

白藜芦醇预处理的脂肪间充质干细胞通过调节自噬 保护CCl₄诱导的肝细胞损伤

刘双娟[#] 孙莹莹[#] 侯乐瑶 马溪媛 吕琼霞 陈晓光 刘玉梅 张自强*

(河南科技大学动物科技学院, 洛阳 471000)

摘要 该文旨在探讨白藜芦醇(resveratrol, Res)预处理脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cells, ADSCs)对四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)诱导的肝细胞损伤的治疗效果及作用机制。从小鼠腹股沟分离提取ADSCs, 培养至第3代, 成脂、成骨分化能力检测。将不同浓度Res预处理第3代的ADSCs与CCl₄损伤的BRL-3A细胞共培养, 采用CCK-8法检测肝细胞活力, 以及试剂盒检测BRL-3A细胞AST、ALT含量变化来筛选Res最适浓度; 之后将BRL-3A细胞分为对照组、CCl₄模型组、ADSCs治疗组、Res预处理ADSCs治疗组、Res预处理ADSCs+3-MA治疗组。试剂盒检测各组AST、ALT、ALB以及ALP含量变化。Western blot检测自噬相关蛋白Beclin-1、LC3II、p62及PI3K/AKT/mTOR通路相关蛋白的表达。结果表明, 筛选出Res的最适浓度是20 μmol/L, 与模型组相比, ADSCs和Res预处理的ADSCs治疗后改善了受损BRL-3A细胞AST、ALT、ALP和ALB的水平, Res预处理组治疗效果更为明显。此外, WB结果显示, 与模型组相比, Res预处理的ADSCs能够上调BRL-3A细胞自噬相关蛋白Beclin-1、LC3II的表达, 下调p62的表达, 同时还可以抑制AKT/PI3K/mTOR通路相关蛋白表达, 而当加入自噬抑制剂3-MA后, Res预处理的ADSCs对损伤肝细胞的治疗作用明显被抑制。这些结果表明, Res预处理的ADSCs可通过促进自噬修复肝损伤, 自噬的增加可能与抑制PI3K/AKT/mTOR通路有关。

关键词 白藜芦醇; 脂肪间充质干细胞; 肝细胞损伤; 自噬

Resveratrol-Pretreated Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Protect CCl₄-Induced Hepatocyte Injury by Regulating Autophagy

LIU Shuangjuan[#], SUN Yingying[#], HOU Leyao, MA Xiyuan, LÜ Qionxia, CHEN Xiaoguang, LIU Yumei,
ZHANG Ziqiang*

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the therapeutic effect and mechanism of Res (resveratrol) pretreatment of ADSCs (adipose mesenchymal stem cells) on liver cell injury induced by CCl₄ (carbon tetrachloride). ADSCs were isolated and extracted from the groin of mice, cultured to the third generation, and the ability of adipogenic and osteogenic differentiation was detected. The third-generation ADSCs pretreated with different concentrations of Res were co-cultured with CCl₄-injured BRL-3A cells. The viability of hepatocytes was detected

收稿日期: 2025-01-14

接受日期: 2025-02-19

河南省自然科学基金(批准号: 232300420016)资助的课题

[#]共同第一作者

*通信作者。Tel: 15303791931, E-mail: ZiqiangZhang@haust.edu.cn

Received: January 14, 2025

Accepted: February 19, 2025

This work was supported by the Natural Science Foundation of Henan Province (Grant No.232300420016)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-15303791931, E-mail: ZiqiangZhang@haust.edu.cn

by CCK-8 method, and the contents of AST and ALT in BRL-3A cells were detected by kit to screen the optimal concentration of Res. Then BRL-3A cells were divided into control group, CCl₄ model group, ADSCs treatment group, Res pretreatment ADSCs treatment group, Res pretreatment ADSCs+3-MA treatment group. The contents of AST, ALT, ALB and ALP in each group were detected by kit. Western blot was used to detect the expression of autophagy-related proteins Beclin-1, LC3II, p62 and PI3K/AKT/mTOR pathway-related proteins. The results showed that the optimal concentration of Res was 20 μ mol/L. Compared with the model group, ADSCs and Res pretreated ADSCs improved the levels of AST, ALT, ALP and ALB in damaged BRL-3A cells, and the treatment effect of Res pretreatment group was more obvious. In addition, Western blot results showed that compared with the model group, Res-pretreated ADSCs could up-regulate the expression of autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3II in BRL-3A cells, down-regulate the expression of p62, and inhibit the expression of AKT/PI3K/mTOR pathway-related proteins. When the autophagy inhibitor 3-MA was added, the therapeutic effect of Res-pretreated ADSCs on injured hepatocytes was significantly inhibited. These results indicate that Res pretreated ADSCs can repair liver injury by promoting autophagy, and the increase of autophagy may be related to the inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway.

