

综述

1型神经纤维瘤病营养不良型脊柱侧凸发病分子机制的研究进展

The progress of pathogenesis in dystrophic scoliosis
secondary to neurofibromatosis type 1

王国强, 康意军, 李亚伟, 周 彬, 王 冰

(中南大学湘雅二医院脊柱外科 410011 长沙市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.12.13

中图分类号: R682.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-12-1120-03

1型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 1, NF1)是最常见的常染色体显性遗传病之一, 发病率约为 1/3000~1/4000, NF1 基因突变导致神经纤维瘤蛋白失活是 NF1 发病的遗传基础^[1]。骨骼营养不良占所有 NF1 患者的 50%^[2], 其中脊柱侧凸是最常见的骨损害, 发病率为 10%~30%^[3]。脊柱侧凸又分为营养不良型和非营养不良型, 营养不良型的比例高达 78.4%^[4]。神经纤维瘤蛋白能够在成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞中表达, 其功能的缺失能够导致骨发育不良^[5,6]。笔者就 NF1 营养不良型脊柱侧凸发病的分子机制综述如下。

1 NF1 基因、NF1 基因产物及信号转导通路

1.1 NF1 基因

NF1 基因位于 17 号染色体(17q11.2), 包含约 60 个外显子, 横跨超过 300 个碱基, NF1 基因在人类基因中是比较大的基因之一, 因外显子较多, 突变方式也较复杂, 包括无义突变、错义突变、插入或缺失(框移)、剪切突变、基因完全缺失、小片段缺失、氨基酸置换、染色体重排等^[7,8]。至今有 1485 种 NF1 基因突变, 多数导致了神经纤维瘤蛋白缩短或者功能缺失^[9]。一项研究发现在 189 例 NF1 基因突变的病例中, 85 例存在频发突变, 占 45%^[10]。NF1 基因 mRNA 长度超过 11~13kbp, 包含 8457bp 的开放阅读框和 1 个 3'端长度为 3.5kbp 的非翻译区^[11]。在 NF1 基因 21~27a 外显子区编码产物与哺乳动物三磷酸鸟苷活化蛋白(guanosinetriphatase activating protein, GAP) 基因产物具有高度序列同源性, 称为 NF1GAP 相关功能区 (NF1-GAP-related domain, NF1GRD)^[12]。

1.2 NF1 基因产物

神经纤维瘤蛋白是 NF1 的基因产物, 包含 2818 个氨基酸的功能蛋白, 分子量为 280kD, 神经纤维瘤蛋白在 NF1GRD 的 25~40kDa 片段与 p120GAP 的 250~400aa 片段具有同源性, 能够作为 GAP 作用于 Ras, 从而发挥功能, 是神经纤维瘤蛋白目前唯一明确的功能片段^[12]。NF1 基因

突变有多种临床表现, 家系之间或家系内 NF1 患者大多数的临床症状和年龄相关, 并有相当大的临床表型差异性, 大约 50% 的 NF1 患者会在 1 岁之前表现出临床症状, 在 8 岁之前达到 97%^[13]。NF1 发病原因主要与 NF1 基因发生突变导致编码神经纤维瘤蛋白异常有关^[1,9,14]。

1.3 NF1 蛋白信号通路

神经纤维瘤蛋白能够在所有的细胞中表达^[15]。神经纤维瘤蛋白能够通过多条细胞信号通路调节细胞的增殖和分化, 主要通路包括有 Ras/有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine-protein kinases, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号转导通路, 其他还包括调节腺苷酸环化酶活性以及与多种蛋白的相互作用, 例如微管蛋白、驱动蛋白 1、蛋白激酶 A 和 C、内陷蛋白、淀粉样前体蛋白^[16]。在 Ras/MAPK 通路中, 神经纤维瘤蛋白能够调节 Ras 蛋白家族的活性, 激活 RasGTP 酶, 加速 GTP 水解, 使 Ras 蛋白失活, 抑制下游的 Ras/MAPK 通路^[12]。Ras/MAPK 通路是调节细胞生长和增殖的主要细胞通路之一, 同时在器官发育过程中也能够调节细胞的分化, 神经纤维瘤蛋白功能障碍或者表达水平下降都有可能激活 Ras/MAPK 通路, 不仅能够导致诱发肿瘤, 也有可能包括导致包括皮肤色素沉着、心血管病变及骨骼和神经系统的病变^[9]。神经纤维瘤蛋白发挥重要作用的另一条通路为 AKT/mTOR 信号通路, 同样为作用于细胞外调节细胞功能的信号通路, AKT 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 能够被磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 激活, 而 PI3K 能够被 Ras 激活, mTOR 是 AKT 下游的一个作用靶点, 是整个 AKT/mTOR 信号通路的关键位点, mTOR 能够激活 p70S6 激酶(p70S6K), 从而直接或者间接激活 S6 核糖体蛋白 (S6 ribosomal protein, S6RP), 抑制 4E 结合蛋白 1 (4E-binding protein1, 4E-BP1)^[16]。mTOR 激活能够促进蛋白合成, 促进细胞的增殖、存活、迁移、侵袭及分化, 从而导致肿瘤以及骨骼等其他系统的病变^[17]。两条通路之间存在交集, 除 Ras 能够激活 PI3K 外, Ras/MAPK 通路中的 MAPK 激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, MEK) 也能够激活 mTOR,

