

领域前沿 · 中国



李红良教授, 武汉大学博士生导师, 国家杰出青年基金获得者、教育部长江学者特聘教授、科技部中青年科技创新领军人才、国家“万人计划”领军人才、湖北省“百人计划”特聘专家。2006年在中国协和医科大学获得博士学位。2006年至2008年底先后受邀到美国哈佛大学医学院、加拿大多伦多大学从事博士后研究工作。现任武汉大学基础医学院院长、武汉大学动物实验中心/ABSL-III实验室主任、武汉大学模式动物研究所所长、武汉大学心血管病研究所副所长、中南医院医学科学研究中心主任。

李红良教授长期致力于心血管代谢性疾病的发生机制与防治研究以及基因工程动物模型的研发。回国后创建了湖北省模式动物研究中心及武汉大学模式动物协同创新中心, 建立了系统而完善的转基因技术和基因敲除技术平台以及大小鼠心血管疾病动物模型的标准化系统, 自主研发或合作研发基因工程大鼠、小鼠1300多个品系。过去十余年来, 应用大量的临床标本, 结合基因工程动物模型, 深入系统地探讨了天然免疫的网络通路对心血管代谢性疾病的作用及其分子机理。在国际上首次提出了天然免疫信号重构概念, 并发现这些天然免疫信号完全可以通过非免疫依赖机制实现, 提出的新理论改变了国际同行学者对天然免疫网络调控作用的认识。

已发表国际重要杂志论文128篇, 其中发表于影响因子10分以上的国际著名杂志25篇; 包括发表在Nat Med、PNAS、Circulation、Hepatology、J Hepatol、Nat Commun等国际知名杂志, 并连续3年入选2014、2015、2016年度中国高被引学者榜单(医学)。以第一申请人申请国内发明专利124项, 获得授权专利43项。承担国家级及省部级项目近30项, 其中作为项目首席科学家主持国家科技支撑计划1项, 作为项目负责人主持国家科技支撑计划5项; 并作为项目负责人获得国家杰出青年基金、国家自然科学基金重点项目、国家自然科学基金重大计划项目等。荣获湖北省科技进步一等奖以及药明康德生命化学研究奖等多项奖励。

实验室近期在Nat Med上发表的研究成果首次揭示了天然免疫重要分子CFLAR对非酒精性脂肪肝炎(NASH)疾病进程中的关键负调控作用, 深入阐明了其分子机制, 对NASH防治具有重要的临床指导意义(Wang *et al.* Nat Med 2017)。

靶向CFLAR改善小鼠和非人灵长类动物的 非酒精性脂肪肝炎

王丕晓¹ 陈明明¹ 沈立君¹ 李红良^{1,2,3*}

(¹武汉大学人民医院心血管内科, 武汉 430071; ²武汉大学基础医学院, 武汉 430071;

³武汉大学动物实验中心/ABSL-III实验室, 武汉 430071)

摘要 非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)逐渐成为发病率最高的慢性肝病类型。NASH发病常常伴随全身代谢综合征, 疾病进展具有发生肝硬化甚至肝癌的高风

*通讯作者。Tel: 027-68759302, E-mail: lihl@whu.edu.cn

*Corresponding author. Tel: +86-27-68759302, E-mail: lihl@whu.edu.cn

网络出版时间: 2017-03-20 16:58:53

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170320.1658.016.html>

险。然而,目前临床上尚无一种获批的针对NASH的有效治疗药物。我们的最新研究结果发现,天然免疫重要分子CFLAR[CASP8 and FADD(Fas-associating protein with death domain)-like apoptosis regulator]直在NASH疾病进程中的关键负调控作用。深入的分子机制探索证实,CFLAR接靶向激酶MAP3K5[mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5,也称为ASK1(apoptosis signal-regulating kinase 1)]并阻断其N-端二聚化,从而抑制ASK1和激酶MAPK8[mitogen-activated protein kinase 8,也称为JNK1(c-Jun N-terminal kinase 1)]的信号通路。此外,我们鉴定出源于CFLAR的一个小肽片段(S1)可以有效发挥CFLAR对ASK1的抑制作用。应用CFLAR(S1)治疗可有效改善并逆转小鼠和猴子中的NASH及并发的代谢综合征。综上所述,我们发现,CFLAR是控制NASH疾病进展的关键抑制子。CFLAR(S1)特异性抑制ASK1激活的作用机制,为开发或筛选NASH的靶向治疗药物提供了可行的新方案。

