

生长抑制因子 (ING) 抑癌基因家族的研究进展*

聂晶^{1,2)} 田春艳^{2)**} 贺福初^{1,2)**}

(¹⁾ 清华大学医学院, 北京 100084; (²⁾ 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要 生长抑制因子 (inhibitor of growth, ING) 家族成员是候选的抑癌基因. ING 蛋白参与磷脂酰肌醇介导的脂类信号转导通路及激素介导的通路, 能够与组蛋白乙酰转移酶、去乙酰化酶等结合参与染色质的重构, 调节基因的转录, 与 p53 协同作用, 抑制细胞生长, 诱导细胞凋亡和 DNA 损伤修复. ING 家族成员通过对基因表达的表观遗传学调控将细胞周期、细胞凋亡和衰老等生物学过程有机联系起来.

关键词 生长抑制因子(ING), PHD 结构域, 抑癌基因, 表观遗传学调控, 磷脂酰肌醇(PtdInsPs)

学科分类号 Q25

肿瘤是危害人类健康的最重要的疾病, 肿瘤的发生涉及众多因素, 其中癌基因的激活与抑癌基因的失活是两大关键因素. p53、Rb、p14^{ARF}等抑癌基因因其在肿瘤发生中的重要性受到人们的广泛关注, 而候选抑癌基因生长抑制因子(ING)家族成员也在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用. 1996年, Garkavtsev 等^[1]克隆出一个新的肿瘤抑制基因, 命名为生长抑制因子1 (inhibitor of growth 1, ING1). 其后, 对此基因家族其他成员也开展了研究, 本文将从ING基因家族的结构特征、系统进化、信号转导通路、生物学功能等方面, 综述ING家族的最新研究进展.

1 ING基因家族的结构特征及系统进化分析

ING基因在许多物种, 如酵母、线虫、果蝇、蛙、小鼠、大鼠和人中广泛存在, 其中对人类的5种ING基因(ING1, ING2, ING3, ING4, ING5)和酵母的3种ING基因(Yng1, Yng2, Pho23)研究较多. 对人类5种ING基因进行染色体定位分析, 它们分别定位于13q34, 4q35, 7q31, 12p13.3, 2q37.3. ING1, ING2, ING4和ING5所在区域与其染色体端粒位置非常接近, 其中ING5可能会受到端粒融合的影响, 而只有ING3位于染色体长臂的中间^[2].

ING蛋白具有4个保守区域: 氨基端为亮氨酸拉链样(leucine zipper-like, LZL)结构域;其后为一段潜在的染色质调节(potential chromatin regulatory domain, PCR)结构域, 含有保守的KIQI/KVQL.

ING蛋白最保守的结构域为近羧基端的PHD (plant homeodomain) 结构域, 含有C4-H-C3型的锌指结构, 从人类至植物的所有ING蛋白成员都具有此完整的PHD结构域^[3](图1). 研究发现, ING蛋白的PHD结构域可以与磷脂酰肌醇单磷酸结合^[3], 参与染色质的重构, 也可以直接与DNA或RNA结合, 调节基因转录. 进一步研究表明, ING2的PHD结构域可以特异识别组蛋白H3第4位三甲基化的Lys (H3K4me3)^[4], 对其复合体的晶体结构解析发现, PHD结构域的Y215和W238残基特异识别H3K4me3, 分子间的氢键及其互补的表面结构对于PHD结构域与H3K4me3高度特异的亲和性是非常重要的, 并对其功能发挥是必需的^[5](图2). ING蛋白的羧基端为蛋白质结合基序(protein-interacting motif, PIM), 富含酸性、碱性和芳香族氨基酸, 在ING1, ING2中较为显著. 核定位序列(NLS)为PHD结构域上游的一段强碱性区域, 包含3个核仁定位信号(NTS), 但NTS只在ING1, ING2中保守, 在其他ING蛋白中缺失^[2].

