creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:48009-200000371491

이학석사 학위논문

짧은 사슬 지방산 처리에 따른 폐 섬유아세포 활성 억제 연구

A Study on the Repression of Human Lung Fibroblast activation by Short Chain Fatty Acid

울 산 대 학 교 대 학 원

생 명 과 학 과

남 소 미

짧은 사슬 지방산 처리에 따른 폐 섬유아세포 활성 억제 연구

指 導 敎 授　백 승 훈

이 論文을 理學碩士 學位 論文으로 제출함

2 0 2 1 年　2 月

蔚 山 大 學 校　大 學 院

生 命 科 學 科

南 昭 美

南 昭 美 의 理學碩士 學位 論文을 認准함

審査委員 長　박 정 우　(인)

審 査 委 員　정 수 월　(인)

審 査 委 員　백 승 훈　(인)

蔚 山 大 學 校　大 學 院

2 0 2 1 年　2 月

국 문 요 약

섬유증은 지속적인 손상에 의해 상피세포가 재생되지 못하고 콜라겐 등의 물질이 축적되어 발생한다. 그 중에서도 폐 섬유증은 확실한 원인과 치료법이 밝혀지지 않았는데, 섬유증에서 중요한 역할을 하는 섬유아세포는 신체 내 결합 조직의 세포로 세포 외 기질의 구조 단백질인 콜라겐, 파이브로넥틴 등을 생산하여 세포 치유에 중요한 역할을 하지만 일부 밝혀지지 않은 이유로 활성화가 제어되지 않아 섬유화 반응을 일으키는 세포이다. 장내세균에 의해 생성되는 짧은 사슬 지방산 (Short Chain Fatty Acid, SCFA)은 식이섬유 대사의 부수산물로서 항 염증작용이 있는 물질로 알려져 있으며, 짧은 사슬 지방산은 천식에도 효과가 있다. 본 연구를 통해 우선 Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1)을 이용한 인간 폐 섬유아세포 세포주 (MRC5)의 활성화 최적조건을 확립하였다. 확립한 TGF-β1 에 의한 활성화 조건에서 3 가지 SCFAs (C2, C3 그리고 C4) 중 C4 (Sodium butyrate)가 섬유아세포의 활성을 가장 강하게 억제함을 보였다. 또한 C4 의 처리는 TGF-β1 에 의한 미토콘드리아 elongation 을 억제함 으로써 미토콘드리아 다이나믹스를 회복시켰다. 이러한 현상은 C4 처리에 의해 유도되는 막전위 활성화와 미토콘드리아 기능 조절에 중요한 PGC1α의 발현 증가와 관련이 있을 것으로 추정한다. 따라서 향후 연구에선 미토콘드리아 활성화와 관련된 대사체의 변화 관찰과 관련 유전자 발현 변화에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

목 차

국문요약

목차

Ⅰ. 서론 ····· 4

Ⅱ. 실험재료 및 방법 ····· 6

1. 시약 ····· 6
2. 세포 배양 ····· 6
3. 세포 처리 및 처리 시약 ····· 6
4. 세포에서 RNA 추출 및 qRT-PCR(quantitative real-time PCR) ····· 6
5. 세포에서 단백질 정량 및 Western blot ····· 7
6. 미토콘드리아 Dynamics 측정 ····· 7
7. 미토콘드리아 ROS 측정 ····· 8
8. 미토콘드리아 막 전위 측정 ····· 8
9. Fluorescence microscope analysis ····· 8
10. 통계처리 ····· 8

Table 1 ····· 10

Ⅲ. 결과 ····· 11

1. TGF-β1 induced myofibroblast differentiation of MRC-5 lung fibroblasts ····· 11

2. Short Chain Fatty Acid (SCFA) repressed myofibroblastic transformation under TGF- β1 treatment ····· 13

3. C4 treatment inhibited fibroblast activation induced by TGF-β1 treatment ····· 15

4. TGF-β1-mediated mitochondrial elongation was inhibited by C4 treatment ··· 17

5. C4 treatment increased mitochondrial membrane potentials and ROS accumulation in TGF-b1 treated lung fibroblasts ····· 19

6. TGF-β1 and C4 co-treatment increased PGC1α mRNA level ····· 21

Ⅳ. 고찰 ····· 23

Ⅴ. 참고문헌 ····· 27

영문요약

Ⅰ. 서론

인구의 고령화로 인해 폐 질환을 포함한 연령과 관련된 질병의 발생률이 증가하고 있는데, 그 중 특발성 폐 섬유증 (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)은 대표적인 노화의 질병으로 폐기능의 감소 및 높은 사망률을 가지고 있다. 섬유증은 지속적인 손상에 의해 상피세포가 재생되지 못하고 콜라겐 등의 물질이 축적되어 발생한다. [1] 섬유증에 중요한 역할을 하는 세포인 섬유아세포는 신체에서 발견되는 결합 조직의 가장 일반적인 세포로 구조 단백질(콜라겐, 파이브로넥틴), 접착 단백질, glycosaminoglycans 및 proteoglycan 과 같은 물질들을 생산하는 세포로 조직 섬유증의 핵심이 되는 세포다. 또한, 섬유아세포는 활성화 되여 근섬유아세포로 분화되게 되는데, 이러한 섬유아세포의 활성화는 세포 치유에 중요한 역할을 하지만 일부의 경우 밝혀지지 않은 이유로 활성화가 제어되지 않아 섬유화 반응을 일으킨다. [2]

신체 내 조직에 여러가지 요인에 의해 자극을 받아 손상이 일어나면 염증 및 치유반응이 일어나게 되는데, 이 과정이 지속되는 경우 조직에 섬유화가 일어나게 된다. 그중 폐 조직에 생기는 섬유화는 지속적인 손상이 일어나면 상피세포 재생 경로에 이상이 생겨 손상이 일어난 부분의 성장인자나 섬유화 매개물질을 조절하는데 불균형이 발생하여 손상부위에 과도하게 재생반응이 일어나 폐 섬유화가 발생하게 된다. [24,25] 뿐만 아니라 다른 조직과는 다르게 폐 섬유증의 경우 회복이 거의 불가능하기 때문에 많은 연구가 이루어 지고 있다. 하지만, 폐 섬유증의 경우 확실한 발생 경로나 원인 치료법이 밝혀지지 않았다.

노화된 폐의 손상 반응에서 미토콘드리아의 기능 장애가 나타난다는 보고가 있다. 특히 폐포 상피 세포, 섬유아세포, 면역세포가 폐 섬유증과 관련된 미토콘드리아의 기능 장애에 영향을 미친다고 알려져 있다. 기능 장애를 가진 미토콘드리아는 대개 미토파지 (Mitophagy)라는 포식 경로를 통해 처리되는데, 폐포 상피 세포에서 과도한 미토파지가 발생하는 경우 섬유증을 촉진하게 되는데, 이러한 반응이 담배 연기로 인한 폐 기종에서 발견된 바가 있다. 섬유아세포는 특정 확경 요인에 만성적으로 노출된 경우 섬유아세포가 노화되게 되며, 미토콘드리아 기능 장애에는 SASP(Senescence-associated secretory phenotype)가 동반되는 것이 특징이다. 또한, ROS 를 포함한 섬유 세포에서 생성되는 인자들은 상피세포의 손상을 지속시킨다.

