

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01017

## 活化型肝星状细胞清除机制及其相关抗肝纤维化策略

李 晶,殷正丰\*

第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室,上海 200438

**[摘要]** 已知肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化是肝纤维化的核心环节。越来越多的基础和临床研究证实,肝纤维化可以逆转。而肝纤维化消退的主要表现之一是活化型 HSCs 数量不断减少。因此,如何清除活化型 HSCs 并使之成为抗肝纤维化治疗新策略正逐渐受到关注。现有两种可能机制用于解释活化型 HSCs 的清除现象,即活化型 HSCs 的表型逆转和凋亡。本文旨在对基于活化型 HSCs 清除机制的抗肝纤维化策略进展做一综述。

**[关键词]** 肝纤维化;肝星状细胞;表型;细胞凋亡

**[中图分类号]** R 575.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)09-1017-03

### Clearance mechanisms of activated hepatic stellate cells and related antifibrotic therapies for chronic liver disease

LI Jing, YIN Zheng-feng\*

Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** The activation of hepatic stellate cells (HSCs) is the key step for liver fibrogenesis and progression. Increasing clinical and experimental studies suggest that hepatic fibrosis is reversible. One of the major manifestations for reduction of fibrosis is the decrease of activated HSCs. Thus, how to clear the activated hepatic stellate cells has become a focus of study on treatment of hepatic fibrosis. By now there have been two potential pathways for reduction of activated HSCs: reversal of the phenotype of HSCs and apoptosis. This paper reviews the anti-hepatic fibrosis strategies based on the clearance of activated HSCs.

**[Key words]** liver fibrosis; hepatic stellate cells; phenotype; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(9):1017-1019]

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理过程,最终可发展成肝硬化,引起肝功能衰竭,导致死亡。因此,肝纤维化能否逆转、可以逆转的阶段及其逆转机制一直是研究的热点。目前越来越多的基础和临床研究证实,肝纤维化可以逆转。肝纤维化动物模型在去除损伤因素后可自动恢复,并且慢性肝病患者在去除病因或给予抗病毒治疗后肝纤维化可能逆转<sup>[1-2]</sup>。比如,丙肝患者给予 $\alpha$ 干扰素(Interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ )及高剂量病毒唑联合治疗后,可观察到肝功能改善、肝纤维化消退以及坏死区域溶解等现象<sup>[1]</sup>。

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化是肝纤维化的核心环节<sup>[3]</sup>。活化型 HSCs 可通过自身分泌作用诱导其自身快速增殖,大量分泌胶原纤维及基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMPs),后者抑制胶原降解,导致胶原纤维堆积并形成疤痕。而肝纤维化消退的主要表现之一则是活化型 HSCs 数量不断减少<sup>[3]</sup>,这已从肝损伤动物和慢性肝病恢复阶段的研究结果中得到证实<sup>[1]</sup>。于是,活化型 HSCs 清除与肝纤维化转归的关系越来

越引起重视。那么,在肝纤维化恢复阶段活化型 HSCs 数目减少的过程中究竟发生了什么改变?目前有两种可能机制用于解释活化型 HSCs 的清除现象。一是活化型 HSCs 发生表型逆转,成为静止型 HSCs;二是通过程序性细胞死亡(凋亡)被机体清除,而后者是肝纤维化逆转的主要机制<sup>[4]</sup>。

#### 1 表型逆转机制及其治疗策略

静止型 HSCs 分布于窦状隙中窦内皮细胞层与肝实质细胞层之间,胞质中储存维生素 A 等中性脂类,并分泌肝脏基底膜成分(层粘连蛋白、IV型胶原等)以维持肝脏结构。肝脏损伤后,HSCs 迅速活化并移行脱离原环境。该过程与脂肪细胞退分化过程相似,脂肪生成转录因子以及窦状隙微环境均在维持 HSCs 静止状态中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。因此,通过促进活化型 HSCs 脂肪储存功能的恢复和诱发其与基底膜蛋白相互作用,成为诱导型 HSCs 逆转为静止状态的可行方案。

1.1 维生素 A 储存与 HSCs 静止表型维持 HSCs 的活化过程与维生素 A 脂滴的丢失相伴进行,而脂滴的丢失是

**[收稿日期]** 2009-12-03 **[接受日期]** 2010-04-25

**[作者简介]** 国家科技重大专项(2008ZX10002-021), Supported by Major Project of National Science & Technology Foundation(2008ZX10002-021).

