

# MEN 1 基因生物学功能研究进展

金光辉\*, 曾德泉, 徐 斌

(厦门大学医学院基础医学部, 福建 厦门 361005)

**摘要:** *MEN 1* 基因是多发性内分泌肿瘤 1 型综合征(MEN1)的关键致病基因之一. 其编码蛋白 *menin* 在细胞核中与混合谱系淋巴瘤基因(MLL)等大量关键转录因子相互作用, 直接参与组蛋白甲基化修饰等表观遗传调控过程, 对靶基因转录和细胞表型的维持起关键的调控作用. *MEN 1* 基因突变导致的 *menin* 表达或核转位异常将引起一系列信号通路紊乱, 进而引起内分泌系统疾病如 MEN1. 近年来, 随着研究的深入, 发现 *menin* 参与调控的组蛋白 3 的赖氨酸 4 残基(H3K4)甲基化修饰与内分泌系统肿瘤以及非内分泌系统如血液系统肿瘤的发生密切相关; 我们最近的研究结果显示, *menin* 通过赖氨酸 27 残基(H3K27)组蛋白甲基化修饰调控的多效生长因子等关键信号通路是调节肺癌表型的重要机制之一, 提示 *menin* 在内分泌系统之外的广泛的生物学作用. 综述了本实验室及国际上关于 *menin* 生物学功能的经典及最近的研究, 重点介绍 *menin* 在非内分泌系统肿瘤发生发展中的关键作用及其调控的组蛋白修饰特点、规律. 同时根据我们新近的研究, 提出 *menin* 在其他系统疾病发生中的可能作用. 这些新发现将有助于进一步深入揭示 *menin* 介导的表观遗传学调控在疾病发生中的关键作用, 为以 *menin* 为靶点的疾病治疗提供崭新思路.

**关键词:** 多发性内分泌肿瘤综合征; *menin*; 混合谱系淋巴瘤基因; PcG

中图分类号: Q 291

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2011)02-0437-08

多发性内分泌肿瘤 1 型综合征(the multiple endocrine neoplasia type 1, MEN1)是一种以甲状旁腺、胰岛和垂体前叶肿瘤等内分泌器官肿瘤为特征的家族性常染色体显性疾病, 又称 Wermer 综合征. 其致病关键基因 *MEN 1* (小鼠为 *Men 1*) 定位于染色体 11q13, 于 1997 年首次鉴定和克隆, 编码 610 个氨基酸的蛋白质 *menin*, 为多组织表达性核蛋白<sup>[1]</sup>. 分析 *menin* 蛋白质氨基酸序列未发现任何功能性结构域, 也没有发现与其他任何已知基因的同源性, 因此对其如何抑制肿瘤发生至今知之甚少. *Men 1* 基因纯合缺失(*Men 1*<sup>-/-</sup>)可引起严重的发育障碍, 包括神经管闭合障碍、心脏及肝脏发育缺陷等, 并引起胚胎期(11.5~13.5 d)死亡, 提示 *MEN 1* 基因在细胞生长和发育中的关键作用<sup>[2]</sup>. 至 2008 年已发现 1 336 个来自 MEN1 患者的 *MEN 1* 基因突变<sup>[3]</sup>. 国内这一领域研究开展较少, Jiang 等对中国人群 8 个 MEN1 患者家庭进行 *MEN 1* 基因突变分析, 发现了 4 个我国人群特有的 *MEN 1* 突变体, 以及已报道的 3 种突变类型<sup>[4]</sup>. 在动物实验中, 小鼠 *Men 1*

杂合性失活可使小鼠发生甲状旁腺肿瘤, 后期还发生了与人类 MEN1 综合征类似的表型<sup>[5]</sup>, 提示 *menin* 可能在 MEN1 综合征发病过程中扮演着关键的抑癌基因的作用. 此外, 最近的研究结果表明, *menin* 表达异常与白血病<sup>[6-9]</sup>、糖尿病<sup>[10-11]</sup>等疾病发生也密切相关, 提示 *MEN 1* 基因生物学功能的广泛性. 与在内分泌肿瘤发生中的抑癌作用相反, 在部分血液系统肿瘤如混合谱系淋巴瘤发生过程中, *menin* 显著促进白血病发生, 起着典型的原癌基因的作用<sup>[6-9]</sup>. 近 5 年的研究结果证实<sup>[6-11]</sup>, *menin* 可以与混合谱系淋巴瘤基因(mixed lineage leukemia, MLL)等关键的组蛋白修饰酶相互作用, 通过组蛋白 3 赖氨酸 4(histone 3 lysine 4, H3K4)三甲基化等组蛋白修饰机制上调 *Hox* 家族基因, 促进淋巴瘤发生; 而在内分泌系统中, *menin* 与 MLL 相互作用则可以促进细胞周期蛋白依赖蛋白激酶抑制蛋白 *p 18<sup>Ink4c</sup>* (*p 18*) 和 *p 27<sup>Kip1</sup>* (*p 27*) 的表达, 从而抑制胰岛瘤发生. 因此, 深入探讨在不同系统中 *menin* 的生物学作用规律及其表观遗传调控机制, 将对阐明和鉴定关键基因调控的表观遗传学在疾病发生过程中的关键作用具有深远的意义. 本文围绕着 *menin* 调控的组蛋白甲基化等表观遗传学修饰与靶基因转录调控、细胞表型以及疾病发生的关系, 将本实验室及国内外 *MEN 1* 基因研究领域进展进行综述.

