

热休克蛋白47在肝纤维化中的研究进展

石榴¹, 韩铭², 袁晓雪², 叶峰¹, 成军², 蔺淑梅¹ (1.西安交通大学第一附属医院 感染科, 西安 710061; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 研究所, 北京 100015)

摘要: 肝纤维化是由胶原和非胶原在肝脏异常沉积引起, 目前尚无特效治疗药物。热休克蛋白47 (heat shock protein 47, HSP47) 是一种存在于内质网中的胶原特异性分子伴侣, 已被证实主要来源于纤维生成细胞, 可协助三螺旋胶原前分子的正确折叠和稳定。在肝纤维化进程中, 细胞外基质的主要来源是肝星状细胞, 体内外研究均证实HSP47在肝内主要存在于肝星状细胞中, 通过转化生长因子- β 1 (transforming growth factor - β 1, TGF- β 1) 信号转导通路调控肝纤维化的发生, miRNA、HSP47-蛋白相互作用也参与了肝纤维化的发生发展, 本文将对HSP47与肝纤维化的发病机制进行综述。

关键词: 热休克蛋白47; TGF- β 1信号转导通路; miRNA; HSP47蛋白相互作用; 肝纤维化

Research advances on heat shock protein 47 in liver fibrosis

Shi Liu¹, Han Ming², Yuan Xiaoxue², Ye Feng¹, Cheng Jun², Lin Shumei¹ (1.Department of Infectious Disease Medicine, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2.Department of Infectious Disease Research Center, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: Liver fibrosis is caused by abnormal deposition of collagen and non-collagen. However, an efficient treatment for liver fibrosis is not yet available. Heat shock protein 47 (HSP47), a collagen-specific molecular chaperone residing in the endoplasmic reticulum, has been proved to assist the correct folding and stabilization of triple-helical procollagen molecules after the synthesis of polypeptide chains. In the process of liver fibrosis, studies both *in vivo* and *in vitro* have convincingly demonstrated that HSP47, which mainly found in hepatic stellate cell, regulated the occurrence of hepatic fibrosis through TGF- β 1 signaling pathway. Besides, miRNA and Hsp47-protein interaction were also involved in the development of liver fibrosis. This review retrospected the role of HSP47 on the pathogenesis and occurrence of liver fibrosis.

Key words: Heat shock protein 47; TGF- β 1 signaling pathway; miRNA; HSP47-protein interaction; Liver fibrosis

肝纤维化及其终末期并发症肝硬化是世界范围内肝病死亡的主要原因之一, 目前尚无有效治疗方法, 因此在肝纤维化早期阶段进行干预非常重要。活化的肝星状细胞是肝损伤时主要的细胞外基质生成细胞, 肝星状细胞的发现表明纤维化是动态甚至是可逆的过程。肝星状细胞激活后将伴随信号级联诱导的一系列复杂事件发生, 这些信号调

控通路包括TGF- β /Smad信号转导通路、增殖信号 (PDGF-PDGFR、PDGF-FAK-PI3K-Akt-p70^{S6K}、PPAR- γ) 通路、MAPK信号转导通路及NF- κ B信号转导通路等, 其中TGF- β /Smad信号转导通路是研究最多且最经典的。近年来, 国内外研究均提示热休克蛋白47 (heat shock protein 47, HSP47) 水平在肝纤维化模型和临床肝纤维化患者中升高, 且与转化生长因子- β 1 (transforming growth factor - β 1, TGF- β 1) 信号转导通路具有相关性。HSP47是20世纪80年代末首先在鸡胚成纤维细胞中发现的一种47 kDa的胶原结合热休克蛋白^[1], 属于serpin超

家族,是位于人类染色体11q13.5的CBP2基因的产物,其功能区由单个基因编码^[2]。HSP47是一种特异的内质网分子伴侣,在前胶原的合成中发挥重要作用,miRNA和内质网中的蛋白-蛋白相互作用均可能通过HSP47调控肝纤维化的发生。因此,针对HSP47在肝纤维化发生中的作用机制值得进一步探索。

1 HSP47 在肝纤维化中的作用

越来越多的研究表明HSP47与肝纤维化的发生有关,前胶原蛋白需要免疫球蛋白结合蛋白(binding immunoglobulin protein, BiP)、78-kDa葡萄糖调节蛋白(78 kDa glucose-regulated protein, Grp78)、94-kDa葡萄糖调节蛋白(94 kDa glucose-regulated protein, Grp94)、蛋白二硫异构酶和HSP47作为分子伴侣参与形成三聚体并在内质网中正确折叠^[3],HSP47可特异性与胶原结合^[4]。Kawada等^[5]首先发现,在大鼠肝纤维化造模进程中HSP47、I型胶原和III型胶原均被显著诱导,这种现象也在通过CCl₄和双导管结扎造模的小鼠肝脏中出现。人III型前胶原的三螺旋区(1029个氨基酸残基)含有29个可能的HSP47结合位点^[3]。有研究表明,在肝小叶中心区域或门脉周围,HSP47阳性细胞数目显著增加^[5],这些细胞被鉴定为肝星状细胞^[6],Kawasaki等^[7]从HSP47 Floxed(条件性基因敲除小鼠称为Flox小鼠,其含有可被Cre识别的loxP序列)小鼠分离出肝星状细胞,通过感染腺病毒Cre(Cre重组酶是细菌噬菌体P1的I型拓扑异构酶,催化loxP位点间的DNA进行位点特异性重组)下调HSP47基因的表达,结果表明在缺乏HSP47时,I型胶原无法转变为成熟形式,因此无法在细胞外基质沉积。此外,HSP47敲除的肝星状细胞中,I型前胶原的积累可诱导内质网的应激反应,抑制自噬导致的活化肝星状细胞的凋亡^[3]。上述研究提示HSP47是由肝星状细胞分泌的一种常驻内质网分子伴侣,对于内质网中前胶原蛋白的正确折叠和分泌至关重要。

