

Защитное действие фукоидана *Fucus vesiculosus* на фиброз печени через опосредованное TGF- β 1 / Smad ингибирование внеклеточного матрикса и аутофагии

12.02.2016

Protective effect of fucoidan from *Fucus vesiculosus* on liver fibrosis via the TGF- β 1/Smad pathway-mediated inhibition of extracellular matrix and autophagy

Источник: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4758785/>

Фиброз печени — динамический обратимый патологический процесс в развитии хронического заболевания печени до цирроза. Тем не менее, текущие методы лечения не назначаются в течение длительного времени из-за их различных побочных эффектов. Аутофагия инициируется для разложения поврежденных или лишних органелл, которые, как было установлено, изменяют развитие фиброза печени. В этой статье мы предположили, что фукоидан *Fucus vesiculosus* может ослаблять фиброз печени у мышей путем ингибирования внеклеточного матрикса и аутофагии в моделях фиброза печени, индуцированных лигандами на основе тетрахлорметана и желчного протока. Результаты определяли с использованием ферментно-связанного иммуносорбентного анализа, количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, Вестерн-блоттинга и иммуногистохимического окрашивания. Фукоидан из *F. vesiculosus* может ингибировать активацию клеток гепатоцеллюлозы и образование внеклеточного матрикса и аутофагосом, а его эффект может быть связан с подавлением трансформирующего фактора роста бета 1 / Smads. Фукоидан, как аутофагия и трансформирующий ингибитор роста бета 1, может быть перспективным потенциальным терапевтическим агентом для фиброза печени.

Фиброз печени, динамический обратимый патологический процесс, который может вызвать хроническое заболевание печени в циррозе (главным образом, при внутричерепной фиброзной дисплазии), приводит к получению и осаждению внеклеточного матрикса (ЕСМ) и дисбалансу между синтезом и деградацией. Приблизительно 70 % пациентов с хроническим заболеванием печени связаны с фиброзом печени. Если процесс не прекращается, 25% ухудшатся до декомпенсированного цирроза, сопровождающегося кровоизлиянием в желудочно-кишечном тракте, печеночной энцефалопатией и гепаторенальным синдромом.²⁻⁴ Современные методы лечения фиброза печени включают противовирусные, антиоксидантные и иммунорегуляторные терапии, которые не являются в связи с их различными побочными эффектами.^{5,6} Поэтому безопасный и эффективный скрининг препаратов, используемых для борьбы с фиброзом печени, играет важную роль в профилактике цирроза и гепатомы.

Печеночный ЕСМ содержит биологически активные вещества. В нормальных физиологических условиях ЕСМ обеспечивает питание и участвует в иммунном ответе. При стимуляции различными цитокинами ЕСМ развивается на фиброз печени из-за синтеза его компонентов, включая коллаген I, фибронектин, ламинин (LN) и гиалуроновую кислоту, или снижение деградации, вызванное дисбалансом между матричными металлопротеиназами (ММР) и тканевым ингибитором матричных металлопротеиназ (ТИМП) .^{7,8} Ряд исследований показал, что активация и пролиферация печеночных звездчатых клеток (HSCs) являются ключевыми моментами в производстве

ECM и включают участие других клеток, таких как эндотелиальные клетки печеночного синуса, Клетки Купфера, нейтрофилы, Т-клетки и естественные киллерные клетки.^{1,7,9,10} HSCs дифференцируются в миофибробласты (MFB) с обильным продуцированием α -гладкомышечного актина (α -SMA) и ECM после повреждения печени, в конечном итоге что приводит к фиброзу печени.¹¹ Связанные сигнальные пути, которые влияют друг на друга в этом процессе, в основном включают трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), тромбоцитарный фактор роста, Wnt / β -catenin, T oll-подобный рецептор и другие важные пути.^{7,12} Установление моделей на животных, имитирующих патогенный механизм, всегда было трудным, и обычно используемые лекарственные средства, которые вызывают фиброз печени, включают четыреххлористый углерод (CCl₄) и диметилнитрозамин. Другая модель фиброза печени индуцируется холестазом посредством операции с лигированием желчных протоков (BDL).¹³⁻¹⁵ CCl₄ может приводить к дегенерации и некрозу печеночных клеток путем непосредственного растворения мембран клеток печени для инициирования перекисного окисления липидов, что аналогично фиброзу печени человека в морфологии и патофизиологии.¹⁶ Модель индуцированного CCl₄ фиброза печени широко используется из-за ее устойчивых патологических характеристик и хорошей повторяемости, тогда как вызванное BDL заболевание сходно биохимическим и гистологическим изменениям в небольшом узловом циррозе человека.¹⁷ Эти две модели животных были совместно приняты в настоящем исследовании для проведения скрининга наркотиков на фиброз печени.

