

# MYCN 与神经母细胞瘤相关性研究进展

邢莉莉 综述 吴晔明 审校

神经母细胞瘤是起源于神经嵴细胞的恶性肿瘤,发病率居儿童恶性肿瘤第四位,仅次于白血病、脑瘤、淋巴瘤。MYCN 是 MYC 家族成员,参与多种生理和病理过程,包括细胞生长和凋亡、新生血管形成和肿瘤浸润与转移等,MYCN 在肿瘤的发生发展过程中所起的作用正日益受到重视。本文对 MYCN 与神经母细胞瘤的关系作一综述。

## 一、MYCN 基因

MYCN 基因在正常人体以单倍体状态位于 2 号染色体短臂远端(2p23~24),由被 2 个内显子分隔开的 3 个外显子组成。表达蛋白 N-myc 约 62~64 KDa,位于细胞核,半衰期约 30~50 min。MYCN 蛋白是螺旋-环-螺旋/亮氨酸拉链(helix-loop-helix/leucine Zipper, HLH/LZ)结构的蛋白,与 MAX 形成复杂的异二聚体,与 CACGTG (E 盒 MYC 位点)序列有高亲和力,而与许多非经典 DNA 序列亲和力很低<sup>[1]</sup>。除神经母细胞瘤外,MYCN 还过表达于其他胚胎或神经内分泌起源的肿瘤,如视网膜母细胞瘤、Wilms' 肿瘤、横纹肌肉瘤、成神经管细胞瘤、胶质母细胞瘤、小细胞肺癌<sup>[2-5]</sup>。与 MYC 家族的其他蛋白一样,MYCN 也是一种转录因子,可调控多个目的基因的表达,从而调控细胞多种功能,如细胞增殖、细胞生长、蛋白合成、细胞代谢、细胞侵袭转移、凋亡及分化<sup>[6]</sup>。约 25%~30% 的神经母细胞瘤患儿 MYCN 基因有扩增,多系晚期患儿,治疗效果差,预后多不良,多数病例扩增倍数越高,预后越差<sup>[7]</sup>。而在高风险神经母细胞瘤中约有 40% 均高表达 MYCN。从不同部位或从诊断到复发的不同时期所取的神经母细胞瘤组织,均可检测到 MYCN 有一致的高表达,这说明 MYCN 的高表达是高风险性神经母细胞瘤的一种稳定的、固有的特性<sup>[8]</sup>。

## 二、MYCN 促进神经母细胞瘤细胞生长增殖

细胞增殖是通过细胞对等分裂产生与母细胞遗

传特性相同的子细胞,使细胞数目增加的过程。有机体对细胞增殖过程具有十分精确的调节能力,使细胞增殖适应机体的生长发育要求。而肿瘤实质是细胞分裂的遗传控制发生根本改变,使肿瘤细胞不受机体控制,无限增殖,且肿瘤细胞形态结构功能异常,对机体造成极大伤害。过量表达的 MYCN 可促进神经母细胞瘤细胞生长增殖,CW Woo 等通过体外 RNA 干扰的方法降低 MYCN 的表达,从而抑制神经母细胞瘤的增殖<sup>[9]</sup>。Shamim Hossain 等通过裸鼠体内试验证实 NLLRR1 可增强 EGF 介导的 MYCN 引发的神经母细胞瘤的生长增殖<sup>[10]</sup>。

## 三、MYCN 抑制神经母细胞瘤细胞凋亡

细胞凋亡是在某些生理或病理条件下,细胞接受到某些信号刺激所触发的程序性细胞死亡。细胞凋亡调控异常(凋亡不足或凋亡过度)可成为某些疾病的重要发病机制。肿瘤生物学研究表明,各种抗凋亡基因和促凋亡基因的表达异常是各种肿瘤疾病发生的重要原因。目前很多证据表明,MYCN 与神经母细胞瘤细胞的凋亡相关,实验性诱导 MYCN 过表达后,主要通过 ARF/p53 通路促进细胞凋亡<sup>[11]</sup>。Jung-Hee Kang 等<sup>[12]</sup>用 Small interfering (si) RNA 体外感染 NB 细胞,降低 MYCN 的表达后即可诱导细胞凋亡,从而抑制神经母细胞瘤细胞生长。Malin 等<sup>[13]</sup>体外和体内实验均证明 GANT61 降低 Hedgehog (HH) 信号通路的 GLI1 及 c-MYC、MYCN 的 mRNA 表达后,即可诱导神经母细胞瘤发生凋亡。

