

I型神经纤维瘤病患者神经纤维瘤发生机制的研究

赵霞, 周列民, 周珏倩, 梁秀龄, 操德智, 李伟峰, 陈子怡
(中山大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨 I 型神经纤维瘤病(NF1)患者神经纤维瘤发生、发展的分子病理机制。【方法】将 17 例 NF1 和 12 例非 NF1 患者的神经纤维瘤标本进行石蜡包埋切片,常规 HE 染色和 NF1 蛋白特异性多克隆抗体标记;Western blot 检测 3 例 NF1、2 例非 NF1 患者神经纤维瘤和 1 例正常神经的细胞中 NF1 蛋白和 hTERT 蛋白的表达。【结果】NF1 组与非 NF1 组 HE 染色无明显差异;NF1 特异性多克隆抗体标记显示 NF1 蛋白的表达率 NF1 组明显低于非 NF1 组,Western blot 结果显示正常神经组与非 NF1 组比较,NF1 蛋白表达没有明显差异,NF1 组 NF1 蛋白表达明显低于非 NF1 组和正常神经组;NF1 组和非 NF1 组 hTERT 蛋白表达明显高于正常神经组,NF1 组和非 NF1 组比较 hTERT 蛋白表达差异无显著性意义。【结论】实验结果提示 NF1 患者神经纤维瘤的形成除了与 NF1 蛋白表达缺失,肿瘤抑制作用减弱有关外还与 hTERT 蛋白表达增加,端粒酶活性增高有关;而非 NF1 患者神经纤维瘤的形成与 hTERT 蛋白表达增加,端粒酶活性增高有关,与 NF1 蛋白表达缺失无关。

关键词: I 型神经纤维瘤病;神经纤维瘤;NF1 蛋白;hTERT 蛋白

中图分类号:R739.43

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)06-0680-04

Pathogenesis of Neurofibromas in Patients with Neurofibromatosis Type 1

ZHAO Xia, ZHOU Lie-min, ZHOU Jue-qian, LIANG Xiu-ling, CAO De-zhi, LI Wei-feng, CHEN Zi-yi
(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】 To explore the molecular pathogenesis of neurofibromas in the patients with neurofibromatosis type 1 (NF1). 【Methods】 Neurofibromas from 17 NF1 patients and 12 non-NF1 patients were stained with regular HE and marked with NF1 poly-cloning specific antibody by immunohistochemical method. To determine the expression of NF1 and hTERT protein in normal nerve cells from one patient, neurofibroma cells from three patients with NF1, and two patients with non-NF1 by Western blot analysis. 【Results】 There was no statistical difference between NF1 group and non-NF1 group in HE staining. The immunohistochemical results showed that the NF1 protein expression level of NF1 group was lower than that of non-NF1 group, with statistical significance. In the Western blot results the NF1 protein expression level of NF1 group was remarkably lower than those of non-NF1 group and normal nerve group, meanwhile, the difference of the NF1 protein expression level of non-NF1 group and normal nerve group was not remarkably significant. The hTERT protein expression levels of NF1 group and non-NF1 group were higher than that of normal nerve group, with statistical significance. There was no statistical difference of hTERT protein expression level between NF1 and non-NF1 group. 【Conclusion】 The results of the study demonstrated that the formation of neurofibromas in patients with NF1 was affected not only by the decreased tumor restraining role resulting from the absence of NF1 protein expression, but also by the increased expression of hTERT protein and then the increased activity of telomerase. The formation of neurofibromas in the patients with non-NF1 was only associated with the increased activity of telomerase resulting from the increased expression of hTERT protein, and was not associated with the absent expression of NF1 protein.

Key words: neurofibromatosis type 1; neurofibromas; NF1 protein; hTERT protein

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci),2006,26(6):680-683]

收稿日期:2005-06-17

基金项目:“211 工程”基金资助项目(98138);教育部留学回国人员启动基金资助项目(118003);广东省医学科研基金资助项目(114011);

作者简介:赵霞(1978-),女,山东莱阳人,硕士,现在深圳市儿童医院神经科;周列民,导师,通讯作者;操德智,深圳市儿童医院神经科。E-mail:lm-zhou2002@yahoo.com.cn

I型神经纤维瘤病 (neurofibromatosis type 1, NF1)是由于NF1基因突变引起的常染色体显性遗传病,多发性神经纤维瘤累及NF1患者的全身,给患者造成了极大的危害,根据国内外对NF1的研究,目前认为NF1患者神经纤维瘤的发病机制主要与NF1基因突变导致施万细胞rasGTP(与三磷酸鸟苷连接的活化的ras蛋白)水平增高有关^[1],但其确切的机制仍不是很清楚。本研究进一步研究了NF1患者神经纤维瘤的发病机制。

