

· 综述 ·

神经母细胞瘤分子遗传学研究进展

杨少波 综述 肖现民 审校

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是儿童最常见的实体肿瘤,约占儿童肿瘤的 8%~10%,是学龄前儿童癌肿死亡的主要原因。其重要特性是表型和遗传异质性^[1]。已知的预后因素有年龄、发病部位、分期、肿瘤分化程度、DNA 含量和不同遗传学改变等。这些预后变量的结合可用于风险评估和治疗分层。近年来新的研究方法和研究成果为该病的风险评估和靶向治疗开启了新的机遇。本文就已发现的一些重要的分子遗传学畸变作一简要综述。

一、MYCN 癌基因扩增

MYCN 癌基因定位于染色体 2p24,其扩增常见于晚期肿瘤,是已公认的不良预后指标,20%~25% 的 NB 中可发现其扩增。最新的 INRG(国际神经母细胞瘤风险评估小组)研究组病人中其扩增预示着不良的临床结局^[2]。

MYCN 基因编码结合 MAX 蛋白的异二聚体转录因子,通过激活其下游的靶基因使细胞周期前进而起作用,具体作用机制尚不清楚。它能调节大量下游基因,已有少数靶基因被鉴定出(如 p53, MDM2, PAX3 等)^[3]。

以 MYCN 癌基因为靶点开发新的治疗方法已有一定进展。一些对其转录功能产生抑制作用的小分子抑制剂已通过 MYCN 报告基因分析方法鉴定出^[4]。Mo H 等^[5]筛选出称为 MYRAs(MYC 通路反应因子)的小分子复合物可靶向作用于 MYCN 通路,在不同水平干扰该通路从而有效抑制 MYCN 癌基因的扩增。另外,一些以核苷酸为基础开发的靶向干预方法旨在抑制 MYCN 表达,包括反义寡核苷酸类, RNA 干扰技术等^[6,7]。

二、染色体区段改变

1. 染色体 1p 缺失:1 号染色体短臂(1p)缺失是 NB 最典型的遗传学改变,约 35% 的 NB 或 70%~80% 的高危 NB 中可发现,提示该区域存在抑癌基因。

White PS 等^[8]通过对 737 例原发 NB 进行 LOH(杂合性丢失)分析和 46 种 NB 细胞系进行基因型分析,在 1p 上鉴定出一个最小缺失区域(SRD),定位于 1p36.31,大小约 2 Mb。该课题组最新研究发现此区域最可能的抑癌基因是 CHD5^[9]。该基因是染色质重塑家庭成员,主要在神经系统表达。Bagchi A 等^[10]发现 CHD5 基因可通过 p19Arf-p53 通路调控细胞增殖、衰老与凋亡,亦确认其为抑癌基因。藤田等^[11]发现在 1p 缺失的 NB 细胞系和肿瘤中 CHD5 基因表达极低或缺失,且在肿瘤集落生成和致瘤性实验中 CHD5 基因启动子超甲基化。综上所述,CHD5 基因可确认为位于 1p 上的抑癌基因。这为探寻 NB 的临床治疗提供了途径,如设计增强 CHD5 基因活性的策略。1p36 上的另一个常见缺失区域是在 NB 细胞系中一段 500 KB 的纯合子缺失(1p36.2),该区域内 KIF1B 基因(驱动蛋白 3 家族成员)被鉴定为单倍剂量不足候选抑癌基因^[12]。

1p 缺失的预后评估意义一直以来备受争议,但目前有研究表明 1p36 序列上的等位基因丢失预示着局部肿瘤复发的风险增加^[13]。

2. 染色体 17q 获得:17 号染色体长臂(17q)获得是 NB 最常见的遗传畸变,约 80% 的 NB 中可发现,常因与 1p 或 11q 的不平衡易位产生。目前认为在 17q 上存在依靠剂量效应起作用的基因。