关键词 CASP8和FADD样凋亡调节因子;非酒精性脂肪肝炎;凋亡信号调节激酶1

Targeting CASP8 and FADD-Like Apoptosis Regulator Ameliorates Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice and Nonhuman Primates

Wang Pixiao¹, Chen Mingming¹, Shen Lijun¹, Li Hongliang^{1,2,3*}

⁽¹⁾Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; ⁽²⁾Basic Medical School, Wuhan University, Wuhan 430071, China; ⁽³⁾Institute of Model Animal of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a progressive disease that is often accompanied by metabolic syndrome and poses a high risk of severe liver damage. However, no effective pharmacological treatment is currently available for NASH. Here we report that CASP8 and FADD (Fas-associating protein with death domain)-like apoptosis regulator (CFLAR) is a key suppressor of steatohepatitis and its metabolic disorders. We provide mechanistic evidence that CFLAR directly targets the kinase MAP3K5 (also known as ASK1) and interrupts its N-terminus-mediated dimerization, thereby blocking signaling involving ASK1 and the kinase MAPK8 (also known as JNK1). Furthermore, we identified a small peptide segment in CFLAR that effectively attenuates the progression of steatohepatitis and metabolic disorders in both mice and monkeys by disrupting the N-terminus-mediated dimerization of ASK1. Taken together, these findings establish CFLAR as a key suppressor of steatohepatitis and indicate that the development of CFLAR-peptide-mimicking drugs and the screening of small-molecular inhibitors that specifically block ASK1 dimerization are new and feasible approaches for NASH treatment.

Keywords CFLAR; NASH; ASK1

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)被认为是全身性代谢综合征在肝脏的表现,后者的主要表现包括高血压、血脂异常、糖尿病、肥胖等。NAFLD患病人数逐年增加,已逐渐成为最常见的慢性肝病类型。非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)是NAFLD较为严重的进展阶段,表现为严重的肝脏脂肪堆积、炎症反应和纤维化。临床研究表明,NASH患者十年内肝硬化和肝癌发生率高达25%,预计NASH将成

为未来十年肝移植的主要原因^[1-2]。然而,目前临床上尚无有效治疗NASH的药物,原因主要在于NASH发病存在很大的异质性,且决定NASH进展的关键机制尚不明确。当前,NASH的治疗策略主要是改善不良的饮食习惯和生活方式以及控制并发的代谢综合征。然而,这些措施往往收效甚微^[3-5]。因此,找到更加特异性的作用于肝脏,尤其是针对NASH进展关键环节——炎症及纤维化的靶向治疗药物,是一件急迫且重要的科学任务。

我们团队长期致力于研究天然免疫与心血管、代谢疾病的关系及作用机制^[6-7]。CASP8和FADD(Fas-associating protein with death domain)样凋亡调节因子(CASP8 and FADD-like apoptosis regulator, CFLAR)是天然免疫调控网络重要分子, 我们之前的研究发现, CFLAR在病理性心脏重构过程中发挥抗凋亡、抑制炎症及纤维化的作用^[8-9]。在NASH的前期研究中, 我们利用小鼠及人体的NASH肝脏样本开展了大量的潜在调控靶分子筛选工作, 其中, 发现CFLAR蛋白含量与NASH的疾病进展呈负相关, 提示CFLAR在NASH进程中可能发挥重要作用。此外, 临床报道了CFLAR在人体多个器官中对炎症、纤维化的显著调控功能^[10-12]。另一方面, 肝脏的根本功能依赖于其对代谢的调控, 大量证据显示, 慢性代谢异常是肝细胞损伤和肝功能障碍的主要原因^[13-14]。由此, 我们的目的是探索CFLAR对肝脏代谢的调控作用, 尤其是阐明CFLAR是否可以作为NASH的治疗靶点^[15]。