1 材料与方 法

1.1 标本来源

细胞培养部分:病例组为3例NF1患者的4个手术切除的神经纤维瘤组织;对照组1为2例临床排除NF1患者的神经纤维瘤组织;对照组2为1例正常神经组织(标本来源于经中山大学附属第一医院神经科和神经外科2002-2004年确诊,从中山大学附属第一医院手术室获取的NF1、非NF1患者神经纤维瘤和正常神经组织的新鲜组织标本)。免疫组化部分:病例组为17例NF1患者的神经纤维瘤石蜡包埋标本;对照组为12例非NF1患者的神经纤维瘤石蜡包埋标本(标本来源于经中山大学附属第一医院神经科1995-2004年确诊,中山大学附属第一医院病理科保存的NF1和非NF1患者神经纤维瘤的石蜡包埋标本)。

1.2 实验方法

1.2.1 HE和ABC法检测NF1蛋白的表达 将手术室取来的神经纤维瘤组织剪切成小块放入40 g/L的多聚甲醛中固定6~12 h,脱水后进行石蜡包埋,每个石蜡块切5 μm厚的切片各两张,分别做常规HE染色和ABC法(通过二甲苯脱腊、酒精去除二甲苯、微波修复抗原、阻断内源性过氧化物酶、封闭抗原、抗体孵育、链霉卵白素孵育、DAB显色和苏木素中复染等步骤)进行NF1蛋白抗体标记。每例标本在高倍镜(×400)视野下计数10个视野,计算各标本中每个高倍镜视野下平均阳性细胞数目以及细胞总数目。

1.2.2 Western blot法检测NF1蛋白和hTERT蛋白的表达 将手术室取来的NF1、非NF1患者神经纤维瘤组织和正常神经组织洗净剪碎后,置于装有2 g/L I型胶原酶(I型胶原酶溶液体积约为瘤组织体积的10倍)的离心管中37℃消化,6~8 h

后组织块消化成细胞悬液,1000 r/min离心5 min,弃去上清液,加入含100 g/L胎牛血清的DMEM制成细胞悬液,接种于培养瓶置于37℃体积分数5%CO₂培养箱中培养,待细胞生长接近融合时终止培养。用细胞裂解液[Tris.Cl(50 mmol/L)、NaCl(150 mmol/L)、NaN₃(2 g/L)、SDS(1 g/L)、PMSF(100 μg/mL)、Aprotinin(1 μg/mL)、NP-40(10 g/L)、Deoxycholin acid(5 g/L)、Leupetin(1 μg/mL)]提取上述各处理组细胞总蛋白,Bradford法蛋白定量,调整所有样本的蛋白质浓度至0.6 g/L后,用Western blot(通过聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、抗体孵育、曝光等步骤)检测三组细胞中NF1蛋白和hTERT蛋白的表达。

1.3 统计学方法

通过SPSS10.0统计分析软件,采用两组独立样本t检验分析免疫组化法NF1蛋白的表达;单因素方差分析和LSD-t检验分析Western blot法检测的NF1蛋白和hTERT蛋白的表达,检验水准取α=0.05。

2 结 果

2.1 HE染色

NF1组和非NF1组的细胞组成、排列、细胞增生程度及形态结构都无明显差异,皆可见梭形细胞呈栅栏状或漩涡状排列(图1)。高倍镜(×400)视野下的两组神经纤维瘤组织中肿瘤细胞的数目,NF1组为49±12,非NF1组为42±11,t=1.689,P=0.682>0.05。因此在普通的HE染色下无法区分神经纤维瘤组织是否来源于NF1患者。