第一作者简介: 男(1985-), 博士在读, 研究方向: 脊柱外科

电话: (0731)85295125 E-mail: wgq7200@163.com

通讯作者: 王冰 E-mail: wbspineyoung@163.com

从而参与 AKT/mTOR 信号通路^[18,19]。

2 NF1 对脊柱的影响

2.1 对脊柱骨生成及骨吸收平衡的影响

神经纤维瘤蛋白在维持脊柱骨生成及骨吸收的平衡中起的作用是目前神经纤维瘤脊柱侧凸研究的热点, NF1GRD 在细胞中负向调节 RasGTP 酶, 抑制 Ras 的活性, 进而调节细胞周期, 抑制肿瘤生成和维持正常的细胞功能, 神经纤维瘤蛋白因突变而错构失活, Ras 的活性增强, Ras 的主要下游通道 MAPK 通路和 mTOR 通路持续激活, 导致细胞增殖和分化异常, Ras/MAPK 通路和 AKT/mTOR 通路是细胞中控制细胞周期的两条主要通路^[1,16,20-22]。

在脊柱骨骼中, 骨组织的生成主要依赖于成骨细胞的正常功能。Kolanczyk 等^[23]通过研究 NF1 动物模型发现神经纤维瘤蛋白失活小鼠中成骨细胞数量有所增加, 但碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 表达显著减少, 成骨细胞活性下降, 矿物质沉着减少, 成骨细胞分化不成熟, 成骨功能障碍。近期研究发现通过降低 Ras/MAPK 通路的活性可以有助于成骨细胞的分化成熟, 但其中具体的作用机制尚未明确^[24]。

在脊柱骨骼中, 骨质的吸收主要由破骨细胞完成。研究发现在 NF1 患者中破骨细胞异常增生, 数量增加, 体积变大, 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 及血清钙含量上升, 同时还发现 NF1 患者尿液中吡啶盐含量上升, 而 Ras/MAPK 通路在维持破骨细胞的正常功能和细胞周期中发挥着重要的作用^[1,25-27]。近年来 Wada 等^[28]发现成骨细胞还通过旁分泌的方式经核因子 κ -B 受体活化因子配体 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)/骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 通路调节破骨细胞的生成。Kneissel 等^[29]的研究发现 mTOR 通路也参与了神经纤维瘤蛋白失活所致骨吸收异常, mTOR-S6 通路的激活增加了肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), RANKL 和巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 的表达, 从而促进破骨细胞的存活, 而 mTOR 通路的特异性抑制剂雷帕霉素则会影响破骨细胞的分化和存活。

2.2 对脊柱发育的影响

营养不良型脊柱侧凸是 NF1 患者最严重的骨骼病变之一, 部分学者认为营养不良型脊柱侧凸可能是椎体内或椎体邻近的神经纤维瘤侵蚀导致^[2,21]。然而一些动物模型的研究结果显示其原因与骨细胞自身缺陷有关。Behrens 等^[30]通过 NF1 动物模型研究发现, NF1 基因突变会影响小鼠脊柱骨祖细胞的正常分化, 脊柱发育缺陷, 导致脊柱侧凸。Wang 等^[31]发现 NF1 小鼠胚胎中脊柱的形成较正常小鼠要晚, 且 1 个月大的 NF1 小鼠脊柱尾部出现了 45° 异常成角、尾部椎体异常融合、椎体排列紊乱; 3 个月大的 NF1 小鼠出现显著的脊柱侧凸; 6 个月大的 NF1 小鼠存在椎体融合、严重的骨密度下降及椎体骨结构疏松和体积变小。

