

神经生长因子诱导神经母细胞瘤 细胞分化的研究

陈 杰

(中国医学科学院、中国协和医科大学、北京协和医院, 北京 100730)

[摘要] 神经生长因子的研究是目前医学生物学研究的热点之一,其诱导瘤细胞的分化更引人注目。我们的研究发现,神经生长因子仅能诱导具有短神经突起的N型瘤细胞分化成神经元样的细胞。这些细胞均无N-myc扩增,均具有高、低亲和性神经生长因子受体。而对神经生长因子无反应的细胞系或为S型细胞,或缺少神经生长因子受体的表达,或有N-myc扩增。进一步研究发现,不同细胞类型代表着瘤细胞的不同分化方向。神经生长因子仅能诱导向神经元方向分化的细胞分化。分化的瘤细胞中,C-myc的表达明显下降,提示神经生长因子可能通过抑制C-myc的表达而促进分化。用基因重组技术,恢复瘤细胞中神经生长因子受体的表达,可部分恢复其对神经生长因子的反应。针对N-myc的反义基因调控,可促进其分化过程。对瘤细胞原位凋亡检测和细胞凋亡相关基因的研究表明:诱导分化过程中伴随着bcl-2表达的下降和瘤细胞凋亡的增加。

[关键词] 神经生长因子,神经母细胞瘤,诱导分化

神经生长因子(NGF)的研究是当今医学生物学界的热点之一。NGF是分子量为26000道尔顿的多肽,它能介导多种生物学反应,对感觉神经元和交感神经元的发育、分化及生存是必不可少的因子。对中枢神经系统的胆碱能神经元亦具有某种神经营养的作用。

恶性肿瘤的分化和逆转是人们梦寐以求的宿愿。神经母细胞瘤的细胞与神经母细胞相似,具有神经母细胞的形态及生化特点,有神经原纤维的表达,能合成肾上腺素能神经递质酶并常有N-myc癌基因的扩增。神经上皮瘤的细胞亦与神经母细胞相似,可视为神经母细胞瘤的一种亚型,在形态上同神经母细胞瘤很难区别。神经上皮瘤的细胞能合成胆碱能神经递质酶,并常有特征的t11:22染色体易位。由于这些肿瘤具有神经母细胞的特点并常有自发分化的倾向,从而推测神经母细胞瘤的发生可能为神经母细胞向神经元分化的过程中发生了某种阻滞的结果。因此推测NGF可能促进这些肿瘤的分化。国外文献中仅有NGF促进神经母细胞瘤分化的零星报道,且结果亦多不一致^[1,2]。人们对NGF促进神经母细胞瘤细胞分化的基础与机理以及NGF诱导分化的规律与癌基因表达等之间的关系均不清楚。国内尚无此方面的研究。鉴于此,我们以18个神经母细胞瘤系和神经上皮瘤系作为基本材料,进行了系统研究。

