·综述·

NOX4与肝纤维化关系的研究进展

吴龙龙 申凤俊

摘要:还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶(NOX)是一种由多种蛋白质亚基组成的复合体,其能生成消除病原微生物的活性氧簇(ROS)。现已证实NOX介导的氧化应激反应与肝纤维化的发生密切相关,而NOX的亚基NOX4则起到了关键作用,它对引起肝纤维化的主要细胞——肝星状细胞(HSC)具有显著的活化效应,并可通过介导多种细胞内外的信号转导通路,参与HSC的持续激活以及肝细胞的增殖、凋亡等过程,最终导致肝纤维化的发生。

关键词:NADPH氧化酶4;氧化应激;细胞凋亡;肝纤维化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2016.06.003

肝纤维化是由多种病因引起的急慢性肝脏损伤导致细胞外基质在肝组织间质过度沉积、降解减少而引起的一种病理改变。近年来的研究表明,还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶(NOX)通过产生活性氧簇(ROS)介导的氧化应激反应在肝纤维化的发生发展中发挥了重要作用。现已证实NOX的多种亚基如NOX1、NOX2及NOX4等在实验性肝纤维化大鼠中表达增加,参与了肝纤维化过程[1],而NOX4可能在其中起着更为重要的作用,其在活化的肝星状细胞(HSC)中表达较前两者更为丰富,并且可通过介导多条细胞信号通路,诱导HSC的持续激活[2-3]。此外,NOX4还可通过参与肝细胞的增殖、凋亡以及肌成纤维细胞的迁移等过程,促进纤维化的发展,这提示NOX4可能将成为肝纤维化新的治疗靶点。本文就NOX4在肝纤维化中作用的研究进展作一综述。

1 NOX家族与肝纤维化

NADPH氧化酶是一种由多种蛋白质亚基组成的复合体,已证实在多种组织细胞中都存在NOX的表达。生理情况下,NOX处于低度表达、低活性状态,其生成ROS的水平较低,并且主要是作为第二信使参与细胞增殖、分化等生物调节[4]。而肝脏在受到病毒等损伤因素刺激时,包括肝细胞及HSC在内的NOX活化产生大量ROS,导致氧化应激的发生。近年来的研究发现,NOX激活产生ROS介导的氧化应激反应在肝纤维化的发生发展中发挥重要作用。Bataller等[5]首先证实,HSC表面存在NOX1、NOX4等亚基以及$p47^{phox}$等组件的表达,在HSC由静止转为活化时,它们的mRNA表达上调。在肝纤维化始动阶段,NOX可调节HSC的激活及细胞凋亡,并参与调控HSC向肌成纤维细胞的转化,以及血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)、血小板生成素和转化生长因子-β(TGF-β)等促纤维化因子作用下细胞的活化[6-7]。

NOX4作为NADPH氧化酶家族的重要成员,相较于其他NOX的同工酶有其独特的特点,研究发现,NOX4可能在肝脏损伤及之后的纤维化过程中起着更为广泛的作用。NOX4在肝细胞和HSC中高度表达,并且在活化的HSC中表达明显增加。而在HCV感染者中,NOX4的上调比NOX2更为显著,却未能发现NOX1表达上的任何变化[8]。娄安妮等[9]发现在胆管结扎大鼠肝组织内,NOX4蛋白表达明显升高,并与胆管结扎时间呈正相关,当手术解除胆管结扎后,NOX4蛋白的升高趋势受到抑制。此外,Lan等[2]通过对比观察长期的NOX1和NOX4缺乏对肝纤维化进程的影响,发现两者通过促进脂质过氧化、HSC增殖等在肝纤维化中扮演重要角色,并且NOX4显示了更强的促HSC活化作用,而NOX1和NOX4的共同抑制剂GKT137831则可减弱上述效应[10]。以上结果表明,NOX4介导的氧化应激参与了肝脏的损伤和纤维化等病理过程。