Аутофагия, определяемая Эшфордом и Портером¹⁸ с использованием электронного микроскопа при наблюдении за клетками печени человека, представляет собой естественный физиологический процесс, в котором разрушаются поврежденные или избыточные органеллы, позволяющие синтезировать новые органеллы в отсутствие питательных веществ и энергии.¹⁸⁻²¹ Запрограммированная гибель клеток играет существенную роль в остром повреждении печени, реперфузии ишемии и других системных заболеваниях; тем не менее, было проведено меньше исследований по фиброзу печени.²²⁻²⁷ В последние годы многочисленные исследования показали, что аутофагия может изменить прогрессию фиброза печени. Hernandez-Gea и др. Обнаружили, что клетки получили энергию для подачи материалов для активации HSC после липидного аутофагического разложения.²⁸ Лю и др. Показали, что ингибитор 3-метиладенина аутофагии влияет на пролиферацию и активацию HSCs для облегчения фиброза.²⁹ Поэтому аутофагия может рассматриваться как мишень в профилактике фиброза печени. Сообщалось, что фукоидан, полисахарид, извлеченный из коричневых водорослей, обладает многими преимуществами, такими как противовоспалительная и противоопухолевая активность, и он влияет на окислительный стресс и сосудистую физиологию.³⁰⁻³² В 2008 году Hayashi et al.³³ продемонстрировал защитный эффект фукоидана на CCl₄-индуцированный фиброз печени, в то время как Hong et al.¹⁵ сообщали, что фукоидан может защитить от фиброгенеза печени, вызванного диметилнитрозамином, за счет ингибирования окислительного стресса и высвобождения воспалительных цитокинов.^{13,15} Однако неясно, может ли фукоидан улучшать CCl₄- и BDL-индуцированные фиброз печени как препарат, нацеливающий аутофагию, и его связь с тропом TGF- β / Smad неизвестна.

В настоящем исследовании мы предположили, что фукоидан *Fucus vesiculosus* может ослаблять фиброз печени у мышей путем ингибирования ECM и аутофагии в CCl₄- и BDL-индуцированных животных моделях фиброза печени. Был также исследован потенциальный механизм действия фукоидана.

Мужские мыши C57 весом 20-22 г были приобретены у Shanghai Laboratory Animal Co., Ltd. (Шанхай, Китайская Народная Республика). Все животные помещали в кондиционируемом помещении при температуре 25 ° C с 12-часовым чередованием света и темного цикла и допускали свободный доступ к пище и воде. В моделях фиброза печени мышам вводили внутривентриально 1 мл / кг массы тела CCl₄ (1:10 по объему, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, США) в оливковом масле дважды в неделю в течение 8 недель. 33 Фукоидан (Sigma-Aldrich Co.) разбавляли в физиологическом растворе и вводили перорально в суточных дозах 10 мг / кг, 25 мг / кг и 50 мг / кг один раз в день. В BDL-индуцированном фиброзе печени все мыши анестезировали 1,25% Nembutal (Sigma-Aldrich Co.) после 24-часового голодания. Когда исчезновение отражения и болевого возбуждения исчезло, брюшная полость открылась вдоль линии альба. Для выявления диафрагмы и пупочной области использовали мокрый тампон и отделяли их от желчного протока, фланцевой воротной вены и печеночной артерии. Желчный проток лигировали двумя хирургическими узлами, используя шов 5-0 и разрезали между двумя узлами.