**[作者简介]** 李 晶,硕士生. E-mail: lijingava5945@tom.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875351, E-mail: yinzfk@yahoo.com.cn

HSCs 功能性改变的起因还是结果目前仍无科学定论<sup>[7]</sup>。然而, HSCs 的活化过程与脂肪细胞转化为前脂肪细胞的过程极其相似。特别是静止型 HSCs 高度表达脂肪生成转录因子, 如转录因子 C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein)<sup>[1,8]</sup>, 过氧化物酶体增殖活化受体(peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ )<sup>[9]</sup>, 固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding protein 1C, SREBP-1C), 肝型 X 受体(liver X receptor, LXR- $\alpha$ )<sup>[10]</sup> 以及脂肪细胞特异性蛋白等, 在活化型 HSCs 中消失, 同样提示 HSCs 活化与脂肪细胞转录调控有关<sup>[5]</sup>。因此, 诱导活化型 HSCs 中脂肪生成相关基因表达不失为诱导其表型逆转的好方法。通过脂肪细胞分化基质(异丁基甲基黄嘌呤、地塞米松和胰岛素)处理活化型 HSCs, 以及在 HSCs 中异位表达 PPAR- $\gamma$  或 SREBP-1C, 均能激发脂肪生成转录因子持续表达, 并使 HSCs 在表型和功能上逆转为静止型。其中, PPAR- $\gamma$  是控制 HSCs 转分化的一个重要效应分子<sup>[11]</sup>。用 15d-PGJ2 和 BRL49653 (PPAR- $\gamma$  的激动剂) 处理 HSCs 也可以逆转 HSCs 活化特征, 抑制前胶原启动子转录和表达<sup>[12]</sup>。

1.2 基底膜蛋白与 HSCs 静止表型维持 正常个体中, 窦状隙中 HSCs 的静止表型由肝脏基底膜成分与 HSCs 周围的肝细胞及窦状内皮细胞组成的微环境共同维持<sup>[13]</sup>。有报道称, 在窦状隙微环境中, 静止型 HSCs 具有干细胞的特征及表面分子标志物(CD133、OCT4 等), 并多数处于细胞分裂 G<sub>0</sub> 期, 主要通过 Wnt、Notch 等信号通路调控自我更新<sup>[14]</sup>, 使其数量维持恒定。肝损伤后, HSCs 活化并释放蛋白酶降解黏附分子, 脱离基底膜后向炎症区域移行和聚集。可见, 窦状隙中的干细胞微环境, 尤其是肝脏基底膜的层粘连蛋白和 IV 型胶原有助于维持 HSCs 的静止状态<sup>[13-15]</sup>。而通过诱导体外培养的 HSCs 向基底膜基质迁徙而引发活化型 HSCs 表型逆转的实验结果并未在体内得到证实<sup>[16]</sup>。

虽然活化型 HSCs 逆转为静止表型的证据越来越多, 但多数限于体外培养活化的 HSCs, 几乎未见有关体内的报道。表达谱示踪技术可能有助于阐明活化型 HSCs 向静止型逆转的完整过程及调控因素<sup>[17]</sup>, 但至今未见相关报道。

## 2 诱导凋亡机制及相关策略

活化型 HSCs 的凋亡是肝纤维化消退的关键因素。HSCs 活化后, 从分泌基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinase, MMPs) 转而大量分泌 TIMPs。MMPs 是降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM) 的主要酶类, 其活性态可被 TIMPs 抑制<sup>[2]</sup>。并且, TIMP-1 的存在能显著提高活化型 HSCs 的抗凋亡能力<sup>[18]</sup>, 所以, 减少 TIMPs 产生将直接增加降解 ECM 的能力和增加活化型 HSCs 的凋亡。动物模型中给予 TIMP-1 抗体中和其活性, 可以部分逆转肝纤维化进程<sup>[18]</sup>。因此, 诱导活化型 HSCs 凋亡不但可以清除胶原纤维的分泌源头, 还可以除去 TIMP-1 的来源, 从而增强 MMPs 间质胶原酶的活性, 加速降解过度积累的 ECM<sup>[19]</sup>。

2.1 活化型 HSC 凋亡通路 活化型 HSCs 的凋亡反应是多个凋亡途径相互作用的结果。目前已知有死亡受体信号通路、线粒体通路、内质网通路、神经生长因子通路、PPAR- $\gamma$  通

路和核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) 信号通路<sup>[17]</sup>。其中, 活化型 HSCs 对死亡受体及肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 介导的凋亡反应敏感<sup>[20]</sup>。活化型 HSCs 高度表达 Fas-R 或肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR) 及其配体, 并通过 caspase-8/3 依赖的通路引发凋亡。或者, 诱导活化型 HSCs 过度表达 P53<sup>[21]</sup>、Bax<sup>[22]</sup> 等促凋亡蛋白, 通过 caspase-9 诱发凋亡。然而, 诱导凋亡效应的靶向性问题目前仍然存在。静止型 HSCs 可以抵抗 Fas-R 介导的凋亡反应, 并且 FasL 能有效促进其分裂增殖, 但 Fas-R 在活化型 HSCs 及肝细胞中均有表达, 其激活可引起这两种细胞的凋亡反应。TRAIL 的表达则不同于 Fas-R, 其 II 型受体在活化型 HSCs 中表达上调。因此, TRAIL-R2 激动剂能够特异性地诱导活化型 HSCs 发生凋亡反应<sup>[20]</sup>。其他细胞因子如 INF- $\gamma$ <sup>[23]</sup>、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 与放线菌酮联合使用<sup>[24]</sup>, 也可以诱导 HSCs 凋亡。

