

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.09.1112

• 专题报道 •

基于报告基因系统的肝细胞核因子 4α 活性检测体系的建立

孙冰洁¹, 陈示洁², 邓龙飞¹, 丁晨虹³, 陈 斐³, 罗 成², 谢渭芬³, 张 新^{1,3*}

1. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237
2. 中国科学院上海药物研究所药物发现与设计中心, 上海 201203
3. 第二军医大学长征医院消化内科, 上海 200003

[摘要] **目的** 建立一个基于荧光素酶报告基因系统的肝细胞核因子 4α(HNF4α)活性检测系统,筛选可调控 HNF4α 活性的小分子化合物。**方法** 采用亲和层析法纯化 HNF4α 蛋白,行蛋白热迁移实验检测相关 DNA 片段及小分子化合物与 HNF4α 蛋白的直接相互作用。分别构建含有 3 个拷贝和 9 个拷贝的 *Ninjurin* 1(*NINJ1*)基因启动子区 HNF4α 反应元件的荧光素酶报告基因质粒 pGL3-NINJ1-3p 和 pGL3-NINJ1-9p,转染肝癌细胞,采用荧光素酶报告基因法检测肝癌细胞内 HNF4α 转录活性的改变,qPCR 检测小分子化合物木犀草素或阿尔维林处理后肝癌细胞中 HNF4α 及下游基因的表达情况,荧光素酶报告基因法检测小分子化合物处理后细胞内 HNF4α 转录活性的改变。**结果** 蛋白热迁移实验证实,*NINJ1* 基因启动子区 HNF4α 的 DNA 结合片段可与 HNF4α 蛋白结合。在过表达 *HNF4α* 的肝癌细胞中,pGL3-NINJ1-3p 和 pGL3-NINJ1-9p 均可检测到肝癌细胞中 HNF4α 活性的改变,且 pGL3-NINJ1-9p 较 pGL3-NINJ1-3p 的检测灵敏度更高($P<0.01$)。木犀草素和阿尔维林与 HNF4α 蛋白存在直接相互作用,分别下调和上调 HNF4α 靶基因;pGL3-NINJ1-9p 可检测到木犀草素和阿尔维林对 HNF4α 转录活性的影响。**结论** 利用报告基因载体 pGL3-NINJ1-9p 成功建立了 HNF4α 活性的检测系统,为筛选调控 HNF4α 活性的小分子化合物等提供了基础工具。

[关键词] 肝细胞核因子 4α;*Ninjurin* 1;报告基因系统;小分子化合物

[中图分类号] R 575 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)09-1112-07

Establishment of a reporter gene system for activity detection of hepatocyte nuclear factor 4α

SUN Bing-jie¹, CHEN Shi-jie², DENG Long-fei¹, DING Chen-hong³, CHEN Fei³, LUO Cheng², XIE Wei-fen³, ZHANG Xin^{1,3*}

1. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China
2. Drug Discovery and Design Center, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China
3. Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To establish a luciferase reporter gene system for detecting the activity of hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α), so as to screen the small molecule compounds regulating the activity of HNF4α. **Methods** HNF4α was purified by affinity chromatography. The direct interaction of DNA fragment or small molecule compounds to the HNF4α was determined by protein thermal shift assay. The constructing recombinant plasmid pGL3-NINJ1-3p or pGL3-NINJ1-9p, which contained three copies or nine copies of the HNF4α response element in the *Ninjurin* 1 (*NINJ1*) promoter, was transfected into hepatoma carcinoma cells. The transcriptional activity of HNF4α was detected by dual-luciferase reporter gene assay. The expressions of HNF4α and its down-stream genes were analyzed in hepatoma carcinoma cells treated with small molecular compound luteolin or alverine by real-time quantitative PCR. The changes of HNF4α transcriptional activity of cells treated with luteolin or alverine were estimated by luciferase reporter gene assay. **Results** Protein thermal shift confirmed that the HNF4α response element in *NINJ1* promoter bound to HNF4α

[收稿日期] 2017-05-20 **[接受日期]** 2017-08-09

[基金项目] 上海市科学技术委员会生物医药领域科技支撑项目(15421907700). Supported by Supporting Project of Biomedical Field of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (15421907700).

