

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 在肝星状细胞静止表型维持中的作用

侯懿耕, 张园园, 贾洁, 胡晔, 吴松, 方步武

侯懿耕, 张园园, 贾洁, 胡晔, 吴松, 天津医科大学03级临床医学七年制 天津市 300070
方步武, 天津医科大学药理学教研室 天津市 300070
国家自然科学基金资助项目, No. 30772856
作者贡献分布: 本论文由方步武与侯懿耕立题; 收集和整理资料由侯懿耕, 张园园, 贾洁, 胡晔及吴松完成; 文章写作由侯懿耕完成; 方步武审核全文。
通讯作者: 方步武, 300070, 天津市气象台路22号, 天津医科大学药理学教研室, fangdch@yahoo.com.cn
电话: 022-23542523
收稿日期: 2008-10-06 修回日期: 2008-10-22
接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-28

Effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ on the maintenance of quiescent phenotype of hepatic stellate cells

Yi-Geng Hou, Yuan-Yuan Zhang, Jie Jia, Ye Hu, Song Wu, Bu-Wu Fang

Yi-Geng Hou, Yuan-Yuan Zhang, Jie Jia, Ye Hu, Song Wu, Grade 2003, Department of Seven-Year Medical Education, Basic Medical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Bu-Wu Fang, Department of Pharmaceutical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772856
Correspondence to: Dr. Bu-wu Fang, Department of Pharmaceutical Sciences, Tianjin Medical University, 22 Qixiangtai Road, Tianjin 300070, China. fangdch@yahoo.com.cn
Received: 2008-10-06 Revised: 2008-10-22
Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-11-28

Abstract

Activation of hepatic stellate cells (HSCs) is the key factor in the formation of hepatic fibrosis, so in present research, it becomes a hotspot that how to maintain the quiescent phenotype of HSCs. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a ligand-activated nuclear transcription factor, which can maintain the quiescent phenotype of HSCs by means of affecting the lipocytes, leptin, cytokines, transcription factors and cell cycle as well as by its synergistic action with Farnesoid X receptors. This paper discusses how PPAR γ maintains the quiescent phenotype of hepatic stellate cells.

Key Words: Hepatic stellate cell; Quiescent phenotype; Peroxisome proliferator-activated receptor γ

Hou YG, Zhang YY, Jia J, Hu Y, Wu S, Fang BW. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ on the maintenance of quiescent phenotype of hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3765-3768

摘要

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活是肝纤维化形成的关键, 因此如何维持HSC静止表型是当前的研究热点. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 是由配体激活的核转录因子, 通过影响脂肪细胞及瘦素、细胞因子、转录因子、细胞周期及与法呢醇X受体的协同作用维持HSC静止状态, 本文就此作一综述.

关键词: 肝星状细胞; 静止表型; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

侯懿耕, 张园园, 贾洁, 胡晔, 吴松, 方步武. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 在肝星状细胞静止表型维持中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3765-3768
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3765.asp>

0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)曾名Ito细胞、维生素A储存细胞等, 当肝脏受到外界因素刺激时, 通常静止的储存维生素A的HSC经过表型转化成为肌成纤维样细胞(myofibroblast, MFB)即活化的HSC, 具有增生、收缩、趋化功能, 且维生素A消失, 细胞外基质生成增加, 导致纤维化形成. HSC的激活是肝纤维化的中心环节^[1-2], 因此维持HSC的静止表型对防治肝纤维化具有重要意义. 近年来研究发现, 过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)在维持HSC的静止表型中发挥重要作用, 其中PPAR γ 的作用尤著, 本文拟就PPAR γ 对维持HSC的静止表型的作用进行综述.

■背景资料

肝纤维化是肝硬化发生的前奏和必经环节, 其中肝星状细胞(HSC)的激活又是肝纤维化形成的关键. 当肝脏受到外界因素刺激时, 静止的HSC活化为肌成纤维样细胞而大量产生胶原等细胞外基质, 因此维持HSC的静止表型对防治肝纤维化具有重要意义. 研究表明, PPAR γ 通过多层次、多途径维持HSC静止表型, 不同途径之间存在着多种交互作用, 形成错综复杂的信号调节网络.

