

FoxA转录因子在肝脏发育中的研究进展

乌云毕力格¹ 顾婷玉² 吕晓雯² 徐晨欢² 何志颖^{3*} 王欣^{1,2*}

(¹内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021; ²中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; ³第二军医大学细胞生物学教研室, 上海 200433)

摘要 FoxA蛋白是一类DNA结合区具有翼状螺旋结构的转录因子, 已发现其三名成员FoxA1、FoxA2和FoxA3在哺乳动物胚胎期的器官形成、成体时期的新陈代谢和内环境稳定中起着重要作用。肝脏发育中FoxA亚家族成员起着关键调控作用, 在肝向命运决定中扮演“先锋因子”的角色。该文对FoxA转录因子在肝脏发育中的调控作用进行了小结, 综述了近年来的最新研究成果。

关键词 肝脏发育; FoxA; 转录因子; 先锋因子

Advances on the FoxA Transcription Factors in Liver Development

Uyunbilig Borjigin¹, Gu Tingyu², Lü Xiaowen², Xu Chenhuan², He Zhiying³, Wang Xin^{1,2*}

(¹The Key Laboratory of Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; ²The Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Shanghai Institute of Cell Biology and Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ³Department of Cell Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract FoxA proteins are subfamily of winged helix/forkhead box (Fox) transcription factors. Its three members, FoxA1, FoxA2 and FoxA3, have been found to play important roles in mammalian early embryo development, organogenesis, metabolism and homeostasis in the adult. FoxA proteins are key transcriptional regulators in liver development and play “pioneer factor” in liver specific genes transcription. This review summarizes the recent research of FoxA transcription factors in the regulation of liver development.

Key words embryo development; FoxA; transcription factors; pioneer factor

哺乳动物的器官发生是一个高度动态的过程。在早期器官形成过程中Fox蛋白决定三个胚层特别是内胚层和中胚层的形成。肝脏发育从肝芽(liver bud)出现开始, 到肝祖细胞的形成, 接着肝祖细胞的增殖、分化和迁移, 直至最后器官的形成。肝脏发育过程经历了转录因子和细胞信号的高度复杂的时空调控过程。FoxA转录因子家族与HNF家族、GATA家族等其他肝内转录因子间形成高度复杂的调控网络, 在肝脏发育过程以及其正常功能的发挥中起着举足轻重的作用。比如, FoxA2在节点和原条前端形成中不可

缺少, FoxA2基因敲除小鼠在原肠运动时期产生异常, 从而影响内胚层的肝脏方向的发育。本文从FoxA家族的结构特点、FoxA家族在早期胚胎发育过程中的调控和肝脏发育相关基因表达中的先锋因子作用、FoxA家族在皮肤成纤维细胞向肝实质细胞的转分化中的关键作用等几个方面进行综述。

1 FoxA蛋白家族的结构特点

Fox蛋白家族是一类从酵母到人类都广泛存在的转录因子, 含有由三个 α 螺旋和两侧 β 折叠片组

收稿日期: 2013-05-22 接受日期: 2013-06-26

国家自然科学基金(批准号: 31060168、31271469、31271042)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-81870946, E-mail: zyhe@smmu.edu.cn; Tel: 0471-5227683, E-mail: wangxxx6@yahoo.com

Received: May 22, 2013 Accepted: June 26, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31060168, 31271469, 31271474 and 31271042)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-81870946, E-mail: zyhe@smmu.edu.cn; Tel: +86-471-5227683, E-mail: wangxxx6@yahoo.com

网络出版时间: 2013-09-11 14:25 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130911.1425.005.html>