폐 섬유증을 유발하는 물질로는 TGF-β1 이 대표적인데, TGF-β1(Transforming Growth Factor-β1)은 활성화되면 섬유아세포를 모으고 증식을 유도한다. [16] 또한, 여러가지 섬유성 사이토카인의 발현을 증가시켜 섬유화를 촉진한다. [22,23]

짧은 사슬 지방산 (Short Chain Fatty Acid, SCFA)은 탄소수가 6 개 이하인 지방산으로 장내 세균에 의해 생성되며 식이섬유 대사의 부수산물로서 C2 (Sodium Acetate), C3 (Sodium Propionate), C4 (Sodium Butyrate) 가 대표적이다. [4,5] 또한, 항염증작용이 있는 물질로 알려져 있고, 짧은 사슬 지방산은 장 내강을 거쳐 혈액을 통해 신체 내 조직들로 수송되며 수송된 짧은 사슬 지방산은 에너지 대사나 지질대사와 같은 물질대사에 영향을 미치며 천식에도 효과가 있고 알려져 있다. [18,19,20,21] H 이전 연구에서 특발성 폐 섬유증을 가진 환자들의 기관지 폐포 세척액에서 높은 수준의 박테리아가 검출되며 박테리아가 많을수록 생존률이 감소한다는 보고가 있다. [6,7] 또한, 짧은 사슬 지방산은 히스톤디아세틸레이즈 인 HDAC 을 억제한다고 알려져 있는데, HDAC 은 일반적으로 전사 억제와 관련이 있는데, 그 중 HDAC4 가 TGF-β에 의한 α-SMA 의 발현을 증가시킨다는 연구가 있다. [27]

이런 다양한 연구 사례를 통해 폐 섬유증에서 미토콘드리아의 기능 장애 및 특이적 박테리아 분포에 의한 에너지, 지질 대사의 변화가 발생한다고 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서는 폐 섬유증을 일으키는데 있어 중요한 세포인 폐 섬유아세포에 TGF-β1 을 처리하여 세포를 활성화시킨 후, 미토콘드리아 기능에 어떤 문제가 생기는지 알아보고, 짧은 사슬 지방산 중 C4 가 TGF-β1 에 의한 섬유아세포 활성화 및 미토콘드리아 기능에 어떤 영향을 끼치는지 알아보고자 한다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 시약

본 실험에서 Western Blot 및 Immunofluorescence 에 사용된 1 차 항체는 anti-β-actin (DSHB), anti-Col1A1 (southern biotech), anti-α-SMA (abcam), anti-PGC1α (NOVUS)를 사용하였다. Western Blot 에 사용한 2 차 항체는 anti-mouse / rabbit / Goat IgG (Jackson ImmunoResearch)를 사용하였고, Immunofluorescence 에 사용한 2 차 항체는 anti-rabbit-TRITC (Molecular probe), anti-Goat-TRITC (Jackson ImmunoResearch)를 사용하였다.

2. Cell culture

연구에 사용한 세포는 사람 폐의 섬유아세포인 MRC5 (CCL-171, ATCC)이다.
MRC5 세포 배양 시에는 MEM 배지 (SH30024.01, Hyclone)에 10% FBS (welgene)과 1% 페니실린-스트렙토마이신 (welgene)을 사용하였고, 37℃, 5% CO_2 incubator 에서 배양하였다.

3. 세포 처리 및 처리 시약

100mm dish 기준 $4x10^5$ 개, 60mm dish 기준 $1x10^5$ 개의 세포를 깔아준 후, 2 일 뒤에 물질을 처리한다. MRC5 세포에 물질을 처리 시에는 MEM 배지에 0.5% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신을 넣어 물질 처리용 배지를 만든 후, TGF-β1 (peprotech, 100-21 10ug), C2 (Sodium acetate, S2889, Sigma), C3 (Sodium propionate, P1880, Sigma), C4 (Sodium butyrate, B5887, Sigma)를 넣어 세포에 처리하였다. TGF-β1 은 5ng/ml, C4 는 5mM 의 농도로 처리하였다.

4. 세포에서 RNA 추출 및 qRT-PCR (quantitative reat-time PCR)

물질 처리가 끝난 세포의 RNA 를 Lysis buffer (QIAzol Lysis reagent, 79306, QIAGEN)를 이용하여 정제하였다. 정제한 RNA 를 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, ABS)를 사용하여 cDNA 를 합성하고, Luna Universal qPCR

Master Mix (M3003, NEB)를 사용하여 qRT-PCR 을 StepOnePlus Real Time system (Applied Biosystems, USA)으로 진행하였다. 대조군으로 사용한 housekeeping gene 은 β-actin 이고, 사용한 primer 서열은 Table 1 에 표시하였다.

5. 세포에서 단백질 정량 및 Western blot

MRC5 cell 에 TGF-β1 5ng/ml 로 처리한 후 시간별로 모아서 13000rpm 으로 3 분동안 4℃에서 원심분리 하여 세포의 pellets 을 얻은 후, NP-40 lysis buffer (1% Nonidet P-40, 0.05% SDS, 50mM Tris-cl pH7.5, 150mM Nacl, 0.5mM Sodium Vanadate, 100mM Sodium fluoride, 50mM b-glyserolphosphate, Thermo protease inhibitor)를 넣고 sonication 하여 용해시킨다. 이후, 13000rpm 으로 15 분동안 4℃에서 원심분리를 하여 상층액을 BCA assay 에 사용하였다. BCA protein assay reagent (Thermo)를 이용하여 정량 한 후, 동량의 단백질 (20 μg)을 SDS-PAGE 로 크기 별로 분리하고, Nitrocellulose membrane 과 PVDF membrane 으로 Transfer 하였다. 항체와 단백질의 비 특이적 결합을 막기 위한 blocking 에는 5% Skim milk in TBS-T 를 사용하였고, 상온에서 1 시간 동안 교반 하였다. 1 차 항체를 Skim milk in TBS-T 혹은 BSA in TBS-T solution 에 희석시켜 4℃에서 하루동안 반응시키고, 5 분씩 3 회 TBS-T 로 세척한 후 2 차 항체를 Skim milk in TBS-T solution 에 희석시켜 상온에서 3 시간 반응시킨다. 반응 후 5 분씩 5 회 TBS-T 로 세척한 후 membrane 을 SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo)를 사용해서 Chemidoc 을 사용하여 특이적 단백질을 확인하였다.

6. 미토콘드리아 Dynamics 측정

Confocal dish (SPL, 101350)를 37℃에서 3 시간동안 Collagen 0.01% (in PBS)를 coating 한 후 MRC5 cell 을 $5.5x10^4$ 으로 깔고 2 일 후 chemical 을 처리한다. 이후 세포 배지에 Mitotracker red (25 nM)과 Hoechst (5 μg/ml)로 20 분간 염색한 후 phenol red (-) MEM (gibco)으로 배지를 교체한 후 confocal laser microscope 로 미토콘드리아를 관찰한다.

7. 미토콘드리아 ROS 측정

Confocal dish (SPL, 101350)를 37℃에서 3 시간동안 Collagen 0.01% (in PBS)를 coating 한 후 MRC5 cell 을 $5.5x10^4$ 으로 깔고 2 일 후 chemical 을 처리한다. 이후 세포 배지에 MitoSOX-red (5uM)과 Hoechst (5ug/ml)로 10 분간 염색한 후 phenol red (-) MEM (gibco)으로 배지를 교체한 후 confocal laser microscope 로 미토콘드리아 ROS 를 관찰한다.

8. 미토콘드리아 막 전위 측정

Confocal dish (SPL, 101350)를 37℃에서 3 시간동안 Collagen 0.01% (in PBS)를 coating 한 후 MRC5 cell 을 $5.5x10^4$ 으로 깔고 2 일 후 chemical 을 처리한다. 이후 세포 배지에 JC-1 (1.38 μg/ml)과 Hoechst (5 μg/ml)로 1 시간 염색한 후 phenol red (-) MEM (gibco)으로 배지를 교체한 후 confocal laser microscope 로 미토콘드리아 membrane potential 을 관찰한다.

9. Fluorescence microscope analysis

6 well plate 에 round cover glass 를 얹고 37℃에서 3 시간동안 Collagen 0.01% (in PBS)를 coating 한다. MRC5 cell 을 코팅한 6well plate 에 배양하고, 물질을 처리한 다음 PBS 로 2 번 세척한 후 3.5% PFA, 혹은 Methanol 을 사용하여 고정한다. Blocking 은 3% BSA in PBS 를 이용하여 실온에서 1 시간 진행하고, 이후 1% BSA in PBS 에 1 차 항체를 희석하여 4℃에서 하루동안 반응시키고, 5 분씩 2 번 PBS 로 세척 후 1% BSA in PBS 에 2 차 항체를 희석하여 실온에서 1 시간 반응시킨다. 이후 5 분씩 2 번 PBS 로 세척 후 10X DAPI 를 PBS 에 희석하여 실온에서 10 분간 반응시킨 후, 1 회 PBS 세척을 하고, 물기를 제거한 cover glass 를 mounting solution (Wako)을 떨어뜨린 slide glass 에 올려 slide 를 제작하였다. 공초점 레이저 현미경 (Confocal laser microscope)으로 관찰하여 결과를 분석하였다.