■同行评议者

高春芳, 研究员, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科; 高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

■研发前沿

PPAR γ 通过多信号、多途径维持HSC静止表型,开发其配体从而发挥抗肝纤维化的作用,有望为肝纤维化的临床治疗带来新的希望。但是PPAR γ 分布及作用广泛,缺乏细胞特异性,因此如何使该类药物主要作用于肝脏,维持HSC静止表型,防治肝纤维化将是今后研究的重点。

1 PPARs概述

1.1 PPARs类型与分布 PPARs是一类由配体激活的核转录因子,1990年首先由Issemann *et al*从小鼠肝脏克隆得到,因被过氧化物酶体增殖物活化后能诱导肝脏过氧化物酶体增殖而得名。PPARs作用广泛,参与体内多种生理和病理活动。迄今为止已发现3种PPAR亚型:PPAR α 、PPAR β (δ)、PPAR γ ,在不同组织中的表达存在差异。其中PPAR β 促进HSC的激活,而PPAR α 、PPAR γ 维持其静止^[3]。PPAR γ 表达的上调可引起HSC活化标志物 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达的抑制和I型胶原合成的下降^[1]。

1.2 PPAR γ 配体与激活物 目前已知PPAR γ 存在多种配体和激活物,可分为合成型配体和天然型配体两大类。在合成型配体中,噻唑烷二酮类化合物(thiazolidinediones, TZDs)是PPAR γ 选择性激活物,包括曲格列酮、罗格列酮、吡格列酮等,与PPAR γ 有高度亲和力,在毫微克分子浓度水平即可特异性激活PPAR γ 。天然配体来源于饮食及机体的代谢产物,包括花生四烯酸系列产物如15-脱氧12,14-前列腺素J₂(15d-PGJ₂)、前列腺素D₂(PGD₂)、白三烯B₄(LTB₄)、多不饱和脂肪酸如亚油酸、氧化型LDL^[4]。

2 PPAR γ 与HSC静止表型维持

大量研究表明,PPAR γ 通过多层次、多途径维持HSC静止表型,不同途径之间存在着多种交互作用,形成错综复杂的信号调节网络。

2.1 PPAR γ 对脂肪细胞及瘦素的作用

2.1.1 PPAR γ 对脂肪细胞分化的促进作用: 静止期HSC贮存大量脂质,包括脂溶性维生素A,其激活引起脂滴消失和转分化为MFBs。She *et al*发现把原代大鼠HSC培养于促进前脂肪细胞向脂肪细胞分化的培养液中,可维持HSC保持静止表型^[5]。PPAR γ 是促进前脂肪细胞向脂肪细胞分化的重要转录因子,但必须与视黄醇X受体(retinoic X receptor, RXR)结合成异二聚体,并与靶基因启动子中的PPAR反应元件(peroxisome proliferator responsive element, PPRE)结合才能发挥作用。他能抑制细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶(cyclin depended kinase, CDK)的活性,阻止细胞生长,使前脂肪细胞向脂肪细胞分化;又能与脂肪细胞特异基因ap2的增强子和磷酸烯醇式丙酮酸激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)启动子结合,调节这些基因的转录与表达。PPAR γ 激动剂存在时,转染性表达PPAR γ

的成纤维细胞NIH-3T3向脂肪细胞分化并伴有脂质贮积。CCAAT增强子结合蛋白(CCAAT-enhancer-binding protein, C/EBP)也参与脂肪细胞分化的调控^[6]。若将其与PPAR γ 共同转染3T3成纤维细胞,则无需PPAR γ 激活物的存在即可使3T3成纤维细胞向脂肪细胞转化。在脂肪细胞生成过程中,PPAR γ 的直接作用就是增加脂肪细胞特异性标志物如LPL、FAT、ap2和乙酰辅酶A合成酶基因的表达;使细胞摄入脂肪酸、甘油增多,表现出脂肪细胞的表型特征^[7-8]。