Брюшную полость промывали физиологическим раствором, а два абдоминальных слоя и кожу закрывали. 17 Мышей кормили в теплой и влажной среде до полного бодрствования, активного и обрабатывали и без наркотиков в течение 2 недель. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с правовыми нормами и одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Университета Шанхая Тунцзи. Сыворотка и ткани печени были получены для следующих определений:

Мышей с индуцированным CCl₄ фиброзом печени случайным образом делили на шесть групп (восемь мышей на группу) следующим образом:

группа контроля (CCl₄): физиологический раствор через зонд;

группа фукоидана (CCl₄): фукоидан (50 мг / кг) ежедневно через желудочный зонд;

CCl₄ группа: CCl₄ вводили внутривентриально;

CCl₄ + фукоидан (10): CCl₄ инъецировали внутривентриально фукоиданом (10 мг / кг) ежедневно через желудочный зонд;

CCl₄ + фукоидан (25): CCl₄ инъецировали внутривентриально фукоиданом (25 мг / кг) ежедневно через желудочный зонд; а также

CCl₄ + фукоидан (50): CCl₄ вводили внутривентриально фукоиданом (50 мг / кг) ежедневно через желудочный зонд.

Мышей с фибрином печени, индуцированных BDL, случайным образом делят на группы, описанные ранее, включая группу контроля (BDL), группу фукоидана (BDL), группу BDL, группу BDL + фукоидан (10), группу BDL + фукоидан (25) и BDL + фукоидан (50) (восемь мышей на группу).

Аминотрансферазу сыворотки (АЛТ) и аспартатаминотрансферазу (АСТ) определяли с использованием автоматизированного анализатора химии (Olympus AU1000, Olympus Corporation, Токио, Япония). Гидроксипролин и LN определяли с использованием наборов согласно инструкциям изготовителей.

Свежие образцы печени были встроены в парафин для гистологического обследования с использованием гематоксилинов и эозинов (H & E) и окрашивания трихрома Массана. Разделы (толщиной 5 мкм) разрезали и готовили для дальнейших экспериментов. Коллагеновые волокна, окрашенные в синий цвет, окрашенные цитоплазмой красные и окрашенные в синий цвет сине-фиолетовые красители Массон наблюдались под световым микроскопом с цифровой камерой (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Общая РНК экстрагировалась из замороженной ткани печени путем пиролиза тризола, хлороформа, изопропилового спирта и этанола (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) и транскрибировалась в кДНК с использованием набора обратной транскрипции (TaKaRa Biotechnology, Далянь, Народная Республика Китай). Реакцию полимеразной реакции в реальном времени (ПЦР) проводили в соответствии с протоколами, описанными SYBR Premix EX Taq (TaKaRa Biotechnology), используя 7900HT Fast Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific). Отношение целевых генов и β -актина было рассчитано на основе кривой растворимости. Все праймеры, используемые в экспериментах, показаны в таблице 1.

Общий тканевой белок экстрагировали с помощью флюорита фенилметансульфонилфторида с помощью радиоиммунопреципитационного аналитического буфера и определяли концентрацию, используя анализ белка бицинхониновой кислоты (Kajji, Китайская Народная Республика). Равные количества образцов добавляли к 8% -12,5% додецилсульфат-полиакриламидных гелей натрия и переносили на мембраны из поливинилиденфторида, которые последовательно блокировали обезжиренным молоком и инкубировали с конкретными первичными и вторичными антителами. Используемые первичные антитела были следующими: α -SMA, TIMP1, MMP-9, Co-I, Beclin-1, P62 (1: 500, все от Proteintech Group, Inc., Чикаго, Иллинойс, США); TGF- β 1, smad2, p-smad2, LC3, β -актин (1: 1000, все от Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); и smad3, p-smad3 (1: 500, как из ABclonal, Cambridge, MA, USA). Для сканирования мембран для получения изображений использовалась двухцветная инфракрасная лазерная система визуализации Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, США).

Полученные парафиновые секции депарафинизировали и регидратировали с различными концентрациями алкоголя. После промывки солевым раствором, заполненным фосфатом, секции предварительно обрабатывали с использованием метода поиска микроволнового антигена с нагревом до 95 ° C и охлаждения до комнатной температуры (четыре цикла). Антитела, включая α -SMA (1: 100), TIMP1 (1: 100), MMP-9 (1: 100), Co-I (1: 100), Beclin-1 (1: 100), TGF- β 1 (1: 200), p-smad2 (1: 100), LC3 (1:50) и p-smad3 (1: 100), добавляли к срезам и затем инкубировали при 4 ° C в течение ночи. После инкубации со вторичным антителом был использован набор DAB, а на микроскопе с цифровой камерой наблюдались положительные области.

