肝细胞核因子 4 α 在肝脏再生中的研究进展

刘新文¹综述, 伍悦², 龚建平^{2 Δ} 审校

1. 重庆市云阳县人民医院普外二科, 重庆 404500; 2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400010

关键词:肝细胞核因子 4 α ; 肝脏; 肝脏再生; 调节**中图分类号:**R446.9**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)13-1940-03

肝细胞核因子 4(HNF4)是从大鼠肝脏中发现的,属类固醇激素受体超家族成员,其 DNA 结合活性与 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A1 和丙酮酸激酶基因转录调控有关。HNF4 α 与大鼠肝脏提取物中 transthyretin (TTR) 和 apolipoprotein C III (APOC III) 转录所需要的位点结合。在小鼠肝脏发育过程中, HNF4 α 在胃泌素分泌前的原发性和胚胎外内脏内皮细胞中表达,在肝、胰腺和肠形成初期的上皮细胞中表达。HNF4 包括 HNF4 α 、HNF4 β 、HNF4 γ 和变异剪切体,与肝脏疾病相关的 HNF4 分子主要是 HNF4 α ,本研究对 HNF4 α 在肝脏再生中的研究进展综述如下。

1 HNF4 α 的来源及分布

HNF4 α 来源于胚泡的原始内胚层,可持续表达于卵黄囊内脏内胚层。HNF4 α 在胚胎肝脏发育形成的第 8 天即可被检测到, HNF4 α 在肝脏和肾脏中表达较高,在小肠、结肠和胰腺 B 细胞中表达较低(< 50%),与肝特异基因的表达密切相关^[1]。

2 HNF4 α 的结构特点

人的 HNF4 α 编码基因位于 20 号染色体长臂(20q13.12)。HNF4 α 含“锌指结构”,其蛋白质 3 级结构由 6 个(A~F)功能性结构域组成:A/B 区(N 端)包含激活结构域 1(AF1),其与启动子特殊序列密切相关;C 区含高度保守的“锌指结构”,与 D 区(铰链区)结合,形成可与靶基因特殊 DNA 序列激素反应元件结合的 DNA 结合域;E 区为多功能配体结合域,包括激活功能域 AF2 和配体结合域;F 区(C 端)是特异性配体结合区,为 HNF4 α 所独有。HNF4 α 有酰基辅酶 A 和游离脂肪酸 2 个配体结合位点,分别以不同模式调节 HNF4 α 的转录活性。HNF4 α 可由多种途径调控激活,如磷酸化、乙酰化^[2] 或与细胞信号转导蛋白^[3] 结合等,与启动子序列结合形成同源二聚体,调节染色体结构,激活靶基因的表达。

3 HNF4 α 的功能

HNF4 α 与人基因启动子区域的基因结合比例高达 12%,其中 RNA 聚合酶 II 结合基因中有 41% 与 HNF4 α 结合,说明 HNF4 α 调控着大部分肝细胞基因的转录,与肝脏关系密切。

HNF4 α 被认为是肝细胞分化的主要调节因子,

它在胚胎发育中起重要作用,不仅能稳定肝转录因子网络^[4],还能维持肝细胞功能^[5]。HNF4 α 所调节的基因参与了异物代谢、碳水化合物代谢、脂肪酸代谢、胆汁酸合成、血液凝固和尿素生成^[6]。在诱导性多能干细胞中, HNF4 α 的表达可诱导肝细胞样特征,而在肝癌中,强迫表达 HNF4 α 可诱导分化,降低肿瘤进展^[7-8]。此外,在肝硬化大鼠模型中,降低 HNF4 α 表达会导致肝功能丧失及呼吸困难^[9]。最新研究显示, HNF4 α 在肝脏中具有抗增殖作用^[10-11]。将小鼠肝细胞特异性 HNF4 α 敲除后,会导致小鼠肝细胞自发性增殖^[10-11],并促进二乙基亚硝胺诱导的肝细胞癌形成^[12]。

4 肝脏再生的临床意义

肝脏是机体唯一可以通过再生进行自我修复的器官,一般情况下,增生不明显,成熟肝细胞平均寿命为 200~300 d。部分肝损伤或外科部分切除后,肝细胞首先进入细胞周期,同时产生有丝分裂信号,促进其他类型细胞增殖,目前已知的促进肝细胞由静止期进入细胞周期的信号通路包括:TNF- α /NF- κ B、IL-6/STAT3、PI3K/Akt、HGF/HFG 受体、ERK1/2、5-羟色胺/G 蛋白等分子通路^[13-15]。通过上述信号转导通路,肝脏可在 8~15 d 恢复至正常重量^[16],普遍认为 70% 的肝脏可安全切除。

