

## 肝细胞微环境:抗肝纤维化药物的新靶点

刘庆山, 张梓倩, 崔 箭, 田燕泽, 庞宗然

**[摘要]** 本文以肝星状细胞为切入点,分析了肝细胞微环境与肝纤维化的关系。肝细胞微环境由肝星状细胞、细胞外基质、基质金属蛋白酶、枯否细胞、自然杀伤细胞等共同构成,而肝纤维化是由其相互作用的失衡所致。因此提出,应将肝细胞微环境作为治疗肝纤维化的复合靶点并应用于传统民族药物筛选,以充分发挥民族药物多机制、多靶点的优势,研制抗肝纤维化的创新药物。

**[关键词]** 肝纤维化;微环境;肝星状细胞;药物靶点

**[中图分类号]** R969;R575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-0440(2010)01-021-04

## Hepatic cellular microenvironment: a novel drug target for anti-hepatic fibrosis

LIU Qing-shan, ZHANG Zi-qian, CUI Jian, TIAN Yan-ze, PANG Zong-ran

(China Minority Traditional Medicine Center, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

**[Abstract]** To screen anti-hepatic fibrosis drugs, the relationship between hepatocellular microenvironment and hepatic fibrosis is analyzed and focused on hepatic stellate cells in this paper. Hepatocellular microenvironment is composed of hepatic stellate cells, extracellular matrix, matrix metalloproteinases, Kupffer cells and natural killer cells. Hepatic fibrosis is induced by the imbalance among the parts of hepatocellular microenvironment. So hepatocellular microenvironment should be a complex drug target for the treatment of hepatic fibrosis, and be applied to screen traditional ethno drugs, which has the advantages of multi-target and multi-mechanism on diseases, to develop innovative anti-fibrotic drugs.

**[Key words]** hepatic fibrosis; microenvironment; hepatic stellate cells; drug targets

针对明确的靶点筛选药物是新药发现的一个重要途径,肝纤维化病因多样,机制复杂,深入研究其靶点和机制有助于抗肝纤维化创新药物的发现。肝纤维化是由肝损伤引起的一种普遍的瘢痕化损伤修复反应,存在于几乎所有类型的慢性肝损伤疾病中,严重危害人类的健康<sup>[1]</sup>。在过去的几十年中,肝纤维化的机制已得到深入研究,但并不完备<sup>[2,4]</sup>。近期的研究表明,肝纤维化在一定条件下可以逆转<sup>[5]</sup>,这为治疗肝纤维化药物的发现提供了理论上的可能。在肝脏中,以肝星状细胞(hepatic satellite cell, HSC)为中心环节,枯否细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞以及其他各种细胞和细胞间相互作用的信号因子共同构成了肝细胞微环境,以综合调控的方式影响肝纤维化的进程,因该环境主要与免疫功能有关,故又称为局部免疫微环境<sup>[6,7]</sup>。使用

药物调节肝局部免疫微环境,诱导肝纤维化相关细胞功能的表达向逆转肝纤维化的方向发展,可能成为抗肝纤维化药物发挥疗效的基础。本文从肝细胞微环境的角度入手,分析肝纤维化的部分关键机制,探讨从传统民族药物中寻找创新药物的思路。

### 1 肝纤维化的形成与肝细胞微环境

HSC在肝纤维化的形成过程中发挥关键性作用<sup>[5,8,9]</sup>。HSC位于窦状内皮细胞和肝细胞之间的Diss间隙中,慢性肝损伤通过某些途径激活静止态HSC,活化的HSC产生大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),ECM在Diss间隙内过度沉积最终导致肝纤维化产生。在此过程中,HSC与免疫系统关系密切<sup>[9]</sup>。HSC与肝NK细胞、枯否细胞、肝细胞以及聚集于肝脏的其他炎症细胞以相应的信号分子为介质,发生复杂交叉感应,打破细胞外基质的生成与降解平衡,触发肝纤维化。该过程极为复杂,由各种因素相互制约、相互作用,交织成一张庞杂网络,从而调节整个肝纤维化过程。因此将肝脏微环境作为整体来研究,是探究肝纤维化发病机制、寻找治疗肝纤维化方案的思路之一。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30973959,30873249)