В тканях печени префикс 3% глутарового альдегида, забуференного 0,2 ммоль / л какодилата, в течение 4 часов и постфиксации в 1% тетроксиде осмия в течение 1 часа. Автофагосомы рассматривались с помощью электронной микроскопии (JEM-1230, JEOL, Токио, Япония), и были получены изображения.

Статистический анализ был выполнен с использованием программного пакета SPSS 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Все данные сравнивались путем вычисления среднего \pm стандартного отклонения с использованием теста Стьюдента-Ньюмана-Кеулса или одностороннего дисперсионного анализа. Значение $P < 0,05$ считалось статистически

значимым. Положительно окрашенные области оценивали по интегрированной оптической плотности и анализировали с использованием Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

ALT и AST являются важными показателями для отражения статуса функции печени. Мы провели серию экспериментов, чтобы выяснить влияние фукоидана на уровни фермента печени. Уровень сывороточных ферментов печени в группах CCl₄ и BDL был значительно повышен, что свидетельствовало о серьезном повреждении печени. С увеличением дозы фукоидана (10 мг / кг, 25 мг / кг и 50 мг / кг) уровни АЛТ и АСТ постепенно снижались. Однако 10 мг / кг фукоидана не оказывали явного влияния на фиброз, вызванный CCl₄. Гидроксипролин, который может отражать тяжесть фиброза печени, является характерной аминокислотой в синтезе коллагенов. Уровни гидроксипролина в тканях печени были выше в модельных группах (как BDL, так и CCl₄) и уменьшались с увеличением концентрации фукоидана (рис. 1А). Н & Е и окрашивание Массоном использовались для определения общей морфологии и коллагеновых волокон в тканях печени. По результатам окрашивания Н и Е в модельных группах наблюдались воспалительные инфильтраты, дегенерация и некроз в клетках печени вокруг центральной вены и гиперплазия соединительной ткани. Степень повреждения в группах лечения фукоиданом была снижена. В соответствии с изменениями в ферментах печени и окрашиванием Н и Е, окраска Массоном секций печени показала синие области коллагенового волокна и красные области цитоплазмы. Коллагеновое волокно в группах фукоиданов демонстрировало тенденцию к снижению по сравнению с модельными группами (рис. 1В). Эти результаты показали, что различные концентрации фукоидана значительно облегчают фиброз печени дозозависимым образом.

Гиалуроновая кислота, фибронектин, LN, коллаген I, α -SMA, MMP и TIMP участвуют в синтезе ЕСМ. Для определения сывороточной гиалуроновой кислоты и LN использовали иммуноферментные аналитические комплексы с ферментным связыванием, и результаты были сопоставимы с результатами для ALT и AST. Увеличение уровней сыворотки в обеих модельных группах показало тяжелый фиброз и снижение уровней в группах фукоиданов, указывающих на ослабление поражения печени (рис. 1А и 2А). ПЦР и Вестерн-блот использовали для определения изменений уровней гена и белка компонентов ЕСМ в тканях печени в разных группах лечения соответственно (фиг. 2В и С). Результаты показали повышенную экспрессию коллагена I, α -SMA и TIMP1 в модельных группах, и фукоидан препятствовал этому увеличению. Аналогично, иммуногистохимическое окрашивание биопсий печени показало, что изменения этих компонентов в тканях печени согласуются с результатами экспрессии гена и белка (рисунок 2D). Эти результаты показывают, что продуцирование ЕСМ ингибировалось фукоиданом для блокирования прогрессирования фиброза печени.