Keywords resveratrol; adipose mesenchymal stem cells; liver cell injury; autophagy

自噬作为一种细胞内保护机制,有助于将异常的蛋白质、细胞器等大分子包裹起来,转移到溶酶体中进一步降解,从而为细胞提供能量并维持细胞稳态^[1-3]。自噬在肝细胞的生理和病理生理过程中起着至关重要的作用^[4]。有研究报道,激活自噬可以减轻肝细胞的代谢负担和抑制氧化应激,保护其免受进一步的损伤甚至细胞凋亡^[5]。

目前,脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cells, ADSCs)因其来源丰富、易获取、具有多向分化潜能等特点已被广泛应用于治疗各种肝脏疾病^[6]。然而,由于受损微环境的影响,ADSCs的治疗效果受到限制^[7]。白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种具有强效抗氧化、抗衰老和抗癌作用的小分子化合物,已被证明可以促进ADSCs的增殖,延缓细胞衰老^[8]。此外,已知磷酸肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase, AKT)/雷帕霉素靶标(mechanistic target of rapamycin, mTOR)通路是自噬的关键调节因子,参与多种疾病的发生和发展^[9]。有研究表明,ADSCs可通过调节PI3K/AKT/mTOR通路对肝脏自噬诱导的损伤发挥保护作用^[10]。然而,Res预处理的ADSCs是否通过PI3K/AKT/mTOR通路调节肝细胞自噬尚不清楚。

四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)作为肝毒性的经典化学试剂,在临床前动物研究中已被广泛用于诱导肝损伤,并能准确模拟肝损伤条件下肝细胞的功能、代谢和形态变化,具有模型稳

定、重复性好、操作简单易行等优点,常用于研究保肝药物的疗效和作用机制^[11-12]。因此,本研究使用CCl₄处理BRL-3A细胞构建体外肝损伤模型,并将其与Res预处理ADSCs共培养,以探索Res预处理ADSCs对CCl₄诱导的BRL-3A细胞损伤的改善作用及相关机制。

1 材料

1.1 实验动物及主要试剂

三周龄昆明系小鼠由河南科技大学实验动物中心提供(该实验伦理批准号为SDXN2019010);鼠肝细胞系BRL-3A来源于本实验室老师的馈赠;3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(货号: MZ0002)购自上海懋康生物科技有限公司;四氯化碳(纯度大于99%, 货号: C07315309)购自南京化学试剂股份有限公司;白藜芦醇(纯度98%, 货号: 554325)购自美国Sigma公司;I型胶原酶、胰蛋白酶/乙二胺四乙酸、地塞米松、胰岛素、油红O染色液购自美国Sigma公司;FBS购自美国Gibco公司;DMEM/F12购自美国HyClone公司;3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、吡啶美辛、抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠购自上海索莱宝科技有限公司;茜素红染色液购自上海钰博生物科技有限公司;CCK8(货号: C0037)和BCA(货号: A045-4-2)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Transwell小室(货号: 14321, 孔径为3 μ m)购自北京兰杰柯科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine

aminotransferase, ALT)(货号: C009-2-1)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)(货号: C010-2-1)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)(货号: A059-2-2)、白蛋白(albumin, ALB)(货号: A028-2-1)试剂盒购自南京建成生物科技有限公司; ECL(货号: G2014)试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司; TRIzol试剂购自 ThermoFisher Scientific公司; PVDF膜购自美国 Millipore公司; 微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)(货号: GB11124)、Beclin-1(货号: GB115741)、p62(货号: GB11531)、PI3K(货号: GB112375)、AKT(货号: GB11689)、mTOR(货号: GB111840)和内参 β -actin(货号: GB11001)的一抗及Alexa Fluor 488标记的山羊抗小鼠IgG(货号: GB25301)和HRP标记山羊抗兔IgG(货号: GB23303)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ADSCs的分离培养 从3周龄小鼠腹股沟分离脂肪组织,并在无菌条件下切碎。脂肪组织用I型胶原酶37 °C消化60~70 min。分离的细胞放入含10%胎牛血清和1%青链霉素的DMEM/F12培养基中,在37 °C、5% CO₂的培养箱中培养^[13]。当细胞融合到70%~80%时进一步纯化,传代培养。在我们实验室前期研究^[13]的基础上,选用第二代和第三代的细胞进行实验。

1.2.2 ADSCs的成脂分化诱导 将第二代ADSCs以 5×10^4 个/mL密度接种到6孔板中。当细胞融合达到约80%时,更换培养基为成脂诱导培养基。成脂诱导培养基为含 1×10^{-6} mol/L地塞米松、0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、10 mg/L胰岛素、0.2 mmol/L吡哆美辛的DMEM/F12。诱导15天后,用多聚甲醛室温固定20 min, PBS洗涤3次,之后用油红O染液染色15 min, PBS洗涤3次,检测细胞向脂肪细胞的转化情况,在倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.3 ADSCs的成骨分化诱导 将第二代ADSCs以 5×10^4 个/mL的密度接种到6孔板中。当细胞融合达到约80%时,更换培养基为成骨诱导培养基。成骨诱导培养基为含 1×10^{-6} mol/L地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和50 μ g/mL抗坏血酸的DMEM/F12。诱导21天后,用多聚甲醛室温固定20 min, PBS洗涤3次,之后用茜素红染液染色15 min, PBS洗涤3次,检测细胞向骨细胞的转化情况,在倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.4 CCK8检测细胞活力 将不同浓度Res(0、5、

10、20、40、80、100 μ mol/L)预处理的F3代ADSCs(3×10^4 /孔)接种到Transwell小室上,培养24 h后,根据先前研究^[14-15]构建CCl₄肝损伤模型,将Res预处理的ADSCs与暴露于6 mmol/L CCl₄ 1 h后的BRL-3A细胞(1.5×10^4 /孔)共培养,24 h后通过CCK-8法检测BRL-3A细胞活力。37 °C孵育4 h后,使用酶标仪(Multiskan FC, ThermoFisher Scientific公司)测量波长为450 nm处的吸光度(D)值。采用以下公式计算细胞存活率:存活率(%)=[(D处理组-D空白组)/(D对照组-D空白组)] $\times 100\%$ 。筛选出Res的最适浓度进行以下实验。