10. 통계처리

표시된 결과는 3 번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균 (mean)과 표준오차 (SEM)을 산출하여 결과를 표시하였다. 실험결과의 통계처리는 Student's *t*-test에 준하여 처리하였으며 *P*-value가 최대치 0.05 ($P < 0.05$) 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

Table 1. qPCR primers

Gene name	5' oligonucleotide	3' oligonucleotide	species
Col1A1	CCTGGATGCCATCAAAGTCT	CGCCATACTCGAACTGGAAT	human
Col3A1	CTTCTCTCCAGCCGAGCTTC	GTAGTCTCACAGCCTTGCGT	human
a-SMA	AATGCAGAAGGAGATCACGG	TCCTGTTTGCTGATCCACATC	human
Fibronectin1	TGTCAGTCAAAGCAAGCCCG	TTAGGACGCTCATAAGTG	human
β-actin	TCCCCCAACTTGAGATGTATGAAG	AACTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGG	human
PGC1-α	CCAAAGGATGCGCTCTCGTTCA	CGGTGTCTGTAGTGGCTTGACT	human

Ⅲ. 결과

1. TGF-β1 induced myofibroblast differentiation of MRC-5 lung fibroblasts

사람 섬유아세포인 MRC5 세포에서 TGF-β1 을 처리하였을 때, 섬유아세포가 활성화되는지를 확인하기 위해 TGF-β1 를 1ng/ml, 2ng/ml, 5ng/ml 의 농도로 48 시간 동안 처리하였다. 또한, 시간이 지남에 따라 섬유아세포가 근섬유아세포로 분화되는 정도를 비교하기 위해 TGF-β1 를 각각 1ng/ml, 5ng/ml 의 농도로 0,6,12,24,48 시간으로 처리하였다. 섬유아세포가 활성화되며 생성되어 발현되며 섬유화 지표로 알려져 있는 Col1A1 과 α-SMA 를 단백질 수준에서 확인하였을 때, TGF-β1 의 농도에 따른 차이는 크게 보이지 않았지만, TGF-β1 을 처리한 시간에 따라 근섬유아세포로의 분화가 증가된 것을 확인할 수 있었다. (Fig 1A,B)

뿐만 아니라 RNA 수준도 Col1A1, Col3A1, α-SMA, Fibronectin 의 발현도가 TGF-β1 을 처리한 시간에 따라 증가하였고(Fig 1C), 세포 내에서 Col1A1 과 α-SMA 의 level 이 어떻게 변화 하는지 확인하였는데 이 또한 TGF-β1 을 처리한 경우에 발현도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. (Fig 1D) 이를 통해 MRC5 cell 에서 TGF-β1 에 근섬유아세포로의 분화가 증가하는 것을 확인하였다.

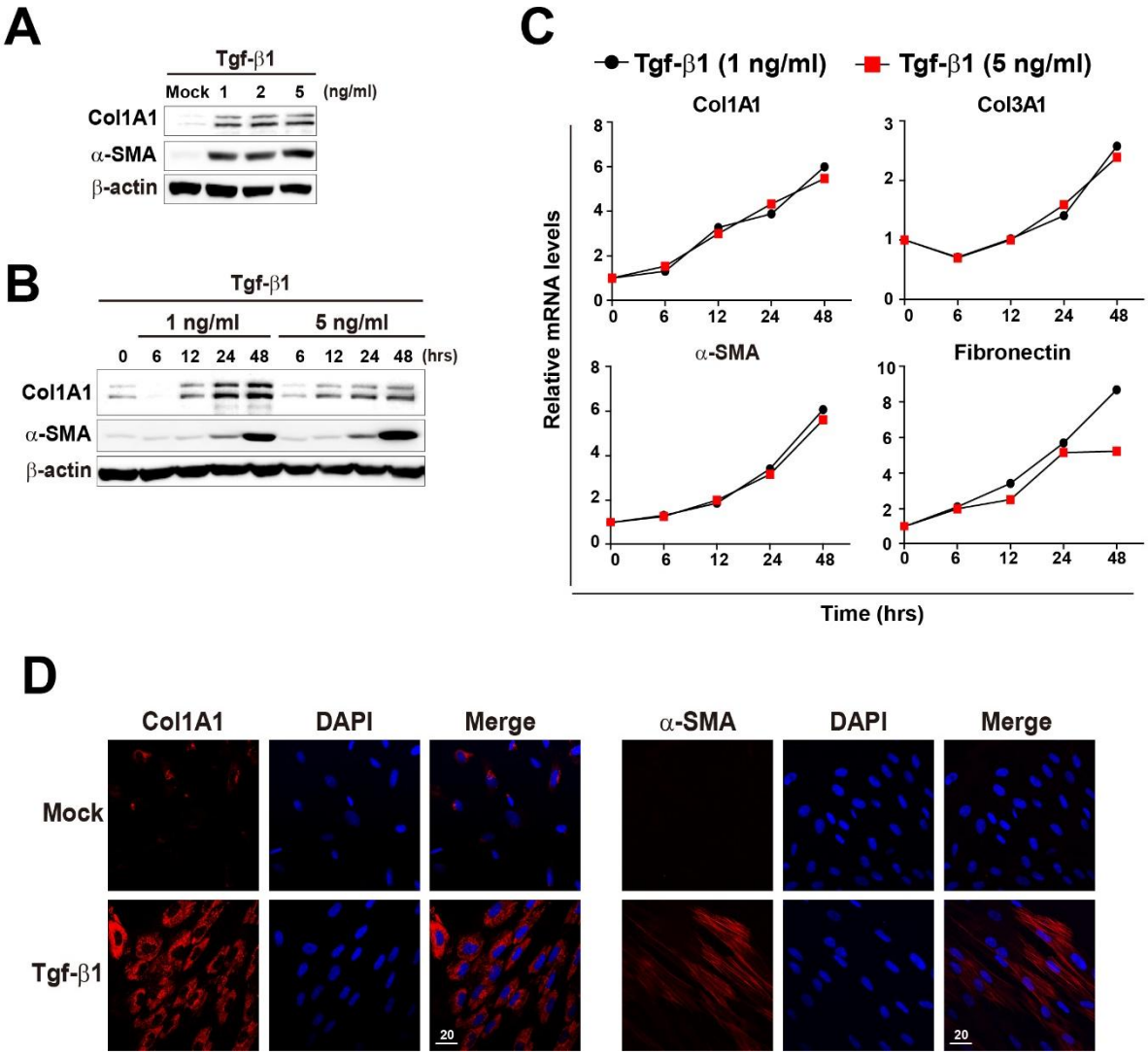


Figure 1. TGF-β1 induced myofibroblast differentiation of MRC-5 lung fibroblasts.

Protein expression levels of Fibrosis markers (Col1A1, and α-SMA) in MRC5 cells. (a) Indicated amounts of TGF-β1(1,2 and ~5 ng/ml) were treated for 48h. (b) TGF-β1 (1 and 5 ng/ml) were treated for indicated times. (c) mRNA levels of Fibrosis markers (Col1A1, Col3A1, α-SMA and Fibronectin) under TGF-β1 (1,5 ng/ml) treatments for indicated times. (d) MRC5 cells were stained with Heochest33258 and anti-Col1A1, anti-α-SMA antibody after TGF-β1 treatment and then analyzed by confocal fluorescence microscope. Scale bar = 20 μm

2. Short Chain Fatty Acid (SCFA) repressed myofibroblastic transformation under TGF- β1 treatment

TGF-β1 에 의해서 MRC5 가 활성화 되어 근섬유아세포로 분화되는 것을 확인했는데 (Fig 1), 이때 짧은 사슬 지방산을 함께 처리하면 근섬유아세포로의 분화에 어떤 영향을 끼치는지를 확인하기 위해 짧은 사슬 지방산 중 C2 (Sodium Acetate), C3 (Sodium Propionate) , C4 (Sodium Butyrate) 를 농도별로 처리하여 RNA 수준을 확인 하였다. 각 짧은 사슬 지방산을 1, 5, 10 mM 의 농도로 처리했을 때 농도가 섬유화 지표인 Col1A1, Col3A1, α-SMA, Fibronectin 의 발현도가 감소하는 것을 확인하였고, 그 중 C4 를 처리한 그룹이 섬유화 지표의 발현도가 가장 많이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. (Fig 2A) 이에 따라 폐 섬유아세포에서 TGF-β1 에 의해 근섬유아세포로의 분화가 짧은 사슬 지방산들에 의해 감소된다는 것을 확인했다.