1 NGF诱导分化规律的研究

为了研究NGF是否能诱导这些人神经母细胞瘤系和神经上皮瘤系的细胞出现分化,我

本文于1996年12月24日收到。

们在不同的培养平面上培养这些细胞系,包括 Primaria 培养平面、铺以 Polylysine 的培养平面和铺以 Matrigel 人工基底膜的培养平面,用 NGF 处理这些瘤细胞系。结果发现,在这三种培养平面上,NGF 仅能诱导三个神经母细胞瘤系的细胞出现分化。分化的细胞出现神经元样的形态特征,表现为神经突起的明显延长。Northern blot 结果显示神经原纤维轻链 mRNA 表达的明显增加。而全部 9 个有 N-myc 扩增的神经母细胞系及三个神经上皮瘤系均未出现 NGF 诱导的分化反应。无 N-myc 扩增的 6 个神经母细胞系中,所有 3 个上皮样细胞(S型)构成的细胞系亦对 NGF 处理无反应,而仅 3 个由神经母细胞(N型)构成的细胞系对 NGF 处理出现明显的分化反应^[3]。我们的研究揭示了 NGF 诱导神经母细胞瘤细胞分化的如下规律:(1) NGF 诱导分化依赖细胞膜表面两种 NGF 受体的同时存在。NGF 受体的化学交联,Scatchard 分析以及 Flow cytometry 结果表明:有反应的细胞系均含有一定数量的 NGF 受体,包括高亲和性受体和低亲和性受体两种;而无反应细胞系中或者没有 NGF 受体的表达,或仅有单一一种受体的少量表达。NGF 受体 mRNA 表达亦显示:有反应的细胞系均有 NGF 受体 mRNA 的表达,反之则没有或很少 NGF 受体 mRNA 的表达。(2) N-myc 的扩增是影响 NGF 诱导分化的主要因素之一。因 3 个 NGF 诱导分化的细胞系均为无 N-myc 扩增的细胞系;9 个有 N-myc 扩增的神经母细胞瘤系,虽形态上多为 N 型,且有明显的 NF-L 的表达,但多无 NGF 受体的表达,亦均对 NGF 处理无明显反应。这表明,在 N-myc 扩增、NGF 受体表达以及 NGF 诱导分化之间有一定联系。(3) 在无 N-myc 扩增的神经母细胞瘤系中,NGF 是否能诱导分化,主要与细胞形态有关。3 个有反应细胞系均为神经母细胞型(N型)或中间型(I型);而 3 个无反应细胞系均为上皮样细胞型(S型)。所有 3 个神经上皮瘤系亦均为 S 型,因而对 NGF 无反应^[3]。这些规律的阐明,对 NGF 诱导神经母细胞瘤细胞分化的研究具有重要的指导意义。

2 神经母细胞瘤系中细胞类型与 NGF 诱导分化的关系

神经母细胞瘤系中,瘤细胞一般均由两种不同形态的瘤细胞构成:一种具有短神经突起,称为 N 型细胞;一种为扁平的瘤细胞,称为 S 型瘤细胞。这两种瘤细胞可来源于不同的肿瘤或同一种瘤的不同克隆。为什么 NGF 仅能诱导 N 型瘤细胞分化?我们通过用 Northern blot 技术,研究这些细胞系中多种神经标志物 mRNA 的表达,发现 3 个神经上皮瘤系中均无神经原纤维轻链(NF-L),Chromogranin A(CGA),Neuropeptide Y(NPY),Peripherin, Synapsin 及 Neurotension(NT)mRNA 的表达,而所有 9 个神经母细胞瘤系中均有 NF-L mRNA 的表达。3/8 神经母细胞瘤系有 CGA 和/或 NPY 的表达。比较不同类型的细胞中的基因表达,我们发现,N 型的神经母细胞瘤系表达的 NGF 受体要比 S 型的多得多。NF-L mRNA 的表达亦比 S 型要高得多;而 S 型细胞中则有较多表皮生长因子受体(EGFR)的基因表达。这些结果表明,瘤细胞的不同形态可能代表着瘤细胞的不同分化方向或不同分化阶段。S 型细胞可能代表着神经母细胞瘤细胞向黑色素细胞或雪旺氏细胞的方向分化;而 NGF 只能诱导那些具有向神经元方向分化潜能的细胞(N型)分化^[4]。这与向神经胶质或雪旺氏细胞分化的细胞多表达 EGF 受体的现象一致^[5]。

3 NGF 诱导分化过程中癌基因表达的变化

在 NGF 诱导分化的过程中是否伴有基因的变化?我们用 Northern blot 和核酸杂交技术

研究 11 个人神经母细胞瘤细胞系在 NGF 处理后的癌基因表达的变化,发现一个有趣的规律,即除一个细胞系既没有 N-myc 的表达,也没有 C-myc 表达外,5 个有 N-myc 扩增的细胞系中均无 C-myc 癌基因的表达。相反,5 个有 C-myc 过度表达的细胞系,则均无 N-myc 的表达。在 20 例神经母细胞瘤的原位核酸杂交的研究中发现,在 60% 的肿瘤(12 例)中也有相似的负相关关系。免疫组化在 55% 的病例中也发现这种规律。在 NGF 诱导分化的细胞中,其 C-myc 的表达明显降低。时间曲线表明,这种基因表达的改变可见于 NGF 处理后 6 小时,到 24 小时已相当明显,4 天时则更明显。其时间曲线与形态学分化出现的时间非常一致^[6]。核酸原位杂交也得到同样结果^[7]。这些结果表明,C-myc 癌基因的过度表达可能阻滞着神经母细胞瘤细胞的自然分化进程,很有可能 NGF 是通过抑制 C-myc 的表达而促进细胞的分化。我们的结论得到美国专家 Ross 博士的实验的支持^[8]。