[作者简介] 孙冰洁,硕士生. E-mail: sunbingjie930115@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871330, E-mail: zhang68@hotmail.com

protein. In the hepatoma carcinoma cells with overexpression of HNF4 α , both pGL3-NINJ1-3p and pGL3-NINJ1-9p could detect the alteration of the transcriptional activity of HNF4 α , and pGL3-NINJ1-9p was more sensitive than pGL3-NINJ1-3p ($P<0.01$). Luteolin and alverine, both directly interacting with HNF4 α , down-regulated and up-regulated the expression of HNF4 α target genes, respectively. Moreover, pGL3-NINJ1-9p could validate the effect of luteolin or alverine on the transcriptional activity of HNF4 α . **Conclusion** We successfully establish a detection system for HNF4 α activity in hepatoma carcinoma cells by the reporter gene vector pGL3-NINJ1-9p. This system is a tool for screening small molecule compounds that regulate HNF4 α activity.

[Key words] hepatocyte nuclear factor 4 α ; Ninjurin 1; reporter gene system; small molecular compound

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(9): 1112-1118]

肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α)是肝细胞核因子家族的重要成员,为核受体型转录因子,因其可调控大量肝细胞特异基因的表达,通常被认为是肝脏分化和功能维持的主要调控者^[1]。既往研究表明,上调 HNF4 α 的表达可抑制肝脏纤维化并诱导肝癌细胞向成熟肝细胞分化,抑制其成瘤性^[2-3]。其他研究还发现,HNF4 α 可抑制促有丝分裂基因的表达和 c-Myc 通路的激活,并促进抑癌基因 p21 的表达^[4-5],具有显著的抑癌作用。因此,探索调控 HNF4 α 活性的小分子化合物在肝纤维化和肝癌的治疗中具有潜在的应用价值。

HNF4 α 具有保守的 DNA 结合结构域和配体结合结构域^[6-7],是肝脏中含量最丰富的转录因子,肝细胞中转录活化的基因约 40% 含有 HNF4 α 反应元件(HNF4 α response element, HNF4 α -RE)^[8]。Chandra 等^[9]发现,HNF4 α 以同源二聚体形式与其 DNA 反应元件和共激活因子衍生肽结合形成特殊四级结构,小分子变构调节剂可通过影响该四级结构调节 HNF4 α 的功能。为筛选可调控 HNF4 α 活性的小分子化合物,本研究选取 HNF4 α 下游靶基因 Ninjurin 1(NINJ1)启动子区的 HNF4 α 反应元件(NINJ1-p)^[10],构建了含有多个拷贝 NINJ1-p 片段的荧光素酶报告基因载体,并在此基础上建立了一个 HNF4 α 活性检测系统,为发现用于治疗慢性肝病的小分子药物提供工具。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 含有 3 个拷贝和 9 个拷贝 NINJ1-p 片段(5'-CAG GAA AAC CTA AGG TCA GGG AG-3')的 NINJ1-3p 和 PUC-NINJ1-9p 质粒委托生工生物(上海)股份有限公司合成,载体构建相关试剂购自 TaKaRa 公司。双荧光素酶报告基因

检测试剂盒购自 Promega 公司。

人肝癌细胞株 Huh7、Hep3B、PLC 和 HepG2 由第二军医大学长征医院消化内科实验室保存,用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,细胞培养相关试剂购自 Thermo 公司。实验所用 HNF4 α 腺病毒 Ad-HNF4 α 及对照病毒 Ad-GFP 由第二军医大学长征医院消化内科实验室构建。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。PCR 引物由华大基因合成。

木犀草素(luteolin)和阿尔维林(alvernine)购于上海陶素生化科技有限公司。Protein Thermal Shift™ Dye Kit 购于 Sigma 公司,96 孔板购于帝恩生物科技有限公司。HisTrap FF(5 mL)、Superdex 75(10/30)购于 GE Healthcare 公司。

1.2 HNF4 α 蛋白纯化 原核蛋白的表达方法参考第二军医大学长征医院消化内科实验室前期工作^[11],HNF4 α 蛋白的相对分子质量约为 54 000。分别取 0.1、0.2、0.4 μ g HNF4 α 蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝 R250 染色过夜,确定其纯度达 90% 以上后用于蛋白热迁移实验(protein thermal shift),在体外确证 HNF4 α 与 DNA 片段、小分子化合物是否存在直接相互作用。

1.3 蛋白热迁移实验 取稀释至不同终浓度的 HNF4 α 蛋白(0、1、2.5、5、10、20 μ mol/L)与 SYPRO Orange(2 $\times$ 、5 $\times$ 、10 $\times$ 、20 $\times$)加于 96 孔 PCR 板中,反应体积为 20 μ L。置于 7500 Fast RT-PCR System(ABI)仪器上,设置反应程序为 25 ℃保温 1 min,再以 0.05 ℃/s 的升温速率从 25 ℃逐渐升至 95 ℃,95 ℃保温 15 s,在此过程中每隔 20 s 记录 1 次荧光信号。所有条件均设 3 个复孔,在不同条件下检测得到 HNF4 α 蛋白质的熔解温度(T_m)。

