μ M cholesterol concentrations for 24 hours. Then, gene expression transforming growth factor beta (TGF- β) and collagen1 α , as well as Smad3C protein level were measured to assess liver fibrosis.

Findings: The expression of TGF- β and collagen1 α genes increased significantly compared to the control group at 75 and 100 μ M 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 μ M cholesterol.

Conclusion: Cholesterol increases the major proteins involved in the production of extracellular matrix, including collagen1 α , 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: ntaghvaei@gmail.com