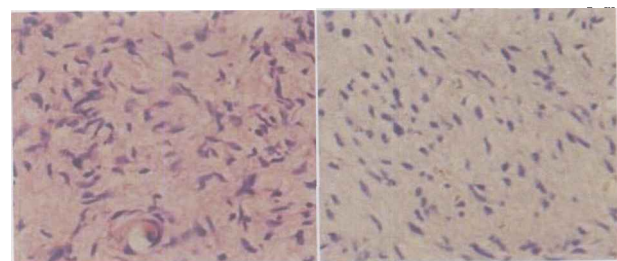


图1 两组神经纤维瘤组织的HE染色

Fig.1 HE staining of the two groups of neurofibromas

A: NF1 patient; B: non-NF1 patient, ×200

2.2 免疫组织化学染色法检测NF1蛋白的表达

NF1组神经纤维瘤组织,可见一部分细胞的胞浆呈棕黄色,为阳性着色,而另一部分细胞胞浆无

阳性着色,只可见淡蓝色的细胞核;非 NF1 组神经纤维瘤组织,所有细胞的胞浆都呈棕黄色的阳性着色,说明 NF1 患者神经纤维瘤组织呈低表达或不表达 NF1 蛋白,而非 NF1 患者神经纤维瘤组织所有细胞均表达 NF1 蛋白,前者 NF1 蛋白表达阳性的细胞占总细胞的比例的均值为 $40\% \pm 5\%$,后者为 $100\% \pm 0\%$, $t=11.16$, $P=0.000 < 0.01$ 。



图 2 NF1 蛋白特异性抗体标记的神经纤维瘤组织

Fig.2 The neurofibromas stained with NF1 protein specific antibody

A: NF1 patient; B: non-NF1 patient, $\times 200$

2.3 Western blot 法检测 NF1 蛋白的表达

NF1 患者神经纤维瘤细胞中 NF1 蛋白表达为 0.364 ± 0.059 ,明显低于正常神经(N, 1.000 ± 0.000)和非 NF1 患者神经纤维瘤细胞(non-NF1, 0.867 ± 0.117) (图 3),应用单因素方差分析检验各组 NF1 蛋白表达的差异,结果示 $F=19.619$, $P=0.000 < 0.01$,各组差异有统计学意义。进一步采用 LSD- t 检验分析比较各组之间的差异,NF1 组 NF1 蛋白的表达明显低于非 NF1 组($P=0.000 < 0.005$)和正常神经组($P=0.000 < 0.005$),正常神经组与非 NF1 组比较,NF1 蛋白表达则没有明显差别($P=0.235 > 0.05$)。



图 3 NF1、非 NF1 患者神经纤维瘤和正常神经的细胞中 NF1 蛋白表达水平的比较

Fig.3 Comparison of NF1 protein expression level between cells of NF1, non-NF1, and normal nerves.

M: Marker; NF1: NF1 group; non-NF1: non-NF1 group; N: normal nerve group

2.4 Western blot 法检测 hTERT 蛋白的表达

NF1 和非 NF1 患者神经纤维瘤细胞中 hTERT 蛋白表达分别为: 2.380 ± 0.103 和 2.766 ± 0.405 ,明显高于正常神经的细胞(1.000 ± 0.000 ,图 4),应用单

因素方差分析检验各组 hTERT 蛋白表达的差异,结果示 $F=14.797$, $P=0.000 < 0.01$,各组差异有显著性意义。进一步采用 LSD- t 检验分析比较各组之间的差异,结果示正常神经组 hTERT 蛋白的表达明显低于 NF1 组($P=0.001 < 0.01$)和非 NF1 组($P=0.000 < 0.01$),NF1 组和非 NF1 组比较 hTERT 蛋白表达差异无显著性意义($P=0.276 > 0.05$)。

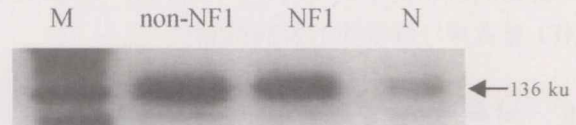


图 4 非 NF1、NF1 患者神经纤维瘤和正常神经的细胞中 hTERT 蛋白表达水平比较

Fig.4 Comparison of hTERT protein expression level between cells of non-NF1, NF1, and normal nerves.

M: Marker; NF1: NF1 group; non-NF1: non-NF1 group; N: normal nerve group

3 讨论

NF1 患者神经纤维瘤的发生机制目前主要认为是由于 NF1 基因突变导致其编码的 NF1 蛋白表达减少甚至缺如,从而使其下调原癌基因 Ras 活性的作用受到抑制,引起施万细胞 rasGTP 水平增高出现异常增殖。端粒酶与肿瘤的关系是目前研究的一个热点,其激活与细胞永生化和肿瘤发生、发展密切相关。近来的研究发现大多数肿瘤细胞中端粒酶的活性都是增高的^[2-4],端粒酶的激活使端粒保持一定的长度不被分解,从而使细胞获得永生是细胞最终发展成肿瘤细胞的一个先决条件^[5-7]。hTERT 是端粒酶的催化亚单位,其表达情况可以反映端粒酶的活性^[8,9]。目前尚未见神经纤维瘤中 hTERT 蛋白表达情况的报道。

