

Merlin 信号通路在 II 型神经纤维瘤病中作用的研究进展

王国栋 王 菊 黄敏光 徐茂义 丁悦敏

摘 要 NF2 基因突变导致其编码蛋白 Merlin 的缺失,是引起 II 型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 2, NF2)的主要原因。Merlin 因其抑制神经纤维瘤的发生,被认为是一种肿瘤抑制蛋白。除了在神经系统引发胶质细胞起源的肿瘤,大部分 NF2 患者还存在外周神经损伤。目前,多种以 Merlin 及其信号通路为靶标的单克隆抗体或抑制剂已经作为 NF2 的治疗药物被深入研究。本文对肿瘤抑制蛋白 Merlin 缺失在神经系统肿瘤发生中的作用及其机制、Merlin 信号通路在 NF2 治疗中的潜在价值等最新研究进展做一综述。

关键词 NF2 基因 Merlin II 型神经纤维瘤病 周围神经病变

中图分类号 R363.1 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.05.008

II 型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 2, NF2)是一种常染色体显性遗传病,与 NF2 基因突变有关。现阶段该疾病以手术治疗为主,但术后复发率高,目前尚无其他有效治疗方法。自 NF2 基因被克隆以来,其分子结构与特征、生物学功能及其作用机制受到了国内外相关领域专家的广泛关注^[1,2]。人类的 NF2 基因定位于 22 号染色体长臂 1 区 2 带 2 亚带(22q12.2),含 17 个外显子,其中 16 和 17 外显子为可变剪接外显子^[1]。由 NF2 基因编码的蛋白质名为 Merlin 或 Schwannomin, Merlin 相对分子质量约为 66000,可定位于细胞膜、细胞质和细胞核等处,通过不同的机制发挥其相应的作用。Merlin 能抑制神经纤维瘤的发生,随着对 Merlin 功能及其信号通路研究的深入,以 Merlin 信号通路上关键信号分子为治疗靶

点的研究开始出现,或将为 NF2 的治疗开创新时代。

一、Merlin 亚型

NF2 基因转录时,由于可变剪接而产生两种 Merlin 亚型:Merlin1 由外显子 1~15 和外显子 17 拼接而成,含有 595 个氨基酸残基;Merlin2 由外显子 1~15 和外显子 16 拼接而成,含有 590 个氨基酸残基^[3]。

Merlin1 蛋白由 3 个功能区构成:氨基末端 FERM 结构域由位于 N-末端的第 1~311 个氨基酸组成,为第 1 功能区;随后是 α -螺旋结构域,由第 312~505 个氨基酸组成,为第 2 功能区;最后是羧基末端亲水结构域,由 C-末端的第 506~595 个氨基酸组成,为第 3 功能区(图 1)。Merlin1 的 FERM 结构域进一步细分为 3 个球状的子域^[4]。

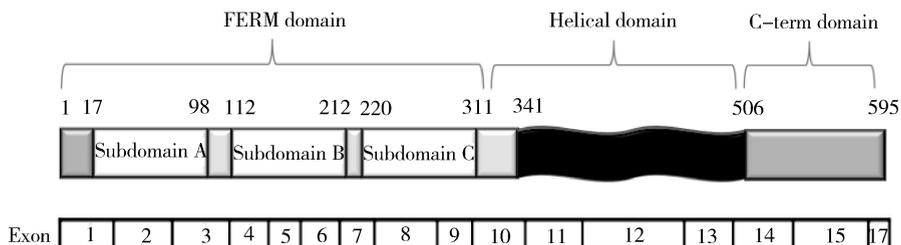


图 1 Merlin 蛋白结构示意图

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY14H090002)

作者单位:311800 诸暨市人民医院放疗科(王国栋、黄敏光、徐茂义);310015 杭州,浙江大学城市学院医学院临床医学系(王菊、丁悦敏)

