

# Non-alcoholic steatohepatitis : second hit or strike out?

## Citation for published version (APA):

Wouters, K. A. M. (2008). *Non-alcoholic steatohepatitis : second hit or strike out?*. Maastricht University.

## Document status and date:

Published: 01/01/2008

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

In chapter 1, NASH was introduced as the hepatic consequence of the metabolic syndrome. It consists of the hepatic accumulation of lipids accompanied by an inflammatory response. As described in the two-hit hypothesis, NASH is thought to develop via a series of hits of which the first consists of the excessive accumulation of lipids in hepatocytes. This first hit sensitizes the liver for a second hit, which would subsequently lead to an inflammatory response in the liver. Once this inflammation is established, the disease readily progresses to more advanced stages, including fibrosis, cirrhosis, liver failure and possibly liver cancer. Although several processes have been identified to occur during the development of liver inflammation, the exact trigger(s) that induces liver inflammation and worsen disease outcome remains to be identified.

In this thesis, we used hyperlipidemic mouse models to investigate the early pathogenesis of NASH. The mouse models used are described in detail in chapter 2. These models are based on mutations in genes that have been found to be directly involved in hyperlipidemia and atherosclerosis risk, i.e. the low density lipoprotein receptor (LDLR) and apolipoprotein E (APOE). Chapter 2 compares the different models and their use in atherosclerosis research, as this is the field of research where they were mostly used up to date. It becomes clear that every model has its particular advantages and disadvantages and that the choice of model should depend of the type of information that is desired. For example, although the ApoE deficient mouse has been primarily used for atherosclerosis studies, the use of these mice is not suitable to test certain hypothesis. Because these mice do not respond to several lipid-lowering drugs, such as statins and fibrates, other mouse models should be preferably used.

Next, in chapter 3, we described how one of the described hyperlipidemic mouse models, i.e. the APOE2 knock-in mouse, develops NASH very rapidly when fed a diet enriched in triglycerides and cholesterol. By combining histological and biochemical approaches with large scale gene expression analysis, we revealed that inflammation was present much earlier than could be explained by the two-hit model. Macrophage infiltration and inflammatory gene expression was already present after only two days of high fat feeding, and it progressed at a higher rate than lipid accumulation. This suggested that inflammation plays a more important role in the early development of NASH than previously assumed. Furthermore, we showed that fenofibrate, a synthetic agonist of peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ), could inhibit NASH development when supplemented to the high fat diet.

To unravel the exact mechanisms how NASH was induced by diet and inhibited by fenofibrate supplementation, hepatic gene expression changes during progression and inhibition of NASH were studied in further detail in chapter 4. Using specialized software that clusters genes according to their occurrence in literature, we aimed to identify pathways that were essential in these processes. We found two major pathways to be of particular importance during the progression and inhibition of diet-induced NASH: i.e. cholesterol metabolism and inflammation. Changes in cholesterol metabolism were probably induced by negative feedback mechanisms induced by increased hepatic cholesterol content. Fenofibrate normalized cholesterol metabolism decreasing the hepatic content of cholesterol and its precursors. Surprisingly, fenofibrate inhibited inflammation probably by interfering with NF- $\kappa$ B, while up-regulating pathways around AP-1.

The link between cholesterol and inflammation was firmly established in chapter 5. We were able to show that dietary cholesterol directly leads to hepatic inflammation. In this chapter, we compared the response high fat, high cholesterol feeding in different mouse models. In addition to the previously used APOE2ki mice, we used *ldlr* deficient mice as a hypercholesterolemic model that originates from a different mutation. Surprisingly, we found that normolipidemic wild-type mice did not develop hepatic inflammation while they did develop steatosis. Contrary, both used female hyperlipidemic mouse models, i.e. APOE2ki mice and *ldlr* knock-out mice, developed steatosis accompanied with inflammation. Clearly, steatosis does not necessarily lead to hepatic inflammation. Furthermore, we established that in male mice, hepatic increases of inflammatory cells could be induced even without the presence steatosis, clearly dissociating the development of hepatic lipid accumulation from hepatic inflammation. In search of the causal factor of

the development of inflammation, we found that only diet-induced hypercholesterolemia correlated with the presence of inflammation. In addition, we found bloated 'foamy' Kupffer cells in these mice, filled with lipid droplets and cholesterol crystals. To test whether a causal relationship was present between the consumption of cholesterol and inflammation in the liver, we compared the response of the used mouse models to the same diet without cholesterol added. This resulted in a clear diminishing of plasma VLDL and LDL levels and a complete inhibition of hepatic inflammation and in the absence of bloated Kupffer cells. These important findings indicate that dietary cholesterol, possibly in the form of modified plasma lipoproteins, is an important risk factor to develop hepatic inflammation. Our results led to the hypothesis that hyperlipidemic mice display an increase of modified plasma lipoproteins upon high cholesterol feeding that leads to an increased clearance by Kupffer cells. Kupffer cells may get subsequently activated and initiate an inflammatory response.