系统进化分析表明, 脊椎动物和节肢动物的ING蛋白与线虫、真菌及植物的ING蛋白之间没有

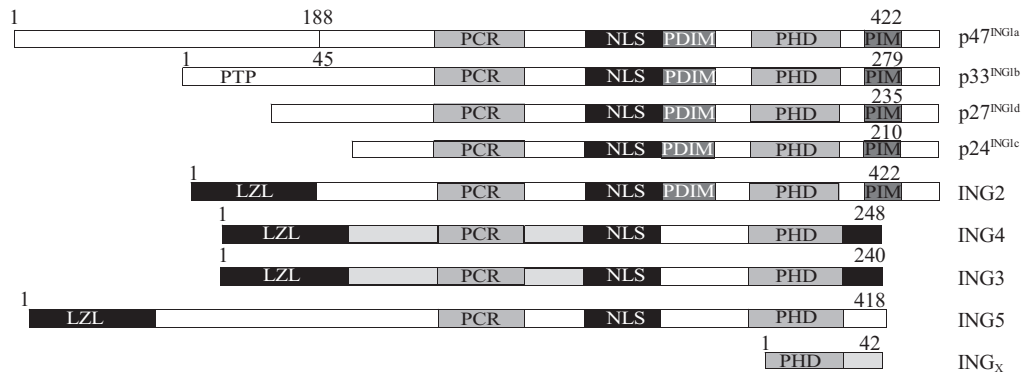
* 国家自然科学基金项目(30600310, 30621063)和国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB910802)资助项目.

** 通讯联系人.

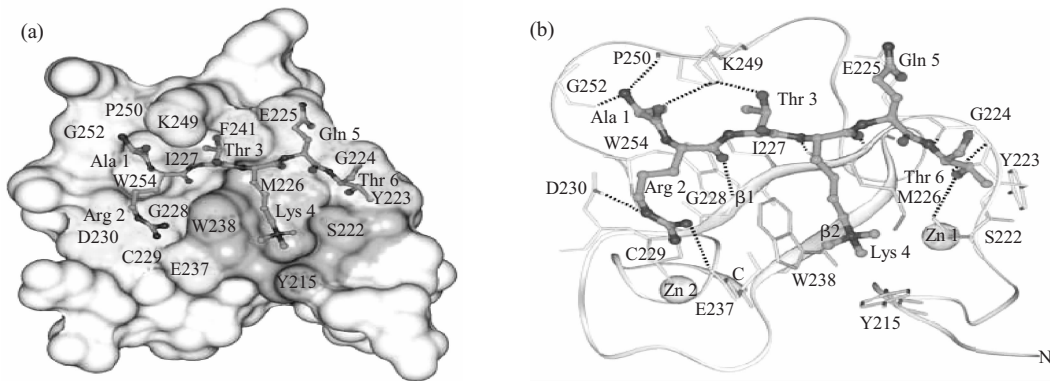
Tel: 010-66931216, Fax: 010-68177417

E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn, tiancy@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2007-05-08, 接受日期: 2007-07-02

Fig. 1 The structural features of hING protein^[2]图 1 人类ING蛋白的结构特征^[2]

LZL: 亮氨酸拉链样结构域; NLS: 核定位序列; PHD: 植物homeo结构域; PDIM: 磷酸化依赖的作用基序; PIM: 脂类作用基序; PCR: 潜在的染色质调节结构域。

Fig. 2 Structure of ING2 PHD finger in complex with a histone H3 peptide trimethylated at Lys 4^[5]图 2 ING2的PHD结构域与组蛋白H3三甲基化的K4复合体的结构^[5]

(a) 固体表面为PHD结构域, 深着色标记的为结合位点. 组蛋白肽段以球棒模型显示. (b) 丝带图的结构示意图.

相似性.人类ING蛋白可以分为3类, 一类为ING1与ING2, ING4与ING5归为一类, 而ING3与其他成员的差异较大.进一步分析显示, ING3与真菌、线虫的某些ING基因可能为旁同源基因, 可见ING3在进化上与其他脊椎动物ING蛋白是不同的, 这与ING3在染色体上独特的定位也是一致的^[2].