Аутофагия может обеспечить энергию для ускорения фиброза печени путем деградации клеточного белка. Beclin-1, LC3 и P62 являются важными маркерами образования аутофагосом. Для оценки уровней аутофагии в тканях печени после лечения фукоиданом использовали ПЦР, Вестерн-блот и иммуногистохимическое окрашивание, чтобы показать уровни этих генов и белковых тканей этих показателей соответственно. Результаты показали, что белки, такие как Beclin-1 и LC3, способствовали аутофагии и были значительно увеличены в модельных группах с фиброзом (группы BDL и CCl₄). Фукоидан уменьшает повреждение клеток, вызванное аутофагией; таким образом, уровни Beclin-1 и LC3 в группах, обработанных фукоиданом (10 мг / кг, 25 мг / кг и 50 мг / кг) постепенно снижались дозозависимым образом. P62 — транспортер, связанный с аутофагами, — уменьшился в группах моделей и увеличился после лечения фукоиданом

(рис. 3). Все маркеры показали образование аутофагосом, обнаруженных с помощью электронной микроскопии, включая наблюдение микроструктуры. По сравнению с контрольной группой число аутофагосом в группах BDL и CCl₄ увеличивалось, и после введения фукоидана агглютинированный хроматин в митохондриях и аутофагосомных корпскулах не был легко замечен. Таким образом, фукоидан смягчал повреждение, вызванное аутофагией, посредством ингибирования образования аутофагосомы путем снижения активности Беклина-1 и ЛК3.

TGF- β 1 в основном встречается в HSCs, эндотелиальных клетках печеночных синусов и воспалительных клетках при фиброзе печени и играет важную роль в тканях и органах. В качестве важного фактора для улучшения фиброза печени TGF- β 1 может опосредовать некроз и аутофагию путем активации smads, которые фосфорилируются в ядерной области. Чтобы подтвердить путь проводимости, мы определили уровни TGF- β 1 в сыворотке и тканях и ее экспрессию гена и белка (рисунок 4A). Результаты показали, что уровни этих факторов были усилены в модельных группах с фиброзом печени, индуцированным BDL и CCl₄, и уменьшились после лечения фукоиданом со статистически значимыми различиями. Мы также сосредоточились на фосфорилировании smads, таких как smad2 и smad3, и обнаружили значительное увеличение групп BDL и CCl₄ и дозозависимое снижение после лечения фукоиданом. Вестерн-блоттинг и иммуногистохимическое окрашивание показали последовательные результаты (фиг. 4B и C). Эти результаты свидетельствуют о том, что фукоидан уменьшает экспрессию TGF- β 1, которая опосредует отрицательную активацию сигнальных путей ниже по течению, которые могут быть существенным путем в индукции некроза и аутофагии во время фиброза печени.

Фиброз печени — это образование рубцов, вызванное компенсаторным ответом на различные хронические повреждения печени. В качестве общего патологического процесса при многих заболеваниях печени фиброз печени также приводит к циррозу.³⁴ Важно выявлять новые, безопасные и эффективные лекарственные препараты из-за отсутствия хирургических процедур в результате диффузных патологических изменений. Фукоидан, полисахарид на основе фукозы, привлек внимание ученых.^{30,35,36} В настоящем исследовании были установлены две модели животных фиброза печени (CCl₄ и BDL) для определения защитного эффекта и механизма действия фукоидана на анализы биохимических показателей (ALT, AST и гидроксипролина), компонентов ECM (коллагеназы I, MMP и TIMP) и других ключевых белков, расположенных в сигнальных путях (TGF- β 1 и Smads).

Исследование Senties-Gomez et al подтвердило, что повышенный синтез и недостаточная деградация ECM, что приводит к избыточному осаждению и взаимодействию с другими цитокинами, происходят при иницировании и развитии фиброза печени.³⁷ Коллаген типа I, обнаруженный при поздних патологических изменениях, является важным компонентом ECM. Поскольку характерной аминокислотой коллагена типа I является гидроксипролин, уровень этой аминокислоты может быть важным показателем фиброза. MMPs, группа ферментов, которые содержат Ca²⁺ и Zn²⁺, могут играть определенную роль в деградации ECM, а TIMP, секретируемые активированными HSC, являются специфическими ингибиторами MMP.¹¹ Метаболизм ECM зависит от баланса между MMP и TIMP, главным образом MMP-9 / TIMP1.^{38,39} В качестве ключевых клеток в производстве ECM HSC могут трансформироваться в MFB, которые экспрессируют уникальный молекулярный маркерный белок α -SMA.¹⁰ Hong et al и Moon et al., Проверенный, что фукоидан увеличивает секрецию MMP-9 в моноцитарную клеточную линию U937 и подавляющий подавление проколлагена I типа и α -SMA в фибробластах