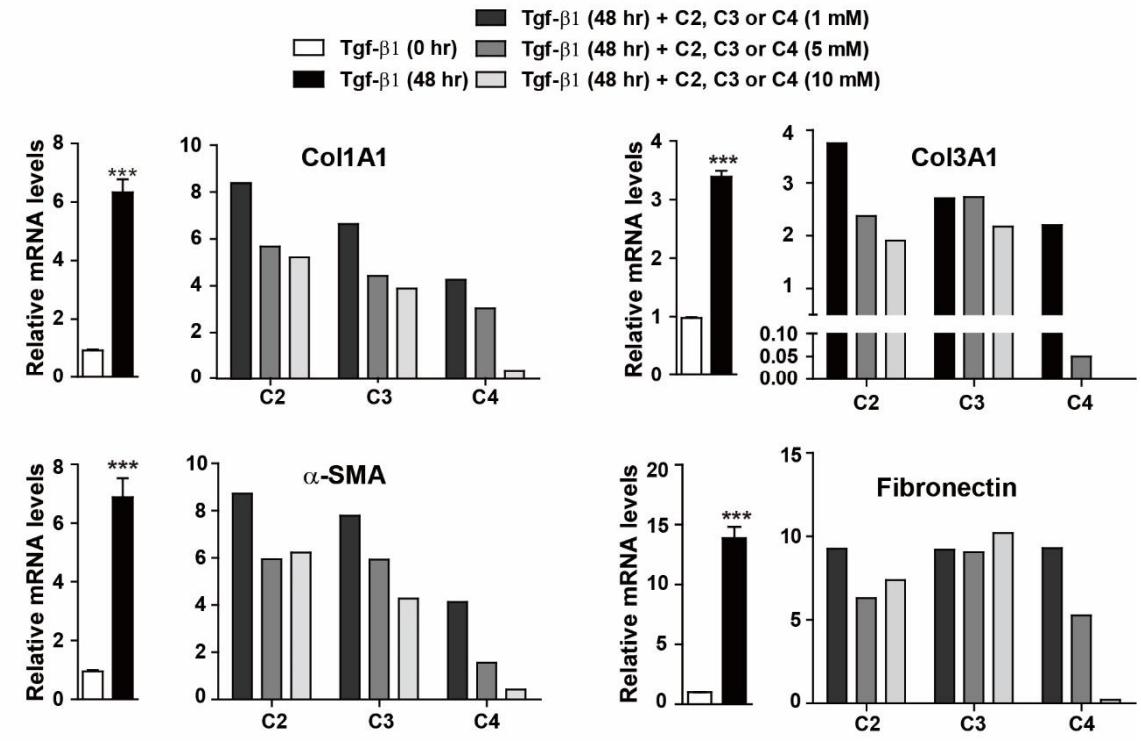


Figure 2. Short Chain Fatty Acid (SCFA) repressed myofibroblastic transformation under TGF-β-1 treatment

mRNA levels of Col1A1, Col3A1, a-SMA, Fibronectin in TGF-β1 (5 ng/ml) treated MRC5 cellsfor 48hr and TGF-β1 (5 ng/ml) and SCFA C2, C3, or C4 (1,2, and 5 mM) co-treated MRC5 cells for 48hr. *P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001 vs. control

3. C4 treatment inhibited fibroblast activation induced by TGF-β1 treatment

C4 를 처리함에 따라 TGF-β1 에 의해 발현된 섬유화 지표의 감소를 확인하였다. RNA (Fig 3A) 및 단백질 (Fig 3B) 수준에서 TGF-β1 (5 ng/ml)을 시간에 따라 처리하였을 때, 섬유화 지표들의 발현도가 점차적으로 증가하는 것을 확인하였고, C4 (5mM)을 함께 처리한 경우, 섬유화 지표들의 발현도가 TGF-β1 만을 처리한 그룹보다 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 세포 내에서 Col1A1 과 α-SMA 의 level 이 어떻게 변화하는지 (Fig 3C) 확인하였는데 TGF-β1 만 처리한 그룹에서는 발현도가 증가하고, C4 를 함께 처리한 그룹에서는 발현도가 감소하는 것을 확인하였다.

TGF-β1 과 C4 를 함께 처리한 그룹에서 섬유화 지표들이 감소하는 것을 통해, C4 가 TGF-β1 에 의한 섬유아세포의 활성화를 감소시키는 것을 알 수 있었다.

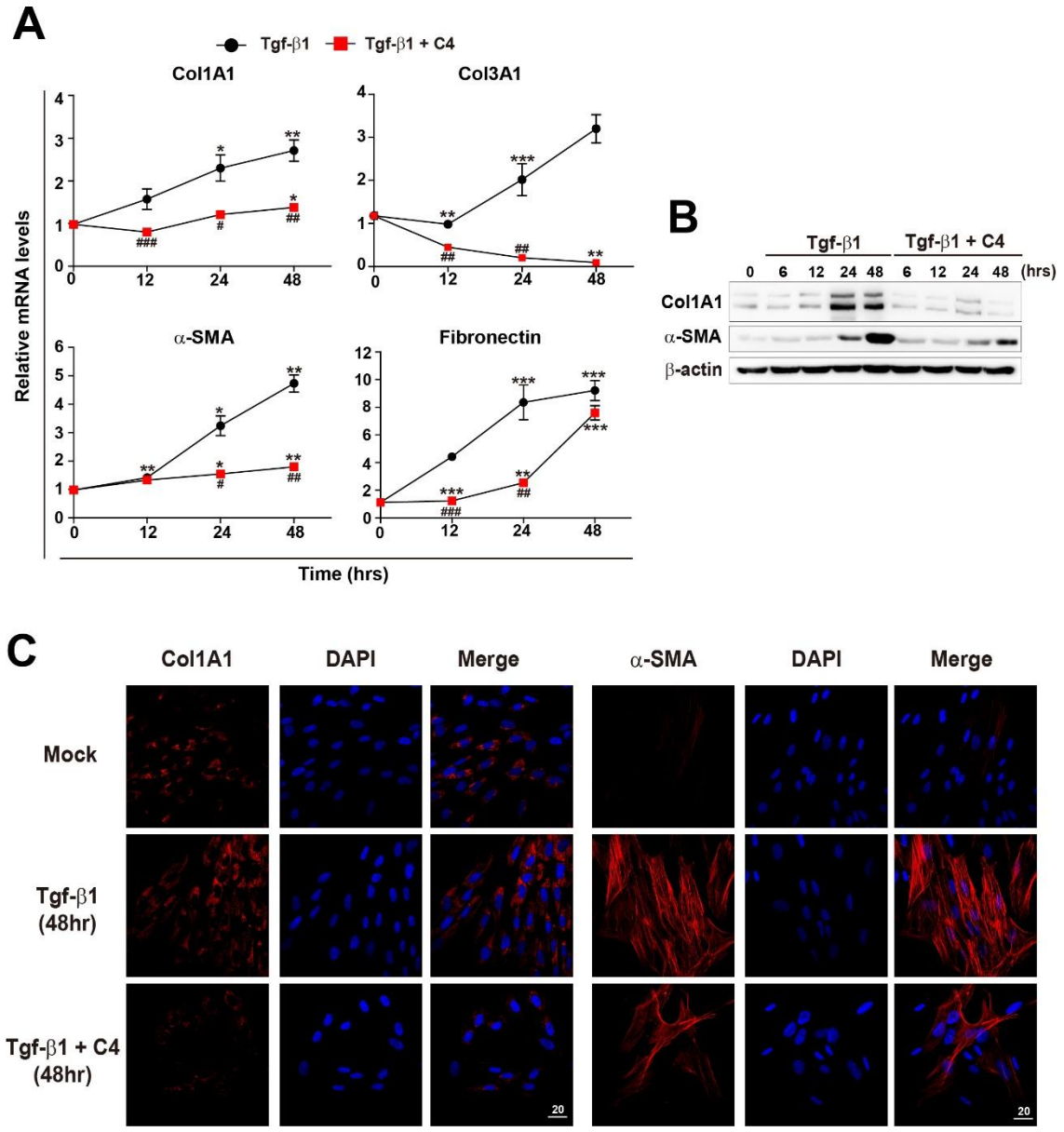


Figure 3. C4 treatment inhibited fibroblast activation induced by TGF-β1 treatment

