



神经纤维瘤病 1 型基因的骨表达及自我平衡的研究进展

张剑波¹ 综述 梅海波² 审校

神经纤维瘤病 1 型 (Neurofibromatosis type 1, NF1) 是一种常见显性遗传性疾病,是由位于染色体 17q11.2 的 NF1 基因突变引起。NF1 基因编码神经纤维素,是一个具有 GTP 酶激活蛋白 (Ras - GAP) 结构域的、含有 2 818 个氨基酸的蛋白,它加快活性 Ras - GTP 转换为非活性 RAS - GDP^[1]。该基因编码的神经纤维瘤蛋白 (Ras GTPase 激活蛋白) 在细胞和组织中广泛表达,包括成熟的软骨细胞、肥大软骨细胞、成骨细胞、骨细胞、破骨细胞。Ras 信号途径与骨形成和维持骨骼的动态平衡密切相关。Ras 的活化生长因子影响骨骼的发育和重塑,丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 是 Ras 的一个主要下游效应器,在细胞外刺激有丝分裂反应,促进骨形成和破骨细胞的吸收^[2]。现就 NF1 基因的骨表达及自我平衡的研究进展综述如下。

一、NF1 基因的骨表达

早在 1994 年, Huynh DP 等^[3]通过对小鼠胚胎的 northern 印迹,发现小鼠 NF1 基因在胚胎期第 11 天开始表达,小鼠胚胎中神经纤维瘤蛋白显现出复杂的组织分布,其分布包括发育中的中枢神经系统、心脏、肺、肝、胃和背根神经节。2002 年, Malminen 等^[4]发现在人类胚胎发育第 8 ~ 14 周, NF1 基因在表皮细胞角蛋白和神经脊衍生组织中表达。

2004 年, Kuorilehto T 等^[5]对小鼠 NF1 基因在骨表达的研究中,首先报道在生长板的肥大软骨细胞中表达,后扩展到在成熟和有增生潜能的软骨细胞中表达。在小鼠胚胎形成过程中,并未发现 NF1 基因在成骨细胞中表达,检测成年小鼠骨膜的成骨细胞和骨皮质,发现有神经纤维瘤蛋白表达,同时骨髓间充质干细胞在体外培养中也发现了该蛋白的表达。2006 年, Kuorilehto T 等^[6]将小鼠胫骨骨折模型作为对照组,小鼠胫骨假关节模型作为实验组,通过

对两组模型骨折术后的随访研究,采用原位杂交和免疫组化技术检测 NF1 肿瘤抑制基因和磷酸化 P44/42 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的表达,结果发现:两组模型的骨折愈合组织中成熟软骨细胞和肥厚性软骨细胞可见 NF1 基因的表达。此外,在两组模型的血管内皮细胞中也发现 NF1 mRNA 蛋白阳性标记。该研究认为,正常的骨折和假关节的愈合都需要 NF1 基因的表达。

有学者对 3 例 NF1 合并先天性胫骨假关节 (CPT) 的患者和 3 例非 NF1 的 CPT 患者作对照研究,用原位杂交技术和 C - 末端抗体分别检测了两组病例中 NF1 mRNA 的表达^[7]。发现 NF1 mRNA 在两组病例假关节组织中的成纤维细胞、软骨细胞、破骨细胞、骨膜成骨细胞中表达。免疫组化特异性抗体标记磷酸化 p44/42MAPK,发现假关节组织中的成纤维细胞和软骨细胞 p44/42MAPK 阳性标记很高,破骨细胞并没有表现出 p44/42MAPK 标记。此外, NF1 患者髌骨细胞仅表现出微弱的 p44/42MAPK 信号。用 Western 印迹分析两组病例中的胫骨和髌骨骨髓间充质干细胞,发现两组 CPT 患者 NF1 蛋白少量表达,而在两组患者的髌骨间充质干细胞则表现出明显的 NF1 蛋白表达。该项研究认为 NF1 蛋白在不同的解剖位置可导致不同的结果,且还指出 NF1 蛋白减弱 RAS - GAP 的功能,影响磷酸化 p44/42MAPK 水平。