Li等^[8]对人肝脏标本研究发现,HSP47和TGF- β 1在慢性血吸虫病和慢性乙型肝炎患者中的表达高于健康人群,HSP47 mRNA表达水平与纤维化分期相关,TGF- β 1 mRNA表达水平与炎症程度相关,这与Brown等^[9]研究结论一致,即HSP47转录水平在纤维形成活跃期升高,在肝硬化形成时下降。上述研究结果也在Huang等^[10]研究中得到验证,其研究表明日本血吸虫引起的肝纤维化患者中HSP47表达显著增加且与肝纤维化程度呈正比,TGF- β 1表达和HSP47相似,其还通过HSP47-shRNA处理

日本血吸虫感染的小鼠,发现胶原沉积和TGF- β 1水平均显著降低。5年后,周永华等^[11]发现在日本血吸虫诱导的小鼠肝纤维化模型中,随着肝纤维化的进展,TGF- β 1、HSP47和COL1A1 mRNA的表达均逐渐升高,且HSP47表达上调与胶原沉积增加有关。这在Rizk等^[12]研究中进一步得到证实,该研究的硫代乙酰胺造模组中,HSP47与平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α -SMA)阳性肝星状细胞百分比呈正相关,且双免疫染色大鼠的 α -SMA和HSP47阳性细胞在同一部位,HSP47和TGF- β 1表达的变化与肝硬化分期相关。Ito等^[13]研究也观察到类似结果,该研究表明HSP47的serpin环(Serpin H1)有助于其与胶原的结合,通过短发夹RNA或siRNA敲除HSP47可抑制胶原蛋白的正确折叠和积累,从而抑制肝纤维化进展。

总之,无论是在小鼠肝纤维化模型还是肝纤维化患者中,HSP47增加与纤维化程度呈正相关,就目前研究而言,HSP47和肝纤维化的发生最有可能与TGF- β 1信号转导通路有关。

2 HSP47 在肝纤维化中的机制

2.1 HSP47与TGF- β 1信号转导通路 目前关于HSP47和肝纤维化发生的分子通路研究主要集中在TGF- β 1信号转导通路,TGF- β 1在1983年首次被发现并被认为是调控肝纤维化的主要细胞因子^[14]。TGF- β 家族(包括TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3)可在多种纤维化疾病中被诱导和激活^[15],TGF- β 信号转导通路在肝星状细胞的激活中发挥重要作用,其对下游细胞内Smad蛋白的级联刺激发挥作用,肝纤维化发生时,Smad2、Smad3和Smad4促进纤维化,而Smad7发挥保护作用^[16];Smad也可充当信号集成分子与其他信号转导通路相互作用,如MAPK和NF- κ B信号转导通路^[17,18]。

HSP47和TGF- β 1在多种组织和器官的纤维化发展中发挥关键作用。大量免疫细胞因子和HSP47共同参与纤维生成,研究表明TGF- β 1、白细胞介素1(interleukin-1, IL-1)和白细胞介素17(interleukin-17, IL-17)等炎症因子可在纤维细胞中促进HSP47的表达^[19];HSP47、TGF- β 1、I型胶原和III型胶原的表达在瘢痕性皮肤病患者纤维化皮肤组织中上调^[20],在结膜成纤维细胞中也观察到了类似结果^[21];在人类胚胎肺成纤维细胞中,TGF- β 和IL-1 β 可诱导HSP47的合成^[22];在鼻成纤维细胞中,TGF- β 1对HSP47的诱导呈剂量依赖性^[23];TGF- β 1在体外可增强HSP47 mRNA和蛋白质在人类II型肺泡上皮细胞A549中的表达^[24],在人类肺成纤维细胞中

也发现了类似现象^[22]；在肾纤维化中，TGF- β 1可促进人近端小管上皮细胞HSP47的表达^[25]。但也有研究与上述结果相反，如Brown等^[9]发现在人肝星状细胞中TGF- β 1未显示出对HSP47表达的调控作用，与Kawada等^[5]对鼠肝星状细胞的研究结果一致。