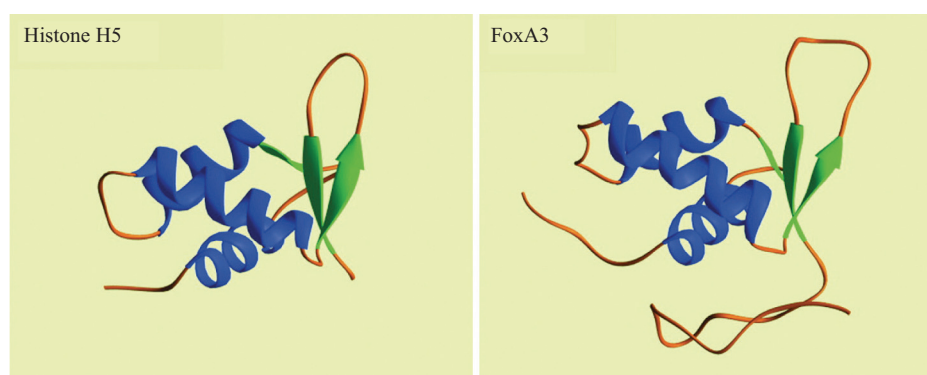
成的DNA结合区具有高度保守性,称为叉头框结构(forkhead box, Fox),该家族蛋白的名称由此得来。FoxA是Fox蛋白家族的一个亚族, FoxA1-3蛋白氨基酸序列的同源性高达95%,其两侧序列是核定位必需的。FoxA1-3叉头框结构以外区域的同源性较低,而叉头框结构区域N和C末端的保守性最高,其中FoxA3的同源性不如FoxA1和FoxA2。FoxA2叉头框区域的N末端包含独特的AKT2/PKB磷酸化位点。FoxA的DNA结合域在结构上与组蛋白H5相似(图1),其C末端与组蛋白H3和H4相互作用。这些特征使FoxA与紧密的染色质结合成为可能,并且即使在其他染色质修饰酶缺乏的情况下也能够打开局部结合区域的核小体。这样, FoxA便能增强染色质对其他转录因子的招募,正因为如此, FoxA被认为具有“先锋因子(pioneer factor)”的作用^[1-2]。

2 早期胚胎发育过程中FoxA家族的调控

随着小鼠胚胎发育,第一个被激活的FoxA基因是FoxA2,在胚胎期6.5(E6.5)在节点(the node)和原条前端(primitive streak)中检测到其RNA和蛋白的表达^[4-7]。哺乳动物胚胎的节点是原肠运动(gastrulation)形成的关键,这时上胚层的一部分细胞沿着原条向前迁移(anterior migration)形成定型内胚层(definitive endoderm, DE)和中胚层前体(mesoderm progenitors),而剩余未迁移的细胞形成外胚层(ectoderm)。FoxA2的表达在E7.5天的定型内胚层到成年体内内胚层来源的肝、胰腺、肺、甲状腺和前列腺中检测到^[5,7-13]。FoxA2对于节点和脊索的发育是必需的, FoxA2基因敲除小鼠在原肠运动时期产生

异常,从而影响了内胚层的肝向发育^[14]。特异性地敲除原肠前端内胚层细胞中的FoxA2基因会使小鼠胚胎不再形成肝芽,并且相应位置的内胚层细胞失去了早期肝脏标记基因——甲胎蛋白(α -fetoprotein, Afp)基因的表达。FoxA2基因被敲除的DE细胞在体外培养时,也不能像正常内胚层细胞那样接受FGF(成纤维细胞生长因子, fibroblast growth factor)信号的刺激,来开启肝脏标记基因血清白蛋白(albumin, Alb)和转甲状腺素蛋白(transthyretin, Ttr)基因的表达^[15],说明FoxA2转录因子赋予了内胚层细胞响应胞外诱导信号的能力。

小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)体外肝向分化模型能够更明确更直接地观察到FoxA2在肝脏发育过程中所发挥的重要作用^[16]。例如,我们观察了FoxA2的敲除(FoxA2-KD)对ESCs向DE细胞分化的影响, FACS分析结果表明, FoxA2-KD组分化细胞中DE细胞的百分比明显低于对照组细胞中DE细胞的百分比。FoxA2的敲除可能干扰了DE细胞的分化、生长或存活等过程中的某个环节,暗示FoxA2的正常表达对于DE细胞的发育是必需的。在小鼠的DE细胞中特异性敲除FoxA2,并不会影响DE向肝脏的命运决定,这有可能是FoxA家族的其他成员补偿了FoxA2的作用^[13]。这些现象也可能是体内胚胎发育过程中多种复杂因素综合作用的结果。因此,我们以早期肝细胞标志基因Afp和Ttr的表达水平来指示DE细胞进一步向早期肝细胞分化的程度,在两组细胞中平行比较这两个基因的表达水平以推测这两组细胞向早期肝细胞分化的程度。在DE向肝脏分化过程中,对照组细胞的Afp



图中分别用蓝色和绿色标记 α -螺旋和 β -折叠的相似性。

Notice the similarity in the orientation of the helices and sheets, shown in blue and green, respectively.

