·综述·

肝纤维化的基因治疗研究进展

冯海娟 陆翠华

摘要:肝纤维化是各种慢性肝病发展至肝硬化的必经阶段,以纤维组织大量增生和肝小叶结构无序化为特征。近年来随着分子生物学的发展,肝纤维化的分子机制逐渐得以阐明,从而使肝纤维化的基因治疗成为可能,肝纤维化的基因治疗主要起到阻止纤维化发展、刺激肝细胞再生和肝组织结构重建三方面的作用。目前,常用的方法一般是通过抑制肝星状细胞(HSC)的活化,抑制HSC的增殖,及对HSC的靶向治疗等,达到延缓和治愈肝纤维化的目的。

关键词:肝纤维化; 肝星状细胞; 基因治疗

Research progress in gene therapy of liver cirrhosis *FENG Hai-juan, LU Cui-hua. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong(226001), China.*

Abstract: Liver fibrosis is the imperative process of all kinds of chronic liver disease transform to liver cirrhosis, which is characterized by disorganization of normal hepatic structure of regenerative nodules and hyperplasia of fibrotic tissues. In recent years, with the development of molecular biology, the molecular mechanisms underlying liver fibrosis has been revealed more and more, which makes the therapy at the gene level possible. The ideal strategy for the treatment of liver fibrosis should include the prevention of fibrogenesis, stimulation of hepatocyte proliferation and reorganization of the liver architecture. Recently, several gene therapy approaches for treatment of liver fibrosis are inhibition the activation of hepatic stellate cell, the proliferation of hepatic stellate cell and targeted therapy of hepatic stellate cell, then delay and cure the liver fibrosis.

Key words: Hepatic fibrosis; Hepatic stellate cell; Gene therapy

肝纤维化[1]是多种慢性肝病发展至肝硬化的必经阶段。从现代生物化学角度来看,肝纤维化是肝脏细胞外基质(ECM)合成增加和(或)降解减少所导致的ECM过度沉积;从细胞生物学角度来看,肝纤维化是产生胶原的肝脏间质细胞(主要是肝星状细胞)被激活从而发生增生并合成、分泌大量ECM的结果;从分子生物学角度来看,肝纤维化是各种细胞因子所导致的基因表达调节异常,即ECM基因表达增强,降解ECM的酶类基因表达下降。大量研究表明肝纤维化是可逆的过程,经过适当的治疗可以减轻或治愈,Friedman指出,不仅肝纤维化是可逆的,肝硬化的可逆问题也逐渐明晰起来。丙型肝炎、乙型肝炎、丁型肝炎和酒精性肝病所致肝硬化的可逆性已被很好的证明了。但目前尚无成熟有效的抗肝纤维化药物问世,随着对肝纤维化的分子机制认识的深入及基因治疗技术的发展,基因治疗有望成为一种有效的抗肝纤维化手段。现就此领域的研究进展作一综述。

作者单位:226001 南通大学附属医院消化内科

1 肝纤维化形成的分子机制

目前认为,在各种损伤性因素的始动作用下,肝星状细胞(HSC)的激活是肝纤维化发生发展的中心环节。HSC的激活包括早期的"启动"和后期的"持久化"两个阶段。

在"启动阶段",刺激因素导致肝细胞释放丝裂原作用于HSC,导致HSC增殖。随后活化库普弗细胞、内皮细胞及血小板释放细胞因子,如转化生长因子β(TGF-β)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肝细胞生长因子(HGF)、结缔组织生长因子(CTGF)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、表皮生长因子(EGF)等直接或间接促进HSC激活。继而c-myb、c-jun/spl、NF-κB等转录因子被激活,细胞增殖,其表面分子及膜受体表达发生改变,最终转化为肌成纤维细胞(MFB),进入激活的"持久化阶段"。激活的HSC又分泌TGF-β、PDGF、HGF等促使未转化HSC向MFB转化。这种自分泌正反馈调节是肝纤维化得以发展的重要环节。