收稿日期: 2010-11-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(81071926); 厦门市科技计划项目(3502Z20104001)

\* 通信作者: ghjin@xmu.edu.cn

## 1 MEN 1 基因及其编码蛋白 menin

menin 主要分布在细胞核中,如染色质和核基质,为进化过程中的保守蛋白,在人类、小鼠(98%)、大鼠(97%)、斑马鱼(75%)以及果蝇(47%)等不同种属生物中具有较高的同源性<sup>[12-15]</sup>。目前发现超过 1 336 种 MEN 1 基因突变类型,散布于外显子 2, 3, 7, 8, 9, 10, 而并不限于某一特定的功能域;但是外显子 2 占据了 50% 的突变,提示可能是 MEN 1 基因突变的“热点”<sup>[16]</sup>。研究发现,内含子 4 的突变是最常见的生殖细胞 MEN 1 基因的突变类型,占总突变的 10%;而生殖细胞和体细胞 MEN 1 基因突变模式相似,80% 的突变会造成编码的 menin 截尾或缺失,这是由于终止密码子、框移突变和大片段缺失造成的,其余 20% 的突变是框内突变或同义突变;截尾突变聚集于外显子 2, 错义突变多集中于外显子 3 内部和附近<sup>[16]</sup>。然而,至今在生殖细胞和体细胞 MEN 1 基因突变中尚未发现基因型和表型间的显著相关性。MEN 1 基因突变往往引起 menin 蛋白质稳定性降低,分子机制研究发现,突变体 menin 可以与热休克蛋白 HSP70 及其泛素化酶配体 CHIP 相互作用,而 CHIP 则促进 menin 突变体迅速通过泛素化途径降解;野生型 menin 则不与 HSP70 相互作用,避免了泛素化途径的快速降解<sup>[17]</sup>。

menin 蛋白显著的生物化学特性之一是可以直接与双链 DNA(dsDNA)结合<sup>[18]</sup>。menin 的功能域包括两个亮氨酸拉链区及细胞核定位信号(nuclear localization signal, NLS) NLSa(第 546~572 氨基酸)、NLS1(第 479~497 氨基酸)和 NLS2(第 588~608 氨基酸),该核定位序列可精确调控 menin 蛋白的正确核定位以及与 DNA 的相互作用,这种结合为细胞增殖调控所必需<sup>[18-19]</sup>。MEN 1 基因截尾突变可造成这两种信号的一种或全部丢失,因此大部分截尾突变的 menin 不能正常定位于细胞核中,而是出现于细胞质;而且截尾突变的 menin 比野生型 menin 降解更快,这表明 NLS 对 menin 由细胞质向细胞核的有效转运起关键作用,并与 menin 的稳定性有关<sup>[20]</sup>。单独的细胞核定位信号的突变,并不能阻断 menin 向细胞核的转运,但能影响 menin 对如 IGFBP-2 和 caspase 8 等靶基因的转录抑制作用<sup>[19, 21-23]</sup>。这些研究表明,menin 作为支架蛋白调控基因的表达,其核定位信号不仅仅使 menin 定位于核内,在调控基因转录方面同样发挥着重要的作用。目前关于 menin 结构与功能的研究多集中于 menin 入核后所介导的对靶基因转录调控的作

用,menin 是否在细胞质或细胞膜中起生物学作用尚不清楚,也没有引起足够的重视。我们的研究结果表明,在特定情况下通过 Western blot 或免疫荧光技术可观察到 menin 在细胞质甚至靠近细胞膜中的分布;同时在细胞质中 menin 可以抑制原癌基因 *K-ras* 的活性形式,而不影响 *K-ras* 的转录和表达。以上发现提示 menin 具有在细胞质中通过蛋白质-蛋白质相互作用而调节关键蛋白活性的潜在的关键生物学功能,这一领域研究的深入将会加深我们对 menin 蛋白生物学功能和在疾病发生中的关键调控作用提供崭新的思路,有待于深入探讨。

## 2 menin 调节的组蛋白修饰与细胞表型

menin 调控的组蛋白甲基化修饰与靶基因转录调控、疾病发生的关系是目前这一领域研究的热点。以染色质共价修饰为主要标志的表观遗传网络作为整合细胞内外环境因素与基因组遗传信息的媒介,直接调控基因表达,决定细胞增殖、分化与功能特化,在生命活动中起到不可或缺的作用<sup>[24]</sup>。表观遗传调控研究因其作用广泛、影响深远,已成为后基因组时代关注的关键问题,是目前生命科学研究中炙手可热的课题。近年来的研究表明,menin 通过与 MLL 等组蛋白修饰酶系统相互作用,通过影响 H3K4 甲基化修饰和染色质结构等表观遗传学机制调节关键靶基因,广泛参与细胞周期、细胞增殖、细胞迁移、细胞凋亡以及 DNA 损伤修复等关键细胞表型调控过程<sup>[25]</sup>。

### 2.1 menin 与细胞增殖

MEN 1 基因最早发现是在内分泌系统肿瘤中,是抑癌基因,但是 menin 如何影响细胞表型尚未完全阐明。Men 1 基因定点敲除的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF 细胞)的细胞增殖明显加速,外源导入 MEN 1 基因则可抑制细胞增殖<sup>[26]</sup>;Men 1 基因缺失或突变可明显促进胰岛细胞增殖<sup>[27]</sup>。分子机制研究发现,menin 与 JunD、Pcm、NF- $\kappa$ B、Smad 3 以及 ASK(activator of *s*-phase kinase)等调节细胞增殖的关键的转录因子相互作用,对细胞增殖起负调控作用<sup>[25]</sup>。如 ASK 是 Cdc7/ASK 激酶复合物的重要组分,在 DNA 复制过程中所必需,野生型 menin 可以与 ASK 相互作用,可完全抑制 ASK 诱导的细胞增殖作用,而人类 MEN1 肿瘤来源的突变体 menin 则不能与 ASK 相互作用,从而失去抑制细胞增殖的作用<sup>[26]</sup>。Heppner 等发现,menin 能与 NF- $\kappa$ B 蛋白结合,抑制 p65 介导的 NF- $\kappa$ B 转录位点