2 NOX4通过TGF-β/Smad通路介导肝纤维化

TGF-β是肝纤维化重要的始动因子,可通过TGF-β/Smad信号通路激活HSC,刺激包括Ⅰ、Ⅲ及Ⅳ型胶原蛋白等的合成与沉积。大量研究表明,NOX4的促纤维化反应受TGF-β的介导,其在TGF-β诱导的纤维化反应中具有促进胶原蛋白产

作者单位:030001 太原,山西医科大学(吴龙龙);030001 太原,山西医科大学第一医院消化内科(申凤俊)

通信作者:申凤俊,Email: 919016603@qq.com

生等重要作用[11-12]。有实验对 NOX4 缺乏的 HSC 进行研究,发现 TGF-β1 介导的 HSC 的活化需要依赖 NOX4 产生 ROS[13]。而 Lee 等[14]发现,保肝药物三白草酮可通过抑制自噬作用及 NOX4 介导的氧化应激作用,减弱 TGF-β/Smad3 通路诱导的纤维化及 HSC 的活化。

Boudreau 等[15]采用丙型肝炎病毒(HCV)感染肝细胞,发现结构性的 HCV 核心蛋白诱导了 NOX4 的高水平表达以及 NOX4 依赖的 ROS 的产生,这个效应可以被 TGF-β 中和性抗体或占据优势的 TGF-β 负性受体弱化,表明 HCV 以自分泌的 TGF-β 所依赖的方式调控了 NOX4 的表达。蔡双明[16]发现,Ang(1～7)能够抑制 Ang Ⅱ对 HSC-T6 细胞的 NOX4 及抗氧化因子 Nrf2、GCLC 的诱导作用,该研究还表明 Ang Ⅱ可以诱导由 NOX4 介导的氧化应激,激活 Smad3 通路,促进 HSC 活化及胶原蛋白合成,因此认为 Smad3 与 NOX4 是上下游信号的关系。以往研究证实,在肾和肺的肌成纤维细胞中,NOX4 是 Smad3 的下游因子[17]。而有研究发现,应用针对 NOX4 表达/活化的药理性抑制剂可以阻止纤维化进程,但并不抑制 TGF-β 介导的其他有利效应[8],如可通过抑制上皮细胞的生长而阻止肿瘤的始动阶段等,因此 NOX4 同样是 TGF-β/Smad 通路的一个重要的下游因子[18-19]。而且 NOX4 可以反馈形式调节 TGF-β/Smad 信号的促纤维化效应[20]。NOX4 介导 ROS 的产生与 TGF-β/Smad 信号通路相关联,是一条关键的促纤维化通路。

3 NOX4 诱导细胞凋亡与肝纤维化

肝纤维化涉及多种细胞机制,NOX4 除了介导 HSC 的活化,还可以通过诱导肝细胞凋亡发挥促纤维化作用。在肝脏中,除了 Ang Ⅱ等受体激动剂可以激活 NOX 外,肝细胞死亡后形成的凋亡小体被 HSC 吞噬后不仅可以刺激巨噬细胞生成 TGF-β,还可以促进 HSC 的活化,导致Ⅰ型胶原蛋白表达上调[21]。Jiang 等[18]发现,NOX4 在死亡配体诱导的肝细胞凋亡中具有十分关键的作用,而敲除 NOX4 基因的肝细胞对 FasL 或肿瘤坏死因子-α/放线菌素 D 诱导的细胞凋亡更具有抵抗力。Tanaka 等[22]通过观察肝内微循环障碍引起缺氧导致的肝细胞凋亡带,发现大部分凋亡肝细胞与 NOX4 共定位,并且凋亡带中 NOX4 介导的氧化应激水平的增加可能促进了肝细胞凋亡的连续发生。同样的,用 TGF-β 刺激敲除 NOX4 基因的肝细胞,可发现 NOX 的活化、细胞凋亡蛋白酶的激活均被减弱,表明 NOX4 介导了 TGF-β 诱导的细胞凋亡。以上研究表明,NOX4 介导细胞凋亡促进了纤维化的发展,而抑制凋亡则减弱了肝脏的促纤维化应答。颜凤[23]在对血管平滑肌细胞(HUVEC)的研究中发现,用 TGF-β 刺激 HUVEC 可以增加 NOX4 mRNA 的表达并上调 NOX4 蛋白的表达水平,而将腺病毒过表达 NOX4 后转染内皮细胞,不仅抑制了内皮细胞的基础凋亡反应,而且抑制了血清饥饿引起的内皮细胞凋亡。此外,内皮细胞中过表达 NOX4 后,再给予 TGF-β 刺激,并不能引起明显的凋亡反应,这一结果提示过表达外源性 NOX4 可能具有抗内皮细胞凋亡的作用。

