

肝内细胞上皮-间质转化: 肝纤维化发生的新机制

李旭, 齐明华

李旭, 南方医科大学南方医院急诊科 广东省广州市 510515
齐明华, 北京大学深圳医院感染性疾病科 广东省深圳市 518036

李旭, 教授, 主任医师, 主要从事肝脏纤维化方面的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81070338

中国肝炎防治基金会王宝恩肝纤维化研究基金资助项目, No. 20090018

作者贡献分布: 本述评由李旭指导及修订; 齐明华负责复习文献, 撰写述评.

通讯作者: 李旭, 教授, 主任医师, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院急诊科. mylx99@163.com

收稿日期: 2011-12-26 修回日期: 2012-01-16

接受日期: 2012-03-15 在线出版日期: 2012-04-08

Epithelial-mesenchymal transition in adult liver cells: a new mechanism of hepatic fibrosis

Xu Li, Ming-Hua Qi

Xu Li, Department of Emergency Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Ming-Hua Qi, Department of Infectious Diseases, Beijing University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81070338; and the Wang Bao En Hepatic Fibrosis Foundation, No. 20090018

Correspondence to: Xu Li, Professor, Department of Emergency Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. mylx99@163.com

Received: 2011-12-26 Revised: 2012-01-16

Accepted: 2012-03-15 Published online: 2012-04-08

Abstract

The research of epithelial-mesenchymal transitions (EMT) has become a hot spot in the area of hepatic fibrosis research recently. EMT can be divided into three subtypes based on different biological context in which it occur: embryogenesis/development, wound healing/tissue regeneration/organ fibrosis, and neoplasia. In order to study EMT conveniently, several types of biomarkers have been identified, including cell surface proteins, cell skeleton proteins, extracellular proteins, transcription factors and microRNAs. Among signaling pathways associated with EMT, TGF- β and Wnt pathways are studied more sufficiently. Nowadays, the methods

used to study EMT include immunohistological method and fate-mapping technology. This article emphasizes the proofs that support or argue against the occurrence of EMT in three main types of liver cells: hepatocytes, cholangiocytes and stellate cells. Although many *in vitro* studies support the occurrence of EMT under certain stimulators, few *in vivo* results obtained by fate-mapping methods draw opposite conclusions. Whether and to what extent EMT influences hepatic fibrosis are interesting questions needed to be explored further. The purpose of this article is to summarize evidence for and against the possibility that EMT is involved in fibrogenic repair in resident liver cells.

Key Words: Adult liver cells; Epithelial-mesenchymal transition; Hepatic fibrosis

Li X, Qi MH. Epithelial-mesenchymal transition in adult liver cells: a new mechanism of hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(10): 811-817

摘要

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)现象是近年来肝纤维化研究的热点问题之一. 根据其发生环境的不同, EMT分为3种类型: I型在胚胎形成中; II型在创伤修复和纤维化过程中; III型发生在肿瘤侵袭和转移中. 在此过程中, 一些细胞表达物会发生变化, 可以用于研究EMT. 这些生物学标记物包括细胞表面蛋白、细胞骨架蛋白、细胞外蛋白、转录因子、微小RNA等. 涉及EMT的主要信号通路有TGF- β 通路、Wnt通路等. 研究EMT的方法有免疫组织化学和细胞世代追踪技术, 前者较为普遍. 本文着重介绍了肝内3种主要的细胞(肝细胞、胆管细胞、肝星状细胞)发生上皮间质转化的证据. 均有体外试验证据证明肝细胞、胆管细胞、肝星状细胞在一定刺激因子作用下可以发生EMT, 但仅有为数不多的利用细胞发育制图技术进行的体内试验结果则相互矛盾或有被质疑之处. 总之, EMT现象在肝纤维化中是否存在以及起多大作用, 是值得深入研究的有趣问题. 本文的目的就是综述支持或反对肝纤维化进程中

■背景资料

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)现象是近年来肝纤维化研究的热点问题之一. 在此过程中, 一些细胞表达物会发生变化, 可以用于研究EMT.