Subsequently, in chapter 6, we investigated whether uptake of modified lipoproteins by Kupffer cells is indeed the mechanism by which inflammation is initialized in hyperlipidemic mice. Two scavenger receptors are known to be important for the majority of the uptake of modified lipoproteins by macrophages, i.e. SR-A and CD36. With the technique of bone marrow transplantation were created animals that lack these two scavenger receptors in their immune cells. This led to deficiency of both scavenger receptors in hepatic immune cells, i.e. Kupffer. When challenged with a high fat diet, we found a significant decrease, but no inhibition, in the development of inflammation in the animals with SR-1 and CD36 deficient Kupffer cells. Surprisingly, foam cell formation remained unaffected, indicating that this is not the mechanism by which inflammation was inhibited. These results indicate that these scavenger receptors play important roles during hepatic inflammation development, although the exact mechanism remains to be determined.

In chapter 7 we hypothesized that the presence of inflammation this early during NASH development may influence the further course of the disease. The mouse models previously used were compared with wild-type mice in terms of their response to long term high fat feeding. Interestingly, an inverse correlation was found between the presence of hepatic inflammation and the degree of liver lipid accumulation. To investigate whether increased inflammation was causal for the lower steatosis levels, we created animals with high hepatic inflammation. This was done with bone marrow transplantation of *ldlr*<sup>-/-</sup> mice with bone marrow of hyper-inflammatory TNF receptor non-sheddable mice, which display increased TNF signaling. These animals displayed a doubling of hepatic inflammation and a significant decrease in steatosis levels. Even without affecting hepatic inflammation directly, we observed an inhibition of steatosis in mice that were injected with antibodies neutralizing the anti-inflammatory cytokine IL10.

In the final chapter, the main results of this thesis are discussed and placed in the current state of the field. Moreover, future applications are discussed. In conclusion, this thesis shows that cholesterol is an important risk factor for the development of hepatic inflammation. Moreover, in contrast to the currently believed two-hit hypothesis, cholesterol was shown to directly lead to hepatic inflammation, disregarding the presence of a first hit, thereby serving as a direct "strikeout" of the liver.

## Samenvatting

In hoofdstuk 1 werd NASH voorgesteld als het gevolg in de lever van het metabool syndroom. Deze aandoening bestaat uit de opstapeling van vetten in levercellen gecombineerd met een ontstekingsreactie. Zoals is beschreven in de “twee-hit hypothese”, wordt er momenteel gedacht dat NASH ontstaat uit een opeenvolging van gebeurtenissen of ‘hits’. De eerste hit bestaat uit een overmatige opeenstapeling van vetten in de levercellen. Deze gebeurtenis maakt de lever gevoeliger voor verdere schade, oftewel een tweede hit die een ontsteking in de lever veroorzaakt. De aanwezigheid hiervan zorgt ervoor dat de aandoening verergert. Mogelijke gevolgen hiervan zijn: bindweefselvorming (fibrose), verstijving van de lever (cirrhose), leverfalen en zelfs leverkanker. Tot op heden zijn een aantal processen die deel uitmaken van de progressie naar ontsteking geïdentificeerd, maar de exacte oorzaken zijn tot nog toe onbekend.