通过上述正交实验,最终选择 5 μ mol/L HNF4 α 蛋白和 10 $\times$ SYPRO Orange 行 HNF4 α 与 DNA、待检测小分子的相互作用确证实验。

1.4 荧光素酶报告基因质粒的构建 合成含有 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切位点的大小为 81 bp 的 NINJ1-3p 片段,或利用 *Kpn* I 和 *Bgl* II 对 pUC-NINJ1-9p 质粒进行分步双酶切得到大小为 219 bp 的 NINJ1-9p 片段,将 NINJ1-3p 片段和 NINJ1-9p 片段分别插入同样用 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切的 pGL3-promoter 空载质粒中,测序成功的重组质粒命名为 pGL3-NINJ1-3p 和 pGL3-NINJ1-9p,用于荧光素酶报告基因法检测细胞中 HNF4 α 的活性。

1.5 双荧光素酶报告基因实验 肝癌细胞 Huh7、Hep3B、PLC、HepG2 感染腺病毒 Ad-HNF4 α 或 Ad-GFP 过夜后,分别转染 pGL3-NINJ1-3p、pGL3-NINJ1-9p 和对照质粒 pGL3-promoter,共转染 pRL-SV40 为

内参,转染 48 h 后检测相对荧光素酶活性。

人肝癌细胞株 HepG2 共转染 pGL3-NINJ1-9p 和 pRL-SV40,6~8 h 后更换为终浓度为 20 μ mol/L 的木犀草素或阿尔维林培液(DMEM+2%胎牛血清),以二甲基亚砜(DMSO)处理为对照,处理 24 h 后,使用 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 试剂盒检测细胞内的相对荧光素酶活性

1.6 qPCR 检测 HNF4 α 及下游基因的表达 按照 RNAiso Plus(TaKaRa)抽提法,分别抽提 20 μ mol/L 木犀草素或阿尔维林处理 24 h 的 HepG2 细胞总 RNA。使用反转录试剂盒(TaKaRa)将抽提 RNA 反转录为 cDNA。设计 PCR 引物(表 1),以 β actin 为内参,检测 HNF4 α 及其下游基因载脂蛋白 C (apolipoprotein C III, APOCIII)、对羟基苯丙酮酸双氧化酶(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPD)和转甲状腺蛋白(transthyretin, TTR)的表达。

表 1 各基因的 qPCR 引物
Tab 1 Primers for qPCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer(5'-3')
β Actin	CAT CCT GCG TCT GGA CCT	GTA CTT GCG CTC AGG AGG AG
HNF4 α	CTT CCT TCT TCA TGC CAG	ACA CGT CCC CAT CTG AAG
APOCIII	GGG TAC TCC TTG TTG TTG C	AAA TCC CAG AAC TCA GAG AAC
HPD	TTG GGA AGG TGA AGT TTG CT	GCA TTT GGG CAG TTT AGG AA
TTR	GCG GGA CTG GTA TTT GTG TCT G	TTA GTG ACG ACA GCC GTG GTG

HNF4 α : Hepatocyte nuclear factor 4 α ; APOC III: Apolipoprotein C III; HPD: 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; TTR: Transthyretin

1.7 统计学处理 使用 GraphPad Prism 6 统计软件进行绘图与数据分析。所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用配对 *t*-test 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HNF4 α 转录活性报告基因检测系统的构建与鉴定 纯化获得纯度达 90%以上的 HNF4 α 蛋白(图 1A),可用于验证 HNF4 α 蛋白与 NINJ1-p DNA 片段结合能力的蛋白热迁移实验。蛋白热迁移实验结果显示,NINJ1-p 片段可在体外与 HNF4 α 蛋白结合,且结合强度具有浓度依赖性,当 NINJ1-p 片段浓度为 25 μ mol/L 时迁移温度可达 2.71 $^{\circ}$ C(图 1B)。结果验证了 NINJ1-p 确实为 HNF4 α 的 DNA 反应元件。