2.3 对椎间盘发育的影响

椎间盘的内部是高度含水的髓核, 在脊柱稳定应力起着重要作用。有学者在 NF1 动物模型中发现 NF1 脊柱侧凸小鼠的椎间盘存在明显异常, 在正常小鼠胚胎发育 13.5d~16.5d 脊索从发育中的椎体间退化消失, 髓核在椎间盘的中心形成, 而在 NF1 脊柱侧凸小鼠中, 虽然在胚胎发育的 14.5d 已经可以见到分段的发育中的椎体, 但此时脊索仍连续, 脊索细胞的凋亡显著减少, 髓核内细胞的增生较正常小鼠少, 最终椎间盘的结构也出现异常, 研究显示 NF1 小鼠脊索的退化滞后, 椎间盘结构存在异常^[32]。Rhodes 等^[32]在 NF1 小鼠营养不良型脊柱侧凸模型上发现 NF1 小鼠椎间盘存在骨性闭合, 36%~60% 的 NF1 小鼠出现了部分椎体间椎间盘骨性闭合, 椎间盘存在明显的发育异常, 同时还报道了 2 例 NF1 患者存在类似表现。

2.4 对肌肉发育的影响

脊柱的正常曲度和功能是由骨骼和肌肉共同作用维持。研究报道除了骨骼的营养不良以外, NF1 患者的肌力也出现下降^[33,34]。Kossler 等^[25]发现 NF1 基因敲除的小鼠出现明显侏儒现象, 肌肉块显著变小, 跟正常小鼠相比, 肱三头肌的重量甚至下降大于 50%, 肌力也显著减弱, 出现了肌肉重量减轻、肌肉无力及肌肉纤维化等改变。Kossler 等^[25]研究还发现, 神经纤维瘤蛋白的失活在胚胎期直接影响肌肉祖细胞的迁移、增殖及分化, 肌母细胞释放肌细胞生成素减少, 肌母细胞向成熟肌细胞分化障碍, 肌束变小, 肌肉变薄, 肌力下降, 同时, 肌间结缔组织及脂肪增生, 肌肉在胚胎发育早期就表现出肌营养不良及纤维化, 认为神经纤维瘤蛋白的失活, Ras/MAPK 通路的激活参与了 NF1 患者肌营养不良的发生, MEK 对肌细胞早期的分化有负向调节作用, 而持续激活的 Ras/MAPK 通道上调了 MEK 的表达, MEK 特异性结合肌祖细胞分化基因 MyoD, 抑制 MyoD 表达, 从而引起了肌细胞的分化成熟障碍。而 Lecker 等^[35]认为肌细胞内编码线粒体相关蛋白的基因的表达下调, 肌细胞内能耗不足是引起 NF1 患者肌营养不良的原因。

综上所述, 神经纤维瘤蛋白在骨骼肌肉的正常发育和生长中发挥着重要的作用。神经纤维瘤蛋白失活, 导致 Ras 及其下游的 Ras/MAPK 和 AKT/mTOR 等信号通路持续激活, 影响了骨祖细胞、破骨细胞, 成骨细胞及肌细胞正常增殖分化及成熟, 可能是引起 NF1 营养不良型脊柱侧凸发病的分子机制。

3 参考文献

1. Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 593-604.
2. Crawford AJ, Bagamery N. Osseous manifestations of neurofibromatosis in childhood[J]. *J Pediatr Orthop*, 1986, 6(1): 72-88.
3. Friedman JM, Birch PH. Type 1 neurofibromatosis: a descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients[J]. *Am J Med Genet*, 1997, 70(2): 138-143.
4. Winter RB, Moe JH, Bradford DS, et al. Spine deformity in neurofibromatosis: a review of one hundred and two patients