1.2.5 实验分组 实验分为5组,未经任何处理的BRL-3A细胞为对照组;使用6 mmol/L CCl₄处理1 h的BRL-3A细胞为模型组;ADSCs与6 mmol/L CCl₄处理1 h的BRL-3A细胞在Transwell小室共培养24 h,为ADSCs组;Res预处理的ADSCs与6 mmol/L CCl₄处理1 h的BRL-3A细胞在Transwell小室共培养24 h,为Res+ADSCs组;Res预处理的ADSCs与6 mmol/L CCl₄处理1 h的BRL-3A细胞共培养前30 min,在BRL-3A细胞培养液中加入750 μ g/mL 3-MA(自噬抑制剂)^[16],为Res+ADSCs+3-MA组。

1.2.6 检测BRL-3A细胞肝功能指标 各组细胞共培养24 h后,收集肝细胞的上清液,并将其置于EP管中,按照AST、ALT、ALP、ALB试剂盒说明书进行检测。

1.2.7 Western blot检测 总蛋白用RIPA裂解液(1 $\times$,含10 mmol/L PMSF蛋白酶抑制剂)在冰上裂解30 min。用BCA试剂盒对蛋白浓度进行定量。然后,将带有蛋白上样缓冲液(5 $\times$,上海碧云天生物技术有限公司)的样品进行SDS-PAGE,并将凝胶转移到PVDF膜上。阻断非特异性信号后,将蛋白条带与一抗4 °C孵育过夜。二抗室温孵育1 h,加入ECL化学发光试剂盒显色,将 β -actin作为内参,使用Image-Pro Plus软件对目的条带灰度值进行分析。抗体的使用情况见表1。

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件进行单因素方差分析。数据以均数 $\pm$ 标准差表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

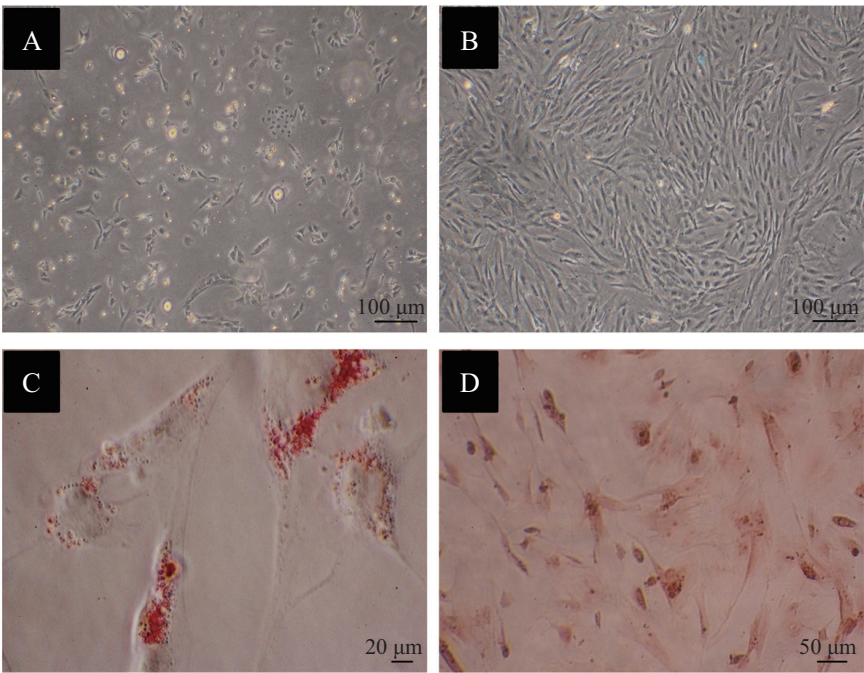
2 结果

2.1 ADSCs的典型特征

如图1A和图1B所示,第0代和第3代ADSCs均可

表1 Western blot中的抗体
Table 1 Antibodies in Western blot

抗体 Antibody	稀释比例 Dilution
Anti-beclin 1 rabbit pAb	1:1 000
LC3 polyclonal antibody	1:1 000
Anti-SQSTM1/p62 rabbit pAb	1:1 000
Anti-PI3 kinase p110 beta rabbit pAb	1:1 000
Anti-AKT1 rabbit pAb	1:1 000
Anti-mTOR rabbit pAb	1:1 000
HRP conjugated goat anti-rabbit IgG	1:5 000
Recombinant anti-beta actin antibody	1:2 000
Alexa fluor®488-conjugated goat anti-mouse IgG	1:5 000



A: 原代ADSCs; B: 第三代ADSCs; C: 油红O染色; D: 茜素红染色。
A: the primary ADSCs; B: the third generation ADSCs; C: oil red O staining; D: alizarin red staining.