通讯作者:丁悦敏,副教授,电子信箱:dingyuemin@zucc.edu.cn

Merlin2 含有携带终止密码子的外显子 16, 产生 C - 末端截断的蛋白。Merlin2 的 C - 末端带正电荷, 亲水性强, 而 Merlin1 的 C - 末端不带净电荷, 亲水性弱, 但 Merlin1 的 C - 末端能紧密连接到 N - 末端 FERM 结构域, 而 Merlin2 的 C - 末端与 N - 末端 FERM 结构域的结合能力就很弱。此外, 两个不同亚型的 C - 末端可以相互作用, 形成异二聚体^[5]。由于其 C - 末端的结构和电荷差异, 两种主要的 Merlin 亚型可能具有不同的结合伴侣。

二、Merlin 与神经系统相关疾病

1. II 型神经纤维瘤病: NF2 基因突变是导致显性遗传疾病 II 型神经纤维瘤病 NF2 的原因, 这种多瘤综合征发生率为 1: 25000^[6]。一般认为, NF2 是由 Schwann 细胞起源的良性肿瘤发展而来, 临床上常表现为双侧第 8 对颅神经受损的神经鞘瘤(前庭神经鞘瘤)。这类肿瘤常常发生在靠近 Obersteiner - Redlich 区, 即中枢神经系统(central nervous system, CNS)与周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)的交界处, 此部位也是 Schwann 细胞和少突细胞髓鞘形成的过渡区^[7]。神经鞘瘤对前庭神经的压迫作用可能导致听力和平衡感的丧失, 也常累及其他颅神经, 导致发声、吞咽、视力等功能障碍^[8]。此外, NF2 基因突变也与所有散发的非遗传性神经鞘瘤和 50% 的散发性脑膜瘤有关^[9]。由 NF2 基因突变引起的 NF2 个体中 35% ~ 53% 发展为室管膜瘤, 其中 62% ~ 86% 的肿瘤位于颈部或胸部脊髓^[10, 11]。

2. 多发性神经病: 除了影响 CNS 外, 不少 NF2 患者在其一生中将会出现周围神经病变。受影响的个体可能出现袜套样分布的痛觉减退和感觉迟钝以及失去振动感觉等症状。有的患者还可能还存在远端反射消失, 疾病晚期出现缓慢而进行性的远端肌肉萎缩并发生轻瘫^[12]。周围神经病变可以为局部表现(单发性), 也可以多部位同时发生(多发性)。

三、发病机制

神经纤维瘤的发病机制: 关于 NF2 相关肿瘤的起源, 有一种假说认为源自 Schwann 细胞, 由于 Schwann 细胞与轴突紧密和直接的接触产生广泛的细胞间交互对话, 使得轴突和/或轴突衍生的信号分别产生了致瘤活性。研究表明, 神经元表达 Merlin 也可能参与到轴突和 Schwann 细胞之间严格控制的交互对话中。Merlin 的 N - 末端可以与 Caspr/paranodin 相结合, paranodin 是有髓轴突的特殊分子域, 富含 paranodal 连接, 可促进 Schwann 细胞和轴突之间的黏

附, 因而对轴突和胶质细胞间信号的相互作用很重要^[13]。另外, β II Spectrin 是另一种支持轴索细胞骨架的分子, 对于有髓轴突组织是必需的。研究表明, Merlin 能够与 β II Spectrin 相互作用^[14]。这些结果提示神经元表达的 Merlin 可以直接参与轴突与 Schwann 细胞之间接触的形成, Merlin 蛋白缺失导致 Schwann 细胞与轴突的接触不足是神经纤维瘤发生、发展过程中的重要事件。

四、Merlin 的信号通路及其治疗价值

1. Hippo 通路: Hippo 通路控制细胞增殖和促进细胞凋亡, 该通路在多个水平的破坏导致组织过度生长和肿瘤发生^[15]。Hippo 通路由 Ste20 样激酶 Mst1 和 Mst2 来驱动, 随后激活 NDR 家族激酶 Lats1 和 Lats2, 活化的 Lats 磷酸化和灭活的转录效应因子 TAZ/YAP。在缺乏 Hippo 信号转导的情况下, 活化的 TAZ/YAP 易位到细胞核以刺激 stemness 的转录和促进增殖, 逃避凋亡基因转录^[16]。Merlin 可被 Angiotensin 募集到细胞紧密连接处, 作为 Hippo 通路信号分子的支架^[17]。