的活化以及 (12-)-14 酸佛波酯(-13-) 乙酸盐(PMA) 诱导的 NF- $\kappa$ B 的活化<sup>[28]</sup>. 此外, *Men 1* 敲除细胞 G0/G1 到 S 期过渡加速, 是通过抑制 CDK(cyclin dependent kinase) 抑制蛋白 *p 27* 转录和增加 CDK2 活性而实现的<sup>[27]</sup>. *Men 1* 敲除小鼠胰岛异常增大, *Men 1* 缺失导致胰腺细胞中 *p 27<sup>Kip1</sup>* 转录水平下降. 这些结果阐明了 *menin* 抑制  $\beta$  细胞增殖的部分机理, 并为通过抑制 CDK2 通路治疗 MEN1 肿瘤、通过提高  $\beta$  细胞增殖治疗 I 型糖尿病提供了新的思路.

组蛋白甲基化修饰等表观遗传调控直接调控基因的表达, 决定细胞增殖、分化等关键表型. 有研究表明, *menin* 调控基因的转录表达部分是通过影响染色体重建而实现的<sup>[25]</sup>. MLL 属于 Trithorax 家族基因, 在靶基因正性调控中起重要作用<sup>[24]</sup>. 野生型 MLL 在蛋白水解酶 Taspase1 作用下剪切为 MLL-N 和 MLL-C 两部分, MLL-C 端含有组蛋白甲基转移酶活性的保守的 SET 结构域<sup>[29]</sup>. MLL 通过其 N 端的 RXRFP 保守序列与 *menin* 相互作用, 通过使 H3K4 三甲基化上调 *Hox* 等基因的表达, 为白血病发生和造血干细胞分化所必需<sup>[30-31]</sup>. 染色质免疫共沉淀(Chromatin immunoprecipitation, ChIP) 研究发现, *menin* 直接结合在 *p 18* 和 *p 27* 基因的启动子区, 显著上调该区域的 H3K4 三甲基化水平, 从而促进 *p 18* 和 *p 27* 等抑癌基因转录并抑制胰岛细胞增殖<sup>[32-33]</sup>. 然而, 在血液系统中, *menin* 复合物则通过上调 *Hox* 等关键基因的表达而促进白血病的发生<sup>[30-31]</sup>. 因此, 在不同的细胞或组织中, *menin* 可能通过相同的组蛋白修饰机制调控不同的靶基因转录而发挥不同的生物学功能. 我们最近的研究表明, *menin* 通过 Polycomb(PcG) 家族基因调控的 H3K27 三甲基化修饰与维持肺癌恶性表型密切相关<sup>[34-35]</sup>. PcG 家族基因在表观遗传调控过程中与 MLL 相拮抗, 参与重要的负性组蛋白修饰机制<sup>[24]</sup>. PcG 蛋白能够形成各种复合物如 PRC1 和 PRC2, EZH2 和 SUZ12 形成复合物 PRC2, EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) 是一个含 SET 结构域的蛋白, 能够特异性催化 H3K27 的三甲基化, 改变染色质结构而抑制基因的表达<sup>[24]</sup>. 在肺癌中, *menin* 能够增加 PcG 介导的靶基因启动子区域的 H3K27 的三甲基化水平, 抑制多效生长因子 (PTN) 的转录及其介导的细胞增殖<sup>[34]</sup>.

## 2.2 *menin* 与细胞迁移

细胞迁移是肿瘤细胞转移的前提, 众多的关键基因和信号通路参与了对细胞迁移的调控<sup>[36]</sup>. 研究发现, 在胰岛  $\beta$  细胞中, *menin* 与细胞骨架蛋白 IQGAP1

(IQ motif containing GTPase activating protein 1) 相互作用, 抑制 GTP-Rac1 与 IQGAP1 的结合, 增加 E-cadherin/ $\beta$ -catenin 与 IQGAP1 的结合, 从而增强细胞间的粘连, 抑制胰岛瘤细胞的迁移<sup>[37]</sup>. 我们通过临床标本研究发现, 在原发性肺腺癌中 *menin* 表达量显著降低, 且其低表达与肺癌细胞淋巴结转移呈正相关, 提示 *menin* 可能对肺癌的转移起重要调控作用<sup>[34]</sup>. 已证实, PTN 通过结合细胞表面的蛋白酪氨酸磷酸化酶受体 Z1 (protein tyrosine phosphatase receptor Z1, PT-PRZ1) 而激活其另一个结合受体 ALK, 与 MAPK 介导的细胞增殖、细胞迁移等信号传递有关<sup>[38]</sup>. PTN 与 PT-PRZ1 结合后能够使其酪氨酸磷酸酶的活性丧失, 进而下游的许多基因酪氨酸磷酸化增强, 其中包括 ALK 与  $\beta$ -catenin<sup>[39]</sup>. ALK 磷酸化可促进细胞增殖, 而  $\beta$ -catenin 磷酸化后与 E-cadherin 的结合减少, 由此减弱细胞间的粘连, 进而提高细胞的迁移<sup>[40]</sup>. 我们发现, *menin* 过表达能够抑制 MEF、B16F10 以及 A549 等多种细胞迁移, 通过 shRNA 特异性沉默 *menin* 表达则促进细胞迁移; 进一步的研究发现, *menin* 通过 H3K27 组蛋白甲基化修饰抑制 PTN 转录, 同时抑制其受体 ALK 及 PT-PRZ1 的转录和表达<sup>[34-35]</sup>. 深入研究发现, Integrin、FAK (focal adhesion kinase) 等关键的黏附分子参与了 *menin* 介导的细胞迁移的调控过程, 阐明了 *menin* 通过调控细胞迁移而影响肿瘤恶性表型的重要生物学功能<sup>[35]</sup>.