2 ING抑癌基因与p53的关系

在许多肿瘤中发现ING蛋白功能丧失, 如氨基酸的突变, 表达下降, 或是定位的改变, 因此认为ING蛋白为肿瘤抑制分子^[6]. ING1是ING家族最先发现的基因, 它具有4种不同的剪接体形式, 其中研究较多的为p^{33ING1b}. 1998年, Garkavtsev等^[7]首先报道p^{33ING1b}可以直接与抑癌分子p53结合, 并激活p53转录活性, 二者协同作用抑制细胞生长^[7].进一步研究表明, 人类的所有ING蛋白都可以促进p53

的转录活性, 增强其下游靶分子p^{21WAF1}、Bax等的表达, 诱导细胞凋亡, 促进周期阻滞, 抑制细胞生长^[8~10], 通过p53依赖的方式发挥其肿瘤抑制的功能.

ING蛋白对p53的调控主要通过3个方式: a. 首先, ING1、ING2能够将组蛋白乙酰转移酶或组蛋白去乙酰化酶(HAT/HDAC)等募集到p53靶分子的启动子区, 使染色质变松散; b. ING1、ING2结合HAT至p53蛋白, 促进p53乙酰化; c. ING1能够抑制p53去乙酰化酶SIRT1对p53的去乙酰化修饰^[9]. 此外, ING1还可以与p53的泛素连接酶HDM2竞争与p53的结合, 从而降低HDM2对p53的泛素化降解, 稳定p53的蛋白质含量^[11].

ING与p53是上下游关系还是并列平行地位, ING蛋白的上下游调控分子等问题目前还没有完全清楚. 但是有结果显示, 在p53突变或缺失的细胞

系中, ING的mRNA及蛋白质表达均不受影响, 推测二者并非上下游的直接调控关系^[8].

3 ING抑癌基因的信号转导通路

作为抑癌基因, ING家族成员能够感受到DNA损伤刺激, 当UV、MMS、Etoposide等因素作用

时, ING蛋白起始其下游特定的信号通路, 调节DNA损伤修复、细胞周期阻滞及凋亡. 不同的ING分子具有不同的相互作用蛋白质网络, 介导了不同的信号通路, 共同发挥其抑制肿瘤发生的作用(图3).

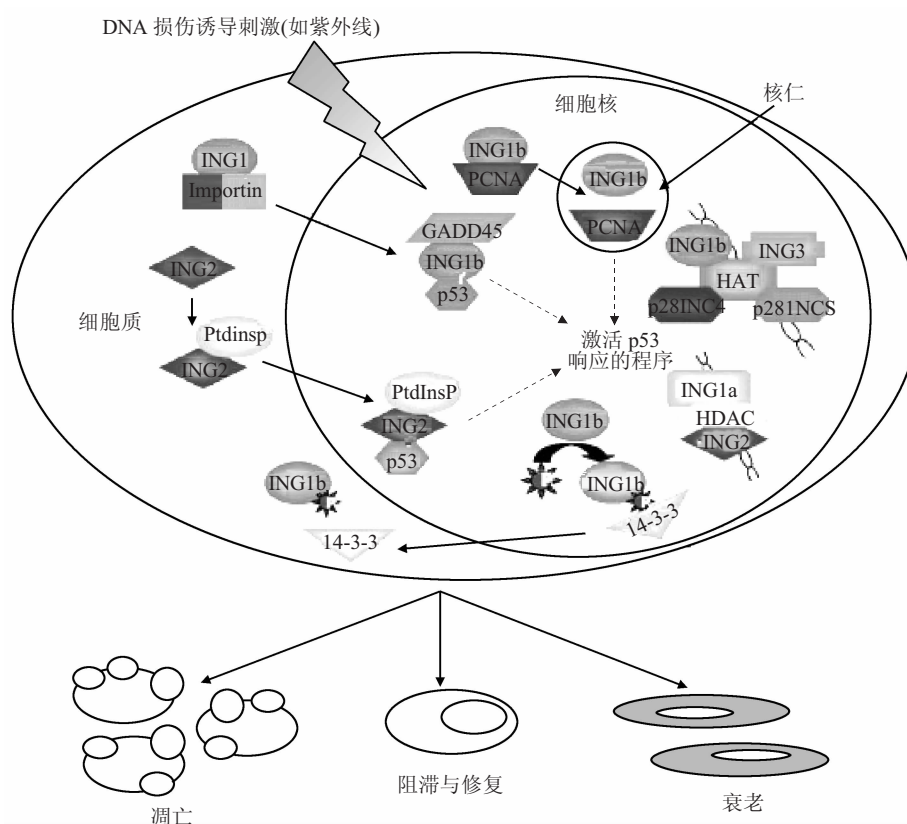


Fig. 3 Major protein-protein interactions involving the ING family and the major tumor suppressive pathways ^[25]