图1 FoxA3和组蛋白H5的DNA结合域(根据参考文献[3]修改)

Fig.1 Structural similarity between FoxA3 and linker histone H5 (modified from reference [3])

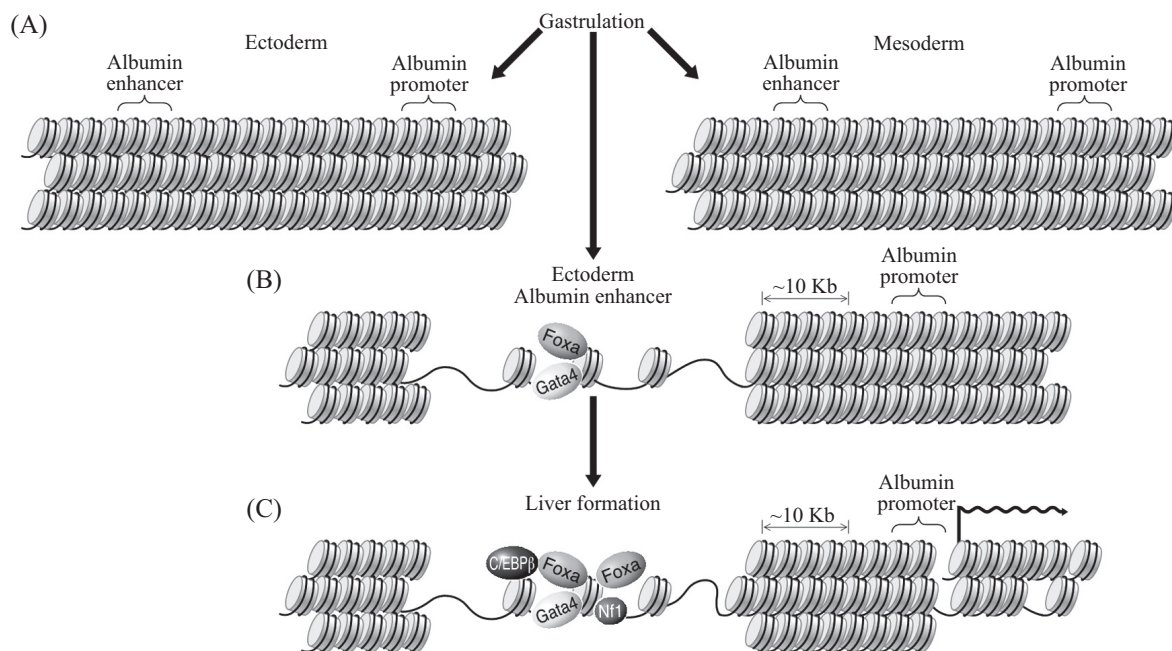
和Ttr的表达水平显著上调,而FoxA2-KD组的细胞中,两者的上调都受到了极大地干扰。由此可以推论, FoxA2的正常表达对于早期胚胎的肝向分化是必需的。

FoxA1在早期胚胎中也广泛表达,表达情况与FoxA2相似。但E7.0天以前,节点和原条后端检测不到FoxA1。除少数情况以外,在成体中FoxA1和FoxA2的表达谱(expression profile)大量重叠,暗示两种转录因子的功能相似性和互补性^[17-18]。在内胚层中E8.5以前不表达FoxA3,在原条和轴中胚层(axial mesoderm)中检测不到其表达^[5]。虽然E10.5天的肝原基中开始检测到FoxA3,肝脏发育到成体过程中其RNA表达量比其他FoxA家族成员RNA表达高出很多^[5,19]。与FoxA2相反, *FoxA1*^{-/-}和*FoxA3*^{-/-}敲除小鼠胚胎发育不受影响并能得到后代^[10-23],说明FoxA蛋白家族有时空表达差别和功能互补的特点。