4 NGF 受体与 NGF 诱导分化的关系

NGF 的作用是通过同其受体结合而实现的。因此,NGF 受体的研究是 NGF 功能研究的重要方面。直到 80 年代中期,Ross 等研制的单克隆抗体才明确 p75 蛋白是 NGF 受体的重要组成成分之一^[9]。为探讨 NGF 受体与 NGF 诱导瘤细胞分化的关系,我们应用受体的化学交联技术、免疫沉淀技术、Scatchard 分析、荧光抗体标记细胞表面 NGF 受体的流式细胞术,以及 Northern blot 技术,研究了 NGF 诱导分化的细胞系和对 NGF 无反应的细胞系。发现,对 NGF 有分化反应的细胞均有高亲和性和低亲和性两种受体(神经母细胞瘤系 SHSY5Y,高亲和性 74 000 结合位点/细胞,低亲和性 29 000 个结合位点/细胞;神经母细胞瘤系 GICAN,高亲和性 53 000 个结合位点/细胞,低亲和性 13 000 个结合位点/细胞)^[3]。这表明,在 NGF 诱导分化的过程中,NGF 受体是必不可少的,而且需要高亲和性和低亲和性 NGF 受体的共同参与。这一提法已逐渐由高亲和性 NGF 受体的基因转染所证实^[8,10]。我们所检测的神经上皮瘤系虽有一定数量的高亲和性和低亲和性受体,但因其均为 S 型细胞,故无 NGF 诱导分化出现。检测的其余两个无 N-myc 扩增的神经母细胞瘤系,因主要是由 S 型细胞构成的细胞系,以及 3 个 N-myc 有扩增的细胞系中,仅两个中有少量低亲和性 NGF 受体,而均无高亲和性受体的表达,故 NGF 不能诱导其向神经元方向分化。Northern blot 分析,亦发现类似结果。

5 表达 NGF 受体基因的逆转录病毒载体的重组及其在缺少 NGF 受体的神经母细胞瘤系中的表达

为了进一步阐明 NGF 受体在 NGF 诱导分化过程中的作用,我们用逆转录病毒载体与 NGF 受体基因进行重组,重组体经 PA317 包被细胞系包被,用其上清分别转染 4 个缺少 NGF 受体表达的人神经母细胞瘤细胞系,其中 3 个(LAN-5, CHP404, IMR-32)有 N-myc 扩增,形态均为 N 型;1 个虽无 N-myc 扩增,但形态为 S 型细胞系(SHEP)。细胞经 G418 筛选后,分别建成了转化细胞系 LAN-5/NGFR, CHP404/NGFR, IMR-32/NGFR 和 SHEP/NGFR,以及相应的空病毒转化细胞系 LAN-5/NEO, CHP404/NEO 和 IMR-32/NEO。经 Scatchard 分析,流式细胞术细胞受体测定,受体化学交联,Northern blot 分析等技术,从蛋白及 mRNA 水平均证实,表达 NGFR 病毒载体的转化细胞系有大量重组 NGF 受体的表达^[11]。用 NGF 处理这些细胞系,发现仅有部分对 NGF 的反应,表现为与分化有关的癌基因 C-fos 的表达增强

和神经原纤维的表达也明显增强,但形态上尚未见明显的分化^[11]。因为这些神经母细胞瘤多为有 N-myc 扩增的细胞系,并且 N-myc 癌基因在 NGFR 基因转染前后及 NGF 处理前后均未见明显改变^[11]。这些结果均说明:恢复 NGF 受体的表达,可部分恢复细胞系对 NGF 诱导分化的反应。N-myc 癌基因的扩增和过度表达可能为阻滞分化的重要因素。