为获得具有高灵敏度的检测细胞内 HNF4 α 活

性的报告基因系统,研究构建了报告基因载体 pGL3-NINJ1-3p 和 pGL3-NINJ1-9p(图 2A)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,HNF4 α 过表达时,转染 pGL3-NINJ1-3p 的 HepG2 细胞报告基因活性较转染 pGL3-promoter 的对照组提高到 3.5 倍($P<0.05$),而转染 pGL3-NINJ1-9p 的细胞报告基因活性较对照组则提高到 55 倍($P<0.01$,图 2B);同样的实验条件下,pGL3-NINJ1-9p 转染 Hep3B 细胞的相对荧光素酶活性提高到 85 倍($P<0.01$),而 pGL3-NINJ1-3p 组则提高到 5 倍($P<0.01$,图 2C);在 PLC 和 Huh7 细胞中,pGL3-NINJ1-9p 转染细胞的检测灵敏度也均高于 pGL3-NINJ1-3p($P<0.01$ 或 $P<0.05$,图 2D、2E)。表明增加 HNF4 α 反应元件的拷贝数可提高报告基因的检测灵敏度,因此选择 pGL3-NINJ1-9p 质粒作为检测 HNF4 α 活性的报告基因质粒。

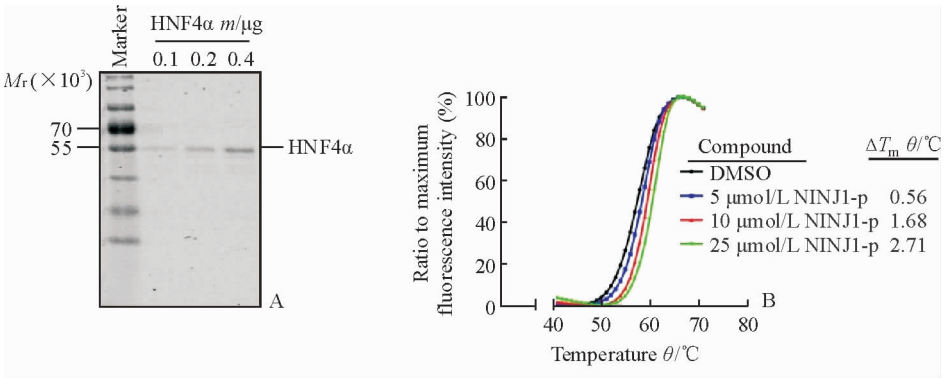


图 1 蛋白热迁移实验确定 NINJ1-p 片段与 HNF4 α 的结合

Fig 1 Binding of NINJ1-p to HNF4 α confirmed by thermal shift assay

A: Eletrophoresis followed by Coomassie brilliant blue staining was used to verify the purity of HNF4 α protein; B: Thermal shift assay of HNF4 α . NINJ1: Ninjurin 1; HNF4 α : Hepatocyte nuclear factor 4 α ; DMSO: Dimethyl sulfoxide