3 FoxA转录因子的肝脏早期发育中的“先锋因子”作用

转录因子GATA4属于GATA家族,在DE细胞中

表达水平高。在小鼠、果蝇、线虫和斑马鱼中, DE向各个器官的命运决定需要GATA和FoxA家族成员的共同作用^[24]。对小鼠胚胎中白蛋白基因表达的研究表明, FoxA2联合GATA4启动肝脏特异基因*Alb*基因的表达,以一种“先锋因子”的方式共同决定DE细胞的肝向分化命运^[17],并一直持续到成体肝细胞阶段。然而,早在DE细胞完成肝向分化的命运决定之前, GATA4和FoxA2已经结合到了*Alb*基因的增强子(enhancer)区(图2),而此时的*Alb*基因还未开始被启动转录表达^[25-26]。根据上述GATA4和FoxA2在*Alb*基因表达前结合其增强子的现象, Zaret等^[27]提出了“先锋因子”的假说,认为FoxA2和GATA4作为“先锋因子”,以一种预先结合到靶基因的promoter/enhancer区并改变其染色质结构的方式,预先调控DE细胞中肝脏分化相关基因所在染色体的三维结构,从而促进了后续阶段的转录活动。但是, FoxA2和GATA4这种预先激活下游基因表达的“先锋”作用从来没有在更广层面得到揭示。为了研究这个问题,我们建立了一个由胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)经DE阶段分化至早期肝细胞的高效模型。在全基因组水平将转录因子定位于靶基因DNA是认识转



A: 在原肠胚形成过程中缺乏激活Albumin的因子,因此Albumin不表达; B: 内胚层细胞的Albumin上游被FoxA和Gata4结合; C: 在内胚层向肝脏诱导的过程中,其他转录因子陆续结合到Albumin上游, Albumin基因被激活。

A: at the time of gastrulation, because of absent of transcription factors, Albumin gene lacks the potential to be activated; B: in the endoderm, occupancy of Foxa and Gata4 can be detected on the upstream of the Albumin; C: during hepatic induction of the endoderm, subsequent binding of additional factors, results in activation of the Albumin gene.

图2 FoxA蛋白的先锋作用(根据参考文献[28]修改)

Fig.2 FoxA as a Pioneer Factor(modified from reference [28])

录调控网络的有效方法。染色质免疫共沉淀结合测序(chromatin immunoprecipitation followed by sequencing, ChIP-Seq)是近年来兴起的、研究全基因组水平上DNA和转录因子相互作用的一种新技术^[29-30]。我们运用ChIP-Seq技术,在分化得到的DE细胞中,鉴定了FoxA2和GATA4在全基因组范围内的结合位点及下游基因。我们在几个肝脏基因 Afp 、 Ttr 和 $Timd2$ 的调控区,都鉴定到了FoxA2和GATA4在DE阶段的共结合位点。此外,结合cDNA芯片表达谱研究和ChIP-Seq的数据,我们的结果还提示,在DE的肝向分化过程中, FoxA2和GATA4可能在全基因组水平上扮演这种“先锋”作用。我们的研究是第一次关于肝向分化过程中转录因子FoxA2和GATA4在全基因组范围内转录调控的探索,并且为胚胎发育中的肝脏发生和ESC肝向分化两方面的研究都提供了非常有用的信息^[31]。

4 FoxA在皮肤成纤维细胞向肝实质细胞转分化中的作用

我们与惠利健课题组合作完成的一项关于GATA4和FoxA3的研究表明^[32],在取自成年小鼠的尾尖皮肤中分离的成体皮肤成纤维细胞中,过量共同表达FoxA3、GATA4和Hnf1 α ,能使之细胞命运从纤维细胞转化到诱导类肝实质细胞(induced hepatocyte-like cell, iHep),转化获得的iHep细胞在各种体内和体外的实验中被得以证明,包括其在形态、基因表达谱和代谢功能方面各种关键肝向指标。转化获得的肝实质细胞进一步被证明了能使模型小鼠的肝衰竭得以救治。这一发现进一步揭示了FoxA3作为关键转录因子在全基因的转录调控网络中占据了肝向命运决定的关键位点。FoxA3和GATA4、Hnf1 α 协同作用的结果能使全基因的转录调控网络从非肝细胞转向肝细胞的命运。由此,认清FoxA转录因子在基因组水平的全部下游基因将有助于揭示细胞肝向分化和肝向维持的机理。紧接着,2011年7月, Sayaka等^[33]通过筛选12种候选因子,鉴定出两种转录因子的三种特定的组合(Hnf4 α 加上FoxA1、FoxA2或FoxA3)能在体外将胚胎成纤维细胞和成年成纤维细胞转化为非常类似于肝细胞的细胞(iHep)。这种诱导的肝细胞样细胞拥有多种肝细胞特异性的特征,经过移植后能够复原受损的肝组织。经这一方式获得的iHep细胞能成为疾病模型、肝细胞移植