2.2 自然杀伤细胞与活化型 HSC 清除 自然杀伤(natural killer, NK) 细胞中肝脏相关亚群以及肝脏特异性  $\gamma$ δT 细胞(NKT) 在肝纤维化消退中能够有效清除活化型 HSCs<sup>[25-26]</sup>, 这些细胞的杀伤活性可被 IFN- $\gamma$  强化。凋亡细胞的清除需要完整的蛋白降解途径才能完成, 因此机体内的 NK 细胞在 HSCs 凋亡中发挥重要作用。最新一项研究表明, 通过去唾液酸四己糖神经节苷酯抗体衰竭小鼠体内 NK 细胞, 则促进小鼠体内肝纤维化发生<sup>[26]</sup>。然而, 通过转入含 I:C 多聚尾巴的 TLR3(Toll-like receptor-3) 配体激活 NK 细胞后, 纤维生成减少<sup>[27]</sup>。NK 细胞清除活化型 HSCs 具有特异性, 只有表达 NK 细胞激活受体 NKG2D 的细胞才能被 NK 细胞清除。在 TRAIL 诱导 HSCs 凋亡的机制中, NK 细胞依赖于 IFN- $\gamma$  给 HSCs 致命一击, 这也阐明了 IFN- $\gamma$  诱导活化型 HSCs 凋亡的过程<sup>[23]</sup>。另外, 小鼠体内的 NK 细胞可直接黏着于 HSCs 上, 并且 NK 细胞遗传缺失的个体有更强的纤维发生能力等证据都说明了 NK 细胞的抗纤维化作用。同样, 肝纤维化患者给予免疫抑制治疗, 其肝纤维化程度加深的临床数据同样支持 NK 细胞具有抗肝纤维化作用这一观点<sup>[28]</sup>。

2.3 诱导 HSC 凋亡的药物研究进展 迄今报道的活化型 HSCs 凋亡诱导药物有很多, 如胶霉毒素、柳氮磺吡啶、苯二氮类配体、姜黄素及丹参酮 I 等。其中姜黄素为多酚类化合物, 作为 PPAR- $\gamma$  配体抑制 HSCs 活化过程中 PPAR- $\gamma$  的丢失, 并减少 PPAR- $\beta$  的表达<sup>[11, 22]</sup>。姜黄素的凋亡诱导效应可以被 PPAR- $\gamma$  拮抗剂所抑制。胶霉毒素可以引起聚集的 HSCs 凋亡而不引起肝细胞损伤<sup>[29]</sup>。大麻素可以引起体外培养活化的 HSCs 凋亡或坏死, 并在体内具有抗肝纤维化活性<sup>[30-31]</sup>。目前多数具有诱导活化型 HSCs 凋亡效果的药物作用机制已经明晰, 但其在临床治疗上的应用还有待进一步开发。

## 3 结语

近年来, 对 HSCs 活化和调控机制的研究取得了诸多进展, 但仍有许多关键问题将成为研究 HSCs 的巨大挑战。特别是 HSCs 活化在肝再生中的作用和调控模式, 肝损伤时

HSCs 中维生素 A 脂滴减少甚至丢失是 HSCs 活化的必要条件还是结果, HSCs 中各个信号通路及其与多种生物学功能的相互关系等等。特别是随着研究不断深入, 出人意料地发现 HSCs 具有一些免疫功能, 更使得 HSCs 在肝纤维化、肝脏病毒感染及免疫耐受方面的作用越来越重要。相信一旦阐明 HSCs 活化和清除机制, 将会给攻克肝硬化这一难题带来新的希望。

