

· 综述 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.17.048

探寻治疗肝纤维化的新方法——ProAgiO 诱导肝星状细胞凋亡*

周卫东¹, 吴兴浪²综述, 龚建平^{2△}, 李生伟^{2▲}审校

1. 重庆市涪陵区人民医院外一科, 重庆 408000; 2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400010

关键词: ProAgiO; 肝纤维化; 整合素 $\alpha v \beta 3$; 肝星状细胞; 凋亡

中图分类号: R657.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)17-2566-04

肝纤维化是一种由多种病因引起的慢性肝脏损伤, 其形成机制复杂, 不仅可导致肝硬化、肝功能衰竭、门静脉高压等, 还是肝癌发生及预后不良的重要原因。已证实肝星状细胞(HSC)的活化和增生是肝纤维化进展的关键步骤, 采取有效措施干预其活化过程对肝纤维化的治疗至关重要。然而, 目前临床上尚缺乏有效逆转或阻止肝纤维化进展的特异性治疗药物。本文将简要阐述 HSC 及其为靶细胞的抗肝纤维化药物研究进展, 同时提出特异结合于整合素 $\alpha v \beta 3$ (βA 凹槽) 的 ProAgiO 诱导 HSC 凋亡治疗肝纤维化的新方法, 旨在为治疗肝纤维化提供新思路及新方向。

1 HSC 激活是肝纤维化发生、发展的中心环节

肝纤维化是各种致病因子(包括慢性肝炎、酒精消耗、脂肪肝病、胆汁淤积、自身免疫性肝炎等)导致的慢性肝损伤, 肝内外细胞基质沉积与降解失调, 是慢性肝损伤发展为肝硬化的必经阶段, 也是发展至肝癌的主要原因^[1]。肝纤维化的形成是一个复杂的过程, 肝脏内细胞-基质-递质间相互作用, 构成了复杂的网络系统, 参与了肝纤维化的发生、发展^[2]。已证实 HSC 是正常肝组织和纤维化肝组织细胞外基质(ECM)的主要来源, 其活化并转化为肌成纤维细胞是肝纤维化的中心环节, 许多因素参与了该过程的调控^[3-4]。

1.1 HSC 的概况 HSC 是位于肝细胞与肝窦状内皮细胞之间(Disse 间隙)的一种间质细胞, 其数量约占肝内细胞总数的 13%^[5]。其大小介于肝细胞与库普弗细胞之间, 形态不规则, 胞体呈圆形或不规则形, 常伸出数个星状胞突包绕着肝血窦。此外, HSC 还伸出胞突与肝细胞、邻近的星状细胞相接触。正常情况下 HSC 表现为富含维生素 A(VA)脂滴的静止型, 其功能主要有: (1)代谢和贮存 VA; (2)储存脂肪; (3)合成和分泌胶原、糖蛋白及蛋白多糖等基质成分; (4)合成基质金属蛋白酶; (5)表达细胞因子及受体; (6)参与肝窦血流调节^[6]。

1.2 HSC 的激活 正常情况下 HSC 处于静止状态, 当各种致病因素持续作用于肝脏时, 通过复杂机制激活 HSC。HSC 的激活包括 2 个步骤: 初始激活及持续激活。相应的 HSC 亦经历 3 种形态转化: (1)静止的 HSC; (2)“移行细胞”; (3)肌成纤维细胞(MF)^[7]。其大致过程为: 当致病因子造成肝细胞损伤时, 激活的库普弗细胞、窦内皮细胞及损伤的肝细胞等分泌多种细胞因子和化学介质共同作用于 HSC, 使 HSC 激活并转化为肌成纤维细胞——活化的 HSC, 并可分泌 TGF- $\beta 1$ (最强的促纤维化细胞因子), 促进胶原和 ECM 沉积; 同时分泌组织金属蛋白酶抑制剂(TIMPs), 抑制 ECM 的分解, 最终导致肝纤维的形成^[8-9]。

