

肝细胞生长因子的分子生物学研究

俞水亮 杨复华*

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 肝细胞生长因子(HGF)是一种多功能细胞因子,其分子为异二聚体糖蛋白,有 NK1, NK2, NK4 三个变种。HGF 启动子的结构很复杂,其表达受多种因素和调控元件的调节。因 HGF 在体内有重要作用,HGF 的基因工程表达和基因治疗正在研究中。

关键词 肝细胞生长因子(HGF), 基因表达, 基因工程

中图分类号 Q71 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2002)01-0001-04

肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)最初从大鼠血浆和血小板中分离得到,是一种分泌型肝素亲和糖蛋白,又称为扩散因子(Scatter factor, SF)。现已知 HGF 由间质细胞产生,与受体 c-Met 结合并激活该受体的酪氨酸激酶活性,促进肝细胞、上皮细胞、内皮细胞、黑色素细胞、造血细胞等多种类型细胞的生长、迁移和形态发生。HGF 在胚胎和胎盘的发育中有重要作用,参与维持和更新肝、肺、肾等器官的细胞,并促进这些器官的再生和损伤后修复。此外,HGF 对不同来源的肿瘤细胞有促侵袭或者生长抑制作用。因此,HGF 是一种多功能细胞因子,具有广阔的临床应用前景。

1 HGF 的分子结构

成熟 HGF 是由重链(α 链)与轻链(β 链)通过链间二硫键连接而成的异二聚体。 α 链含 463aa, 约 69kD, β 链含 234aa, 约 34kD。 α 链 N-末端有一发夹结构,靠近其 C-末端有 4 个纤溶酶样 Kringle 结构,依次称为 K1、K2、K3、K4 区,每个 Kringle 结构由约 80aa 组成。现已知,发夹结构和 K1 区是 HGF 与受体 c-Met 结合的关键部位,而发夹结构和 K2 区一起构成 HGF 与肝素及硫酸乙酰肝素亲和的必需结构; β 链含有丝氨酸蛋白酶样折叠区,但没有丝氨酸蛋白酶活性。整个 HGF 分子共有 4 个 N 型糖基化位点,分别处在 Asn294, Asn402, Asn566, Asn653, 重链和轻链各 2 个。

2 HGF 的变种

通过对 HGF cDNA 分析发现, α 、 β 链由同一 ORF 编码,先合成 728aa 的无活性单一分子 pro-HGF 并分泌到细胞外,然后,其 N-端 31aa 的信号肽被切除,再由 HGF-A(HGF activator)切割成 α 、 β 链,成为成熟的异二聚体 HGF。并且,在比较不同的 cDNA 克隆后发现,存在有多种 HGF mRNA 的转录本,

说明 HGF 基因转录后,经过了不同的拼接过程,产生了不同的 mRNA。因这种转录后的拼接,导致了不同的 HGF 变种。

2.1 NK1 分子

NK1 分子由 175aa 组成,包含了 HGF α 链的 N-末端发夹结构以及与发夹结构相邻的 K1 区。体外研究^[1]表明,NK1 可与 c-Met 受体结合,并有一定的促有丝分裂原活性,可通过与 HGF 竞争受体而部分抑制 HGF 引起的靶细胞的 DNA 合成和有丝分裂。Stahl 等研究^[2]发现,在高浓度情况下(为 HGF 浓度的 100 倍)NK1 促 B5/589 人乳房上皮细胞 DNA 合成的活性达到 HGF 的 60%。体内实验^[3]也表明,NK1 的过表达会自分泌而激活 c-Met 受体的酪氨酸激酶活性。因此,此前认为 NK1 作为 HGF 的抑制剂而有一定临床治疗价值的观点将受到重新置疑。

2.2 NK2 分子

NK2 分子由 HGF α 链的 N-末端发夹结构和 K1、K2 区组成。NK2 同样能与 c-Met 受体结合,体外实验证实^[2],NK2 保留了 HGF 部分游走原活性,部分促进细胞的游走,但缺乏有丝分裂原活性,可明显抑制 HGF 的促有丝分裂作用。最近的研究^[4]证实这一结论在体内同样成立。

2.3 FLPSS 分子

FLPSS 分子是 pro-HGF 的自然变种,因在其编码区缺失 15bp,故在 K1 区缺失了 5aa,为 723aa 的单分子形式。但这一缺失不影响其分泌后的加工,仍可被酶切为少 5aa 的双链 HGF 形式。与全长 pro-HGF 分子比较,FLPSS 分子存在的数量少,与肝素的亲和力略有降低,其它性质基本一致。