1 肝细胞中CFLAR抑制肝脏脂质堆积、炎症并改善胰岛素抵抗

为了明确CFLAR参与脂肪肝的发病过程, 我们首先检测了CFLAR在饮食引起的代谢紊乱小鼠多个组织器官中的表达。结果发现, 与正常小鼠相比, CFLAR蛋白含量在脂肪肝中显著地减少, 而在脂肪及骨骼肌等代谢相关组织器官中没有明显变化。为了进一步确认这一发现, 我们收集了人体NASH肝脏活检样本进行临床相关性研究, 结果证实, 肝脏中CFLAR的蛋白含量与NASH的疾病进展呈负相关。随后, 我们构建了肝细胞特异性CFLAR基因敲除小鼠以及肝细胞特异性CFLAR转基因小鼠。通过给予高脂饮食喂养诱导脂肪肝疾病模型, 动物实验结果证实了CFLAR对NASH的中心环节肝脏脂质堆积、炎症和胰岛素抵抗的关键抑制作用。

2 CFLAR发挥作用的分子机制

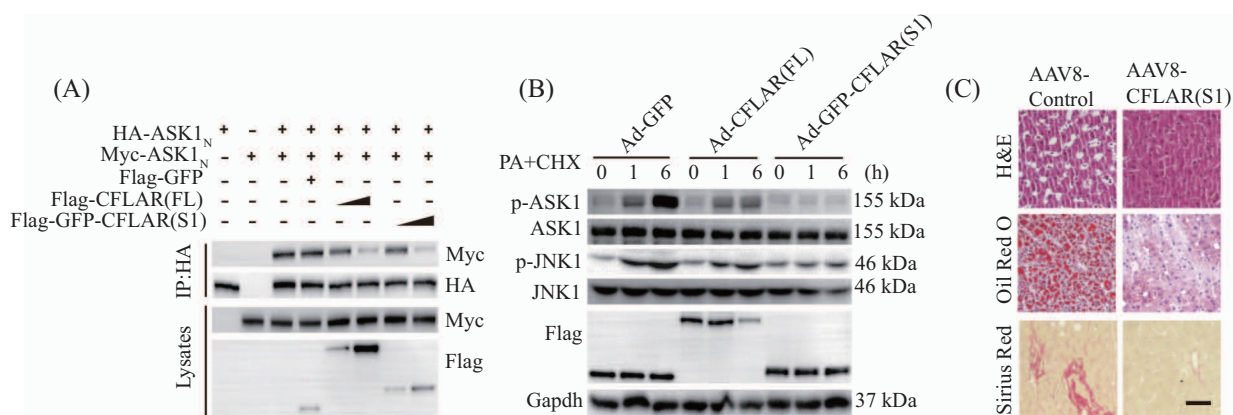
随后, 我们进行了深入的分子机制探索。首先, 通过检测多条可能参与NASH进展的信号通路的活性, 我们发现, CFLAR特异性地抑制ASK1-JNK1级联信号通路的激活。同时, 与正常肝组织相比, NASH肝脏组织中ASK1-JNK1处于过度激活状态。接下来, 我们重点探索CFLAR如何抑制

ASK1的激活。通过分子间相互作用实验, 我们发现, CFLAR(203~260)和CFLAR(414~480)两个片段[分别命名为CFLAR(S1)和CFLAR(S2)]可以与ASK1直接结合。然而, 随后的功能实验证实, 只有CFLAR(S1)可以阻断ASK1-JNK1信号通路的激活, 而CFLAR(S2)以及CFLAR(S1)和CFLAR(S2)的连接体[命名为CFLAR(S3)]均不能有效抑制ASK1的激活。CFLAR(S1)与全长CFLAR对ASK1的作用方式完全相同, 但是CFLAR(S1)比CFLAR全长更稳定, 抑制作用也更强。同时, 我们惊喜地发现, CFLAR(S2)片段与E3泛素连接酶ITCH结合, 导致CFLAR泛素化修饰并随后被蛋白酶体降解, 揭示了上述脂肪肝中CFLAR蛋白含量减少的原因。