■同行评议者

季菊玲, 副教授, 南通大学医学院病理教研室

■ 研发前沿

EMT/MET的平衡关系影响了慢性肝病的转归。如果EMT超过MET,则肝脏修复以纤维化为主;如果MET超过EMT,则正常上皮增生、纤维化逆转,因此通过抑制EMT减轻或逆转肝纤维化,可能是抗纤维化研究新的靶点。

肝内细胞发生EMT/MET现象的证据,以便今后做更深入的研究。

关键词: 肝内细胞; 上皮-间质转化; 肝纤维化

李旭, 齐明华. 肝内细胞上皮-间质转化: 肝纤维化发生的新机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(10): 811-817

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/811.asp>

0 引言

各种肝病必须经历肝纤维化,进而发展成肝硬化,导致肝功能障碍。如何逆转肝纤维化的过程,一直是人们研究的热点。活化的肌成纤维细胞是细胞外基质产生的主要来源。如何减少肌成纤维细胞的数量,减少基质相关物质的产生,是解决问题的关键。活化的肌成纤维细胞主要由肝星状细胞转化而来,部分直接来自门脉和骨髓,部分来自骨髓的成纤维细胞。近些年来,关于肌成纤维细胞的来源有新的进展:有研究发现肝内细胞(肝细胞、胆管细胞、星状细胞)通过上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)可以成为肌成纤维细胞,分泌细胞外基质,参与组织修复,成为肝纤维化研究新的热点。这一理论认为,EMT/间质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transitions, MET)的平衡关系影响了慢性肝病的转归。如果EMT超过MET,则肝脏修复以纤维化为主;如果MET超过EMT,则正常上皮增生、纤维化逆转,因此通过抑制EMT减轻或逆转肝纤维化,可能是抗纤维化研究新的靶点。本文将详细阐述EMT的病理生理环境;如何判断细胞发生EMT;重点讲述研究肝内细胞EMT的方法以及肝内3种主要细胞(肝星状细胞、肝细胞、胆管细胞)发生EMT的体内及体外研究证据及争议所在,指出未来EMT研究中需要解决的问题。

1 EMT的定义和类型

1.1 EMT的定义 传统的细胞理论认为,所有细胞都由祖先细胞分化而来。但是这一理论正面临着挑战。20世纪末人们发现,除了直系繁殖和正常分化外,成熟的上皮细胞在特定环境作用下,可以表现出可塑性,由一种表型转化为另一种表型。这些上皮细胞在与其周围间质的相互作用过程中,丧失部分上皮细胞特征如细胞间连接丢失,细胞极性丧失;获得了一些间质细胞的特征,如浸润性和迁移游走能力,这种现象被称为EMT;而相反的过程,则称为MET^[1,2]。EMT/MET的完成需要许多机制调节,不但涉及基因

转录水平,而且涉及基因转录后的修饰水平^[2]。以下分别讲述EMT发生的生化环境和调控EMT的因素。

1.2 EMT发生的环境 由于发生EMT的上皮细胞种类繁多,发生环境各异,研究起来较为困难。为了方便EMT的研究,在2007年国际EMT会议上根据EMT发生的环境不同,将其分为以下3种: I型EMT出现在受精卵植入、胚胎发生和器官形成过程中,主要是在原肠胚和神经嵴发生中出现;间皮层和内皮层细胞经过MET转化,而形成次级上皮细胞,进而经过新一轮的EMT/MET而形成各种器官。II型EMT出现在创伤愈合、组织重构和纤维化过程中:表现为炎症刺激下,次级上皮细胞或内皮细胞转化为成纤维细胞参与组织修复。III型EMT发生在肿瘤浸润和转移过程中:原发灶细胞通过EMT变为间质细胞,进入血流向远处转移,或者通过MET形成远处的次级灶^[3]。3种类型中, I和III型较为相似,都是以形成新的上皮细胞为结局, II型则以纤维化为结局。3种类型的EMT尽管发生的条件各异,但他们可能具有相同的基因和生化背景,因此,在生物学标志物和研究的方法学上有许多共同之处,下面以II型EMT为主介绍近年来较为明确的生物学标志物和常用的研究EMT的方法。