4 NOX4 介导的其他促纤维化途径

近期研究发现,NOX4 诱导产生的 ROS 介导了内质网应激的发生,这种应激反应在体外或体内都可以提高 HSC 对凋亡的敏感性[24-25]。Kim 等[26]发现,水飞蓟宾可通过介导 NOX4 的产生,诱发线粒体 ROS 依赖的细胞凋亡,这一过程与 Ca^{2+} 稳态的破坏及伴发的内质网应激反应相关联。在对心脏和肾的研究中发现,NOX4 还可能通过介导内皮型一氧化氮合酶(eNOS)解偶联,促进纤维化的发生。Lee 等[27]的研究采用 Ang Ⅱ刺激肾小球系膜细胞,发现 NOX4 是过氧亚硝酸盐依赖的 eNOS 解偶联作用以及由此导致的一氧化氮(NO)生物利用度下降的重要中介,NOX4 和线粒体 ROS 不仅是 Ang Ⅱ诱导的氧化应激反应的重要介质,而且导致了 eNOS 的功能障碍和系膜细胞的纤维化损伤。在对心脏的研究中也证实了 eNOS 的脱偶联可引起心肌肥厚和纤维化。关于 eNOS 解偶联作用在肝纤维化过程中的作用尚需要进一步研究。

上述研究均证实了 NOX4 在肝纤维化中扮演着重要的角色,基于此,许多研究致力于探索新型的 NOX4 抑制剂,以期用于临床上改善纤维化。有研究认为,TGF-β 具有抑制生长和诱导凋亡的能力,是一种上皮细胞肿瘤抑制因素[28]。Crosas-Molist 等[29]发现,NOX4 可能对肝细胞癌的发生起保护作用,因为 TGF-β 诱导的肿瘤细胞的衰老是 NOX4 依赖性的。他们通过沉默肝癌细胞株中的 NOX4 基因,发现可以促进肝癌细胞的增殖,提示 NOX4 可能在肝脏中具有抑制肿瘤的功能,其主要证据如下:(1)在实验大鼠模型中肝脏肿瘤的发生与 NOX4 的下调相关联;(2)在人类肝癌细胞株中发现 NOX4 的表达处于低水平。

5 小结与展望

综上所述，NOX4可通过多种途径参与肝纤维化的发生发展。它不仅可介导TGF-β/Smad信号通路，诱导HSC的持续活化，而且参与了TGF-β或凋亡配体诱导的肝细胞凋亡。此外，还需要关注NOX4可能在肝脏中起着抑制肿瘤的作用。肝纤维化往往会进展为肝硬化，而肝硬化是一种癌前状态，有较大概率会发展为肝细胞癌，这种长期持续性的NOX4抑制是否会产生不利的后果仍需要更多的研究进行验证，但也不能因此而否认NOX4作为新型抗纤维化治疗靶点的重要意义。对NOX介导的氧化应激的调控机制作进一步的研究，将有助于临床肝纤维化治疗策略的改善。

参 考 文 献

1 Paik YH, Iwaisako K, Seki E, et al. The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91(phox) mediate hepatic fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2011, 53: 1730-1741.