肝脏的再生具有重要临床意义,手术切除肝组织、中毒性肝损害、病毒性肝病、缺血再灌注损伤后,可启动肝脏再生,促进肝功能恢复,比如,活体肝移植后供者肝脏体积与功能的恢复及移植肝脏的再生;急性肝衰竭后数月,肝脏可能仅表现出无或轻度组织学异常;轻中度肝纤维化去除病因后也可通过再生得以恢复等。如果肝脏再生不足或肝脏再生不能启动,肝功能将持续受损,此时可选择的治疗方法不多,只能进行肝移植或肝功能支持治疗,如血浆置换、分子吸收再循环系统、生物人工肝等。所以,肝损伤后早期,有效激发肝脏再生对于提高患者生存率和预后非常重要^[17]。

5 HNF4 α 与肝脏再生的关系

肝脏受损后,成体肝细胞退出静息状态,进入细胞周期,增殖、再生完成后恢复分化、静息状态。细胞

增殖的增加有助于细胞数量增加,但肝脏受损后细胞大小的恢复需要肝细胞的营养、蛋白质和水分恢复到正常水平。HUCK 等^[18]研究发现,HNF4 α 的下调可能有助于肝细胞更快地进入肝细胞周期起始期,而重要的是,在细胞再生终止过程中恢复 HNF4 α 的活性,对于细胞再生的终止和肝细胞功能的恢复是绝对需要的。此外,在缺乏 HNF4 α 的情况下,肝脏再生可导致去分化、促癌的肝细胞表型,这些结果证实了 HNF4 α 在肝脏再生过程中作为肝细胞增殖和分化的主要角色。

5.1 HNF4 α 与细胞增殖 HNF4 α 参与了细胞增殖,这是由于观察到 HNF4 α 在多种器官中正常表达的 HNF4 α 在癌症中表达减少。通过分析人肾细胞癌(RCC)得知,HNF4 α 的 mRNA 和蛋白表达下调,同时 HNF4 α 的 DNA 结合特性受到抑制。HEK293 细胞中 HNF4 α 的表达抑制了细胞增殖,并表达了与 RCCs 变化相关的基因变化。GRIGO 等^[19]将 HNF4 α 对 RCC 影响的基因范围缩小到 14 个基因,包括 CDKN1A (p21)、TGFA、MME (NEP)、ADAMTS1、SEPP1、THEM2、BPHL、DSC2、ANK3、ALDH6A1、EPHX2、NELL2、EFHD1 和 PROS1。

有学者开发了一种具有 HNF4 α 诱导形式的 F9 小鼠胚胎细胞系,在这个模型中,他们提供了 HNF4 α 表达抑制细胞增殖的证据,发现表达可诱导 HNF4 α 的 F9 细胞在细胞周期的 G0/G1 阶段由于 CDKN1A (p21)以 p53 独立的方式上调而被抑制,进一步证实了他们在大鼠肺内皮细胞中的发现^[18]。

有学者研究了 HNF4 α 在大鼠胰岛素瘤细胞系 INS-1 细胞中过表达是否能抑制胰腺 B 细胞的增殖,发现 HNF4 α 亚型 2 过表达导致明显的形态学改变和细胞增殖减少^[19]。

5.2 缺乏 HNF4 α , 肝脏再生无法完成 HNF4 α 在肝细胞分化中的作用是众所周知的^[4-6],最近的研究显示,其在肝细胞中具有抗增殖作用^[12,20-21]。HUCK 等^[18]研究发现,肝脏特异性 HNF4 α 敲除(HNF4 α -KO)小鼠在大部分肝切除(PH)前,肝脏重量与小鼠重量比值明显增高,但在 PH 后 5 d,肝脏重量的恢复情况与 WT 相似。而 HNF4 α -KO 小鼠在 PH 1、2、5 d 后,血清胆红素水平明显增高,虽然血清胆红素随时间的推移降低,但是更多的血清胆红素在 HNF4 α -KO 小鼠死亡后才能检测到。HNF4 α -KO 小鼠 PH 后病死率达 100%,通过静脉注射 AAV8-CMV-HNF4 α 恢复细胞分裂后,可大大提高 PH 后 HNF4 α -KO 小鼠的存活率。

