

褪黑素抑制肝星状细胞增殖的机制研究

谢圆圆 洪汝涛 汪玉荣

摘要 目的 通过转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 激活肝星状细胞系(HSC-T6) 探讨褪黑素对活化的肝星状细胞系 HSC-T6 的抑制作用及相关机制。方法 肝星状细胞被分为 5 组, 分别为: 对照组、模型组和 3 个不同剂量实验组, 培养 24 h 贴壁后换用无血清培养基, 除对照组外均加入 TGF- $\beta 1$, 在实验组加入不同浓度的褪黑素, 培养 48 h 后, 通过 MTT 实验检测褪黑素对肝星状细胞增殖的影响, 通过细胞免疫组化方法检测褪黑素对肝星状细胞中 Smad 蛋白表达的影响。结果 与模型组相比, 实验组中肝星状细胞的增殖明显被抑制 ($P < 0.05$); TGF- $\beta 1$ 能明显刺激肝星状细胞中 Smad2/3 和 p-Smad2/3 的表达 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 实验组可以明显抑制 Smad2/3 和 p-Smad2/3 的表达 ($P < 0.05$)。结论 褪黑素可显著抑制肝星状细胞的增殖, 其作用机制可能与抑制 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路相关。

关键词 肝纤维化; 褪黑素; 肝星状细胞; 转化生长因子- β
中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1327-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.016

肝硬化是许多肝损伤的终末阶段, 最终可能并发门脉高压、肝衰竭, 甚至原发性肝癌; 细胞外基质的堆积和肝小叶的形成是肝硬化的特征。目前临床上除了肝移植, 没有更好的治疗方法, 而在肝纤维化阶段仍有逆转的可能^[1-3]。肝星状细胞是肝纤维化过程细胞外基质的主要来源。转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 是刺激肝星状细胞活化、增殖的主要细胞因子之一^[4]; 已有研究^[5-7]证实阻断 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路可以抑制肝星状细胞的增殖, 延缓肝纤维化的进展。

褪黑素主要是由松果体分泌的活性物质, 具有抗炎、抗氧化、抗纤维化等作用^[8]。有研究^[7,9]证实褪黑素有肝脏保护作用, 但具体作用机制仍需进一步探讨。本课题组前期研究^[10-11]结果显示褪黑素

对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化具有保护作用, 其作用机制可能与抑制 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路相关。该研究通过体外实验进一步研究褪黑素对肝纤维化的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与试剂 肝星状细胞系 (HSC-T6) (南京凯基生物科技发展有限公司); 褪黑素 (美国 Sigma 公司); TGF- $\beta 1$ (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 (合肥 Biosharp 公司); 免疫组化试剂盒、DAB 染色液 (北京中衫金桥生物技术有限公司); 抗 Smad2/3 抗体、抗 p-Smad2/3 抗体 (加拿大 Santa Cruz 公司); DMSO、BCA 试剂盒、胰酶消化酶、青霉素/链霉素 (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 细胞培养 HSC-T6 细胞培养基为 DMEM 中加入 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱内培养, 每 24 h 换液, 待细胞融合至 70% ~ 80% 时传代培养, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 细胞活力实验 褪黑素对肝星状细胞活力的影响使用 MTT 法来检测。HSC-T6 细胞经过消化后以每孔 $6 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$ 个/孔的浓度铺板在 96 孔板内, 按实验需求分为对照组和实验组 (1 nmol/L 组、1 μ mol/L 组、0.1 mmol/L 组和 1 mmol/L 组) 细胞培养 24 h 后换用无血清培养基, 实验组分别加入终浓度为 1 nmol/L, 1 μ mol/L, 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L 的褪黑素, 对照组加入等体积的 PBS, 药物孵育 48 h 后, 弃去上清液, 加 MTT (5 mg/ml) 孵育 4 h, 再弃去上清液, 加入 150 μ l 的 DMSO, 置于摇床上室温震荡 10 min 使 96 孔板内的结晶充分溶解, 酶标仪检测 490 nm 波长 96 孔板各孔的光密度 (optical density, OD) 值。

1.4 MTT 实验 取对数生长期 HSC-T6 细胞, 经消化后以 $5 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$ 个/孔的浓度铺板于 96 孔板内, 细胞分为 5 组: 对照组、模型组、实验组 (1 nmol/L 组、1 μ mol/L 组和 0.1 mmol/L 组), 于培养