2 Lan T, Kisseleva T, Brenner DA. Deficiency of NOX1 or NOX4 prevents liver inflammation and fibrosis in mice through inhibition of hepatic stellate cell activation[J]. PLoS One, 2015, 10: e0129743.

3 张新华，朱萱. NOX通过ROS介导的信号通路与肝纤维化[J]. 国际消化病杂志，2011，31：34-36.

4 Jha JC, Gray SP, Barit D, et al. Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25: 1237-1254.

5 Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin Ⅱ in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis[J]. J Clin Invest, 2003, 112: 1383-1394.

6 Hecker L, Vittal R, Jones T, et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury[J]. Nat Med, 2009, 15: 1077-1081.

7 Liang S, Kisseleva T, Brenner DA. The role of NADPH oxidases (NOXs) in liver fibrosis and the activation of myofibroblasts[J]. Front Physiol, 2016, 7: 17.

8 Sancho P, Mainez J, Crosas-Molist E, et al. NADPH oxidase NOX4 mediates stellate cell activation and hepatocyte cell death during liver fibrosis development[J]. PLoS One, 2012, 7: e45285.

9 娄安妮，潘春球，李洋，等. 胆管结扎与再通对大鼠肝内细胞表型和NOX4蛋白表达的影响[J]. 南方医科大学学报，2015，35：1457-1462.

10 Aoyama T, Paik YH, Watanabe S, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent[J]. Hepatology, 2012, 56: 2316-2327.

11 Tobar N, Toyos M, Urra C, et al. c-Jun N terminal kinase modulates NOX-4 derived ROS production and myofibroblasts differentiation in human breast stromal cells[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 640.

12 Chan EC, Peshavariya HM, Liu GS, et al. Nox4 modulates collagen production stimulated by transforming growth factor β1 *in vivo* and *in vitro*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430: 918-925.

13 Carmona-Cuenca I, Roncero C, Sancho P, et al. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity[J]. J Hepatol, 2008, 49: 965-976.

14 Lee JH, Jang EJ, Seo HL, et al. Sauchinone attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through TGF-β/Smad signaling pathway[J]. Chem Biol Interact, 2014, 224: 58-67.

15 Boudreau HE, Emerson SU, Korzeniowska A, et al. Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress[J]. J Virol, 2009, 83: 12934-12946.

16 蔡双明. 血管紧张素Ⅱ/血管紧张素1-7通过调节氧化/抗氧化平衡影响肝纤维化的作用及机制[D]. 广州：南方医科大学，2014.

17 Carnesecchi S, Deffert C, Donati Y, et al. A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15: 607-619.

18 Jiang JX, Chen X, Serizawa N, et al. Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor *in vivo*[J]. Free Radic Bio Med, 2012, 53: 289-296.

19 Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF-β signaling in tissue fibrosis: Redox controls, target genes and therapeutic opportunities[J]. Cell Signal, 2013, 25: 264-268.

20 Jiang F, Liu GS, Dusting GJ. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF-β-mediated fibrotic responses[J]. Redox Biol, 2014, 2: 267-272.

21 Yu JH, Zhu BM, Riedlinger G, et al. The liver-specific tumor suppressor STAT5 controls expression of the reactive oxygen species-generating enzyme NOX4 and the proapoptotic proteins PUMA and BIM in mice[J]. Hepatology, 2012, 56: 2375-2386.

22 Tanaka M, Tanaka K, Masaki Y, et al. Intrahepatic microcirculatory disorder, parenchymal hypoxia and NOX4 upregulation result in zonal differences in hepatocyte apoptosis following lipopolysaccharide- and D-galactosamine-induced acute liver failure in rats[J]. Int J Mol Med, 2014, 33: 254-262.

23 颜凤. Nox4型NADPH氧化酶在TGF-β调节内皮细胞凋亡和表型分化中的作用及机制[D]. 济南：山东大学，2014.