Wnt 信号的典型途径参与调节成骨细胞生理机能,包括细胞增殖、分化、骨基质的形成/矿化和凋亡。2011 年, DongYeon L 等^[8]用酶分离法从 11 例 NF1 合并 CPT 患者的纤维错构瘤中获得成纤维样细胞作为实验组,3 例没有 CPT 或没有 NF1 患者的胫骨远端骨膜获得成骨细胞作为对照,使用逆转录聚合酶链反应测定 Wnt 配体 (wnt1 和 wnt3a) mRNA 和其典型的受体如 Lrp5 和 β -连环蛋白的表达。结果发现对照组比实验组的 Wnt1 和 Wnt3a 在 mRNA 表达较高,但其典型的受体没有表现出显著差异。该研究认为,Wnt 配体的缺乏可能会干扰纤维错构

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2015.01.019

基金项目:湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目

作者单位:1, 南华大学儿科学院 (湖南省衡阳市, 421001); 2, 湖南省儿童医院 (湖南省长沙市, 410007), 通讯作者:梅海波, E-mail: meihaiibo@sina.com

瘤的成骨分化。

2012 年, Sang Min Lee 等^[9]通过使用聚合酶链(PCR)反应标记 4 个基因(D17S1863, GXALU, IN38, 3NF1-1), 对 16 例(男性 5 例, 女性 11 例)CPT 合并 NF1 患者纤维性错构瘤组织及其本体血白细胞或口腔黏膜细胞的 DNA 进行分析, 为了解决 LOH 的局限性, 该研究还对 11 例女性患者做了克隆性分析, 其中 8 例有意义(3 例克隆性生长, 5 例非克隆性生长)。结合两项研究分析, 2 例患者显示纤维错构瘤的特征, 呈 LOH 和克隆性生长; 2 例显示出遗传标记的 LOH 但没有克隆性生长; 6 例显示 4 个遗传标记, 但没有 LOH 证据和克隆数据; 5 例没有证据显示 LOH 或克隆; 1 例显示纤维性错构瘤的克隆增长特征, 但 4 个遗传标记检测都没有表现出 LOH。该研究结果支持 LOH 或 NF1 基因双失活和随后的克隆生长可能是纤维性错构瘤组织的一个病理特点, 至少在部分 CPT 中如此, 但并不是 CPT 发展的必要条件。

二、NF1 基因的自我平衡

骨的自我调控存在两个竞争性方面: 新骨的形成(合成代谢)和骨的吸收(分解代谢)^[10]。这两个过程分别由成熟的成骨细胞和破骨细胞驱动, 这两种细胞的平衡一旦被破坏, 就会引起骨形成异常。成骨细胞来源于间充质干细胞, 它的作用是形成新的骨基质。破骨细胞来源于造血干细胞, 其直接前驱细胞是巨噬细胞。在特定的环境下, 骨髓中的造血干细胞首先分化成巨噬细胞克隆形成单位再分化成巨噬细胞, 巨噬细胞从骨髓中游离出来, 进一步分化成单核破骨细胞。这些单核破骨细胞进而融合成多核破骨细胞, 附着在骨表面, 发挥骨吸收作用。

一些研究为检测神经纤维瘤蛋白对成骨细胞和破骨细胞分化及功能的影响, 培养了 NF1 基因杂合型小鼠的成骨前体细胞和成骨细胞^[11], 以及 NF1 单倍不足的人胚胎期骨细胞^[12]。这些细胞在成骨的环境中培养, 发现骨标志物表达减少和(或)骨基质矿化减弱。这些发现与 Ras-MAPK 通路活性减小成骨分化增强的研究结果相一致, 但 Ras-MAPK 信号通路在成骨生物代谢中的具体作用仍然存在争议^[13-15]。

有学者通过 von Kossa 染色来估算体外骨髓细胞诱导的钙沉积增加和骨形成, 碱性磷酸酶活性、I 型胶原合成的增加和 III 型胶原的表达下调来评估成骨细胞的分化^[7]。发现 NF1 合并 CPT 患者的胫骨骨髓细胞的成骨潜能最弱, 同一 NF1 患者髌骨骨髓