2 以 HSC 为靶细胞的抗肝纤维化药物

将药物选择性作用于 HSC, 能够有效发挥抗纤维作用并降低其系统不良反应。目前临床研究将甘露糖 6-磷酸酯-人血清清蛋白(M6P-HSA)偶合物、VA 及透明质酸(HA)等作为最常用的 HSC 靶向载体, 而且具有抗肝纤维化活性的血管紧张素 1 受体阻断剂、ALK5 抑制剂、siRNA、肝细胞生长因子基因、一氧化氮等与这些靶向载体偶联后, 能够特异性分布于 HSC, 既能发挥抗肝纤维化作用, 又能避免或降低其全身不良反应^[10]。

以上靶向载体的作用机制简述如下: (1)在肝纤维化进程中, 活化的 HSC 表面高表达甘露糖-6-磷酸酯受体, 该受体对 M6P-HSA 具有高亲和力和高度选择性。M6P-HSA 作为 HSC 的载体, 可以将抗肝纤维化药物如甘草次酸等选择性地投放于 HSC, 提高抗肝纤维化作用的选择性^[11-12]。(2)HSC 是 VA 的储存细胞, VA 能够通过 HSC 表面的维生素 A 结合蛋白介导的特异性途径进入 HSC, 成为研究最多的 HSC 靶向配基^[13-14]。(3)HA 为分布于 ECM、连接组织及器官的黏多糖, 是具有生物相容性、生物可降解性、非免疫原性、非致炎性、非毒性的线性多糖, 为常用的药物递送载体^[15]。CD44 在肝纤维化时高表达, 可与 HA

* 基金项目: 重庆市卫生和计划生育委员会科技基金(2017MSXM145)。

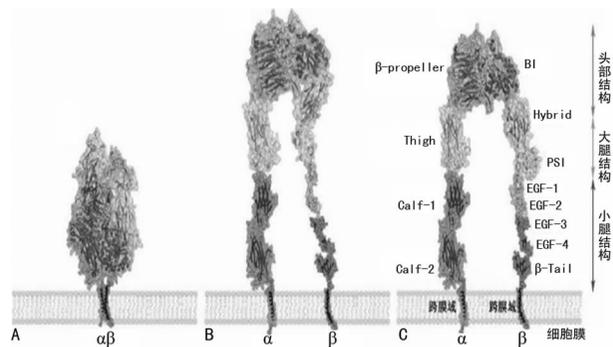
△ 通信作者, E-mail: gongjianping11@126.com; ▲ 共同通信作者, E-mail: 300383@hospital.cqmu.edu.cn。

特异性结合并内化,并在活化 HSC 迁移中发挥重要作用。

3 整合素 $\alpha v \beta 3$ 作为诱导 aHSC 凋亡的重要靶点

3.1 整合素与整合素 $\alpha v \beta 3$ 整合素是位于细胞表面的糖蛋白受体家族分子,为介导细胞-细胞及细胞-细胞外基质间黏附作用的黏附分子之一。其是由一个 α 亚基和一个 β 亚基构成的异型二聚体,迄今至少发现 18 种 α 亚基和 8 种 β 亚基,共可形成 24 种功能不同的整合素分子^[16]。根据整合素识别配体的特异性,可以将整合素大致分为识别精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽(RGD 肽类)序列整合素、层粘连蛋白连接整合素、白细胞整合素和胶原蛋白连接整合素^[17]。其亚基或者二聚体可以调节不同的细胞生物学功能,它们激活不同的细胞内信号转导分子,施加对细胞存活、增殖、黏附和迁移的严格控制,整合素亦在肿瘤的转型、生长、侵袭、转移、远处器官的定植和血管生成等方面起着非常关键的作用^[18-19]。

整合素 $\alpha v \beta 3$ 结构庞大,它包含 2 个非共价结合的 I 型跨膜糖蛋白 αv 亚基和 $\beta 3$ 亚基,存在 3 类基本构象,即弯折构象、中等亲和性构象及高亲和性构象(图 1)^[20]。其中 α 链的胞膜外区能特异性识别含 RGD 序列的多肽,介导细胞与细胞外基质的黏附。整合素 $\alpha v \beta 3$ 在正常组织器官及成熟血管内皮细胞中不表达或低表达,在多种肿瘤细胞表面和新生血管内皮细胞中高表达,在肿瘤血管生成、侵袭和转移过程中起重要作用。根据其在各种疾病中的表达特性,现已成为临床药物研究的重要靶点。