2.4 NK4 分子

较晚发现的 HGF 变种是 NK4,它包括 HGF α 链的 N-末端发夹结构和 4 个 Kringle 结构,但缺失 β 链。NK4 可单独与 c-Met 受体结合,但不诱导其 Tyr 磷酸化,不表现 HGF 的任何

活性。体外、体内实验均表明^[5,6],NK4 可与 HGF 竞争受体,从而拮抗 HGF 诱发的肿瘤细胞侵袭、迁移,促进肿瘤细胞的凋亡,在癌细胞的转移控制中有重要意义。因此,NK4 作为 HGF 的抑制剂,具有潜在的临床应用价值。此外,利用 NK4 进行的研究有助于阐明 HGF 与受体相互作用的机制。Kunio 等^[7]认为当 NK4 与 c-Met 受体结合时,其 N-末端发夹结构和 K1、K2 区占据了 c-Met 受体,而 K3 和 K4 区的存在则使 c-Met 受体上的 β 链结合位点充分暴露, β 链与受体结合,使 c-Met 二聚化,从而诱导受体的 Tyr 磷酸化及细胞的有丝分裂、迁移和形态发生。

3 HGF 的基因结构及表达调控

3.1 HGF 的基因结构

HGF 基因定位于人 7 号染色体的长臂上(7q21.1),长约 70kb,只有 1 个拷贝。由 18 个外显子组成,其间被 17 个内含子分隔。其中,第 1 个外显子包含 5'-端非编码区和信号肽编码区;第 2~11 个外显子,分成 5 对,分别编码 HGF 的 α 链氨基末端和 4 个 Kringle 结构;第 12 个外显子编码重链和轻链间的连接区,而剩余的 6 个外显子编码轻链的丝氨酸蛋白酶样结构区。第 18 个外显子除编码 β 链 C-端末尾的 58aa 外,还含有大约 3kb 的 3'-端非编码区。HGF 基因具有 3 个不同的转录起始点,其主要转录起始点位于翻译起点上游 76bp 处。HGF 基因外显子和内含子的这种排列方式,与纤溶酶原基因非常相似,说明它们在进化上有亲缘关系。同时,对多种生物基因组的比较分析发现,HGF 基因的碱基序列在进化上高度保守,证明 HGF 在生物体内有重要意义。

3.2 HGF 启动子与 HGF 的表达调控

现已知,HGF 的表达受多种细胞因子、激素及生长因子的调节,如 IL-1、IL-6 和 EGF 可促进 HGF 在成纤维细胞及人胚肺细胞中的表达,而 TGF- β 和地塞米松(9- α -氟-16-甲基脱氢皮质醇)可抑制上述细胞中 HGF 的表达。此外,在哺乳动物的发育过程中,HGF 的表达具有组织特异性和时间依赖性,提示 HGF 的表达同时也受发育进程的调节。

HGF 的表达调控主要发生在转录水平。通过对小鼠的 HGF 启动子及其 5'-端旁侧区的序列分析发现,HGF 启动子的结构非常复杂。在 -30bp 处有一个不规范的 TATAbox(ATAAA),在 TATAbox 及转录起始位点附近的序列中发现了多个 DNA 序列调控元件,包括 4 个 IL-6 反应元件,1 个 NF-IL-6 结合位点,2 个肝特异性转录因子(C/EBP)结合元件,1 个 Pu.1/ETS 结合元件,1 个 TGF- β 抑制元件(TIE),1 个 AP-1 保守序列,2 个雌激素效应元件(Estrogen responsive element, ERE),1 个糖皮质激素反应元件(GRE)及维生素 D 反应元件(VDRE),1 个鸡卵清蛋白上游启动子转录因子(Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, COUP-TF)结合元件和 1 个 cAMP 效应元件(CRE)。

近年的研究已陆续地证实了上述一部分调控元件,并发现了一些新的调控元件。Jiang 和 Zamegar^[8]研究发现,C/EBP α 、 β 、 δ 三种形式都可结合到 HGF 启动子的 -6~+7 序列