图1 ADSCs的形态与多向分化

Fig.1 Morphology and multidirectional differentiation of ADSCs

见成纤维细胞样形态, 呈长梭形。如图1C和图1D所示, 经油红O和茜素红染色鉴定, 具有细胞分化为骨细胞和脂肪细胞的能力。

2.2 Res预处理的ADSCs增加了共培养后BRL-3A细胞的细胞活力

CCK8法检测BRL-3A细胞活力。结果如图2所示, 与对照组相比, 加入CCl₄($P<0.01$)后BRL-3A细胞活力显著降低, 而ADSCs组和Res预处理ADSCs组BRL-3A细胞活力显著升高($P<0.01$), 其中20 μmol/L Res预处理组BRL-3A细胞活力升高最为显著($P<0.01$)。

2.3 Res预处理的ADSCs可以改善CCl₄诱导的BRL-3A细胞的功能

首先, 通过检测BRL-3A细胞的功能进一步筛选Res发挥作用的最适浓度。结果如图3所示, 与对照组相比, CCl₄组BRL-3A细胞的AST和ALT含量显著升高($P<0.01$), 不同浓度Res预处理的ADSCs治疗后AST和ALT含量显著降低, 其中20 μmol/L Res预处理的ADSCs治疗效果最显著($P<0.01$)。因此, 确定选取20 μmol/L Res预处理的ADSCs进行后续实验。当加入3-MA自噬抑制剂时, 观察自噬对Res预处理的

ADSCs改善受损BRL-3A细胞功能的影响, 结果如图4所示, 与Res预处理的ADSCs组相比, 加入3-MA抑制自噬后, Res预处理的ADSCs对受损BRL-3A细胞中ALT、AST、ALP和ALB的改善效果被显著抑制($P<0.05$)。

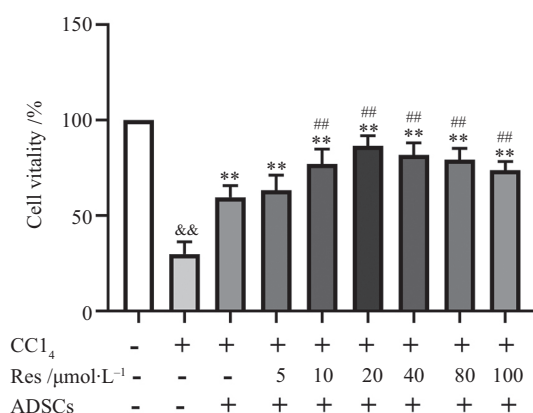
2.4 Res预处理的ADSCs可以恢复CCl₄诱导的BRL-3A细胞自噬功能

如图5所示, 与对照组相比, CCl₄组 Beclin-1、LC3II和p62蛋白表达水平升高($P<0.05$), 表明自噬被激活; 与CCl₄组相比, ADSCs以及Res预处理ADSCs与受损BRL-3A细胞共培养后 Beclin-1、LC3II表达水平

升高($P<0.01$), 而p62蛋白表达水平减少($P<0.01$), 差异有统计学意义; 加入3-MA自噬抑制剂后可明显抑制治疗组提高肝细胞中Beclin-1、LC3II蛋白表达水平以及降低p62蛋白表达水平的作用($P<0.05$)。

2.5 白藜芦醇预处理的ADSCs对PI3K/AKT/mTOR自噬通路的影响

Western blot检测PI3K、AKT、mTOR的蛋白表达水平。如图6所示, 与对照组相比, CCl₄组中PI3K、AKT和mTOR蛋白磷酸化表达量显著增加($P<0.01$), 而Res预处理的ADSCs显著抑制了PI3K、AKT和

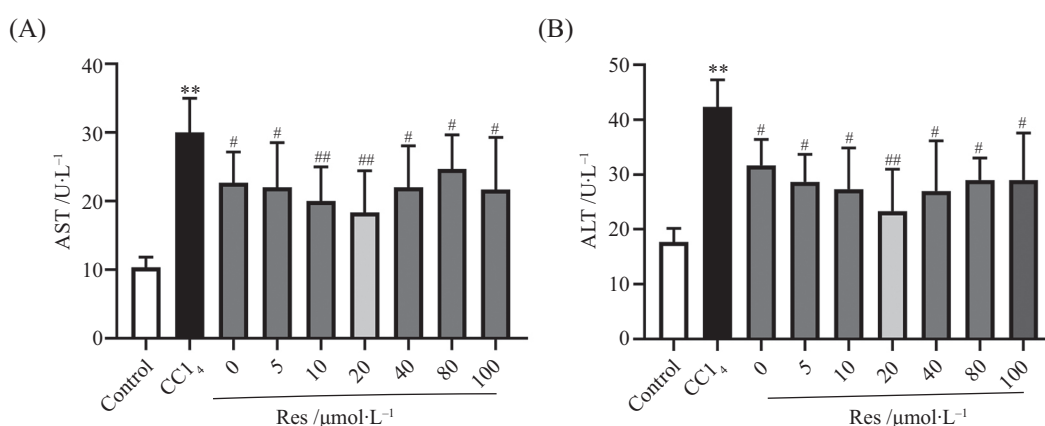


$^{&&}P<0.01$, 与对照组相比, 差异极显著; $^{**}P<0.01$, 与CCl₄组相比, 差异极显著; $^{##}P<0.01$, 与ADSCs组相比, 差异极显著。

$^{&&}P<0.01$ compared with the control group was extremely significant; $^{**}P<0.01$ compared with the CCl₄ group was extremely significant; $^{##}P<0.01$ compared with the ADSCs group was extremely significant.