## 2.3 *menin* 与 DNA 损伤修复、细胞凋亡

研究发现, *menin* 通过与先天性骨髓发育不全综合征相关基因 FANCD2 相互作用在 DNA 损伤修复以及细胞存活等生命活动中起重要调控作用, 如  $\gamma$  射线照射可增强 *menin*/FANCD2 相互作用; *menin* 集中在染色质和核基质区域, 与核基质的关联可被  $\gamma$  射线激活<sup>[41]</sup>. 我们研究发现, *menin* 参与顺铂诱导的恶性黑色素瘤细胞凋亡, 部分机制与 *menin* 抑制  $\gamma$ -H2A.X 磷酸化有关. *Men 1* 敲除可拮抗 TNF- $\alpha$  诱导的细胞凋亡, *Men 1*<sup>-/-</sup> MEF 细胞补充 *menin* 则恢复了对 TNF- $\alpha$  的敏感性<sup>[23]</sup>. *menin* 通过调节 caspase8 的表达间接地影响细胞凋亡, *menin* 能够结合到 caspase8 的基因位点, 并上调 caspase8 的表达, 从而增强细胞对 TNF- $\alpha$  或辐射诱导的凋亡的敏感性, 但对基础水平的细胞凋亡影响不大<sup>[42]</sup>. 人类 MEN1 肿瘤来源的两个 *menin* 突变体 (L22R 和 A242V) 则丧失了对 caspase8 的 mRNA 转录调控作用, 从而抵抗 TNF- $\alpha$  诱导的细胞凋亡作用<sup>[42]</sup>, 提示 *menin* 抑制内分泌肿瘤至少部分是通过调控 caspase8 的表达而实现的. 另有发现, 在小

细胞肺癌、神经内分泌肺癌细胞中 caspase8 的表达由于启动子区域的 DNA 甲基化而被不同程度地抑制。用一种能够抑制 DNA 甲基化的核酸类似物(5-azacitidine)处理这些细胞,能够使 caspase8 表达正常并恢复对 caspase8 依赖的细胞凋亡的敏感性<sup>[43]</sup>。以上结果表明,menin 能够介导细胞凋亡,并在抑制肿瘤发生的过程中发挥着重要作用,而 menin 对 caspase8 的调控可能是通过减少 caspase8 启动子区的 DNA 甲基化抑或是影响启动子区组蛋白 H3K4 的甲基化水平,有待进一步深入研究。

### 3 menin 的生物学功能

#### 3.1 menin 与内分泌系统疾病

MEN1 综合征是一种常染色体显性疾病,以家族性甲状旁腺、胰岛和垂体前叶肿瘤为特征,也可伴随肾上腺皮质肿瘤、类癌、脂肪瘤和嗜铬细胞瘤等肿瘤发生<sup>[25]</sup>。此外,menin 水平降低可导致垂体前叶肿瘤、甲状旁腺肿瘤和胰岛素瘤。Theodoropoulou 等研究发现,正常人的垂体前叶内分泌细胞核内 menin 表达量高,但其表达水平与分泌激素的细胞类型无关;而在垂体腺瘤中 menin 的免疫活性明显低于正常垂体,且 menin 水平变化较大<sup>[44]</sup>;提示散发性垂体腺瘤细胞中 menin 表达降低可能是垂体肿瘤发生的机制之一。转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )抑制垂体瘤细胞增殖,但是 menin 失活则拮抗 TGF- $\beta$  介导的细胞增殖抑制<sup>[45]</sup>。这是因为在 TGF- $\beta$  诱导的信号通路中,Smad3 入核后需与 DNA 结合才能发挥其转录调控作用,但这一过程需要借助于 menin 使其结合到 DNA 上,menin 失活则抑制了 Smad3 与 DNA 相互作用<sup>[45]</sup>。另有研究发现,甲状旁腺内分泌细胞表达 TGF- $\beta$ ,在继发性甲状旁腺功能亢进患者的甲状旁腺细胞中加入 TGF- $\beta$ ,可抑制甲状旁腺细胞增殖和甲状旁腺激素(PTH)分泌。但是加入反义寡核苷酸特异性抑制 menin 时,甲状旁腺细胞对 TGF- $\beta$  的反应明显减弱;同时 TGF- $\beta$  不影响 MEN1 患者的甲状旁腺细胞的增殖和 PTH 分泌<sup>[46]</sup>,提示 TGF- $\beta$  对甲状旁腺细胞的作用需要 menin。Namihira 等研究发现,大鼠垂体 GH3 细胞中,menin 显著抑制人催乳素(hPRL)启动子的转录活性,当导入突变的 MEN1 基因时,hPRL 启动子活性抑制被部分逆转<sup>[47]</sup>。提示 menin 能够抑制 hPRL 启动子活性和细胞增殖,并在泌乳素瘤发生中起重要作用。MEN1 基因缺失或突变可明显促进胰岛细胞增殖<sup>[27]</sup>。进一步研究表明,menin 与 MLL1 的 N