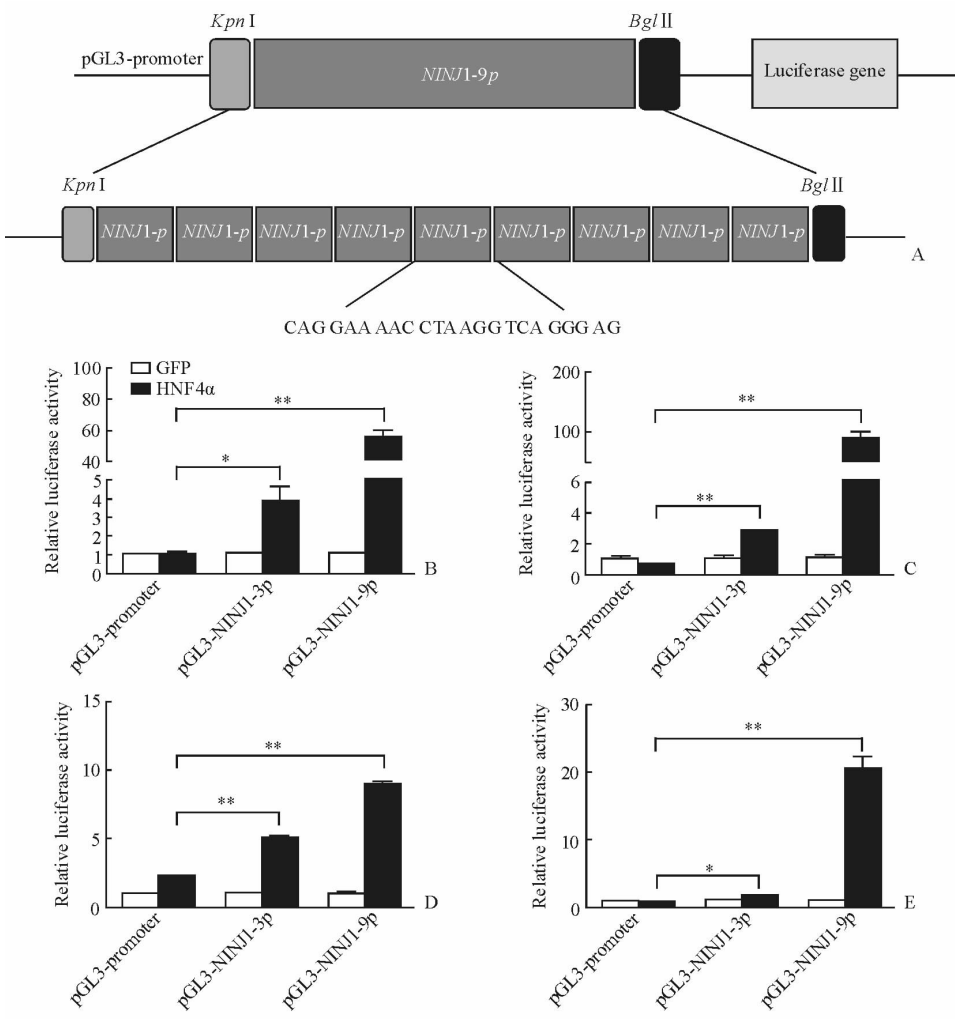


图 2 荧光素酶报告基因系统的构建与鉴定

Fig 2 Construction and identification of luciferase reporter gene system

A: Schematic illustration of the luciferase reporter plasmid pGL3-NINJ1-9p; B-E: Luciferase reporter assay was performed in HepG2 (B), Hep3B (C), PLC (D) and Huh7 (E) cells transfected with pGL3-NINJ1-3p, pGL3-NINJ1-9p or pGL3-promoter, respectively. NINJ1: Ninjurin 1; HNF4 α : Hepatocyte nuclear factor 4 α ; GFP: Green fluorescent protein. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 木犀草素和阿尔维林与 HNF4 α 的结合及对 HNF4 α 下游基因的调控作用 蛋白热迁移实验结果显示,200 $\mu\text{mol/L}$ 的木犀草素可使 HNF4 α 蛋白

的 T_m 迁移达 4.85 $^{\circ}\text{C}$ (图 3A);而阿尔维林浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, T_m 正向迁移 1.97 $^{\circ}\text{C}$ (图 3B),表明木犀草素和阿尔维林均可与 HNF4 α 蛋白直接结

合。进一步检测木犀草素和阿尔维林对 HNF4 α 及其下游基因表达的影响,将 DMSO 处理的对照组的值标准化为 1,可见木犀草素处理细胞的 HNF4 α 表达无明显变化,而其下游基因 APOCIII、HPD、TTR 的表达均下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$;图 3C)。阿尔维林处理细胞后,HNF4 α 基因的表达较对照组差异无统计学意义,而 APOCIII、HPD、TTR 基因的表达均上调($P<0.05$,图 3D),说明木犀草素和阿尔维林分别为 HNF4 α 的抑制剂和激活剂。

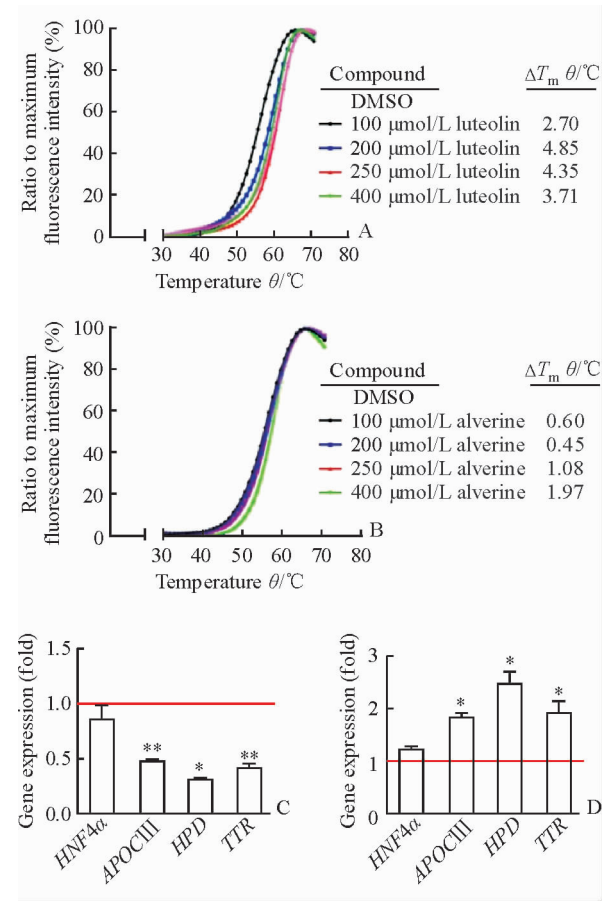


图 3 木犀草素和阿尔维林与 HNF4 α 的结合
及对 HNF4 α 下游基因的调控

Fig 3 Interaction of HNF4 α with luteolin and alvernine
and its regulation of HNF4 α down-stream genes

