

· 综 述 ·

酒精性肝纤维化发生机制的研究进展*

王小莲¹, 吴江锋¹综述, 冯 罡^{2△}审校

(1. 三峡大学医学院人体解剖学教研室, 湖北宜昌 443002; 2. 湖北省宜昌市第一人民医院内科 443002)

关键词: 肝硬化, 酒精性; 乙醛; 胶原蛋白; 肝星状细胞

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)04-0464-03

在发达国家, 肝纤维化的主要病因是乙醇所导致的, 而在我国的主要病因是由病毒引起的, 特别是乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒的持续感染。但是随着经济的高速发展, 人们生活水平的不断提高, 生活方式及饮食结构发生了很大的改变, 我国的酒精性肝病的发病率也在逐年上升, 成为危害人们健康的主要疾病之一, 也是近年来医学界关注的热点。酒精性肝病是由于长期大量饮酒导致肝脏发生进行性的病理化改变, 早期的脂肪变性发展成脂肪性肝炎, 进而逐步演变为肝纤维化、肝硬化, 最终发展成为肝细胞癌。而肝纤维化是多种慢性肝病发展为肝硬化的必经之路, 形成原因与胶原合成酶、基质金属蛋白酶及其抑制因子等有关。当细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成大于降解时, 过多的 ECM 沉积于肝脏形成肝纤维化。大量研究已证明, 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是合成 ECM 的主要参与者, HSC 的活化与增殖是肝纤维化进展的中心环节^[1]。

乙醇引起肝纤维化的发病机制非常复杂, 包括各种不同的分子学和生物学机制, 大量研究证据表明, 乙醇的代谢物——乙醛在肝纤维化发展的整个进程中起着关键性的作用。研究还表明, 乙醛可以通过各种途径活化 HSC^[2], 本文将乙醛引起肝纤维化过程中存在的分子机制作一综述。

1 乙醇在体内的代谢及毒性

从消化道吸收来的乙醇, 90%~98%经门脉系统进入到肝脏, 通过肝脏的代谢和处理后, 乙醇及其代谢物进入体循环, 仅有 2%~10%的乙醇通过尿、汗、呼气排出, 或者转移至唾液或乳汁中。乙醇在肝脏内代谢主要有两条途径, 其一是经乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)氧化为乙醛, 然后经乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)氧化为乙酸。其二是经微粒体中细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)为主的微粒体乙醇氧化系统(microsomal ethanoxidizing system, MEOS)和过氧化小体上的角酶氧化为乙酸^[3]。ADH、ALDH 和 CYP2E1 均有基因多态性。

长期大量饮酒所致的乙醇中毒除乙醇自身毒性外, 主要是代谢过程中生成的乙醛和自由基、羟基以及氢离子浓度的改变对身体造成影响。而且长期的乙醇摄入会使肝脏线粒体功能紊乱, 代谢乙醛的能力就大大降低, 而乙醇的氧化速度不变甚至提高, 造成乙醛的生成与降解不平衡, 导致肝内乙醛浓度增加。乙醛的毒性作用主要通过以下方式: 乙醛可以与半胱氨酸、谷胱甘肽及维生素 E 的相互作用促进脂质过氧化, 与微粒体、循环中的清蛋白、球蛋白和脂蛋白等通过共价键结合形成乙醛蛋白加合物, 乙醛还可以促进胶原形成。

2 乙醛引起肝纤维化的分子机制

早期的研究发现, 乙醛可以引起 HSC 内而不是肝细胞内 I 型胶原蛋白的合成^[4-5], 虽在 HSC 内并没有发现 ADH, 有可能乙醛是通过旁分泌的形式从肝细胞内进入 HSC 的^[6]。研究还发现乙醛可以通过上调间质胶原酶 MMP-2 的基因表达及下调纤维胶原酶 MMP-1 的基因表达, 进而导致 ECM 合成大于降解^[7]。

在大鼠的 HSC 中, 乙醛通过蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)快速地引起 AP-1 转录因子的活化^[8-9], 在乙醛的作用下, PKC 的活化是 Ca²⁺非依赖性的, 主要是由增多的二酰基甘油产物所致。在人的 HSC 中, Svegliati-Baroni 等^[10]已阐明了 PKC 在转换乙醛下游信号的核心作用, PKC 磷酸化 p70s6k 的过程中有细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)和 PI3K 的参与, 所有的这些通路都会诱导胶原蛋白 α2(I) 的表达。

