

ING1 家族各异构体抑制 HeLa 细胞增殖的分子机制研究*

李娜¹⁾ 张英涛^{1)**} 薛丽香^{2)**} 童坦君²⁾

(¹⁾北京大学医学部药学院, 北京 100083; ²⁾北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京大学衰老研究中心, 北京 100083)

摘要 ING1(inhibitor of growth 1)是一个候选抑癌基因家族, p47ING1a、p33ING1b 和 p24ING1c 是其三种剪接异构体. 通过 MTT 法和流式细胞术研究 ING1a、ING1b 和 ING1c 对 HeLa 细胞增殖的影响, 结果发现三者均可将 HeLa 细胞阻滞于 G0/G1 期并抑制细胞生长. 采用 PCR 方法构建 ING1a 和 ING1b 的 PHD 结构域缺失体 1a Δ C 和 1b Δ C, 进而使 ING1a, ING1b、ING1c、1a Δ C 和 1b Δ C 在 HeLa 细胞中过表达. 采用 Western blot 检测上述 HeLa 细胞中 p16^{INK4a}、PTEN/p27^{Kip1} 和 p53/p21^{Waf1} 的表达变化, 结果发现 ING1a、ING1b、ING1c 和 1a Δ C 均可促进 p16^{INK4a} 的表达, 其中 ING1c 的促进作用最为显著, 1b Δ C 则略微抑制了 p16^{INK4a} 的蛋白质表达. 利用荧光素酶分析初步确定 1a Δ C 可增强 p16^{INK4a} 启动子活性而促进 p16^{INK4a} 的转录, 1b Δ C 则抑制了 p16^{INK4a} 启动子活性. 上述结果阐释了 ING1 家族各成员对 HeLa 细胞增殖的影响及其分子机制, 从而确定了各异构体功能的异同及它们所调控的重要基因. 首次发现除 p53/p21^{Waf1} 通路外, ING1 家族各异构体还可通过上调 p16^{INK4a} 和 PTEN 的表达而抑制肿瘤细胞生长, 并且 ING1a 的 PHD 结构域删除体可以增强 p16^{INK4a} 的转录, 这为研究 ING1 家族抑制肿瘤细胞生长的分子机制提供了新的线索.

关键词 ING1, p16^{INK4a}, p53, PHD 结构域

学科分类号 Q291, Q7

ING1(inhibitor of growth 1)家族具有抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、参与 DNA 损伤修复及诱发细胞衰老等功能^[1]. ING1 家族基因含有 3 个外显子(1a, 1b 和 2)及 2 个内含子, 剪接后形成不同的 mRNA 产物. 目前已发现 ING1 剪接异构体有 3 种, 分别为 p47ING1a、p33ING1b 和 p24ING1c. 其中, p24ING1c 最短, 其转录起始于家族共有的第二个外显子. ING1 家族各异构体蛋白的 C 端序列保守, p24ING1c 的氨基酸序列为 3 种异构体共有, 均包含核定位信号和 PHD 锌指结构域. p47ING1a 和 p33ING1b 蛋白的 N 端序列有所不同. p33ING1b 的 N 端含有可与 PCNA 相互作用的 PIP 结构域及可与 HAT 和 HDAC 复合物相互作用的序列. 而 p47ING1a 的 N 端由 188 个氨基酸组成, 只含有可与 HDAC 复合物结合的序列^[2]. p47ING1a 和 p33ING1b 是哺乳动物细胞中的 2 种主要异构体. 3 种异构体中, 关于 p33ING1b 的报道最多, 而另外 2 种异构体的功能尚有待深入研究^[1,3,4]. p33ING1b 在人体正常组织和多种肿瘤细胞

系中呈高表达, 而 p47ING1a 和 p24ING1c 在 HeLa 细胞中呈低表达或表达下调^[3,5], 此表达下调与肿瘤发生发展的关系有待进一步研究.

在 HeLa 细胞中, 人类乳头瘤病毒 E6 可引起 p53 的降解^[6], 因此 p53 的表达量极低. 以往的研究表明, ING1 家族主要通过 p53 依赖途径抑制细胞增殖. p33ING1b 和 p24ING1c 是 p53 蛋白复合物的成员^[7], 可增强 p53 靶基因 p21^{Waf1} 的转录, 进而将细胞阻滞于 G1/S 期^[7]. 但也有研究显示, ING1 与 p53 不是简单的上下游关系, p53 敲除小鼠中, ING1 的表达不受影响^[8]. 另外, 小鼠中 p33ING1b 的同源基因 p37Ing1 可不依赖于 p53 而

* 国家重点基础研究发展规划(2007CB507400), 国家自然科学基金(30500082)资助项目.

** 通讯联系人.

张英涛. Tel: 010-82801454, E-mail: zhang_yingtao@yahoo.com.cn

薛丽香. Tel: 010-82801454, E-mail: lixiangxue@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2008-03-24, 接受日期: 2008-04-15

抑制细胞增殖^[9]。这些均提示除 p53/p21^{Waf1} 通路外, ING1 家族还可能通过影响其他重要的细胞周期调控蛋白而抑制细胞增殖。

周期素依赖性蛋白激酶(CDKs)调控了哺乳动物细胞从 G1 期到 S 期的进程。CDK 抑制剂(CKIs)可以结合到 CDK 或相应的细胞周期蛋白上而抑制细胞生长。p16^{INK4a}、p27^{Kip1} 和 p21^{Waf1} 均是重要的 CKI, 可参与细胞周期调控。此外, 在细胞衰老进程中, p16^{INK4a}/Rb、p19^{ARF}/p53/p21^{Waf1} 和 PTEN/p27^{Kip1} 是 3 条公认的信号通路。这些通路上所涉及的关键调节因子发生突变时, 细胞将延缓衰老或绕过衰老程序继续增殖, 这些通路或分子均可能与 ING1 抑制细胞增殖的生物学功能有关。但目前尚无 ING1 家族各异构体影响 p16^{INK4a}, PTEN 等蛋白分子的报道。

在肿瘤的发生发展中, 细胞异常增生是一个重要特征, 故本研究首先考察了 ING1 各异构体过表达后, HeLa 细胞增殖和周期分布的变化情况, 又进一步检测了细胞周期相关蛋白 p16^{INK4a}、PTEN/p27^{Kip1} 和 p53/p21^{Waf1} 的表达变化, 并对其影响 p16^{INK4a} 表达的机制进行了初步研究, 以期更全面地阐释 ING1 家族各异构体抑制肿瘤细胞增殖的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和表达载体。HeLa 细胞由本室冻存。使用含有 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液, 在饱和湿度, 37℃, 5% CO₂ 的条件下培养。pcDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司。p16 启动子质粒 PGL3-p16-207bp, PGL3-p16-620bp 和 PGL3-p16-2070bp 由本室构建并鉴定^[10]。pCI-p47ING1a, pCI-p33ING1b 和 pCI-p24ING1c 的表达质粒由加拿大 Calgary 大学的 Karl T. Riabowol 教授惠赠^[4, 11]。

1.1.2 酶及主要试剂。限制性内切酶, T4 DNA 连接酶和 Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自 Promega 公司(美国); *pfx* DNA 聚合酶, Thermoscript RT-PCR system 购自 Invitrogen 公司(美国); G418 购自 Sigma 公司(美国); 质粒提取纯化和 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司(德国); 抗 p16^{INK4a} 鼠单抗购自 NeoMarkers 公司(美国); 抗 p21^{Waf1}、抗 p53 鼠单抗购自 MBL 公司(日本); 抗 PTEN、抗 p27^{Kip1} 鼠单抗, 抗 ING1 羊多抗和抗 β -actin 羊多抗购自 Santa Cruze 公司(美国); ECL

检测试剂盒和 BCA 蛋白检测试剂盒购自 Pierce 公司(美国); SYBR GreenMaster Mix 购自 Applied Biosystems 公司(美国); 二抗购自北京中杉金桥公司; 测序及引物合成均由三博远志公司完成。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1(+)-1a, 1b, 1c, 1a Δ C 和 1b Δ C 表达载体的构建。构建 pcDNA3.1(+)-1a, 1b, 1c 表达载体: *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切 pCI-p47ING1a, p33ING1b 和 p24ING1c 的表达载体后, 连接到相同酶切后的 pcDNA3.1(+) 中。构建 PHD 结构域缺失的表达载体 1a Δ C 和 1b Δ C: 以 pCI-1a, 1b 为模板, 在上下游引物的 5' 端分别加上 *Bam*H I 及 *Xho* I 的酶切位点进行 PCR 扩增, 产物酶切回收后克隆到相同酶切后的 pcDNA3.1(+) 载体。以上重组质粒酶切后, 于 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后 UV 灯下观察, 并进一步对阳性重组质粒进行测序鉴定。pcDNA3.1(+)-1a Δ C 和 1b Δ C 的 PCR 引物序列如下: 正向引物, 5' GCGCGGATCCGTATGTCCTTCGTGGAATGTCCT 3'; 反向引物, 5' CCCGCTCGAGCTAGTACGTGGGTTCGTTGGGGTCG 3' (1a Δ C); 正向引物, 5' GCGCGGATCCGTATGTTGAGTCCTGCCAACGGG 3'; 反向引物, 5' CCCGCTCGAGCTAGATGGGGAGGTCGGCAGGGGACG 3' (1b Δ C)。

1.2.2 转染。细胞接种到 10 cm 板中, 用无抗生素的含 10% NCS 的 DMEM 培养基培养细胞生长至 90% 汇合时, 使用 lipofectamine 2000 按照说明进行转染, 5 h 后更换新鲜培养基, 转染 48 h 后收获细胞。

1.2.3 总 RNA 提取, 实时定量 PCR 及 RT-PCR。使用 RNeasy Mini Kit 提取细胞总 RNA, 取 2 μ l 总 RNA 按照 RT-PCR kit 的说明反转录成 cDNA。实时定量 PCR 采用 2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix, 取适量 cDNA 作为模板, 引物浓度 0.4 μ mol/L, 15 μ l 体系进行扩增, 每个样品设置 3 个平行样, 以 GAPDH 作为内参。PCR 反应在 ABI Prism 7300 Sequence Detector 平台上运行。循环参数: 95℃, 10 min; 95℃, 15 s, 60℃, 1 min, 40 个循环。用 Sequence Detector software (version 1.7) 进行数据分析, 相对定量采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 的推导方法。RT-PCR 取 2 μ l cDNA 作为模板, 加入特异基因引物, 50 μ l 体系进行扩增: [Mg²⁺] 2.0 mmol/L, 引物浓度 200 nmol/L, dNTP 浓度 200 nmol/L, 1 μ l Taq DNA 聚合酶进行扩增。以 GAPDH 作为内参。循

环参数为: 94℃, 3 min; 94℃, 30 s, 58℃, 30 s, 72℃, 30 s, 循环数 25 次. 引物序列为 p16INK4a 正向引物, 5' CCCAACGCACCGAAT-AGT 3', 反向引物, 5' ATCTAAGTTTCCCAGG-TT 3'; ING1 正向引物, 5' TGACAAGCCCAACA-GCAAG 3', 反向引物, 5' CACGCACGAGAAGT-GGAAC 3'; GAPDH 正向引物, 5' CGAGTCAA-CGGATTTGGTGGTAT 3', 反向引物, 5' AGCC-TTCTCCATGGTGAAGAC 3'.

1.2.4 蛋白质印迹. 细胞沉淀中加入 3~5 倍体积裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.25 mol/L NaCl, 0.1% Triton-X100, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaF, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L Na₃VO₄)和 0.1 mmol/L PMSF, 1 mg/L leupeptin, 1 mg/L aprotinin 蛋白酶抑制剂. 冰上孵育 30 min, 14 000 r/min. 4℃离心 15 min, 收集上清. 12%的聚丙烯酰胺变性胶分离蛋白质, 湿式电转到 PVDF 膜上, 5%脱脂牛奶-TBS-0.25% Tween 20 室温封闭 1 h, TBS-0.25% Tween 20 中室温孵育一抗 1 h, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, ECL 显影.

1.2.5 MTT 法测定细胞生长曲线. pcDNA3.1(+)空载体、pcDNA3.1(+)-1a、pcDNA3.1(+)-1b 和 pcDNA3.1(+)-1c 转染 HeLa 细胞后, 用 800 mg/L 的 G418 筛选 2 周, 挑取克隆, 扩增培养. 用 MTT 法测定生长曲线. 细胞接种于 96 孔板, 每孔细胞数为 2.0×10^3 . 测定时每孔加入 10 μ l 5 g/L MTT, 37℃继续培养 4 h 后加入裂解液 150 μ l DMSO, 室温振荡混匀 30 min, DMSO 作空白对照, 酶标仪测量 490 nm 的 A 值. 连续测 5 天. 每次设置 3 个平行样, 至少重复两次.

1.2.6 流式细胞术. 分别取生长状态良好的转染 pcDNA3.1(+) 空载体、转染 pcDNA3.1(+)-1a、pcDNA3.1(+)-1b 和 pcDNA3.1(+)-1c 的细胞各 3 瓶用 PBS 洗涤, 70%乙醇固定. 调节细胞浓度至 1×10^6 /ml 后待用. 加入 PI 染液, 在流式细胞仪测定细胞的荧光强度, 数据经计算机软件分析, 得出细胞群体在细胞周期各个时相的分布比例.

1.2.7 荧光素酶分析. 使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System. PBS 漂洗细胞 3 次, 每孔加入 200 μ l PLB, 室温下置于脱色摇床缓慢摇动

20 min. 将细胞裂解液转移至 Eppendorf 管, 10 000 g 离心 30 s, 吸取 20 μ l 上清加入到 96 孔板中, 加入 100 μ l 萤火虫荧光素酶底物(LAR II)测量萤火虫荧光素酶激发的荧光强度, 再加入 100 μ l 海肾荧光素酶底物(Stop & Glo Reagent), 淬灭萤火虫荧光并同时激发海肾荧光, 测定荧光值. 取萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的比值作为最终结果进行组间比较.

1.2.8 统计分析. 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析. 配对组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性.

2 结 果

2.1 pcDNA3.1(+)-1a, 1b, 1c, 1a Δ C 和 1b Δ C 表达载体的构建

定向构建 pcDNA3.1(+)-1a(长度为 1 269 bp)、pcDNA3.1(+)-1b(长度为 840 bp)、pcDNA3.1(+)-1c(长度为 633 bp)、pcDNA3.1(+)-1a Δ C(长度为 1 067 bp)和 pcDNA3.1(+)-1b Δ C(长度为 615 bp)的真核表达重组体, 对阳性重组质粒进行酶切及测序鉴定, 图 1 示酶切鉴定结果. 测序分析显示插入基因的序列正确(未示出).

2.2 pcDNA3.1(+)-1a, 1b, 1c 的转染及过表达

由于 ING1a 和 ING1c 基因在 HeLa 细胞中呈低表达或表达下调, 故将 pcDNA3.1(+)-1a, 1b, 1c 的表达载体分别导入 HeLa 细胞中, 以研究上调 ING1a, ING1b, ING1c 基因的表达对肿瘤细胞生长速度和相关基因的影响. 分别用 Western blot 和 RT-PCR 检测 pcDNA3.1(+)-1a, 1b, 1c 表达质粒在 HeLa 细胞中的过表达, 以保证后续试验的有效性. Western blot 的结果显示, 空载体转染细胞中仅能明显检测到 p33ING1b 的蛋白质表达, 而分别转染 pcDNA3.1(+)-1a, 1b, 1c 后, ING1a, 1b, 1c 的蛋白质表达均显著高于空载对照组中各自的表达(图 2a, 2c). 针对 ING1a, 1b, 1c 的 mRNA 序列保守区设计一对引物, 用于检测 ING1a, 1b, 1c 过表达后 ING1 家族 mRNA 水平的变化. RT-PCR 结果显示, 分别转染 pcDNA3.1(+)-1a, 1b, 1c 后, ING1 家族的 mRNA 水平显著高于空载对照组(图 2b, 2d). 这表明以上 3 个表达质粒均可在 HeLa 细胞中过表达.

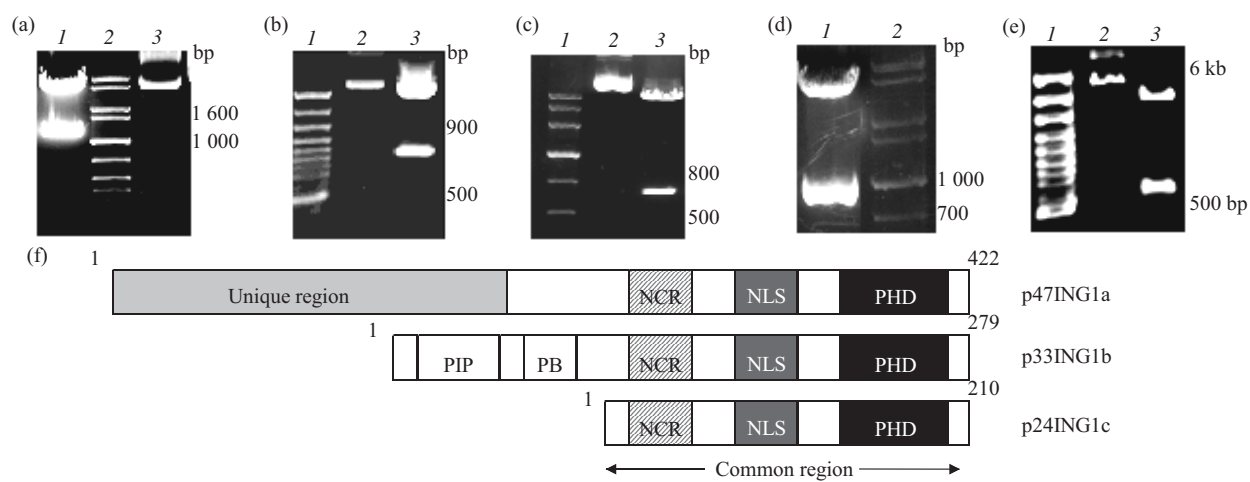


Fig. 1 Identification of recombinants pcDNA3.1(+)-1a,1b,1c,1aΔC and 1bΔC by digestion of indicated restrict endonucleases (a) Identification of recombinant pcDNA3.1 (+)-1a. L: pcDNA3.1 (+)-1a digested by *EcoR* I and *Xba* I; 2: 1 kb plus DNA ladder; 3: pcDNA3.1-1a plasmid. (b) Identification of recombinant pcDNA3.1 (+)-1b. L: 100 bp DNA ladder plus; 2: pcDNA3.1-1b plasmid; 3: pcDNA3.1 (+)-1b digested by *EcoR* I and *Xba* I. (c) Identification of recombinant pcDNA3.1 (+)-1c. L: Marker III; 2: pcDNA3.1-1c plasmid; 3: pcDNA3.1 (+)-1c digested by *EcoR* I and *Xba* I. (d) Identification of recombinant pcDNA3.1 (+)-1aΔC. L: pcDNA3.1 (+)-1aΔC digested by *BamH* I and *Xho* I; 2: 1 kb plus DNA ladder. (e) Identification of recombinant pcDNA3.1 (+)-1bΔC. L: 100 bp DNA ladder plus; 2: pcDNA3.1-1bΔC plasmid; 3: pcDNA3.1 (+)-1bΔC digested by *BamH* I and *Xho* I. (f) Schematic illustration of structural features of the ING1 proteins. PHD: Plant homeodomain; NLS: Nuclear localization sequence; PIP: PCNA-interacting protein motif; PB: Partial bromodomain; NCR: Novel conserved region.

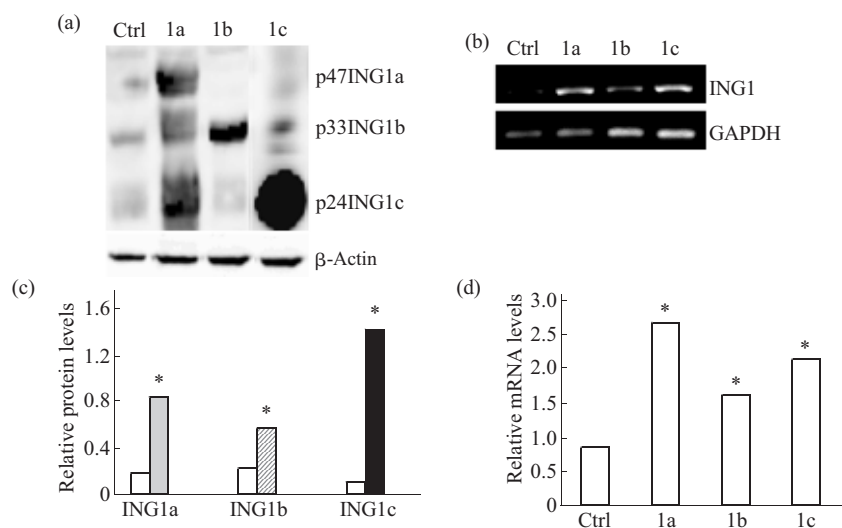


Fig. 2 ING1 overexpression analysis (a) Detection of ING1a, ING1b, ING1c and β-actin protein expression after transfection of indicated plasmids by Western blot. (b) Detection of ING1 and GAPDH mRNA expression after transfection of indicated plasmids by RT-PCR. (c) Densitometric analysis of the intensity ratio of p47ING1a/β-actin, p33ING1a/β-actin and p24ING1c/β-actin in (a). □: Control; ▤: pcDNA3.1(+)-1a; ▨: pcDNA3.1(+)-1b; ■: pcDNA3.1(+)-1c. (d) Densitometric analysis of the intensity ratio of ING1/GAPDH in (b). Ctrl: pcDNA3.1 (+); 1a: pcDNA3.1 (+)-1a; 1b: pcDNA3.1 (+)-1b; 1c: pcDNA3.1(+)-1c. **P* < 0.05, compared with pcDNA3.1(+)/HeLa cells.

2.3 ING1 家族各异构体对 HeLa 细胞增殖速度的影响

MTT 法是确定细胞增殖状态的有效方法. 质粒转染后经稳定筛选, 对转染空载体以及 ING1a、ING1b 和 ING1c 基因的 HeLa 细胞分别描绘生长曲

线. 结果显示, 与空载体组相比, 转染 ING1a、ING1b 和 ING1c 基因的细胞增殖速度明显减慢. 表明过表达 ING1 家族各异构体可以抑制 HeLa 细胞的增殖速度(图 3).

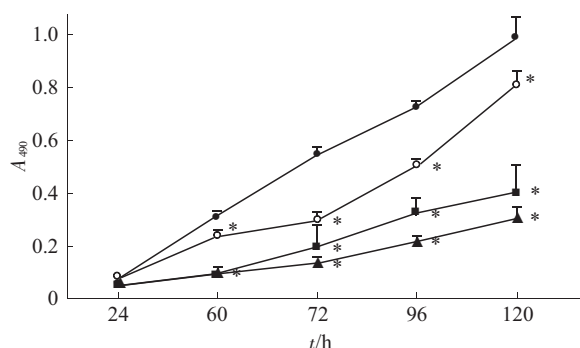


Fig. 3 Growth curve of pcDNA3.1(+)/HeLa(●—●), pcDNA3.1(+)-1a/HeLa(▲—▲), pcDNA3.1(+)-1b/HeLa(■—■) and pcDNA3.1(+)-1c/HeLa(○—○)

* $P < 0.05$, compared with pcDNA3.1(+)/HeLa cells. Bars: SD values.

2.4 ING1 家族各异构体对 HeLa 细胞周期分布的影响

转染 ING1a、ING1b 和 ING1c 后, 阻滞在 G0/G1 期细胞的百分比显著高于对照组, 而 S 期的细胞比例明显减少. 其中空载对照组 G0/G1 期的百分比为 50.1%, 而过表达 1a, 1b 和 1c 后 G0/G1 期细胞的百分比分别为 63.4%、60.3%和 64.9%, 三者均显著高于空载体对照组($P < 0.05$)(图 4). 这表明 ING1 家族通过使细胞周期阻滞在 G0/G1 期而延缓 HeLa 细胞的生长.

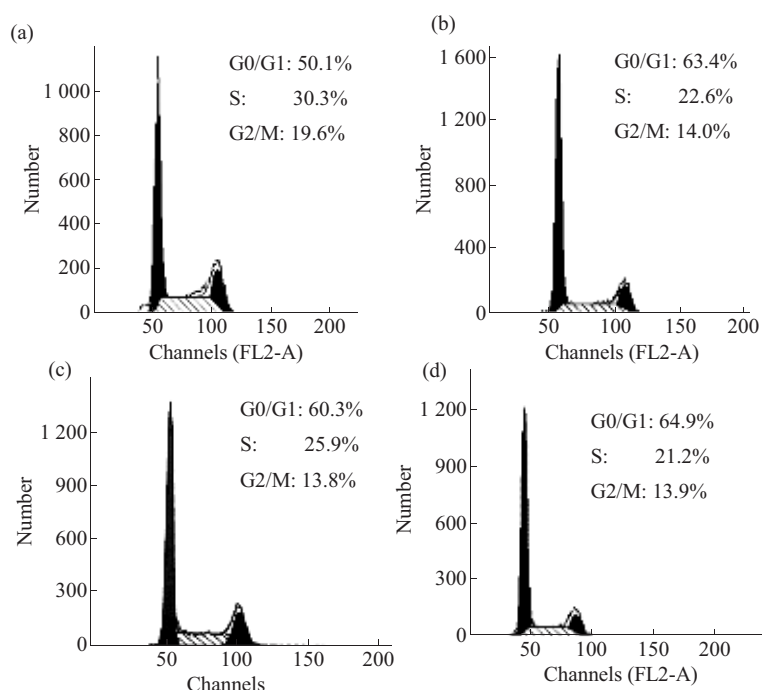


Fig. 4 Effect of different isoforms of ING1 on cell cycle of HeLa cells

(a) pcDNA3.1(+)/HeLa. (b) pcDNA3.1(+)-1a/HeLa. (c) pcDNA3.1(+)-1b/HeLa. (d) pcDNA3.1(+)-1c/HeLa. $P < 0.05$, compared with pcDNA3.1(+)/HeLa cells.

2.5 ING1 家族各异构体对 p53/p21^{Waf1}, p16^{INK4a}/Rb 和 PTEN/p27^{Kip1} 蛋白表达的影响

ING1 家族各异构体均能使 HeLa 细胞生长减慢并阻滞在 G0/G1 期, 故我们过表达 ING1 家族各异构体及其 PHD 结构域删除体后, 检测参与调控细胞周期及细胞衰老的重要分子的表达. 结果表明, ING1a、ING1b 和 ING1c 对 p16^{INK4a}、PTEN/

p27^{Kip1} 和 p53/p21^{Waf1} 的蛋白质表达均有一定程度的促进作用, 其中 1c 的作用最强, 1a 的作用相对较弱, 而将 1a 的 PHD 结构域删除后, 反而在一定程度上促进了 p16^{INK4a}、PTEN 和 p53/p21^{Waf1} 的蛋白质表达. 1b 的 PHD 结构域删除体则略微降低了 p16^{INK4a} 的蛋白质表达(图 5a, b).

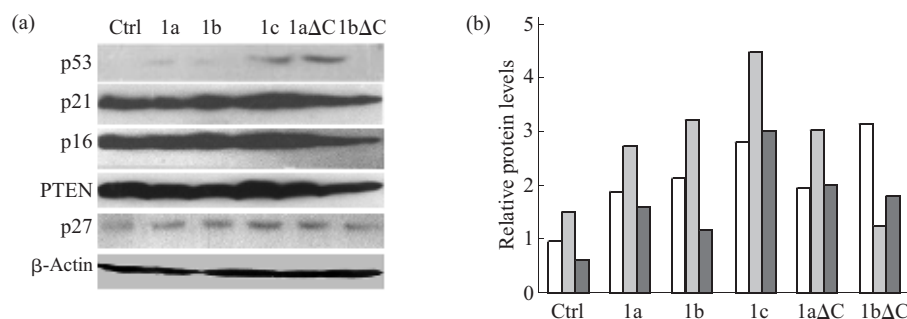


Fig. 5 Effect of ING1 family and their PHD domain deletions on the protein expression of p16^{INK4a}, PTEN/p27^{Kip1} and p53/p21^{Waf1} in transfected HeLa cells

(a) Detection of p53, p21^{Waf1}, p16^{INK4a}, PTEN, p27^{Kip1} and β-actin protein expression after transfection of indicated plasmids by Western blot. (b) Densitometric analysis of the intensity ratio of p16^{INK4a}/β-actin, PTEN/β-actin, and p21^{Waf1}/β-actin. □: p21; ▒: p16; ■: PTEN. Ctrl: pcDNA3.1(+); 1a: pcDNA3.1(+)-1a; 1b: pcDNA3.1(+)-1b; 1c: pcDNA3.1(+)-1c; 1aΔC: pcDNA3.1(+)-1aΔC; 1bΔC: pcDNA3.1(+)-1bΔC.

2.6 ING1c、ING1aΔC 和 ING1bΔC 对 p16^{INK4a} 的转录调节作用

ING1 的三种异构体中, ING1c 对 p16^{INK4a} 蛋白表达的促进作用最强, 故我们采用实时定量 PCR 检测转染 ING1c 后 p16^{INK4a} mRNA 的变化. 结果显示, 转染 ING1c 组的 p16^{INK4a} mRNA 水平比空载体组显著增高(图 6a). ING1a 和 ING1b 均能促进 p16 的蛋白质表达, 而两者 PHD 结构域删除体对 p16^{INK4a} 蛋白质水平的影响不一致, 故我们将 pcDNA3.1(+), pcDNA3.1(+)-1a, pcDNA3.1(+)-1aΔC、pcDNA3.1(+)-1b 和 pcDNA3.1(+)-1bΔC 质粒分别与 p16^{INK4a} 转录起始位点上游 207 bp、620 bp 和 2 070 bp 的 PGL3-p16-207 bp、PGL3-p16-620 bp 和 PGL3-p16-2 070 bp 质粒分别共转染, 检测 p16^{INK4a} 的启动子活性. 结果表明, 与空

载体组相比, 转染 ING1a 对不同长度的 p16^{INK4a} 启动子活性影响不大, 而转染 ING1aΔC 后 p16^{INK4a} 启动子活性升高, 说明 PHD 结构域抑制了 ING1a 对 p16^{INK4a} 的启动子激活, 删除此结构域的 ING1aΔC 可增加 p16^{INK4a} 转录活性. ING1aΔC 对 p16^{INK4a} 转录起始位点上游 620 bp 内的启动子活性促进较强, 高于 207 bp 和 2 070 bp (图 6b), 提示此区域内可能含有 ING1aΔC 的转录激活元件, 进而促进 p16^{INK4a} 的转录. 而转染 ING1b 后, p16^{INK4a} 转录起始位点上游 207 bp 和 620 bp 以内的启动子活性下降. PHD 结构域删除体 ING1bΔC 不能增加 p16^{INK4a} 的转录活性, 而对 p16^{INK4a} 转录起始位点上游 207 bp 以内的启动子活性有抑制作用 (图 6c). ING1aΔC 和 ING1bΔC 对 p16^{INK4a} 启动子活性的影响与它们对 p16^{INK4a} 蛋白质的影响趋势相同.

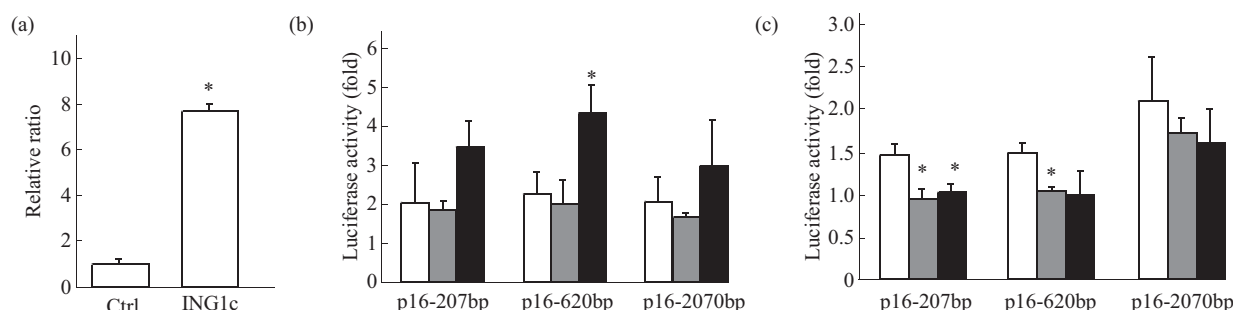


Fig. 6 Effect of ING1c, ING1aΔC and ING1bΔC on p16^{INK4a} transcription

(a) Effect of ING1c on p16^{INK4a} mRNA level by real-time PCR. (b) Cells were transfected with expression plasmids pcDNA3.1(+), pcDNA3.1(+)-1a, and pcDNA3.1(+)-1aΔC as indicated, together with PGL3-p16-207 bp, PGL3-p16-620 bp and PGL3-p16-2 070 bp. Luciferase activities were measured 24 h after transfection. Values are the $\bar{x} \pm s$ of triplicate points from a representative experiment ($n = 3$). □: Control; ▒: pcDNA3.1(+)-1a; ■: pcDNA3.1(+)-1aΔC. (c) Cells were transfected with expression plasmids pcDNA3.1(+), pcDNA3.1(+)-1b and pcDNA3.1(+)-1bΔC as indicated, together with PGL3-p16-207 bp, PGL3-p16-620 bp and PGL3-p16-2 070 bp. Luciferase activities were measured 24 h after transfection. Values are the $\bar{x} \pm s$ of triplicate points from a representative experiment ($n = 3$). □: Control; ▒: pcDNA3.1(+)-1b; ■: pcDNA3.1(+)-1bΔC. * $P < 0.05$ compared with pcDNA3.1(+)/HeLa cells.

3 讨 论

ING1 家族抑制细胞生长, 诱发细胞衰老及参与 DNA 损伤修复等生物学功能之间有着紧密的联系. 近来的研究表明细胞衰老是细胞抵抗癌化的一种方式. 衰老细胞处于 G1 期阻滞, 而肿瘤细胞中最常见的也是 G1/S 期检测点的突变. 多种癌基因和抑癌基因参与了细胞衰老进程, 而参与细胞衰老的重要分子也具有抑制肿瘤细胞生长的作用, 如 p53、p16^{INK4a} 和 PTEN 等. 这为本项研究提供了思路. p16^{INK4a}/Rb、p53/p21^{Waf1} 和 PTEN/p27^{Kip1} 是细胞衰老的 3 条重要诱导途径, p16^{INK4a}、p21^{Waf1} 和 PTEN 既是关键的衰老调控基因也是引起细胞周期阻滞的重要分子^[12]. 目前, p53 依赖性的 CDK 下调被认为是 ING1 发挥细胞增殖抑制作用的重要机制^[7]. 但除 p53/p21^{Waf1} 通路之外, 搞清 ING1 家族各异构体是否还作用于 p16^{INK4a}/Rb 和 PTEN/p27^{Kip1} 通路, 对于全面认识 ING1 家族的抑癌机制具有重要意义.

我们的结果表明, 在 p53 功能受抑制的 HeLa 细胞系中, 过表达 ING1 家族各异构体均可延缓 HeLa 细胞的增殖, 其中 ING1a 作用最强(图 3). 另外, 3 种异构体均可阻滞 HeLa 细胞于 G0/G1 期(图 4). 说明 ING1 家族并非仅依赖 p53 发挥其增殖抑制作用. 我们还首次发现, ING1 家族各异构体均可促进 p16^{INK4a} 和 PTEN 等具有 G1 期阻滞作用的重要分子的表达. 其中 ING1c 对 p16^{INK4a}、PTEN 和 p21^{Waf1} 蛋白质表达的诱导作用最强(图 5).

ING1a 对细胞增殖的抑制作用最强, 但对我们检测的 p16^{INK4a}、PTEN 和 p21^{Waf1} 蛋白质表达的诱导作用却不及 ING1c(图 3, 图 5). 这可能是因为 ING1 家族可在多个水平上调控肿瘤细胞增殖. 肿瘤细胞增殖减慢除细胞周期的 G0/G1 期阻滞外, 还存在多种机制: 通过细胞凋亡与坏死而使肿瘤细胞增殖减慢^[13]; 通过调节细胞间连接分子的胞内和质膜分布使肿瘤细胞的增殖和迁移降低^[14]; 通过蛋白酶体调节细胞增殖相关分子的降解等^[15]. ING1 家族是否影响了这些环节而抑制细胞增殖有待进一步研究. 另外, 本研究中 ING1 家族对 p27^{Kip1} 诱导作用不强, 与 ras 诱导的生长阻滞细胞类似, 这可能是不同的基因和外界刺激下, 周期阻滞分子和信号通路受影响程度不同造成的^[16].

PHD 结构域可介导蛋白质的相互作用, 调节

染色质结构, 并介导 E3 泛素化连接酶的结合^[17].

ING1 家族蛋白在 C 端具有保守的 PHD 结构域, 此结构域可介导 ING1 家族与信号分子磷脂酰肌醇 PtdIns(3)P 和 PtdIns(5)P 的相互作用^[18], 还可识别三甲基化的组蛋白 H3K4 (H3K4me3)激活或抑制基因表达^[19,20]. 本研究首次发现, 过表达 ING1a 的 PHD 结构域删除体可明显促进 p16^{INK4a} 的启动子活性, 而 ING1b 及 ING1b 的 PHD 结构域删除体则降低了 p16^{INK4a} 的启动子活性(图 6b, 6c). 这提示 PHD 结构域对转录的调节作用是异构体依赖性的, 其对 p16^{INK4a} 启动子活性的影响可能需 ING1 异构体分子内其他结构域的共同协作. ING1a 和 ING1b 蛋白 N 端结构存在差异, 招募的分子不同, 如 ING1a 只与 HDAC 转录抑制复合物结合, 而 ING1b 的 N 端具有 PIP 结构域, PB 结构域, 与 HDAC 转录抑制复合物及 HAT 转录激活复合物相互作用的序列等, 这很可能导致了 PHD 结构域在两种异构体中对转录的调节作用不同.

我们注意到 ING1a 和 ING1b 均可诱导 p16^{INK4a} 的蛋白质表达, 但对 p16^{INK4a} 启动子活性却无促进作用(图 5, 图 6b, c), 说明 ING1a 和 ING1b 可能在组蛋白的表观遗传修饰, 转录后水平或翻译水平提高了 p16^{INK4a} mRNA 表达或 mRNA、蛋白质的稳定性. 此外, 在转录水平, ING1a Δ C 对 p16^{INK4a} 的启动子的诱导作用大于 ING1a, 但是两者对 p16^{INK4a} 蛋白表达的促进程度相似. 我们推测, PHD 结构域不仅参与了转录调控, 可能还参与 ING1a 转录后上调 p16^{INK4a} 表达的过程, 删除此结构域的 ING1a Δ C 则丧失了这种转录后调控作用. ING1b 与 ING1b Δ C 对 p16^{INK4a} 启动子活性均有一定的抑制效应, 而 ING1b 可上调 p16^{INK4a} 的蛋白表达, ING1b Δ C 则略微抑制了 p16^{INK4a} 的蛋白表达. 同样地, 这可能是 PHD 结构域参与 ING1b 转录后上调 p16^{INK4a} 表达的结果, 删除此结构域的 ING1b Δ C 则丧失了这种转录后调控作用. 目前, 对 PHD 结构域的研究还很有限, 我们只能从现有的实验结果来推测它的功能, 尚待深入的研究来证实^[17~20]. 总之, 对 ING1 家族各异构体特别是 1a 和 1c 的研究, 将有助于更全面地了解 ING1 家族作为抑癌候选基因的细胞增殖抑制作用, 而对其分子机制的探讨为研究 ING1 家族的生物学功能提供了新的思路 and 方向.

致谢 感谢 Karl T. Riabowol 教授惠赠质粒.

参 考 文 献

- 1 Feng X, Hara Y, Riabowol K T. Different HATS of the ING1 gene family. Trends Cell Biol, 2002, **12**(11): 532~538
- 2 Gong W, Suzuki K, Russell M, *et al.* Function of the ING family of PHD proteins in cancer. Int J Biochem Cell B, 2005, **37**(5): 1054~1065
- 3 Skowrya D, Zeremski M, Neznanov N, *et al.* Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. J Biol Chem, 2001, **276**(12): 8734~8739
- 4 Vieyra D, Loewith R, Scott M, *et al.* Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. J Biol Chem, 2002, **277**(33): 29832~29839
- 5 Jager D, Stockert E, Scanlan M J, *et al.* Cancer-testis antigens and ING1 tumor suppressor gene product are breast cancer antigens: characterization of tissue-specific ING1 transcripts and a homologue gene. Cancer Res, 1999, **59**(24): 6197~6204
- 6 Koivusalo R, Mialon A, Pitkanen H, *et al.* Activation of p53 in cervical cancer cells by human papillomavirus E6 RNA interference is transient, but can be sustained by inhibiting endogenous nuclear export-dependent p53 antagonists. Cancer Res, 2006, **66**(24): 11817~11824
- 7 Garkavtsev I, Grigorian I A, Ossovskaya V S, *et al.* The candidate tumour suppressor p33(ING1) cooperates with p53 in cell growth control. Nature, 1998, **391**(6664): 295~298
- 8 Zeremski M, Hill J E, Kwek S S, *et al.* Structure and regulation of the mouse ing1 gene-Three alternative transcripts encode two PHD finger proteins that have opposite effects on p53 function. J Biol Chem, 1999, **274**(45): 32172~32181
- 9 Coles A H, Liang H L, Zhu Z Q, *et al.* Deletion of p37(Ing1) in mice reveals a p53-independent role for Ing1 in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. Cancer Res, 2007, **67**(5): 2054~2061
- 10 Xue L X, Wu J F, Zheng W J, *et al.* Sp1 is involved in the transcriptional activation of p16(INK4) by p21(Waf1) in HeLa cells. Febs Lett, 2004, **564**(1-2): 199~204
- 11 Kataoka H, Bonnefin P, Vieyra D, *et al.* ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. Cancer Res, 2003, **63**(18): 5785~5792
- 12 Sherr C J, Roberts J M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G(1)-phase progression. Gene Dev, 1999, **13**(12): 1501~1512
- 13 Wajapeyee N, Serra R W, Zhu X, *et al.* Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. Cell, 2008, **132**(3): 363~374
- 14 Novellino L, De F A, Deho P, *et al.* PTPRK negatively regulates transcriptional activity of wild type and mutated oncogenic β -catenin and affects membrane distribution of β -catenin/E-cadherin complexes in cancer cells. Cell Signal, 2008, **20**(5): 872~883
- 15 Su R S, Fran L, Nathalie F, *et al.* The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation. Embo J, 2004, **23**(19): 3780
- 16 Groth A, Willumsen B M. High-density growth arrest in Ras-transformed cells: low Cdk kinase activities in spite of absence of p27Kip Cdk-complexes. Cell Signal, 2005, **17**(9): 1063~1073
- 17 Ivanov A V, Peng H, Yurchenko V, *et al.* PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. Mol Cell, 2007, **28**(5): 823~837
- 18 Gozani O, Karuman P, Jones D R, *et al.* The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. Cell, 2003, **114**(1): 99~111
- 19 Shi X B, Hong T, Walter K L, *et al.* ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. Nature, 2006, **442**(7098): 96~99
- 20 Mellor J. It takes a PHD to read the histone code. Cell, 2006, **126**(1): 22~24

Molecular Mechanism Study on Different Isoforms of ING1 Family Inhibiting HeLa Cells Proliferation*

LI Na¹⁾, ZHANG Ying-Tao^{1)**}, XUE Li-Xiang^{2)**}, TONG Tan-Jun²⁾

¹⁾Department of Pharmacy, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China;

²⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Peking University Health Science Center, Research Center on Aging, Beijing 100083, China)

Abstract ING1 family is a candidate for tumor suppressor, which has three splicing isoforms named p47ING1a, p33ING1b, and p24ING1c. Study of the effect of different isoforms of ING1 on HeLa cells proliferation and its molecular mechanism would help further identifying the functional relationship of ING1 isoforms, and finding important genes regulated by ING1. Cell growth curve and cell cycle analysis were used to observe the effect of ING1a, ING1b, and ING1c on HeLa cells growth, and the result indicated that they could all inhibit HeLa cells growth by arresting cell cycle at G0/G1 phase. PCR method was used to construct the PHD domain deletions of ING1a and ING1b. ING1a, ING1b, ING1c and the PHD domain deletions 1a Δ C and 1b Δ C were then overexpressed in HeLa cells. p16^{INK4a}, PTEN/p27^{Kip1} and p53/p21^{Waf1} protein levels were detected by Western blot. The result showed that ING1a, ING1b, ING1c, and 1a Δ C except for 1b Δ C induced p16^{INK4a} protein expression, in which ING1c had the most powerful effect. Luciferase assay identified that overexpression of pcDNA3.1(+)-1a Δ C facilitated p16^{INK4a} transcription through enhancing p16^{INK4a} promoter activity, while pcDNA3.1(+)-1b Δ C repressed the p16^{INK4a} promoter activity. In a word, it was found for the first time that except for the p53/p21^{Waf1} pathway, three splicing isoforms of ING1 family could also inhibit HeLa cells proliferation through upregulation of p16^{INK4a} and PTEN, and the PHD domain deletion of ING1a enhanced p16^{INK4a} transcription. These findings provide new clues to further study on the mechanisms of ING1 family suppressing cancer cells growth.

Key words ING1, p16^{INK4a}, p53, PHD domain

*This work was supported by grants from The Major State Basic Research Development Program of People's Republic of China (2007CB507400) and The National Natural Science Foundation of China (30500082).

**Corresponding author.

ZHANG Ying-Tao. Tel: 86-10-82801454, E-mail: zhang_yingtao@yahoo.com.cn

XUE Li-Xiang. Tel: 86-10-82801454, E-mail: lixiangxue@bjmu.edu.cn

Received: March 24, 2008 Accepted: April 15, 2008