2.1.2 PPAR γ 对瘦素的抑制作用: 瘦素(leptin)是由肥胖基因编码、脂肪细胞分泌的一种蛋白质,是重要的代谢调节信号,具有诱导HSC活化和增殖作用,必须与HSC膜上特异性肥胖受体(obesity receptor, OB-R)结合后才能产生促肝纤维化作用。Lee *et al*研究发现PPAR γ 配体可下调OB-R基因表达,从而抑制了HSC的活化^[9]。JAK-STAT(janus kinase-the signal transducer and activator of transcription)途径是HSC内瘦素受体后信号转导的主要途径,始于JAK-2磷酸化,激活的JAK-2再激活JAK-1,在JAK-1的作用下,STAT1和STAT2分别被激活,前者形成同源二聚体后须与协同活化因子CREB结合蛋白(cAMP response element binding protein, CBP)或p300结合后才能转入细胞核内,识别并结合到瘦素启动子区的活化序列或相关序列,调控瘦素的基因转录^[10]。当PPAR γ 被配体激活后,PPAR γ -RXR异二聚体招募、结合数量有限的CBP及p300,竞争抑制STAT1的活化,减少瘦素mRNA生成,使HSC维持于静止表型。

2.2 PPAR γ 对细胞因子的影响

2.2.1 PPAR γ 对PDGF信号转导的阻断作用: 血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是最强大的促进HSC分裂和增生的细胞因子。PDGF受体结构域与接头蛋白Grb2(growth factor receptor bound protein 2)结合后激活Ras,促使细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)激活,ERK转位至细胞核,使c-fos等转录因子表达增加,启动HSC的增生。PDGF亦可通过蛋白激酶C等细胞内信号转导途径改变HSC内细胞骨架的分布,刺激HSC转化为MFBs。此外,PDGF诱导HSC合成TGF β 等细胞因子,促进HSC表达 α -SMA与分泌细胞外基质。以上途径中,PDGF均可以正反馈的方式作用于HSC,形成放大效应,进一步促进HSC的激活。PPAR γ 可干扰ERK的激活,抑制TGF β 和 α -SMA

的表达, 从而阻断PDGF引起的HSC活化^[11-13].

2.2.2 PPAR γ 对TGF β -1信号转导的阻断作用:

转化生长因子 β -1(transforming growth factor beta-1, TGF β -1)是最强的肝纤维化发生因子, 而且诱导HSC转化为MFBs的作用显著. 他通过改变HSC基因型及其表型, 使胞膜上细胞因子受体的表达增加, 提高了HSC对细胞因子的敏感性. TGF β -1主要通过细胞内(small mothers against decapentaplegic, Smad)通路介导其生物学活性, 与TGF β 的II型受体结合后, 激活TGF β I型受体的丝氨酸/苏氨酸激酶, 使Smad2、Smad3磷酸化. 活化的Smad2、Smad3再与Smad4形成活性复合物后入核, 激活血纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)和胶原蛋白 α I 转录, 引起纤维连接素、I型胶原沉积增加和 α -SMA应力纤维加速组合, 直接介导HSC向MFBs的转化. PAI-1也是HSC活化的标志^[14]. PPAR γ 配体通过激活PPAR γ , 抑制Smad3磷酸化, 阻断TGF β -1介导的PAI-1的产生, 阻止HSC向MFBs转化^[15]; 还可抑制转录因子KLF6(kruppel-like factor 6)的表达, 从而在转录水平降低其下游因子TGF β -1的表达, 抑制HSC的激活^[16].

2.3 PPAR γ 对转录因子的影响

2.3.1 PPAR γ 对NF- κ B信号转导的阻断作用: 核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)是由Rel蛋白家族组成的同源或异源二聚体的转录因子, 最常见的是RelA(p65)/NF- κ B1(p50)异二聚体, 参与细胞增殖调控和凋亡等过程^[17]. HSC的活化与NF- κ B异常持续性激活有关. 在静息细胞中, NF- κ B以无活性的潜在状态存在于细胞质中, 与其抑制蛋白I κ B结合组成异源多聚体. 细胞表面复杂的信号级联反应可导致I κ B降解, 因而NF- κ B被活化并从细胞质易位至细胞核内, 发挥转录调控作用. 经PPAR γ 激活物15d-PGJ₂处理后HSC的NF- κ B表达下调^[18], 并且PPAR γ 可直接与p65/p50结合, 形成转录抑制复合物, 降低了NF- κ B与DNA的结合活性, 进而抑制NF- κ B的转录作用, 使HSC维持在静止表型.