胶原蛋白 α1(I) 和 α2(I) 都含有丰富的乙醛应答元件供各种转录因子结合, 尽管如此, 这两种胶原蛋白基因上的响应元件可以被各种信号激活并呈现出不同的活力。

Chen 等^[11]发现在大鼠胶原蛋白 α1(I) 基因末端 CG 盒(-1484至-1476)中具有启动子的正性调控序列, 这段序列可以结合基础转录元件结合蛋白(BTEB), 此蛋白的表达是由乙醛引起的 JNK 通路介导产生的。乙醛调控胶原蛋白 α1(I) 表达的机制中包括转录因子 C/EBPβ 家族的参与而且需要过氧化氢的存在^[12-13], 从而得出了这样的结论: 乙醛所致的胶原蛋白的合成与氧化应激有直接的关系。

在胶原蛋白 α2(I) 基因中, 乙醛应答元件始于启动子区域-378至-183^[14-15], 类似于胶原蛋白 α1(I), 这段序列包括细胞因子反应元件。然而, 不同的转录因子参与了乙醛介导的调控基因。此外, 乙醛通过不同机制来引起胶原蛋白 α2(I) 基因的双相性应答。早期的应答发生于乙醛作用于人类 HSC 的 3 h 内, 同时要求转录复合物 SP1、Smad3 和 Smad4 的形成^[16]。这种早期应答不需要转化生长因子(transforming growth factor, TGF)-β, 因为中和抗体对 TGF-β₁ 没有影响乙醛介导的胶原合成。在 6 h 后, 由于乙醛介导的一个 TGF-β 依赖的迟发应答的出现以及维持 HSC 的促纤维化和促炎性。事实上, 在体外培养的 HSC 中乙醛可以介导 TGF-β₁ 的分泌和活化, 也能够介导 TGF-β₂ 的表达^[17]。TGF-β 转而可以增加胶原蛋白 α1(I) 和 α2(I) 的转录。

* 基金项目: 湖北省卫生厅青年科技人才基金资助项目(QJX2010-28)。 作者简介: 王小莲(1984~), 讲师, 硕士, 主要从事肝纤维化分子治疗的研究。 △ 通讯作者, Tel: 13618699667; E-mail: fenggang104@sohu.com。

最近,作者看到了一种新的机制——乙醛可以发挥其自身的促纤维化行为。在人类的 HSC 中,乙醛可以通过磷酸化第 84 位上的丝氨酸残基来抑制过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) γ 的转录活性^[18]。这个机制有别于先前报道的乙醛介导的对 PPAR α 的抑制作用^[19],由于 PPAR γ 的磷酸化作用不会损害受体与其应答元件的结合而是阻碍其转录活性,从而证明了其特殊的报道基因结构。作者还发现乙醛对 PPAR γ 的抑制作用是通过 PKC δ 和 ERK1/2 的快速活化通路,而且这个机制有赖于 H₂O₂ 产物和癌基因活性。事实上,乙醛对胶原蛋白 $\alpha 2(I)$ 的促纤维化作用是完全可以由癌基因激酶的死亡突变和 PPAR γ 中丝氨酸突变为丙氨酸。

除了乙醛对 I 型胶原蛋白基因和 HSC 活化的直接作用外,在促肝纤维化的过程中,由乙醛派生的加合物也起了非常重要的作用。乙醛极不稳定,迅速与细胞成分发生反应,生成一些具有损害和异常功能的加合物。这是酒精性肝纤维化过程的一个关键步骤。事实上,乙醛加合物如丙二醛(MDA),4-羟基壬烯醛(HNE)和乙醛的混合加合物如丙二醛-乙醛(MAA)水平的升高与肝纤维化的进展有密切的关系,无论是在患者还是体内实验模型中^[20-23]。此外,在酒精性肝病的患者中,作者发现其自身抗 AcCHO-MDA-和抗 MMA-加合物和抗体滴度显著升高与肝功能损害的严重程度有着密切的关系,表明这些分子很可能参与了纤维化肝脏中的免疫反应^[24]。

据报道,MAA 加合物可以诱发大鼠 HSC 中炎症趋化因子的分泌^[25]。此外,在 HSC 中,中性粒细胞衍生活性氧能够诱导脂质过氧化和 MDA/HNE 蛋白加合物,从而导致胶原蛋白的合成增加。乙醛加合物似乎在 HSC 活化表型的维持中发挥作用,而不是在早期活化过程中,可能通过增强氧化应激的作用^[26]。HNE 已经证明,通过促进 I 型胶原和金属蛋白酶 1 组织抑制剂诱导 HSC 生存和 ECM 重构^[27]。此外,乙醛自身通过依赖 PKC 通路,能够诱导肝癌细胞 hepG2 中转录因子 AP-1 和 NF- κ B 的早期活化^[28]。AP-1 和 NF- κ B 是已知的促炎性细胞因子的调控子,他们转而促进 HSC 活化状态的持续。