图3 ING蛋白的主要相互作用分子及其抑癌功能通路 ^[25]

ING蛋白与生长阻滞、衰老、凋亡和DNA损伤反应等重要的肿瘤抑制通路紧密相关. 所有ING家族成员(INGs 1~5)都能与组蛋白修饰复合体(HAT, HDAC)结合, 表明ING蛋白通过对基因表达的表观遗传学调控来调节细胞的生理功能.

在UV照射后, ING1移位入核仁, 并迅速与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合, 取代与PCNA结合促进DNA复制的特定蛋白而诱导细胞凋亡的发生^[12], 同时ING1与PCNA结合后还可以在DNA复制的位点募集其他不同HAT复合体, 从而将DNA损伤与染色质修饰联系起来. 另外, ING1也可以与GADD45 (growth inhibitor after DNA damage45)蛋白结合, 增强紫外线诱导的DNA损伤的修复^[13]. 在人的成纤维细胞中抑制ING1的表达会导致细胞生命期限的延长, 表明ING1在衰老的起始中发挥作用^[14]. ING1基因敲除的小鼠易于患早期淋巴瘤, 同时对 γ 射线辐射有较高的敏感性^[15].

Gozani等^[3]的研究发现, PHD结构域可作为磷脂酰肌醇结合基序, 首次揭示了ING2是磷脂酰肌醇-5-磷酸(PtdIns-5-P)的核受体, 大大扩展了脂类信号分子在核内转导作用. PtdIns-5-P在细胞内含量较少, 它会被PIP4K α 激酶磷酸化为PtdIns(4,5)P₂. 在紫外线照射、超氧化物刺激等DNA损伤因素处理下, MAPK (mitogen-activated protein kinases) 通路成员p38被磷酸化激活, 进而促进PIP4K α 第326位丝氨酸磷酸化, 减弱其激酶活性, 从而提高PtdIns-5-P的含量. 核内的ING2能够感受到PtdIns-5-P的含量变化, 因此当DNA损伤时, ING2含量增加, 并发生移位, 核内定位增强而胞质定位减弱. 进一步研究显示, ING2增强p53和组蛋白的乙酰化水

平, 诱导G1期细胞周期阻滞和细胞凋亡的功能是依赖于它与PtdIns5P的结合^[16].

除了DNA损伤刺激信号, ING蛋白也参与一些激素信号通路. 甲状腺激素(thyroid hormone, TH) 处理后, ING1和ING2的爪蟾同源基因xING1和xING2表达升高, 在凋亡的蝌蚪组织中积累, 可见ING蛋白在两栖动物发育过程的激素介导的信号转导通路中发挥重要作用^[17]. 近来有研究表明, ING在雌激素信号通路中也存在一定作用, ING1可以直接与雌激素受体 α (ER α) 结合, 并调控其报告基因活性^[18], 而ER α 可以通过对组蛋白乙酰化的修饰调节基因表达, 进一步表明ING蛋白对染色质的重构起到重要作用.

4 ING抑癌基因在基因表达表观遗传学调控中的作用

在真核生物中, DNA与组蛋白组装成高度有序的染色质结构, 而乙酰化、磷酸化和甲基化等翻译后修饰形式可以通过对组蛋白氨基端尾巴的修饰, 进行核小体的重构, 影响转录因子与启动子区的结合, 从而调节下游基因的转录, 构成表观遗传学修饰的重要组成部分. 研究表明, 对抑癌基因与癌基因的翻译后修饰等机制的探索, 对于肿瘤的发生发展具有重要意义.

含有PHD结构域的许多分子都参与染色质的重构, ING蛋白与组蛋白修饰的关联研究最早是在酵母中进行的, 通过酵母双杂交实验得到ING在酵母中的3种同源分子均可以与HAT结合^[19]. 人类ING蛋白通过其PHD结构域可以与HAT、HDAC等染色质修饰酶类结合形成复合体. ING复合体通过其PHD结合域, 能够识别组蛋白氨基端尾巴的特定修饰状态, 从而将此复合体锚定到染色质上的特定位置, 其中的HAT或HDAC等通过翻译后修饰或对其邻近的核小体进行重构修饰, 以建立一定的表观遗传状态.