2 肝纤维化基因治疗途径

2.1 抑制HSC活化

2.1.1 针对TGF-β的治疗方案 TGF-β在肝脏有

万方数据

3种亚型，即β_1、β_2和β_3，其中TGF-β_1在肝纤维化发生中起着非常重要的作用[2]。它既能诱导HSC活化产生大量的ECM，又能诱导肝细胞凋亡；它还能抑制基质金属蛋白酶(MMP)合成，促进金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)合成，同时抑制间质胶原酶的活性，使ECM降解减少。多项研究表明，阻断TGF-β_1信号通路，不仅可以抑制HSC和库普弗细胞的激活，从而抑制肝纤维化的进程；而且对肝细胞的再生起易化作用，对已存在的肝纤维化有逆转作用。

针对TGF-β_1的基因治疗可分为以下几种(1)TGF-β_1作用于HSC膜Ⅱ型受体(TβRⅡ)抑制细胞增殖，Ⅰ型受体(TβRⅠ)促进ECM合成。Wei等[3]构建大鼠反义TβRⅠ和TβRⅡ重组质粒，转染猪血清诱导肝纤维化模型。结果表明，大鼠体内可以表达TβRⅠ和TβRⅡ反义核糖核酸，分别能阻断TβRⅠ和TβRⅡmRNA和蛋白的表达，抑制肝脏羟脯氨酸含量及Ⅰ、Ⅲ型胶原量，具有逆转大鼠肝纤维化的作用。(2)在TGF-β_1信号转导中，Smad4可激发肝纤维化发生，而Smad7具有抑制肝纤维化效应。因此，可通过增加Smad7或降低Smad4含量和活性对肝纤维化进行基因治疗。(3)骨成形蛋白(BMP-2)是TGF-β超家族成员之一，Kinoshita等[4]在整体和细胞水平证实腺病毒介导BMP-2在HSC表达可抑制Ⅰ型胶原和α-SMA的合成，由此发挥抗肝纤维化作用。

上述各种针对TGF-β_1的治疗方案都可以很好的改善肝纤维化症状，但适量TGF-β_1对维持正常生理过程是必需的。因此，抑制TGF-β_1表达的基因治疗对机体有何不良影响，长期用药安全性如何仍有待进一步研究。

2.1.2 调控瘦素(leptin)基因治疗肝纤维化 瘦素是新近发现的肥胖基因编码产物，主要由脂肪细胞表达，可通过多种信号转导途径发挥生物学效应。已知HSC活化是肝纤维化发生发展的中心环节，Potter等[5]研究发现活化的HSC中可表达瘦素及其功能性受体。瘦素还能提高TGF-β_1、TNF-α等细胞因子促进肝纤维化发展。因此有望通过抑制瘦素表达，抑制HSC的增殖活化，防止肝纤维化的发生发展。薛秀兰等[6]研究，构建了针对瘦素的siRNA的真核表达载体，并把其转入HSC细胞内，结果证实siRNA可以抑制瘦素mRNA和蛋白表达，可促进HSC凋亡，降低HSC增殖活性。瘦素可作为肝纤维化基因治疗一个较好的新靶点。

2.2 抑制HSC增殖

2.2.1 抗血小板衍生生长因子(PDGF)治疗方案 PDGF是一种炎性因子，由A、B两条肽链组合而成，可表现为PDGF-AA、PDGF-BB及PDGF-AB 3种形式。其中PDGF-BB是重要的促有丝分裂因子[7]，在各种病因所致肝损伤后，PDGF-BB可促进HSC分裂、增殖和活化静息状态的HSC，使其表达PDGF受体β而启动肝纤维化进程，并通过促进ECM的合成，使肝脏发生纤维化沉积。此外还通过和其他细胞因子相互作用而促进肝纤维化进程。因此，抑制PDGF或其β受体产生或对其作用进行拮抗可阻断肝纤维化。核酶是一类具有酶活性的RNA分子，可序列特异性定点切割靶RNA，其阻断失控基因或有害基因表达的作用已得到证实。Chen等[8]研究表明，抗PDGFRβ核酶能有效地裂解靶RNA，明显地抑制靶RNA表达，并在受体水平阻断PDGF的信号转导，抑制HSC的增殖和胶原的合成，诱导HSC的凋亡。提示阻断PDGFRβ表达可作为抗肝纤维化治疗的重要手段。