**作者简介:** 刘庆山,男,博士,副研究员,研究方向:药理学与民族创新药物研究, Tel:010-68933254-839, E-mail:nlqsh@163.com

**作者单位:** 100081 北京,中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院(刘庆山,张梓倩,崔箭,田燕泽,庞宗然)

**通讯作者:** 张梓倩,女,硕士研究生,研究方向:药理学与民族创新药物研究, E-mail:85zi@163.com

## 2 肝细胞微环境中不同因素对肝纤维化的作用

### 2.1 细胞外基质的合成与降解

肝纤维化以胞外基质蛋白(如 I 型胶原、III 型胶原、IV 型胶原、V 型胶原、层黏连蛋白和弹性蛋白)的广泛沉积为特点。肝纤维化过程中胶原生成的主要来源包括:肝脏中激活的 HSC、门脉区域的成纤维细胞和起源于骨髓的肌成纤维细胞。在纤维化的肝脏中,ECM 的产生不仅增加,而且组成发生改变,向着 I 型胶原表达占主导的趋势发展。HSC 被认为是生成 I 型胶原的主要细胞。HSC 的激活伴随  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白、结蛋白等细胞骨架蛋白的表达上调,HSC 转变为肌成纤维样细胞,生成大量 I 型胶原,导致肝纤维化的发生<sup>[4]</sup>。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)是能够降解 ECM 的主要酶<sup>[4]</sup>,肝纤维化的可逆性依赖于 MMP 的活性。MMP 可由基质纤维母细胞、巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞等多种类型细胞分泌,作为活性酶的前体,需要翻译并修饰后才具有功能。MMP,尤其是 MMP-1、MMP-9 和 MMP-13,对于 I 型胶原的降解和维持肝脏的正常结构十分重要,有研究发现,枯否细胞或巨噬细胞可通过产生 MMP-13 逆转肝纤维化<sup>[10]</sup>,激活的 HSC 也可释放 MMP<sup>[11]</sup>。

MMP 被激活后,可被其天然抑制因子基质金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)所抑制。TIMP 家族由 4 个成员(TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4)组成,其中 TIMP-1 和 TIMP-2 存在于肝脏中。巨噬细胞和激活的 HSC 可通过表达 TIMP 来抑制 MMP 的活性<sup>[8,11]</sup>,打破 ECM 合成与降解间的平衡,使其向 ECM 合成与纤维生成方向发展。即使是在纤维生成因素消失后,延长的 TIMP-1 表达仍可减缓自发性肝纤维化的降解。因为,肝纤维化的可逆性依赖于 MMP 的活性,而 TIMP-1 的持续表达抑制了 MMP 的功能<sup>[5]</sup>。

总之,HSC 可生成 ECM,并释放 MMP,同时又通过释放 TIMP 以抑制 MMP 的活性,使 ECM 的合成与降解达到动态平衡。当 HSC 被激活后,此平衡被打破,转向 ECM 合成与纤维化方向发展。枯否细胞对 ECM 的直接作用则是通过生成基质降解酶,抑制并逆转肝纤维化。