注:A 为弯折构象,即静止状态;B 为部分亲和状态;C 为激活高亲和态

图 1 整合素 $\alpha v \beta 3$ 的 3 个基本构象^[1]

3.2 整合素 $\alpha v \beta 3$ 诱导 aHSC 凋亡 纤维化肝脏中沉积的大量细胞外基质源于活化的 HSC。活化的 HSC 有 4 个去向,即活化型 HSC 转化为静止型 HSC、细胞凋亡、免疫清除、细胞衰老。其凋亡信号转导通路主要是由线粒体途径、死亡受体途径(Fas/FasL、TRAIL、TNF- α 等途径)、内质网途径所介导,并最终由半胱天冬氨酸蛋白酶家族执行凋亡过程^[21]。通过诱导 HSC 凋亡,可减少活化 HSC 的数量以及降

低肝脏中胶原和 TIMPs 的表达量,从而逆转肝纤维化^[22]。

整合素在肝纤维化形成过程中表达逐渐增加或诱导表达,在 HSC 与 ECM 的相互作用中发挥重要桥梁作用已被证实。qHSC 表达 $\alpha I \beta 3$ 和 $\alpha v \beta 3$,而 aHSC 上除 $\alpha I \beta 3$ 和 $\alpha v \beta 3$ 表达增强外,还出现 $\alpha 2 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 4$ 和 $\alpha 8 \beta 1$ 的诱导表达^[23-24]。另外 ZHOU 等^[25]研究发现,用 siRNA 沉默整合素 $\alpha v \beta 3$ 基因或破坏 $\alpha v \beta 3$ 配体,均会导致 aHSC 凋亡。正常肝细胞不表达整合素 $\alpha v \beta 3$,活化的巨噬细胞高表达整合素 $\alpha v \beta 3$,以整合素 $\alpha v \beta 3$ 为靶点诱导 aHSC 凋亡,可在不影响正常肝细胞的情况下,同时诱导活化的巨噬细胞凋亡,减轻肝脏炎症反应,阻断 HSC 的进一步激活,对 aHSC 起到双重调控的作用^[26]。因此,整合素 $\alpha v \beta 3$ 可与细胞外基质中的配体结合,抑制线粒体凋亡通路和死亡配体凋亡通路,具有重要的抗凋亡作用。

3.3 以整合素 $\alpha v \beta 3$ 为靶点的药物研究 研究表明,整合素 $\alpha v \beta 3$ 在肿瘤血管生成、侵袭和转移过程中起重要作用,集中于肿瘤方面的药物研究较为普遍,在治疗肝纤维方面未见诸报道。目前以整合素 $\alpha v \beta 3$ 为靶点的药物都经历了动物实验中有效,但不能转化为临床可用成果的尴尬境地。

Etaracizumab 是整合素 $\alpha v \beta 3$ 单克隆抗体,临床前期试验显示,Etaracizumab 具有抑制黑素瘤生长的作用,但在 II 期临床试验中,Etaracizumab 与传统抗肿瘤药物联合使用并不能提升患者的生存率,已停止进一步的临床试验^[27]。Cilengitide 是含 RGD 序列的多肽,可与整合素 $\alpha v \beta 3$ 结合抑制其功能,在 I 期和 II 期临床试验中,无论单用还是与其他化疗药物联合应用,均有较好的耐受性,具有明显的抗肿瘤作用,但在 III 期临床试验中,Cilengitide 与传统化疗药物相比,并不能提高神经胶质瘤患者的生存率,因此没有能够进一步临床推广和应用^[28-29]。