ASK1形成二聚化及随后发生自磷酸化导致ASK1激活^[16]。N-末端卷曲螺旋(N-terminal coiled coil, NCC; 氨基酸297~324)和C-末端卷曲螺旋(C-terminal coiled coil, CCC; 氨基酸1 239~1 295)结构域负责ASK1的N-末端和C-末端的二聚化^[16]。我们观察到, CFLAR(S1)片段特异性地结合在ASK1的N-端, 通过抑制ASK1的N-端二聚化形成, 阻断ASK1激活(图1A和1B)。肿瘤坏死因子受体相关蛋白(tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF)与ASK1结合, 促进ASK1的过度活化^[16-17]。除了抑制ASK1的N-端二聚化形成, 我们的结果还证实了CFLAR可以竞争性地阻断TRAF6与ASK1的结合, 从而强有力地抑制ASK1的过度活化。

3 CFLAR对NASH的治疗效果

最后, 我们用CFLAR(S1)治疗小鼠及猴子的NASH及并发的代谢综合征。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一种复制缺陷型微小病毒, 由于其安全性好、宿主细胞范围广(分裂和非分裂细胞)、免疫源性低、在体内表达外源基因时间长等特点, 被视为最有前途的基因转移载体之一。此外, 不同AAV血清型具有特异的组织器官亲和性, 如AAV8载体表现出明显肝嗜性, AAV9载体则更特异性地靶向心脏^[18]。于是, 我们利用AAV8构建编码CFLAR(S1)序列的重组表达载体, 体内注射靶向肝脏治疗小鼠及猴子的NASH。小鼠实验结果显示, 与对照组相比, 肝脏中表达CFLAR(S1)显著减轻并逆转肝脏脂肪堆积和炎症, 同时, 胰岛素抵抗也得到显著改善。然而, 研究表明, 小鼠的疾病进展特



A: CFLAR全长和CFLAR(S1)抑制ASK1的N-端二聚化; B: CFLAR全长和CFLAR(S1)抑制ASK1-JNK1信号通路的激活; C: CFLAR(S1)显著减轻猴子的非酒精性脂肪肝炎。标尺=100 μ m。

A: full-length CFLAR (CFLAR-FL) and CFLAR(S1) impaired the N-terminus-mediated dimerization of ASK1; B: CFLAR-FL and CFLAR(S1) inhibit the activation of ASK1-JNK1 signaling; C: therapeutic effects of CFLAR(S1) on nonalcoholic steatohepatitis in monkeys. Scale bar=100 μ m.

图1 CFLAR通过抑制ASK1激活减轻非酒精性脂肪肝炎(根据参考文献[15]修改)

Fig.1 CFLAR inhibits ASK1 activation to ameliorate nonalcoholic steatohepatitis (modified from reference [15])

点与人体疾病的病理生理过程有较大差别^[19], 为了更加确信CFLAR的治疗效果及其临床转化潜能, 我们从野生猴群中筛选了18只代谢综合征倾向的猴子, 且肝脏活检证实NASH发病。通过门静脉注射AAV8-CFLAR(S1)治疗, 结果证实, CFLAR显著阻断并逆转NASH疾病进展(图1)。同时, 我们观察到, CFLAR(S1)对猴子的体重、心率、体温和血压没有明显影响, 显示了CFLAR治疗的特异性和安全性。

4 转化意义

本研究首次提出N-端二聚化介导的ASK1酶过度激活, 是控制NASH进展的关键环节, 对理解NASH的发病机制提出了全新的认识。通过阐明CFLAR抑制ASK1过度激活的调控机制, 我们提供了一种可开发靶向治疗药物的新策略。目前已经研发的ASK1抑制剂主要是直接抑制ASK1的激酶活性, 而ASK1的酶活性对于机体正常生理功能至关重要。正因为如此, ASK1抑制剂有可能影响正常的生理功能, 因而会限制临床的应用; 而我们的研究证实, N-端二聚化引起的ASK1的激活主要发生于疾病过程中, 因此, CFLAR更靶向于治疗疾病本身, 而对机体正常生理功能影响较小, 更具有临床转化的潜能。最新一项刊登在国际知名杂志PNAS上的研究报告证实, ASK1是参与多种疾病发生过程的关键因子, 比如帕金森综合征、胃癌以及黑色素瘤等^[20], 显示了ASK1对机体病理生理过程的重要作用。此前, 美国吉利德公司公布的数据显示, ASK1的抑制剂