图2 不同浓度Res预处理ADSCs对CCl₄诱导BRL-3A细胞活力的影响

Fig.2 Effects of ADSCs pretreated with different concentrations of Res on CCl₄-induced BRL-3A cell viability

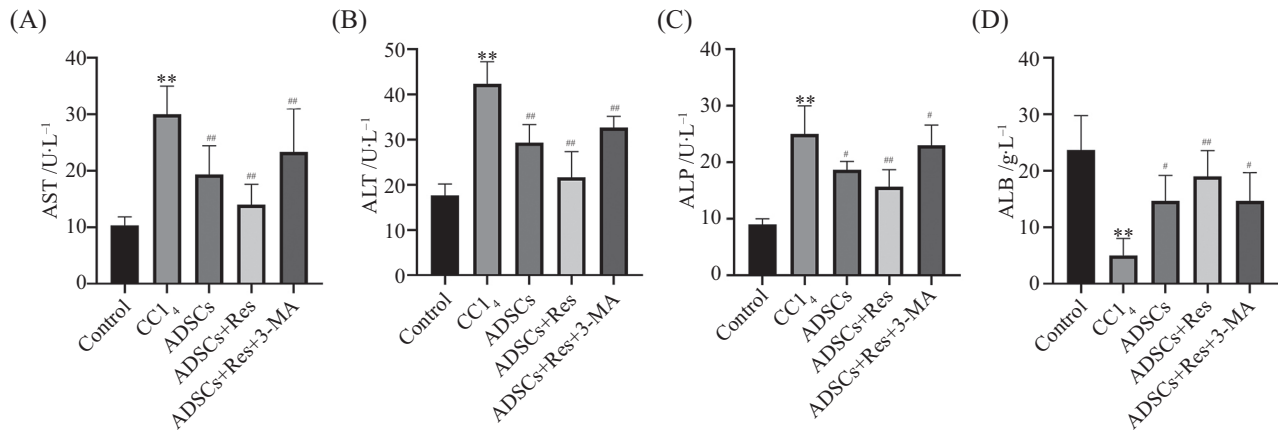


A、B: Res预处理ADSCs 24 h对CCl₄诱导的BRL-3A相关肝酶AST、ALT活性的影响。 $^{**}P<0.01$, 与对照组相比, 差异极显著; $^{*}P<0.05$, 与CCl₄组相比, 差异显著; $^{##}P<0.01$, 与CCl₄组相比, 差异极显著。

A,B: the effect of Res pretreatment of ADSCs for 24 h on the expression of BRL-3A related liver enzymes AST and ALT induced by CCl₄. $^{**}P<0.01$ compared with the control group was extremely significant; $^{*}P<0.05$ compared with CCl₄ group significantly; $^{##}P<0.01$ compared with CCl₄ group was extremely significant.

图3 不同浓度Res预处理ADSCs对CCl₄诱导BRL-3A细胞AST和ALT活性的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of Res pretreatment of ADSCs on the activity of AST and ALT in BRL-3A cells induced by CCl₄

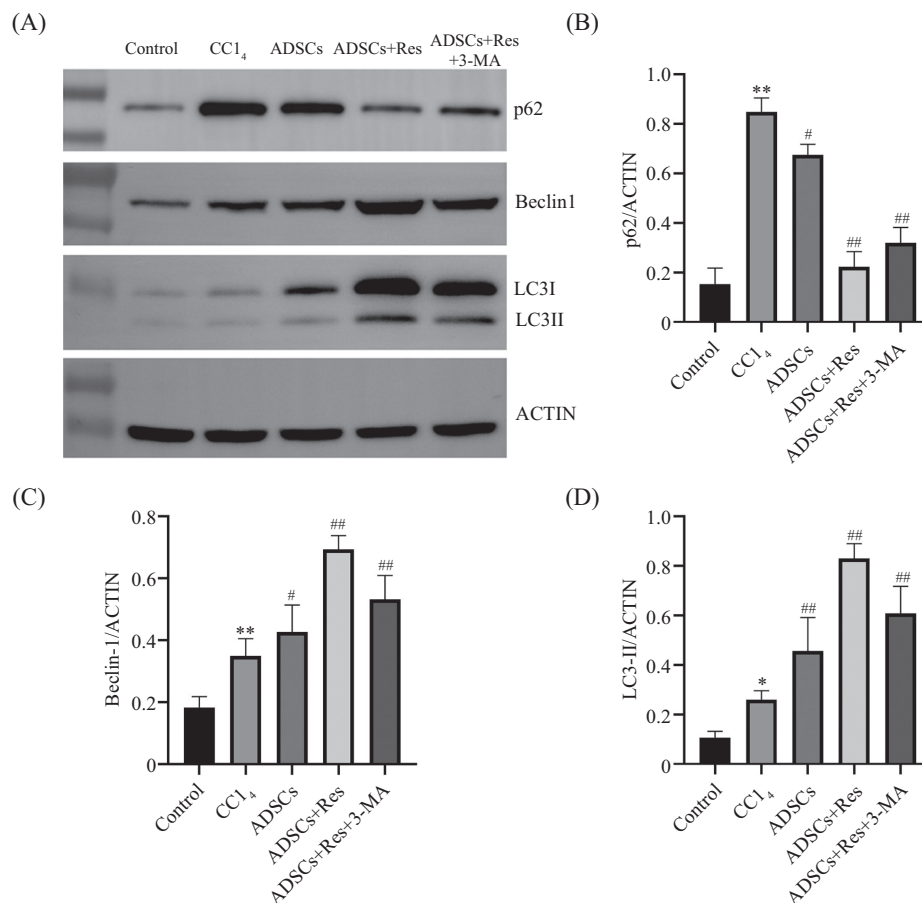


A~D: Res预处理的ADSCs共培养对损伤BRL-3A细胞相关酶AST、ALT、ALP、ALB活性的影响。** $P<0.01$, 与对照组相比, 差异极显著; # $P<0.05$, 与CCl₄组相比, 差异显著; ### $P<0.01$, 与CCl₄组相比, 差异极显著。

A~D: the effects of co-culture of ADSCs pretreated with Res on the activity of AST, ALT, ALP and ALB in injured BRL-3A cells. ** $P<0.01$ compared with the control group was extremely significant; # $P<0.05$ compared with CCl₄ group significantly; ### $P<0.01$ compared with CCl₄ group was extremely significant.