A: Thermal shift assay of HNF4 α in cells treated by luteolin; B: Thermal shift assay of HNF4 α in cells treated by alvernine; C, D: Expression of HNF4 α target genes in HepG2 cells treated with luteolin (C) or alvernine (D). The red line means standardizing the DMSO control group to 1. HNF4 α : Hepatocyte nuclear factor 4 α ; APOCIII: Apolipoprotein C III; HPD: 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; TTR: Transthyretin; DMSO: Dimethyl sulphoxide. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs DMSO group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.3 HNF4 α 转录活性报告基因检测系统的小分子化合物验证 利用木犀草素和阿尔维林验证 pGL3-

NINJ1-9p 是否可检测到小分子化合物对 HNF4 α 转录活性的调控。结果显示,在利用腺病毒过表达 HNF4 α 的 HepG2 细胞中转染 pGL3-NINJ1-9p 后,20 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素可使报告基因活性下降 40% ($P<0.05$,图 4A);而 20 $\mu\text{mol/L}$ 阿尔维林则可使细胞中报告基因的活性提高 60% ($P<0.05$,图 4A)。此外,在 HepG2 细胞株中,DMSO、木犀草素和阿尔维林处理后,转染 pGL3-NINJ1-9p 的细胞报告基因活性较转染对照质粒的细胞升高($P<0.05$,图 4B)。比较转染 pGL3-NINJ1-9p 的各组细胞报告基因活性发现,与对照组相比木犀草素处理组 HNF4 α 的活性降低($P<0.05$),而阿尔维林处理组 HNF4 α 的活性升高($P<0.05$,图 4B),表明报告基因载体 pGL3-NINJ1-9p 可灵敏地检测小分子化合物对 HNF4 α 的活性影响。

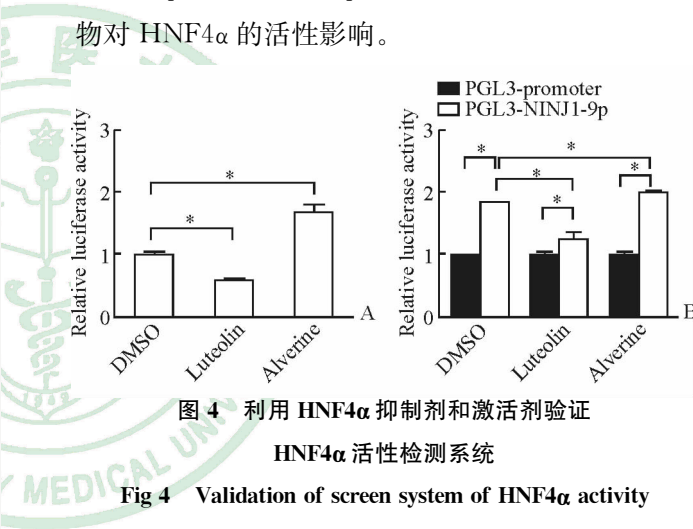


图 4 利用 HNF4 α 抑制剂和激活剂验证
HNF4 α 活性检测系统

Fig 4 Validation of screen system of HNF4 α activity
by inhibitor and activator of HNF4 α

A: HepG2 cells with HNF4 α overexpression were treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ luteolin or 20 $\mu\text{mol/L}$ alvernine for 24 h; B: HepG2 cells transfected with pGL3-promoter or pGL3-NINJ1-9p were treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ luteolin or 20 $\mu\text{mol/L}$ alvernine for 24 h. HNF4 α : Hepatocyte nuclear factor 4 α ; DMSO: Dimethyl sulfoxide; NINJ1: Ninjurin 1. * $P<0.05$. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

HNF4 α 为高度保守的配体依赖型核受体蛋白^[1],通过同源二聚体的形式与多种参与调控肝脏功能的下游靶基因启动子结合并发挥作用,包括脂质转运、葡萄糖代谢、脂肪酸代谢、尿素生成、蛋白合成等相关分子;近期大量研究显示,HNF4 α 在调控参与药物代谢基因的过程中也起到重要作用^[12-16],表明 HNF4 α 是维持肝脏功能的重要转录因子。同时,我们和其他研究者的工作也证实,在肝纤维化和