因 Etaracizumab 和 Cilengitide 都包含 RGD 序列,能与多种整合素相结合;另整合素 $\alpha v \beta 3$ 也可与 ECM 中的多种配体相结合,这便导致这一类药物与机体有复杂的相互作用,缺乏良好的靶向性,这很有可能是这一类药物难以转化为临床应用的重要原因。

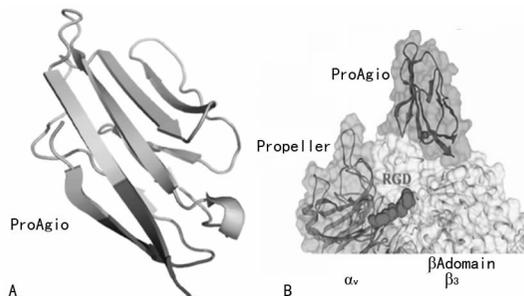
4 特异结合于整合素 $\alpha v \beta 3$ 的 ProAgiO 诱导 aHSC 凋亡

4.1 ProAgiO 的概况 如前所述,目前针对整合素的药物研究大多集中在与其经典配体结合方面,如抗体、环肽、崩解素、肽类和小分子拮抗剂。但靶向于整合素经典配体位点的药物有着明显的缺点,即与配体结合所产生信号的有效性限制了整合素配体拮抗剂/激动剂在临床上的成功应用。这促使着需要开发新的治疗靶点,譬如靶向于经典配体结合位点以外。

TURAGA 等^[30]研究发现,人类和大鼠 CD2 的结构域 1(D1-CD2)与整合素 $\alpha v\beta 3$ 的亲合力很弱,且由于 $\beta 3$ 的 βA 结构域在配体结合和整合素信号传导中的重要作用,他们尝试将 D1-CD2 配位到整合素 $\alpha v\beta 3$ 的 βA 凹槽(与 βA 结构域中的 RGD 结合位点非常接近)。在充分考虑结合程度、溶解度、稳定性和其他参数的情况下,对 D1-CD2 进行合理突变,选择了其中的一个突变体,称之为 ProAgio,其结构与人体蛋白的结构性质非常相似(图 2A),相对分子质量为 1.0×10^4 ,在其细胞和动物实验中发现 ProAgio 具有抗炎、抗肿瘤和抗血管生成等多种作用,且不影响正常的器官、血管及免疫系统。

TURAGA 等^[30]通过实验分析验证了 ProAgio 在整合素 $\alpha v\beta 3$ 的 βA 凹槽特异性结合而不是在经典结合位点,且其结合不干扰 RGD 结合。通过使用人脐静脉内皮细胞(高表达 $\alpha v\beta 3$)进行细胞黏附、免疫共沉淀等实验也进一步证实了 ProAgio 与整合素 $\alpha v\beta 3$ 的特异结合,而不是与含有 β 亚基的整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 和 $\alpha v\beta 6$ 等结合。体内及体外实验均证实 Pro-Agio 可通过招募和激活 caspase 8,进而诱导整合素 $\alpha v\beta 3$ 高表达细胞的凋亡,且其有效诱导细胞凋亡的机制与整合素介导死亡机制相似,但与失巢凋亡(当细胞与其周围的基质和邻近细胞分离后而启动的死亡过程)和其他整合素拮抗剂完全不同。

ProAgio 具有以下新的作用机制:(1)它与整合素 $\alpha v\beta 3$ 的结合位点并不是受体-配体结合位点(图 2B)^[30],可在不影响配体信号传导的情况下,直接诱导整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达细胞的凋亡。(2)ProAgio 不需要与配体竞争整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体位点,不影响整合素与细胞外基质复杂的相互作用,具有绝佳的靶向作用。



注:A为ProAgio的分子构象图;B为ProAgio结合在整合素 $\alpha v\beta 3$ 的 β 亚基 βA 凹槽(βA groove)^[2]

图 2 分子构象图

4.2 ProAgio 与肝纤维化 前文回顾分析已知 HSC 的活化和增生是肝纤维化进展的关键步骤,整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达可诱导 aHSC 凋亡,从而影响肝纤维化的进程。基于整合素 $\alpha v\beta 3$ 的研究多见于肿瘤领域,而作用于整合素 $\alpha v\beta 3$ 的 ProAgio 可通过招募和激活 caspase 8,进而诱导整合素 $\alpha v\beta 3$ 高表达细胞的凋亡。那么,ProAgio 通过与整合素 $\alpha v\beta 3$ 的特异结合是否可