2017-02-23 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: 谢圆圆, 女, 硕士研究生;

洪汝涛, 男, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hongrutao@163.com

箱内培养 24 h 后,换无血清培养基,除对照组外均加入 TGF-β1 (5 ng/ml),在实验组加入不同浓度的褪黑素 (1 nmol/L、1 μmol/L 和 0.1 mmol/L);置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱内培养 48 h,如上所示行 MTT 实验,酶标仪检测 490 nm 波长 96 孔板各孔的 OD 值。

1.5 细胞免疫组化法检测 将无菌盖玻片置于 24 孔板内,待 HSC-T6 细胞生长至对数生长期,经消化后以 1.5 × 10⁴ ~ 2 × 10⁴ 个/孔的浓度铺于 24 孔板内的盖玻片上,培养 24 h 后,按上述方式加入药物孵育 48 h,取出 24 孔板,用 PBS 洗 3 min × 3 次,用 95% 乙醇溶液室温固定 20 min, PBS 洗 3 min × 2 次,取出盖玻片置于载玻片上,0.3% Triton X-100 室温孵育 15 min, PBS 洗 3 min × 2 次,3% H₂O₂ 室温孵育 10 min; PBS 洗 3 min × 2 次;滴加一抗后 4 °C 孵育 16 ~ 18 h,次日严格按照免疫组化试剂盒和 DAB 试剂盒说明书进行二抗孵育及 DAB 显色,苏木精复染 15 s 后,中性树脂封片,显微镜下放大至 200 倍随机选取 6 个视野拍照,实验结果通过 Image-Pro Plus 分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,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 HSC-T6 细胞活力的影响 不同浓度的褪黑素作用于 HSC-T6, MTT 结果显示,只有当褪黑素浓度上升到 1 mmol/L,对照组与实验组相比差异有统计学意义 (P < 0.01),所以选择褪黑素浓度为 1 nmol/L、1 μmol/L 和 0.1 mmol/L 为后续实验组的用药浓度。见表 1。

表 1 细胞活力实验 (n = 4)

组别	OD ₄₉₀	抑制率 (%)	F 值	P 值
对照组 ($\bar{x} \pm s$)	0.410 ± 0.106	-	-	-
实验组 ($\bar{x} \pm s$)				
1.0 nmol/L	0.405 ± 0.046	1.18	-	1.000
1.0 μmol/L	0.385 ± 0.044	5.90	20.664	1.000
0.1 mmol/L	0.339 ± 0.071	17.30	-	0.684
1.0 mmol/L	0.125 ± 0.020**	69.56	-	0.000

与对照组比较: ** P < 0.01

2.2 褪黑素对 TGF-β1 激活的 HSC-T6 细胞的影响 MTT 结果显示,与对照组相比,单用 TGF-β1 激

活了肝星状细胞的增殖,差异有统计学意义 (P < 0.01);使用褪黑素后,与 TGF-β1 模型组相比,肝星状细胞的增殖被抑制,且随着褪黑素浓度的增加,这种抑制作用越显著 (P < 0.05)。褪黑素抑制 TGF-β1 诱导 HSC-T6 增殖达半数抑制率 (50% inhibition rate, IC₅₀) 的浓度约为 1.9 mmol/L。见表 2。

表 2 褪黑素对 TGF-β1 激活的 HSC-T6 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

组别	OD ₄₉₀	抑制率 (%)	F 值	P 值
对照组	0.215 ± 0.062	-	-	-
模型组 (5.0 ng/ml)	0.543 ± 0.097 ^{##}	-	-	0.000
实验组				
1.0 nmol/L	0.537 ± 0.020	1.08	23.808	0.887
1.0 μmol/L	0.530 ± 0.084	2.37	-	0.756
0.1 mmol/L	0.411 ± 0.065*	24.30	-	0.003