## 四、MYCN 抑制神经母细胞瘤的分化

诱导分化(Induction of differentiation, IOD)是指恶性肿瘤细胞在体内外分化诱导剂的作用下,向成熟或接近成熟的细胞分化。肿瘤的诱导分化作为肿瘤治疗的一条新途径,近年来研究非常活跃,国内外对诱导分化剂的研究取得了重大进展。特别是我国学者王振义、陈竺等研究出的诱导分化剂全反式维甲酸,它可以通过诱导分化未成熟的白血病细胞,而应用于临床治疗 M3 型慢性粒细胞白血病,并取得显著疗效。降低 MYCN 表达可以诱导神经母细胞瘤细胞分化是当前研究神经母细胞瘤领域的热点之

一。神经母细胞瘤最显著的特征是肿瘤可以自然转归消退,其中包括未分化或低分化的神经母细胞瘤细胞分化成为正常的神经细胞。全反式维甲酸也可以诱导神经母细胞瘤细胞分化,很多研究表明,全反式维甲酸先在转录水平降低 MYCN 的表达,然后诱导神经母细胞瘤细胞分化<sup>[14]</sup>,更进一步用 shRNA 干扰 MYCN 基因表达,导致神经母细胞瘤细胞形态学和生物化学的分化<sup>[15]</sup>。Jung-Hee Kang 等<sup>[12]</sup>也用 Small interfering (si) RNA 体外感染 NB 细胞,降低 MYCN 的表达,促进神经母细胞瘤细胞分化。这些研究均表明 MYCN 有保持神经母细胞瘤细胞未分化表型的功能。

#### 五、MYCN 促进神经母细胞瘤侵袭转移

肿瘤转移是指肿瘤细胞从原发部位侵入淋巴管、血管或体腔,迁徙到它处继续生长,形成与原发肿瘤同样类型的肿瘤的过程。这个过程由一系列复杂步骤组成,包括肿瘤细胞对基底膜和基质的浸润,迁徙能力的增强,免疫监视的逃脱,在靶器官的种植和新生血管形成等。

整合素(integrin)在调节神经母细胞瘤粘附、侵袭中有重要作用。Natsumi Tanaka 等<sup>[16]</sup>发现在 MYCN 表达低的细胞株如 SK-N-SH 和 NB69 中, integrin  $\alpha 1$  的表达量高,而 MYCN 过表达的细胞株如 IMR32、NB1、NB9 和 NB19 中 integrin  $\alpha 1$  的表达量低;用 siRNA 干扰 MYCN 过表达细胞株 NB1 和 NB19 中 MYCN 的表达后,与增强神经母细胞瘤细胞与细胞外基质粘附密切相关,从而降低神经母细胞瘤迁移能力的 integrin  $\alpha 1$  的表达量会升高;然而将 SK-N-SH 和 NB69 细胞株的 MYCN 过表达后 integrin  $\alpha 1$  的表达量降低,从而降低神经母细胞瘤细胞与胞外基质的粘附作用,增强神经母细胞瘤的迁移能力;这些结果证明了 MYCN 可以下调 integrin  $\alpha 1$  的表达,从而降低神经母细胞瘤细胞与细胞外基质粘附作用,促进细胞迁移。Sonja Volland 等<sup>[17]</sup>发现,另一个在神经母细胞瘤中具有极强促迁移能力的重组人斯钙素-2(Stanniocalcin-2/STC-2),在 4 期神经母细胞瘤中高表达;在不同神经母细胞瘤细胞株之间,STC-2 与 MYCN 的表达有正相关性;4 期和 4 s 期的神经母细胞瘤有广泛的远处器官转移,而在此两期神经母细胞瘤的原位肿瘤组织中均发现有 STC-2 与 MYCN 正相关的高表达。