(a) mRNA levels and (b) Protein levels of fibrosis markers in MRC5 cells treated with TGF-β1 (5 ng/ml) or TGF-β1 (5 ng/ml) and C4 (5 mM) together for indicated times. (c) TGF-β1-treated or TGF-β1 and C4 co-treated MRC5 cells were stained with Heochest 33258 and anti-Col1A1, anti-α-SMA antibody. And then they were analyzed by confocal fluorescence microscope. *P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001 vs. control and #P<0.05, ##P<0.01, and ###P<0.001 TGF-β1 vs co-treatment with TGF-β1 and C4, Scale bar = 20 μM

4. TGF-β1-mediated mitochondrial elongation was inhibited by C4 treatment

MRC5 세포에서 TGF-β1 에 의한 섬유아세포의 활성화가 C4 에 의해 감소되는 것을 확인했는데 (Fig 3), 이 현상이 미토콘드리아와 어떤 관련이 있는지 확인하기 위해 미토콘드리아의 다이나믹스를 확인하였다. 미토콘드리아를 막전위에 따라 염색하는 Mitotracker 를 사용하여 MRC5 세포의 미토콘드리아의 다이나믹스를 확인하였다. 각각 control, TGF-β1 (5 ng/ml), TGF-β1, C4 (5 mM)을 함께 처리한 그룹으로 나누어 미토콘드리아의 다이나믹스를 확인 (Fig 4A) 해 보니, TGF-β1 을 처리한 그룹에서 미토콘드리아의 길이가 길어져 다이나믹스가 붕괴된 것을 확인할 수 있었다. 또한, C4 를 함께 처리한 그룹에서는 미토콘드리아의 다이나믹스가 원래 상태와 같이 회복되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 TGF-β1 을 처리한 경우 미토콘드리아의 morphology 가 길어지며 다이나믹스가 붕괴되지만, TGF-β1 과 함께 C4 를 처리한 경우 미토콘드리아의 다이나믹스가 다시 회복된다는 것을 알 수 있다.

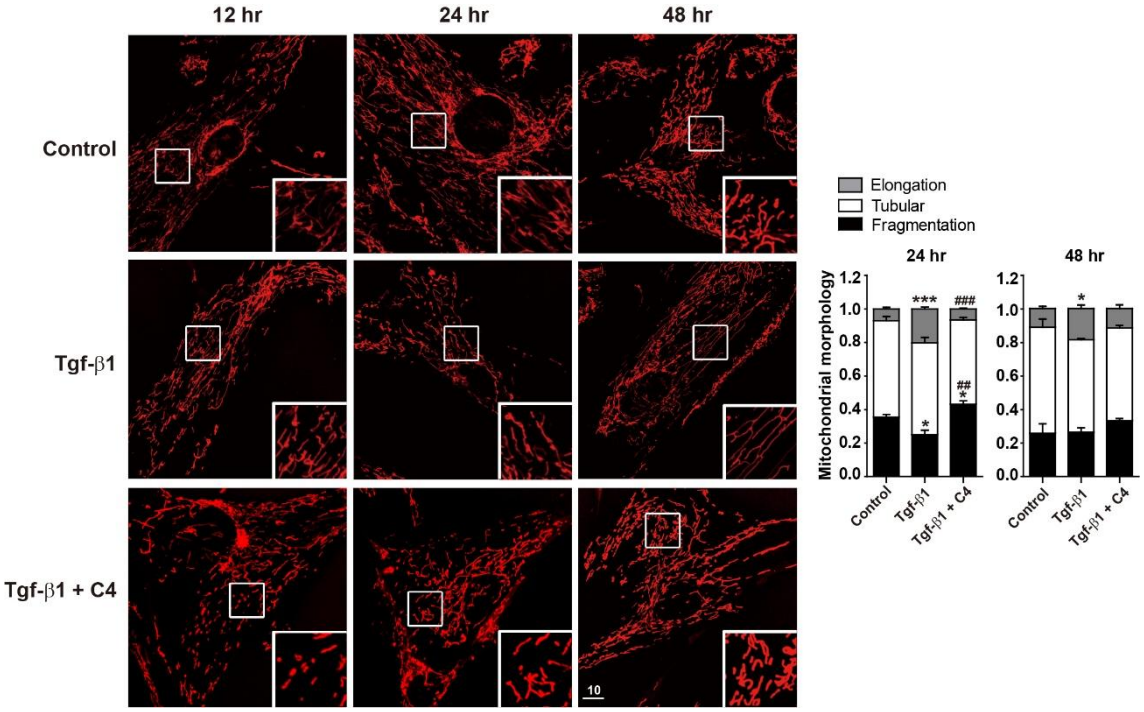


Figure 4. TGF-β1-mediated mitochondrial elongation was inhibited by C4 treatment

TGF-β1-treatedor TGF-β1 and C4 co-treated MRC5 cells were stained Heochest33258 and mitotracker red. They were then analyzed by confocal fluorescence microscope. Data are Mean ± SEM; n = 4, *P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001 vs. control and #P<0.05, ##P<0.01, and ###P<0.001 TGF-β1 vs co-treatment with TGF-β1 and C4. Scale bar = 10μM

5. C4 treatment increased mitochondrial membrane potentials and ROS accumulation in TGF-β1 treated lung fibroblasts

TGF-β1과 C4를 함께 처리한 경우 미토콘드리아 다이나믹스가 회복되는 것을 통해 미토콘드리아 기능에 변화가 있을 것이라 예상할 수 있었다. 그래서 미토콘드리아 ROS (Fig 5A)와 막전위 (Fig 5B)의 변화를 각각 MitoSOX 와 JC-1 을사용하여 측정하였다. MitoSOX 와 JC-1 을 이용하여 미토콘드리아 ROS 와 미토콘드리아 막전위를 측정하고, Hoechst 33258 을 이용하여 핵을 염색하였다. Fig 5A 에서 미토콘드리아 ROS 가 컨트롤에 비해 TGF-β1 을 단독 처리하거나, C4 를 함께 처리한 경우 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, Fig 5B 에서 미토콘드리아 막전위가 TGF-β1 을 단독 처리한 경우에 처리 시간이 길어질수록 증가하고, C4 를 함께 처리하면 더 많이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이에 따라 TGF-β1 과 함께 C4 를 처리하였을 때, ROS 나 막전위가 증가하는 등 회복을 위해 미토콘드리아의 활성도가 증가한다고 볼 수 있다.

