

综 述

人肝星状细胞激活和抑制及其相关分子机制的研究进展

秦桢楠 钟耀刚 李 铮*

(西北大学生命科学学院功能糖组学实验室, 西安 710069)

摘要 肝纤维化是肝脏对一系列慢性刺激的损伤修复反应, 以细胞外基质的过度沉积为主要特征。许多研究证明人肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的活化与增殖是肝纤维化形成的中心环节。因此, 肝星状细胞激活机制及抑制活化途径的研究和发现成为防治肝纤维化的关键。目前, 国际上肝纤维化药物研发的思路之一是从肝纤维化发生的机制, 即肝星状细胞激活机制中寻找分子靶点。近年来, 对各种使肝星状细胞活化的信号通路及相关抑制机制的研究取得了一些进展, 但由于肝星状细胞活化是多条信号通路相互协调的结果, 其复杂性、未知性造成了阻断方式的特异性、多样性, 使该研究还仅限于实验室阶段, 要想应用于临床还需要大量实验证明。该文就最新发现的肝星状细胞激活和抑制及相关分子机制作一综述。

关键词 肝纤维化; 肝星状细胞; 激活; 抑制活化; 分子机制

1 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis)是肝脏对一系列慢性刺激的损伤修复反应, 以细胞外基质的过度沉积为主要特征。我国每年有许多急性肝炎和肝炎病毒携带者发展为慢性肝炎, 最终发展为肝硬化。肝纤维化是个可逆过程, 如能及早发现并加以控制, 则可以有效阻断肝硬化的病情进展。目前, 普遍认为人肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSCs)的活化与增殖是肝纤维化形成的中心环节^[1-2]。因此, 肝星状细胞激活机制及抑制活化途径的研究和发现成为预防和治疗肝纤维化的关键。目前国际上肝纤维化药物研发的思路之一是从肝纤维化发生的机制, 即肝星状细胞激活机制中寻找分子靶点, 在体外模拟肝星状细胞不同生理、病理状态下的激活会为肝纤维化药物研发提供有效工具, 而抑制肝星状细胞活化则成为抗纤维化治疗的关键点。

肝星状细胞被广泛用于研究肝纤维化的体外模型^[3]。有人发现, 自人体分离的肝星状细胞系传至2~5代就开始衰老, 认为是细胞多分自老年患者的缘故^[3]。LX-1细胞系和LX-2细胞系的出现弥补了这一缺陷。它们筛自转染了pRSVTag质粒的原代细胞,

pRSVTag质粒编码SV40 T抗原。LX-2细胞系则来自LX-1细胞系在低血清(1%胎牛血清)培养条件下自发无限增殖的细胞^[4]。经基因芯片检测, LX-1和LX-2与原代肝星状细胞分别具有98.4%和98.7%的基因相似度。故这两种细胞被广泛用于研究肝星状细胞激活及抑制活化的细胞模型。

细胞模型可更直接地揭示细胞内部各组分的相互作用关系, 就早期研究而言, 具有模型简练、易操作、成本低、伤害小、受干扰少等优点。近年来对各种使肝星状细胞活化的信号通路及相关抑制条件的研究取得了一些进展, 为肝纤维化的临床治疗提供了新的思路。但由于肝星状细胞活化是多种细胞因子、多条信号通路相互影响的结果, 其复杂性和未知性造成阻断方式的特异性和多样性, 这些困难使该研究还仅限于实验室阶段。要想应用于临床还需要大量实验证明。本文就最新发现的肝星状细胞激活和抑制及相关分子机制作一综述。

收稿日期: 2011-06-15 接受日期: 2011-07-06

国家自然科学基金(No.30870549)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金(No.200806970018, No.20106101110012)资助项目

*通讯作者。Tel: 029-88303446, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

2 肝星状细胞的激活(纤维化)

肝星状细胞的激活过程可人为地分为两个阶段^[2]: 启动阶段和持续激活阶段(图1), 相应的肝星状细胞亦经历三种形态转化: 静息态HSCs→“移行细胞(transitional cell)”→肌成纤维细胞样细胞(myofibroblastic-like cell, MFLC)。图1绿色圈出部分为激活态HSCs重新逆转为静息态HSCs, 或者凋亡, 即肝星状细胞的抑制, 将在后文说明。肝星状细胞激活即采取适当的方法施加于肝星状细胞使其由静息态HSCs成为激活态HSCs。

2.1 细胞因子激活及相关分子机制

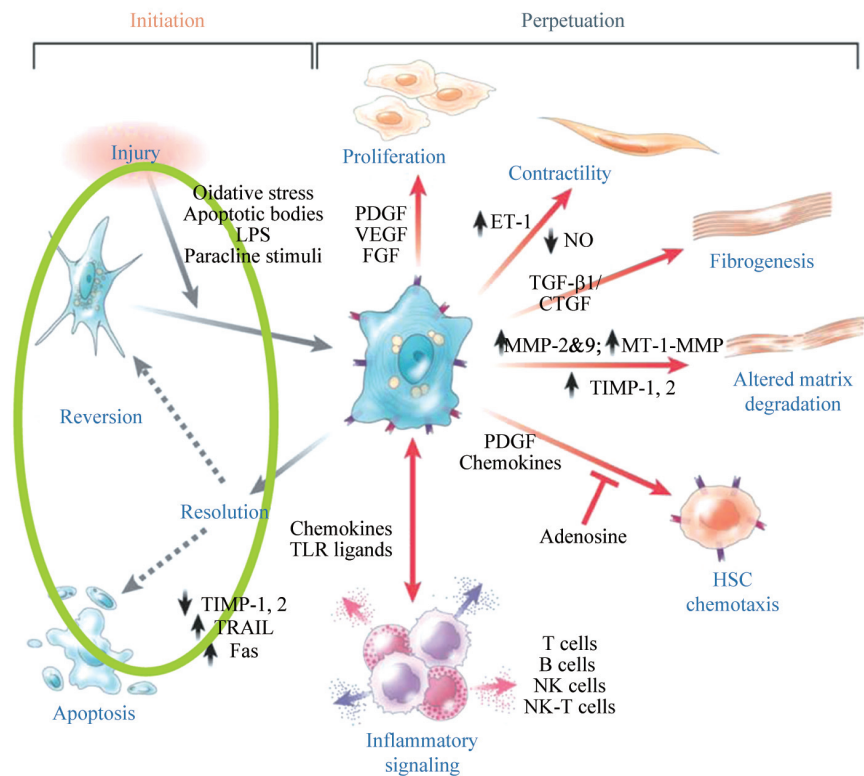
根据在肝纤维化中的作用, 肝星状细胞相关细胞因子可以分为两类(表1), 一类是刺激炎症反应和纤维化的促进因子, 另一类是抑制这种反应的抑制因子。促进肝星状细胞活化的诱导因子常见的有: 转化生长因子(TGF- β 1)、血小板衍生生长因子(PDGF)、结缔组织生长因子(CTGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、表皮生长因子(EGF)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、瘦素、内皮素(ET)-1等。TGF- β 1为现知最强的促肝纤维化因子, TGF- β 1活化后与肝星状细胞膜上受体结合发挥作用。就目前已知的分子机制, TGF- β 1激活了肝星状细胞内TGF- β -Smad信号转导通路(图2)。Smad蛋白家族直接参与TGF- β 1超家族成员的信号传导, 是TGF- β 1超家族成员参与生命活动的重要介