2 EMT的生物学标志物

2.1 细胞表面蛋白 包括表达下调的E-钙黏蛋白和紧密连接蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1),以及上调的N-钙黏蛋白。研究得较多的是E-钙黏蛋白。他除了构成细胞间强大的物理性连接外,还维持上皮细胞的极性,他的水平下降可以激活间质细胞特异性基因的转录,从而激活EMT^[4]。因为OB-钙黏蛋白在成纤维细胞中有较高的特异性,E-钙黏蛋白-OB-钙黏蛋白转化是II型EMT研究中的热点之一。

2.2 细胞骨架蛋白 细胞骨架蛋白,包括下调的细胞角蛋白(cytokeratin)和上调的成纤维细胞特异性蛋白1(fibroblast specific protein1, FSP-1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、细胞间丝波形蛋白(vimentin)、 β -连接素(β -catenin)。FSP-1是成纤维样细胞(fibroblastoid cell)表达的标志;从1995年以来,人们就发现FSP-1可在通过II型EMT形成的成纤维细胞中表达^[5]。随后在体内肾脏、肝脏、肺、心脏组织中,人们利用细胞发育制图技术(fate-

mapping)技术,证实了这一点^[6]。 α -SMA虽然也是常用的标志物,但他的特异性不如FSP-1,他只在成纤维细胞亚群,肌成纤维样细胞(myofibroblastoid cell)中表达。而肌成纤维样细胞因其移动性差而是否属于间质细胞还存在争议^[7]。波形蛋白在I型EMT中特异性较高,但是因为成人上皮细胞可因损伤刺激一过性分泌波形蛋白,作为II型EMT的标志物特异性稍差。 β -catenin是胞浆蛋白,一方面将钙黏蛋白与细胞骨架连接;一方面与T细胞因子TCF/LEF结合起到转录激活的作用,激活Snail等基因,促进EMT的发生。

2.3 细胞外蛋白 细胞外蛋白包括下调的IV型胶原蛋白、层板蛋白1(laminin 1)和上调的纤维粘连蛋白(fibronectin)、层板蛋白5(laminin 5)。纤维粘连蛋白在II型EMT时可在各种细胞如上皮细胞、成纤维细胞、单核细胞中表达。层板蛋白是三聚体糖蛋白,由一个 α 链、 β 链、 γ 链组成。在体内和体外研究中,均发现层板蛋白1($\alpha 1\beta 1\gamma 1$)在II型EMT中表达下调,而层板蛋白5($\alpha 3\beta 3\gamma 2$)在肺纤维化组织中表达会上调^[8]。

2.4 转录因子 包括Snail 1, Snail 2(Slug), ZEB 1, CBF-A/KAP-1复合物, Twist, LEF-1, Fts-1, FOXC2, Goosecoid。Snail为锌指蛋白超家族,调控多种下游信号通路,如TGF- β /Smad、MAPK和PI3K通路等,从而调控EMT。Snail主要通过锌指区域与E-钙黏蛋白启动子区锌指E盒同源盒(zinc finger E-box binding homobox, ZEB)序列结合,下调E-钙黏蛋白表达;除此之外,他可上调间质细胞生物标志物,如纤维粘连蛋白和vitronectin;下调上皮标志(claudins, occludins, cytoket-atins);抑制基质金属蛋白(matrix metal protein, MMP)的表达;抑制凋亡。人肾活检发现,肾纤维化组织中可见Snail高表达;在Snail转基因小鼠中,活化Snail可以发生II型EMT和肾纤维化^[9]。Twist在I、II和III型EMT中是高表达的;在III型EMT中,可见他独立于Snail抑制E-cadherin表达,上调纤维粘连蛋白和N钙黏蛋白^[10]。

2.5 微小RNA 包括下调的Mir-200家族,和上调的Mir-10b, Mir-21家族。在TGF- $\beta 1$ 诱导的EMT中,可见到Mir-200的表达下调。2种情况中,均可见Mir-200与E-钙黏蛋白ZEB结合,抑制E-钙黏蛋白的表达;与之相反, TGF- $\beta 1$ 诱导的EMT可见Mir-21表达上调; Twist诱导的乳癌EMT中,可见Mir-10b表达上调^[11-14]。有关EMT的具体生物学标志物见表1。