端相互作用,通过 MLL1 的 C 端招募 Ash2L、Rbbp5 (retinoblastoma binding protein 5) 以及 WDR5(WD repeat domain 5) 等形成 HMTase 复合物,结合在 CDKs 的抑制因子 p 27 和 p 18 的基因组启动子区域而影响 H3K4 甲基化水平,进而调控其转录,为胰岛细胞增殖所必需;而部分肿瘤来源突变体则缺失 HMTase 调节活性,提示 MEN1 突变引起的组蛋白甲基化等表观遗传修饰紊乱是胰岛瘤发生的重要机制之一<sup>[32-33]</sup>。最近的研究发现,menin 表达异常与糖尿病发生密切相关。Karnik 等研究发现,menin 可抑制小鼠胰岛 $\beta$  细胞生长并促进妊娠糖尿病的发生,妊娠刺激胰岛 $\beta$  细胞增殖,同时伴随胰腺 menin 的减少<sup>[11]</sup>。此外,Men1 基因敲除可以改善 streptozotocin 诱导的小鼠糖尿病症状,同时也可以改善遗传性 db/db 糖尿病小鼠的高血糖症,其分子机制与 menin 在胰岛细胞中调控多个关键的细胞增殖相关信号通路有关<sup>[10]</sup>。

#### 3.2 menin 与造血系统

MLL 在正常的骨髓造血分化中发挥着重要的作用<sup>[48]</sup>;此外,在各种人类急性白血病例中发现 MLL 通过染色体易位突变可以与超过 60 多种的基因融合形成各种 MLL 融合蛋白,例如 MLL-AF4、MLL-AF9 等,MLL 融合蛋白能够促使 Hox 基因等表达失调及白血病的发生<sup>[19]</sup>。MLL 蛋白由 N 端和 C 端两个亚基组成,具有复杂的结构域,N 端有 3 个 AT 弯钩基序和 1 个富含半胱氨酸区(CxxC 基序),是哺乳动物 DNA 甲基转移酶同源区,能够与 DNA 结合;MLL 和 TRX 之间的保守区位于内部锌指同源结构域和 C 端 SET 区,参与蛋白-蛋白交互作用和染色质修饰<sup>[24]</sup>。研究发现,Men1 基因条件敲除引起小鼠造血功能缺陷<sup>[49-50]</sup>。menin 与 MLL 相互作用调节 Hox 基因转录,对造血过程和维持外周血白细胞数量、正常稳态是必需的<sup>[49]</sup>;体内实验发现,Men1 敲除小鼠骨髓造血祖细胞克隆形成能力显著下降,但是当 Hoxa9 和 Meis1 共同过表达可恢复克隆形成能力<sup>[50]</sup>。Jin 等发现,c-Myb 通过 menin 与 MLL 结合,参与对 Hoxa9 的转录调控<sup>[8]</sup>。最近的研究发现,在 MLL-AF9 诱导的白血病发生过程中,menin 既可以与野生型的 MLL 相互作用,也可以与 MLL-AF9 相互作用,共同通过 H3K4 三甲基化和 H3K79 二甲基化修饰促进 Hoxa9 和周期蛋白 CyclinA 的表达,在白血病的发生过程中起关键作用<sup>[9]</sup>。利用 CHIP 分析把 menin、MLL 以及 H3K4 甲基化等联系起来,阐明了 menin 依赖性基因转录调控的明确机制,提示了崭新的治疗思路,即通过阻断 menin 功能可能对混合谱系白血病具有潜在治疗作用。

### 3.3 menin 与肺癌

肺癌是一种常见的肺部恶性肿瘤,目前肺癌的发病率和病死率在全球范围内均居首位,是严重危害人类健康的恶性疾病.但相对于乳腺癌、前列腺癌等其他主要类型的恶性肿瘤,至今仍缺乏对各类肺癌发生分子机制及信号通路的认识.已证实,部分关键原癌基因如 *K-ras*、*ALK* (anaplastic lymphoma kinase)、*EGFR* (epidermal growth factor receptor) 以及抑癌基因 *p 53* 等异常表达或突变是肺癌发生的重要分子机制<sup>[51-52]</sup>.至今尚不清楚抑癌基因 *MEN 1* 是否与非内分泌型肿瘤如肺癌的发生有关,其生物学意义尚在讨论中. Debelenko 等报道<sup>[53]</sup>,小鼠 *Men 1* LOH 可诱散发散在型肺类癌,同时在 1 例发生肺类癌的 *MEN1* 综合征患者基因组中检测到复合型 *MEN 1* 基因点突变.最近的遗传学研究结果表明, *Men 1*<sup>+/-</sup> 或 *Men 1*<sup>-/-</sup>; *p 18*<sup>-/-</sup> 小鼠发生非小细胞型肺癌 (non small cell lung cancer, NSCLC) 概率显著提高,其部分机制与 *Men 1* 敲除后上调支气管上皮细胞中 Rb 蛋白磷酸化水平有关<sup>[54]</sup>.我们实验室围绕着 menin 与肺癌的关系进行了大量、系统的探索.研究结果表明,menin 可以显著抑制肺癌细胞的细胞增殖和细胞迁移.如外源性 menin 过表达可显著抑制 A549 等肺癌细胞增殖,而 A242V、L22R 等肿瘤来源突变体则丧失或部分丧失抑制细胞增殖功能.通过临床调查研究发现,临床来源 NSCLC 中约 77% 的肺腺癌 menin 蛋白表达量明显低于癌旁正常组织,其中约 23% 肺癌患者中未检测到 menin 表达;然而在 10 例磷癌标本中未观察到肿瘤组织与癌旁组织间明显的 menin 表达差异<sup>[34]</sup>.且肺癌组织中的 menin 低表达与肺癌细胞淋巴结转移呈正相关,提示 menin 失活或表达改变可能是一些特异性肺癌如非小细胞型肺癌发生的重要分子基础之一.通过基因序列分析,我们并未找到肺癌中 *MEN 1* 基因典型的突变形式,而我们最近的研究结果表明, K-Ras/DNMT 1 介导的 *MEN 1* 基因启动子 DNA 甲基化是导致其表达沉默的重要机制之一.进一步深入阐明 *MEN 1* 基因表达沉默的分子机制,将对以 *MEN 1* 通路为靶点的肺癌早期诊断和治疗提供崭新的思路,其精确的 DNA 甲基化调控规律仍需要进一步深入研究.我们通过基因芯片筛选了显著受 menin 调控的 5 000 多个靶基因,涵盖了细胞增殖、细胞迁移、细胞凋亡等重要细胞表型调控相关的众多信号通路.我们围绕 menin 调控的分泌型生长因子 PTN 及其受体 ALK 信号通路异常与肺癌细胞增殖的关系进行了深入的研究. PTN 广泛表达于肺癌等多种肿瘤,是目前备受关注的原癌基