In deze thesis zijn hyperlipidemische muizen gebruikt om de vroege gebeurtenissen te onderzoeken tijdens de ontwikkeling van NASH. De gebruikte muismodellen zijn in detail beschreven in hoofdstuk 2. Deze muismodellen zijn gebaseerd op mutaties in sleutelgenen die bekend staan omwille van hun rol in hyperlipidemie en het risico op de vorming van aderverkalking. Deze genen zijn de low density lipoproteïne receptor (LDLR) en apolipoproteïne E (APOE). Hoofdstuk 2 vergelijkt de bestaande modellen en hun gebruik in het hart- en vatenonderzoek, vermits dit het onderzoeksveld is waarin ze tot op heden het meest gebruikt worden. Elk muismodel heeft zo zijn voor- en nadelen en de keuze van het te gebruiken muismodel hangt af van het soort informatie dat gewenst is. Zo is bijvoorbeeld de ApoE deficiënte muis de het meest gebruikte model in het aderverkalkingsonderzoek, maar is het niet het geschikte model voor alle soorten hypothesen. Omdat deze muis geen respons vertoont als reactie op bepaalde vetverlagende geneesmiddelen, zoals statines en fibraten, worden beter andere muismodellen gebruikt om deze stoffen te onderzoeken.

Vervolgens, in hoofdstuk 3, wordt aangetoond dat een van de beschreven hyperlipidemische muismodellen, de APOE2 knock-in muis, zeer snel NASH ontwikkelt wanneer het wordt gevoed met een dieet met hoge hoeveelheden triglyceriden en cholesterol. Door histologische en biochemische technieken te combineren met genexpressie analyse hebben we ontdekt dat de ontstekingsreactie in de lever veel vroeger aanwezig is dan kan worden verklaard met het twee-hit model. Al na 2 dagen op het vetrijke dieet konden macrofaaginfiltatie en inflammatoire genexpressieveranderingen worden waargenomen die sneller optraden dan vetophoping. Deze resultaten suggeren dat ontsteking een belangrijkere speelt tijdens de ontwikkeling van de ziekte dan eerder gedacht. Daarenboven hebben we aangetoond dat het toedienen fenofibraat, een synthetische agonist van proliferater activator receptor alpha (PPAR $\alpha$ ), de ontwikkeling van NASH kan tegengaan.

Om vervolgens te onderzoeken via welke mechanismen NASH wordt geïnduceerd door dieet en gïnhibeert door fenofibraat, zijn de genexpressieveranderingen in meer detail bestudeerd in hoofdstuk 4. Met gespecialiseerde software die genen groepeerd volgens hun voorkomen in de literatuur, beoogden we om belangrijke pathways te identificeren. Twee pathways waren van specifiek belang tijdens de ontwikkeling en de inhibitie van NASH. Deze waren het cholesterol metabolisme en inflammatie of ontsteking. De geobserveerde veranderingen in het cholesterol metabolisme werden waarschijnlijk veroorzaakt door terugkoppelingsmechanismen als gevolg van een verhoogde hoeveelheid cholesterol in de lever. Deze verhoging werd genormaliseerd door het toedienen van fenofibraat. Het was verrassend om te vinden dat fenofibraat de ontsteking in de lever waarschijnlijk inhibeerde door te storen in de NF- $\kappa$ B signalisatie, terwijl de expressieniveaus van AP-1 en zijn doelwit genen werden verhoogd.

Deze opmerkelijke relatie tussen cholesterol en ontsteking werd duidelijk bevestigd in hoofdstuk 5. Hier konden we aantonen dat cholesterol uit het dieet rechtstreeks tot een ontstekingsreactie in de lever leidt. In dit hoofdstuk werden de eerder gebruikte APOE2ki muizen gebruikt samen met een ander bekend hyperlipidemisch muismodel, nl. de ldlr deficiënte (ldlr<sup>-/-</sup>) muis. Deze muizen vertonen, net als de APOE2ki muizen, meer vetten in het bloed veroorzaakt door een andere mutatie. Het was verrassend om vast te stellen dat normolipidemische wild-type muizen geen ontsteking vertoonden in hun levers terwijl er toch steatose optrad. De gebruikte hyperlipidemische muismodellen daarentegen vertoonden een hevige

ontstekingsreactie samen met de vetophoping. Deze vaststelling laat duidelijk zien dat steatose niet altijd hoeft te leiden tot ontsteking in de lever. Daarenboven hebben we aangetoond dat in mannelijke muizen er zelfs een ontstekingsreactie in de lever aanwezig kan zijn zonder vetopstapeling. Deze bevinding koppelt de twee processen duidelijk los van elkaar. Vervolgens gingen we op zoek naar de directe oorzaak van het ontstekingsproces in de lever. Het werd duidelijk dat er een relatie bestond tussen de verhoogde cholesterolwaarden in het bloed die door het dieet werden veroorzaakt, en de aanwezigheid van ontstekingscellen in de lever. Bovendien was het opgevallen dat in de lever van deze dieren gezwollen Kupffer cellen aanwezig waren gevuld met vetdruppels en cholesterolkristallen.