目前对HSP47和TGF- β 1信号转导通路在肝纤维化中的具体机制研究较少，Nakai等^[26]研究表明TGF- β 在成纤维细胞系中可调节HSP47的产生。TGF- β 可呈剂量依赖性促进小鼠成骨细胞MC3T3-E1 I型胶原蛋白和HSP47 mRNA的表达；瞬时转染实验表明，TGF- β 1可使HSP47基因上游约5.5 kb区域的启动子活性增加4~6倍，-3.9~2.7 kb和-280~50 bp两个上游区域均被证明参与了TGF- β 1的激活^[27]。对禽类肌腱细胞的研究表明，TGF- β 1是前胶原和HSP47基因的主要调控因子，TGF- β 1延迟热休克后HSP47 mRNA的降解可能是通过对HSP47基因的转录后调控实现的^[28]。机械压力可增加HSP47 mRNA的表达和HSP47蛋白的合成。热休克、机械应激和TGF- β 1诱导HSP47蛋白表达可能是通过热休克转录因子1 (heat shock transcription factor 1, HSF1) 的激活和核转位实现的^[28]。Sasaki等^[19]第1次使用人类胚胎肺成纤维细胞确认HSP47表达的增强是通过TGF- β 和IL-1 β 调控的，其发现TGF- β 和IL-1 β 可诱导HSP47的合成并增强热休克元件 (heat shock element, HSE) 与HSF1的结合，TGF- β 和IL-1 β 诱导HSF1三聚体形成，进而促进HSF1与HSP47的HSE结合，导致HSP47表达增强，5.0 μ g/L TGF- β 和IL-1 β 可同等程度且最大强度增强人类胚胎肺成纤维细胞中HSP47的表达，该浓度与组织纤维化患者的HSP47水平非常接近，如肝硬化患者血浆TGF- β 蛋白浓度为(3.7 \pm 2.1) μ g/L^[29]；同时，其还通过交联实验观察了HSF1与TGF- β 信号传导主要介质Smad3、Smad4、TAK1的相互作用，但这些介质均未显示与HSF1有相互作用，故TGF- β 介导的HSF1三聚体形成机制有待进一步阐明。对鼻成纤维细胞的研究表明，通过siRNA敲除HSP47可抑制TGF- β 1诱导的HSP47、 α -SMA及细胞外基质的产生，3 μ mol/L的Smad3特异性抑制剂对Smad2/3磷酸化的抑制可显著下调TGF- β 1介导的HSP47、 α -SMA、纤连蛋白及I型胶原的产生，提示HSP47通过Smad2/3信号转导通路调控TGF- β 1介导的鼻成纤维细胞分化和细胞外基质的产生；siRNA敲除HSP47并未抑制Smad2/3的磷酸化，Smad3特异性抑制剂对Smad2/3磷酸化的抑制降低了HSP47在TGF- β 1介导的鼻成纤维细胞中的表达，故表明HSP47对于细胞外基质的

调控点可能位于TGF- β 1/Smad2/3信号转导通路的下游^[23]。Xiao等^[25]研究表明，在人近端小管上皮细胞中，细胞外通路调控激酶和c-Jun N-端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号转导通路 (二者均属于MAPK家族，在调节应激反应和热休克蛋白表达中具有重要作用) 可调控TGF- β 1介导的HSP47表达。MAPK和NF- κ B信号转导通路均为TGF- β 1/Smad信号转导通路的主要交联通路，MAPK信号转导通路已被证明参与肝星状细胞的增殖，并可能导致成纤维细胞的扩增，促进成纤维反应，MAPK通路包含c-JNK、ERKs和p38激酶，JNK已被证明在肝星状细胞内正向调节细胞增殖，TGF- β 1/Smad7和NF- κ B信号转导通路间的交联在肝脏炎症的发展中发挥重要作用，Smad7缺失可增强NF- κ B介导的炎症反应^[30,31]。

以上研究提示：①TGF- β 1可能通过HSP47基因上游区域调控其表达；②TGF- β 1诱导HSP47蛋白表达可能是通过HSF1的激活和核转位实现的，TGF- β 1和IL-1 β 可诱导HSF1三聚体形成，HSF1与HSP47的HSE结合导致HSP47表达增强；③HSP47可能通过Smad2/3信号转导通路调控TGF- β 1介导的纤维细胞分化和细胞外基质产生，HSP47对于细胞外基质的调控点可能位于TGF- β 1/Smad2/3信号转导通路的下游；④TGF- β 1可能通过MAPK家族调控HSP47的表达。HSP47与TGF- β 1信号转导通路在肝纤维化中的作用机制及与其他信号转导通路的交联具有较高的研究价值。