最近几项研究揭示了 Merlin 调控 Hippo 信号的独立机制。研究发现, 在果蝇和哺乳动物中, Merlin 能够直接结合 Wts/Lats, 招募这些蛋白质到细胞膜, 并被活化的 Mst1/2 磷酸化, 从而揭示了 Merlin 与 Hippo 途径间的重要关联^[18]。Merlin 还可通过 Rac/PAK1 通路激活 YAP^[19]。此外, Merlin 缺失对 LRP6 磷酸化的抑制减弱, 导致 Hippo 通路中 Wnt/ β - catenin 信号持续激活, 这也可能是肿瘤发生的机制之一^[20, 21]。最近 Cooper 等^[22] 研究发现, 联合应用 NEDD8 活化酶和 mTOR 的抑制剂可通过 CRL4DCAF1 泛素连接酶降低 YAP 活性, 有望成为一种新型的治疗 NF2 的药物。

2. p75NTR/JNK/NF - κ B 信号通路: 在正常神经系统中, Schwann 细胞与轴突接触并保持在静息状态。当神经损伤轴突变性后, Schwann 细胞失去与轴突的接触, 导致神经营养素受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR)表达快速增加, 介导细胞死亡。研究表明, Merlin 在体内外均能抑制 Schwann 细胞中的 p75NTR 水平^[23]。当轴突被切断后, Merlin 蛋白磷酸化失活, 允许与轴突失去接触的 Schwann 细胞重新进入细胞周期, p75NTR 表达增加。p75NTR 可通过 JNK 通路激活 NF - κ B, 在前庭神经鞘瘤(vestibular schwannomas, VS)细胞中产生促生存效应^[24]。最近的研究发现异常 NF - κ B 激活是 VS 细胞增殖的根本

原因,且 NF- κ B 抑制剂在体外可减少 VS 细胞增殖,进一步证实该途径在 VS 肿瘤发生中的重要作用^[25]。这部分解释了神经鞘瘤细胞为何在没有轴突接触的情况下具有长期生长和存活的能力^[26]。因此,Merlin/p75NTR 信号通路可以作为针对神经鞘瘤的特异性治疗靶点。

3. Neuregulin1/ErbB2/3 通路:轴突和 Schwann 细胞之间研究得最清楚的信号通路为神经调节蛋白 1 (Neuregulin1, Nrg1)/表皮生长因子受体 ErbB2/3 通路。Alexander Schulz 等^[27]分析了神经元表达的 Merlin 对该通路的影响。在轴突膜上表达的 Nrg1 III 型是 Schwann 细胞的一种近分泌生长因子的受体,研究发现,在敲除 Merlin 后该受体表达降低。此外,从 NF2 患者获取的人腓肠神经活检显示 Nrg1 III 型的表达锐减,并伴随 ErbB2 的表达代偿性上调。神经元特异性 Merlin 敲除的小鼠和 NF2 患者样本所得的结果一样。此外, Schwann 细胞中的 Merlin 与 CD44 相互作用, CD44 是一种能诱导 ErbB2 磷酸化的膜糖蛋白^[28]。由于过表达 Merlin 蛋白可抑制 CD44 与透明质酸结合及肿瘤生长,而 CD44 结合结构域缺失的突变型 Merlin 蛋白则不能抑制肿瘤生长,因此 Merlin 蛋白至少部分通过负性调控 CD44 发挥其肿瘤抑制作用^[29]。可见, Merlin 在神经元和 Schwann 细胞中都具有调节 ErbB2/3 受体表达的功能,因此, ErbB2/3 受体已被认为是治疗 NF2 的潜在靶标,可使用单克隆抗体 Trastuzumab 或酪氨酸激酶抑制剂拉帕替尼来治疗。