肝癌中 HNF4 α 的表达或活性下降^[2-3], 从而发现调控 HNF4 α 活性的方法, 为肝纤维化或肝癌治疗提供了新策略。

HNF4 α 早期因其无明确的配体而被认为是孤儿核受体 (orphan nuclear receptor)。但 Hertz 等^[17]研究表明, 脂肪酸可作为配体与 HNF4 α 结合, 并认为脂肪酸对 HNF4 α 的调控取决于脂肪酰基 CoA 硫酯的链长和配体的饱和程度, 但这一发现缺乏具体的结构证据。Yuan 等^[18]利用亲和分离层析法证明亚油酸 (linoleic acid) 可作为 HNF4 α 的内源性可逆结合配体, 但对 HNF4 α 的转录激活无明显作用。此外, 有文献报道某些临床药物可调控 HNF4 α 的活性, 如 Lee 等^[19]在筛选逆转脂肪酸棕榈酸酯对人胰岛素启动子活性抑制作用的化合物时, 发现阿尔维林是 HNF4 α 的潜在激活剂, 但其影响 HNF4 α 活性的机制及两者的结合情况均不明确。此外, 有研究报道木犀草素可与 HNF4 α 的配体结构域结合, 是 HNF4 α 的抑制剂^[20], 但这些药物在临床上存在难吸收和心脑血管不良反应等缺点。近年来, 研究人员在利用胰岛细胞筛选人胰岛素启动子的调控效应物时, 获得了调控 HNF4 α 活性的异咪唑类化合物 BI6015^[21]等小分子化合物, 虽然其对肝细胞的作用尚不明确, 但这一利用 HNF4 α 下游基因启动子筛选化合物的方法为我们构建肝细胞中调节 HNF4 α 活性的小分子化合物提供了支持。NINJ1 基因是 Bolotin 等^[10]发现的 HNF4 α 直接靶基因, 其启动子序列同时满足以下 3 个条件: 具有 HNF4 α 结合位点 (由 PBM/SVM 检索获得); 在体内与 HNF4 α 结合 (ChIP 分析证实); 当 HNF4 α 表达下调时其表达量也降低 (RNA 干扰实验证实)。他们的研究表明, 其他 HNF4 α 调控的下游基因大多只满足以上 3 个条件中的 1~2 个。因此利用 NINJ1 启动子序列建立的筛选系统能更直接反映肝细胞 HNF4 α 的活性。

本研究通过报告基因实验比较了报告基因质粒 pGL3-NINJ1-3p 和 pGL3-NINJ1-9p 检测肝癌细胞内 HNF4 α 活性的灵敏度, 发现 pGL3-NINJ1-9p 相比 pGL3-NINJ1-3p 具有更高的检测灵敏度, 表明 HNF4 α 反应元件拷贝数的增加可提高报告基因系统的灵敏度。蛋白热迁移实验是筛选与蛋白发生直接结合的小分子的高通量技术, 当蛋白被加热时, 荧

光染料 SYPRO Orange 可与蛋白结构中暴露的疏水域结合并产生荧光, 进而获得蛋白的熔解温度 (T_m)。若小分子能够结合蛋白并影响蛋白的热稳定性, 则蛋白的 T_m 将会发生迁移, 通过监测 T_m 的改变便可判断小分子在体外是否能与蛋白相互结合。本研究利用该技术进一步明确了木犀草素和阿尔维林与 HNF4 α 蛋白的结合, 同时发现 pGL3-NINJ1-9p 能灵敏地检测出木犀草素和阿尔维林处理后 HepG2 细胞中 HNF4 α 的转录活性变化, 表明 pGL3-NINJ1-9p 可用于通过高通量筛选所获得的小分子化合物对 HNF4 α 转录活性影响的复筛研究。此外, pGL3-NINJ1-9p 可灵敏检测出 HNF4 α 表达量的改变, 表明该系统还可用于筛选调控 HNF4 α 表达的小分子化合物。

综上, 本研究建立了一种基于报告基因系统检测小分子化合物调控 HNF4 α 转录活性的实验方法, 有望用于筛选调控 HNF4 α 表达或转录活性的小分子化合物, 为基于调控 HNF4 α 活性的肝纤维化和肝癌治疗候选药物的筛选提供有效工具。

[参考文献]