#### 六、MYCN 促进神经母细胞瘤血管生成

自 1971 年 Folkman<sup>[18]</sup>首次提出肿瘤的生长和转移具有血管依赖性之后,肿瘤血管生成的调节机

制和抗血管生成在肿瘤治疗中的意义得到广泛关注。肿瘤的生长依赖于血管的生成,只有当大量肿瘤相关血管长入肿瘤实质内部,才能促使肿瘤持续生长和转移;反之,肿瘤生长将受到明显限制,肿瘤细胞就会出现凋亡或坏死。因此,肿瘤的生长包括两个不同的阶段,即从无血管的缓慢生长阶段转变成有血管的快速增殖阶段,血管生成使肿瘤获得足够的营养物质,是促成上述转变的关键环节<sup>[19]</sup>。恶性肿瘤发生侵袭和转移是肿瘤治疗失败的主要原因,它是一个由多分子参与的肿瘤细胞与宿主细胞间相互作用的复杂的多阶段过程,在这一过程的起始及终末阶段血管生成发挥着重要作用<sup>[20]</sup>。血管生成因子(VEGF)在血管生成中发挥重要作用,Kang J 等<sup>[21]</sup>研究发现,在 MYCN 高表达的细胞株中使用磷脂酰肌醇激酶-3(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抑制剂渥曼青霉素(wortmannin)后会使 MYCN 的表达降低,用 siRNA 干扰 MYCN 的表达后又会阻断 VEGF 的分泌。Yvan H. Chanthery 等<sup>[22]</sup>也发现,可以调节神经母细胞瘤血管生成的 PI3K,加入 PI3K 抑制剂 NVP-BEZ235 后,MYCN 表达降低,从而神经母细胞瘤的血管生成减少。Josiah V. Dungwa 等<sup>[23]</sup>发现,血管生成素(angiogenin, ANG)在神经母细胞瘤中对血管生成起到很重要作用,且 ANG 与神经母细胞瘤临床病理、细胞生物学特征患者预后均密切相关;而 ANG 在 4 期神经母细胞瘤和 MYCN 过表达时显著增多。

#### 七、MYCN 与神经母细胞瘤的预后及分期

肿瘤组织内 MYCN 基因扩增已做为一个神经母细胞瘤预后不良的指标应用于临床。Linda J. Valentijn 等<sup>[24]</sup>应用 shRNA 干扰 MYCN 过表达的 IMR-32、SKNBE 的 MYCN 表达后,检测到表达降低,CLU 表达升高,即证明标志神经母细胞瘤预后不良的高表达指标 PRMT1、MTAP 和表达指标 CLU 均受 MYCN 的调节;应用免疫组化方法检测 29 例临床神经母细胞瘤患者组织标本的 MYCN 蛋白表达,进一步证明 MYCN 蛋白相对高表达是神经母细胞瘤预后不良的标志。MYCN 基因的表达量已成为神经母细胞瘤临床病理分期的参考指标之一。NB 被分为 3 个病理学亚型:TRK-A 神经亲和受体表达是高倍体,倾向可自行消退;另一类型 TRK-B 神经亲和受体表达有另外的染色体增强,17q、14q 杂合体缺失,一般为不稳定型;第三类型为染色体 1P 丢失、N-myc 基因扩增<sup>[25]</sup>。北美国际肿瘤协作组依据年龄、国际 NB 分期系统(INSS)分期和肿瘤病理

(MYCN 状况、Shimada 组织学、DNA 倍性)将 NB 患者分为低危、中危和高危组,确诊后 3 a 无事件生存率分别为 90%、70%~90% 和 30% 以上。

#### 八、MYCN 与神经母细胞瘤的治疗

多数神经母细胞瘤患儿就诊时肿瘤已转移,转移部位以淋巴结、骨髓及骨多见,在强烈化疗、自体造血干细胞移植及诱导治疗后,其预后仍然很差。目前广泛应用的化疗由于缺乏特异性,对正常组织细胞毒副作用大,需要探索新的靶向治疗方法。20%~25% 的神经母细胞瘤患儿有 MYCN 原癌基因扩增,大量研究显示,MYCN 扩增提示预后不良。因此,MYCN 是治疗神经母细胞瘤的特异性分子靶点之一。Bagatell R 等<sup>[26]</sup>统计 1991—2002 年各种生活习惯的 1 期和 2 期神经母细胞瘤患者发现 MYCN 高表达的患者较 MYCN 低表达患者治疗效果差。应用 RNA 干扰的方法抑制 MYCN 的 RNA 表达,可抑制神经母细胞瘤细胞的增殖、转移,促进凋亡、分化,从而抑制神经母细胞瘤的发展恶化已得到广泛证实<sup>[10,12,16]</sup>。因此,抑制 MYCN 的表达有待成为治疗神经母细胞瘤的新方法。