5.3 HNF4 α 在肝脏再生中的机制研究 在 PH 小鼠肝脏再生恢复初期,HNF4 α 蛋白表达降低,转录水平也降低。在 PH 6 h 后,处死小鼠前,使用 Src 抑制剂 PP2,HNF4 α 表达较 WT 相比明显增高,从而得出肝脏再生初期 HNF4 α 的快速下降可能与 Src 介导的

磷酸化有关的结论。通过 Tet-On-HNF4 α 系统将肝细胞中的 HNF4 α 过表达后,PH 后 6 h 内,出现更少的阳性 PCNA 细胞,在 48 h 后恢复到正常水平,同时抑制了短暂性脂肪变性发生^[22]。

众所周知,c-Myc 与细胞增殖有关,它在发育过程和增殖细胞中上调,通常在人类肿瘤中上调,因此被称为癌蛋白。c-Myc 水平升高会导致细胞周期进程和细胞永生。SLADEK 的研究^[23]表明,c-Myc 和 HNF4 α 争夺 p21 启动子的控制权,HNF4 α 可通过直接竞争与 c-Myc 结合的能力,上调 p21 的表达,p21 可阻止细胞增殖,HNF4 α -KO 小鼠中 c-Myc 明显升高。在 HNF4 α 缺失后,包括 Fus、Set、Ccnb1、Ccnb2、Rrm2、Myc 等多个原生基因的 c-Myc 调控基因网络被高度激活。在诱导的肝癌模型的进一步研究中发现,HNF4 α 的消耗与肿瘤中 c-Myc 的增加及细胞周期蛋白 D1 的增加之间存在相关性,这些数据有助于支持 SLADEK^[23]提出的 c-Myc/cyclin D1/HNF4 α 环,可作为控制肝细胞增殖和分化的可能机制。HANSE 等^[24]最近的研究认为,cyclin D1 对 HNF4 α 在选择靶基因上的转录活性提供了证据,发现 cyclin D1 抑制 HNF4 α 在特定基因上的结合,导致基因表达下调。这是由于 cyclin D1 和 HNF4 α 之间的直接相互作用所致。

LU 等^[25]研究了多种生长因子的表达,包括 Ar-eg、Bmp7、Egf、Hb-Egf、Igf-1、Scf、Tgfa 等,观察到 Tgfa 轻微升高,Hgf 和 Igf-1 降低,最明显的差异是 Bmp7,增加了 40 多倍。最近的一项研究表明,Bmp7 在某些肝细胞瘤中上调,其中 Bmp7 也被发现上调了 40 倍以上^[26]。BONZO 等^[26]通过芯片检测得出 Bmp7 不是 HNF4 α 的靶点,不过,他们也评论说,Bmp7 是 c-Myc 的一个已知目标,有证据表明,在失去 HNF4 α 后,c-Myc 的目标有所提高。

6 结 语

HNF4 α 的抗增殖与促进分化作用已被广泛认知,而它在肝脏再生中的直接作用却鲜有报道。在 HNF4 α -KO 小鼠中,虽然肝细胞生长因子受体(c-MET)和表皮生长因子受体(EGFR)表达缺失,但肝细胞增殖在 PH 前处于高水平。那么可以猜测 HNF4 α -KO 小鼠的再生反应(不表达 EGFR 或 c-MET)是由于激活了通常被 HNF4 α 抑制的促增殖通路所致。而 HNF4 α -KO 小鼠在 PH 后,不仅出现了细胞增殖的增加,还表达了促炎和促纤维化,随着时间的推移癌基因表达也有所增高。这一从异常再生反应到病理状态开始的转变表明,HNF4 α 在慢性或间歇性低水平肝损伤后再生反应的调节中发挥了作用,并提示在慢性肝病中 HNF4 α 的丢失可能会致肝癌的肿瘤生长。如果能够进一步研究出 HNF4 α 的功能及其在肝脏再生中的作用,是未来治疗慢性肝功能衰竭的新方向。