因之一. PTN 结合 PTPRZ1 后激活其另一个结合受体 ALK, 与 MAPK 介导的细胞增殖信号传递有关<sup>[55-56]</sup>. 已发现, 在 63% 的 NSCLC 患者血清中 PTN 浓度显著高于正常组, 其平均浓度为正常组的 10.8 倍<sup>[57]</sup>; 此外, 约在 6.7% 的 NSCLC 患者中发现原癌基因 ALK 的突变体 ALK-EML4 异常表达, 导入外源性 ALK-EML4 可显著增强 3T3 细胞的致癌性, 提示 PTN/ALK 是促进 NSCLC 发生的关键信号通路<sup>[52]</sup>. 我们发现, menin 通过显著抑制 PTN/ALK/PTPRZ1 表达而抑制 A549 细胞增殖和细胞迁移, 适量补充外源性 PTN 则恢复 menin 抑制的以上细胞表型; PTN 表达沉默则抑制 A549 细胞增殖, 提示 PTN 信号通路是 menin 抑制肺癌细胞增殖和迁移的关键通路之一. 以往的研究表明, menin 通过与 MLLs 等 HMTase 相互作用而调节 H3K4 等正性组蛋白甲基化修饰, 但是 menin 是否参与其他组蛋白如 H3K27 等甲基化修饰尚未见报道. 我们通过 ChIP 技术研究发现, menin 蛋白直接结合在 PTN 启动子区域, 但是 *Men 1* 敲除并不影响该区域 H3K4 组蛋白甲基化水平. 提示通过 MLLs 影响 H3K4 甲基化修饰可能不是 menin 唯一的表观遗传调控特性, 在调节 PTN 等靶基因转录时可能伴随其他组蛋白修饰机制参与. PcG 家族基因在表观遗传调控过程中与 MLL 相拮抗, 参与重要的负性组蛋白修饰机制<sup>[29]</sup>. EZH2 是 PcG 家族重要成员之一, 是含保守 SET 区域的染色质相关蛋白. 然而, 与 MLL SET 区域的 H3K4 甲基化修饰特点不同, EZH2 SET 区域特异性修饰 H3K27 甲基化, 影响染色质结构紧密性、抑制靶基因转录<sup>[29]</sup>. 我们发现, *Men 1* 敲除可显著降低 PTN 启动子区域的 H3K27 三甲基化修饰, 同时减少 SUZ12 等 PcG 其他成员在该区域的富集; EZH2 表达沉默则促进 PTN 表达<sup>[34]</sup>. 提示, menin 与 PcG 家族共同介导的 H3K27 负性甲基化修饰可能与 PTN 等靶基因转录调控、肺腺癌发生密切相关. 但是 menin 如何参与 PcG 介导的 H3K27 三甲基化组蛋白修饰过程尚不清楚, 其精确的分子模型仍需要进一步深入阐明.

## 4 展 望

大量研究表明, menin 在调控基因转录、细胞增殖、细胞迁移、细胞凋亡及基因组的稳定等方面扮演着非常关键的角色, 然而确切的机制目前尚未完全阐明, 有待进一步研究. 如 menin 在内分泌瘤中扮演着抑制肿瘤的作用, 而在不同类型的内分泌瘤中, 这种抑癌机

制是否有共同的通路;menin MLL 介导的 H3K4 组蛋白修饰,如何在不同的细胞中作用于不同的靶基因;menin 作为支架蛋白,是否被组织特异表达的蛋白招募;menin 如何调节组蛋白重构并改变染色质结构.这些问题的回答不仅可以为研究 MEN1 及其他肿瘤提供新的思路,同时也可以揭示未知的分子信号通路及其作用机理,并为治疗与 menin 相关的疾病提供新的策略.