2.2 肝纤维化中miRNA与HSP47的调控 miRNA是由22~25个碱基构成的小的非编码RNA，可作为转录后调节因子与3'-非翻译区的靶mRNA结合，抑制mRNA的翻译或促进靶基因mRNA的降解^[32]。miRNA可影响肝星状细胞的激活和转化^[33]，在静止和活化的肝星状细胞中共发现33种miRNA参与调控，包括12种促纤维化miRNA和21种抗纤维化miRNA^[34]。在肝纤维化过程中，miRNA受TGF- β 1信号转导通路调控，且HSP47 mRNA在3'-非翻译区 (untranslated regions, UTR) 有miRNA的结合位点^[35]，因此miRNA可能通过HSP47/TGF- β 1信号转导通路调控肝纤维化的发生。故可重点关注与HSP47和TGF- β 1信号转导通路相关的miRNA，在肝纤维化中，miR-146a、miR-454、miR200a、miR-19b、miR-144、miR-29、miR-455-3与TGF- β 1信号转导通路呈负相关；miR-17-5p、miR-199a、miR-33a、miR-21、miR-214-5p与TGF- β 1信号转导通路呈正相关，见表1。

表1 与 HSP47 或 TGF- β 1 信号转导通路相关的 miRNA

名称	作用靶点	纤维化	名称	作用靶点	纤维化
miR-17-5p	Smad7	促进 ^[36]	miR-146a	Smad4	抑制 ^[37]
miR-199a	Smad3	促进 ^[38]	miR-19b	TGF- β 1	抑制 ^[39,40]
miR-33a	Smad7	促进 ^[41]	miR-29	HSP47	抑制 ^[42]
miR-21	Smad7	促进 ^[43]	miR-29b	HSP47	抑制 ^[44]
miR-214-5p	TGF- β 1	促进 ^[45]	miR-144	TGF- β 1	抑制 ^[46]
miR-200a	Smad3/TGF- β 2	抑制 ^[47]	miR-455-3p	HSF1/HSP47/Smad4	抑制 ^[48]
miR-454	Smad4	抑制 ^[49]			

miRNA介导基因调控的显著特点是单个miRNA可同时调控数百个基因^[50],这一特性使其能够协调复杂的基因表达程序。miR-29是在肝纤维化过程中被研究最多的miRNA之一,在小鼠和人肝纤维化中,miR-29显著下调^[51]。目前,在肝纤维化中miRNA和HSP47相关研究主要集中在miR-29b和miR-455-3p,Zhang等^[47]检测了HSP47和miR-29b在CCl₄诱导的肝纤维化小鼠模型中的表达水平,小鼠腹腔注射CCl₄ 6周后,肝组织HSP47 mRNA和蛋白水平均显著上调,miR-29b表达显著下降,在原代培养的大鼠造血干细胞中也观察到类似结果。此外,用miR-29b转染2型肝星状细胞后,在mRNA和蛋白水平上显著抑制了HSP47的表达,TGF- β 1可促进2型肝星状细胞中HSP47 mRNA和蛋白表达水平升高,并伴随miR-29b表达水平下降,以上研究表明在肝纤维化组织和活化的肝星状细胞中,miR-29b与HSP47基因表达呈负相关。此外,TGF- β 1信号转导通路可能参与了肝星状细胞激活过程中HSP47和miR-29b的表达调控,其还通过荧光素酶证实miR-29b通过靶向HSP47 mRNA 3'-UTR上的推测结合序列下调HSP47的表达^[44]。Wei等^[48]研究表明,miR-455-3p在体外活化的肝星状细胞和不同肝纤维化模型小鼠体内均下调,包括CCl₄、胆管结扎(bile duct ligation, BDL)和高脂饮食(high-fat diet, HFD)诱导的肝纤维化,miR-455-3p可能在肝纤维化的发生中起抑制作用,与对照组相比,过表达miR-455-3p可降低CCl₄、BDL和HFD处理小鼠经ago-miR-455-3p处理后肝脏HSF1、HSP47、TGF- β 1和Smad4的表达水平,提示miR-455-3p可通过HSP47/TGF- β 1/Smad4信号转导通路靶向HSF1缓解肝纤维化。此外,荧光素酶实验证实miR-455-3p通过与HSF1 mRNA的3'-UTR直接结合来调控HSF1的表达。上述研究提示miRNA可能主要作用于HSP47 mRNA或HSF1 mRNA 3'-UTR的结合序列并通过TGF- β 1信号转导通路对调控HSP47的表达,进

而影响肝纤维化形成。

2.3 肝纤维化中HSP47蛋白的作用 蛋白稳态受热休克和内质网等各种细胞压力的影响,这些压力可诱导细胞保护反应,包括在细胞质中的热休克反应(heat shock response, HSR)和在内质网中的未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),由分子伴侣、运输机械介质和泛素-蛋白酶体来维持平衡^[4]。分子伴侣通过参与蛋白-蛋白的相互作用在蛋白质平衡中发挥关键作用,HSP47作为内质网中胶原合成的分子伴侣,被认为主要是与内质网中的三螺旋胶原蛋白中的精氨酸位点结合;此外,HSP47还可与精氨酸缺失的胶原蛋白结合,表明HSP47在三螺旋状胶原蛋白上可能有多个结合位点^[1],与HSP47相互作用的蛋白包括肌醇酶1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α),65-kDa FK506结合蛋白(a 65-kDa FK506-binding protein, FKBP65),高尔基组织蛋白1(Golgi tissue protein1, TANGO1)和Col003等。