质。根据结构, Smad蛋白分成R-Smad、Co-Smad和I-Smad 3个亚家族。TGF- β 与肝星状细胞胞膜受体(TGF- β receptor, T β R)结合使T β R活化, 结合在T β R上的受体活化型Smad (R-Smad)蛋白被磷酸化而激活, 活化的R-Smad再与胞质共用的共同通路型Smad (Co-Smad)蛋白形成Smads异源多聚体而转位进入胞核与靶细胞DNA上特定的Smad结合元件(smad-binding elements, SBEs)序列CAGAC或AGAC结合, 促进靶基因的转录^[5]。在方法上, Xu等^[4]将LX-2细胞系于2%胎牛血清的DMEM培养液中正常培养24 h后, 饥饿培养24 h, 最后用终浓度2.5 ng/mL的TGF- β 1诱导20 h。类似的, Shimada等^[6]用10 ng/mL TGF- β 1诱导24 h激活LX-2细胞系, Shi等^[7]用2 ng/mL TGF- β 1诱导48 h激活LX-2细胞系。

除此之外, 瘦素(leptin)作为一种纤维化细胞因子, 可诱导肝星状细胞发生氧化应激反应。Saxena等^[8]报道leptin可以作为一个直接维持肝星状细胞存活的激动剂, 更重要的是, 他们发现leptin诱导的肝星状细胞的增殖或抑制凋亡通过瘦素长受体和ErK、Akt磷酸化发挥作用。其诱导方法为正常培养肝星状细胞24 h, 无血清培养基中饥饿16 h, 最后加入终浓度25~100 ng/mL的瘦素培养24 h^[9-10]。氧化应激反应是肝纤维化发生、发展中造成肝星状细胞激活的一个重要因素。瘦素通过JAK/STAT通路

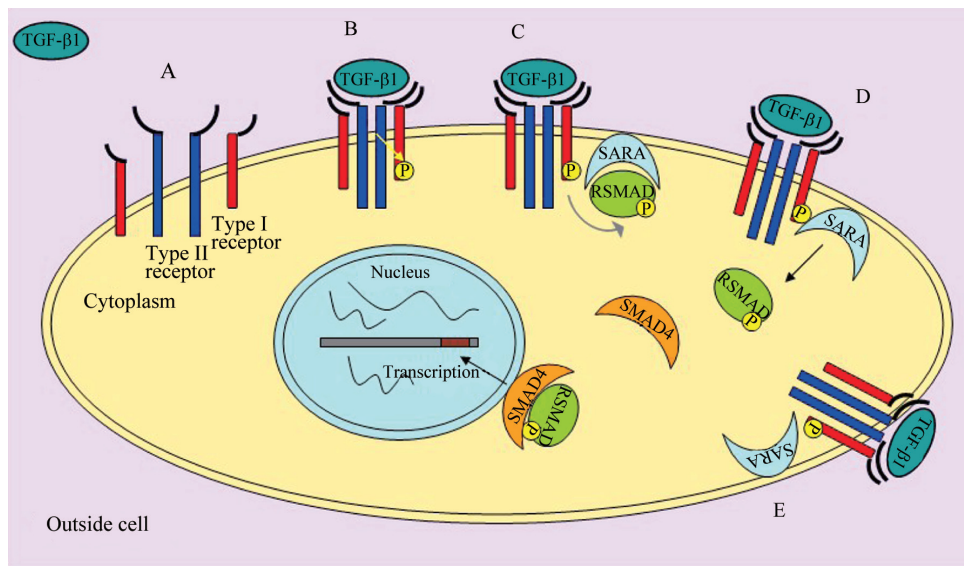
表1 作用于肝星状细胞的细胞因子及部分药物介导的信号通路
Table 1 Cytokines and drugs and related signaling pathways in HSCs

组别 Groups	细胞因子 Cytokines	细胞内信号通路 Intracellular signaling pathways	参考文献 References
Profibrotic cytokines	TGF- β 1	TGF- β -Smad signaling pathways	[5-6]
	PDGF	ERK/MAPK signaling pathways, PI-3K/AKT signaling pathways	[14]
	CTGF	TGF- β -Smad signaling pathways	[15]
	IGF-1	PI-3K/AKT signaling pathways	[16]
	VEGF	PI-3K/AKT signaling pathways	
	TNF- α	NF- κ B signaling pathways	[17]
	Leptin	JAK/STAT signaling pathways	[13]
	ET-1	Contractility, Akt/ PI-3K pathway	[18]
	Interleukin-10	ERK/MAPK signaling pathways	[19]
Antifibrotic cytokines and drugs	Interferon- γ	Inflammatory signaling	[20]
	Interleukin-2	Inflammatory signaling	[21]
	Interleukin-4	Inflammatory signaling	
	Interferon- α	Inflammatory signaling	[22]
	Statins	Blocking Rho-ROCK signaling pathways	[23]
	Rapamycin, everolimus	Blocking PI-3K/AKT signaling pathways	[24]



肝星状细胞的活化分为起始阶段和持续激活阶段。当肝受到损伤时，静息态肝星状细胞变为移行细胞，不同细胞因子通过不同的信号通路诱导移行细胞进一步分化。圈出部分为激活态肝星状细胞的抑制机制。
HSCs activation can be divided into two phases: initiation and perpetuation. After suffering liver injury, quiescent HSCs turn into transitional cells, and then are differentiated by different cytokines of different signaling pathways. Green circle marked the inhibition mechanism of activated HSCs.