上,刺激 HGF 启动子的活性。而且,他们发现在 -16~+11 之间存在一个可与某种新转录因子结合的调控元件,一旦这一序列被该种转录因子结合,则会阻断 C/EBP 家族与启动子中心的结合,从而抑制 HGF 启动子的活性。而这种抑制反之又可被 C/EBP- β (血清型)、TNF- α 、IL-6 和 EGF 的上调作用克服。他们还在 -872~-860 处找到了 ERE,可供核内孤儿受体(Orphan receptor)COUP-TF 与雌激素受体(ER)结合。因为 ER 和 COUP-TF 竞争结合 ERE,故 ER 可以抗 COUP-TF 在 HGF 启动子上的下调作用^[9]。他们还在 -318~-303 区间找到了一个增强子元件,与 SP1 和 SP3 结合,激活 HGF 启动子^[10]。1995 年 Schlutter 等发现的 -258~-229 区间的负调控元件也被重新认识。最近的研究^[11]表明,它是一个复合的多功能 DNA 元件。USF(Upstream stimulatory factor)家族因子和 NF-1 家族因子与此位点有高亲和力,并且,NF-1 家族因子抑制 HGF 启动子活性,USF 家族则激活它,两者形成竞争关系。同为这一序列,一个 AP-2 结合位点也被发现。体外实验^[12]证实,AP-2 结合到该位点后,强烈抑制 HGF 启动子的活性。

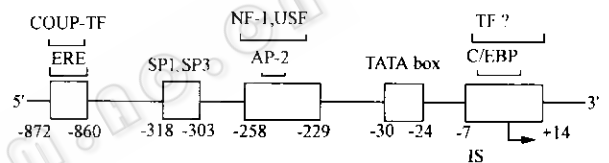


图 1 HGF 启动子及其调控元件

Fig. 1 The promoter and regulatory elements of HGF

近年来,激素对 HGF 表达的调控也为实验所证实,Brotten 等^[13]在体外发现去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)能促进 HGF 在 MRC-5 成纤维细胞中的转录。他们认为,NE 一方面通过与 β -肾上腺能受体作用,激活 PKA,PKA 磷酸化 C/EBP- β ,使 C/EBP- β 进入核内,促进 HGF 的表达;同时,PKA 还激活 CREB(cAMP response element binding protein)来增加 C/EBP- β 基因的转录。另一方面,NE 还可由 α_1 -肾上腺能受体通过磷酸肌醇途径激活钙调蛋白和 PKC,进一步激活 CREB 和 C/EBP- β ,从而促进 HGF 的表达。

因为 HGF 的表达有非常复杂的调控机制,彻底清楚 HGF 的表达调控仍需进一步的研究,序列分析推定的某些调控元件还有待实验证实,激素和细胞因子调控的信号传递途径也有待深入认识。

4 HGF 的基因工程表达

作为具有多种生物学功能的细胞因子,HGF 已被应用于临床疾病的治疗,其来源主要是从人血浆和人胎盘中提取纯化。但机体内 HGF 浓度很低,超过 100L 的人血浆仅能提取 50~100 μ g HGF,超过 50 个人胎盘仅可获得 1mg HGF。而且,制备的 HGF 往往是单链 pro-HGF 与异二聚体 HGF 的混合物,这样制备 HGF 既费时、费力,且成本高昂。因此,利用基因工程表达重组人 HGF(rhHGF)是大量获取具生物活性 HGF 的有效途径。

Nakamura 等早在 1989 年就用 HGF 全长 cDNA 转染 COS 细胞株而获得 HGF 的稳定表达,但产量很低。其后,有人通过 cDNA 瞬时转染或构建表达质粒的方法,分别在 MDCK、CHO 及 MLE-10 等细胞中表达了具有生物活性的 HGF,但产量均很低,得到的 HGF 仅能应用于 HGF 功能和结构方面的科学研究。Zarnegar 的实验室 1993 年将 HGF cDNA 与杆状病毒重组,以构建的重组病毒感染昆虫细胞株 Hi-5 和 Sf9,得到相对大量的 HGF(3~8mg/L 培养液)。但细胞培养液中需加入 10% 的小牛血清(FBS),利用 FBS 中的 HGF-A 将分泌到细胞外的单链 Pro-HGF 切割成异二聚体成熟的 HGF。最近,有人对这一杆状病毒表达系统作了改进^[14],利用无血清培养液培养来自粘虫的 SL-7B 细胞,然后用克隆有 HGF 基因的重组杆状病毒去感染,结果发现 SL-7B 细胞合成并分泌 pro-HGF,pro-HGF 在无血清(即无 HGFA)的情况下被转化为异二聚体具活性的 HGF。这一结果提示 SL-7B 细胞中产生一种 HGFA 的同功酶,可正确切割 pro-HGF。在表达体系中不提供血清的好处有三:①降低成本;②杜绝因血清感染性物质对细胞的污染;③简化了下游提纯工艺。