在治疗NASH的二期临床实验中显示出了一定的疗效。而我们的研究更是为围绕ASK1开发靶向药物指明了方向, 有望彻底打破NASH治疗无药可用的局面。

参考文献 (References)

- Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol* 2015; 62(1 Suppl): S47-64.
- Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S, *et al.* Hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis in united states veterans is associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14(1): 124-31.e1.
- LaBrecque DR, Abbas Z, Anania F, Ferenci P, Khan AG, Goh KL, *et al.* World gastroenterology organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2014; 48(6): 467-73.
- Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2(11): 901-10.
- Czech MP. Obesity Notches up fatty liver. *Nat Med* 2013; 19(8): 969-71.
- Zhang XJ, Zhang P, Li H. Interferon regulatory factor signalings in cardiometabolic diseases. *Hypertension* 2015; 66(2): 222-47.
- The Institute of Model Animals of Wuhan University, China. *Eur Heart J* 2016; 37(43): 3257-9.
- Li H, Tang QZ, Liu C, Moon M, Chen M, Yan L, *et al.* Cellular FLICE-inhibitory protein protects against cardiac remodeling induced by angiotensin II in mice. *Hypertension* 2010; 56(6): 1109-17.
- Xiao J, Moon M, Yan L, Nian M, Zhang Y, Liu C, *et al.* Cellular FLICE-inhibitory protein protects against cardiac remodelling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2012; 107(1): 239.
- Cha SI, Groshong SD, Frankel SK, Edelman BL, Cosgrove GP, Terry-Powers JL, *et al.* Compartmentalized expression of c-FLIP in lung tissues of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am*

- J Respir Cell Mol Biol 2010; 42(2): 140-8.
- 11 Monteleone I, Monteleone G, Fina D, Caruso R, Petruzzello C, Calabrese E, *et al.* A functional role of flip in conferring resistance of Crohn's disease lamina propria lymphocytes to FAS-mediated apoptosis. *Gastroenterology* 2006; 130(2): 389-97.
- 12 Esmailzadeh S, Huang Y, Su MW, Zhou Y, Jiang X. BIN1 tumor suppressor regulates Fas/Fas ligand-mediated apoptosis through c-FLIP in cutaneous T-cell lymphoma. *Leukemia* 2015; 29(6): 1402-13.
- 13 Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114(2): 147-52.
- 14 Scorletti E, Byrne CD. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Nutr* 2013; 33: 231-48.
- 15 Wang PX, Ji YX, Zhang XJ, Zhao LP, Yan ZZ, Zhang P, *et al.* Targeting CASP8 and FADD-like apoptosis regulator ameliorates nonalcoholic steatohepatitis in mice and nonhuman primates. *Nat Med* 2017; doi: 10.1038/nm.4290.
- 16 Fujino G, Noguchi T, Matsuzawa A, Yamauchi S, Saitoh M, Takeda K, *et al.* Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol Cell Biol* 2007; 27(23): 8152-63.
- 17 Ji YX, Zhang P, Zhang XJ, Zhao YC, Deng KQ, Jiang X, *et al.* The ubiquitin E3 ligase TRAF6 exacerbates pathological cardiac hypertrophy via TAK1-dependent signalling. *Nat Commun* 2016; 7: 11267.
- 18 Nam HJ, Lane MD, Padron E, Gurda B, McKenna R, Kohlbrenner E, *et al.* Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector. *J Virol* 2007; 81(22): 12260-71.
- 19 Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, *et al.* Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(9): 3507-12.
- 20 Weijman JF, Kumar A, Jamieson SA, King CM, Caradoc-Davies TT, Ledgerwood EC, *et al.* Structural basis of autoregulatory scaffolding by apoptosis signal-regulating kinase 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; doi: 10.1073/pnas.1620813114.