图 1 肝星状细胞活化通路^[2]
Fig.1 Pathways of hepatic stellate cell activation^[2]



A: 配体结合; B: 受体磷酸化; C: SMAD蛋白磷酸化; D: CoSMAD复合物形成; E: 转录。
A: ligand binding; B: receptor recruitment and phosphorylation; C: SMAD phosphorylation; D: CoSMAD binding; E: transcription.

图 2 TGF-β1信号通路
Fig.2 TGF-β1 signaling pathway

与JAK介导的依赖H₂O₂的p38和ERK1/2信号通路相互协同作用,抑制基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1)表达,使肝星状细胞活化。JAK激酶/信号转导和转录激活子通路(JAK/STAT)是多种细胞生长、活化、分化、凋亡及其功能发挥过程中重要的一条细胞内信号传导途径。各种细胞因子可通过偶联和激活JAK酪氨酸激酶家族(JAKs)而实现信号传导^[1]。STATs是JAKs的下游效应物, JAK通过激活下游分子STATs将信号传输至细胞核内,激活的STATs进入细胞核并与相关DNA启动子结合,调节基因的转录和表达^[12]。

另有胰岛素样生长因子结合蛋白5 (IGFBP5)可抑制细胞凋亡,提高活化态肝星状细胞及成肌纤维样细胞的存活率,增加I型胶原和TIMP-1的表达,是一种很好的肝星状细胞激活剂。Sokolović等^[13]用终浓度0.1 ng/μL的人重组IGFBP5诱导正常LX-2细胞系24 h,使其成为活化态肝星状细胞。研究发现IGFBP5通过胰岛素样生长因子1 (IGF1)依赖机制减少肌成纤维细胞样细胞的凋亡,从而促纤维化。

2.2 肝炎病毒激活及其分子机制

不论是肝炎病毒直接感染肝星状细胞还是由HBV、HCV的部分基因间接转染肝星状细胞,其结果都表明肝星状细胞可被肝炎病毒及相关病毒基因激活,而且激活途径多与TGF-β1信号通路有关。

2.2.1 病毒直接感染 使用纯化的HBV病毒直接感染肝星状细胞可诱导肝星状细胞活化。Wu等^[25]采用蔗糖密度梯度离心法从HBV感染者的高滴度血清中进行病毒纯化浓缩,用纯化HBV 3.6×10⁵ copies/mL培养LX-2细胞系24 h和48 h后, TGF-β1、Smad3和Smad7的mRNA表达量相比对照组均升高,对应蛋白的表达量也相应升高,说明纯化的HBV感染可使肝星状细胞活化且与TGF-β1信号通路相关。

2.2.2 共培养 共培养是将肝星状细胞与具有诱导作用的其它细胞系共同培养,或培养于该细胞系的条件培养基中。Guo等^[26]将LX-2细胞系与转入HBV X蛋白(HBx)基因的稳定QSG7701-HBx细胞系在体外共培养,结果显示共培养的LX-2细胞系加速了从G₁期到S期的转变,α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、TGF-β1、TGF-βR II和CTGF等纤维化密切相关蛋白及受体均明显增加,表明HBx通过促进肝星状细胞增殖和上调纤维化相关分子表达来促进肝纤维化。Clément等^[27]将LX-2细胞系培养于可表达HCV核心

蛋白的Huh-7细胞系条件培养基中,引起LX-2细胞系中α-SMA活化表达,并发现是白介素-8强力诱导了α-SMA表达。

2.3 外界条件激活及其分子机制

外界培养环境(条件)的改变也可以诱使肝星状细胞活化。目前发现,缺氧培养条件下LX-2细胞系可被激活。Shi等^[28]将LX-2细胞系置于缺氧环境(1% O₂)下培养,发现缺氧条件下的LX-2细胞系被诱导表达缺氧诱导因子(HIF-1α)和血管内皮生长因子(VEGF)基因,α-SMA蛋白和I型胶原表达增加, MMP-2和TIMP-1基因表达上调,分析TGF-β/Smad信号通路发现, TGF-β1的表达和Smad2的磷酸化均增强,结果表明缺氧条件通过TGF-β/Smad信号通路导致了LX-2细胞系的活化。

2.4 细胞内新的激活信号、受体或通路的发现

研究者还通过肝星状细胞模型发现了一些存在于肝星状细胞中新的激活相关的信号分子、受体与通路。Watanabe等^[29]发现炎性体(inflammasome)作为一种存在于免疫细胞中传递细胞损伤和死亡信号的细胞质多蛋白复合体,同样存在于肝星状细胞(LX-2细胞系和原代培养的鼠源肝星状细胞)中。炎性体的激活引起了肝星状细胞中TGF-β1和I型胶原mRNA表达上调,导致肝星状细胞活化。Che等^[30]通过加入腺苷刺激活化LX-2细胞中的腺苷A_{2A}受体,引起原骨胶原αI和原骨胶原αIII mRNA及其蛋白的增加,继而发现腺苷A_{2A}受体可通过蛋白激酶A、原癌基因酪氨酸激酶(Src)、细胞外信号调节激酶1/2信号级联反应,或p38有丝分裂原激活蛋白激酶信号通路等多条途径激活LX-2细胞系。Moles等^[31]发现酸性神经磷脂酶(ASMase),一种已知的调节死亡受体及压力诱导肝细胞凋亡的细胞因子,在肝星状细胞(LX-2细胞系和原代培养的鼠源肝星状细胞)中也发挥着作用。他们发现,在分化及活化的肝星状细胞中ASMase被大量激活,并证明了ASMase-CtsB信号通路的存在,说明ASMase通过调节下游效应器CtsB/D活化肝星状细胞。这些新的激活信号、受体及通路的发现有助于人们对肝星状细胞的激活产生新的认识,推动新抑制活化方法的诞生,为抗纤维化药物提供了新靶点。