2.2.2 抗CTGF小干扰RNA(siRNA)治疗肝纤维化 CTGF主要由活化的HSC产生，是HSC增殖的重要刺激因子[9-10]。因此，下调CTGF表达抑制HSC增殖，减少活化HSC数量和ECM形成可防止肝纤维化。siRNA是一种新的基因阻断技术，用来有目的地关闭特定基因表达。Li等[11]研究表明，转染抗CTGF siRNA的原代HSC，CTGF蛋白表达明显下降；siRNA沉默CTGF能显著抑制大鼠原代HSC增殖；且siRNA沉默CTGF能显著诱导大鼠原代HSC细胞周期静止，抑制其增殖。

2.3 靶向HSC治疗肝纤维化

2.3.1 γ干扰素(IFN-γ) IFN-γ是肝脏免疫反应的重要因子之一，能够直接抑制HSC合成ECM。最近，国内学者将重组IFN-γ腺病毒分别转染大鼠HSC和CCl_4诱导肝纤维化的大鼠。体外实验显示HSC的激活受到抑制，α-SMA和TIMP-1、TGF-β mRNA表达减少。活体实验显示肝纤维化进展受到抑制，血清AST、ALT转氨酶均显著降低[12]。

2.3.2 白细胞介素-10(IL-10) IL-10可通过上调Fas配体(FasL)和凋亡相关基因Bax的表达，下调凋亡抑制基因Bcl-2的表达，促进HSC的凋亡。Wang等[13]研究表明，IL-10可引起大鼠HSC的TGF-β和PDGF基因表达下调。

2.3.3 促进HSC的凋亡 在细胞凋亡的调节中，可溶性Fas配体(sFasL)与Fas(APO-1/CD95)系

万方数据

统是细胞凋亡调节过程中的重要因素。Song等[14]在两种自身免疫性肝炎动物模型体内发现，针对Fas基因(也称Tnfrsf6，编码Fas受体)的siRNA可以防止小鼠发生肝纤维化和肝功能衰竭。因此，从诱导HSC的凋亡入手，也是抗肝纤维化基因治疗的有效手段。

2.4 促进ECM降解

通过调控MMP和金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)的活性促进ECM降解治疗肝纤维化。正常的肝脏ECM合成和降解处于动态平衡，MMP促进ECM降解，TIMP是调节MMP活性的物质。肝脏受到损伤时，HSC激活不仅表达多种MMP，还能合成MMP活性调节因子如TIMP和纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)等。TIMP能抑制MMP的活性，被认为是肝纤维化产生的原因之一。因此，可通过抑制TIMP和增加MMP活性，使ECM降解增加、合成减少治疗肝纤维化。

Iimuro等[15]研究发现，含有人MMP-1前体DNA的重组腺病毒，可使大鼠的肝纤维化减轻、激活的HSC减少、肝细胞再生增加、I型胶原生成减少。Hu等[16]采用靶向TIMP-2的siRNA治疗CCl_4诱导大鼠肝纤维化，能抑制HSC激活，促进ECM降解和肝细胞再生。

2.5 其他

2.5.1 应用HGF的治疗方案 这是肝纤维化基因治疗最常用的方法。HGF是一种多效性物质，不仅具有强大的促肝细胞再生、抑制肝细胞凋亡的作用，而且具有促进纤维化肝组织重建、新的血管形成的作用，还可以促进转录调节因子的表达，通过其上调胶原酶I、尿激酶原基因的表达，从而促进ECM的降解。HGF对肝纤维化的抑制作用是通过降低TGF-β基因转录水平，抑制HSC激活以促进肝细胞再生来实现的。