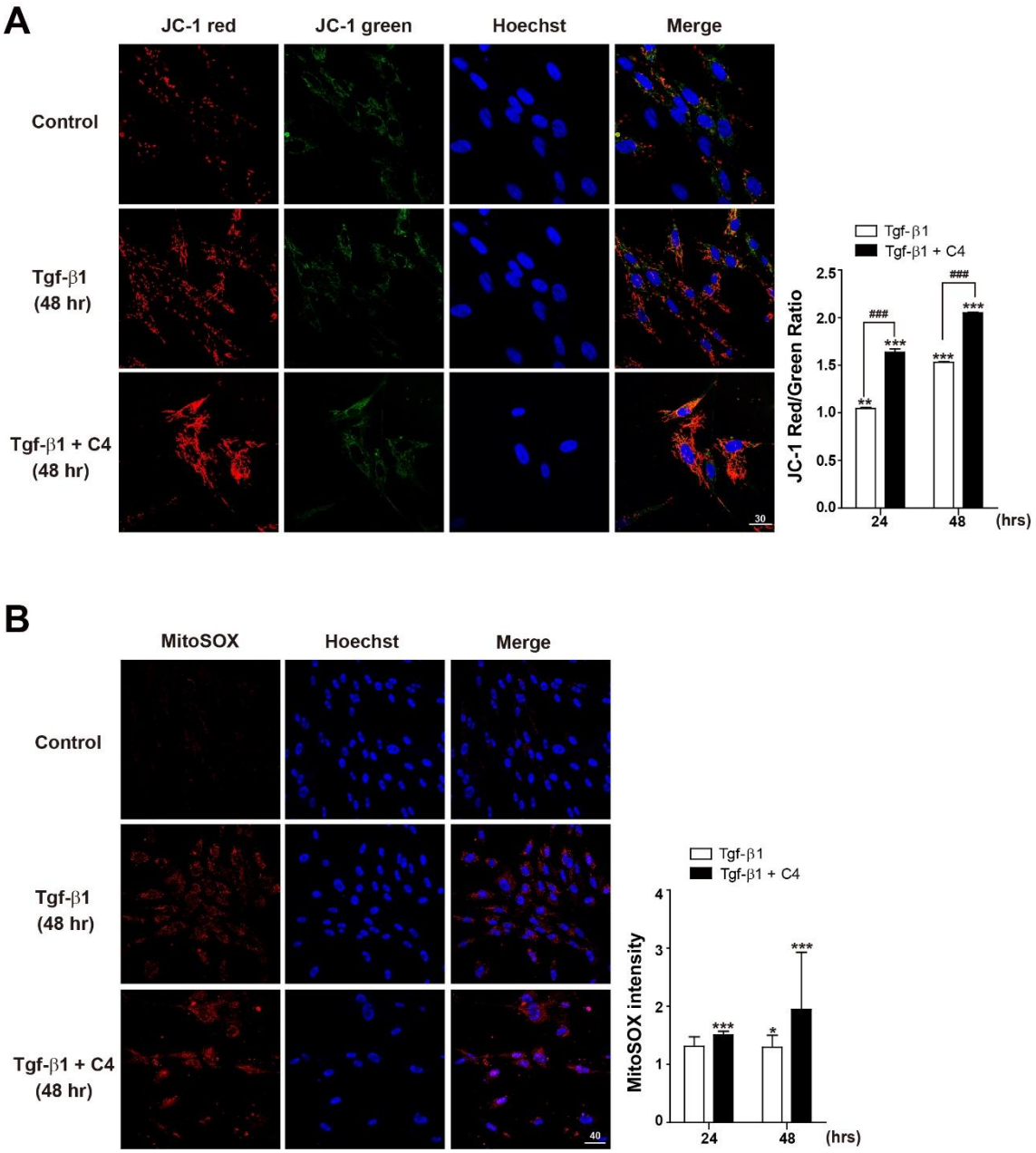
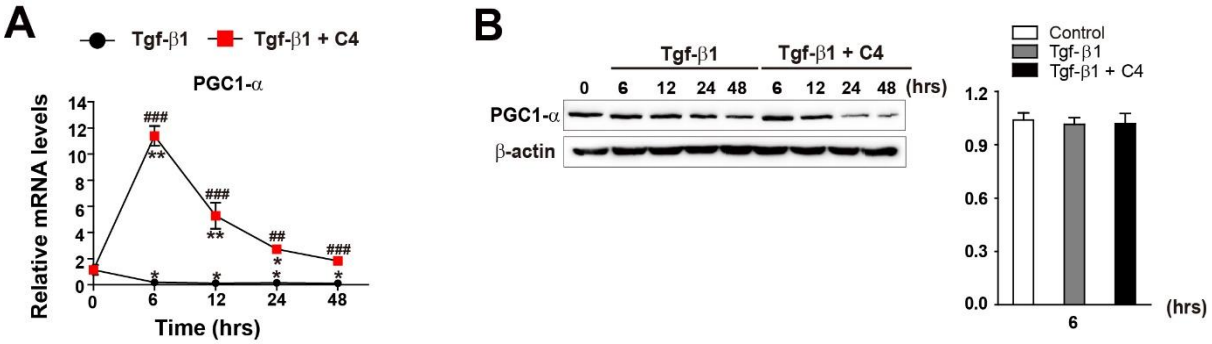


Figure 5. C4 treatment increased mitochondrial membrane potentials and ROS accumulation in TGF-β1 treated lung fibroblasts

For 24 and 48hr, TGF-β1 and C4 cotreated MRC5 cells were stained (a) Heochest 333258 and MitoSOX (red) , (b) Heochest33258 and JC-1 (red and green) And the stained cells were then analyzed by confocal fluorescence microscope. Data are Mean ± SEM; n = 4, *P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001 vs. control and #P<0.05, ##P<0.01, and ###P<0.001 TGF-β1 vs co-treatment with TGF-β1 and C4. Scale bars = 40 μM, or 30 μM

6. TGF-β1 and C4 co-treatment increased PGC1α mRNA level

앞선 Figure 에서 MRC5 세포에서 TGF-β1 에 의해 활성화된 섬유아세포가 C4 에 의해 활성이 감소되고, 미토콘드리아의 morphology 가 길어졌다 회복하며, 미토콘드리아의 막전위나 ROS 가 증가하는 것과 같이 활성도가 증가한다는 것을 확인하였다. 이러한 섬유아세포 활성화 및 회복 단계에서 미토콘드리아의 변화가 어떤 요소에 의한 것인지 확인하기 위해, 미토콘드리아 master regulator 로 알려져 있는 PGC1α의 RNA 및 단백질 수준을 확인하였다. RNA 수준 (Fig 6A)에서 TGF-β1 을 단독처리 하였을 때, PG1Cα의 발현도가 급격히 감소하고, C4 를 함께 처리한 경우 PGC1α의 발현도가 크게 증가하는 것을 확인하였다. 하지만, 단백질 수준 (Fig 6B)에서는 큰 변화를 발견하지 못했다.



6. In early time, TGF-β1 and C4 co-treatment increase PGC1α mRNA level

(a) mRNA levels and (b) Protein levels of PGC1α gene in MRC5 cells treated with TGF-β1 (5 ng/ml) or TGF-β1 (5 ng/ml) and C4 (5 mM) for indicated times.

Ⅳ. 고찰

섬유 아세포는 신체에서 발견되는 결합 조직의 가장 일반적인 세포로 세포 치유에 중요한 역할을 하지만 일부의 경우 밝혀지지 않은 이유로 활성화가 제어되지 않아 섬유화 반응을 일으킨다. [1] 신체 내에서 발생하는 섬유화 반응에는 여러가지가 있는데 그 중 폐 섬유화의 경우 확실한 치료법 및 원인이 밝혀지지 않았다.

장내세균에 의해 생성되는 짧은 사슬 지방산 (Short Chain Fatty Acid, SCFA)은 식이섬유 대사의 부수산물로서 항 염증작용이 있는 물질로 알려져 있으며, 짧은 사슬 지방산은 천식에도 효과가 있다. [19,20] 또한, 짧은사슬지방산은 히스톤디아세틸레이즈 인 HDAC 을 억제한다고 알려져 있는데, HDAC 은 일반적으로 전사 억제와 관련이 있다. 그 중 HDAC4 가 TGF-β에 의한 근섬유세포의 표현형인 α-SMA 의 발현을 증가시킨다는 연구가 있다. [29] 이를 토대로 본 실험에서는 폐 섬유화를 일으키는 세포인 섬유 아세포 중 사람 폐 섬유 아세포인 MRC5 에 TGF-β1 을 이용하여 섬유아세포를 활성시키고, 근섬유아세포의 분화를 촉진하며, SCFA 의 한 종류인 C4 를 통해 세포의 활성도가 억제되는지를 연구하였다.

먼저, MRC5 세포에서 TGF-β1 에 의해 섬유아세포가 활성화되는지를 확인하였다. TGF-β1 의 적정농도를 확인하기 위해 각각 1,2,5 ng/ml 의 농도로 TGF-β1 을 처리하여 섬유화 지표의 발현도를 확인하였고, 가장 활성화가 많이 된 5 ng/ml 의 농도로 이후 실험을 진행하였다. TGF-β1 을 시간별로 처리했을 때, 처리 시간에 따라 섬유화 지표의 발현도가 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 세포 내 Col1A1 과 α-SMA 의 발현도도 증가하는 것을 확인하였다.(Fig 1) 이를 통해 섬유아세포가 근섬유아세포로의 분화가 촉진되었다고 볼 수 있다.