与对照组比较: ^{##} P < 0.01; 与模型组比较: * P < 0.05

2.3 褪黑素对 HSC-T6 细胞中 Smad2/3 和 p-Smad2/3 表达的影响 细胞免疫组化方差分析结果显示,各组中 Smad2/3 和 p-Smad2/3 表达差异有统计学意义 (F = 16.685、25.531, P < 0.05)。Smad2/3 蛋白的表达主要存在于细胞质内,少部分表达在细胞核内。与对照组相比,模型组中 Smad2/3 显著增加 (P < 0.01);实验组与模型组相比,Smad2/3 的表达显著减少 (P < 0.05)。p-Smad2/3 的主要表达在细胞核内。与对照组相比,模型组中 p-Smad2/3 也表现出增加的趋势 (P < 0.01);实验组与模型组相比, p-Smad2/3 的表达被显著抑制,且随着褪黑素浓度增加,抑制作用越明显 (P < 0.05)。见图 1、2。

3 讨论

目前推测肝纤维化是慢性肝损伤过程中的一个可逆阶段,如果不能逆转,则进一步进展为肝硬化,甚至原发性肝癌^[1-3]。细胞外基质的堆积是肝纤维化过程中重要机制,活化的肝星状细胞则是产生细胞外基质的主要来源^[4]。褪黑素具有很强的抗衰老、抗炎、抗氧化作用,有研究^[7-9]证实褪黑素对肝脏有保护作用,但其作用机制仍需进一步研究。本研究通过褪黑素干预 TGF-β1 激活的肝星状细胞,结果显示褪黑素可以抑制肝星状细胞的活化及增殖,其机制可能与抑制 TGF-β1/Smad 信号通路相关。

肝星状细胞是一种肝脏间质细胞,参与肝脏脂质代谢、细胞外基质的合成及分解等生理过程;在肝纤维化过程中,肝星状细胞则被激活并产生大量细胞外基质。目前一些研究将肝星状细胞作为抑制肝

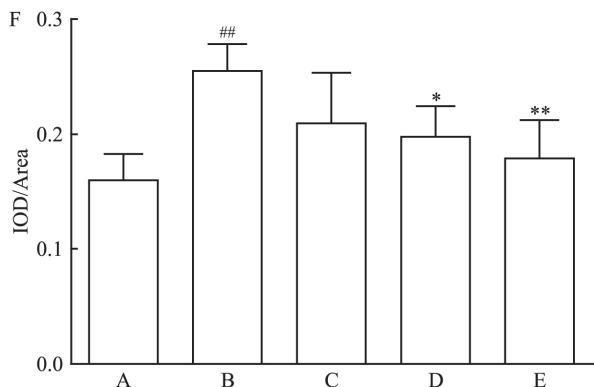
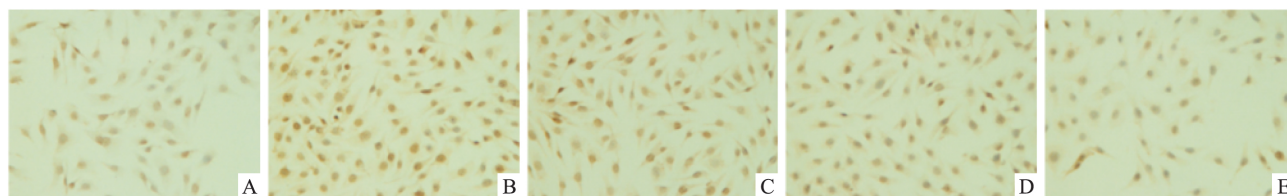


图1 褪黑素对 Smad2/3 表达的影响 ICC × 200 A: 对照组; B: 模型组; C: 褪黑素 1 nmol/L 组; D: 褪黑素 1 μmol/L 组; E: 褪黑素 0.1 mmol/L 组; F: 褪黑素对 Smad2/3 表达影响的统计学分析结果; 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