由于ING2的PHD结构域可特异识别组蛋白H3-K4的三甲基化修饰^[4,5], 当DNA损伤时, ING2-mSin3A-HDAC1复合体在某些增殖相关基因的启动子区锚定, 通过去乙酰化修饰抑制相关基因的转录表达, 以发挥ING2抑制细胞生长的功能^[20]. 同样的, 核小体重构因子(NURF)的PHD结构域也能够与组蛋白三甲基化的H3-K4结合, 调控发育进程中HOX基因的表达^[21]. 以往许多研究都表明, H3-K4可被转录激活效应分子所识别, 作为促进基

因转录的标志, 而对PHD结构域的研究拓展了我们对此修饰状态的认识. 可见, 组蛋白的甲基化可引发转录激活或转录抑制, 不仅取决于不同位点的甲基化, 而同一位点甲基化的数目, 甚至同一修饰状态也会导致不同的效应^[22].

因此, 我们推测ING蛋白可能是一种新的核内转导信号的关键成员, 在DNA损伤或其他刺激时, 它们能够作为桥梁与许多不同的染色质修饰酶类结合, 通过特定表观遗传学密码的指引, 将此复合体与具有其他活性的分子或转录因子联系起来, 调节基因的转录, 行使不同的生物学功能^[9].

5 ING抑癌基因家族其他成员的生物学功能

在乳腺癌、胃癌、食道癌、肺癌、血癌及脑瘤中, 抑癌基因ING1表达明显降低, ING家族其他成员如ING3也有类似现象, 而ING4表达的显著下调主要发生在脑瘤^[10]. 近期研究发现, 在神经胶质瘤模型中, ING4可以调节脑瘤的血管生成, ING4能够与NF- κ B结合, 进而调节在脑瘤血管生成中NF- κ B响应基因, 如IL8、IL6、Cox-2等的表达, 从而影响血管的生成. 同时, 在缺少细胞增殖信号时, ING4能够抑制MYCN和MYC诱导的接触抑制效应^[23]. 近来有人发现, ING3过表达能够促进紫外线诱导的细胞凋亡, 而并不依赖于p53的存在, 由此揭示了ING蛋白生物学功能的实现还存在不依赖于p53的途径^[24].

6 展 望

ING蛋白参与许多生物学进程, 如生长的调节、细胞衰老、DNA损伤修复和细胞凋亡等. ING蛋白家族具有高度保守的PHD结构域, 特异识别组蛋白的不同表观遗传修饰状态, 将组蛋白密码进一步翻译为对特定基因转录的调节, 发挥ING家族成员的生物学功能. ING蛋白的功能失调会导致肿瘤的发生, 但是ING蛋白表达下调与癌症发生之间的因果联系, 以及不同的ING蛋白成员在特定细胞中的确切作用及其相互作用的蛋白质还不很清楚, 我们需要对此进行深入研究, 以便揭示ING蛋白在调节细胞生长、凋亡及衰老中特异的生理特性与功能, 及其与其他抑癌基因的相互作用, 并为探索新的肿瘤治疗靶点提供生物学基础与依据^[25].

参 考 文 献

- 1 Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, et al. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic

- transformation. *Nat Genet*, 1996, **14** (4): 415~420
- 2 Gordon H Y H, Helbing C, Wagner M J, *et al.* Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, **22** (1): 104~116
 - 3 Gozani O, Philip K, David R, *et al.* The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell*, 2003, **114** (1): 99~111
 - 4 Shi X B, Tao H, Kay L, *et al.* ING2 PHD domain links histone H3 lysine methylation to active gene repression. *Nature*, 2006, **442** (7098): 96~99
 - 5 Pedro V, Foteini D, Shi X B, *et al.* Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature*, 2006, **442** (7098): 100~103
 - 6 Gong W, Suzuki K, Russell M, *et al.* Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, **37**:1054~1065
 - 7 Garkavtsev I, Grigorian I A, Ossovskaya V S, *et al.* The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature*, 1998, **391**(15): 295~298
 - 8 Nagashima M, Riabowol K, Harris C C, *et al.* DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (17): 9671~9676
 - 9 Shi X B, Gozani O. The Fellowships of the ING's. *J Cell Biochem*, 2005, **96**: 1127~1136
 - 10 Feng X, Hara Y, Riabowol K. Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol*, 2002, **12**(11): 532~538
 - 11 Leung K M, Po L S, Tsang F C, *et al.* The candidate tumor suppressor ING1b can stabilize p53 by disrupting the regulation of p53 by MDM2. *Cancer Res*, 2002, **62** (17): 4890~4893
 - 12 Scott M, Bonnefin P, Veyra D, *et al.* UV-induced association of INGI with PCNA. *J Cell Science*, 2001, **114** (19): 3455~3462
 - 13 Cheung K J Jr, Mitchell D, Lin P, *et al.* The tumor suppressor candidate p33(ING1) mediates repair of UV-damaged DNA. *Cancer Res*, 2001, **61** (13): 4974~4977
 - 14 Garkavtsev I, Riabowol K. Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (4): 2014~2019
 - 15 Kichina J V, Zeremski M, Aris L, *et al.* Targeted disruption of the mouse *ing1* locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene*, 2006, **25** (6): 857~866
 - 16 David R, Yvette B, Keune W, *et al.* Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: An *in vivo* role for PIP4Kbeta. *Molecular Cell*, 2006, **23** (5): 685~695
 - 17 Wagner M J, Gogela-Spehar M, Skirrow R C, *et al.* Expression of novel ING variants is regulated by thyroid hormone in the *Xenopus laevis* tadpole. *J Biol Chem*, 2001, **276** (50): 47013~47020
 - 18 Toyama T, Iwase H, Yamashita H, *et al.* p33(ING1b) stimulates the transcriptional activity of the estrogen receptor alpha via its activation function (AF) 2 domain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, **87** (1): 57~63
 - 19 Loewith R, Meijer M, Riabowol K, *et al.* Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (11): 807~816
 - 20 Kuzmichev A, Zhang Y, Tempst P, *et al.* Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol*, 2002, **22** (3): 835~848
 - 21 Wysocka J, Swigut T, Xiao H, *et al.* A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*, 2006, **442** (7098): 86~90
 - 22 Zhang Y. It takes a PHD to interpret histone methylation. *Nat Structural & Mol Biol*, 2006, **13** (7): 572~574
 - 23 Garkavtsev I, Kozin S V, Chernova O, *et al.* The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature*, 2004, **428** (6980): 328~332
 - 24 Wang Y, Li G. ING3 Promotes UV-induced apoptosis via Fas/Caspase-8 pathway in melanoma cells. *J Biol Chem*, 2006, **281** (17): 11887~11893
 - 25 Russell M, Berardi P, Gong W, *et al.* Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis. *Experimental Cell Research*, 2006, **312**(7): 951~961.

Progress in The Study of Novel Tumor Suppressor of ING Family*

NIE Jing^{1,2)}, TIAN Chun-Yan^{2)**}, HE Fu-Chu^{1,2)**}

⁽¹⁾ *Department of Medical Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China;*

²⁾ *Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)*

Abstract Inhibitor of growth (ING) family proteins belong to candidate tumor suppressor proteins. The ING proteins participate in PtdInsPs-mediated lipid signaling and hormone signaling pathways. They are associated with histone acetyltransferase, histone deacetylase and play a role in chromatin remodeling and gene transcription regulation. ING proteins regulate cell growth, apoptosis and DNA damage repair in p53 dependent manner; thus linking the processes of cell cycle regulation, apoptosis and cellular aging through epigenetic regulation of gene expression.

Key words ING, PHD finger, tumor suppressor, epigenetic regulation, phosphatidy Linosital (PtdInsPs)

* This work was partially supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30600310, 30621063) and The National Basic Research Program of China (2006CB910802).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-66931216, Fax: 86-10-68177417, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn, tiancy@nic.bmi.ac.cn

Received: May 8, 2007 Accepted: July 2, 2007