参考文献

- [1] HELLERBRAND C, AMANN T, SCHLEGEL J, et al. The novel gene MIA2 acts as a tumour suppressor in hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 2008, 57(2): 243-251.
- [2] TSAI T Y, WANG W T, LI H K, et al. RNA helicase DDX3 maintains lipid homeostasis through upregulation of the microsomal triglyceride transfer protein by interacting with HNF4 and SHP [J]. *Sci Rep*, 2017, 27(7): 41452-41459.
- [3] SHI W C, WANG H Y, ZHENG X, et al. HNF-4 α Negatively Regulates Hcpidin Expression Through BMPR1A in HepG2 Cells[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2017, 176(2): 294-304.
- [4] KYRMIZI I, HATZIS P, KATRAKILI N, et al. Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(16): 2293-2305.
- [5] MORIMOTO A, KANNARI M, TSUCHIDA Y, et al. An HNF4-microRNA-194/192 signaling axis maintains hepatic cell function[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(25): 10574-10585.
- [6] GONZALEZ F J. Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription[J]. *Drug Metab Pharmacokin*, 2008, 23(1): 2-7.
- [7] WEI L, DAI Y, ZHOU Y, et al. Oroxylin A activates PKM1/HNF4 alpha to induce hepatoma differentiation and block cancer progression[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(7): e2944.
- [8] YIN C, LIN Y, ZHANG X, et al. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene [J]. *Hepatology*, 2008, 48(5): 1528-1539.
- [9] NISHIKAWA T, BELL A, BROOKS J M, et al. Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1533-1544.
- [10] WALESKY C, GUNWARDENA S, TERWILLIGER E F, et al. Hepatocyte-specific deletion of hepatocyte nuclear factor-4 alpha in adult mice results in increased hepatocyte proliferation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 304(1): 26-37.
- [11] BONZO J A, FERRY C H, MATSUBARA T A, et al. Suppression of hepatocyte proliferation by hepatocyte nuclear factor 4 alpha in adult mice[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(10): 7345-7356.
- [12] WALESKY C, EDWARDS G, BORUDE P, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha deletion promotes diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rodents [J]. *Hepatology*, 2013, 57(6): 2480-2490.
- [13] MURATA S, MARUYAMA T, NOWATARI T, et al. Signal transduction of platelet-induced liver regeneration and decrease of liver fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 5412-5425.
- [14] CHEN X G, XU C S, LIU Y M. Involvement of ERK1/2 signaling in proliferation of eight liver cell types during hepatic regeneration in rats [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(1): 665-677.
- [15] FIDALGO S, IVANOV D K, WOOD S H. Serotonin: from top to Bottom [J]. *Biogerontology*, 2013, 14(1): 21-45.
- [16] MICHALOPOULOS G K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(1): 2-13.
- [17] TAKAHASHI K, MURATA S, OHKOHCHI N. Novel therapy for liver regeneration by increasing the number of platelets [J]. *Surg Today*, 2013, 43(10): 1081-1087.
- [18] HUCK L, GUNWARDENA S, ESPANOL-SUNER R, et al. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Activation is Essential for Termination of Liver Regeneration in Mice [J]. *Hepatology*, 2018, 10(5): 30405-30409.
- [19] GRIGO K, WIRSING A, LUCAS B, et al. HNF4 alpha orchestrates a set of 14 genes to down-regulate cell proliferation in kidney cells [J]. *Biol Chem*, 2008, 389(2): 179-187.
- [20] TSAI T Y, WANG W T, LI H K, et al. RNA helicase DDX3 maintains lipid homeostasis through upregulation of the microsomal triglyceride transfer protein by interacting with HNF4 and SHP [J]. *Sci Rep*, 2017, 27(7): 41452-41459.
- [21] SHI W, WANG H, ZHENG X, et al. HNF-4 α negatively regulates hepcidin expression through BMPR1A in HepG2 cells [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2017, 176(2): 294-304.
- [22] DAS A T, TENENBAUM L, BERKHOUT B. Tet-on systems for doxycycline-inducible gene expression [J]. *Curr Gene Ther*, 2016, 16(3): 156-167.
- [23] SLADEK F M. The yin and yang of proliferation and differentiation: cyclin D1 inhibits differentiation factors ChREBP and HNF4 α [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(17): 3156-3157.
- [24] HANSE E A, MASHEK D G, BECKER J R, et al. Cyclin D1 inhibits hepatic lipogenesis via repression of carbohydrate response element binding protein and hepatocyte nuclear factor 4 alpha [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(14): 2681-2690.
- [25] LU J W, HSIA Y, YANG W Y, et al. Identification of the common regulators for hepatocellular carcinoma induced by hepatitis B virus X antigen in a mouse model [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(1): 209-219.
- [26] BONZO J A, FERRY C H, MATSUBARA T A, et al. Suppression of hepatocyte proliferation by hepatocyte nuclear factor 4 alpha in adult mice [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(10): 7345-7356.