总之,乙醛深入地参与了肝纤维化的发病机制。要充分认识乙醛的作用,必须在今后的实验中研究分子机制,涉及乙醛代谢、氧化应激、免疫反应、肝细胞活化和 ECM 重构之间的复杂关系。

参考文献:

- [1] Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches[J]. *J Biol Interact*, 2011, 193(3): 225-231.
- [2] Anania FA, Womack L, Jiang M. Aldehydes tentiate alpha(2)-1 collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30(8): 846-857.
- [3] Knockaert L, Fromenty B, Robin MA. Mechanisms of mitochondrial targeting of cytochrome P450 2E1: physiological role in liver injury and obesity[J]. *FEBS J*, 2011, 278(22): 4252-4260.
- [4] Haorah J, Schall K, Ramirez SH, et al. Activation of protein tyrosine kinases and matrix metalloproteinases causes blood-brain barrier injury: novel mechanism for neurodegeneration associated with alcohol abuse[J]. *Glia*, 2008, 56(1): 78-88.
- [5] Moshage H, Casini A, Lieber CS. Acetaldehyde selectively stimulates collagen production in cultured rat liver fat-storing cells but not in hepatocytes[J]. *Hepatology*, 1990, 12(3 Pt 1): 511-518.
- [6] Fontana L, Jerez D. Ethanol induces the expression of alpha1(I) procollagen mRNA in a co-culture system containing a liver stellate cell-line and freshly isolated hepatocytes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1362(2/3): 135-144.
- [7] Casini A, Ceni E. Acetaldehyde regulates the gene expression of matrix metalloproteinase-1 and -2 in human fat-storing cells[J]. *Life Sci*, 1994, 55(17): 1311-1316.
- [8] Budas GR, Disatnik MH, Mochly-Rosen D. Aldehyde dehydrogenase 2 in cardiac protection: a new therapeutic target[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2009, 19(5): 158-164.
- [9] Lee YJ, Shukla SD. Pro- and anti-apoptotic roles of c-Jun N-terminal kinase(JNK) in ethanol and acetaldehyde exposed rat hepatocytes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 508(1/3): 31-45.
- [10] Svegliati-Baroni G, Ridolfi F. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells[J]. *Hepatology*, 2001, 33(5): 1130-1140.
- [11] Chen A, Davis BH. The DNA binding protein BTEB mediates acetaldehyde-induced, jun N-terminal kinase-dependent alpha1(I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(8): 2818-2826.
- [12] Garcia-Trevijano ER, Iriburu MJ. C/EBPbeta associates with caspase 8 complex proteins and modulates apoptosis in hepatic stellate cells[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2007, 41(3): 295-299.
- [13] Dunning S, Hannivoort RA, de Boer JF, et al. Superoxide anions and hydrogen peroxide inhibit proliferation of activated rat stellate cells and induce different modes of cell death[J]. *Liver Int*, 2009, 29(6): 922-932.
- [14] Zhao YP, Wang H, Fang M, et al. Study of the association between polymorphisms of the COL1A1 gene and HBV-related liver cirrhosis in Chinese patients[J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(2): 369-376.
- [15] Hirose T, Nakazato K, Song H, et al. TGF-beta1 and TNF-alpha are involved in the transcription of type I collagen alpha2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading[J]. *J Appl Physiol*, 2008, 104(1): 170-177.
- [16] Svegliati-Baroni G, Inagaki Y, Rincon-Sanchez AR, et al. Early response of alpha2(I) collagen to acetaldehyde in human hepatic stellate cells is TGF-beta independent[J]. *Hepatology*, 2005, 42(2): 343-352.
- [17] Chen A. Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells[J]. *Biochem J*, 2002, 368(Pt 3): 683-693.