#### [参考文献]

- [1] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 209-218.
- [2] Kisseleva T, Brenner D A. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21 (Suppl 3): S84-S87.
- [3] Safadi R, Friedman S L. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation[J]. *Med Gen Med*, 2002, 4: 27.
- [4] Kume Y, Ikeda H, Inoue M, Tejima K, Tomiya T, Nishikawa T, et al. Hepatic stellate cell damage may lead to decreased plasma ADAMTS13 activity in rats[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581: 1631-1634.
- [5] Tsukamoto H. Adipogenic phenotype of hepatic stellate cells [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005, 29(11 Suppl): 132S-133S.
- [6] She H, Xiong S, Hazra S, Tsukamoto H. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells[J]. *J Bio Chem*, 2005, 280: 4959-4967.
- [7] Hellemans K, Verbuyst P, Quartier E, Schuit F, Rombouts K, Chandraratna R A, et al. Differential modulation of rat hepatic stellate phenotype by natural and synthetic retinoids[J]. *Hepatology*, 2004, 39: 97-108.
- [8] Wang X, Huang G, Mei S, Qian J, Ji J, Zhang J. Over-expression of C/EBP-alpha induces apoptosis in cultured rat hepatic stellate cells depending on p53 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380: 286-291.
- [9] Shan W, Palkar P S, Murray I A, McDevitt E I, Kennett M J, Kang B H, et al. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) attenuates carbon tetrachloride hepatotoxicity by downregulating proinflammatory gene expression[J]. *Toxicol Sci*, 2008, 105: 418-428.
- [10] Tsukamoto H, She H, Hazra S, Cheng J, Wang J. Fat paradox of steatohepatitis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(Suppl 1): S104-S107.
- [11] Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee H F Jr, Motomura K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 35715-35722.
- [12] Suk F M, Chen C H, Lin S Y, Cheng C J, Yen S J, Hung L F, et al. 15-deoxy-Delta(12, 14)-prostaglandin J(2) inhibits fibrogenic response in human hepatoma cells[J]. *Toxicol Lett*, 2009, 187: 22-27.
- [13] Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, et al. CD133<sup>+</sup> hepatic stellate cells are progenitor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352: 410-417.
- [14] Sawitza I, Kordes C, Reister S, Häussinger D. The niche of stellate cells within rat liver[J]. *Hepatology*, 2009, 50: 1617-1624.
- [15] Issa R, Zhou X, Constandinou C M, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca M D, et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126: 1795-1808.
- [16] Gaça M D, Zhou X, Issa R, Kiriella K, Iredale J P, Benyon R C,

Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells[J]. *Matrix Biol*, 2003, 22: 229-239.

- [17] Friedman S L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88: 125-172.
- [18] Parsons C J, Bradford B U, Pan C Q, Cheung E, Schauer M, Knorr A, et al. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats[J]. *Hepatology*, 2004, 40: 1106-1115.
- [19] Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer M V, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005, 29(11 Suppl): 121S-131S.
- [20] Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe R A, Friedman S, Gores G J. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis[J]. *Hepatology*, 2003, 37: 87-95.
- [21] Traister A, Breitman I, Bar-Lev E, Zvibel I, Harel A, Halpern Z, et al. Nicotinamide induces apoptosis and reduces collagen I and pro-inflammatory cytokines expression in rat hepatic stellate cells[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2005, 40: 1226-1234.
- [22] Cheng Y, Ping J, Xu L M. Effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and nuclear translocation/redistribution in culture-activated rat hepatic stellate cells[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120: 794-801.
- [23] Saile B, Eisenbach C, Dudas J, El-Armouche H, Ramadori G. Interferon-gamma acts proapoptotic on hepatic stellate cells (HSC) and abrogates the antiapoptotic effect of interferon-alpha by an HSP70-dependant pathway[J]. *Eur J Cell Biol*, 2004, 83: 469-476.
- [24] Varela-Rey M, Montiel-Duarte C, Osés-Prieto J A, López-Zabalza M J, Jaffrèzou J P, Rojkind M, et al. p38 MAPK mediates the regulation of alpha1(I) procollagen mRNA levels by TNF-alpha and TGF-beta in a cell line of rat hepatic stellate cells(1)[J]. *FEBS Lett*, 2002, 528(1-3): 133-138.
- [25] Notas G, Kisseleva T, Brenner D. NK and NKT cells in liver injury and fibrosis[J]. *Clin Immunol*, 2009, 130: 16-26.
- [26] Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen V T, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-dependent manners[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130: 435-452.
- [27] Zhang C, Zhang J, Tian Z. The regulatory effect of natural killer cells; do "NK-reg cells" exist[J]? *Cell Mol Immunol*, 2006, 3: 241-254.
- [28] Elsharkawy A M, Oakley F, Mann D A. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis[J]. *Apoptosis*, 2005, 10: 927-939.
- [29] Wright M C, Issa R, Smart D E, Trim N, Murray G I, Primrose J N, et al. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats[J]. *Gastroenterology*, 2001, 121: 685-698.
- [30] Siegmund S V, Uchinami H, Osawa Y, Brenner D A, Schwabe R F. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells [J]. *Hepatology*, 2005, 41: 1085-1095.
- [31] Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu J T, Li L, Karsak M, et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128: 742-755.