Vandesompele J 等^[14]采用比较基因组杂交(CGH)芯片结合基因位置富集分析方法对 69 例 NB 原发瘤和 28 种细胞系分析鉴定出两个关键获得片段区域,NB 相关剂量敏感基因多定位于此。现已鉴定出的候选剂量敏感癌基因包括 BIRC5、NME1、NME2 和 PPM1D 等^[14-16]。以上基因在 NB 的发生发展中起着一定的作用,具体作用机制有待进一步研究。一项最新研究发现一个定位于 17q25.1 的 ncRAN(non-coding RNA expressed in aggressive neuroblastoma)的高表达与 NB 的不良预后相关^[17]。该研究采用 CGH 芯片对 236 例 NB 样品分析,同时采用 cDNA 芯片对 136 例样品进行全基因组表达谱分析,鉴定出一个定位于 17q25.1 的新

候选基因,其转录产物的 cDNA 序列没有明显开放阅读框架,体内体外实验均检测不到该基因的蛋白产物,提示该转录物可能不编码任何蛋白产物。通过对 70 例散发 NB 患者分析得出该 ncRAN 的高表达水平与患者不良预后显著相关。多元统计分析亦得出 ncRAN 的表达是一个独立的预后因素。综上所述提示 ncRAN 可能是定位于 17q 获得区域的一个新的非编码 RNA(ncRNA),并类似癌基因在侵袭性 NB 中发挥作用。该研究涉入近年的热点领域—非编码 RNA(ncRNA),为 NB 研究开拓了新的视野。

17q 获得是临床不良预后最有力的独立指标,而整条 17 号染色体获得则与良好预后相关^[18]。近三倍体肿瘤往往获得整条额外的 17 号染色体,而不平衡的 17q 获得则是近二倍体肿瘤的特性。

3. 染色体 11q 缺失: 11 号染色体长臂(11q)缺失在 15%~22% 的原发 NB 发生,常出现在晚期、无 MYCN 基因扩增和 1p 完整的肿瘤。

Attiey EF 等^[13]对 915 例 NB 样本进行 11q23 片段 LOH 筛选,发现 LOH 发生率为 34%,结合临床相关参数统计分析发现 11q23 缺失与无瘤生存率减小相关,而不平衡的 11q23 缺失与无瘤生存率和总生存率减小均存在相关性,尤其低中危组 NB 与无瘤生存率减小存在独立相关性,表明不平衡的 11q 缺失是 NB 患者临床不良预后的一个独立指标。

Michels E 等^[19]采用 CGH 芯片对 100 个 NB 原发瘤和 29 种细胞系分析鉴定出 11 号染色体上两个常见缺失区域 11q23.1-23.2 (1.79 Mb) 和 11q23.2-q23.3 (3.72 Mb),再对已发表文献作 Meta 分析后得出 CADM1 为后一区域上的候选抑癌基因。Nowacki S 等^[20]发现 CADM1 表达下调与不良预后指标(如远处播散的 4 期、年龄大于 18 个月、MYCN 扩增和 11q 缺失)相关,且低表达的 CADM1 与不良的临床结局相关。另有研究提示 TSLC1(同样定位于 11q23)亦可能是作用于 NB 发病中的一个抑癌基因,其表达下调与被研究的 108 位 NB 患者的不良预后高度相关,该表达下调并不是因为其启动子区域甲基化造成^[21]。

4. 染色体 3p 缺失: 3 号染色体短臂(3p)缺失通常与 11q 缺失相关,主要发生在无 MYCN 基因扩增或 1p 缺失的肿瘤。该缺失是年龄较大患者的特点之一,提示 3p 缺失是 NB 发生过程中的一个晚期事件^[11]。