虽然HGF具有多种生物学活性，对多种组织器官具有影响，但研究中并未发现其肝外活性表现，显示出以日本血凝素病毒-脂质体转导的HGF具有良好的亲嗜性和靶向性。

2.5.2 调节纤溶酶系统活性 纤溶酶原激活剂(PA)包括组织型PA(tPA)和尿激酶型PA(uPA)，tPA主要参与纤溶过程，而uPA主要作用于生理病理条件下ECM降解、细胞迁移、组织重建、肿瘤浸润与转移等过程。纤溶酶原激活剂/纤溶酶系统是调节MMP活性和ECM降解的关键因素。谢渭芬等[17]研究结果显示，uPA基因和HGF基因联合治疗可在促进ECM降解的同时，有效改善肝功能，减轻肝细胞坏死。

2.5.3 其他 EGF、角质细胞生长因子(KGF)和肝再生增强因子(ALR)均能促进肝细胞再生，减轻肝纤维化。目前研究较多的是ALR，ALR广泛存在于哺乳动物胚胎肝、幼仔肝及再生肝细胞胞质中，比HGF有更强的促进肝细胞增殖的能力和更高的特异性。ALR可通过上调IFN-γ表达，抑制肝脏自然杀伤细胞(NK)的活性，起到促进肝细胞再生和逆转肝纤维化作用。此外，ALR还可以抑制TIMP-1的表达，逆转肝纤维化。

3 展望

随着对肝纤维化发病机制认识的深入，许多致纤维化的关键环节及相应的调节基因被逐渐发现。抗肝纤维化有效的目的基因的高效性、靶向性、低免疫原性转导，可明显阻止或逆转肝纤维化进程。以上介绍了目前研究较多的几种基因治疗方法，每一种方法都有其特有的优点，但也有其局限性和不良反应。体外及许多动物实验中虽然取得了很好的效果，但临床应用还有很长的路要走。随着科技水平提高，肝纤维化基因治疗有望成为重要的临床治疗手段。

参 考 文 献

1 姚光弼. 临床肝脏病学. 上海：上海科学技术出版社，2004.

2 Friedman SL, Arthur MJ. Reversing hepatic fibrosis. Science & Medicine, 2002, 8: 194-205.

3 Wei J, Yang CQ, Liu WB, et al. Blockage of transforming growth factor receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis. J World Gastroenterol, 2004, 10: 1634-1638.

4 Kinoshita K, Iimuro Y, Otogawa K, et al. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. Gut, 2007, 56: 706-714.

5 Potter JJ, Rennie-Tankesley L, Mezey E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by Schistosoma mansoni infection and by chronic carbon tetrachloride administration. J Hepatol, 2003, 38: 281-288.

6 薛秀兰，林菊生，宋宇虎，等. 靶向leptin基因的SiRNA对鼠肝星状细胞生物学特性的影响. 华中科技大学学报(医学版)，2006, 35: 331-335.

7 CaligiuriA. Antifibrogenic effects of canrenone, anantialdosteronicdrug, on human hepatic stellate cell. Gastroenterology, 2003, 124: 1-24.

8 Chen YX, Lu CH, Xie WF, et al. Effects of ribozyme targeting platelet-derived growth factor receptor β subunit gene on the proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro. Chin Med J, 2005, 118: 982-988.

(下转第60页)