кожи человека.15,40 В наших экспериментах экспрессия коллагена I и α -SMA, обнаруженная ПЦР, Вестерн-блот и иммуногистохимическое окрашивание в CCl₄ и Группы моделей BDL демонстрировали восходящий тренд с TIMP1, рассматриваемый как метаболический ингибирующий фермент ECM, но уменьшающийся дозозависимым образом в группах, обработанных фукоиданом (10 мг / кг, 25 мг / кг и 50 мг / кг). Напротив, MMP-9, фермент, который способствует метаболизму ECM, уменьшался в модельных группах и увеличивался после лечения фукоиданом. Эти результаты показали, что фукоидан может защитить от повреждения печени, вызванного CCl₄ и BDL, благодаря эффективному ингибированию продукции ECM и предотвращению изменения от HSC до MFB, что приводит к уменьшению фиброза печени. Основываясь на обнаружении вышеуказанных показателей, измерение ALT, AST и гидроксипролина показало, что функция печени изменяется с образованием ECM. По сравнению с модельными группами патология биопсии печени в группах, обработанных фукоиданом, показала меньшее образование коллагеновых волокон и очаговый некроз, который был зависимым от дозы. Таким образом, фукоидан ингибировал HSC и уменьшал образование ECM и высвобождение α -SMA для защиты от фиброза печени.

Аутофагия, называемая запрограммированной клеточной смертью типа II, широко существует в биологии эукариотических клеток, встречается реже при нормальных обстоятельствах, но может быть вызвана поддержанием баланса между белками и органеллами под стрессом. Однако избыточная активация аутофагии может также увеличивать повреждение и смерть клеток.41, 42 В последние годы все большее число исследований подтвердили роль аутофагии при хроническом повреждении печени, например, безалкогольное и алкогольное жировое заболевание печени, вирусные гепатиты и цирроз.43-46. Во время фиброза печени возникновение аутофагии связано с активацией HSC, действующей на TGF- β , тромбоцитарный фактор роста, Wnt / β -catenin и Toll-подобные рецепторные пути.47-51 Следовательно, мы предполагаем, что ингибирование аутофагии может стать новой лекарственной мишенью для профилактики фиброза печени. Ves1p-1, LC3 и P62 оценивали, чтобы продемонстрировать экспрессию аутофагии в этом исследовании. Результаты показали, что аутофагия была активирована в моделях CCl₄ и BDL и уменьшалась с увеличением концентрации фукоидана. Обильные аутофагосомы и аутофаголизосомы наблюдались в тканях печени модельных групп, но редко наблюдались после лечения фукоиданом. Эти результаты показывают, что фукоидан может эффективно ингибировать аутофагию, которая обеспечивает энергию для активации HSC и, таким образом, замедляет процесс фиброза печени.

Как фукоидан регулирует образование ECM и аутофагии при фиброзе печени? Shen et al, He и др., И Гавами и др. Обнаружили, что аутофагия является регулятором пути TGF- β 1 в предсердных MFB и HSC, и эти результаты были проверены другими исследователями.12,23,28,29,45,47, 48,50 Семейство TGF- β , которое включает различные функциональные цитокины, может регулировать рост клеток, пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз. Исследовательские данные показывают, что TGF- β , в основном TGF- β 1 с самой высокой биологической активностью, находящейся во внутрипеченочных клетках, высоко экспрессируется в HSCs, печеночном синусе, эндотелиальных клетках и воспалительных клетках, которые влияют на фиброз печени.52,53 HSCs были активированы CCl₄ и холестаза и трансформировали в MFB, которые секретируют TGF- β 1. TGF- β 1 может ускорить процессы коллагена, а TIMP1 в ECM и TGF β 1 на поверхности клеточных мембран может сочетаться с TGF- β 1 для стимуляции Smad2 / 3, находящегося в цитоплазме.54-56. Исследование сигнальных молекул в TGF - β 1 / Путь Smads показал повышенную тенденцию в модельных группах по сравнению с нормальной группой, которая снизилась после лечения фукоиданом. Результаты экспрессии гена и белка показали, что фукоидан эффективно снижает