Hoebbeck J 等^[22]采用 CGH 技术鉴定出 3p 上 3 个常见缺失区域,且发现其中两个 SRD 与更常见的

肿瘤如乳腺癌和肺癌中的相一致,提示相同的抑癌基因可能在众多肿瘤的发生发展过程中起作用。这些区域包含若干候选抑癌基因,较为确定的是 RASSF1A 基因。目前对 RASSF1A 基因的研究集中在甲基化方面。Michalowski MB 等^[23]对 62 例 NB (45 例原发瘤和 17 例复发瘤)进行 19 种抑癌基因的甲基化状态分析,发现 93% 的原发瘤和 100% 的复发瘤 RASSF1A 基因甲基化,该结果与之前文献报道的在 100% 的细胞系和 50%~90% 的肿瘤样本中 RASSF1A 基因甲基化相符^[24,25]。Misawa A 等^[26]最新研究发现 68 例 NB 患者其肿瘤组织 RASSF1A 基因甲基化率为 94%,血清样品甲基化率为 25%,经统计分析发现 17 例血清 RASSF1A 基因甲基化与年龄大于 12 个月、4 期和 MYCN 扩增等变量相关,提示血清 RASSF1A 基因甲基化可能成为评估 NB 临床预后的指标。

三、染色体倍数分型

据染色体套数 NB 分为含近二倍体 DNA 含量和近三倍体 DNA 含量的两种亚型,前者约占所有 NB 的 45%,后者约占 55%。近三倍体 DNA 含量是因为肿瘤在有丝分裂时发生重要缺陷而导致整条染色体的缺失或获得,而近二倍体 DNA 含量是因为在基因组稳定性方面存在重要缺陷而导致染色体重排^[27]。局限性肿瘤通常是近三倍体的;二倍体多出现在中晚期肿瘤。研究表明,对于存在转移性病灶的 18 个月大的患儿,近三倍体 DNA 含量、无 MYCN 基因扩增和无特殊染色体片段畸变(如 11q 缺失)是良好预后的指标^[28]。而在有转移性病灶的小于 18 个月的患儿,近二倍体 DNA 含量、无 MYCN 基因扩增的 NB 有统计学意义的不良结局。

NB 是一个临床和遗传异质性疾病,呈现出多种不同的临床过程和结局。为更好地了解该疾病,必要的一步就是深入地研究导致其形成的遗传性缺陷。全基因组分析已经使研究人员能够鉴定出特殊基因的扩增、染色体区域的获得和缺失,使得进一步描绘该肿瘤的遗传异质性成为可能。上述研究中虽已鉴定出部分与 NB 相关的抑癌基因,但对抑癌基因的鉴定将是需要继续进行的工作,并且要深入研究它们在 NB 发病中的具体作用机制。

在研究方法上,CGH 使得研究得以在一个单一的实验中进行,且已广泛应用于大量实体肿瘤的基因谱分析。它将是进行 NB 遗传缺陷研究的重要方法,但表观遗传学方法(如抑癌基因的甲基化谱和 miRNA 谱分析)将逐步成为解析该癌症难题的重要

策略。

NB 的生物学特征及临床行为较为复杂, 尽管近年来治疗策略有所改善, 患儿的远期预后仍不容乐观^[29]。目前分子遗传学改变已被作为常规考虑入 NB 治疗决策的制定^[30]。更多的基因或基因涉及的通路、miRNA 或抑癌基因的甲基化位点经研究有望成为新的生物学治疗靶点。