表1 II型EMT的生物学标志物

上调的标志物	下调的标志物
细胞表面蛋白	
N-cadherin	E-cadherin
	ZO-1
细胞骨架蛋白	
FSP-1	
α -SMA	
Vimentin	
β -catenin	
细胞外基质蛋白	
Fibronectin	$\alpha 1(\text{IV})$ collagen
Laminin 5	Laninin 1
转录因子	
Snail1 (Snail)	
Snail2 (Slug)	
ZEB1	
CBF-A/KAP-1 complex	
Twist	
LEF-1	
Ets-1	
FOXC2	
Goosecoid	
微小RNAs	
miR10b	Mir-200 family
miR-21	

3 EMT相关信号通路

研究表明,各型EMT发生过程中,微环境各种刺激可通过不同信号途径诱导上皮细胞发生EMT。涉及EMT的信号通路有许多,研究的较多的有TGF- β 通路、Wnt通路。TGF- β 通路是作用较明确的诱导EMT的信号通路^[15-17]。TGF- β 是一种组织中广泛存在的细胞因子,调控下游多个信号通路,包括经典和非经典的smad通路。非经典smad通路包括MAPK和PI3K通路等。体外实验发现, TGF- β 具有明显的促肝细胞EMT作用,可以使上皮细胞极性消失,上调间质细胞相关蛋白如波形蛋白等,增加胶原合成,从而促进肝脏纤维化^[18]。Wnt途径是诱导EMT的另一条重要信号转导通路,由Wnt蛋白、卷曲蛋白(frizzled, Fz)、APC蛋白、糖原合成酶激酶GSK3 β 、Axin蛋白、 β -连接素(catenin)、T细胞转录因子/淋巴增强因子(T cell transcription factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF)家族组成。一方面 β -连接素是细胞黏着连接的一部分,他将E钙黏蛋白与 α -连接素相结合,介导细胞间黏附。另一方面, β -连接素是活化TCF/LEF的辅因子。Wnt信号与卷曲蛋白结合后,使GSK3 β 失

■ 相关报道

多种体外实验证据表明,不论用TGF- β 还是四氯化碳(CCl_4)干预,都可在小鼠的原代肝细胞或肝细胞系培养中发现肝细胞发生了EMT。

■同行评价

本文内容较丰富, 有助于同行了解上皮间质转化现象与肝纤维化的背景知识, 为进一步研究提供了必要的参考资料。

表 2 有关EMT研究的重要进展

年代	作者	研究结果
1982	Greenburg等 ^[24]	发明三维胶原培养基, 构建EMT研究的体外模型
2000	Battle等 ^[34]	发现第一个调控E钙黏蛋白的基因Snail
2002	Iwano等 ^[25]	肾小管上皮细胞可以发生EMT
	Lim等 ^[29]	体外研究证实HSC可以发生EMT
2003	Zeisberg等 ^[28]	BMP7可以逆转TGF- β 诱导的肾纤维化
2006	Sicklick等 ^[32]	体外研究证实HSC, 胆管细胞, 卵圆细胞可以发生EMT
2007	Zeisberg等 ^[29]	BMP7可以逆转TGF- β 诱导的心肌纤维化
2007	Zeisberg等 ^[6]	构建转基因动物模型, 证实肝内细胞发生EMT
2008	Acloque等 ^[23]	提出EMT/MET概念, 指出其在胚胎发育中的重要作用
	Yang等 ^[38]	构建转基因动物模型, 证实HSC发生EMT
2009	Sackett等 ^[39]	构建转基因动物模型, 胆管细胞没有发生EMT
2010	Taura等 ^[41]	构建转基因动物模型, 胆管细胞没有发生EMT
2010	Scholten等 ^[40]	构建转基因动物模型, 肝细胞没有发生EMT
2011	Chu等 ^[42]	构建转基因动物模型, 肝细胞和胆管细胞没有发生EMT