存在的问题是上述表达系统均难以实现产业化,不能提供大量的有活性的人 HGF 供临床使用。同时,因 HGF 有 4 个糖基化位点,所以在原核系统中获取完全活性的 HGF 似乎不现实。不过有趣的是,Stahl 等利用大肠杆菌表达了 HGF 的两个变种 NK1 和 NK2,通过对它们的结构和生物活性分析发现,它们保持着天然 NK1 和 NK2 的构型,其生物活性与真核表达的 NK1、NK2 没有差别^[2]。这可能与 NK1、NK2 上没有糖基化位点有关。目前为止,尚未见原核表达全长有活性 HGF 的报道。同时,HGF 在酵母系统中的表达也未见报道。

5 HGF 与基因治疗

HGF 促进肝的发育和再生,并有抗肝细胞凋亡的活性,对肝癌细胞的生长有抑制作用。因此,有人尝试用 HGF 作肝癌的基因治疗。实验证实,肝癌细胞(HepG2)转染 HGF cDNA 后,较对照细胞生长缓慢,转到裸鼠体内后致瘤性减弱,说明 HGF 在肝癌细胞中的自分泌作用对抑制肝癌细胞的生长有一定效果。

当前,HGF 在基因治疗方面的应用主要有两个方面。一方面,将 HGF 基因直接转入动物模型体内,使动物稳定合成较高水平的 HGF,治疗肝癌或肝硬化。VeKi^[15] 等用二甲基亚硝胺处理大鼠,得到致死性肝硬化动物模型,然后向骨骼肌重复转染人 HGF 基因,诱导了大鼠血浆中人 HGF 和内源性的大鼠 HGF 水平的升高及 c-Met 受体的 Tyr 磷酸化;同时,抑制了 TGF- β 的表达(TGF- β 在肝硬化的发展中有重要意义),还抑制了纤维的发生和肝细胞的凋亡,并完全清除了硬化肝脏中的纤维变性,提高了大鼠的成活率。

另一方面,用 HGF 处理动物模型,使肝细胞分裂,便于逆转录病毒载体介导的基因导入,提高基因治疗的效率。大鼠模型实验表明,由门静脉注入逆转录病毒后直接注入 HGF^[16],或将角质形成细胞生长因子(Keratinocyte growth fac-

tor,KGF)与 HGF 联合使用^[17],均可大大提高逆转录病毒载体的基因转导效率。Nguyen 等^[18]利用 HGF 与其受体 c-Met 高度亲和的特性,用基因工程方法将 HGF 与病毒的跨膜包膜糖蛋白融合表达,展示在鼠源双嗜性逆转录载体表面,使病毒载体对携带 c-Met 受体的细胞具有更高的感染效率。体外实验证实,这种改造后的嵌合病毒载体对 MDCK 细胞和原代肝细胞的感染效率显著提高。这无疑为设计具细胞特异性的高效率逆转录病毒载体提供了一个新思路。最近,Gao 等^[19]用 HGF 基因取代 HGF 导入小鼠体内,以利于逆转录病毒载体携带外源基因转导肝细胞。首先由肌肉注射带有 HGF 基因的腺病毒载体(Ad.CMV.HGF),使小鼠的血和肝内 HGF 浓度达到中等水平,并诱发 3%~12% 的肝细胞复制。在肝细胞复制的高峰期静脉注射表达 β -半乳糖苷酶的逆转录病毒载体后,约 8% 的肝细胞被转导。而且,肝脏中未见致细胞病变效应,腺病毒载体在体内不复制或极低水平复制。这说明肌注 Ad.CMV.HGF 是一种安全有效提高肝内基因治疗效率的方法。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Clioce V, Csaky K G, Chan A M L *et al.* Hepatocyte growth factor (HGF)/NK1 is a naturally occurring HGF/scatter factor variant with partial agonist/antagonist activity. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 13110 ~ 13115
- [2] Stahl S J, Wingfield P T, Kanfman J D *et al.* Functional and biophysical characterization of recombinant human hepatocyte growth factor isoforms produced in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1997, **326**: 763 ~ 772
- [3] Jakubczak J L, Lakochelle W J, Merlino G. NK1, a natural splice variant of hepatocyte growth factor/scatter factor, is a partial agonist *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**: 1275 ~ 1283
- [4] Otsuka T, Jakubczak J, Merlino G *et al.* Disassociation of Met-mediated biological responses *in vivo*: the natural hepatocyte growth factor/scatter factor splice variant NK2 antagonizes growth but facilitates metastasis. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 2055 ~ 2065
- [5] Date K, Matsumoto K, Nakamura T *et al.* Inhibition of tumor growth and invasion by a four-Kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor. *Oncogene*, 1998, **17**: 3045 ~ 3054
- [6] Parr C, Hiscox S, Nakamura T *et al.* NK4, a new HGF/SF variant, is an antagonist to the influence of HGF/SF on the motility and invasion of colon cancer cells. *Int J Cancer*, 2000, **85**: 563 ~ 570
- [7] Matsumoto K, Kataoka H, Nakamura T *et al.* Cooperative interaction between α - and β -chains of hepatocyte growth factor on c-Met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 22913 ~ 22920
- [8] Jiang J G, Zarnegar R. A novel transcriptional regulatory region within the core promoter of the hepatocyte growth factor gene is responsible for its inducibility by cytokines via the C/EBP family of transcription factors. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 5758 ~ 5770
- [9] Jiang J G, Bell A, Zarnegar R *et al.* Transcriptional regulation of the hepatocyte growth factor gene by the nuclear receptors chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor and estrogen recep-