4. CRL4DCAF1 E3 泛素连接酶:去磷酸化的 Merlin 可转移到细胞核,结合并抑制 CRL4DCAF1 E3 泛素连接酶。研究发现 Merlin 的去磷酸化形式优先转移到细胞核,而磷酸化形式则无法入核,这与 Merlin 以其去磷酸化形式抑制肿瘤发生的观察一致。虽然 Merlin 缺乏经典的核定位序列,但它在羧基末端含有促进 CRM1 核输出蛋白通路的核输出基序。另外, Merlin 的 FERM 区对于核定位至关重要。研究发现 CRL4DCAF1 通过泛素化和抑制 Lats1/2 在细胞核中促进 Hippo 通路的 YAP 功能和 TEAD 依赖性转录,而 Merlin 可抑制 CRL4DCAF1 的功能,从而发挥肿瘤抑制功能。尽管如此, Merlin 抑制 CRL4DCAF1 的具体机制仍需进一步研究。

5. Rho-GTPase 信号通路:研究发现, Merlin 通过作用于 small GTPase-RhoA 信号,促进神经元损伤后的再生。该研究通过建立小鼠坐骨神经挤压损

伤模型,条件性敲除 Merlin 可引起小鼠功能恢复不良,这与它调节外周神经 RhoA 的活性有关。RhoA 是 small GTPase 的下游信号组分,能调节局部细胞骨架重排,是神经系统发育和再生过程中的关键调节信号。Merlin 通过作用于 RhoA 影响神经再生的能力,符合 NF2 患者接受前庭神经纤维瘤手术后面神经麻痹恢复缓慢的发生率更高的临床观察。此外,在神经细胞间成熟的紧密连接处, Merlin 与支架蛋白 Angiomin 相互作用,调节接触抑制和潜在的肿瘤抑制。Merlin 与 Angiomin 结合并取代富含 Rac 的 GTPase 活化蛋白,从而抑制 Rac/PAK 信号转导。该种抑制作用加强了细胞间的接触抑制,并且阻碍促有丝分裂信号,从而抑制肿瘤的发生。

五、展望

自 1993 年发现 II 型神经纤维瘤病是由 NF2 基因突变引起,对该基因编码产物 Merlin 蛋白的研究一直方兴未艾。虽然目前已经发现 Merlin 在神经系统以外组织也发挥重要作用,但其主要作用是抑制神经系统肿瘤的发生。手术治疗是目前最常用的方法,但预后较差,复发率很高,积极探索其他治疗方法是肿瘤科医生的迫切任务。近年来,对 Merlin 功能及其信号通路的研究使得治疗 NF2 的潜在靶标逐渐增多,已经出现针对 Hippo、p75NTR/JNK/NF- κ B、Neuregulin1-ErbB2/3 等信号通路关键分子的靶向治疗探索。随着对 Merlin 信号通路研究的不断深入,相信不久的将来会出现更多靶向药物,为 NF2 的临床治疗带来光明的前景。

参考文献

- 1 Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, *et al.* Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2 [J]. *Nature*, 1993, 363 (6429): 515-521
- 2 贺华, 张晨冉, 卞留贯, 等. NF2 基因及其编码蛋白质结构的研究进展 [J]. *中华神经医学杂志*, 2007, 6(5): 531-533
- 3 Gutmann DH, Wright DE, Geist RT, *et al.* Expression of the neurofibromatosis 2 (NF2) gene isoforms during rat embryonic development [J]. *Human Mol Genet*, 1995, 4(3): 471-478
- 4 Shimizu T, Seto A, Maita N, *et al.* Structural basis for neurofibromatosis type 2. Crystal structure of the merlin FERM domain [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(12): 10332-10336
- 5 Meng JJ, Lowrie DJ, Sun H, *et al.* Interaction between two isoforms of the NF2 tumor suppressor protein, merlin, and between merlin and ezrin, suggests modulation of ERM proteins by merlin [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 62(4): 491-502
- 6 Baser ME, Dg RE, Gutmann DH. Neurofibromatosis 2 [J]. *Curr Opin Neurol*, 2003, 16(1): 27-33
- 7 Roosli C, Linthicum Fh Jr, Cureoglu S, *et al.* What is the site of origin of cochleovestibular schwannomas? [J]. *Audiol Neurootol*,