活, 无法降解 β -连接素, 当 β -连接素积聚到一定程度后, TCF/LEF发生核转位后并激活下游的靶基因如slug, snail等, 进而诱导EMT的发生。近来Scheel等^[19]在EMT的相关信号研究中取得进展, 证实TGF- β 、经典及非经典Wnt三条信号通路协同作用诱导激活细胞EMT程序, 之后以自分泌的方式维持最终的间质细胞状态。研究证实下调内源的自分泌信号抑制因子可以诱导上皮细胞发生EMT。与之相反, 信号通路抑制剂可以破坏自分泌信号, 使原代乳腺上皮细胞迁移受到抑制。有关EMT研究的重要进展见表2。

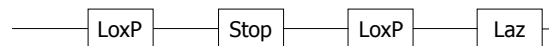
4 EMT的研究方法

4.1 免疫组织化学技术 相对于I和III型EMT有大量细胞参与, 在组织损伤修复或纤维化过程中, 只有小部分细胞分批发生EMT, 因此通常使用免疫组织化学技术研究。但是免疫组织化学技术有3个不足: (1)不能使几个蛋白在特定细胞, 特定时间点同时显色, 因而得不到反应全貌的图像; (2)不能确定看似在同一个部位表达的2个蛋白是否来自同一个细胞; (3)不能显示细胞的运动, 而运动性是细胞发生EMT的特征之一^[20,21]。

尽管如此, 因为免疫组织化学技术的简单方便, 他仍是目前判断细胞发生EMT的主要技术方法。

4.2 细胞发育制图技术 细胞发育制图技术是追踪某种类型细胞及其子代的技术, 又称世代追踪(lineage tracing)技术。可利用Cre/loxP系统来实现。Cre重组酶及LoxP(locus of X-over P1)序列均来源于P1噬菌体, Cre重组酶能有效切除2个LoxP位点间的序列^[22]。Cre/loxP系统需要2只转

转基因鼠1



转基因鼠2

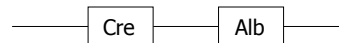


图 1 Cre-LoxP模型原理。

基因小鼠。第1只转基因小鼠含有在目的基因两端分别有1个loxP位点的基因序列, 第2只转基因小鼠中, Cre重组酶被置于某特定基因启动子的调控之下, 最后, 让这2只小鼠进行交配, 产生的同时含有上述2种基因型的子代小鼠就会在某一特定类型的细胞中缺失目的基因。比如将Cre重组酶与白蛋白基因关联构建的转基因鼠可以使得目的基因在表达白蛋白的细胞—肝细胞中缺失。比如实验中, 往往将stop盒置于2个LoxP之间, 之后接Laz基因, 这样Laz的抑制基因被选择性地肝细胞中被切除, Laz被表达。即肝细胞, 且仅仅是肝细胞, 不论其处于发育中的何种阶段, 都可以表达Laz基因(即半乳糖), 如果对半乳糖染色, 就可以达到对肝细胞“示踪”的目的(图1)。

5 肝内细胞发生EMT的证据和争议

研究者对EMT的认识达数10年的历程。EMT现象最初在胚胎发育过程中得到关注^[23,24]; 而后在肿瘤转移机制中得到进一步研究。10年前, 已有学者发现肾小管上皮细胞^[25-27]和心肌细胞^[28]可以发生EMT, 参与肾脏和心肌纤维化过程。近5年来, EMT成为肝纤维化研究中新的热点之一^[29,30]。体外大量研究证实了EMT在肝纤维化发展起到

作用^[31,32],深入研究其信号转导机制的文献也很多^[18,33-37];但是构建转基因动物模型,利用细胞发育制图技术进行的体内研究则有结果不一致,有的结果证实肝内细胞发生了EMT^[6,38],有的则未见阳性结果^[39],目前看来,EMT如何在体内影响肝纤维化的进程以及由EMT转化而来的肌成纤维细胞占多大比例,仍不明确。下面本文总结一些重要的研究结果,讲述肝内细胞发生EMT的证据和争议所在,以便较全面地了解这一领域的研究热点和需要解决的问题。