IRE1 α 是一种I型内质网跨膜蛋白,具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶和核糖核酸内切酶活性,是最保守的UPR传感器,BiP与IRE1 α 内质网腔内部位结合维持其单体抑制状态,在内质网应激下,BiP优先与不正确折叠的蛋白结合,引起IRE1 α 蛋白的二聚和自体磷酸化,以激活其核糖核酸酶结构域^[1,52],IRE1 α 通过Xbp1 mRNA剪接和Xbp1以外的内切核糖核酸酶激活,即调控IRE1依赖衰减(regulated IRE1-dependent decay, RIDD)参与UPR信号转导通路,调控内质网应激下的细胞存活。此外,一些适配器蛋白质可结合IRE1 α 并介导与其他路径(包括c-JNK和NF- κ B信号转导通路)的相互作用^[53,54]。有两种类型的信号可引起IRE1 α 反应:①异常错误折叠的蛋白通过与BiP的结合解除了传感器的抑制;②正常折叠的胶原蛋白/HSP47复合物的增加^[55]。细胞和生物化学分析表明,HSP47通过物理作用诱导IRE1 α 信号,HSP47在体外以高亲和力直接结合

IRE1 α 的内质网腔结构域,取代复合物中的负调节因子BiP,促进IRE1 α 寡聚^[56],提示HSP47可作为新的作用分子调控IRE1 α 信号,HSP47可能通过与IRE1 α 的相互作用参与其他相关信号转导通路的调控。

FKBP65是一种由*Fkbp10*基因编码的65-kDa FK506结合蛋白,是一种常驻内质网的肽基脯氨酰异构酶,能与赖氨酰基羟化酶2 (lysyl hydroxylase 2, LH2) 形成复合物。FKBP65通过特异性介导LH2二聚参与胶原交联,这对细胞外基质的稳定性非常重要。Dichiara等^[57]证实HSP47和FKBP65均与I型胶原蛋白稳态网相关。HSP47和FKBP65在I型前胶原翻译后成熟过程中发挥协同作用,HSP47和FKBP65相互作用的位点非常接近,尽管FKBP65作为分子伴侣能够识别三螺旋胶原蛋白,结合亲和力的差异使得FKBP65优先与HSP47结合,而非I型胶原^[58,59]。Duran等^[60]发现了一种内质网伴侣复合物,包括HSP47、FKBP65和调节LH2活性的BiP,FKBP65和HSP47可促进或抑制LH2活性,BiP在促进复合物的形成方面发挥作用,这个新发现的内质网伴侣复合物有助于阐明LH2如何调节I型胶原C-末端肽的赖氨酰羟化,从而影响结缔组织的质量。总之,FKBP65和HSP47在前胶原成熟过程中共同作用,有助于I型前胶原的分子稳定性和翻译后修饰。

TANGO1已被鉴定为大蛋白的载物受体,其能够进入直径60~90 nm外壳蛋白复合物II (coat protein complex II, COP-II) 包膜小泡,运输到高尔基体^[1],是xbp1的直接靶基因^[61],缺乏Mia3/TANGO1可影响小鼠软骨细胞、成纤维细胞、内皮细胞和壁细胞分泌胶原的能力^[62]。TANGO1和cTAGE5 (一种协同受体蛋白) 形成的复合物通过与Sec12、Sec16相互作用 (COP-II起始因子),严格调控Sar1 GTPase周期,完成大分子分泌^[63],然后,TANGO1与HSP47一起依赖外壳蛋白复合物I (coat protein complex I, COP I) 再循环^[64]。TANGO1的Src同源性3 (SH3) 结构域位于内质网内部,可识别VII型胶原^[61],SH3结构域是一种小的蛋白模块,介导与细胞增殖、迁移和细胞骨架修饰相关的蛋白-蛋白相互作用,但其如何识别不同类型胶原目前尚未明确。最近,胶原特异性分子伴侣HSP47被鉴定为通过与TANGO1的SH3结构域相互作用引导胶原进入特殊囊泡的候选引导分子,HSP47可作为TANGO1和胶原蛋白SH3结构域间的锚定分子^[65]。此外,TANGO1可通过HSP47识别多种原胶原分

子,这一发现可能解决了关于TANGO1如何识别不同类型胶原的重要问题,Ishikawa等^[58]研究表明HSP47对FKBP65的亲和力弱于TANGO1SH3结构域,因此FKBP65在内质网出口位点被TANGO1的SH3结构域所取代,但TANGO1在I型胶原分泌中的生理作用尚存在争议,在TANGO1敲除细胞中,I型胶原分泌受到影响,但在敲减的细胞中无类似表现^[61,66,67],HSP47、前胶原和TANGO1在内质网出口位点的捕获和释放机制仍需进一步研究。