## 参考文献:

- [ 1 ] Chandrasekharappa S C, Guru S C, Manickam P, et al. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia type 1 [ J ]. Science, 1997, 276: 404-407.
- [ 2 ] Bertolino P, Radovanovic I, Casse H, et al. Genetic ablation of the tumor suppressor menin causes lethality at mid-gestation with defects in multiple organs [ J ]. Mech Dev, 2003, 120: 549-560.
- [ 3 ] Lemos M C, Thakker R V. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene [ J ]. Hum Mutat, 2008, 29: 22-32.
- [ 4 ] Jiang X H L J, Cui B, Zhao Y J, et al. MEN1 mutation analysis in Chinese patients with multiple endocrine neoplasia type 1 [ J ]. Endocr Relat Cancer, 2007, 14: 1073-1079.
- [ 5 ] Crabtree J S, Scacheri P C, Ward J M, et al. A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors [ J ]. Proc Natl Acad Sci, 2001, 98: 1118-1123.
- [ 6 ] Yokoyama A, Somerville T C, Smith K S, et al. The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis [ J ]. Cell, 2005, 123: 207-218.
- [ 7 ] Hughes C M, Rozenblatt Rosen O, Milne T A, et al. Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus [ J ]. Mol Cell, 2004, 13: 587-597.
- [ 8 ] Jin S, Zhao H, Yi Y, et al. c Myb binds MLL through menin in human leukemia cells and is an important driver of MLL-associated leukemogenesis [ J ]. J Clin Invest, 2010, 120: 593-606.
- [ 9 ] Thiel A T, Blessington P, Zou T, et al. MLL-AF9 induced leukemogenesis requires coexpression of the wild type Mll allele [ J ]. Cancer Cell, 2010, 17: 148-159.
- [ 10 ] Yang Y, Gurung B, Wu T, et al. Reversal of preexisting hyperglycemia in diabetic mice by acute deletion of the Men1 gene [ J ]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107: 20358-20363.
- [ 11 ] Karnik S K, Chen H, McLean G W, et al. Menin controls growth of pancreatic beta cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus [ J ]. Science, 2007, 318: 806-809.
- [ 12 ] Guru S C, Crabtree J S, Brown K D, et al. Isolation, genomic organization, and expression analysis of Men1, the murine homolog of the MEN1 gene [ J ]. Mamm Genome, 1999, 10: 592-596.
- [ 13 ] Karges W, Maier S, Wissmann A, et al. Primary structure, gene expression and chromosomal mapping of rodent homologs of the MEN1 tumor suppressor gene [ J ]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1446: 286-294.
- [ 14 ] Khodaei S, O'Brien K P, Dumanski J, et al. Characterization of the MEN1 ortholog in zebrafish [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 264: 404-408.
- [ 15 ] Guru S C, Prasad N B, Shin E J, et al. Characterization of a MEN1 ortholog from Drosophila melanogaster [ J ]. Gene, 2001, 263: 31-38.
- [ 16 ] Turner J J, Leotela P D, Pannett A A, et al. Frequent occurrence of an intron 4 mutation in multiple endocrine neoplasia type 1 [ J ]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87: 2688-2693.
- [ 17 ] Yaguchi H, Ohkura N, Takahashi M, et al. Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin proteasome pathway [ J ]. Mol Cell Biol, 2004, 24: 6569-6580.
- [ 18 ] La P, Silva A C, Hou Z, et al. Direct binding of DNA by tumor suppressor menin [ J ]. J Biol Chem, 2004, 279: 49045-49054.
- [ 19 ] La P, Desmond A, Hou Z, et al. Tumor suppressor menin: the essential role of nuclear localization signal domains in coordinating gene expression [ J ]. Oncogene, 2006, 25: 3537-3546.
- [ 20 ] Chandrasekharappa S C, Teh B T. Functional studies of the MEN1 gene [ J ]. J Intern Med, 2003, 253: 606-615.
- [ 21 ] La P, Schnepf R W, Petersen C D, et al. Tumor suppressor menin regulates expression of insulin-like growth factor binding protein 2 [ J ]. Endocrinology, 2004, 145: 3443-3450.
- [ 22 ] La P, Yang Y, Karnik S K, et al. Menin-mediated caspase 8 expression in suppressing multiple endocrine neoplasia type 1 [ J ]. J Biol Chem, 2007, 282: 31332-31340.
- [ 23 ] Schnepf R W, Mao H, Sykes S M, et al. Menin induces apoptosis in murine embryonic fibroblasts [ J ]. J Biol Chem, 2004, 279: 10685-10691.
- [ 24 ] Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, et al. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins [ J ].