诱导 aHSC 凋亡,而不导致 qHSC 的凋亡呢? ProAgio 可否成为预防、抑制甚至逆转肝纤维化的新药物? 以下问题亟待解决:(1)HSC 的活化与增生是肝纤维化发生发展的中心环节,肝纤维化时,aHSC 高表达整合素 $\alpha v\beta 3$ 的结论均来自于细胞实验或动物实验,在人肝纤维化标本是否具有相同的结论?(2)在离体及动物实验中,作用于整合素 $\alpha v\beta 3$ (βA 凹槽)的 ProAgio 是否可以通过诱导 aHSC 凋亡,减少细胞外胶原沉积,最终逆转甚至抑制肝脏纤维化?(3)在人体试验中,能否产生同样的效果并进行安全的临床试验?

5 现状与展望

我国是乙型肝炎大国,肝纤维化患者多、程度重,对抗肝纤维化药物的需求紧迫。目前,许多靶向治疗方法虽已被证实且不少具有抗肝纤维化活性的候选药物亦被报道,但临床上尚无十分有效的抗纤维化药物或生物制剂。另外,当前暂无相关文献及试验证实 ProAgio 治疗和预防肝纤维化的有效性。但就其机制而言显然具有重要研究价值,甚至很有可能率先突破肝纤维化药物研发的瓶颈,是研究肝纤维化治疗的新思路、新方向,需进一步实验及研究证明。

参考文献

[1] DONGIOVANNI P,ROMEO S,VALENTI L. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: Role of environmental and genetic factors[J]. World J Gastroenterol, 2014,20(36):12945-12955.

[2] 胡焯,张国. 肝纤维化的药物治疗研究进展[J]. 实用肝病杂志,2016,19(1):8-11.

[3] 胡潇,胡光荣,刘思达,等. 肝纤维化治疗进展[J]. 肝脏,2018,23(10):85-87.

[4] LEI X F,FU W,KIM-KANEYAMA J R,et al. Hic-5 deficiency attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through upregulation of Smad7 in mice [J]. J Hepatol,2015,64(1):110-117.

[5] FUJITA T,NARUMIYA S. Roles of hepatic stellate cells in liver inflammation;a new perspective[J]. Inflamm Regen,2016,36:1.

[6] 胡倩,梁健,邓鑫,等. 星状细胞的激活与凋亡对肝纤维化的影响[J]. 大众科技,2015,17(11):78-81.

[7] 王林,刘学恩,庄辉. 多种细胞在肝纤维化逆转中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志,2018,34(4):862-866.

[8] KOYAMA Y,BRENNER D A. New therapies for hepatic fibrosis [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2015, 39 (Suppl 1):S75-S79.

[9] WAN Y,MENG F,WU N,et al. Substance P increases liver fibrosis by differential changes in senescence of cholangiocytes and hepatic stellate cells[J]. Hepatology, 2017,66(2):528-541.

[10] 靳雪源,赵平. 靶向肝星状细胞的肝纤维化治疗研究进展 [J]. 世界华人消化杂志,2017,25(28):2495-2502.