3 肝星状细胞的活化抑制(抗纤维化)

在肝纤维化的逆转过程中,随着肝组织结构完

整性的恢复, 激活的肝星状细胞数量会减少。目前认为激活的肝星状细胞有两个去向: (1) 激活态转变回静息态; (2) 激活细胞凋亡而死亡。大多数研究表明, 活化的肝星状细胞主要通过凋亡途径消除, 是肝纤维化消退的主要机制。抑制肝星状细胞活化即采用适当的方法使活化态肝星状细胞向静息态肝星状细胞转变或诱导活化态肝星状细胞凋亡。

3.1 细胞因子抑制及相关分子机制

3.1.1 常见抑制因子 抑制因子主要通过抑制肝星状细胞增殖和ECM合成起作用。常见的细胞抑制因子有: 干扰素(IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)、干细胞生长因子(HGF)等。如干扰素- β (IFN- β)能明显抑制 α -SMA; I型胶原和III型胶原的表达, 最终抑制肝星状细胞的激活。进一步研究发现, IFN- β 能下调肝星状细胞的TGF- β 1活化通路中TGF- β 1以及TGF- β 1下游信号分子Smad4的蛋白表达, 并能上调Smad7的蛋白表达^[32]。在Smad分子中Smad4是TGF- β 1活化通路中关键的核心分子, 而Smad7却抑制TGF- β 1的信息传递, 从而阻断TGF- β 1所诱导的ECM合成以及肝星状细胞的激活, 发挥抗肝纤维化的作用。IFN- γ 通过抑制细胞信号转导与转录激活因子1 (STAT1)介导的腺苷酸环化酶的表达而妨碍LX-2细胞腺苷A_{2A}受体的功能, 从而阻断了A_{2A}受体介导的胶原蛋白及其mRNA的表达, 部分解释了IFN- γ 通过何种机制发挥抗纤维化功效^[33]。A₁、A_{2A}、A_{2B}和A₃是存在于哺乳动物中的四种腺苷受体, 属于G蛋白偶联受体。IFN- γ 、TNF- α 和IL-1均可调控A_{2A}受体的表达和功能, 其中TNF- α 和IL-1增强A_{2A}受体的表达, 而IFN- γ 是负责负调控的。

3.1.2 其它抑制因子 除上述常见抑制因子外, 一些特殊的抑制因子也被陆续发现。一种钙调蛋白激酶II (CaMKII)选择性抑制剂KN-93^[34], 可通过抑制细胞周期调节因子p53和p21的表达而抑制LX-2细胞系增殖。KN-93 (5~50 μ mol/L)处理LX-2细胞系24 h, 其抑制增殖作用具有剂量依赖性, 从81.76%到27.15%; 用10 μ mol/L KN-93处理LX-2细胞系, 其抑制作用具有时间依赖性, 从8 h的78.27%到48 h的11.48%。高杰等^[35]研究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)诱导肝星状细胞凋亡情况及调控机制, 结果发现与对照组相比, TRAIL诱导的LX-2细胞凋亡明显增加, Western blot分析显示, 在TRAIL作用下, LX-2细胞线粒体Bax、细胞浆半胱氨酸蛋

白酶(caspase-3)表达上调, 说明外源性TRAIL可诱导LX-2细胞凋亡, 同时由于DR5受体在LX-2细胞膜表面表达增加, 使外源性TRAIL诱导细胞凋亡的敏感性提高。其机制与DR5及线粒体Bax表达上调有关。另有发现骨形态发生蛋白-7 (BMP-7)可抑制肝星状细胞的增殖和活化, 减少I型胶原质的表达, 其机制可能为抑制TGF- β -Smad通路中Smad3 mRNA表达, 增加Smad7 mRNA表达, 从而拮抗TGF- β 1的促纤维化作用^[36]。Decorin是一种平均分子量在90~140 kDa的蛋白多糖, 可修饰胶原质, 具有抗肿瘤发生的作用。Shi等^[8]将人decorin糖蛋白克隆重组制备出重组人decorin蛋白(rhDecorin), 并以13 μ g/mL的浓度与2 ng/mL TGF- β 1同时加入LX-2细胞培养液。与只加TGF- β 1的LX-2细胞系相比, rhDecorin有效抑制了TGF- β 1对LX-2细胞系的激活作用, 表现为MMP-2和TIMP-1 mRNA表达减少、 α -SMA、胶原质III型和磷酸化Smad2显著减少等。

3.2 西药抑制及相关作用机理

除已经临床使用的西药外, 一些西药成分尚处于实验室研究阶段, 其抑制肝星状细胞活化的机理正在明确。根据抑制作用靶点的不同可简单分为两类。**3.2.1 抑制肝星状细胞增殖和活化, 促进肝星状细胞凋亡** 热激蛋白(hsp90)抑制剂17AAG可诱导LX-2细胞系凋亡, 而且在凋亡之前抑制细胞活化^[37]。17AAG通过诱导核转录因子(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)和糖皮质激素受体之间的复合物的形成, 阻止了NF- κ B信号传导通路活化。NF- κ B信号传导通路可被TNF- α 等细胞因子激活, 活化的NF- κ B被解离出来并移位入肝星状细胞细胞核, 其亚基形成环状与DNA接触并启动基因转录。目前, NF- κ B信号通路的特异抑制剂大多仅限于实验室相关研究, 在临床上的意义还需要进一步观察。来氟米特A771726处理活化的LX-2细胞系, 并不增加TRAIL受体的表达, 而是通过降低TRAIL诱导的JNK和c-Jun磷酸化抑制c-Jun NH₂-末端激酶(JNK)激活通路, 而且A771726加速TRAIL诱导的细胞凋亡, 因此, 来氟米特有望成为有效的抗纤维化药物^[38]。终浓度为5 μ g/mL的奥曲肽处理肝星状细胞细胞系, 实时监测细胞内钙离子浓度, 检测肿瘤生长抑素受体(SSTRs1-5)的表达情况, 发现SSTRs1-5在蛋白和mRNA水平均阳性表达, 细胞内钙离子浓度下降两倍, 说明奥曲肽可通过刺激SSTRs1-5降低细胞内钙离子浓度, 从