和组织工程中重要的非供体细胞来源, iHep的产生也将为肝细胞分化的分子机制和潜在的肝脏疾病治疗提供新的启示^[34]。最近, Takayama等^[35]也报道两种转录因子FoxA2及Hnf1 α 联合促进了人胚胎干细胞(hESCs)及人诱导多能干细胞(hiPSCs)有效分化为肝细胞。通过FoxA2及Hnf1 α 的转导,这些干细胞获得了肝细胞相关基因的表达谱,比如细胞色素P450基因、结合酶基因、肝细胞转运体基因以及肝细胞核受体基因。进一步研究发现这些功能特性与原代人类肝细胞无异,说明FoxA2在人类肝脏发育中起关键作用。

5 展望

Fox基因可能起源于单细胞或简单的多细胞生物,其功能是维持基本的细胞代谢,控制细胞周期和生长调节等关键过程。生物进化的驱动导致这一家族成员不断扩充,并有了组织特异性表达模式,如胚胎发育过程中,不同胚层或同一胚层的不同部位都有特征性的Fox基因表达,这些基因参与细胞类型的决定和器官形成中扮演重要角色。肝脏是体内最大的一个器官,对于维持体内新陈代谢具有重要作用,具有内分泌和外分泌的功能。FoxA转录因子家族成员在肝脏发育过程中起重要调节作用。肝脏特异性基因表达过程中FoxA转录因子扮演“先锋因子”的作用。最近,体细胞转分化和人ES及iPS细胞诱导分化研究也有有力地证明FoxA成员在肝脏发育过程中的不可替代的关键作用。随着挖掘FoxA家族在肝脏发育中的功能及其调控机理的深入研究将会揭示其更多的机理,从而为体外诱导产生肝实质细胞研究中提供理论指导。

参考文献 (References)

- 1 Lupien M, Eeckhoutte J, Meyer CA, Wang Q, Zhang Y, Brown M, et al. FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription. *Cell* 2008; 132(6): 958-70.
- 2 Taube JH, Allton K, Duncan SA, Shen L, Barton MC. Foxa1 functions as a pioneer transcription factor at transposable elements to activate Afp during differentiation of embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2010; 285(21): 16135-44.
- 3 Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA recognition motif resembles histone H5. *Nature* 1993; 364(6436): 412-20.
- 4 Ang SL, Wierda A, Wong D, Stevens KA, Cascio S, Rossant J, Zaret KS. The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: Involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* 1993; 119(4): 1301-15.