### 2.2 枯否细胞对肝纤维化的双重作用

枯否细胞是肝脏驻留型巨噬细胞,存在于肝血窦内壁,参与清除体内不溶性废物;同时在肝纤维化的发病机制中具有重要作用<sup>[12]</sup>。

肝损伤通过某些途径激活枯否细胞,释放活性

氧和多种细胞因子,如肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、转化生长因子(TGF)- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、血小板源性生长因子以及白细胞介素(IL)-1 和 IL-6 等,使 HSC 活化,最终导致肝纤维化<sup>[2,13,14]</sup>。例如,活化的枯否细胞可高表达巨噬细胞还原型辅酶 II 氧化酶,在肝损伤早期产生大量活性氧并释放到细胞外,以旁分泌的方式促进 HSC 活化和胶原合成。活性氧发挥作用的具体机制尚不清楚,但已知有大量调节抗氧化的基因表达或受氧化还原状态调节的转录因子接受活性氧的调节,如核因子- $\kappa$ B、刺激蛋白-1 和激活蛋白-1。活性氧对胶原基因表达的影响可能与调节上述转录因子有关<sup>[15]</sup>。枯否细胞通过产生 MMP-13 逆转肝纤维化的作用已在文献[10]中提及。另有报道,在肝纤维化进程中,巨噬细胞的减少导致瘢痕形成减少与激活的 HSC 减少;在恢复过程中,巨噬细胞的减少则阻碍基质的降解<sup>[11]</sup>。

对于枯否细胞在肝纤维化过程中的双重作用,其在何种情况下促进肝纤维化,在何种条件下抑制肝纤维化,枯否细胞对哪种趋势的作用更强,以及是否存在功能不尽相同的枯否细胞亚型有待进一步研究。

### 2.3 自然杀伤细胞在抗肝纤维化中的作用

肝脏组织中存在较丰富的 NK 细胞。这种细胞主要分布在肝小叶周边带,少量分布于肝小叶中央带。有研究显示 NK 细胞的激活可抑制体内肝纤维化过程<sup>[13,16]</sup>。进一步研究发现,这种抑制效应由多种机制共同介导。

#### 2.3.1 直接杀伤活化的 HSC,抑制肝纤维化过程

在正常肝脏中,HSC 是储存视黄醇的主要细胞,因此也曾被称为储脂细胞。在各种病原刺激下,静止的 HSC 脱颗粒,释放出视黄醇,细胞发生形态改变而被激活。近期有研究对视黄醇释放引起 HSC 改变的分子机制进行了报道<sup>[6,13,17]</sup>。在活化的早期,HSC 释放视黄醇,乙醛还原酶将视黄醇转化为视黄醛,视黄醛脱氢酶又将视黄醛转化为视黄酸,视黄酸诱导 RAE-1 的表达。RAE-1 是 NK 细胞激活性受体 NKG2D 的配体,因此促使 NK 细胞的激活。激活的 NK 细胞可通过肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体分子、主要组织相容性复合体 I 类分子和端粒酶依赖性方式等直接杀伤活化早期的 HSC。值得注意的是,NK 细胞并不杀伤静态或完全激活的 HSC。这是因为,只有活化早期的 HSC 表达 RAE-1 的水平升高。

此现象说明 NK 细胞对 HSC 的杀伤具有选择性,而这种选择性源于细胞内某些基因表达的改变,

而这种改变是由 HSC 感受环境刺激导致细胞内的复杂反应引起的。

**2.3.2 产生  $\gamma$  干扰素,抑制肝纤维化过程** NK 细胞可释放  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ ),IFN- $\gamma$  通过信号转导与转录活化因子-1 依赖性机制促使 HSC 细胞周期停滞与细胞凋亡,从而改善肝纤维化<sup>[13]</sup>。同时,IFN- $\gamma$  激活了 NK 细胞对 HSC 的细胞毒作用<sup>[18]</sup>,并可抑制胶原合成<sup>[13]</sup>。

总之,在 NK 细胞与 HSC 的交互作用过程中,活化的 HSC 激活 NK 细胞,NK 细胞又通过多种途径抑制 HSC 的活性并产生 IFN- $\gamma$ ,进一步激活同种细胞,发挥改善肝纤维化的作用。