而抑制肝星状细胞收缩以治疗肝病患者^[39]。Wang等^[40]研究发现,治疗肾癌及肝癌的药物索拉菲尼(Sorafenib)可减少LX-2细胞系增殖,导致细胞凋亡,而且Sorafenib诱导LX-2细胞内MMPs组分增加TIMPs组分减少,胶原蛋白合成减少,其部分机制在于抑制了ERK、蛋白激酶B(Akt)和70 kDa核糖体S6激酶(p70S6K)的磷酸化,最终说明Sorafenib具有抗纤维化效应。

3.2.2 抑制ECM合成或降解ECM Ciglitazon作为过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR γ)的配体,除了能抗糖尿病外,还通过阻断肝星状细胞的TGF- β 1型受体(TGF β R1)信号途径,阻止Smad3磷酸化而抑制纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)和胶原蛋白I α 1的表达,发挥其抗纤维化的作用^[41]。细胞色素P450 2E1(CYP2E1)抑制剂DDC可上调肝星状细胞中MMP-1的表达,抑制I型胶原合成,但对I型胶原和TIMP-1的转录无明显影响^[42]。用吡非尼酮(PFD)处理活化的LX-2细胞系,发现明显抑制了 α -SMA和I型胶原的表达,说明PFD具有抗肝星状细胞活化及抗纤维化功能^[43]。

3.3 中药抑制及相关作用机理

中医干预肝星状细胞的途径主要通过阻断肝星状细胞活化、抑制肝星状细胞增殖、促进肝星状细胞凋亡,干扰肝星状细胞自分泌及旁分泌活性因子功能,调节胶原代谢,抑制收缩及调控其细胞内信号转导等。目前,中医药制剂抗纤维化的作用仍较弱^[44],原因在于:(1)中药产地、剂型、品系存在差异,如何统一其疗效作用是一难题;(2)需进一步明确复方制剂相互作用的机制及各自作用的靶点,以最好地发挥中药协同抗纤维化的作用;(3)部分中药对肝功能存在不可避免的损害。

3.3.1 抑制肝星状细胞增殖和活化 黄芪多糖和黄芪总甙对LX-2细胞中与纤维化相关的细胞因子的分泌有影响^[45]。低浓度(25 μ g/mL)和高浓度(300 μ g/mL)的黄芪多糖和黄芪总甙可通过不同的分子机制调控肝星状细胞因子的分泌而发挥抗纤维化作用;黄芪多糖主要以促进MMP-2分泌为主,而黄芪总甙则主要通过上调MMP-2、MMP-9及IL-10的分泌而发挥作用。最近又发现,丹参素对肝星状细胞增殖、活化及TGF- β 、BMP受体表达有影响^[46],研究发现TGF- β 1诱导的细胞活化可被丹参素浓度依赖性抑制,丹参素可浓度依赖性减少T β R I、II和增加BMPR

II mRNA表达,说明丹参素可抑制肝星状细胞增殖和TGF- β 1诱导的肝星状细胞活化。

3.3.2 促进肝星状细胞凋亡 有研究发现川芎嗪(TMP)可显著促进LX-2细胞凋亡,细胞早期凋亡率随TMP浓度增加而提高;同时TMP可显著降低LX-2细胞TIMP-1 mRNA的表达^[47]。最终得出结论,TMP促进肝星状细胞凋亡,其抗肝纤维化的部分机制是抑制TIMP-1 mRNA的表达。随后,又发现姜黄素可显著促进LX-2细胞凋亡,细胞早期凋亡率随姜黄素质量浓度增加而提高;同时姜黄素可显著降低LX-2细胞的胶原I型 mRNA表达,表明姜黄素可促进肝星状细胞凋亡,其抗肝纤维化的部分机制是抑制胶原I型的表达^[48]。Deng等^[49]的最新研究发现天然牛磺酸对肝星状细胞的调控以及抑制肝纤维化的机制,用终浓度40 mmol/L牛磺酸的DMEM处理LX-2细胞系48 h,蛋白组学技术鉴定出19种差异表达蛋白,分析得出天然牛磺酸通过促进肝星状细胞凋亡而抑制肝纤维化。

3.4 其他物质抑制

3.4.1 抗氧化物 抗氧化成分不仅能抑制肝星状细胞活化和胶原合成,而且可阻止kupffer细胞活化和保护肝细胞凋亡。如研究S-腺苷蛋氨酸(SAM)对人肝细胞和肝星状细胞(LX-2细胞株)增殖和氧应激及转化生长的影响,发现SAM可抑制肝星状细胞增殖,而对肝细胞增殖无影响;SAM可增加肝细胞和肝星状细胞的超氧化物歧化酶(SOD)活力,降低其丙二醛(MDA)含量,同时可抑制肝星状细胞的TGF- β 1表达。结论: SAM可抑制肝星状细胞增殖,保护肝细胞和肝星状细胞免受氧应激损伤,抑制肝星状细胞分泌TGF- β 1,显示其具有抑制肝星状细胞增殖、抗氧化和抗肝纤维化作用^[50-51]。另外,还原型谷胱甘肽(GSH)对人肝细胞和LX-2细胞株增殖和氧应激及TGF- β 1表达也有影响,发现GSH可促进肝细胞增殖,保护肝细胞和肝星状细胞免受氧应激损伤,抑制肝星状细胞分泌TGF- β 1,显示其具有肝细胞保护、抗氧化和抗肝纤维化作用^[52]。