Col003即5-苄基-3-硝基水杨醛,是胶原蛋白-HSP47相互作用的小分子抑制剂,是通过表面等离子体共振分析筛选化学文库发现的。Ito等^[13]利用重组鸡HSP47进行体外实验证实了Col003可直接与HSP47结合,竞争性抑制HSP47与胶原的相互作用,磁共振分析显示Col003结合位点主要位于胶原结合界面内,是HSP47与胶原相互作用的竞争性抑制剂。Col003抑制了胶原蛋白与小鼠HSP47的相互作用,其序列与人HSP47序列有96%相同,因此,Col003可抑制人HSP47与前胶原的相互作用^[68]。Yoshida等^[69]成功合成了Col003类似物,并用表面等离子体共振分析评价了其抑制活性,结果表明两种有效的抑制因子在1.9 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时对胶原-HSP47相互作用的抑制率分别为85%和81%。以上研究表明,HSP47作用蛋白(包括内源性和外源性)均是通过与HSP47相互作用影响胶原的合成过程。

3 展望

肝纤维化是胶原和非胶原在肝脏的异常累积引起的,目前针对肝纤维化尚无特效治疗方法,阻止胶原的合成可为治疗提供新方向。HSP47水平在肝纤维化中升高,且与纤维化程度呈正比,可能主要通过TGF- β 1信号转导通路实现调控,miRNA也直接或间接通过TGF- β 1信号转导通路参与肝纤维化形成。此外,HSP47还通过与内质网中蛋白质间相互作用实现对胶原合成过程的调控,但关于HSP47在肝纤维化发生机制方面的研究尚不深入,HSP47和TGF- β 1信号转导通路的具体作用靶点、HSP47参与胶原合成的准确调控过程以及是否存在和其他通路的相互作用仍需进一步研究。

参考文献

- [1] ITO S, NAGATA K. Roles of the endoplasmic reticulum-resident, collagen-specific molecular chaperone Hsp47 in vertebrate cells and human disease[J]. J Biol Chem, 2019, 294(6): 2133-2141.
- [2] NAGAI N, TETUYA Y, HOSOKAWA N, et al. The human genome has only one functional hsp47 gene (CBP2) and a pseudogene (pshp47)[J]. Gene, 1999, 227(2): 241-248.