- tor. *J Biol Chem*, 1997, **272**:3928 ~ 3934
- [10] Jiang J G, Chen Q Y, Zarnegar R *et al*. Transcriptional regulation of the hepatocyte growth factor (HGF) gene by the Sp family of transcription factors. *Oncogene*, 1997, **14**:3039 ~ 3049
- [11] Jiang J G, Gao B, Zarnegar R. The concerted regulatory functions of the transcription factors nuclear factor-1 and upstream stimulatory factor on a composite element in the promoter of the hepatocyte growth factor gene. *Oncogene*, 2000, **19**:2786 ~ 2790
- [12] Jiang J G, Defrances M C, Zarnegar R *et al*. The repressive function of AP2 transcription factor on the hepatocyte growth factor gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, **272**:882 ~ 886
- [13] Broten J, Michalopowlos G, Cruise J *et al*. Adrenergic stimulation of hepatocyte growth factor expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **262**:76 ~ 79
- [14] Wang M Y, Yang Y H, Lee H S *et al*. production of functional hepatocyte growth factor (HGF) in insect cells infected with an HGF-recombinant baculovirus in a serum-free medium. *Biotechnol Prog*, 2000, **16**:146 ~ 151
- [15] Ueki T, Kaneda Y, Fujimoto J *et al*. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med*, 1999, **5**:226 ~ 230
- [16] Kosai K I, Finegold M J, Darlington G J *et al*. Retrovirus-mediated *in vivo* gene transfer in the replicating liver using recombinant hepatocyte growth factor without liver injury or partial hepatectomy. *Hum Gene Ther*, 1998, **9**:1293 ~ 1301
- [17] Bosch A, McCray P B Jr, Davidson B L *et al*. Effects of keratinoocyte and hepatocyte growth factor *in vivo*: implications for retrovirus-mediated gene transfer to liver. *Hum Gene Ther*, 1998, **9**:1747 ~ 1754
- [18] Nguyen T H, Pages J C, Weber A *et al*. Amphotropic retroviral vectors displaying hepatocyte growth factor-envelope fusion proteins improve transduction efficiency of primary hepatocytes. *Hum Gene Ther*, 1998, **9**:2469 ~ 2479
- [19] Gao C H, Jokerst R, Ponder K P *et al*. Intramuscular injection of an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor facilitates hepatic transduction with a retroviral vector in mice. *Hum Gene Ther*, 1999, **10**:911 ~ 922

Molecular Biological Progress of Hepatocyte Growth Factor (HGF)

YU Shui-Liang YANG Fu-Hua*

(College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract Hepatocyte growth factor (HGF) is a multifunctional growth factor which is a heterodimeric glycoprotein molecule. There are three truncated HGF variants: NK1, NK2, NK4. The structure of the promoter of HGF is very complicated, and the expression of HGF is regulated by various factors and regulatory elements. Because of the importance of HGF to human body, the genetic engineering expression and gene therapy investigation of HGF are being done.

Key words hepatocyte growth factor (HGF), gene expression, genetic engineering