TGF-β1 에 의해 MRC5 가 활성화되는 것을 확인했기 때문에, TGF-β1 에 의해서 활성화된 MRC5 세포에서 SCFA 를 처리했을 때 세포의 섬유화에 어떤 영향을 미치는지를 확인하였다. SCFA 중 각각 2 개, 3 개, 4 개의 탄소 원자로 이루어져 있는 C2, C3, C4 를 함께 처리하였다. SCFA 의 효과를 확인함과 동시에 적정농도를

확인하기 위해, 각 SCFA 를 1, 5, 10 mM 의 농도로 처리하였는데, 물질을 처리함에 따라 섬유화 지표들의 발현도가 감소하고, 농도가 높아짐에 따라 활성도 또한 많이 감소하였다. 그 중에서도 가장 효과가 큰 C4 를 선정하여 이후 실험을 진행하였으며, 세포에 데미지를 입히지 않는 적정 농도인 5 mM 의 농도로 실험을 진행하였다. (Fig 2)

Fig 2 에서 선정한 C4 (5 mM)를 TGF-β1 과 함께 처리하였을 때, 섬유화 지표의 발현도를 통해 세포 활성화가 억제되었는지를 확인하였다. TGF-β1 과 C4 를 함께 처리한 경우 MRC5 세포의 활성화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 세포 내 Col1A1 과 α-SMA 의 발현도 또한 TGF-β1 을 단독 처리했을 때 증가되었다가 C4 를 함께 처리한 경우 발현도가 감소하는 것을 확인하였다. (Fig 3)

앞선 결과들을 통해 TGF-β1 에 의해 활성화가 된 MRC5 세포에 C4 를 함께 처리했을 때 세포의 활성화가 억제되는 것을 확인했는데, 이러한 결과에 따른 미토콘드리아의 변화가 있는지 확인하기 위해 미토콘드리아의 변화를 확인하였다. 먼저, Mitotracker staining 을 통해 미토콘드리아 다이나믹스를 보았더니, TGF-β1 을 단독으로 처리한 경우에는 미토콘드리아의 길이가 길어지는 elongation 현상을 발견했고, C4 를 함께 처리한 경우 elongation 되었던 미토콘드리아가 다시 원래 상태로 회복되는 것을 확인했다. 이전에 발표된 연구들에서 미토파지가 결핍된 경우 근섬유아세포가 분화된다는 보고가 있었는데 [28] 이런 보고를 토대로 TGF-β1 을 단독 처리한 경우 elongation 이 일어나는 것을 통해 근섬유아세포가 분화되었다는 것을 알 수 있다. 또한, C4 가 함께 처리한 경우 근섬유아세포의 분화를 막았기 때문에 미토콘드리아 다이나믹스가 원래 상태로 회복되었다고 볼 수 있다. (Fig 4)

앞선 Mitotracker staining 결과를 통해 TGF-β1 을 처리했을 때 미토콘드리아의 기능에 문제가 생겼을 것으로 예상할 수 있는데, 이를 MitoSOX 를 통한 미토콘드리아 ROS 와 JC-1 을 통한 MMP (Mitochondrial membrane potential)를 측정하여 확인하였다. TGF-β1 을 단독 처리하였을 때, 미토콘드리아 ROS 와 MMP 가 모두 증가하였고, C4 를 함께 처리했을 때 발현도가 더 많이 증가하였다. (Fig 5) 미토콘드리아 막전위는 ATP 합성효소에서 ATP 를 만드는데 사용되는 중간 형태의 에너지 저장 역할 및 손상된 미토콘드리아의 제거를 결정하여 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 긴 기간동안 막전위가 증가하는 것을 과도한 ROS 생성으로

인해 미토콘드리아에 심각한 영향을 줄 수 있지만, 짧은 기간 동안 미토콘드리아 막 전위가 증가하는 것은 과도한 ROS 에 의한 미토콘드리아의 손상을 ROS 의 short-term burst 가 완화하기 위한 시스템이기도 하다. 이때, 미토콘드리아 ROS 는 정상적인 미토콘드리아가 대사 및 항상성을 유지할 때 부산물로 축적되게 된다고 알려져 있으며, 미토콘드리아 막전위가 높은 경우 더 많은 ROS 를 생성한다고 알려져 있다. [7,8,9,10] 이러한 이전 보고들을 토대로 TGF-β1 만을 처리했을 때 일어난 미토콘드리아의 손상을 완화하기 위해 미토콘드리아의 활성이 증가했고, C4 를 함께 처리한 경우 이를 회복하기 위하여 활성도가 더 증가하고, 이에 따라 ROS 가 증가했다고 볼 수 있다. (Fig. 5)

Fig 4,5 를 통해 TGF-β1 과 C4 를 처리한 경우 생긴 미토콘드리아의 변화를 확인했고, 미토콘드리아 master regulator 로 알려져 있는 PGC1α의 발현도를 확인하였다. TGF-β1 을 단독처리 한 경우 PGC1α의 RNA, 단백질 발현도가 급격하게 감소하고, C4 를 함께 처리한 경우 초반에 급격히 증가하는 경향을 보였다. PGC1α가 상향 조절되는 경우는 주로 미토콘드리아의 생합성 기능이 증가하거나 지방산 산화 (Fatty Acid Oxidation)가 증가되는 경우로, Fig 6 의 결과를 통해 TGF-β1 을 단독처리 했을 때 줄어들었던 미토콘드리아 생합성 기능 및 지방산 산화 기능이 이 C4 를 함께 처리한 경우 다시 회복되는 것으로 볼 수 있다.

본 연구를 통해서 사람 폐 섬유 아세포인 MRC5 세포에서 TGF-β1 에 의한 섬유아세포의 활성화를 SCFA 의 한 종류인 C4 가 완화시킨다는 것을 알 수 있었다. 더 나아가 C4 가 섬유아세포의 활성화를 억제하는데 있어 미토콘드리아의 다이나믹스, 막전위, ROS 발현도 가 변화한다는 것을 확인했는데, TGF-β1 을 단독 처리한 경우 망가졌던 미토콘드리아 다이나믹스가 C4 를 처리했을 때 원래 상태로 회복되는 것을 통해 TGF-β1 을 처리한 경우 활성화된 섬유아세포가 근섬유아세포로 분화하고, C4 를 함께 처리한 경우 섬유아세포의 활성을 억제한다고 볼 수 있다. 또한, TGF-β1 과 C4 를 함께 처리했을 때 미토콘드리아의 막전위, ROS 발현도가 TGF-β1 을 단독 처리한 그룹보다 증가하는 것으로 보아 TGF-β1 에 의해 입은 손상 때문에 미토콘드리아의 활성도가 높아졌고, C4 를 함께 처리한 경우에는 이를 회복하기 위해 미토콘드리아의 활성도가 더 증가한다는 것을 알 수 있다. 또한, 미토콘드리아 master regulator 인 PGC1α 의 mRNA 발현도가 TGF-β1 을 처리했을 때 감소했다가 C4 를 함께 처리한 경우 증가하는 것으로 보아 C4 가 미토콘드리아의

생합성뿐만 아니라 지방산 산화와 관련된 기작에 의해 섬유화를 완화시킬 수 있다는 가능성을 제기했다. [10,11,12]

하지만, 폐 섬유증 환자에게서 나타나는 특징적 에너지대사 및 지질대사가 C4 를 처리한 경우 어떻게 변화하는지에 대한 정확한 메커니즘은 규명되지 않았기 때문에, MRC5 세포에서 TGF-β1, C4 물질 처리에 의해 변화하는 대사체를 분석해 봄으로써 C4 가 섬유 아세포의 활성에 어떤 특이적 물질대사를 일으켜 세포 활성화를 완화시키는지를 확인하고, 미토콘드리아와 섬유 아세포의 활성 및 활성 억제 사이의 관계를 규명하기 위해 어떤 기능에 의해 미토콘드리아에 변화가 생겼는지를 확인할 필요가 있다. 또한, 어떤 물질이 PGC1α와 함께 작용하여 미토콘드리아 생합성 또는 지방산 분화에 영향을 미치고 있는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

Ⅴ. 참고문헌

1. Shaney L. Barratt, Andrew Creamer, Conal Hayton, Nazia Chaudhuri, Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): An Overview, J Clin Med. 2018 Aug 6;7(8):201.