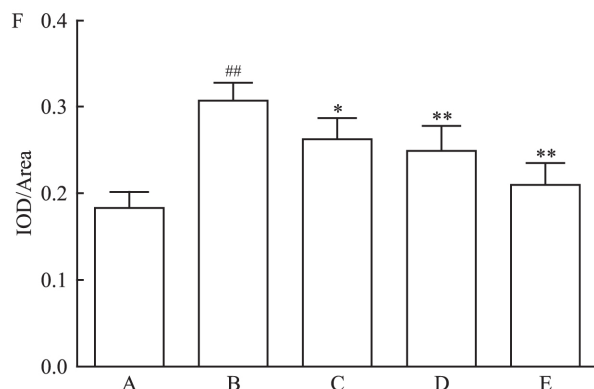
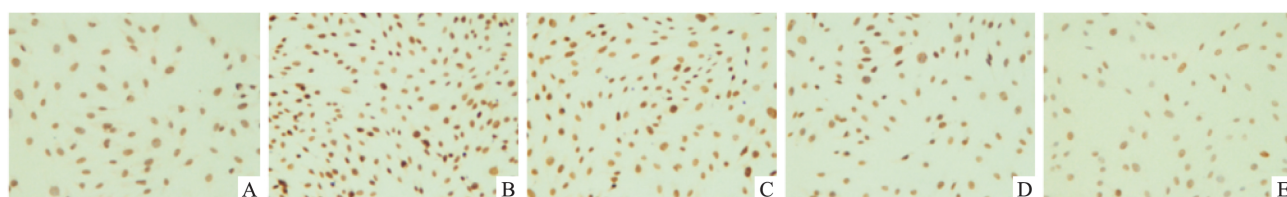


图2 褪黑素对 p-Smad2/3 表达的影响 ICC × 200 A: 对照组; B: 模型组; C: 褪黑素 1 nmol/L 组; D: 褪黑素 1 μmol/L 组; E: 褪黑素 0.1 mmol/L 组; F: 褪黑素对 p-Smad2/3 表达影响的统计学分析结果; 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

纤维化过程的靶点^[5]。HSC-T6 是由 Vogel et al^[12] 建立的永生化的大鼠肝星状细胞系,已广泛应用于肝脏脂质代谢及肝纤维化的体外研究,所以本实验选择该细胞系进行肝星状细胞体外实验。

Tahan et al^[13] 通过胆道结扎制造大鼠肝纤维化模型,经腹腔注射褪黑素后检测褪黑素对肝纤维化的作用,结果显示褪黑素有肝脏保护作用,其机制可能与其抗炎、抗氧化作用相关。Shajari et al^[14] 实验中提取了原代肝星状细胞,使用褪黑素 (10 μmol/L) 干预,结果显示褪黑素可以直接抑制肝星状细胞的活化和增殖。本研究参考了该实验中的褪黑素浓度,在细胞活力实验中,设置 4 个浓度褪黑素实验组,结果显示当褪黑素浓度增加至 1 mmol/L 可显著抑制肝星状细胞增殖,所以选择 1 nmol/L、1 μmol/L

和 0.1 mmol/L 作为后续实验中褪黑素的药物浓度。MTT 实验结果显示褪黑素可显著抑制活化状态的肝星状细胞,且随着褪黑素浓度的增加,抑制作用越强,表明褪黑素改善肝纤维化的作用可能与抑制肝星状细胞的活化及增殖相关,但具体作用机制尚需进一步探讨。

TGF-β1 是诱导肝星状细胞活化的主要细胞因子之一。在肝纤维化过程中,TGF-β1 和其受体的表达均有增加,故 TGF-β1 被用作肝星状细胞的激活剂。Ling et al^[5] 在研究肝星状细胞实验中使用 TGF-β1 (5 ng/ml) 制造活化的肝星状细胞模型,结果显示 TGF-β1 可明显增加肝星状细胞活化及增殖。这与本实验结果相似,本实验选择 TGF-β1 作为肝星状细胞的激活剂,结果显示 TGF-β1 可显著

激活 HSC-T6 细胞系的增殖,表明 TGF- β 1 参与肝星状细胞活化增殖的过程。

Smads 蛋白是介导细胞内 TGF- β 信号传导的主要蛋白家族。依据不同的结构和功能,Smads 蛋白可分为 3 组:Smad1、Smad2/3、Smad5 和 Smad8 为受体调控型,Smad4 为共同型,Smad6 和 Smad7 是抑制型。TGF- β 与细胞膜上受体结合后,受体调控型 Smad 磷酸化后与 Smad4 结合,转位到细胞核调控目的基因的表达^[15]。Crespo et al^[7] 使用四氯化碳制造小鼠肝纤维化模型,通过腹腔注射褪黑素研究其对小鼠肝纤维化的作用及其机制,结果显示褪黑素可以抑制肝星状细胞,改善肝纤维化,其作用机制可能与阻断 TGF- β 1/Smad 信号通路相关。关于褪黑素直接干预肝星状细胞、抑制其增殖活化的机制与 TGF- β 1/Smad 信号通路的关系,国内外文献鲜有报道。本研究通过体外实验进一步探讨褪黑素对肝脏保护作用的机制。免疫组化实验结果显示 TGF- β 1 可显著增加肝星状细胞中 Smad2/3 和 p-Smad2/3 的表达,而褪黑素可明显抑制 Smad2/3 和 p-Smad2/3 的表达发挥改善肝纤维化的作用。