- [1] WALESKY C, APTE U. Role of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) in cell proliferation and cancer[J]. *Gene Expr*, 2015, 16: 101-108.
- [2] YIN C, LIN Y, ZHANG X, CHEN Y X, ZENG X, YUE H Y, et al. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4 α gene [J]. *Hepatology*, 2008, 48: 11-21.
- [3] YUE H Y, YIN C, HOU J L, ZENG X, CHEN Y X, ZHONG W, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α attenuates hepatic fibrosis in rats[J]. *Gut*, 2010, 59: 236-246.
- [4] HANSE E A, MASHEK D G, BECKER J R, SOLMONSON A D, MULLANY L K, MASHEK M T, et al. Cyclin D1 inhibits hepatic lipogenesis via repression of carbohydrate response element binding protein and hepatocyte nuclear factor 4 α [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11: 2681-2690.
- [5] CHIBA H, ITOH T, SATOHISA S, SAKAI N, NOGUCHI H, OSANAI M, et al. Activation of ρ 21CIP1/WAF1 gene expression and inhibition of cell proliferation by overexpression of hepatocyte nuclear

- factor-4 α [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 302: 11-21.
- [6] SLADEK F M, ZHONG W M, LAI E, DARNELL J E Jr. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily[J]. *Genes Dev*, 1990, 4 (12B): 2353-2365.
- [7] MANGELSDORF D J, EVANS R M. The RXR heterodimers and orphan receptors[J]. *Cell*, 1995, 83: 841-850.
- [8] WALLERMAN O, MOTALLEBPOUR M, ENROTH S, PATRA K, BYSANI M S, KOMOROWSKI J, et al. Molecular interactions between HNF4 α , FOXA2 and GABP identified at regulatory DNA elements through ChIP-sequencing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: 7498-7508.
- [9] CHANDRA V, HUANG P, POTLURI N, WU D, KIM Y, RASTINEJAD F. Multidomain integration in the structure of the HNF-4 α nuclear receptor complex [J]. *Nature*, 2013, 495: 394-398.
- [10] BOLOTIN E, LIAO H, TA T C, YANG C, HWANG-VERSLUES W, EVANS J R, et al. Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4 α target genes using protein binding microarrays[J]. *Hepatology*, 2010, 51: 642-653.
- [11] 邓龙飞, 丁晨红, 谢渭芬, 张新. PEP-1 介导的重组肝细胞核因子 4 α 蛋白转导对肝癌细胞的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2015, 36: 929-935.
- DENG L F, DING C H, XIE W F, ZHANG X. Inhibitory effect of PEP-1-mediated recombinant hepatocyte nuclear factor 4 α transduction on hepatocellular carcinoma cells[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2015, 36: 929-935.
- [12] HAYHURST G P, LEE Y H, LAMBERT G, WARD J M, GONZALEZ F J. Hepatocyte nuclear factor 4 α (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 1393-1403.
- [13] BARRY W E, THUMMEL C S. The *Drosophila* HNF4 nuclear receptor promotes glucose-stimulated insulin secretion and mitochondrial function in adults [J/OL]. *Elife*, 2016, 5: e11183. doi: 10.7554/eLife.11183.
- [14] INOUE Y, PETERS L L, YIM S H, INOUE J, GONZALEZ F J. Role of hepatocyte nuclear factor 4 α in control of blood coagulation factor gene expression[J]. *J Mol Med*, 2006, 84: 334-344.
- [15] DESAI S S, TUNG J C, ZHOU V X, GRENET J P, MALATO Y, REZVANI M, et al. Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 α [J]. *Hepatology*, 2016, 64: 261-275.
- [16] TRACY T S, CHAUDHRY A S, PRASAD B, THUMMEL K E, SCHUETZ E G, ZHONG X B, et al. Interindividual variability in cytochrome P450-mediated drug metabolism[J]. *Drug Metab Dispos*, 2016, 44: 343-351.
- [17] HERTZ R, MAGENHEIM J, BERMAN I, BAR-TANA J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 α [J]. *Nature*, 1998, 392: 512-516.
- [18] YUAN X, TA T C, LIN M, EVANS J R, DONG Y, BOLOTIN E, et al. Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor [J/OL]. *PLoS One*, 2009, 4: e5609. doi: 10.1371/journal.pone.0005609.
- [19] LEE S H, ATHAVANKAR S, COHEN T, PIRAN R, KISELYUK A, LEVINE F. Identification of alverine and benfluorex as HNF4 α activators[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 1730-1736.
- [20] LI J, INOUE J, CHOI J M, NAKAMURA S, YAN Z, FUSHINOBU S, et al. Identification of the flavonoid luteolin as a repressor of the transcription factor hepatocyte nuclear factor 4 α [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290: 24021-24035.
- [21] KISELYUK A, LEE S H, FARBER-KATZ S, ZHANG M, ATHAVANKAR S, COHEN T, et al. HNF4 α antagonists discovered by a high-throughput screen for modulators of the human insulin promoter [J]. *Chem Biol*, 2012, 19: 806-818.