MYCN 广泛参与神经母细胞瘤多种生理和病理过程,在细胞生长与凋亡、细胞分化、肿瘤的浸润与转移、及血管形成等方面发挥重要作用,对神经母细胞瘤的诊断、治疗和预后评价有重要意义。但是,MYCN 的许多生物学功能和效应机制尚不完全清楚,对其更进一步的研究有可能发现预防和治疗神经母细胞瘤的新方法。

#### 参考文献

- Kato GJ, Lee WM, Chen LL, et al. Max; functional domains and interaction with c-Myc [J]. *Genes Dev*, 1992 (6):81-92.
- Lee WH, Murphree AL, Benedict WF. Retinoic acid pathway activity in Wilms tumors and characterization of biological responses in vitro [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10:136.
- Pistola V, Morandi F, Pezzolo A, et al. MYCN: from oncoprotein to tumor-associated antigen [J]. *Front Oncol*, 2012, 2:174.
- Piccinni E, Chelstowska A, Hanus J, et al. Direct interaction of Gas41 and Myc encoded by amplified genes in nervous system tumours [J]. *Acta Biochim Pol*, 2011, 58(4):529-534.
- Salido M, Arriola E, Carracedo A, et al. Cytogenetic characterization of NCI-H69 and NCI-H69AR small cell lung cancer cell lines by spectral karyotyping [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2009, 191(2):97-101.
- Natsumi Tanaka, Masahiro Fukuzawa. MYCN downregulates integrin  $\alpha 1$  to promote invasion of human neuroblastoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(4):815-821.
- Anderson J, Gibson S, Williamson D, et al. Rapid and accurate determination of MYCN copy number and 1p deletion in neuroblastoma by quantitative PCR [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2006, 46:820-824.
- Moreau LA, McGrady P, London WB, et al. Does MYCN amplification manifested as homogeneously staining regions at diagnosis predict a worse outcome in children with neuroblastoma? A Children's Oncology Group Study [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:5693-5697.
- Woo CW, Tan F, Cassano H, et al. Use of RNA interference to elucidate the effect of MYCN on cell cycle in neuroblastoma [J]. *Pediatr. Blood Cancer*, 2008 (50):208-212.
- Shamim Hossain, Atsushi Takatori, Yusuke Suenaga, et al. neuroblastoma and accelerates tumor growth in vivo NL-RR1 enhances EGF-mediated MYCN induction in neuroblastoma and accelerates tumor growth in vivo [J]. *Cancer Res*, 2012, 1-15.
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis [J]. *Nature*, 2005, (434):864-870.
- Jung-Hee Kang, Piotr G, Rychahou, et al. MYCN silencing induces differentiation and apoptosis in human neuroblastoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, (351):192-197.
- Malin Wickström, Cecilia Dyberg, Takashi Shimokawa, et al. Targeting the Hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo [J]. *Int. J. Cancer*, 2012, 1-9.
- Wada RK, Seeger RC, Reynolds CP, et al. Cell type-specific expression and negative regulation by retinoic acid of the human N-myc promoter in neuroblastoma cells [J]. *Oncogene*, 1992, 7:711-717.
- Henriksen J, Haug B, Buechner J, et al. Conditional expression of retrovirally delivered anti-MYCN shRNA as an in vitro model system to study neuronal differentiation in MYCN-amplified neuroblastoma [J]. *BMC Dev Biol*, 2011, 1-11.
- Natsumi Tanaka, Masahiro Fukuzawa. MYCN downregulates integrin  $\alpha 1$  to promote invasion of human neuroblastoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33:815-821.
- Abteilung Anatomie und Zellbiologie, Zentrum Anatomie, Universitätsmedizin Göttingen, et al. Stanniocalcin 2 promotes invasion and is associated with metastatic stages in neuroblastoma [J]. *Int J Cancer*, (下转第 343 页)