图4 Res预处理ADSCs对CCl₄诱导BRL-3A细胞功能指标含量的影响

Fig.4 Effects of Res pretreatment of ADSCs on the content of functional indexes of BRL-3A cells induced by CCl₄

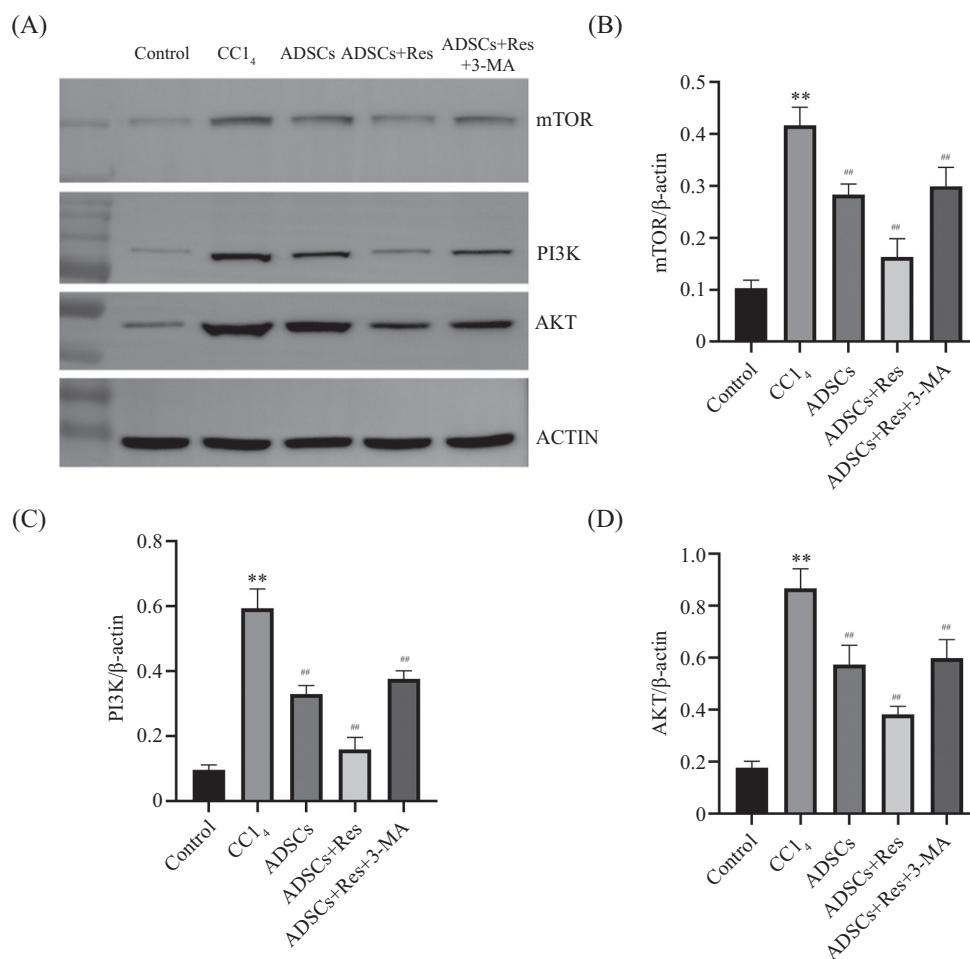


A~D: 用Western blot检测Res预处理的ADSCs共培养对损伤BRL-3A细胞自噬相关蛋白表达的影响。* $P<0.01$, 与对照组相比, 差异显著; ** $P<0.01$, 与对照组相比, 差异极显著; # $P<0.05$, 与CCl₄组相比, 差异显著; ### $P<0.01$, 与CCl₄组相比, 差异极显著。

A~D: Western blot was used to detect the effect of co-culture of ADSCs pretreated with Res on the expression of autophagy-related proteins in injured BRL-3A cells. * $P<0.01$ compared with the control group significantly; ** $P<0.01$ compared with the control group was extremely significant; # $P<0.05$ compared with CCl₄ group was significant; ### $P<0.01$ compared with CCl₄ group was extremely significant.

图5 Res预处理ADSCs对BRL-3A细胞p62、LC3、Beclin-1表达量的影响

Fig.5 Effects of Res pretreatment of ADSCs on the expression of p62, LC3 and Beclin-1 in BRL-3A cells



A~D: 通过Western blot检测各组PI3K/AKT/mTOR通路蛋白表达的变化。** $P < 0.01$, 与对照组相比, 差异极显著; # $P < 0.01$, 与CCl₄组相比, 差异极显著。
A~D: the expression of PI3K/AKT/mTOR pathway protein in each group was detected by western blot. ** $P < 0.01$ compared with the control group was extremely significant; # $P < 0.01$ compared with CCl₄ group was extremely significant.