参考文献

- Castel V, Grau E, Noguera R, et al. Molecular biology of neuroblastoma[J]. Clin Transl Oncol, 2007, 9(8):478-483.
- Cohn SL, Pearson AD, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(2):289-297.
- Bell E, Chen L, Liu T, et al. MYCN oncoprotein targets and their therapeutic potential[J]. Cancer Lett, 2010, 12.
- Lu X, Pearson A, Lunec J. The MYCN oncoprotein as a drug development target[J]. Cancer Lett, 2003, 197(1-2):125-130.
- Mo H, Henriksson M. Identification of small molecules that induce apoptosis in a Myc-dependent manner and inhibit Myc-driven transformation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(16):6344-6349.
- Burkhardt CA, Cheng AJ, Madafoglio J, et al. Effects of MYCN antisense oligonucleotide administration on tumorigenesis in a murine model of neuroblastoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(18):1394-1403.
- Nara K, Kusafuka T, Yoneda A, et al. Silencing of MYCN by RNA interference induces growth inhibition, apoptotic activity and cell differentiation in a neuroblastoma cell line with MYCN amplification[J]. Int J Oncol, 2007, 30(5):1189-1196.
- White PS, Thompson PM, Gotoh T, et al. Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma[J]. Oncogene, 2005, 24(16):2684-2694.
- Okawa ER, Gotoh T, Manne J, et al. Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas[J]. Oncogene, 2008, 27(6):803-810.
- Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, et al. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36[J]. Cell, 2007, 128(3):459-475.
- Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, et al. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(13):940-949.
- Munirajan AK, Ando K, Mukai A, et al. KIF1Bbeta functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death[J]. J Biol Chem, 2008, 283(36):24426-24434.
- Attiey EF, London WB, Mosse YP, et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma[J]. N Engl J Med, 2005, 353(21):2243-2253.
- Vandesompele J, Michels E, De Preter K, et al. Identification of 2 putative critical segments of 17q gain in neuroblastoma through integrative genomics[J]. Int J Cancer, 2008, 122(5):1177-1182.
- Eckerle I, Muth D, Batzler J, et al. Regulation of BIRC5 and its isoform BIRC5-2B in neuroblastoma[J]. Cancer Lett, 2009, 285(1):99-107.
- Saito-Obara F, Imoto I, Inoue J, et al. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(8):1876-1883.
- Yu M, Ohira M, Li Y, et al. High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma[J]. Int J Oncol, 2009, 34(4):931-938.
- Vandesompele J, Baudis M, De Preter K, et al. Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(10):2280-2299.
- Michels E, Hoebeeck J, De Preter K, et al. CADM1 is a strong neuroblastoma candidate gene that maps within a 3.72 Mb critical region of loss on 11q23[J]. BMC Cancer, 2008, 8:173.
- Nowacki S, Skowron M, Oberthuer A, et al. Expression of the tumour suppressor gene CADM1 is associated with favourable outcome and inhibits cell survival in neuroblastoma[J]. Oncogene, 2008, 27(23):3329-3338.
- Ando K, Ohira M, Ozaki T, et al. Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation[J]. Int J Cancer, 2008, 123(9):2087-2094.
- Hoebeeck J, Michels E, Menten B, et al. High resolution tiling-path BAC array deletion mapping suggests commonly involved 3p21-p22 tumor suppressor genes in neuroblastoma and more frequent tumors[J]. Int J Cancer, 2007, 120(3):533-538.
- Michalowski MB, de Fraipont F, Plantaz D, et al. Methylation of tumor-suppressor genes in neuroblastoma: The RASSF1A gene is almost always methylated in primary tumors[J]. Pediatr Blood Cancer, 2008, 50(1):29-32.
- Banelli B, Gelvi I, Di Vinci A, et al. Distinct CpG methylation profiles characterize different clinical groups of neuroblastic tumors[J]. Oncogene, 2005, 24(36):5619-5628.

- 25 Alaminos M, Davalos V, Cheung NKV, et al. Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96 (16): 1208-1219.
- 26 Misawa A, Tanaka S, Yagyu S, et al. RASSF1A hypermethylation in pretreatment serum DNA of neuroblastoma patients: a prognostic marker [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100 (2): 399-404.
- 27 Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3 (3): 203-216.
- 28 George RE, London WB, Cohn SL, et al. Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (27): 6466-6473.
- 29 张健, 董亮, 崔华雷. 神经母细胞瘤相关基因的研究进展 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2006, 5 (6): 443-446.
- 30 Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, et al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100 (9): 1471-1482.