- [11] BELJAARS L, OLINGA P, MOLEMA G, et al. Characteristics of the hepatic stellate cell-selective carrier mannose 6-phosphate modified albumin (M6P (28)-HSA) [J]. *Liver*, 2010, 21(5): 320-328.
- [12] LUK J, ZHANG Q, LEE N, et al. Hepatic stellate cell-targeted delivery of M6P-HSA-glycyrhethinic acid attenuates hepatic fibrogenesis in a bile duct ligation rat model [J]. *Liver*, 2007, 27(4): 548-557.
- [13] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(7): 397-411.
- [14] SENOO H, MEZAKI Y, FUJIWARA M. The stellate cell system (vitamin A-storing cell system) [J]. *Anat Sci Int*, 2017, 92(4): 387-455.
- [15] GIUSEPPE T, ADRIANA T, MARIA LUISA T, et al. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: recent advances and challenges [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 97(Pt B): 400-416.
- [16] ANDERSON L R, OWENS T W, NAYLOR M J. Structural and mechanical functions of integrins [J]. *Biophysical Reviews*, 2014, 6(2): 203-213.
- [17] BARCZYK M, CARRACEDO S, GULLBERG D. Integrins [J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 339(1): 269-280.
- [18] 刘莉, 丁丽君. 靶向整合素 $\alpha\beta3$ 药物的研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2017, 36(9): 505-510.
- [19] 王莹, 姜媛媛, 李国军, 等. 整合素在肿瘤发展中的作用 [J]. *中国化工贸易*, 2017, 9(20): 235.
- [20] 戴明权, 金海晓, 严小军. 整合素 $\alpha\beta3$ 结构与激活及其肿瘤靶向药物的研究进展 [J]. *生物学杂志*, 2018, 35(4): 85-89.
- [21] JOHNSON A, DIPIETRO L A. Apoptosis and angiogenesis: an evolving mechanism for fibrosis [J]. *FASEB J*, 2013, 27(10): 3893-3901.
- [22] ZHANG X, HAN X, YIN L, et al. Potent effects of dios-
- cin against liver fibrosis [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9713.
- [23] FAUSTHER M, DRANOFF J A. Integrins, myofibroblasts, and organ fibrosis [J]. *Hepatology*, 2014, 60(2): 756-758.
- [24] GARDNER H. Integrin $\alpha1\beta1$ [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 819: 21-39.
- [25] ZHOU X, MURPHY F R, GEH DU N, et al. Engagement of $\alpha5\beta1$ integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(23): 23996.
- [26] TACKE F, ZIMMERMANN H W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5): 1090-1096.
- [27] HERSEY P, SOSMAN J, O'DAY S, et al. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin $\alpha\beta3$, \pm dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma [J]. *Cancer*, 2010, 116(6): 1526-1534.
- [28] STUPP R, HEGI M E, GORLIA T, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(10): 1100-1108.
- [29] LOMBARDI G, PAMBUKU A, BELLU L, et al. Effectiveness of antiangiogenic drugs in glioblastoma patients: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 111: 94-102.
- [30] TURAGA R C, YIN L, YANG J J, et al. Rational design of a protein that binds integrin $\alpha\beta3$ outside the ligand binding site [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11675.

(收稿日期: 2019-02-18 修回日期: 2019-05-06)

• 综述 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 17. 049

蓝激光成像结合放大内镜对胃黏膜萎缩及肠上皮化生的诊断价值

王于梅^{1,2}综述, 何松^{1△}审校

1. 重庆医科大学附属第二医院消化科, 重庆 400010; 2. 重庆市黔江中心医院消化内科, 重庆 409000

关键词: 蓝激光成像; 放大内镜; 萎缩; 肠上皮化生

中图分类号: R445.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)17-2569-04

慢性萎缩性胃炎(CAG)及肠化生是胃癌前状态, 具有较高的癌变风险^[1]。研究显示诊断明确的上消化道癌, 很多背景黏膜为 CAG 及肠上皮化生, 因此, CAG 是胃癌发生的重要环节, 开展对 CAG 的规范筛查、诊治对预防胃癌的发生具有重大意义。然而, 传统内镜对 CAG 的诊断尚有一定的局限性, 随着内镜

技术的发展, 新型内窥镜问世, 不断提高了对消化道疾病诊断的准确率, 其中有蓝激光(BLI)成像放大内镜结合技术(BLI-ME)、色素内镜、共聚焦激光显微内镜(CLE)、自发荧光内镜(AFI)等。BLI有别于过去惯用的卤素灯和氙气灯光源, 首次研发采用激光光源, 是对不同观察用激光的叠加而非滤除, 从而有效

△ 通信作者, E-mail: 578673595@qq.com.