3.4.2 其他物质 研究天然产物Withagutatin A对肝星状细胞的存活率和I型原骨胶原产量的影响,发现Withagutatin A减少了控制LX-2细胞增殖和存活的胰岛素样生长因子(IGF-I)/磷酸肌醇三激酶(PI3K)/苏氨酸激酶(Akt)/雷帕霉素(mTOR)靶蛋白(p70S6K)信号通路(Akt/mTOR/p70S6K)磷酸化,同时抑制了原

骨胶原I型基因的表达, 结果表明Withagultin A有效降低了肝星状细胞的存活率和I型原骨胶原产量, 可能成为一种抗纤维化新的药物^[53]。维生素A和棕榈酸盐调节脂肪分化相关蛋白(ADRP)表达上调可导致LX-2细胞胶原质I型表达减少, *MMP-1* mRNA表达增加等一系列肝星状细胞活化下调的纤维化相关分子变化^[54]。

3.5 基因治疗及其原理

基因治疗, 理论上是指将目的DNA通过病毒载体介导或脂质体转移或细胞吞噬作用等手段导入到肝脏细胞内(包括肝细胞、肝星状细胞等), 抑制宿主细胞胶原纤维基因表达从而起到治疗肝纤维化的作用。刘天会等^[55]构建含*MMP-1*全长编码基因的表达质粒, 并转染LX-2细胞系, 荧光定量PCR与Western blot法分别检测*MMP-1*、I型胶原、*TIMP-1*基因与蛋白水平的表达, 结果发现人肝星状细胞高表达*MMP-1*后显著抑制I型胶原蛋白的表达, 其机制主要通过发挥其酶活性降解I型胶原蛋白, 而不影响I型胶原蛋白基因水平的表达, 同时也不影响*TIMP-1*在基因以及蛋白水平的表达。Gao等^[56]用*CCN2* cDNA构建pTriCCN2-Rz质粒转染LX-2细胞系, 发现正常pTriEx2质粒转染的LX-2细胞经TGF- β 1诱导可活化, 但pTriCCN2-Rz质粒转染的LX-2细胞*CCN2*和胶原质I型在蛋白水平及mRNA水平均被抑制。

3.6 病毒治疗及相关分子机制

新城疫病毒(NDV)具有在肿瘤细胞和转化细胞中选择性复制的特性。Li等^[57]发现经TGF- β 1活化的LX-2细胞可促进NDV的复制。在活化的LX-2细胞系中, α -SMA、I型胶原、*TIMP-1*和TGF- β 1在mRNA水平上表达上调, 当LX-2细胞感染NDV后上述细胞因子在转录水平表达降低了。从而说明NDV可在活化的LX-2细胞中选择性复制, 使MMPs分泌减少, 从而削弱肝星状细胞的活化。将活化的LX-2细胞系与具有抑制肝星状细胞活化作用的细胞系共培养或在该细胞系的条件培养基中培养也能有效地抑制活化。Basu等^[58]将LX-2细胞系与转染了HCV核心基因片段的永生化人肝细胞系(IHH)共培养, 或将LX-2细胞系培养于IHH条件培养基中, 发现LX-2细胞表面TRAIL受体表达增加, 且以caspase依赖性机制诱导细胞凋亡, 说明CM中某些可溶性调节因子可促肝星状细胞凋亡。多种药物作用于活化的肝星状细胞后, 诱导效应子caspases-3的表达, 最终导致肝星状

细胞凋亡。

3.7 改变培养环境

培养环境(条件)的改变可刺激肝星状细胞系活化, 同样, 适当的条件改变也可抑制肝星状细胞活化, 保护肝星状细胞不受损。我们都知道, 对真核细胞氨基酸剥夺处理可使其在应力条件下存活。Arriazu等^[59]将LX-2细胞系做组氨酸剥夺处理, 发现细胞内活性氧(ROS)水平快速降低, 同样的情况也发生在亮氨酸剥夺及无氨基酸培养基培养条件下, 但无糖培养基却不能使ROS水平快速降低。组氨酸剥夺诱使GCN2激酶及其底物eIF2 α 磷酸化。GCN2激酶是一般氨基酸控制通路活化的关键, 其活化说明氨基酸限制通过调控GCN2激活而起到保护肝星状细胞的作用。

4 结语

总之, 肝纤维化是多种病因导致慢性肝损害的共同结局, 肝星状细胞的激活、增殖和凋亡在肝纤维化发生、发展中发挥着重要作用, 针对肝星状细胞的抗纤维化治疗具有重要意义。伴随着越来越多科研工作者的投入和先进技术的开发, 人类对肝星状细胞激活机制和抑制活化机制的认识会更准确、深刻, 会有更简单、有效、无伤害的防治手段出现, 从而使人类的肝脏不再“受伤”。

参考文献 (References)

- 1 Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28(2): 105-12.
- 2 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134(6): 1655-69.
- 3 Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis. *Biochem J* 2008; 41(1): 1-18.
- 4 Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, *et al.* Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: New tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005; 54(1): 142-51.
- 5 Feng XH, Derynck R. A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J* 1997; 16(13): 3912-23.
- 6 Shimada H, Staten NR, Rajagopalan LE. TGF- β 1 mediated activation of Rho kinase induces TGF- β 2 and endothelin-1 expression in human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2011; 54(3): 521-8.
- 7 Shi YF, Zhang Q, Cheung PY, Shi L, Fong CC, Zhang Y, *et al.* Effects of rhDecorin on TGF- β 1 induced human hepatic stel-