- [3] MORIMOTO R I. The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol,2011,76:91-99.
- [4] ITO S, NAGATA K. Biology of Hsp47 (Serpin H1), a collagen-specific molecular chaperone[J]. Semin Cell Dev Biol,2017,62:142-151.
- [5] KAWADA N, KUROKI T, KOBAYASHI K, et al. Expression of heat-shock protein 47 in mouse liver[J]. Cell Tissue Res,1996,284(2):341-346.
- [6] NAGATA K. HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development[J]. Semin Cell Dev Biol,2003,14(5):275-282.
- [7] KAWASAKI K, USHIODA R, ITO S, et al., Deletion of the collagen-specific molecular chaperone Hsp47 causes endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of hepatic stellate cells[J]. J Biol Chem,2015,290(6):3639-3646.
- [8] LI L, WU T, HUANG J, et al. Expression of heat shock protein 47, transforming growth factor-beta 1, and connective tissue growth factor in liver tissue of patients with Schistosoma japonicum-induced hepatic fibrosis[J]. Parasitology,2015,142(2):341-351.
- [9] BROWN K E, BROADHURST K A, MATHAHS M M, et al., Expression of HSP47, a collagen-specific chaperone, in normal and diseased human liver[J]. Lab Invest,2005,85(6):789-797.
- [10] HUANG J Q, TAO R, LI L, et al. Involvement of heat shock protein 47 in Schistosoma japonicum-induced hepatic fibrosis in mice[J]. Int J Parasitol,2014,44(1):23-35.
- [11] 周永华, 徐辰, 杨莹莹, 等. 日本血吸虫诱导小鼠肝纤维化进程中TGF- β 1和HSP47的作用机制研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2019,31(4):382-387,433.
- [12] RIZK F H, SARHAN N I, SOLIMAN N A, et al. Heat shock protein 47 as indispensable participant in liver fibrosis: possible protective effect of lactoferrin[J]. IUBMB Life,2018,70(8):795-805.
- [13] ITO S, SAITO M, YOSHIDA M, et al. A BRET-based assay reveals collagen-Hsp47 interaction dynamics in the endoplasmic reticulum and small-molecule inhibition of this interaction[J]. J Biol Chem,2019,294(44):15962-15972.
- [14] DRABSCH Y, Ten DIJKE P. TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev,2012,31(3-4):553-568.
- [15] GOVINDEN R, BHOOLA K D. Bhoola, Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta[J]. Pharmacol Ther,2003,98(2):257-265.
- [16] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF-beta/SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. J Histochem Cytochem,2016,64(3):157-167.
- [17] SENGUPTA U, UKIL S, DIMITROVA N, et al., Expression-based network biology identifies alteration in key regulatory pathways of type 2 diabetes and associated risk/complications[J]. PLoS One,2009,4(12):e8100.
- [18] DERYNCK R, ZHANG Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling[J]. Nature,2003,425(6958):577-584.
- [19] SASAKI H, SATO T, YAMAUCHI N, et al., Induction of heat shock protein 47 synthesis by TGF-beta and IL-1 beta via enhancement of the heat shock element binding activity of heat shock transcription factor 1[J]. J Immunol,2002,168(10):5178-5183.
- [20] RAZZAQUE M S, AHMED A R. Collagens, collagen-binding heat shock protein 47 and transforming growth factor-beta 1 are induced in cicatricial pemphigoid: possible role(s) in dermal fibrosis[J]. Cytokine,2002,17(6):311-316.
- [21] RAZZAQUE M S, FOSTER C S, AHMED A R. Tissue and molecular events in human conjunctival scarring in ocular cicatricial pemphigoid[J]. Histol Histopathol,2001,16(4):1203-1212.
- [22] NAKAYAMA S, MUKAE H, SAKAMOTO N, et al. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts[J]. Life Sci,2008,82(3-4):210-217.
- [23] KIM H J, PARK J H, SHIN J M, et al. TGF- β 1-induced HSP47 regulates extracellular matrix accumulation via Smad2/3 signaling pathways in nasal fibroblasts[J]. Sci Rep,2019,9(1):15563.
- [24] HISATOMI K, MUKAE H, SAKAMOTO N, et al., Pirfenidone inhibits TGF- β 1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells[J]. BMC Pulm Med,2012,12:24.
- [25] XIAO H B, LIU R H, LING G H, et al. HSP47 regulates ECM accumulation in renal proximal tubular cells induced by TGF- β 1 through ERK1/2 and JNK MAPK pathways[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2012,303(5):F757-F765.
- [26] NAKAI A, SATOH M, HIRAYOSHI K, et al. Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum[J]. J Cell Biol,1992,117(4):903-914.
- [27] YAMAMURA I, HIRATA H, HOSOKAWA N, et al. Transcriptional activation of the mouse HSP47 gene in mouse osteoblast MC3T3-E1 cells by TGF- β 1[J]. Biochem Biophys Res Commun,1998,244(1):68-74.
- [28] PAN H, HALPER J. Regulation of heat shock protein 47 and type I procollagen expression in avian tendon cells[J]. Cell Tissue Res,2003,311(3):373-382.
- [29] SHIRAI Y, KAWATA S, TAMURA S, et al. Plasma transforming growth factor- β 1 in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Cancer,1994,73(9):2275-2279.
- [30] TSUKADA S, PARSONS C J, RIPPE R A. Rippe, mechanisms of liver fibrosis[J]. Clin Chim Acta,2006,364(1-2):33-60.
- [31] NG Y Y, HOU C C, WANG W, et al. Blockade of NF- κ B activation and renal inflammation by ultrasound-mediated gene transfer of Smad7 in rat remnant kidney[J]. Kidney Int Suppl,2005(94):S83-S91.
- [32] HA M, KIM V N. Regulation of microRNA biogenesis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2014,15(8):509-524.
- [33] ZHOU L, LIU S, HAN M, et al. miR-185 inhibits fibrogenic activation of hepatic stellate cells and prevents liver fibrosis[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2018,10:91-102.
- [34] KITANO, M, BLOOMSTON P M. Bloomston, hepatic stellate cells and microRNAs in pathogenesis of liver fibrosis[J]. J Clin Med,2016,5(3):38.
- [35] ZHU J, XIONG G, FU H, et al. Chaperone Hsp47 drives malignant growth and invasion by modulating an ECM gene network[J]. Cancer Res,2015,75(8):1580-1591.
- [36] YU F, GUO Y, CHEN B, et al., MicroRNA-17-5p activates hepatic stellate cells through targeting of Smad7[J]. Lab Invest,2015,95(7):781-789.
- [37] 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(10):1923-1930.
- [38] MURAKAMI Y, TOYODA H, TANAKA M, et al. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families[J]. PLoS One,2011,6(1):e16081.