Om te zien of er een oorzakelijk verband bestond tussen cholesterol en ontsteking in de lever, hebben we de reactie onderzocht in deze muizen op hetzelfde vetrijke dieet maar dan zonder de toegevoegde cholesterol. Het weglaten van cholesterol uit het dieet resulteerde in een vermindering van “slechte cholesterol” in het bloed (VLDL en LDL) en dit inhibeerde volledig deze ontstekingsreactie in de lever. Deze belangrijke bevindingen geven aan dat cholesterol uit het dieet, mogelijk in de vorm van gemodificeerde plasma lipoproteïnen, een belangrijke risicofactor is voor het ontwikkelen van een ontsteking in de lever. Hieruit volgde de hypothese dat in de hyperlipidemische muizen een verhoging optreedt van gemodificeerde plasma lipoproteïnen als ze gevoed worden met een cholesterolrijk dieet. Dit zou kunnen leiden tot een verhoogde opname door Kupffer cellen, welke hierdoor geactiveerd worden en de ontstekingsreactie in gang zetten.

In het volgende hoofdstuk hebben we onderzocht of de opname van gemodificeerde lipoproteïnen door Kupffer cellen het mechanisme is waardoor een ontsteking op gang komt in de lever van hyperlipidemische muizen. Twee zogenaamde scavenger receptoren staan bekend om verantwoordelijk te zijn voor het grootste deel van de opname van gemodificeerde lipoproteïnen door macrofagen: SR-A en CD36. Met beenmergtransplantaties hebben we daarom muizen gecreëerd die deze twee scavenger receptoren niet hebben in hun immuuncellen, wat ook leidt tot de afwezigheid ervan in de immuuncellen van de lever: de Kupffer cellen. Deze dieren vertoonden een verlaging, maar geen volledige inhibitie, van de ontsteking in de lever wanneer een vetrijk dieet werd gegeven. Verrassend genoeg bleef de hoeveelheid gezwollen Kupffer cellen gelijk, wat erop duidt dat deze receptoren belangrijk zijn in de ontwikkeling van ontsteking in de lever, maar het exacte mechanisme blijft voorlopig onduidelijk.

Het feit dat ontsteking in de lever veel vroeger optreedt dan verwacht leidde toe de hypothese dat de aanwezigheid ervan een rol kan spelen tijdens de verdere ontwikkeling van NASH. Vandaar werden in hoofdstuk 7 de twee eerder gebruikte hyperlipidemische muismodellen vergeleken met normolipidemische controle muizen wat betreft hun respons op het toedienen van vetrijke voeding gedurende een langere periode. We vonden een omgekeerde correlatie tussen de aanwezigheid van ontsteking in de lever en de hoeveelheid opgestapeld vet. Om te onderzoeken of er sprake was van een oorzakelijk verband, hebben we dieren gecreëerd met een verhoogde ontsteking in de lever. Hiertoe werden beenmergtransplantaties gebruikt. Ldlr-/- muizen werden bestraald en getransplanteerd met beenmerg van hyper-inflammatoire TNF receptor non-sheddable muizen, welke een verhoogde TNF signalering vertonen. Deze dieren hadden een verdubbeling van het aantal ontstekingscellen in de lever, en dit leidde tot een verlaging van de vetopstapeling in de lever. Daarenboven hebben we gevonden dat de opstapeling van vetten in de lever volledig werd geïnhibeerd na het neutraliseren van het anti-inflammatoir cytokine IL10 met antilichamen. Dit gebeurde zelfs zonder een verandering van de hoeveelheid ontsteking in de lever.

In het laatste hoofdstuk worden de belangrijkste resultaten uit deze thesis besproken in het licht van de huidige stand van zaken. Daarenboven worden de mogelijke toepassingen en gevolgen besproken. We kunnen besluiten dat in deze thesis wordt aangetoond dat cholesterol een belangrijke risicofactor is om ontsteking in de lever te ontwikkelen. In tegenstelling tot het huidige geaccepteerde twee-hit model, heeft deze thesis aangetoond dat cholesterol mogelijk rechtstreeks leidt tot leverinflammatie, ongeacht de aanwezigheid van een eerste “hit”. Cholesterol zorgt daardoor voor een onmiddellijke “strike out” van de lever.