本实验将 NF1 与非 NF1 患者的神经纤维瘤组织进行常规 HE 染色,并用免疫组织化学染色法检测其 NF1 蛋白表达水平,Western blot 法检测了 NF1、非 NF1 患者神经纤维瘤和正常神经的细胞 NF1 和 hTERT 蛋白表达水平,结果显示普通的 HE 染色, NF1 与非 NF1 患者神经纤维瘤组织在细胞组成、排列、增生程度,组织的形态结构上都无明显差异,因此很难将两者区分。NF1 特异性抗体免疫组织化学标记结果提示 NF1 患者神经纤维瘤组织中 NF1 蛋白的表达明显降低,其表达率仅为

39.65%,而非NF1患者神经纤维瘤中所有细胞都能表达NF1蛋白,其表达率为100%,两者差异有显著性意义。Western blot法检测NF1蛋白表达结果与免疫组织化学标记结果相符,NF1患者神经纤维瘤细胞中NF1蛋白的表达量是正常神经的细胞的36.35%,两者差异有显著性意义,而非NF1患者神经纤维瘤细胞中NF1蛋白的表达量是正常神经的细胞的86.73%,但两者无显著性差异,NF1和非NF1患者神经纤维瘤细胞中NF1蛋白的表达量也是有显著性差异的。这些都证实了NF1患者的神经纤维瘤的形成是由于NF1基因突变引起NF1蛋白的表达减少或缺失引起的,而非NF1患者的神经纤维瘤的形成与NF1基因是没有关系的。

Western blot法检测hTERT蛋白表达结果显示NF1和非NF1患者神经纤维瘤组织均有hTERT蛋白的表达,NF1患者神经纤维瘤细胞中hTERT蛋白的表达量是正常神经细胞的276倍,两者有显著性差异;非NF1患者神经纤维瘤细胞中hTERT蛋白的表达量是正常神经细胞的238倍,两者差异有显著性意义;NF1和非NF1患者神经纤维瘤细胞中hTERT蛋白的表达量是没有显著性差异的。端粒酶不仅在肿瘤细胞而且在人类的一些正常细胞如男性精子细胞,活化的淋巴细胞和干细胞等细胞中也保持着一定的活性,且在人类生长发育阶段其正常细胞端粒酶的活性是增加的^[2,10]。本实验检测到正常神经细胞(主要是施万细胞)是有hTERT蛋白表达的,说明在人的正常神经的细胞内端粒酶是有一定活性的,NF1和非NF1患者神经纤维瘤细胞中hTERT蛋白的表达量明显高于正常神经细胞,说明其端粒酶活性明显增高,提示了NF1和非NF1患者神经纤维瘤的形成都与hTERT表达增加和端粒酶的激活有关。NF1和非NF1患者神经纤维瘤细胞中hTERT蛋白的表达量无显著性差异,说明二者端粒酶的激活程度无明显差异。

综上所述,NF1患者神经纤维瘤的形成除了与NF1蛋白表达缺失,肿瘤抑制作用减弱有关外还与hTERT蛋白表达增加,端粒酶活性增高有关;而非NF1患者神经纤维瘤的形成与hTERT蛋白表达增

加,端粒酶活性增高有关,而与NF1蛋白表达缺失无关。

参考文献:

- [1] Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, *et al.* Gross deletion of the neurofibromatosis type 1 gene are predominantly with material origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay[J]. *Hum Genet*, 1998, 102(5): 591-7.
- [2] Shay J, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer[J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(5): 787-91.
- [3] 王安训,黄洪章. 端粒、端粒酶与口腔颌面部肿瘤[J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20增刊:97-9,103.
- [4] Palmquist R, Zhang A, Xu D, *et al.* hTERT gene copy number is not associated with hTERT RNA expression or telomerase activity in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(3):395-400.
- [5] Neumeister P, Albanese C, Balent B, *et al.* Senescence and epigenetic dysregulation in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34(11):1475-90.
- [6] 谭平国,丁之明. 脑膜瘤端粒酶的活性在判断复发和恶变中的价值[J]. *中山医科大学学报*, 2002, 23(2): 148-50.
- [7] Atkinson SP, Hoare SF, Glasspool RM, *et al.* Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17):7585-90.
- [8] Joseph C, Poole, Lucy G, *et al.* Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT)[J]. *Gene*, 2001, 269(1-2): 1-12.
- [9] Fujiwara AH, Maesawa C, Honda T, *et al.* Expression of human telomerase reverse transcriptase splice variants is well correlated with low telomerase activity in osteosarcoma cell lines[J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(4):1009-16.
- [10] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266 (5193): 2011 - 5.

(编辑 刘清海)