- 5 Monaghan AP, Kaestner KH, Grau E, Schutz G. Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/ HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development* 1993; 119(3): 567-78.
- 6 Ruiz i Altaba A, Prezioso VR, Darnell JE, Jessell TM. Sequential expression of HNF-3 beta and HNF-3 alpha by embryonic organizing centers: the dorsal lip/node, notochord and floor plate. *Mech Dev* 1993; 44(2/3): 91-108.
- 7 Sasaki H, Hogan BL. Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* 1993; 118(1): 47-59.
- 8 Clevidence DE, Overdier DG, Tao W, Qian X, Pani L, Lai E, *et al.* Identification of nine tissue-specific transcription factors of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead DNA-binding-domain family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(9): 3948-52.
- 9 Kaestner KH, Lee KH, Schlondorff J, Hiemisch H, Monaghan AP, Schutz G. Six members of the mouse forkhead gene family are developmentally regulated. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(16): 7628-31.
- 10 Lai E, Prezioso VR, Tao WF, Chen WS, Darnell JE Jr. Hepatocyte nuclear factor 3 alpha belongs to a gene family in mammals that is homologous to the *Drosophila* homeotic gene fork head. *Genes Dev* 1991; 5(3): 416-27.
- 11 Mirosevich J, Gao N, Matusik RJ. Expression of Foxa transcription factors in the developing and adult murine prostate. *Prostate* 2005; 62(4): 339-52.
- 12 Sasaki H, Hogan BL. Enhancer analysis of the mouse HNF-3 beta gene: Regulatory elements for node/notochord and floor plate are independent and consist of multiple subelements. *Genes Cells* 1996; 1(1): 59-72.
- 13 Yasui K, Sasaki H, Arakaki R, Uemura M. Distribution pattern of HNF-3beta proteins in developing embryos of two mammalian species, the house shrew and the mouse. *Dev Growth Differ* 1997; 39(6): 667-76.
- 14 Lee CS, Friedman JR, Fulmer JT, Kaestner KH. The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature* 2005; 435(7044): 944-7.
- 15 Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, *et al.* Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 2004; 303(5662): 1378-81.
- 16 Li F, Li L, Ding X, Hu Y, He Z, Wang X, *et al.* Hepatoblast-like progenitor cells derived from embryonic stem cells can repopulate livers of mice. *Gastroenterology* 2010; 139(6): 2158-69.
- 17 Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* 2002; 9(2): 279-89.
- 18 Peterson RS, Clevidence DE, Ye H, Costa RH. Hepatocyte nuclear factor-3 alpha promoter regulation involves recognition by cell-specific factors, thyroid transcription factor-1, and autoactivation. *Cell Growth Differ* 1997; 8(1): 69-82.
- 19 Kaestner KH, Hiemisch H, Luckow B, Schutz G. The HNF-3 gene family of transcription factors in mice: Gene structure, cDNA sequence, and mRNA distribution. *Genomics* 1994; 20(3): 377-85.
- 20 Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, *et al.* The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 1994; 78(4): 575-88.
- 21 Kaestner KH, Hiemisch H, Schutz G. Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol* 1998; 18(7): 4245-51.
- 22 Kaestner KH, Katz J, Liu Y, Drucker DJ, Schutz G. Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression *in vivo*. *Genes Dev* 1999; 13: 495-504.
- 23 Shih DQ, Navas MA, Kuwajima S, Duncan SA, Stoffel M. Impaired glucose homeostasis and neonatal mortality in hepatocyte nuclear factor 3alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(18): 10152-7.
- 24 Zaret K. Developmental competence of the gut endoderm: Genetic potentiation by GATA and HNF3/fork head proteins. *Dev Biol* 1999; 209(1): 1-10.
- 25 Bossard P, Zaret KS. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* 1998; 125(24): 4909-17.
- 26 Jackson DA, Rowader KE, Stevens K, Jiang C, Milos P, Zaret KS. Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition. *Mol Cell Biol* 1993; 13(4): 2401-10.
- 27 Zaret KS, Watts J, Xu J, Wandzioch E, Smale ST, Sekiya T. Pioneer factors, genetic competence, and inductive signaling: Programming liver and pancreas progenitors from the endoderm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008; 73: 119-26.
- 28 Le Lay J, Kaestner KH. The Fox genes in the liver: from organogenesis to functional integration. *Physiol Rev* 2010; 90(1): 1-22.
- 29 Farnham PJ. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet* 2009; 10(9): 605-16.
- 30 Park PJ. ChIP-seq: Advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet* 2009; 10(10): 669-80.
- 31 Xu C, Lv X, Chen EZ, He Z, Uygunbilig B, Wang X, *et al.* Genome-wide roles of Foxa2 in directing liver specification. *J Mol Cell Biol* 2012; 4(6): 420-2.
- 32 Huang P, He Z, Ji S, Hu Y, Wang X, Hui L, *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 386-9.
- 33 Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 390-3.
- 34 Ji S, Zhang L, Hui L. Cell fate conversion: Direct induction of hepatocyte-like cells from fibroblasts. *J Cell Biochem* 2013; 114(2): 256-65.
- 35 Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Sugawara M, Kikuchi K, Higuchi M, *et al.* Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1a transduction. *J Hepatol* 2012; 57(3): 628-36.