细胞的成骨潜能表现出比胫骨骨髓细胞的成骨潜能更高, 非 NF1 患者骨髓细胞的成骨潜能比上述两组 NF1 患者的骨髓细胞高。2010 年, Granchi D 等^[16]以 13 例 CPT(7 例合并 NF1, 6 例无 NF1), 4 例先天性髌关节发育不良患者为对照, 研究其本体的髌骨和病变部位附近所采集的骨髓间充质干细胞(MSC), 以 AlamarBlue 检测细胞的活性和增殖, 发现在 CPT 患者髌骨 MSC 的成骨能力比从病变附近所收集的 MSC 要高, 但是都比对照组低。该项研究还认为, NF1 基因缺失并没有影响 13 例 CPT 患者病变部位 MSC 的成骨能力。

2012 年, Granchi D 等^[17]用自体间充质干细胞和血小板源性生长因子治疗 10 例 CPT 患者, 其中 6 例 NF1 合并 CPT 者为研究组, 4 例无 NF1 患者为对照组, 用 AlamarBlue 测试来评估细胞培养的存活率和增殖情况, 发现两组髌骨骨髓间充质干细胞(ic-msc)的存活和增殖以及碱性磷酸酶阳性的骨髓菌落形成单位和矿化结节无明显差异, 且都得到了较好的结果。神经纤维瘤蛋白的缺失诱导血小板衍生生长因子、血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的表达, 这些因子有利于骨修复。

2012 年, El-Hoss J 等^[18]研究 NF1 基因缺陷的小鼠模型, 从实验组小鼠的颅骨提取的 NF1 基因缺失的早期和晚期的骨祖细胞, 用重组腺病毒(Ad-Cre)与重组人骨形成蛋白(rhBMP-2)来促进的成骨分化。发现 NF1 基因缺失影响早期骨祖细胞, 使其分化延迟并无法表达出成熟的成骨细胞标志物, 即使在 rhBMP-2 的处理下也无法逆转。相反, 晚期骨祖细胞却得到了进一步的分化和矿化, 并不受 Ad-Cre 和 rhBMP-2 的影响。该研究认为 NF1 基因的缺失仅影响早期骨祖细胞向成骨细胞分化, 并不影响晚期骨祖细胞。

破骨细胞的生成受细胞核因子 κ B 受体活化因子/骨保护素(RANKL/OPG)信号调节, 而这两个信号因子由成骨细胞产生, 以旁分泌的形式作用于破骨细胞前体。成骨细胞中 NF1 基因缺陷所致的 RANKL 分泌过多或 RANKL/OPG 比率的改变也可能促进 NF1 小鼠模型或人类疾病中的骨分解代谢^[19-20]。

2006 年, Yang 等^[21]用破骨细胞前体刺激因子——巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和其受体的激动剂- κ B 受体活化因子配体(RANKL)培养 NF1 基因杂合型小鼠的骨祖细胞。当在体外培养时, 其骨祖细胞在较低的 M-CSF/RANKL 浓度情况下, 能产

生出比野生型小鼠更多的耐酒石酸的酸性磷酸酶阳性的破骨细胞。该研究发现 NF1 基因杂合型小鼠体内的骨祖细胞和破骨细胞也增多,认为 NF1 单倍剂量不足对 NF1 骨病的发病存在影响。2011 年 Yongzheng He 等^[2]通过小鼠模型探讨细胞外调节蛋白激酶(ErRK1 和 ErK2)中断后破骨细胞功能的多种后果及特有的巨噬单核细胞谱系的骨再吸收。发现中断小鼠 ErK2 降低了破骨细胞的成核和骨吸收活性,但比中断 ErK1 小鼠要差。这项研究还发现野生型小鼠、中断 ErK1 小鼠和 ErK2 小鼠体内的成骨细胞数量无明显改变,认为 ErK1 正向调节破骨细胞的分化和介导巨噬细胞集落刺激因子(m-csf)迁移。