2.3.2 PPAR γ 对AP-1信号转导的阻断作用: 激活蛋白1(activator protein 1, AP-1)是在激活的HSC中表达持续增加的一种核转录因子, 由Jun家族和Fos家族组成. Jun家族成员包括c-Jun、Jun-B和Jun-D; Fos家族成员含有c-Fos、Fos-B、Fra-1和Fra-2. Jun-D是激活的HSC中一种最重要的AP-1蛋白. 研究表明, 在激活的HSC中, AP-1活

性升高, 多种蛋白表达增加. 早期主要是c-Fos、Fra-1、c-Jun、Jun-B被诱导表达, 随后为Fra-2、FosB、Jun-D等被诱导表达, 提示AP-1参与HSC激活过程的基因表达. PPAR γ 通过和AP-1竞争与协同活化因子CBP、p300的结合, 抑制AP-1信号转导途径, 这一机制与PPAR γ 影响JAK-STAT途径类似^[19].

2.4 PPAR γ 对细胞周期的影响 静止期HSC多停留在G₀/G₁期, 活化时细胞主要集中在G₂期. HSC体外培养活化时, 从培养第2天至第7天, G₀/G₁期细胞逐渐减少, G₂期细胞显著增多. G₁/S调控点是影响细胞周期的关键. 细胞周期调控因子可分为三类: 细胞周期蛋白(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶(CDK)和细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶抑制物(CDK inhibitor, CDI)如p21、p27、p18等. 单独的CDK亚基无激酶活性, 需与相应的Cyclin结合, 进而作用于视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, pRb), 使之磷酸化后释放转录因子E2F, 使细胞通过检测点, 启动DNA复制, 进入S期. PPAR γ 通过降低Cyclin D1、Cyclin D2及Cyclin E水平、提高与Cyclin结合的p21waf1/cip1和p27 kip1水平, 抑制CDK的活性, 从而阻断细胞通过检测点向S期转化, 维持HSC的静止表型^[20]. 经15d-PGJ₂处理的HSC中处于G₁期的细胞百分比高于非处理组, 差异有统计学意义, 说明PPAR γ 的配体15d-PGJ₂产生了G₁期阻滞作用.

2.5 PPAR γ 与FXR的协同作用 法呢醇X受体(farnesoid X receptor, FXR)介导的信号途径可明显减少HSC活化及肝纤维化相关分子表达. FXR需要和RXR形成异源二聚体后才能直接与特定DNA反应元件结合而调节基因表达. 使用FXR的激动剂6-ECDCA(6-ethyl-chenodeoxycholic acid)可减轻动物模型的肝纤维化程度, 下调HSC的TGF β -1、 α -SMA、TIMP-1表达, 可能是6-ECDCA作用于FXR后诱导转录抑制因子SHP(Src-homology 2 domain phosphatase)表达, 而SHP可抑AP-1与DNA的结合活性. 同时, 6-ECDCA作用于FXR后, PPAR γ 表达升高达40倍, 提示FXR通过其与PPAR γ 之间的协同作用而抑制HSC的激活^[21-22].

3 结论

PPAR γ 可通过维持HSC静止表型而发挥抗肝纤维化的作用, 因此开发PPAR γ 配体, 如已用于治疗II型糖尿病的噻唑烷二酮类药物, 有望为肝

■创新盘点

本文突出了PPAR γ 在肝星状细胞静止表型维持中的作用, 分析其影响脂肪细胞及瘦素、细胞因子、转录因子、细胞周期及与法呢醇X受体协同作用等多个环节, 阐述其作用机制.