секретируемый TGF- β 1, тем самым ингибируя путь ниже по течению. Таким образом, фукоидан ингибировал активацию HSC, образование ECM и высвобождение TGF- β 1. Недостаточный TGF- β 1 образовал комплексы с его рецептором, что привело к снижению фосфорилирования Smad2 / 3. Smad2 / 3 не может быть перенесен из цитоплазмы в ядро, чтобы сочетаться со специфическими последовательностями ДНК, чтобы способствовать транскрипции *Smad3* из-за его нефосфорилированного состояния. Smad3 обычно способствует возникновению аутофагии через взаимодействие с PI3K, которое индуцирует конверсию от LC3-I до LC3-II [19,57]. После обработки фукоиданом ингибирование TGF- β 1 препятствовало образованию аутофагосом, которые деградировали органеллы для защиты клеток печени через нисходящие сигнальные пути TGF- β 1 / Smad (рисунок 5).

В заключение мы предварительно обнаружили, что активация HSCs для секреции TGF- β 1, которая индуцировала образование ECM и аутофагии, была ингибирована фукоиданом от *F. vesiculosus* во время фиброза печени у мышей. В качестве новых лекарственных мишеней ингибиторы аутофагии и TGF- β 1 могут быть перспективными потенциальными терапевтическими агентами для фиброза печени. Конечно, безопасность и другие связанные с этим механизмы фукоидана требуют дальнейшего изучения до клинического применения.

Вклад автора

Все авторы внесли существенный вклад в концепцию и дизайн, сбор данных или анализ и интерпретацию данных; участвовал либо в разработке статьи, либо в критической оценке ее важного интеллектуального содержания; дал окончательное одобрение версии для публикации; и согласны нести ответственность за все аспекты работы.

раскрытие

Авторы не сообщают о конфликте интересов в этой работе.

Влияние фукоидана на цитолиз печени.

Примечания: (A) Фукоидан уменьшал уровень содержания АЛТ, АСТ и гидроксипролина дозозависимым образом. Данные выражаются как среднее \pm SD ($n = 8$, * $P < 0,05$ для CC14 [BDL] против контроля, # $P < 0,05$ для CC14 [BDL] + фукоидана по сравнению с CC14 [BDL], ^ $P < 0,05$ для CC14 [BDL] + фукоидан [25 мг / кг] по сравнению с CC14 [BDL] + фукоидан [10 мг / кг], + $P < 0,05$ для CC14 [BDL] + фукоидан [50 мг / кг] по сравнению с CC14 [BDL] + фукоидан [25 мг / кг]). (B и C) Фукоидан улучшает патологическое изменение, показанное H & E и трихромом Массона (оригинальное увеличение: $\times 200$).

Сокращения: АСТ, аспартатаминотрансфераза; SD, стандартное отклонение; CC14, четыреххлористый углерод; BDL, лигирование желчных протоков; H & E, гематоксилин и эозин; ALT, аланинаминотрансфераза.

Влияние фукоидана на ECM при фиброзе печени.

Примечания: (A) Фукоидан снизил уровень HA и LN. (B) Анализ вестерн-блоттинга показал, что фукоидан явно меняет экспрессию коллагена I, α -SMA, MMP-9 и TIMP1. (C)

Уровни мРНК коллагена 1 α 1, α -SMA были значительно снижены с помощью фукоидана. Данные выражаются как среднее \pm SD (n = 8, * P <0,05 для CCl4 [BDL] против контроля, #P <0,05 для CCl4 [BDL] + фукоидана по сравнению с CCl4 [BDL], ^ P <0,05 для CCl4 [BDL] + фукоидан [25 мг / кг] по сравнению с CCl4 [BDL] + фукоидан [10 мг / кг], + P <0,05 для CCl4 [BDL] + фукоидан [50 мг / кг] по сравнению с CCl4 [BDL] + фукоидан [25 мг / кг]). (D). Области положительных клеток коллагена I и α -SMA уменьшались фукоиданом, как показано окрашиванием иммуногистохимическими веществами (исходное увеличение: \times 200).

Сокращения: ECM, внеклеточный матрикс; HA, гиалуроновая кислота; LN, ламинин; α -SMA, α -гладкомышечный актин; MMP, матриксная металлопротеиназа; TIMP, тканевый ингибитор матричной металлопротеиназы; мРНК, мессенджер рибонуклеиновой кислоты; SD, стандартное отклонение; CCl4, четыреххлористый углерод; BDL, лигирование желчных протоков.