综上所述,本实验通过体外肝星状细胞系 HSC-T6 相关实验显示褪黑素可明显抑制肝星状细胞的活化及增殖,推测褪黑素抑制肝星状细胞的作用可能与阻断 TGF- β 1/Smad 信号通路有关。这为药物治疗肝纤维化提供了新的思路。

参考文献

- [1] Lee U E, Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25(2):195-206.
- [2] Hernandez-Gea V, Friedman S L. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6:425-56.
- [3] Friedman S L. Hepatic fibrosis-Overview [J]. *Toxicology*, 2008,

254(3):120-9.

- [4] Puche J E, Saiman Y, Friedman S L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(4):1473-92.
- [5] Fang L, Huang C, Meng X, et al. TGF- β 1-elevated TRPM7 channel regulates collagen expression in hepatic stellate cells via TGF- β 1/Smad pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 280(2):335-44.
- [6] Tang L X, He R H, Yang G, et al. Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling *in vivo* and *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e31350.
- [7] Crespo I, San-Miguel B, Fernández A, et al. Melatonin limits the expression of profibrogenic genes and ameliorates the progression of hepatic fibrosis in mice [J]. *Transl Res*, 2015, 165(2):346-57.
- [8] Hu W, Ma Z, Jiang S, et al. Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis? [J]. *J Pineal Res*, 2016, 60(2):121-31.
- [9] 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.
- [10] 洪汝涛, 许建明, 沈继龙, 等. 褪黑素对大鼠肝纤维化的影响及部分机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(8):1141-5.
- [11] 汪玉荣, 洪汝涛, 谢圆圆. 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.
- [12] Vogel S, Piantedosi R, Frank J, et al. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism *in vitro* [J]. *J Lipid Res*, 2000, 41(6):882-93.
- [13] Tahan G, Akin H, Aydogan F, et al. Melatonin ameliorates liver fibrosis induced by bile-duct ligation in rats [J]. *Can J Surg*, 2010, 53(5):313-8.
- [14] Shajari S, Laliene A, Heegsma J, et al. Melatonin suppresses activation of hepatic stellate cells through ROR α -mediated inhibition of 5-lipoxygenase [J]. *J Pineal Res*, 2015, 59(3):391-401.
- [15] Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(23):2783-810.

The mechanism of melatonin attenuates activation of hepatic stellate cells

Xie Yuanyuan, Hong Rutao, Wang Yurong

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

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect of melatonin on TGF- β 1-stimulated HSC-T6 cells and its underling mechanism. **Methods** The HSC-T6 cells were divided into five groups: control group, model group and three experimental groups. After being cultured for 24 h, they were replaced with FBS-free medium and treated with transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1, 5 ng/ml) excepted the control group, and melatonin was added immediately with different concentrations (1 nmol/L, 1 μ mol/L, 0.1 mmol/L) in three experimental groups. After drugs incubation for 48 h, MTT assay was performed to assess the cell proliferation, immunocytochemistry were