24 De Minicis S, Candelaresi C, Agostinelli L, et al. Endoplasmic Reticulum stress induces hepatic stellate cell apoptosis and contributes to fibrosis resolution[J]. Liver Int, 2012, 32: 1574-1584.

(下转第359页)

G0/G1期的比例升高，CCK8实验结果显示过表达的miR-375可抑制细胞增殖，而细胞迁移实验结果显示提高miR-375含量对HSC迁移无影响。有研究发现PDK1是miR-375的靶基因，可直接靶向作用于PDK1，降低其mRNA和蛋白质的水平。由此可见，过表达的miR-375可通过靶向作用于PDK1抑制PI3K/Akt信号通路，抑制HSC增殖，负性调控肝纤维化进程。本研究揭示了miR-375在肝纤维化发生发展中的作用及其部分调控机制。

参 考 文 献

1 Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 6: 67-80.

2 Shaer A, Azarpira N, Vahdati A, et al. miR-375 induces human decidua basalis-derived stromal cells to become insulin-producing cells[J]. Cell Mol Biol Lett, 2014, 19: 483-499.

3 Li JS, Yao ZX. MicroRNAs: novel regulators of oligodendrocyte differentiation and potential therapeutic targets in demyelination-related diseases[J]. Mol Neurobiol, 2012, 45: 200-212.

4 Chen C, Wu CQ, Zhang ZQ, et al. Loss of expression of miR-335 is implicated in hepatic stellate cell migration and activation [J]. Exp Cell Res, 2011, 317: 1714-1725.

5 He Y, Huang C, Sun X, et al. MicroRNA-146a modulates TGF-beta1-induced hepatic stellate cell proliferation by targeting SMAD4[J]. Cell Signal, 2012, 24: 1923-1930.

6 Ji J, Zhang J, Huang G, et al. Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation[J]. FEBS Lett, 2009, 583: 759-766.

7 虢灿杰，潘勤，罗声政，等. MicroRNA在肝星状细胞活化过程中表达差异谱的研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2010，19：20-24.

8 Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, et al. TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes[J]. J Immunol, 2012, 188: 454-461.

9 Zhang ZW, Zhang LQ, Ding L, et al. MicroRNA-19b downregulates insulin 1 through targeting transcription factor NeuroD1[J]. FEBS Lett, 2011, 585: 2592-2598.

10 Mavrakis KJ, Van Der Meulen J, Wolfe AL, et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL)[J]. Nat Genet, 2011, 43: 673-678.

11 El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, et al. miR-375 targets 3′-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells[J]. Diabetes, 2008, 57: 2708-2017.

12 Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, et al. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta[J]. Cancer Res, 2010, 70: 2339-2349.

（收稿日期：2016-06-01）

（本文编辑：林磊）

（上接第335页）

25 Wang X, Shi Q, Xu K, et al. Familial CJD associated PrP mutants within transmembrane region induced CTM-PrP retention in ER and Triggered apoptosis by ER stress in SH-SY5Y cells[J]. PLoS One, 2011, 6: e14602.

26 Kim SH, Kim KY, Yu SN, et al. Silibinin induces mitochondrial NOX4-mediated endoplasmic reticulum stress response and its subsequent apoptosis[J]. BMC Cancer, 2016, 16: 452.

27 Lee DY, Wanquier F, Eid AA, et al. Nox4 NADPH oxidase mediates peroxynitrite-dependent uncoupling of endothelial nitric-oxide synthase and fibronectin expression in response to angiotensin Ⅱ: role of mitochondrial reactive oxygen species [J]. J Biol Chem, 2013, 288: 28668-28686.

28 Senturk S, Mumcuoglu M, Gursoy-Yuzugullu O, et al. Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth[J]. Hepatology, 2010, 52: 966-974.

29 Crosas-Molist E, Bertran E, Sancho P, et al. The NADPH oxidase NOX4 inhibits hepatocyte proliferation and liver cancer progression[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 69: 338-347.

（收稿日期：2016-5-30）

（本文编辑：周骏）