6 表达反义 N-myc 基因的逆转录病毒载体的重组和其对 NGF 诱导分化的影响

大约 30%神经母细胞瘤的病例有 N-myc 癌基因的扩增。晚期神经母细胞瘤的一半左右和大多数神经母细胞瘤系中均有 N-myc 癌基因的扩增和过度表达。有 N-myc 扩增的细胞系均对 NGF 的处理无反应。这些提示,N-myc 扩增与 NGF 诱导分化有一定关系。Rosolen 等^[12]应用反义寡核苷酸处理无 N-myc 扩增的神经上皮瘤系,观察到一定的促分化反应,但由于反义寡核苷酸容易被降解,持续时间短,且其研究的细胞系无 N-myc 的扩增,因此尚不能直接说明 N-myc 与 NGF 诱导分化的关系。我们用逆转录病毒重组了表达反义 N-myc 的重组体^[13],经磷酸钙、脂质体、Transfectam reagent,PA317 细胞包被,再用其上清感染等多种基因转移技术,转染曾经表达重组 NGF 受体基因的人神经母细胞瘤系,其中 Transfectam reagent 转染的细胞,已经相应抗生素(puromycin)筛选,建立了表达反义 N-myc 的神经母细胞瘤系(IMR-32/NGFR/AS-N-myc)。用 NGF 处理此神经母细胞瘤系,瘤细胞出现了明显的分化反应,表现为神经突起的明显延长^[14]。结果表明,通过抑制 N-myc 癌基因的表达,可明显促进 NGF 诱导神经母细胞的分化,同时说明 N-myc 在 NGF 诱导瘤细胞分化中起着一定的阻滞作用。

7 细胞凋亡相关基因与神经母细胞瘤细胞凋亡的关系

恶性肿瘤的发生与发展,除与癌基因及抑癌基因改变有关外,凋亡调节基因的意义正日益受到重视。我们应用原位杂交和免疫组织化学检测 20 例人神经母细胞瘤中 bcl-2 的表达,发现人神经母细胞瘤中有很高比率的 bcl-2 的表达。应用细胞原位凋亡检测技术检测不同 bcl-2 表达强度的神经母细胞瘤中的细胞凋亡情况,发现瘤细胞的凋亡与 bcl-2 表达强度呈明显的负相关关系,即随着 bcl-2 表达的增强而凋亡细胞数明显减少。这表明, bcl-2 作为重要的凋亡抑制基因,在神经母细胞瘤的发生中可能起重要作用。针对这些凋亡抑制基因进行基因调控,可能恢复肿瘤的自我生长平衡调节机制,甚至出现良性逆转。

参 考 文 献

- [1] Jensen LM. Phenotypic differentiation of aphidicolin-selected human neuroblastoma cultures after long-term exposure to nerve growth factor. *Dev. Biol.*, 1987, **120**: 56-64.
- [2] Reynolds CP, Perez-Polo Jr. Nerve growth factor induces neurite outgrowth in a clone derived from an NGF-insensitive human neuroblastoma cell line. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1989, **7**: 125-132.
- [3] Chen J, Chattopadhyay B, Venkatakrishnan, et al. Nerve growth factor-induced differentiation of human neuroblastoma and neuroepithelioma cell lines. *Cell Growth & Differentiation*, 1990, **1**: 79-85.
- [4] 陈杰, 刘彤华. 人神经母细胞瘤系中生长因子受体及神经标志物基因的表达. *中华病理学杂志*, 1991, **21** (2): 10-12.
- [5] Biedler JL, Spengler BA, Chang TD, et al. Transdifferentiation of human neuroblastoma cells results in a coordinate loss

- of neuronal and malignant properties. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1988, **271**: 265-276.
- [6] 陈杰, 刘彤华, Ross AH. 神经生长因子诱导人神经母细胞瘤细胞分化过程中癌基因表达的变化. *中华病理学杂志*, 1991, **20**: 7-10.
- [7] Chen J, Liu T H, Ross AH. Down-regulation of C-myc oncogene during NGF-induced differentiation of neuroblastoma cell lines. *Chinese Med. J.*, 1994, **9** (3): 152-156.
- [8] Poluha W, Poluha DK, Ross AH. Trk A neurogenic receptor regulates differentiation of neuroblastoma cells. *Oncogene*, 1995, **10**: 185-189.
- [9] Ross AH, Grob P, Bothwell M, et al. Characterization of NGF receptor in neural crest tumors using monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**: 6681-6685.
- [10] Lavenius E, Gestblom C, Johansson I, et al. Transfection of TRK A into human neuroblastoma cells restores their ability to differentiate in response to nerve growth factor. *Cell Growth & Differentiation*, 1995, **6**: 727-736.
- [11] 陈杰, 刘彤华, Ross AH. 重组 NGF 受体基因在缺乏 NGF 受体的人神经母细胞瘤系中的表达. *基础医学与临床*, 1991, **11**: 26-31.
- [12] Rosolen A, Whitesell L, Ikegaki N, et al. Antisense inhibition of single copy N-myc expression results in decreased cell growth without reduction of C-myc protein in a neuroepithelioma cell line. *Cancer Res.*, 1990, **50**: 6316.
- [13] 陈杰, 刘彤华等. 表达反义 N-myc 逆转录病毒载体的构建. *中国医学科学院学报*, 1996, **18** (3): 235-237.
- [14] Chen J, Liu T H, Gao J. Construction of retroviral vector expressing antisense gene and its effects on NGF-induced differentiation of neuroblastoma cell lines. Presented in the 4th Congress of Asian-Pacific Association of Societies of Pathologists. 1995, May, 8-11. Beijing, China.