### 3 结语

综上所述,肝纤维化过程与肝细胞局部免疫微环境关系密切,多种机制和细胞参与了肝纤维化。同时,参与肝纤维化的同种细胞往往具有多种潜在功能,其发挥的作用可能不同甚至相反,但这些功能表达与否并非由细胞本身所决定,而是取决于细胞局部微环境对它的影响。多种病因可通过改变肝细胞局部免疫微环境诱导肝纤维化过程。使用药物调整被改变的微环境、诱导肝纤维化相关细胞向表达逆转肝纤维化功能的方向发展,是治疗肝纤维化的一种思路。然而,肝细胞微环境是一个极其复杂的网络系统,这种复杂性决定了微环境的可调节性与相对稳定性,同时也决定了肝纤维化难以逆转。因此,依靠作用于单一靶点或单一途径的化合物,不足以恢复整个微环境的紊乱状态,反而可能被微环境的可调节性所抵消,甚至产生副作用<sup>[19]</sup>。例如,对大鼠肝纤维化模型的研究发现,秋水仙碱可抑制肝脏 TIMP-1 的表达,但在病理形态学的观察中,未发现秋水仙碱治疗组与肝纤维化模型组之间存在显著性差异,秋水仙碱用于肝纤维化治疗的临床试验结果也一直存在争议,且具有较大的骨髓和肝肾毒性<sup>[20]</sup>。IFN- $\gamma$  在少量患者的临床试验中显示可改善乙型和丙型肝炎病毒感染患者的肝纤维化,但在大规模临床试验并未显示 IFN- $\gamma$  对进展期肝病患者有益<sup>[13]</sup>。

与此相比,传统民族药物通过多机制多靶点发挥整体疗效,具有单一化合物不可比拟的优势,可能克服以上不足。例如,扶正化癥方是抗肝纤维化的有效临床药物,上海中医药大学肝病研究院对其促进肝纤维化逆转的配伍机制进行了研究,发现扶正化癥方的不同成分可通过直接抑制肝纤维化大鼠

HSC 的增殖与 I 型胶原的分泌、抑制损伤肝枯否细胞分泌 TGF- $\beta$ 、提高肝组织 MMP-1 活性、降低 TIMP-2 的表达等多种途径逆转肝纤维化<sup>[21]</sup>。此外,白花丹、穿破石、藤茶等传统民族药物在民间常用于肝病的治疗,有多家研究机构对其抗肝纤维化及其多途径作用机制进行了初步探讨<sup>[22-24]</sup>。

总之,将肝细胞微环境这一整体作为靶点,从调节其平衡入手,筛选并研制治疗肝纤维化的创新民族药物具有重要意义。

### 【参考文献】

- [1] Williams R. Global challenges in liver disease[J]. *Hepatology*, 2006, 44(3):521-526.
- [2] Friedman SL, Rockey DC, Bissell DM. Hepatic fibrosis 2006: report of the third AASLD single topic conference[J]. *Hepatology*, 2007, 45(1):242-249.
- [3] Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(3):539-548.
- [4] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2):209-218.
- [5] Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21(S3):S84-S87.
- [6] Gao B, Jeong JW, Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity[J]. *Hepatology*, 2008, 47(2):729-736.
- [7] Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ[J]. *Hepatology*, 2006, 43(Suppl 1):S54-S62.
- [8] Henderson NC, Forbes SJ. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith[J]. *Toxicology*, 2008, 254(3):130-135.
- [9] Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(8/9):1639-1642.
- [10] Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis[J]. *J Immunol*, 2007, 178(8):5288-5295.
- [11] Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(1):56-65.
- [12] Heymann F, Trautwein C, Tacke F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(4):307-318.
- [13] Jeong WI, Gao B. Innate immunity and alcoholic liver fibrosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(Suppl 1):S112-S118.
- [14] Nieto N. Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer cells on stellate cells[J]. *Hepatology*, 2006, 44(6):1487-1501.

(下转第 59 页)

多药转运子的底物特异性相互重叠,某些抗 HIV 药物所共用的外排转运子的重叠使同时抑制几种转运子成为可能,可能成为提高抗 HIV 药物进入 CNS 的一种途径。同时给予转运子特异性抑制剂及 HAART 实施的转运子药理学调节可能是提高抗 HIV 药物在脑中的浓度且不引起全身性副作用的替代方法。更重要的是,已逐步揭示个体组织中特异性转运子的相对重要性功能,并建立了膜转运蛋白的定量图谱。