- late cells LX-2 activation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1760(11): 1587-95.
- 8 Saxena NK, Titus MA, Ding XK, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, *et al.* Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: Mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (ErK) and Akt phosphorylation. *FASEB J* 2004; 18(13): 1612-4.
- 9 Jiang JX, Mikami K, Shah VH, Torok NJ. Leptin induces phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells via a Rho guanosine triphosphatase-dependent mechanism. *Hepatology* 2008; 48(5): 1497-505.
- 10 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Leptin enhances $\alpha 1(I)$ collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H_2O_2 -dependent MAPK pathways. *J Cell Biochem* 2006; 97(1): 188-97.
- 11 Won HH, Park I, Lee E, Kim JW, Lee D. Comparative analysis of the JAK/STAT signaling through erythropoietin receptor and thrombopoietin receptor using a systems approach. *BMC Bioinformatics* 2009; 10(Suppl 1): S53.
- 12 Martínez-Chantar ML, Vázquez-Chantada M, Ariz U, Martínez N, Varela M, Luka Z, *et al.* Loss of the glycine N-methyltransferase gene leads to steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2008; 47(4): 1191-9.
- 13 Sokolović A, Sokolović M, Boers W, Oude Elferink RP, Bosma PJ. Insulin-like growth factor binding protein 5 enhances survival of LX2 human hepatic stellate cells. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010; 17(3): 3.
- 14 Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, Palmer TE, Holdren MS, Haran AC, *et al.* Platelet derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(9): 3389-93.
- 15 Li G, Xie Q, Shi Y, Li DG, Zhang MJ, Jiang S, *et al.* Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *J Gene Med* 2006; 8(7): 889-900.
- 16 富翠芹, 王沁, 尹蓉, 武令启. PI-3K/AKT信号转导通路在肝癌细胞生长和黏附中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(14): 1493-8.
- 17 Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 114(2): 181-90.
- 18 Xu SW, Chen YL, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, *et al.* Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2004; 15(6): 2707-19.
- 19 李涛, 冷希圣, 秦致中, 宋盛晗, 赵力, 熊亮发, 等. 白细胞介素10对肝星状细胞激活的调节. *中华肝脏病杂志* 2005; 13(1): 35-7.
- 20 Rockey DC, Malter JJ, Jarnagin WR, Gabbiani G, Friedman SL. Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon-gamma. *Hepatology* 1992; 16(3): 776-84.
- 21 Napoli T, Bioshop GA, McCaughan GW. Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukins 2, 6 and 8 in human cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 107(3): 789-98.
- 22 Suzuki K, Aoki K, Ohnami S, Yoshida K, Kazui T, Nato N, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of interferon α improves dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis in rat model. *Gene Therapy* 2003; 10(9): 765-73.
- 23 Gelosa P, Cimino M, Pignieri A, Tremoli E, Guerrini U, Sironi L. The role of HMG-CoA reductase inhibition in endothelial dysfunction and inflammation. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3(5): 567-77.
- 24 Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, *et al.* Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008; 118(9): 3065-74.
- 25 Wu XN, Bai QX, Liu TH, Li J, You H, Jia JD. Purified HBV promoting Smad3 expression in human hepatic stellate cell line LX-2 cells. *Infect Dis Info* 2009; 22(4): 203-6.
- 26 Guo GH, Tan DM, Zhu Pi A, Liu F. Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF- $\beta 1$ and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8(1): 59-64.
- 27 Clément S, Pascarella S, Conzelmann S, Gonelle-Gispert C, Guilloux K, Negro F. The hepatitis C virus core protein indirectly induces alpha-smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8. *J Hepatol* 2010; 52(5): 635-43.
- 28 Shi YF, Fong CC, Zhang Q, Cheung PY, Tzang CH, Wu SS, *et al.* Hypoxia induces the activation of human hepatic stellate cells LX-2 through TGF- β signaling pathway. *FEBS Lett* 2007; 581(2): 203-10.
- 29 Watanabe A, Sohail MA, Gomes DA, Hashmi A, Nagata I, Sutterwala FS, *et al.* Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296(6): 1248-57.
- 30 Che J, Chan ES, Cronstein BN. Adenosine A_{2A} receptor occupancy stimulates collagen expression by hepatic stellate cells via pathways involving protein kinase A, src, and extracellular signal-regulated kinases 1/2 signaling cascade or p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Mol Pharmacol* 2007; 72(6): 1626-36.
- 31 Moles A, Tarrats N, Morales A, Dominguez M, Bataller R, Caballeria J, *et al.* Acidic sphingomyelinase controls hepatic stellate cell activation and *in vivo* liver fibrogenesis. *Am J Pathol* 2010; 177(3): 1214-24.
- 32 Rao H Y, Wei L, Fei R, Wang JH, Jiang D, Zhang Q, *et al.* Inhibitory effect of interferon- β on the activation of LX-2 and rHSC-99 hepatic stellate cells in culture. *Chin J Hepatol* 2006; 14(7): 550-2.
- 33 Block ET, Cronstein BN. Interferon-gamma inhibits adenosine A_{2A} receptor function in hepatic stellate cells by STAT1-mediated repression of adenylyl cyclase. *Int J Interferon Cytokine Media-*