STUDIES OF NERVE GROWTH FACTOR (NGF) -INDUCED DIFFERENTIATION OF NEUROBLASTOMA CELLS

Chen Jie

*(Department of Pathology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy
of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730)*

Abstract Nerve growth factor-induced differentiation of tumor cells has become one of the important issues in biomedical research. In a serial of studies, we found that NGF-induced differentiation was confined to a particular class of neuroblastoma cell lines. They were usually N type cells without N-myc amplification, and expressed both low and high-affinity NGF receptors. However, the cell lines without response to NGF treatment were either S type cells, or with N-myc amplification. Most of them lacked expression of NGF receptors. Further studies indicated that different phenotypes might represent different directions of differentiation of neuroblastoma cells. NGF could only induce differentiation of those tumor cells ready to be differentiating to neurons. Using recombinant DNA technique, we successfully restored the expression of NGF receptor in neuroblastoma cell lines which lacked expression of NGF receptor and partially restored the NGF responsiveness of the cell lines. In order to specially down-regulate expression of N-myc in neuroblastoma cells, we constructed retroviral vector expressing antisense N-myc RNA. Enhanced morphological differentiation was observed when antisense N-myc vector was introduced into the tumor cell line. Apoptot-

ic cell number was significantly increased in antisense N-myc transduced cell line as detected by in situ cell death detection method and electromicroscopy. These results showed that inhibition of N-myc expression could promote NGF-induced differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells.

Key words nerve growth factor, differentiation, neuroblastoma, nerve growth factor receptors

· 资 料 ·

捷克科学院简介

捷克科学院成立于1992年,其前身是捷克斯洛伐克科学院。由59个研究所和5个下属单位组成。其中近1/2是具有大学以上学历的科学家和研究人员。其主要决策机构是科学院全委会,全委会中2/3的成员是各学科的代表,其他代表有大学学者、政府官员和公众人物。

执行机构是科学院理事会,理事长由科学院院长担任。理事会成员由选举产生,每届任期4年。为了对各研究所的工作进行评估,科学院设评审委员会,由其任命评审委员。委员会成员都是来自其它学术机构和各大学的著名科学家,其中一半是国外专家。

科学院的主要目标是在自然科学、技术科学、社会科学和人文科学等领域进行基础和战略性的应用研究,尤其是学术水平高,又涉及交叉学科领域或高度专业化的研究。

科学院预算由议会批准,主要经费由国家财政拨款。其它经费来源包括科技项目竞争中获益单位按合同提供的支持。

科学院的研究所也具有教育功能,主要是指导博士论文,同时也提供给年轻学者函授教育和大学进修的机会。

捷克科学院具有培养研究生的任务,许多理学硕士和博士生在相关研究所从事研究工作并撰写论文。另外,也参与科学院各所的科研工作。研究所与大学的科学家共同指导研究生的工作。

国际合作研究项目系统地分别通过三种形式的协议渠道受到资助:(1)科学院所属研究所同国外的科学院所和研究机构或专业学院的协议;(2)捷克科学院同国外对应机构的协议;(3)政府间的科技及文化协议。

1996年,捷克科学院共签署230项协议,其中56项为捷克科学院同其它33个国家的合作伙伴签署的协议。这些协议主要用于支持科技创新研究项目和科学院涉及的新兴学科领域的技术发展项目。另一个有影响的国际合作渠道是通过政府间或非政府间组织的合作。

捷克科学院也是国际科学院联盟的成员。科学院所属的各研究所和科研小组还分别参加欧盟的各种研究计划,同时也同国家科学技术委员会和全欧科学院密切的合作。

(国际合作局美大东欧处 陈淮 张巍 供稿)