同行评价

本文总体内容比较新颖,参考文献引用恰当,具有一定的参考价值。

纤维化的临床治疗带来新的希望。但是目前在此方面的研究仅限于细胞培养和动物实验,尚未见临床试验的报道;并且PPAR γ 分布及作用广泛,缺乏细胞特异性,因此如何使该类药物主要作用于肝脏,维持HSC静止表型,防治肝纤维化将是我们今后研究的重点。

参考文献

- Sun K, Wang Q, Huang XH. PPAR gamma inhibits growth of rat hepatic stellate cells and TGF beta-induced connective tissue growth factor expression. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 715-723
- Greupink R, Bakker HI, Bouma W, Reker-Smit C, Meijer DK, Beljaars L, Poelstra K. The antiproliferative drug doxorubicin inhibits liver fibrosis in bile duct-ligated rats and can be selectively delivered to hepatic stellate cells in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317: 514-521
- Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 999-1013
- Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, Bertilsson G, Jendeberg L, Berkenstam A. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J Biol Chem* 1998; 273: 31108-31112
- She H, Xiong S, Hazra S, Tsukamoto H. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 4959-4967
- Guimarães EL, Franceschi MF, Andrade CM, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, Bernard EA, Guma FC. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver Int* 2007; 27: 1255-1264
- Tsukamoto H, She H, Hazra S, Cheng J, Miyahara T. Anti-adipogenic regulation underlies hepatic stellate cell transdifferentiation. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S102-S105
- Wang P, Renes J, Bouwman F, Bunschoten A, Mariman E, Keijer J. Absence of an adipogenic effect of rosiglitazone on mature 3T3-L1 adipocytes: increase of lipid catabolism and reduction of adipokine expression. *Diabetologia* 2007; 50: 654-665
- Lee JI, Paik YH, Lee KS, Lee JW, Kim YS, Jeong S, Kwon KS, Lee DH, Kim HG, Shin YW, Kim MA. A peroxisome-proliferator activated receptor-gamma ligand could regulate the expression of leptin receptor on human hepatic stellate cells. *Histochem Cell Biol* 2007; 127: 495-502
- Cao Q, Mak KM, Ren C, Lieber CS. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H₂O₂-dependant MAPK pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 4292-4304
- Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Stoll D, Treptau J, Gressner AM, Weiskirchen R. Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits

hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Lab Invest* 2004; 84: 766-777

- Di Sario A, Bendia E, Svegliati-Baroni G, Marziani M, Ridolfi F, Trozzi L, Ugili L, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A. Rearrangement of the cytoskeletal network induced by platelet-derived growth factor in rat hepatic stellate cells: role of different intracellular signalling pathways. *J Hepatol* 2002; 36: 179-190
- Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 413-423
- Zhao CY, Zhou JY, Yang L, Wang YD. [Molecular mechanism of ciglitazone inhibiting the expression of extracellular matrix in human hepatic stellate cells] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 840-844
- Zhao C, Chen W, Yang L, Chen L, Stimpson SA, Diehl AM. PPARgamma agonists prevent TGFbeta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 385-391
- Wang XM, Chen DF. [Effects of rosiglitazone on Kruppel-like factor 6(KLF6) signaling in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver fibrosis] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 649-653
- 成扬, 平键, 刘成, 徐列明. 姜黄素激活过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ 信号对大鼠肝星状细胞基质金属蛋白酶2、9活性和胞核因子- κ Bp65表达的影响. *中国中西医结合杂志* 2007; 27: 439-442
- Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 35715-35722
- Hazra S, Xiong S, Wang J, Rippe RA, Krishna V, Chatterjee K, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 11392-11401
- Toyota M, Miyazaki Y, Kitamura S, Nagasawa Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma reduces the growth rate of pancreatic cancer cells through the reduction of cyclin D1. *Life Sci* 2002; 70: 1565-1575
- Fiorucci S, Rizzo G, Antonelli E, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Morelli A, Pruzanski M, Pellicciari R. Cross-talk between farnesoid-X-receptor (FXR) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to the antifibrotic activity of FXR ligands in rodent models of liver cirrhosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 58-68
- Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pellicciari R, Morelli A. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 127: 1497-1512

编辑 史景红 电编 何基才