大鼠 ALPPS 术后残肝再生与 Wnt2 蛋白表达关系的研究

刘伟伟¹ 余 锋² 刘 洪² 李福利² 柏 杨² 罗昆仑^{1,2}

摘要 目的 探讨大鼠联合肝脏分割和门静脉结扎分阶段肝切除术(ALPPS)后残余肝再生 Wnt2 蛋白的表达变化,进一步了解肝再生过程中的分子机制。方法 选取 200~240 g 健康 SD 雄性大鼠 40 只,随机分为 ALPPS 组和假手术(Sham)组;Sham 组仅游离出门静脉各分支,不结扎即关腹;ALPPS 组行大鼠肝左外叶、左中叶、右叶门静脉分支结扎,切除尾状叶,保留肝右中叶分支,并行肝中叶实质离断。分别于术后 1、2、4、7 d 处死 5 只大鼠,称取大鼠肝右中叶重量,计算肝再生率;光学显微镜下观察肝右中叶细胞的形态学变化,免疫组化法检测肝右中叶 Ki-67 和 Wnt2 蛋白表达变化,并进行统计分析。结果 ① ALPPS 术后保留侧肝脏开始再生,第 2 天肝再生率升高最快,随后肝再生率升高速度逐渐降低,第 7 天与 Sham 组相比肝再生率升高速度两者相近;② ALPPS 术后 Ki-67 与 Sham 组比较,第 1 天开始升高,第 2 天达到最高,此后逐渐降低,第 7 天有少量阳性细胞,与 Sham 组相比差异无统计学意义;③ Wnt2 阳性表达主要在中央静脉周围,可能与肝干细胞的产生相关;与 Sham 组相比,肝右中叶 Wnt2 蛋白在 ALPPS 术后第 1 天即开始升高,第 2 天达到最高,然后逐渐降低,第 7 天时仅有少量表达,与 Sham 组相比差异无统计学意义;④ 大鼠肝脏 ALPPS 术后 Wnt2 的表达与术后 Ki-67 的表达呈正相关性。结论 Wnt2 在 ALPPS 术后肝脏再生及肝干细胞表达过程中起重要的调控作用。

关键词 肝再生;ALPPS;Wnt2

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1331-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.017

2017-02-23 接收

基金项目:南京军区医学科技创新课题重点资助项目(编号:14D05)

作者单位:¹安徽医科大学无锡临床学院肝胆外科,无锡 214044

²中国人民解放军第一〇一医院肝胆外科,无锡 214044

作者简介:刘伟伟,男,硕士研究生;

罗昆仑,男,博士,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:lk1197041@163.com

Wnt 蛋白通过传递细胞间相互信息,对控制细胞生长、增殖起着关键作用。有研究^[1]证明,干细胞和细胞外基质的相互作用需要 Wnt 信号途径的参与。近年来有研究^[2]显示有分泌性蛋白 Wnt 覆盖的肝细胞就是肝干细胞;同时该报道称发现了位于中央静脉周围的干细胞,而且肝干细胞需要 Wnt 信号以维持其干细胞的身份;如果干细胞迁移后不在 Wnt 信号的覆盖范围内,其便失去了分裂成新肝细胞的能力,开始发展为成熟的肝细胞。Wnt 是否在肝再生及肝干细胞中发挥重要作用,目前文献报道尚少。该研究通过建立联合肝脏分割和门静脉结扎分阶段肝切除术(associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy,ALPPS)动物实验模型,研究 Wnt2 蛋白在大鼠 ALPPS 术后肝再生过程中的表达变化及其与肝干细胞的关系。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型的制备 第一阶段选取雄性 SD 大鼠 20 只,进行大鼠肝脏解剖学习及 ALPPS 手术训练;第二阶段:雄性 SD 大鼠 40 只,200~240 g,由江苏省血吸虫病防治研究所提供。动物在控制温度、湿度及 12 h 照明与 12 h 黑暗交替的环境中饲养,并允许随时自由食用固定标准饲料和清水。实验大鼠随机分为两组:① ALPPS 组:20 只;② 假手术(Sham)组:20 只。每个组又随机分为 4 个亚组,每组 5 只,分别为 1 d 组、2 d 组、4 d 组、7 d 组。实验所用外科手术器械由中国人民解放军第 101 医院提供。所有大鼠采用 10% 水合氯醛 3.0~3.5 ml/100 g 体重,腹腔注射麻醉;由正中纵切口入腹腔。Sham 组:仅游离出门静脉分支不结扎即关腹。AL-

used to assess the expression levels of Smad2/3, p-Smad2/3. **Results** Melatonin could significantly inhibited cells proliferation simulating with TGF- β 1 ($P < 0.05$). The expression of Smad2/3 and p-Smad2/3 in TGF- β 1-treated group were dramatically elevated compared to the control group ($P < 0.01$). After being added with different concentrations of melatonin, the expression of Smad2/3 and p-Smad2/3 were strongly attenuated compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Melatonin significantly mitigates HSCs' activation, which might be related to TGF- β 1/Smad signaling pathway.

Key words hepatic fibrosis; melatonin; hepatic stellate cells; TGF- β