- [18] Ceni E, Crabb DW, Foschi M, et al. Acetaldehyde inhibits PPAR gamma via H₂O₂-mediated c-Abl activation in human hepatic stellate cells[J]. Gastroenterology, 2006, 131(4):1235-1252.
- [19] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Prog Lipid Res, 2009, 48(1):1-26.
- [20] Casini A, Galli A, Pignatelli P, et al. Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation[J]. J Pathol, 2000, 192(1):81-89.
- [21] Holstege A, Bedossa P, Poynard T, et al. Acetaldehyde-modified epitopes in liver biopsy specimens of alcoholic and nonalcoholic patients: localization and association with progression of liver fibrosis[J]. Hepatology, 1994, 19(2):367-374.
- [22] Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttuala S, et al. Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease[J]. Hepatology, 1995, 22(4 Pt 1):1208-1214.
- [23] Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, et al. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration[J]. Hepatology, 1996, 23(4):872-880.
- [24] Setschedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2010, 3(4):178-185.
- [25] Kharbanda KK, Todero SL, Shubert KA, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde-protein adducts increase secretion of chemokines by rat hepatic stellate cells[J]. Alcohol, 2001, 25(2):123-128.
- [26] Olynyk JK, Khan NA, Ramm GA, et al. Aldehydic products of lipid peroxidation do not directly activate rat hepatic stellate cells[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(7):785-790.
- [27] Zamara E, Novo E, Marra F, et al. 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 2004, 40(1):60-68.
- [28] Roman J, Gimenez A, Lluís JM, et al. Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 by acetaldehyde in HEPG2 cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19):14684-14690.

(收稿日期:2012-09-23 修回日期:2012-10-25)

· 综 述 ·

超声微泡在肿瘤分子成像和治疗中的应用研究

欧阳紫兰 综述, 邱丽华, 高 志 审核

(重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科/重庆市口腔疾病与生物医学研究中心 400015)

关键词: 超声微泡; 超声分子成像; 肿瘤治疗

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.044

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)04-0466-03

随着现代生物医学工程的不断发展,人类对医学诊断及治疗的技术不断完善,同时对其要求也逐步提高。在超声医学领域,超声微泡(ultrasound microbubbles, UM)是近年来发展速度较快的新型超声造影剂(ultrasound contrast agent, UCA),其实质是一种内含气体的微球,通过改变组织的超声特性提高诊断的灵敏度和特异性,可实现从分子水平对疾病进行精确诊断^[1-2],现已成为超声医学的热门课题。

自1968年有学者首次报道用吲哚菁绿和生理盐水/葡萄糖水制作的小气泡可增强心脏超声显影以来,其研究历史已有40余年,现已用于多种器官造影成像的实验研究^[3-4]。此外,UM还被证实是药物和基因的良好、有效载体。载药微泡能显著提高靶部位的药物浓度,减少全身毒副作用;载基因微泡则能明显提高局部组织细胞的基因转染和表达^[5-6]。目前,利用UM造影剂对体内组织、器官的微观病变进行分子成像,对疾病诊断、治疗及药物递送系统的深入研究均具有非凡的意义^[7-8]。

1 UM 概述

近年来,UM因其安全、高效、简便、无创等众多优点,在肿瘤显影与药物、基因治疗等方面展现了巨大的应用潜力及实用价值。随着纳米技术的发展,UM与纳米技术的结合已成为研

究热点。纳米级UM穿透性高、稳定性强,具有聚集成像特性,能增加转染效率,为肿瘤诊断及治疗带来新希望和新方向^[9-11]。

“空化效应”是其最重要的作用机制,也是液体中高强度超声应用的基础。在超声波作用下,微泡向血管壁移动并黏附,高频声波可使微泡产生不对称的膨胀和收缩,然后破裂、振动,瞬间释放能量,从而使得周围组织细胞受损,细胞壁和细胞膜出现可逆或不可逆的穿孔^[12]。研究表明,UM可增加超声辐照时肝癌组织微血管的通透性,而微泡破裂引起的毛细血管破裂则有利于药物载体在靶组织中克服内皮屏障。

2 超声微泡造影及其应用

超声分子成像主要是因为微泡内含气体,利用声波对气体的反射远大于液体及微泡的非线性声学效应显影,进而达到诊断疾病的目的。近年来,应用UM进行肿瘤的超声造影成像(contrast-enhanced ultrasound, CEUS)已成为临床超声诊断方法中不可缺少的一部分^[13-14],UM分子成像技术也备受关注^[15]。研究表明^[9],UM造影技术能有效增强多实质器官的二维灰阶影像,提高超声多普勒对血流信号的敏感性,提高肿瘤的分辨率,在肿瘤良、恶性的鉴别诊断上有重大意义。最近,Willmann等^[16]利用双靶点靶向UM进行小鼠卵巢癌的显影,