- [39] LAKNER A M, STEUERWALD N M, WALLING T L, et al. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis[J]. *Hepatology*,2012,56(1):300-310.
- [40] GE S, XIE J, LIU F, et al. MicroRNA-19b reduces hepatic stellate cell proliferation by targeting GRB2 in hepatic fibrosis models in vivo and in vitro as part of the inhibitory effect of estradiol[J]. *J Cell Biochem*,2015,116(11):2455-2464.
- [41] HUANG C F, SUN C C, ZHAO F, et al. miR-33a levels in hepatic and serum after chronic HBV-induced fibrosis[J]. *J Gastroenterol*, 2015,50(4):480-490.
- [42] KWIECINSKI M, NOETEL A, ELFIMOVA N, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction[J]. *PLoS One*,2011,6(9):e24568.
- [43] MARQUEZ R T, BANDYOPADHYAY S, WENDLANDT E B, et al. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans[J]. *Lab Invest*,2010,90(12):1727-1736.
- [44] ZHANG Y, GHAZWANI M, LI J, et al. MiR-29b inhibits collagen maturation in hepatic stellate cells through down-regulating the expression of HSP47 and lysyl oxidase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2014,446(4):940-944.
- [45] IIZUKA M, OGAWA T, ENOMOTO M, et al. Induction of microRNA-214-5p in human and rodent liver fibrosis[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*,2012,5(1):12.
- [46] LIU Z, YI J, YE R, et al. miR-144 regulates transforming growth factor- β 1 induced hepatic stellate cell activation in human fibrotic liver[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(4):3994-4000.
- [47] WANG B, KOH P, WINBANKS C, et al., miR-200a prevents renal fibrogenesis through repression of TGF- β 2 expression[J]. *Diabetes*,2011,60(1):280-287.
- [48] WEI S, WANG Q, ZHOU H, et al. miR-455-3p alleviates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by suppressing HSF1 expression[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*,2019,16:758-769.
- [49] ZHU D, HE X, DUAN Y, et al. Expression of microRNA-454 in TGF- β 1-stimulated hepatic stellate cells and in mouse livers infected with *Schistosoma japonicum*[J]. *Parasit Vectors*,2014,7:148.
- [50] SATOH J, TABUNOKI H. Comprehensive analysis of human microRNA target networks[J]. *BioData Min*,2011,4:17.
- [51] RODERBURG C, URBAN G W, BETTERMANN K, et al. MicroRNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis[J]. *Hepatology*,2011,53(1):209-218.
- [52] GONG J, WANG X Z, WANG T, et al. Molecular signal networks and regulating mechanisms of the unfolded protein response[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*,2017,18(1):1-14.
- [53] URANO F, WANG X, BERTOLOTI A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1[J]. *Science*,2000,287(5453):664-666.
- [54] HU P, HAN Z, COUVILLON A D, et al., Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression[J]. *Mol Cell Biol*,2006,26(8):3071-3084.
- [55] ROJAS-RIVERA D, RODRIGUEZ D A, SEPULVEDA D, et al. ER stress sensing mechanism: putting off the brake on UPR transducers[J]. *Oncotarget*,2018,9(28):19461-19462.
- [56] SEPULVEDA D, ROJAS-RIVERA D, RODRÍGUEZ D A, et al. Interactome screening identifies the ER luminal chaperone Hsp47 as a regulator of the unfolded protein response transducer IRE1 α [J]. *Mol Cell*,2018,69(2):238-252.
- [57] DICHIARA A S, TAYLOR R J, WONG M Y, et al. Mapping and exploring the collagen- I proteostasis network[J]. *ACS Chem Biol*,2016,11(5):1408-1421.
- [58] ISHIKAWA Y, HOLDEN P, BÄCHINGER H P. Heat shock protein 47 and 65-kDa FK506-binding protein weakly but synergistically interact during collagen folding in the endoplasmic reticulum[J]. *J Biol Chem*,2017,292(42):17216-17224.
- [59] DURAN I, NEVAREZ L, SARUKHANOV A, et al. HSP47 and FKBP65 cooperate in the synthesis of type I procollagen[J]. *Hum Mol Genet*,2015,24(7):1918-1928.
- [60] DURAN I, MARTIN J H, WEIS M A, et al. A chaperone complex formed by HSP47, FKBP65, and BiP modulates telopeptide lysyl hydroxylation of type I procollagen[J]. *J Bone Miner Res*,2017,32(6):1309-1319.
- [61] SAITO K, CHEN M, BARD F, et al. TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites[J]. *Cell*,2009,136(5):891-902.
- [62] WILSON D G, PHAMLUONG K, LI L, et al. Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse[J]. *J Cell Biol*,2011,193(5):935-951.
- [63] SAITO K, MAEDA M, KATADA T. Regulation of the Sar1 GTPase Cycle is necessary for large cargo secretion from the endoplasmic reticulum[J]. *Front Cell Dev Biol*,2017,5:75.
- [64] YUAN L, KENNY S J, HEMMATI J, et al. TANGO1 and SEC12 are copackaged with procollagen I to facilitate the generation of large COP II carriers[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2018,115(52):E12255-E12264.
- [65] ISHIKAWA Y, ITO S, NAGATA K, et al. Intracellular mechanisms of molecular recognition and sorting for transport of large extracellular matrix molecules[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016,113(41):E6036-E6044.
- [66] NOGUEIRA C, ERLMANN P, VILLENEUVE J, et al., SLY1 and Syntaxin 18 specify a distinct pathway for procollagen VII export from the endoplasmic reticulum[J]. *Elife*,2014,3:e02784.
- [67] SAITO K, YAMASHIRO K, ICHIKAWA Y, et al. cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites[J]. *Mol Biol Cell*,2011,22(13):2301-2308.
- [68] ITO S, OGAWA K, TAKEUCHI K, et al. A small-molecule compound inhibits a collagen-specific molecular chaperone and could represent a potential remedy for fibrosis[J]. *J Biol Chem*,2017,292(49):20076-20085.
- [69] YOSHIDA M, SAITO M, ITO S, et al. Structure-activity relationship study on Col-003, a protein-protein interaction inhibitor between collagen and Hsp47[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*,2020,68(3):220-226.

收稿日期: 2021-01-21

石榴, 韩铭, 袁晓雪, 等. 热休克蛋白47在肝纤维化中的研究进展[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2021,13(3):30-36.