为详尽了解抗 HIV 药物跨脑屏障转运受限的原因,需研究抗 HIV 药物和新近发现的转运子如 URAT1 和 RST 的相互作用。抗逆转录病毒药物的鼻腔给药是一种潜在的克服药物脑低渗透性的给药方式,并能靶向到储存在 CNS 中的 HIV。病毒进入抑制剂-多肽 T 的鼻腔给药已被用于神经性 AIDS 的治疗,如与 HIV 相关性认知损伤。有趣的是,多肽 T 在接受多肽 T 鼻腔给药的 HIV 患者中表现出抗病毒和免疫活性,且单核细胞储库中的病毒载量降低,增加了抗病毒的细胞毒 T 细胞,而不产生相关毒性并提升了 CD4<sup>+</sup> 水平。

未来研究领域应确定是否有其他系统能将药物靶向到脑或使用重组蛋白疗法实现此目的。高分子

科学和纳米技术领域的最新进展为克服药物入脑受限提供可能。已成功开发纳米药物如聚乙二醇包裹的载化疗药脂质体用于全身治疗。其他纳米材料包括纳米粒、聚合物胶束和纳米凝胶。脑微血管内皮细胞的研究表明,普流尼克(Pluronic)聚醚胶束能通过抑制 P-gp 和定向囊泡转运而影响药物转运。多聚醚 P85 能增加抗逆转录病毒药物渗透到脑,且嵌段共聚物本身可能具有抗逆转录病毒的作用,尤其在作为 CNS 中病毒储库的巨噬细胞中更是如此。

HAART 的出现对 HIV/AIDS 及其并发症 HAD、HIVE、MND 影响深远。一些因素使抗 HIV 药物进入脑变得复杂,如 HIV 感染及 CNS、血浆中病毒种群的不同而导致转运子的多特异性及在不同组织的不同表达(如 BBB 与脉络丛)和表达改变等,这也使治疗变得很困难。彻底了解每一种转运子及其定位、表达水平和转运能力有助于提高对 HIV 感染和 AIDS 的疗效。

[编译自: Varatharajan L, Thomas SA. The transport of anti-HIV drugs across blood-CNS interfaces: summary of current knowledge and recommendations for further research[J]. *Antiviral Res*, 2009, 82: A99 - A109.]

(收稿日期:2009-11-06 修回日期:2009-11-27)

(上接第 23 页)

- [15] Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage[J]. *Alcohol Res Health*, 2003, 27(4):277 - 284.
- [16] Melhem A, Muhanna N, Bishara A, et al. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC[J]. *J Hepatol*, 2006, 45(1):60 - 71.
- [17] Radaeva S, Wang L, Radaev S, et al. Retinoic acid signaling sensitizes hepatic stellate cells to NK cell killing via upregulation of NK cell activating ligand RAE1[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(4):G809 - G816.
- [18] Radaeva S, Sun R, Jaruga B, et al. 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(2):435 - 452.
- [19] Csermely P, goston V, Pongor S. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2005, 26(4):178 - 182.
- [20] 杨长青, 胡国龄, 周文红, 等. 秋水仙碱对肝纤维化大鼠肝脏基质金属蛋白酶-1 及其抑制因子-1 表达的影响[J]. *中华传染病杂志*, 2000, 18(3):176 - 179.
- [21] 刘平, 吴定中, 刘成海, 等. 扶正化痰中药复方促进 CCl<sub>4</sub> 大鼠肝纤维化逆转的配伍机理研究[J]. *上海中医药大学学报*, 2002, 16(1):37 - 41.
- [22] 钟鸣, 郭力城, 农朝赞, 等. 瑶药猛老虎提取物对大鼠肝星状细胞 I、III 型胶原、MMP-1 和 TGF-β<sub>1</sub> 表达的影响[J]. *中国民族医药杂志*, 2009, 15(2):33 - 36.
- [23] 杨增艳, 滕红丽. 穿破石总黄酮对两种肝纤维化模型大鼠的实验研究[J]. *四川中医*, 2009, 27(7):30 - 31.
- [24] 邝满元, 罗明英, 贾蕾. 藤茶总黄酮对实验性肝纤维化大鼠 TGF-β<sub>1</sub> 表达的影响[J]. *中国民族民间医药*, 2009, 18(6):6 - 8.