- Cell, 2007, 128: 735-745.
- [25] Gao S B, Hua X, Jin G H. Menin regulates endocrine diseases by controlling histone modification and gene transcription[J]. *Ann Endocrinol*, 2008, 69: 426-432.
- [26] Schnepf R W, Hou Z, Wang H, et al. Functional interaction between tumor suppressor menin and activator of S-phase kinase[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 6791-6796.
- [27] Schnepf R W, Chen Y X, Wang H, et al. Mutation of tumor suppressor gene *Men 1* acutely enhances proliferation of pancreatic islet cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 5707-5715.
- [28] Heppner C, Bilimoria K Y, Agarwal S K, et al. The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB mediated transactivation[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 4917-4925.
- [29] Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 846-856.
- [30] Thiel A T, Blessington P, Zou T, et al. MLL-AF9 induced leukemogenesis requires coexpression of the wild type Mll allele[J]. *Cancer Cell*, 2010, 17: 148-159.
- [31] Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, et al. Leukemia proto-oncogene MLL forms a SET-like histone methyltransferase complex with menin to regulate *Hox* gene expression[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 5639-5649.
- [32] Karnik S K, Hughes C M, Gu X, et al. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102: 14659-14664.
- [33] Milne T A, Hughes C M, Lloyd R, et al. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin dependent kinase inhibitors[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102: 749-754.
- [34] Gao S B, Feng Z J, Xu B, et al. Suppression of lung adenocarcinoma through menin and polycomb gene mediated repression of growth factor pleiotrophin[J]. *Oncogene*, 2009, 28: 4095-4104.
- [35] Feng Z J, Gao S B, Wu Y, et al. Lung cancer cell migration is regulated via repressing growth factor PTN/RPTP beta/zeta signaling by menin[J]. *Oncogene*, 2010, 29: 5416-5426.
- [36] Hood J D, Cheresch D A. Role of integrins in cell invasion and migration[J]. *Nat Rev Cancer* 2002, 2: 91-100.
- [37] Yan J, Yang Y, Zhang H, et al. Menin interacts with IQ-GAP1 to enhance intercellular adhesion of beta cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28: 973-982.
- [38] Perez-Pinera P, Chang Y, Deuel T F. Pleiotrophin, a multifunctional tumor promoter through induction of tumor angiogenesis, remodeling of the tumor microenvironment, and activation of stromal fibroblasts[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6: 2877-2883.
- [39] Meng K, Rodriguez Pena A, Dimitrov T, et al. Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 2603-2608.
- [40] Lu K V, Jong K A, Kim G Y, et al. Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 26953-26964.
- [41] Jin S, Mao H, Schnepf R W, et al. Menin associates with FANCD2, a protein involved in repair of DNA damage[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 4204-4210.
- [42] La P, Yang Y Q, Karnik S K, et al. Menin mediated caspase 8 expression in suppressing multiple endocrine neoplasia type I[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 31332-31340.
- [43] Hopkins Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, et al. Silencing of death receptor and caspase 8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation[J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10: 356-364.
- [44] Theodoropoulou M, Cavallari I, Barzon L, et al. Differential expression of menin in sporadic pituitary adenomas[J]. *Endocrine Related Cancer*, 2004, 11: 333-344.
- [45] Kaji H, Canaff L, Lebrun J J, et al. Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 3837-3842.
- [46] Sowa H, Kaji H, Kitazawa R, et al. Menin inactivation leads to loss of transforming growth factor beta inhibition of parathyroid cell proliferation and parathyroid hormone secretion[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 2222-2228.
- [47] Namihira H, Sato M, Muraio K, et al. The multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin, inhibits the human prolactin promoter activity[J]. *J Mol Endocrinol*, 2002, 29: 297-304.
- [48] Ono R, Nosaka T, Hayashi Y. Roles of a trithorax group gene, MLL, in hematopoiesis[J]. *Int J Hematol*, 2005, 81: 288-293.
- [49] Yan J, Chen Y X, Desmond A, et al. Cdx4 and menin coregulate *Hoxa9* expression in hematopoietic cells[J]. *PLoS One*, 2006, 1: e47.
- [50] Chen Y X, Yan J, Keeshan K, et al. The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing *Hox* gene expression[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103: 1018-1023.

- [ 51] Herbst R S, Heymach J V, Lippman S M. Lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 1367-1380.
- [ 52] Soda M, Choi Y L, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2007, 448: 561-566.
- [ 53] Debelenko L V, Brambilla E, Agarwal S K, et al. Identification of *MEN 1* gene mutations in sporadic carcinoid tumors of the lung [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6: 2285-2290.
- [ 54] Pei X H, Bai F, Smith M D, et al. p18Ink4c collaborates with *Men 1* to constrain lung stem cell expansion and suppress non-small cell lung cancers [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 3162-3170.
- [ 55] Perez Pinera P, Zhang W, Chang Y, et al. Anaplastic lymphoma kinase is activated through the pleiotrophin/receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta signaling pathway: an alternative mechanism of receptor tyrosine kinase activation [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 28683-28690.
- [ 56] Stoica G E, Kuo A, Aigner A, et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 16772-16779.
- [ 57] Jager R, List B, Knabbe C, et al. Serum levels of the angiogenic factor pleiotrophin in relation to disease stage in lung cancer patients [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86: 858-863.

## Progress on Biological Function of *MEN 1* Gene

JIN Guang hui<sup>\*</sup>, ZENG De quan, XU Bin

(Department of Basic Medical Sciences, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** *MEN 1*, one virulence gene of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), encodes a protein referred to as menin. Menin plays a key role in the regulation of gene transcription and maintenance of cell phenotype via interacting with transcription factors which could directly influence histone modification in the nucleus, such as MLL (Mixed Lineage Leukemia). Aberrant menin expression or nuclear translocation caused by *MEN 1* mutation results in unregulation of signal pathways and occurrence of endocrine system diseases such as MEN1. Recent studies show that the function of menin to epigenetic histone modifications is associated with endocrine neoplasia and non-endocrine neoplasia such as hematological tumors; Interestingly, our recent results show that menin regulates pleiotropic growth factor (PTN) through H3K27me<sub>3</sub>, which is an important mechanism in lung cancer phenotype, suggesting wide biological roles of menin. Here we review the previous and the recent progresses on the biological function of menin, especially on the role of menin in the development of non-endocrine neoplasia and the pattern of histone modifications. These findings indicate the potential effects of menin on other diseases. The new knowledge will help to further reveal the menin-mediated epigenetic regulation in diseases, and could also provide new ideas for therapeutic interventions against disease targeted on menin.

**Key words:** multiple endocrine neoplasia type 1; menin; mixed lineage leukemia; PcG