万方数据

4 Roblin X, Germain E, Phelip JM, et al. Factors associated with hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel disease: prospective study in 81 patients. Rev Med Interne, 2006, 27:106-110.
5 Fernandez-Miranda C, Martinez Prieto M, Casis Herce B, et al. Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T and 1298A-->C mutations in patients with inflammatory bowel disease. Rev Esp Enferm Dig, 2005, 97:497-504.
6 Papa A, De Stefano V, Danese S, et al. Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol, 2001, 96:2677-2682.
7 Mahmood A, Needham J, Prosser J, et al. Prevalence of hyperhomocysteinaemia, activated protein C resistance and prothrombin gene mutation in inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005, 17:739-744.
8 Danese S, Sgambato A, Papa A, et al. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel diease. Am J Gastroenterol, 2005, 100:886-895.
9 Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, et al. Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: Role of inflammation and correlation with acute phase reactants. Am J Gastroenterol, 2003, 98:112-117.
10 Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. Scand Gastroenterol, 2004, 39:1119-1127.
11 Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, et al. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci, 2004, 49:1433-1437.
12 Oz HS, Chen TS, McClain CJ, et al. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. J Nutr Biochem, 2005, 16:297-304.
13 Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: Time for a reality check? Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20:1182-1184.
14 Sengupta S, Wehbe C, Majors AK, et al. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. J Biol Chem, 2001, 276:46896-46904.
15 Danese S, Sgambato A, Papa A, et al. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel diease. Am J Gastroenterol, 2005, 100:886-895.
16 Welch GN, Upchurch GR Jr, Farivar RS, et al. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos 2. Proc Assoc Am Physicians, 1998, 110:22-31.
17 Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. Trans Res, 2007, 149:173-186.
18 Holven KB, Aukrust P, Retterstol K, et al. Increased levels of C-reactive protein and interleukin-6 in hyperhomocysteinemic subjects. Scand J Clin Lab Invest, 2006, 66:45-54.
19 Friso S, Choi SW, Girelli D, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99:5606-5611.
20 Gloria L, Cravo M, Pinto A, et al. DNA hypomethylation and proliferative activity are increased in the rectal mucosa of patients with long-standing ulcerative colitis. Cancer, 1996, 78:2300-2306.
21 Munkholm P. Review article: The incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther, 2003, 18(Suppl 2):1-5.
22 Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. Nat Rev Microbiol, 2004, 2: 820-832.
23 Keller L, Surette MG. Communication in bacteria: An ecological and evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol, 2006, 4: 249-258.
24 Oldenburg B, Fijnheer R, van der Griend R, et al. Homocysteine in inflammatory bowel disease: A risk factor for thromboembolic complications? Am J Gastroenterol, 2000, 95: 2825-2830.

(收稿日期:2008-05-05)
(本文编辑:王立明)

(上接第47页)

9 Paradis V, dargere D, Bonvoust F, et al. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. Lab Invest, 2002, 82:767-774.
10 Yuan LX, Liu XJ, Gao J, et al. Effects of lipopolysaccharide on the expression of connective tissue growth factor in hepatic stellate cells. Zhonghua Ganzangbing Zazhi, 2003, 11:200.
11 Li GM, Xie Q, Shi Y, et al. Small interfering RNA targeting connective tissue growth factor prevents rat liver fibrosis. Chin J Dig, 2005, 25:336-339.
12 Chen M, Wang GJ, Diao Y, et al. Adeno-associated virus mediated interferon-gamma inhibits the progression of hepatic fibrosis in vitro and in vivo. World J Gastrometrol, 2005, 11: 4045-4051.
13 Wang XZ, Zhang SJ, Chen YX, et al. Effects of platelet-derived growth factor and interleukin-10 on Fas/Fasligand and Bcl-2/Bax mRNA expression in rat hepatic stellate cells in vitro. World J Gastroenterol, 2004, 10:2706-2710.
14 Song E, Lee SK, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat Med, 2003, 9: 347-351.
15 Iimuro Y, Nishio T, Morimoto T, et al. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. Gastroenterology, 2003, 124:445-458.
16 Hu YB, Li DG, Lu HM. Modified synthetic SiRNA targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-I inhibits hepatic fibrogenesis in rats. J Gene Med, 2007, 9:217-229.
17 谢渭芬,林勇,陈伟忠,等.尿激酶型纤溶酶原激活剂基因治疗肝纤维化的实验研究.胃肠病学,2002,7(增刊):A40.

(收稿日期:2008-07-17)
(本文编辑:王立明)

万方数据