- [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1979, 61(5): 677-694.
5. Schindeler A, Little DG. Recent insights into bone development, homeostasis, and repair in type 1 neurofibromatosis (NF1)[J]. *Bone*, 2008, 42(4): 616-622.
6. Kuorilehto T, Nissinen M, Koivunen J, et al. NF1 tumor suppressor protein and mRNA in skeletal tissues of developing and adult normal mouse and NF1-deficient embryos [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(6): 983-989.
7. Theos A, Korf BR. Pathophysiology of neurofibromatosis type 1[J]. *Ann Intern Med*, 2006, 144(11): 842-849.
8. Messiaen LM, Callens T, Mortier G, et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects[J]. *Hum Mutat*, 2000, 15(6): 541-555.
9. Abramowicz A, Gos M. Neurofibromin in neurofibromatosis type 1- mutations in NF1 gene as a cause of disease[J]. *Dev Period Med*, 2014, 18(3): 297-306.
10. Ars E, Kruyer H, Morell M, et al. Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients[J]. *J Med Genet*, 2003, 40(6): e82.
11. Barron VA, Lou H. Alternative splicing of the neurofibromatosis type I pre-mRNA[J]. *Biosci Rep*, 2012, 32(2): 131-138.
12. Scheffzek K, Ahmadian MR, Wiesmuller L, et al. Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications[J]. *EMBO J*, 1998, 17(15): 4313-4327.
13. Karwacki MW, Wozniak W. Neurofibromatosis: an inborn genetic disorder with susceptibility to neoplasia[J]. *Med Wiek Rozwoj*, 2006, 10(3 Pt 2): 923-948.
14. Zhang J, Tong H, Fu X, et al. Molecular characterization of NF1 and neurofibromatosis type 1 cenotype-phenotype correlations in a Chinese population[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11291.
15. Daston MM, Scrabble H, Nordlund M, et al. The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes[J]. *Neuron*, 1992, 8(3): 415-428.
16. Trovo-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook[J]. *Clin Genet*, 2006, 70(1): 1-13.
17. Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, et al. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis[J]. *Nature*, 2012, 485(7396): 55-61.
18. Leseux L, Laurent G, Laurent C, et al. PKC zeta mTOR pathway: a new target for rituximab therapy in follicular lymphoma[J]. *Blood*, 2008, 111(1): 285-291.
19. Yamnik RL, Holz MK. mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(1): 124-128.
20. Ma J, Li M, Hock J, et al. Hyperactivation of mTOR critically regulates abnormal osteoclastogenesis in neurofibromatosis type 1[J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(1): 144-152.
21. Boyd KP, Korf BR, Theos A. Neurofibromatosis type 1[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2009, 61(1): 1-14.
22. Stevenson DA, Schwarz EL, Carey JC, et al. Bone resorption in syndromes of the Ras/MAPK pathway [J]. *Clin Genet*, 2011, 80(6): 566-573.
23. Kolanczyk M, Kossler N, Kuhnisch J, et al. Multiple roles for neurofibromin in skeletal development and growth [J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(8): 874-886.
24. Nakayama K, Tamura Y, Suzawa M, et al. Receptor tyrosine kinases inhibit bone morphogenetic protein-Smad responsive promoter activity and differentiation of murine MC3T3-E1 osteoblast-like cells[J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(5): 827-835.
25. Kossler N, Stricker S, Rodelsperger C, et al. Neurofibromin (NF1) is required for skeletal muscle development[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(14): 2697-2709.
26. Parikka V, Väänänen A, Risteli J, et al. Human mesenchymal stem cell derived osteoblasts degrade organic bone matrix in vitro by matrix metalloproteinases [J]. *Matrix Biol*, 2005, 24(6): 438-447.
27. Yu X, Chen S, Potter O, et al. Neurofibromin and its inactivation of Ras are prerequisites for osteoblast functioning[J]. *Bone*, 2005, 36(5): 793-802.
28. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease [J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(1): 17-25.
29. Kneissel M, Luong-Nguyen NH, Baptist M, et al. Everolimus suppresses cancellous bone loss, bone resorption, and cathepsin K expression by osteoclasts[J]. *Bone*, 2004, 35(5): 1144-1156.
30. Behrens A, Haigh J, Mehta-Grigoriou F, et al. Impaired intervertebral disc formation in the absence of Jun[J]. *Development*, 2003, 130(1): 103-109.
31. Wang W, Nyman JS, Ono K, et al. Mice lacking Nf1 in osteochondroprogenitor cells display skeletal dysplasia similar to patients with neurofibromatosis type 1[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(20): 3910-3924.
32. Rhodes SD, Zhang W, Yang D, et al. Dystrophic spinal deformities in a neurofibromatosis type 1 murine model [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119093.
33. Souza JF, Passos RL, Guedes AC, et al. Muscular force is reduced in neurofibromatosis type 1 [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2009, 9(1): 15-17.
34. Summers MA, Quinlan KG, Payne JM, et al. Skeletal muscle and motor deficits in neurofibromatosis type 1[J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2015, 15(2): 161-170.
35. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression[J]. *FASEB J*, 2004, 18(1): 39-51.

(收稿日期:2015-08-24 修回日期:2015-11-01)

(本文编辑 李伟霞)