·病例报告·

母婴共患绒癌 1 例

侯大为

母婴共患绒癌临床罕见,病死率高,诊治困难。本院近期救治 1 例,现报告如下。

患儿,男,23 d,足月顺产,出生体重 3 250 g,因呕吐、黑便 5 d 入院。患儿 5 d 前出现呕吐,为胃内容物并含少量黄绿色液体,症状渐加重,间断合并少量黑便,当地医院腹部 B 超诊断为消化道内占位。体查:一般情况好,腹平软,深压痛(+),未扪及包块,肝脾无肿大,肠鸣音 3~5 次/min。钡餐检查见空肠近端不全性梗阻。腹部 B 超检查考虑空肠腔内息肉。血常规:WBC 14.3×10^9 , Hb 116 g/L。剖腹探查见腹腔内有少量淡血性渗液,距屈氏韧带 15 cm 处有肿物自空肠系膜对缘肠腔内突出于浆膜外,表面有破溃,呈鱼肉样,并少量出血,约 4 cm × 3 cm × 3.2 cm,腔内占位造成不全梗阻。切除肿物所在肠管 10 cm 后行端端吻合术。术后病理诊断为绒毛膜上皮癌。免疫组化: HCG(+), AFP(-), NSE(-), AE1/AE3(+), Vimentin(-)。血 AFP 961 ng/mL (正常 <20 ng/mL), HCG 206.7 mIU/mL (正常 <5 mIU/mL), NSE 12.4 ng/mL, 雌二醇 (E_2) 14.7 pg/mL (正常 0~11 pg/mL)。其母 HCG 35 220 mIU/mL,呈上升趋势,出现数次阴道大量出血,子宫超声检查见多发实性占位性病变,肺内有结节样转移阴影,经刮宫后确诊为绒癌。因胎盘病理检查发现原发肿瘤病灶,故患儿临床诊断为胎盘绒毛膜癌、消化道转移。术后 10 d 母婴同时开始 EMA/CO 方案化疗(患儿母亲未行手术治疗),先后联合使用 5-FU(氟尿嘧啶)、KSM(放线菌素 D)、VP-16(依托泊苷)、DDP(顺铂)化疗,持续 3 个月,母婴主要理化指标基本恢复正常,予维持量化疗 2 年,

效果满意,随访 4 年,母子健康。

讨论 绒癌是高度恶性的妇科生殖细胞肿瘤,多发于生育期妇女,病情进展快,全身转移早,死亡率约 20%。婴儿绒癌病因尚不明确,普遍认为系经胎盘母婴垂直传播方式获得,在患母胎盘中发现了绒癌细胞的浸润而得以佐证^[1]。最新基因学研究考虑肿瘤与第 12 位染色体异常表达和相关基因诱导有关,多孕、多产(包括流产)与母婴绒癌发生关系密切,绒癌家族史及既往葡萄胎的出现亦应引起重视^[1-3]。绒癌经血行播散,多脏器侵蚀,好发转移部位依次为肝、肺、脑和皮肤等^[4]。婴儿绒癌病情进展快,转移早,症状隐蔽,临床表现多样化且症状不典型,诊断困难。术前血、尿 HCG 的明显升高及肝、肺等重要脏器的转移病灶是诊断的重要依据,术后病理检查结果和患母的异常妇科表现乃是提示诊断和获得治疗的最后机会。母婴共患绒癌具有恶性度高、破坏浸润性强、转移进展快和发现治疗滞后的特点,母婴血、尿 HCG 指标及准确的病理检查结果至关重要,早发现、早手术及合理的联合化疗是共患绒癌母婴长期存活的关键。

参考文献

- 1 崔金全,石一复,周怀君,等. 葡萄胎和绒毛膜癌基因表达谱改变与滋养细胞增生的关系 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 12: 16-17.
- 2 罗大顺,沈兰皖,鲁潘贵. HCPT、5-FU、MTX 联合化疗绒癌 2 例 [J]. *中国肿瘤临床杂志*, 2000, 2: 34.
- 3 闫瑾. 46 例葡萄胎、绒癌患者血清 HCG 检测分析 [J]. *洛阳医学学报* 2001, 1: 25-26.
- 4 冯淑娴,边丽华. 绒癌空肠转移 1 例 [J]. *西北国防医学杂志*, 2005, 2: 143-144.

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2010.06.020

作者单位:首都医科大学附属北京儿童医院新生儿外科 (100045), 侯大为, E-mail: hd7187@163.com