Влияние фукоидана на процесс аутофагии при фиброзе печени.

Примечания: (A) Уровни мРНК Beclin-1 и LC3-11 были снижены с помощью фукоидана дозозависимым образом. Данные выражаются как среднее \pm SD (n = 8, * P, 0,05 для CCl4 [BDL] против контроля, #P <0,05 для CCl4 [BDL] + фукоидана по сравнению с CCl4 [BDL], ^ P <0,05 для CCl4 [BDL] + фукоидан [25 мг / кг] по сравнению с CCl4 [BDL] + фукоидан [10 мг / кг], + P <0,05 для CCl4 [BDL] + фукоидан [50 мг / кг] по сравнению с CCl4 [BDL] + фукоидан [25 мг / кг]). (B) Анализ Вестерн-блоттинга показал, что фукоидан, очевидно, изменил экспрессию Beclin-1, LC3 и P62. (C). Области положительных клеток Beclin-1 и LC3 были уменьшены фукоиданом, как показано окрашиванием иммуногистохимическими веществами (первоначальное увеличение: 200 \times). (D) Количество аутофагосомы значительно уменьшилось, как показано TEM (первоначальное увеличение: \times 20 000). Красные стрелки показывают аутофагосомы, обнаруженные в ткани печени.

Сокращения: мРНК, посланная рибонуклеиновая кислота; SD, стандартное отклонение; BDL, лигирование желчных протоков; CCl4, четыреххлористый углерод; TEA, просвечивающая электронная микроскопия.

Влияние фукоидана на пути TGF- β 1 / Smads при фиброзе печени.

Примечания: (A) Уровни TGF- β 1 в сыворотке и мРНК были снижены с помощью фукоидана дозозависимым образом. Данные выражаются как среднее \pm SD (n = 8, * P <0,05 для CCl4 [BDL] против контроля, #P <0,05 для CCl4 [BDL] + фукоидана по сравнению с CCl4 [BDL] + фукоидан [25 мг / кг] по сравнению с CCl4 [BDL] + фукоидан [10 мг / кг], + P <0,05 для CCl4 [BDL] + фукоидана [50 мг / кг] по сравнению с CCl4 [BDL] + фукоидан [25 мг / кг]). (B) Анализ Вестерн-блоттинга показал, что фукоидан, очевидно, снижает экспрессию TGF- β 1, p-Smad2 и p-Smad3. (C) Области положительных клеток TGF- β 1, p-Smad2 и p-Smad3 были уменьшены фукоиданом, как показано путем иммуногистохимического окрашивания (первоначальное увеличение: \times 200).

Сокращения: TGF- β 1, трансформирующий фактор роста бета 1; мРНК, мессенджер рибонуклеиновой кислоты; SD, стандартное отклонение; CCl4, четыреххлористый углерод; BDL, лигирование желчных протоков.

Механизм действия фукоидана.

Примечания: Fucoidan ингибирует активацию HSC, которая может секретировать TGF- β 1, тем самым ингибируя нисходящий путь TGF- β 1 / Smads. Smad2 / 3 не может быть перенесен из цитоплазмы в ядро, чтобы сочетаться со специфическими последовательностями ДНК для промотирования транскрипции Bcl-1, так что фукоидан препятствовал образованию аутофагосом. Затем была активирована аутофагия, связанная с треснувшими органеллами, чтобы вызвать гибель клеток.

Сокращения: HSCs, гепатоцитарные звездчатые клетки; TGF- β 1, трансформирующий фактор роста бета 1; ДНК, дезоксирибозную нуклеиновую кислоту; CCl₄, четыреххлористый углерод; BDL, лигирование желчных протоков; МФБ, миофибробласты; ECM, внеклеточный матрикс; ММП, матричные металлопротеиназы; TIMP, тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ; α -SMA, α -гладкомышечный актин; SEC, синусоидальные эндотелиальные клетки. CRE, элемент ответа c-AMP.

Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых для qRT-PCR

Сокращения: qRT-PCR, количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени; α -SMA, α -гладкомышечный актин; TGF- β 1, трансформирующий фактор роста бета 1.