图6 Res预处理ADSCs对CCl₄诱导BRL-3A细胞PI3K/AKT/mTOR蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of Res pretreatment of ADSCs on the expression of PI3K/AKT/mTOR protein in BRL-3A cells induced by CCl₄

mTOR蛋白磷酸化的表达($P < 0.01$)。与Res+ADSCs组比较, 3-MA组中PI3K、AKT、mTOR蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。

3 讨论

肝脏具有重要的稳态作用, 例如调节新陈代谢、解毒药物和外源性物质以及支持针对病毒和细菌感染的免疫反应^[17-18]。在正常生理情况下, 肝细胞能够维持肝脏的正常功能; 然而, 当肝细胞受损时, 肝细胞的活力及功能也会受到影响。研究表明, ADSCs能够抑制肝细胞的凋亡, 并通过分泌一些生长因子促进肝细胞增殖, 进而缓解肝损伤^[19]。因此, 本实验选用小鼠第三代ADSCs治疗受损的肝细胞, 并寻找可以改善ADSCs易受损伤微环境影响以及发生细胞衰老的方法。在天然化合物中, 多酚是

一个重要的类别, 一直与一系列修复、抗衰老、抗炎、抗氧化和抗癌作用有关。Res作为多酚组中一种化合物, 已被报道可以促进间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的细胞活力, 还可通过调节RELA/Sirt1通路减少过早衰老, 对MSCs表现出抗衰老作用, 以及抑制MSCs的凋亡^[20]。此外, 我们实验室前期研究表明, Res对正常ADSCs的细胞活力没有明显影响。然而, Res可以促进H₂O₂损伤的ADSCs增殖, 抵抗H₂O₂诱导的细胞凋亡, 从而提高ADSCs在损伤微环境中的存活率^[7]。但由于本实验是将Res预处理的ADSCs与CCl₄损伤的BRL-3A细胞进行共培养, 与先前研究的培养以及造模方式有所差异。因此, 在本研究中重新筛选了Res增强ADSCs治疗效果的最佳剂量, 用不同浓度Res预处理的ADSCs, 与CCl₄损伤的BRL-3A细胞共培养, 检测对BRL-3A细胞活力和功能

的影响。得到了与先前研究相同的结论, 20 $\mu\text{mol/L}$ Res预处理效果最好。

自噬作为一种高度保守的细胞过程, 被认为对细胞存活有着至关重要的影响^[2]。在肝脏中, 大约80%的细胞是肝细胞。自噬可以减少肝细胞损伤, 抑制自噬可以促进肝损伤和炎症^[21]。当受到外界刺激、自噬活性减弱或者自噬功能缺陷时, 自噬过程中相关蛋白的表达将会受到影响, Beclin-1蛋白表达量降低; LC3的脂化过程被阻碍导致形成的LC3II含量减少; 而p62作为一种选择性自噬受体, 则无法与泛素化的蛋白质结合并被自噬溶酶体所降解, 在细胞质中不断累积^[22]。本研究的结果表明, ADSCs和Res预处理的ADSCs增加了CCl₄诱导的BRL-3A细胞中Beclin-1和LC3II蛋白水平的表达, 降低了p62蛋白水平的表达, 表明自噬被激活, 且Res预处理的ADSCs组效果更显著。为了深入了解Res预处理的ADSCs在肝细胞自噬过程中的作用, 本研究将3-MA自噬抑制剂与Res预处理的ADSCs共同作用于CCl₄处理的BRL-3A细胞, 实验结果显示Res预处理的ADSCs促进BRL-3A细胞中自噬水平表达的作用被减弱, 证明Res预处理的ADSCs通过激活自噬来改善肝损伤。

PI3K/AKT/mTOR信号通路不仅参与自噬的调控, 也是肝纤维化的关键通路之一^[23]。以往对自噬细胞信号调控的研究表明, 该通路的激活可以抑制自噬^[24]。因此, 抑制该通路的激活可以缓解肝细胞损伤, 干预肝纤维化的进展。LIU等^[25]报道天然分子异甘草素通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路促进自噬, 从而减轻小鼠的代谢功能障碍相关脂肪性肝炎和肝纤维化。在本研究中检测PI3K/AKT/mTOR信号通路蛋白的表达情况, 结果发现ADSCs组和Res预处理的ADSCs组中PI3K、AKT和mTOR蛋白表达水平降低, 表明该通路中蛋白的表达被抑制, 与上述LIU等研究结果一致, 而在Res预处理的ADSCs治疗基础上加入自噬抑制剂3-MA后, Res预处理的ADSCs对PI3K、AKT和mTOR蛋白的抑制作用被减弱, 表明Res预处理的ADSCs可能通过调节PI3K/AKT/mTOR信号通路, 缓解CCl₄诱导的BRL-3A细胞损伤。

综上所述, 20 $\mu\text{mol/L}$ Res预处理的ADSCs可以通过激活自噬缓解肝细胞损伤, 并且这种自噬的增加可能与抑制PI3K/AKT/mTOR通路有关。此外,

由于本研究是基于体外细胞实验得到的结果, 后续应在动物体内实验中加以验证以为Res预处理的ADSCs治疗肝脏疾病提供更好的理论和实验依据。

参考文献 (References)