5.1 肝细胞发生EMT的证据 体外实验有许多证据证明肝细胞发生了EMT:不论用TGF- β 还是四氯化碳(CCl₄)干预,都可在小鼠的原代肝细胞或肝细胞系培养中发现肝细胞发生了EMT,表现为白蛋白表达下调,FSP-1, α -SMA表达上调,且获得间质细胞的表型^[31-37]。

体内试验有一些争议之处。支持者如Zeisberg等^[6]认为在体内肝细胞发生了EMT。他使用细胞发育制图原理,构建Alb-Cre-LacZ模型小鼠,使用CCl₄诱导,研究小鼠肝纤维化中肝细胞发生EMT的情况。此模型中他将 β -半乳糖的表达同白蛋白转录关联。这样,肝细胞来源的各子代细胞均可通过半乳糖来标记。而成纤维样细胞则用FSP-1作为标记物。研究发现:与对照相比,肝纤维化时FSP-1阳性的成纤维样细胞增多,且70%成纤维样细胞来源于肝细胞EMT。这是个著名的实验,被广泛引用,作为肝细胞发生EMT,从而促进肝纤维化的直接证据。但是这个实验存在一些问题:人们发现超过一半的FSP⁺细胞不表达半乳糖,其次该试验没有观察 β -半乳糖是否在 α -SMA阳性的肌成纤维样细胞中表达;最后,迄今还缺乏直接证据证明这些肝细胞来源的成纤维样细胞参与了基质合成。因此,学者们认为,对于肝内成纤维细胞的来源,及他们在肝纤维化中的精确作用还要进一步研究。

最近, Scholten等^[40]对于肝细胞发生EMT提出异议。首先,他质疑Zeisberg等^[6]把FSP-1作为成纤维细胞的标记物,转而使用I型胶原作为衡量成纤维细胞功能的标志;其次,他认为将半乳糖和FSP-1做双重免疫荧光的检测方法欠准确,转而使用X-gal染色继而FSP-1免疫组织化学的方法检测。这样,他的转基因鼠试验发现不论用TGF- β 还是CCl₄诱导肝纤维化,都不能证明肝细胞发生了EMT。

5.2 胆管细胞发生EMT的证据 体外实验方面证据很多:有研究发现给予一定基质培养,胆管细

胞系可以发生EMT;胆汁性肝硬化的小鼠原代胆管细胞可以同时表达上皮和间皮2类标志物;原代人胆管细胞培养也可以看到类似情况,且TGF- β 刺激下,间质细胞标志物会高表达,间质表型也更明显。在胆道闭锁和其他一些胆管疾病中,均可看到胆管细胞标志物如CK19,及间质细胞标志物同时表达^[18,37,41]。

体内实验方面证据仍不足。虽然Sackett使用细胞发育制图原理,构建Fox11-Cre-LacZ模型老鼠来研究胆管细胞EMT,但是并没有得到阳性结果。Fox11是一种间质细胞表达的基因,此模型将他与 β -半乳糖表达相关联。健康老鼠的Fox11在汇管区表达较多,一些细胞同时表达CK19;用胆总管结扎术和肝毒性药物处理这种老鼠,则看到Fox11表达主要集中在胆管细胞系。但是, β -半乳糖的表达并没有同elastin(成纤维细胞),desmin(静止的肝星状细胞), α -SMA(肌成纤维细胞, myofibroblasts)共同表达。说明胆管细胞在本试验所观察的阶段并没有间质表型的转化^[39]。最近, Chu等所做的转基因鼠的研究也未发现肝纤维化过程中胆管细胞表达间质标志物^[42]。这说明对于胆管细胞是否发生EMT,以及他在肝纤维化中的作用,体内试验的研究证据还缺乏。