2011 年,Stevenson. DA 等^[22]研究 75 例年龄 1 ~ 25 岁 NF1 患者的外周血获得的破骨细胞,发现 75 例患者中有 70 例表现出 2 倍及以上的多核破骨细胞。这项研究还发现 NF1 患者的外周血破骨细胞的骨吸收活性增加,破骨细胞前体附着力增加,且肌动蛋白环形成。2012 年,Yongzheng He 等^[23]对 NF1 单倍体不足的 NF1 基因杂合型小鼠研究,在小鼠体外的骨髓核细胞中用流式细胞仪冲洗获得破骨细胞,发现破骨细胞分化加剧、迁移和在体外骨吸收的能力增强。该研究认为,NF1 单倍剂量不足可能影响 M-CSF/c-Fms 信号轴引起破骨细胞的功能异常。2012 年,Alanne MH 等^[24]对小鼠模型的研究同样发现了 NF1 小鼠骨吸收能力增加和细胞结构的变化,包括细胞形状不规则和 NF1 破骨细胞异常的肌动蛋白成环。

综上所述,NF1 基因编码产物—神经纤维瘤蛋白通过影响 Ras 通路的激活信号,发挥重要的调控作用,平衡骨的发育和形成。但是 NF1 基因缺陷中断或减弱了 Ras 通路的激活信号,使骨祖细胞的成骨潜能降低,而外周血破骨细胞增多及骨吸收能力增强,这可能是引起骨科疾病的重要原因。

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 He Y, Staser K, Rhodes SD, et al. Erk1 positively regulates osteoclast differentiation and bone resorptive activity[J]. PLoS One,2011,6(9):24780.
- 3 Huynh DP, Nechiporuk T, Pulst SM. Differential expression and tissue distribution of type I and type II neurofibromins during mouse fetal development[J]. Dev Biol,1994,161

- (2):538-551.
- 4 Malminen M, Peltonen S, Koivunen J, et al. Functional expression of NF1 tumor suppressor protein: association with keratin intermediate filaments during the early development of human epidermis[J]. BMC Dermatol,2002;2:10.
- 5 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.
- 6 Kuorilehto T,Ekholm E,Nissinen M,et al. NF1 gene expression in mouse fracture healing and in experimental rat pseudarthrosis[J]. J Histochem Cytochem,2006,54(3):363-370.
- 7 Leskela HV, Kuorilehto T, Risteli J, et al. Congenital pseudarthrosis of neurofibromatosis type 1: impaired osteoblast differentiation and function and altered NF1 gene expression[J]. Bone,2009,44(2):243-250.
- 8 Lee DY, Cho TJ, Lee HR et al. Disturbed osteoblastic differentiation of fibrous hamartoma cell from congenital pseudarthrosis of the tibia associated with neurofibromatosis type I[J]. Clin Orthop Surg,2011,3(3):230-237.
- 9 Lee SM, Choi IH, Lee DY, et al. Is double inactivation of the Nf1 gene responsible for the development of congenital pseudarthrosis of the tibia associated with NF1? [J]. J Orthop Res,2012,30(10):1535-1540.
- 10 Little DG, Ramachandran M, Schindeler A. The anabolic and catabolic responses in bone repair[J]. J Bone Joint Surg Br,2007,89(4):425-433.
- 11 Schindeler A, Ramachandran M, Godfrey C, et al. Modeling bone morphogenetic protein and bisphosphonate combination therapy in wild type and Nf1 haploinsufficient mice[J]. J Orthop Res,2008,26(1):65-74.
- 12 Klein BY, Rojansky N, Gal I, et al. Analysis of cell-mediated mineralization in culture of bone - derived embryonic cells with neurofibromatosis[J]. J Cell Biochem,1995,57:530-542.
- 13 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.
- 14 Kretzschmar M, Doody J, Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1[J]. Nature,1997,389(6651):618-622.
- 15 Schindeler A, Little DG. Ras-MAPK signaling in osteogenic differentiation: friend or foe? [J]. J Bone Miner Res,2006,21(9):1331-1338.
- 16 Granchi D, Devescovi V, Baglio SR, et al. Biological basis for the use of autologous bone marrow stromal cells in the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia[J]. Bone,2010,46(3):780-788.