2. Ryan T. Kendall, Carol A. Feghali-Bostwick, Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators, Front Pharmacol. 2014; 5: 123.

3. Daniela Parada Venegas, Marjorie K. De la Fuente, Glauben Landskron, María Julieta González, Rodrigo Quera, Gerard Dijkstra, Hermie J. M. Harmsen, Klaas Nico Faber, Marcela A. Hermoso, Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases, Front. Immunol., 11 March 2019.

4. Gijs den Besten, Karen van Eunen, Albert K. Groe , Koen Venema, Dirk-Jan Reijngoud, and Barbara M. Bakker, The role of Short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism, Journal of lipid research 2013; volume 54:2325-2340

5. Wei Ling Lau, Nosratola D. Vaziri , Gut microbial short-chain fatty acids and the risk of diabetes, Nature Reviews Nephrology volume 15, pages389–390(2019)

6. Berit Hippe, Marlene Remely, Eva Aumueller, Angelika Pointner, Alexander G. Haslberger, SCFA Producing Gut Microbiota and its Effects on the Epigenetic Regulation of Inflammation, Beneficial Microorganisms in Medical and Health Applications, Microbiology Monographs 28.

7. Michael P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species, Biochem J. 2009 Jan 1; 417(Pt 1): 1–13.

8. Dmitry B. Zorov, Magdalena Juhaszova, Steven J. Sollott, Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release, Physiol Rev. 2014 Jul; 94(3): 909–950.

9. L.D. Zorova, V.A. Popkov, E.Y. Plotnikov, D.N. Silachev, I.B. Pevzner, S.S. Jankauskas, V.A. Babenko, S.D. Zorov, A.V. Balakireva, M. Juhaszova, S.J. Sollott, D.B. Zorov, Mitochondrial membrane potential, Analytical Biochemistry (2017)

10. Suski J.M., Lebiedzinska M., Bonora M., Pinton P., Duszynski J., Wieckowski M.R. (2012) Relation Between Mitochondrial Membrane Potential and ROS Formation. In: Palmeira C., Moreno A. (eds) Mitochondrial Bioenergetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 810. Humana Press.

11. Renée Ventura-Clapier, Anne Garnier, Vladimir Veksler, Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 alpha, Cardiovasc Res. 2008 Jul 15;79(2):208-17.

12. Elena Piccinin, Gaetano Villani, Antonio Moschetta, Metabolic aspects in NAFLD, NASH and hepatocellular carcinoma: the role of PGC1 coactivators, Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology volume 16, pages160–174 (2019)

13. Li, X., Zhang, W., Cao, Q. et al. Mitochondrial dysfunction in fibrotic diseases. Cell Death Discov. 6, 80 (2020).

14. Hoon-In Choi, Jung Sun Park, Dong-Hyun Kim , Chang Seong Kim , Eun Hui Bae, Seong Kwon Ma and Soo Wan Kim, PGC-1α Suppresses the Activation of TGF-β/Smad Signaling via Targeting TGF–βRI Downregulation by let-7b/c Upregulation, Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 5084

15. Masafumi Noguchi a, Atsuko Kasahara, Mitochondrial dynamics coordinate cell differentiation, Biochemical and Biophysical Research Communications 500 (2018) 59e64.

16. Erin M. O'Leary, Yufeng Tian, Recep Nigdelioglu, Leah J. Witt, Rengul Cetin-Atalay, Angelo Y. Meliton, Parker S. Woods, Lucas M. Kimmig, Kaitlyn A. Sun, Gizem A. Gökalp, Gökhan M. Mutlu1, and Robert B. Hamanaka, TGF-β Promotes Metabolic Reprogramming in Lung Fibroblasts via mTORC1-dependent ATF4 Activation, AJRCMB Articles in Press. Published July 15, 2020.

17. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C,et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. Nat Med 2014; 20:159-66.

18. Thio CL-P, Chi P-Y, Lai AC-Y, Chang Y-J. Regulation of type 2 innate lymphoid cell-dependent airway hyperreactivity by butyrate. J Allergy Clin Immunol 2018; 142:1867-83, e12.

19. Cait A, Hughes MR, Antignano F, Cait J, Dimitriu PA, Maas KR, et al. Microbiome-driven allergic lung inflammation is ameliorated by short-chain fatty acids. Mucosal Immunol 2018;11:785-95.

20. Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, Stanley D, Macia L, Mason LJ, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. Nat Commun 2015;6:7320.

21. Anna Theiler, MSc, Thomas Barnthaler, MD, Wolfgang Platzer, MSc, Georg Richtig, MD, Miriam Peinhaupt, MSc, Sonja Rittchen, MSc, Akos Heinemann, MD et al, Butyrate ameliorates allergic airway inflammation by limiting eosinophil trafficking and survival, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology May 3, 2019.

22. Ghorbani P, Santhakumar P, Hu Q, Djiadeu P, Wolever TM, Palaniyar N, Grasemann H. Short-chain fatty acids affect cystic fibrosis airway inflammation and bacterial growth. Eur Respir J 46: 1033–1045, 2015.

23. Sandra Rutting, Dia Xenaki, Monique Malouf, Jay C. Horvat, Lisa G. Wood, Philip M. Hansbro, X Brian G. Oliver, Short-chain fatty acids increase TNF-α-induced inflammation in primary human lung mesenchymal cells through the activation of p38 MAPK, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 316: L157–L174, 2019.

24. Abhinav Agrawal, Isha Verma, Varun Shah, Abhishek Agarwal, Rutuja R Sikachi, Cardiac manifestations of idiopathic pulmonary fibrosis, Intractable & Rare Diseases Research. 2016; 5(2):70-75.

25. Richard B. Hubbard, Chris Smith, Ivan Le Jeune, Jonathan Gribbin, and Andrew W. Fogarty, The Association between Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Vascular Disease, American journal of respiratory and critical care medicine 2008; Volume 178, Issue 12: 1257-1261

26. Wendy Glenisson, Vincent Castronovo, David Waltregny, Histone deacetylase 4 is required for TGFbeta1-induced myofibroblastic differentiation, Biochim Biophys Acta. 2007 Oct;1773(10):1572-82.

27. Wendy Glenisson, Vincent Castronovo, David Waltregny, Histone deacetylase 4 is required for TGFβ1-induced myofibroblastic differentiation, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research Volume 1773, Issue 10, October 2007, Pages 1572-1582

28. Elizabeth S.Malsin, David W.Kamp, The mitochondria in lung fibrosis: friend or foe?, Translational Research Volume 202, December 2018, Pages 1-23

영 문 요 약

Pulmonary fibrosis is a chronic lung disease characterized by continuous damage that does not regenerate epithelial cells and excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) and remodeling of the lung architecture. Until now, the effective treatments are absent and the precise mechanisms that drive fibrosis in most patients remain incompletely understood. Fibroblasts, which play an important role in fibrosis, are cells of connective tissues. They can differentiate into myofibroblast, which leads to excessive deposition of collagen proteins and progressive scarring. They play an important role in cell healing, but they are cells that cause fibrosis reactions because of uncontrolled activation by unknown reasons. Short chain fatty acid (SCFA) produced by intestinal bacteria is known to be anti-inflammatory substances as adjuvant of dietary fiber metabolism. Also, short chain fatty acids are effective for asthma. In this study, we first established the optimal conditions for the activation of human lung fibroblast cell line (MRC5) using Transforming Growth factor beta 1 (TGF-β1). In the activated conditions by TGF-β1, C4 (Sodium butyrate) of three SCFAs (C2, C3 and C4) showed the strongest inhibitory effects in myofibroblast differentiation of MRC4. In addition, C4 treatment restored mitochondrial dynamics by inhibiting mitochondrial elongation induced by TGF-β1 treatment. This phenomenon might be associated with the increase of PGC1α expression, which is important for the activation of membrane potential and mitochondrial function under the condition of TGF-β1 and C4 co-treatment. Therefore, further studies on changes in metabolites and related gene expression related to mitochondrial activation are needed.