5.3 肝星状细胞发生EMT的证据 肝星状细胞在肝脏发育过程中,来自次间质层细胞(sub-mesothelial),可能是发生部分EMT的上皮细胞。比如,有实验表明部分原代培养的鼠肝星状细胞可以表达祖先细胞的标志物,如CD133;在不同刺激条件下,具有向上皮和间质细胞转化的双重可能性^[38]。HSC经过MET转化而成的肝细胞可以表达甲胎蛋白、白蛋白等肝细胞标志物。这使人们有理由认为肝星状细胞和成熟肝细胞均来源于同一个祖先细胞。

细胞发育制图技术所做的研究也证明了这一点。有人构建了GFAP-Cre-GFP模型小鼠来研究星状细胞EMT。胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)是成熟肝星状细胞标志物,绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)用作标志,追踪肝星状细胞的世代。结果发现新鲜分离的Q-HSC表达GFAP和GFP;培养所得的其子代的肌成纤维细胞,甚至连肝细胞、胆管细胞也表达GFAP和GFP。说明肝星状细胞、肝细胞、胆管细胞极有可能来源于同一个祖先细胞,在特定损伤刺激下,通过EMT/MET转化而来^[38]。然而, Scholten所做的转基因鼠实验并没有发现GFAP(Cre)标记的肝星状细胞表达上皮标志物,

从而对肝星状细胞是否可以发生MET提出质疑^[40]。

6 结论

对肝细胞、胆管细胞、肝星状细胞的研究发现: 体外实验中, 这些细胞在刺激因子的作用下, 同时表达上皮和间质细胞的蛋白标志物, 并具有间质细胞的表型和移动性, 即发生EMT。进一步运用细胞发育制图技术做体内研究则发现仍有许多争议之处, 比如: 不能证明肝细胞来源的成纤维细胞分泌基质, 从而不能确立肝细胞EMT在肝纤维化中的作用; 胆管细胞发生EMT体内实验证据不足, 即运用细胞发育制图技术所得的是阴性结果; 对肝星状细胞MET的研究发现, 肝星状细胞的特征性标志物在肝细胞和胆管细胞中也有表达, 说明所谓的特征性标志物不能特异性地只在某种细胞中表达。人们推论3种肝内细胞可能来源于同一个祖先细胞, 通过EMT/MET转化后, 共同参与肝纤维化的过程。但是直接的体内试验的证据还在搜集之中。

尽管存在一些争议, EMT的研究在抑制肝脏纤维化方面还是很值得探索。比如, 骨成形蛋白7(bone morphogenic protein 7, BMP-7)可以抑制CCl₄诱导的小鼠肝损伤, 抑制BMP-7可以延缓肝脏修复^[43]。药物抑制胆管细胞 α v β 6整合素可以逆转兔胆汁性肝纤维化^[44]。美国肝病学会主席Friedman认为, 肝内上皮细胞经EMT转化为成纤维细胞是肝纤维化的重要发现^[45]。然而, 对于EMT/MET还有许多问题有待解决, 比如他们发生时所需要的条件? 各个影响因子所起的确切作用? 如何逆转? 从EMT转化而来的间质细胞和成纤维细胞的分子特征是什么? 他们的区别又是怎样的? 他们是否来源于同一个干细胞? 体内环境的复杂性使得研究EMT困难重重。近年来, 学者们也越来越关注到各种细胞因子, 炎症介质, 病原微生物等对EMT的诱导作用^[45]。随着研究的积累, 我们构建的研究EMT的细胞及动物模型才会越来越接近生物体固有的体内环境, 使得结果更加可信。同时, 也要认识到纤维化发生过程中, 肝星状细胞的来源、活化、增生、募集和细胞外基质的产生和降解是一系列相互作用的复杂过程, 任何单一的因素都很难完全解释这一过程。

7 参考文献

- Rizzino A. A challenge for regenerative medicine: proper genetic programming, not cellular mimicry. *Dev Dyn* 2007; 236: 3199-3207

- Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119: 1429-1437
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420-1428
- Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 548-558
- Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995; 130: 393-405
- Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282: 23337-23347
- Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 526-537
- Chilosi M, Zamò A, Doglioni C, Reghellin D, Lestani M, Montagna L, Pedron S, Ennas MG, Cancellieri A, Murer B, Poletti V. Migratory marker expression in fibroblast foci of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2006; 7: 95
- Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J* 2006; 25: 5603-5613
- Yang Z, Zhang X, Gang H, Li X, Li Z, Wang T, Han J, Luo T, Wen F, Wu X. Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 925-930
- Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 2008; 7: 3112-3118
- Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 2008; 27: 5959-5974
- Zavadil J, Narasimhan M, Blumenberg M, Schneider RJ. Transforming growth factor-beta and microRNA: mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 157-161
- Ma L, Weinberg RA. MicroRNAs in malignant progression. *Cell Cycle* 2008; 7: 570-572
- Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 2004; 18: 1131-1143
- Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 1997; 16: 5353-5362
- Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl)* 2004; 82: 175-181
- Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 2007; 282: 22089-22101
- Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA. Paracrine and autocrine signals

- induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 2011; 145: 926-940
- 20 Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-5774
- 21 Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol* 2007; 178: 437-451
- 22 Kos CH. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev* 2004; 62: 243-246
- 23 Aclouque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep* 2008; 9: 322-326
- 24 Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 1982; 95: 333-339
- 25 Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110: 341-350
- 26 Yamashita S, Maeshima A, Kojima I, Nojima Y. Activin A is a potent activator of renal interstitial fibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 91-101
- 27 Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9: 964-968
- 28 Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007; 13: 952-961
- 29 Lim YS, Kim KA, Jung JO, Yoon JH, Suh KS, Kim CY, Lee HS. Modulation of cytokeratin expression during in vitro cultivation of human hepatic stellate cells: evidence of transdifferentiation from epithelial to mesenchymal phenotype. *Histochem Cell Biol* 2002; 118: 127-136
- 30 Diaz R, Kim JW, Hui JJ, Li Z, Swain GP, Fong KS, Csiszar K, Russo PA, Rand EB, Furth EE, Wells RG. Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. *Hum Pathol* 2008; 39: 102-115
- 31 Kordes C, Sawitz I, Müller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Häussinger D. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 410-417
- 32 Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Pérez EH, Huang J, Li YX, Rojkind M, Diehl AM. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G575-G583
- 33 Meindl-Beinker NM, Dooley S. Transforming growth factor-beta and hepatocyte transdifferentiation in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S122-S127
- 34 Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 84-89
- 35 Nitta T, Kim JS, Mohuczy D, Behrns KE. Murine cirrhosis induces hepatocyte epithelial mesenchymal transition and alterations in survival signaling pathways. *Hepatology* 2008; 48: 909-919
- 36 Dooley S, Hamzavi J, Ciucan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehner S, Ueberham E, Gebhardt R, Kanzler S, Geier A, Breitkopf K, Weng H, Mertens PR. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology* 2008; 135: 642-659
- 37 Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 2008; 118: 3331-3342
- 38 Yang L, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi S, Vandongen HM, Huang J, Alpini GD, Diehl AM. Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers. *Stem Cells* 2008; 26: 2104-2113
- 39 Sackett SD, Fulmer JT, Friedman JR, Kaestner KH. Foxl1-Cre BAC transgenic mice: a new tool for gene ablation in the gastrointestinal mesenchyme. *Genesis* 2007; 45: 518-522
- 40 Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, Iwaisako K, Gu G, Brenner DA, Kisseleva T. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2010; 139: 987-998
- 41 Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Penz-Osterreicher M, Brenner DA. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2010; 51: 1027-1036
- 42 Chu AS, Diaz R, Hui JJ, Yanger K, Zong Y, Alpini G, Stanger BZ, Wells RG. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology* 2011; 53: 1685-1695
- 43 Sugimoto H, Yang C, LeBleu VS, Soubasakos MA, Giraldo M, Zeisberg M, Kalluri R. BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration. *FASEB J* 2007; 21: 256-264
- 44 Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Jonczyk A, Goodman SL, Schuppan D. Inhibition of integrin alphavbeta6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor-beta activation and retards biliary fibrosis progression. *Gastroenterology* 2008; 135: 660-670
- 45 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669

编辑 张姗姗 电编 闫晋利