- [1] BYRNES K, BAILEY N T, BARAL K, et al. Impaired hepatic autophagy exacerbates hepatotoxin induced liver injury [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 71.
- [2] DENG X, LI Y, CHEN Y, et al. Paeniflorin protects hepatocytes from APAP-induced damage through launching autophagy via the MAPK/mTOR signaling pathway [J]. Cell Mol Biol Lett, 2024, 29(1): 119.
- [3] LU J, CHEN Z, BU X, et al. Elaidic acid induced hepatocyte pyroptosis via autophagy-CTSB-NLRP3 pathway [J]. Food Chem Toxicol, 2023, 181: 114060.
- [4] YANG A, ZENG W, ZHANG H, et al. Homocysteine accelerates hepatocyte autophagy by upregulating TFEB via DNMT3b-mediated DNA hypomethylation [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2023, 55(8): 1184-92.
- [5] BHOGAL R H, WESTON C J, CURBISHLEY S M, et al. Autophagy: a cyto-protective mechanism which prevents primary human hepatocyte apoptosis during oxidative stress [J]. Autophagy, 2012, 8(4): 545-58.
- [6] NAHAR S, NAKASHIMA Y, MIYAGI-SHIOHIRA C, et al. Cytokines in adipose-derived mesenchymal stem cells promote the healing of liver disease [J]. World J Stem Cells, 2018, 10(11): 146-59.
- [7] ZHANG Z, ZHANG M, SUN Y, et al. Effects of adipose derived stem cells pretreated with resveratrol on sciatic nerve regeneration in rats [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 5812.
- [8] LEI L T, CHEN J B, ZHAO Y L, et al. Resveratrol attenuates senescence of adipose-derived mesenchymal stem cells and restores their paracrine effects on promoting insulin secretion of INS-1 cells through Pim-1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(6): 1203-13.
- [9] YU L, HU X, XU R, et al. Piperine promotes PI3K/AKT/mTOR-mediated gut-brain autophagy to degrade α -synuclein in Parkinson's disease rats [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 322: 117628.
- [10] MA Y, JIAO Z, LIU X, et al. Protective effect of adipose-derived stromal cell-secretome attenuate autophagy induced by liver ischemia-reperfusion and partial hepatectomy [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 427.
- [11] PU X, FU Y, YANG Y, et al. Ginkgo biloba extract alleviates CCl₄-induced acute liver injury by regulating PI3K/AKT signaling pathway [J]. Heliyon, 2024, 10(4): e26093.
- [12] BEN HSOUNA A, DHIBI S, DHIFI W, et al. Chemical composition and hepatoprotective effect of essential oil from Myrtus communis L. flowers against CCl₄-induced acute hepatotoxicity in rats [J]. RSC Adv, 2019, 9(7): 3777-87.
- [13] 孙莹莹, 刘玉梅, 刘永昌, 等. 褪黑激素体外对脂肪间充质干细胞增殖及向施万样细胞分化的影响[J]. 中国细胞生物学学报(SUN Y Y, LIU Y M, LIU Y C, et al. Effects of melatonin on proliferation and Schwann-like cell differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2022, 44(7): 1330-8.
- [14] CHAN K W, HO W S. Anti-oxidative and hepatoprotective ef-

- fects of lithospermic acid against carbon tetrachloride-induced liver oxidative damage *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(2): 673-80.
- [15] GAO Q, GU Y, JIANG Y, et al. Long non-coding RNA Gm2199 rescues liver injury and promotes hepatocyte proliferation through the upregulation of ERK1/2 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 602.
- [16] SEGLEN P O, GORDON P B. 3-methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(6): 1889-92.
- [17] EHRLICH A, DUCHE D, OUEDRAOGO G, et al. Challenges and opportunities in the design of liver-on-chip microdevices [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2019, 21: 219-39.
- [18] TREFTS E, GANNON M, WASSERMAN D H. The liver [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(21): R1147-r51.
- [19] WANG Y, PIAO C, LIU T, et al. Exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells promote regeneration of injured liver in minipigs [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(12): 6604.
- [20] AL-AZAB M, IDIATULLINA E, SAFI M, et al. Enhancers of mesenchymal stem cell stemness and therapeutic potency [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114356.
- [21] SHEN Y, MALIK S A, AMIR M, et al. Decreased hepatocyte autophagy leads to synergistic IL-1 β and TNF mouse liver injury and inflammation [J]. *Hepatology*, 2020, 72(2): 595-608.
- [22] 魏砚明, 任晋宏, 栾智华,等. 多种细胞自噬调节剂对自噬标记物LC3II及p62表达的影响[J]. 中国药科大学学报(WEI Y M, REN J H, LUAN Z H, et al. The effects of various cell autophagy regulators on the expression of autophagy markers LC3 II and p62 [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*), 2018, 49(3): 341-7.
- [23] XIU A Y, DING Q, LI Z, et al. Doxazosin attenuates liver fibrosis by inhibiting autophagy in hepatic stellate cells via activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 3643-59.
- [24] SHEN M, GUO M, WANG Z, et al. ROS-dependent inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling is required for Oroxylin A to exert anti-inflammatory activity in liver fibrosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106637.
- [25] LIU R, ZHANG Y, LIU M, et al. Natural molecule isoliquiritigenin mitigates MASH and liver fibrosis in mice by promoting autophagy through the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Nutr Biochem*, 2025, 136: 109808.