- tor Res 2010; 2010(2): 113-26.
- 34 An P, Zhu JY, Yang Y, Cronstein BN. KN-93, a specific inhibitor of CaMK II inhibits human hepatic stellate cell proliferation *in vitro*. World J Gastroenterol 2007; 13(9): 1445-8.
- 35 Gao J, Zhao YH, Kang P, Liang M, Li SC. The effect of TRAIL on apoptosis of human hepatic stellate cell lines LX-2 and its regulation mechanism. Chinese Hepatol 2010; 15(2): 109-12.
- 36 武鹏宇, 戴立里, 唐 静, 吕琳琳. 骨形态发生蛋白-7对人肝星状细胞转化生长因子 β 信号转导的影响. 第三军医大学学报 2010; 32(13): 1433-7.
- 37 Myung SJ, Yoon JH, Kim BH, Lee JH, Jung EU, Lee HS. Heat shock protein 90 inhibitor induces apoptosis and attenuates activation of hepatic stellate cells. J Pharmacol Exp Ther 2009; 330(1): 276-82.
- 38 Tang XM, Yang JT, Li J. Sensitization of human hepatic stellate cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by leflunomide. Biol Pharmaceut Bull 2009; 32(6): 963-7.
- 39 Zhai Y, Zhang J, Shang HW, Lu SC, Wang ML, You H, *et al*. Octreotide decreases portal pressure: Hepatic stellate cells may play a pivotal role. Afr J Biotechnol 2010; 9(12): 1833-8.
- 40 Wang Y, Gao JC, Zhang D, Zhang J, Ma JJ, Jiang HQ. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis. J Hepatol 2010; 53(1): 132-44.
- 41 Zhao CY, Zhou J, Ying YL, Wang YD. Molecular mechanism of ciglitazone inhibiting the expression of extracellular matrix in human hepatic stellate cells. Chin J Hepatol 2007; 15(11): 840-4.
- 42 Liu TH, Cong M, Wang P, Xu YQ, You H. Cytochrome P450 2E1 inhibitor DDC upregulated the expression of MMP1 in human hepatic stellate cells. Chinese Hepatol 2010; 15(3): 180-2.
- 43 Zhao XY, Zeng X, Li XM, Wang TL, Wang BE. Pirfenidone effectively inhibits carbon tetrachloride-albumin complex-induced liver fibrosis in rodents by preventing activation of hepatic stellate cells. Clin Exp Pharmacol Physiol 2009; 36(10): 963-8.
- 44 黄贵华, 林寿宁. 以肝星状细胞为靶标的中医药抗肝纤维化实验研究概况. 广州中医药大学学报 2004; 21(3): 228-30.
- 45 李淑萍, 许晓燕, 孙 箴, 周林福, 羊正纲, 陈 峰, 等. 黄芪多糖和黄芪总甙调控LX-2细胞因子分泌. 浙江大学学报(医学版) 2007; 36(6): 543-8.
- 46 武鹏宇, 戴立里, 唐 静, 吕琳琳. 丹参素对肝星状细胞增殖、活化及TGF β /BMP受体表达的影响. 重庆医科大学学报 2010; 35(9): 1344-7.
- 47 何 航, 华海婴, 徐宏平. 川芎嗪对人肝星状细胞凋亡与基质金属蛋白酶抑制因子-1 mRNA表达的影响. 辽宁中医杂志 2008; 35(10): 1447-8.
- 48 何 航, 沈晓君, 华海婴. 姜黄素对人肝星状细胞LX-2凋亡及Collagen α 1(I) mRNA表达的影响. 中药材 2009; 32(12): 1880-2.
- 49 Deng X, Liang J, Lin ZX, Zhang YP, Zhang ZW. Natural taurine promotes apoptosis of human hepatic stellate cells in proteomics analysis. World J Gastroenterol 2010; 16(15): 1916-23.
- 50 刘 梅, 陆伦根, 窦爱霞, 陈尉华, 郑瑞丹, 茅益民, 等. S-腺苷蛋氨酸对人肝星状细胞增殖和氧应激及转化生长因子 β 1表达的影响. 肝脏 2007; 12(2): 99-102.
- 51 Matsui H, Kawada N. Effect of S-adenosyl-L-methionine on the activation, proliferation and contraction of hepatic stellate cells. Eur J Pharmacol 2005; 509(1): 31-6.
- 52 刘 梅, 陆伦根, 窦爱霞, 陈尉华, 郑瑞丹, 曹民德, 等. 还原型谷胱甘肽对人肝星状细胞增殖和氧应激及转化生长因子 β 1表达的影响. 中华消化杂志 2007; 27(10): 666-9.
- 53 Liu Q, Chen J, Wang X, Yu L, Hu LH, Shen X. Withagutalin A inhibits hepatic stellate cell viability and procollagen I production through Akt and Smad signaling pathways. Acta Pharmacologica Sinica 2010; 31(8): 944-52.
- 54 Lee TF, Mak KM, Rackovsky O, Lin YL, Kwong AJ, Loke J, *et al*. Downregulation of hepatic stellate cell activation by retinol and palmitate mediated by adipose differentiation-related protein (ADRP). J Cell Physiol 2010; 223(3): 648-57.
- 55 刘天会, 丛 敏, 王 萍, 尤 红. MMP-1过表达抑制人肝星状细胞I型胶原表达. 肝脏 2009; 14(4): 291-4.
- 56 Gao RP, Brigstock DR. Connective tissue growth factor hammerhead ribozyme attenuates human hepatic stellate cell function. World J Gastroenterol 2009; 15(30): 3807-13.
- 57 Li YL, Wu J, Wei D, Zhang DW, Feng H, Chen ZN, *et al*. Newcastle disease virus represses the activation of human hepatic stellate cells and reverses the development of hepatic fibrosis in mice. Liver Int 2009; 29(4): 593-602.
- 58 Basu A, Saito K, Meyer K, Ray RB, Friedman SL, Chang YH, *et al*. Stellate cell apoptosis by a soluble mediator from immortalized human hepatocytes. Apoptosis 2006; 11(8): 1391-400.
- 59 Arriazu E, De Obanos MP, López-Zabalza MJ, Herraiz MT, Iraburu MJ. Amino acid deprivation decreases intracellular levels of reactive oxygen species in hepatic stellate cells. Cell Physiol Biochem 2010; 26(3): 281-90.

Activation and Inhibition of Human HSCs and the Related Molecular Mechanisms

Qin Yannan, Zhong Yaogang, Li Zheng*

(Laboratory for Functional Glycomics, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract Liver fibrosis is the excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins resulting from chronic liver damage. Cirrhosis is the end-stage consequence of fibrosis of the hepatic parenchyma. If liver fibrosis can be detected and treated early, cirrhosis can be prevented. During the past 20 years, much research has proved that the activation and proliferation of hepatic stellate cells (HSCs) play a pivotal role in liver fibrogenesis. One of the current international thinkings on developing anti-fibrotic drugs is to find molecular targets from the mechanism of liver fibrosis, especially HSCs activation mechanism. As a result of the “communication” of multiple signal pathways, HSCs activation mechanisms and the related inhibition mechanisms are especially complicated and varied. In recent years, some progress has been made on the related mechanisms of HSCs and some molecular mechanisms are still unknown. The main purpose of this paper is to summarize updated activation and inhibition of human HSCs and the related molecular mechanisms.

Key words liver fibrosis; hepatic stellate cells; activation; inhibition; molecular mechanism

Received: June 15, 2011 Accepted: July 6, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30870549) and Doctoral Program Foundation of Institutions of Higher Education of China (No.200806970018, No.20106101110012)

*Corresponding author. Tel: 86-29-88303446, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn