

# ING4 基因在肿瘤发生作用中的研究进展

朱延玲 李铁臣

**【摘要】** *ING4* 基因是近年来新发现的一种肿瘤抑制因子,可能通过抑制肿瘤血管增生、调节细胞周期、增强 *p53* 的活性、恢复细胞间的接触抑制等途径抑制肿瘤的生长。*ING4* 基因在正常组织中表达丰富,而在肿瘤组织中表达下降,多种肿瘤细胞系中均发现其存在突变,但其在肿瘤发生、发展过程中的确切作用尚不清楚。

**【关键词】** *ING4* 基因; 突变; 表达; 肿瘤发生

**The Effect of *ING4* Gene in Tumorigenesis** ZHU Yan-ling, LI Tie-chen. (Laboratory of Medical Genetics, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China)

Corresponding author: LI Tie-chen. E-mail: litiechen@yahoo.com.cn

**【Abstract】** *ING4* gene, a novel tumor suppressor reported recently, may suppress tumor growth through angiogenesis repression, cell growth regulation, enhancement of *p53* activity, suppression of loss of contact inhibition and so on. Expression of *ING4* is reduced in tumor tissue as compared with normal tissues, *ING4* mutation in several human cancer cell lines is examined. Nevertheless, the precise effect of *ING4* in tumorigenesis is unclear yet.

**【Key words】** *ING4* gene; Mutation; Expression; Tumorigenesis

生长抑制因子(inhibitor of growth, ING)家族是一组重要的肿瘤抑制因子, *ING* 基因家族有 5 个成员: *ING1* ~ *ING5*, 共编码 7 种蛋白质, 包括 *ING1* 基因的 3 种产物(*ING1a*、*ING1b*、*ING1c*)以及 *ING* 基因家族其他 4 个成员的编码蛋白<sup>[1~3]</sup>。在体内和体外实验中, *ING* 蛋白均可抑制肿瘤的发生、发展<sup>[1,4~7]</sup>。近年来, *ING4* 基因的抑瘤功能及其机制受到越来越多的关注。

## 1 *ING4* 基因

2003 年, Shiseki 等<sup>[1]</sup>通过寻找 *ING1* 和 *ING2* 的相似序列时, 发现并克隆出了 *ING4* 基因, 它定位于人类染色体 12 p13.31, 基因跨距 13 kb, 含 8 个外显子<sup>[8]</sup>, cDNA 全长 1 380 bp, 编码蛋白含 249 个氨基酸<sup>[1]</sup>。*ING4* 基因编码的蛋白定位于细胞核内<sup>[7,9~10]</sup>, 在所有被检测到的人类组织中均有表达<sup>[7]</sup>。*ING4* 基因编码蛋白的 N 端和 C 端与 *ING* 家族其他蛋白具有高度同源性, 尤其与 *ING5* 同源率达 80.3%<sup>[1]</sup>。C 端有具锌指结构的高度保守的植物同源结构域(plant homeodomain, PHD)和核定位信号

区(nuclear localization signal, NLS)<sup>[1,2,9~11]</sup>。

PHD 由 4 个色氨酸、1 个组氨酸和 3 个色氨酸(C4H1C3)形成金属整合区<sup>[1,2,12~14]</sup>, 跨越 50~80 个氨基酸<sup>[2,15]</sup>。PHD 与不同的机体生理功能有关, 如生长调节、细胞成熟、DNA 修复、致癌性转化和凋亡等<sup>[14]</sup>。PHD 发生自然变异后, 可能阻断 *ING4* 蛋白诱导的细胞凋亡, 并且阻止 *ING4* 蛋白增加或抑制某些特殊基因的表达, 从而引起不同的疾病包括肿瘤的发生<sup>[2]</sup>。2004 年, Gong 等<sup>[2]</sup>发现 *ING* 家族蛋白的 PHD 是磷脂酰肌醇磷酸的核受体。磷脂酰肌醇磷酸(phosphatidylinositol phosphates, PtdInsPs)是一种信号分子, 调节细胞存活、生长、增殖<sup>[16]</sup>。*ING* 家族蛋白与之相互作用可诱导凋亡<sup>[2]</sup>。

在 *ING4* 蛋白 127~164 位氨基酸的区域<sup>[7]</sup>, 有二联的 NLS, 分为两个基本的氨基酸组, Lys-Lys(KK)和 Arg-Ala-Arg-Ser-Lys(RARSK), 中间跨距 10 个氨基酸, 其中第二组 NLS(RARSK)在 *ING4* 和 *p53* 的结合中起重要作用<sup>[9]</sup>。NLS 除介导 *ING4* 的核定位以及 *ING4* 与 *p53* 在细胞核内的复合定位外, 在 *ING4* 与 *p53* 相互作用所诱导的 *p21* 表达上调中扮演关键的角色<sup>[9]</sup>。当 NLS 区发生某种变异或完全缺失时, *ING4* 与 *p53* 的相互作用将消失, 并改变 *ING4* 的核定位<sup>[9,11]</sup>。

## 2 *ING4* 基因的作用机制

2.1 抑制血管增生: 肿瘤生长和转移依赖新生血管形成<sup>[17]</sup>, 新生血管为肿瘤生长提供足够的养料; 新生血管基底膜不完整或缺乏, 为肿瘤细胞进入血液循环、向周边组织侵袭及远处转移提供了基础。

Garkavtsev 等<sup>[7]</sup>在进行 *ING4* 和神经胶质瘤关系的研究中, 将 *ING4* 基因表达量高和低的人类神经胶质瘤 U87MG 细胞株分别植入小鼠大脑中, 用活体显微镜检查 (intravital microscopy, IVM) 观察小鼠大脑中血管的变化。结果显示, *ING4* 基因低表达的肿瘤细胞株植入后, 比对照组所生成的血管数量和血管密度高 25%, 出血更频繁, 且肿瘤细胞长势更快。此研究表明 *ING4* 能抑制血管的生成进而抑制肿瘤的生长。

在进一步的研究中发现, 其作用机制可能和低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 及白细胞介素-8 (Interleukin-8, IL-8) 有关。HIF-1 在许多肿瘤中表达增加, 能促进肿瘤血管形成并增强肿瘤细胞糖酵解, 并与肿瘤高侵袭性及对放、化疗不敏感和预后不良密切相关<sup>[18]</sup>。2005 年, Ozer 等<sup>[19]</sup>发现 *ING4* 水平和细胞内低氧状态下诱导产生的 HIF 靶基因的表达呈负相关。HIF 脯氨酰羟化酶-2 (HIF prolyl hydroxylase-2, HPH-2) 是调节 HIF 稳定性的调节因子, *ING4* 在细胞核内和 HPH-2 相互作用, 以染色体依赖的方式抑制 HIF-1 的活性<sup>[19]</sup>。*IL-8* 在神经胶质瘤中的分泌和表达水平较高, 并在新血管生成和肿瘤生长过程中具有关键作用, 且 *IL-8* 的表达水平和神经胶质瘤的组织学分级也相关<sup>[10]</sup>。转录因子 NF- $\kappa$ B 可以调节细胞免疫应答、细胞存活、血管生成、肿瘤发生和转移等<sup>[20]</sup>。*ING4* 可通过与 NF- $\kappa$ B 的 P65 (RelA) 亚基相互作用来抑制 *IL-8* 的表达, 并在随后的血管生成中起关键作用<sup>[7]</sup>。用酶联免疫吸附测定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 来测定离体的神经胶质瘤组织中 *IL-8* 的含量显示, 随着 *ING4* 的下调, *IL-8* 从 80 pg/mg 到 780 pg/mg 逐渐增加<sup>[7]</sup>。这些发现表明 *ING4* 可通过调节 *IL-8* 而影响大脑肿瘤的血管生成及肿瘤细胞生长<sup>[7]</sup>。

2.2 恢复细胞间的接触抑制: Kim 等<sup>[11]</sup>认为 *ING4* 在体内可抑制由原癌基因 *MYCN* 或 *MYC* 过度表达引起的细胞间接触抑制的丧失, 可能机制是 *ING4* 影响 *MYC* 下游靶基因的转录, 而此靶基因在 *MYC* 诱导的接触抑制丧失中起直接作用。研究发现, 在肿瘤细胞株中发生的 *ING4* 突变可使其恢复接触抑制的功能失活<sup>[11]</sup>。

2.3 影响细胞周期的进程: Shiseki<sup>[1]</sup>发现在转染

RKO 细胞株 48 小时后, *ING4* 基因的高表达引起 S 期细胞数量的减少以及 G<sub>1</sub>/S 和 G<sub>2</sub>/M 期细胞数量的增加。而 Zhang 等<sup>[21]</sup>研究显示, 在体外和体内, *ING4* 诱导的 p21 的上调可以增强细胞周期调节蛋白 B1 和 P21 的联系, B1 和 P21 的结合可以调节 HepG2 细胞株的 G<sub>2</sub> 限制点以抑制 G<sub>2</sub>/M 期, 最终抑制细胞的增殖, 且这种抑制呈剂量依赖性。此外, *ING4* 还可在体内及体外抑制 HepG2 细胞的生长, 并作为有条件的诱导物以增强 HepG2 细胞株通过血清饥饿法 (serum starvation) 所触发的凋亡<sup>[21]</sup>。但 Kim 等<sup>[11]</sup>认为 *ING4* 对细胞增殖没有直接的抑制作用。

2.4 增强细胞对化学试剂的敏感性: Zhang 等<sup>[21]</sup>用分别被阿霉素 (doxorubicin) 和足叶乙甙 (etoposide) 处理过的 HepG2 细胞株检测外源性的 *ING4* 对 DNA 损伤试剂效应的影响, 结果发现在 HepG2 细胞株中, 阿霉素和足叶乙甙对 *ING4* 的表达没有显著的影响, 但 *ING4* 可显著增加某些 DNA 损伤试剂引起的 HepG2 细胞株的死亡, 可使细胞对阿霉素的敏感性增加 3 倍, 而足叶乙甙为 4 ~ 4.6 倍。

2.5 增强 P53 的活性: *ING4* 可通过 NLS 与 P53 复合定位于细胞核内<sup>[9]</sup>。P53 是一种多功能蛋白, 它的基本功能是作为转录反式作用子调节转录活性<sup>[1]</sup>。*ING4* 在肿瘤细胞中的高表达引起集落形成的有效减少、S 期细胞数量的下降以及细胞凋亡的增加, 这些 P53 依赖的效应显示 *ING4* 是 P53 介导的细胞进程的调节因子<sup>[1]</sup>。近年来发现, 组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyl transferase, HAT) 和组蛋白脱乙酰基酶 (histone deacetylase, HDAC) 控制组蛋白以及其他细胞蛋白 (包括 P53) 赖氨酸残基乙酰化<sup>[1,3]</sup>。*ING4* 是某一特定 HAT 4 个亚基中的一个<sup>[3]</sup>, 能增加 P53 第 382 位赖氨酸残基乙酰化的数量, 表明 *ING4* 基因可以通过控制 P53 乙酰化状态来调节 P53 的功能, 增强 p53 的转录活性<sup>[1]</sup>。

## 3 *ING4* 基因与肿瘤发生

3.1 *ING4* 基因突变与肿瘤发生: Kim 等<sup>[11]</sup>采用 RT-PCR 实验方法, 发现在 RNA 水平, 所有检测到的 9 个肿瘤细胞株中, 有 7 个发生了突变, 包括神经母细胞瘤细胞株 (IMR-32、SK-N-AS、SK-N-BE)、非小细胞肺癌细胞株 (H23)、小细胞肺癌细胞株 (H82)、乳腺癌细胞株 (T47D) 和结直肠癌细胞株 (ACHN)。最普遍的突变是 12 个核苷酸的缺失 (379 ~ 390), 其编码序列包括一组 NLS (KK)。SK-N-AS 和 H82 细胞株均发生了单核苷酸缺失, 分别为 465C 和 446A, 这种缺失导致移码突变, 而产生截短的基因产物, 在近一半的缺失中包含了 PHD 区。这两种单核苷酸

缺失变异不仅产生无功能的蛋白,并且可以抑制野生型等位基因产生的正常的 ING4 蛋白。另外 *ING4* 基因的突变还有错义突变,包括 H82 和 ACHN 细胞株, H82 细胞株的 *ING4* 基因第 640 位的 A 突变成 G, 致使其基因产物 214 位的氨基酸由天冬酰胺(N)变成天冬氨酸(D)。ACHN 细胞株的 *ING4* 基因第 165 位的 A 突变成 G, 其蛋白质第 50 位由甲硫氨酸(M)变成缬氨酸(V)。

但 Gunduz 等<sup>[8]</sup>采用 RT-PCR 实验方法,在对 50 例原发性头颈部鳞状细胞癌患者的肿瘤组织 RNA 水平进行突变检测,没有发现任何变异。

3.2 *ING4* 基因表达异常与肿瘤的发生:2004 年, Garkavtsev 等<sup>[7]</sup>采用实时 RT-PCR 的方法对 50 例神经胶质瘤和 5 例正常对照脑组织中 *ING4* 基因 mRNA 水平进行检测,结果显示 *ING4* 基因在神经胶质瘤中的表达下降,且肿瘤恶性程度越高,表达水平越低,在高度恶性的神经胶质瘤(IV)中,表达强度甚至比正常脑组织低 6 倍。另外免疫组化实验亦表现出, *ING4* 基因在肿瘤组织中表达水平低,但在邻近的正常脑组织中表达丰富。Gunduz 等<sup>[8]</sup>在 *ING4* 基因与头颈部鳞状细胞癌的实验中发现,在 50 例患者中,有 76% (38/50) 的病例与相对应的正常组织相比 *ING4* 基因表达下降,有 10% (5/50) 的病例表达相近,其余 14% (7/50) 的病例较相应的正常组织表达要高。

#### 4 小结

肿瘤的发生是一个复杂的、多阶段、多步骤的过程,它包括细胞的致瘤性转化、抗凋亡、自分泌生长信号、血管联结的出现、逃避免疫监视、侵袭和转移等特性<sup>[19]</sup>,众多的癌基因和抑癌基因参与了肿瘤发生过程,其间涉及复杂的分子调控机制,相信随着分子生物学和细胞遗传学的不断发展以及对肿瘤病因学研究的不断深入,必将有助于进一步认识 *ING4* 的生物学功能及其对肿瘤的调控机制,为肿瘤的诊治提供新的策略。

#### 参 考 文 献

- Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, *et al.* p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res*, 2003, 63: 2373-2378.
- 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.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, *et al.* ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell*, 2006, 21: 51-64.
- Kameyama K, Huang CL, Liu D, *et al.* Reduced ING1b gene

expression plays an important role in carcinogenesis of non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 4926-4934.

- Okano T, Gemma A, Hosoya Y, *et al.* Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. *Oncol Rep*, 2006, 15: 545-549.
- Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, *et al.* Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers. *Oncogene*, 2002, 21: 4462-4470.
- Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, *et al.* The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature*, 2004, 428: 328-332.
- Gunduz M, Nagatsuka H, Demircan K, *et al.* Frequent deletion and down-regulation of ING4, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas. *Gene*, 2005, 356: 109-117.
- Zhang X, Wang KS, Wang ZQ, *et al.* Nuclear localization signal of ING4 plays a key role in its binding to p53. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331: 1032-1038.
- Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *NeuroOncol*, 2005, 7: 122-133.
- Kim S, Chin K, Gray JW, *et al.* A screen for genes that suppress loss of contact inhibition; identification of ING4 as a candidate tumor suppressor gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 16251-16256.
- Cheung KJ Jr, Li G. The tumor suppressor ING1: structure and function. *Exp Cell Res*, 2001, 268: 1-6.
- Campos EI, Chin MY, Kuo WH, *et al.* Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 2597-2613.
- He GH, Helbing CC, Wagner MJ, *et al.* Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol*, 2005, 22: 104-116.
- Nouman GS, Anderson JJ, Lunec J, *et al.* The role of the tumour suppressor p33 ING1b in human neoplasia. *J Clin Pathol*, 2003, 56: 491-496.
- Goza O, Karuman P, Jones DR, *et al.* The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell*, 2003, 114: 99-111.
- Wagatsuma S, Konno R, Sato S, *et al.* Tumor angiogenesis, hepatocyte growth factor, and c-Met expression in endometrial carcinoma. *Cancer*, 1998, 82: 520-530.
- Powis G, Kirkpatrick L. Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3: 647-654.
- Ozer A, Wu LC, Brucik RK. The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 7481-7486.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, *et al.* NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 301-310.
- Zhang X, Xu LS, Wang ZQ, *et al.* ING4 induces G2/M cell cycle arrest and enhances the chemosensitivity to DNA-damage agents in HepG2 cells. *FEBS Lett*, 2004, 570: 7-12.

(收稿日期:2006-08-25)

(本文编辑:王璐)