2012,17(2):121-125

8 Best SR, Ahn J, Langmead S, *et al.* Voice and swallowing dysfunction in neurofibromatosis 2[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2018, 158(3):505-510

9 Lee JH, Sundaram V, Stein DJ, *et al.* Reduced expression of schwannomin/merlin in human sporadic meningiomas[J]. *Neurosurgery*, 1997,40(3):578-587

10 Mautner VF, Tatagiba M, Lindenau M, *et al.* Spinal tumors in patients with neurofibromatosis type 2: MR imaging study of frequency, multiplicity, and variety[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 1995,165(4):951-955

11 Plotkin SR, O'donnell CC, Curry WT, *et al.* Spinal ependymomas in neurofibromatosis Type 2: a retrospective analysis of 55 patients[J]. *J Neurosurg Spine*, 2011,14(4):543-547

12 England JD, Asbury AK. Peripheral neuropathy[J]. *Lancet*, 2004, 363(9427):2151-2161

13 Salzer JL, Brophy PJ, Peles E. Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system[J]. *Glia*, 2008, 56(14):1532-1540

14 Zhang C, Susuki K, Zollinger DR, *et al.* Membrane domain organization of myelinated axons requires betaII spectrin[J]. *J Cell Biol*, 2013,203(3):437-443

15 Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal[J]. *Nat Cell Biol*, 2011,13(8):877-883

16 Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment[J]. *Nat Rev Drug Disc*, 2014,13(1):63-79

17 Wang W, Huang J, Chen J. Angiotensin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1[J]. *J Biol Chem*, 2011,286(6):4364-4370

18 Yin F, Yu J, Zheng Y, *et al.* Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2[J]. *Cell*, 2013,154(6):1342-1355

19 Sabra H, Brunner M, Mandati V, *et al.* $\beta 1$ integrin dependent Rac/group I PAK signaling mediates YAP activation of Yes associated pro-

tein 1 (YAP1) via NF2/merlin[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(47):19179-19197

20 Kim S, Jho EH. Merlin, a regulator of Hippo signaling, regulates Wnt/beta-catenin signaling[J]. *BMB Rep*, 2016,49(7):357-358

21 Morrow KA, Das S, Meng E, *et al.* Loss of tumor suppressor Merlin results in aberrant activation of Wnt/beta-catenin signaling in cancer[J]. *Oncotarget*, 2016,7(14):17991-18005

22 Cooper J, Xu Q, Zhou L, *et al.* Combined inhibition of NEDD8-activating enzyme and mTOR suppresses NF2 loss-driven tumorigenesis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017,16(8):1693-1704

23 Ahmad I, Yue WY, Fernando A, *et al.* p75^{NTR} is highly expressed in vestibular schwannomas and promotes cell survival by activating nuclear transcription factor kappaB[J]. *Glia*, 2014,62(10):1699-1712

24 Gentry JJ, Casaccia-Bonnel P, Carter BD. Nerve growth factor activation of nuclear factor kappaB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(11):7558-7565

25 Dilwali S, Briet MC, Kao S, *et al.* Preclinical validation of anti-nuclear factor-kappa B therapy to inhibit human vestibular schwannoma growth[J]. *Mol Oncol*, 2015,9(7):1359-1370

26 Ahmad I, Fernando A, Gurgel R, *et al.* Merlin status regulates p75 (NTR) expression and apoptotic signaling in Schwann cells following nerve injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2015,82:114-122

27 Schulz A, Kyselyova A, Baader SL, *et al.* Neuronal merlin influences ERBB2 receptor expression on Schwann cells through neuregulin 1 type III signalling[J]. *Brain*, 2014,137(Pt 2):420-432

28 Morrison H, Sherman Ls, Legg J, *et al.* The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44[J]. *Genes Dev*, 2001,15(8):968-980

29 Hartmann M, Parra L, Ruschel A, *et al.* Tumor suppressor NF2 blocks cellular migration by inhibiting ectodomain cleavage of CD44[J]. *Mol Cancer Res*, 2015,13(5):879-890

(收稿日期:2018-08-20)

(修回日期:2018-09-02)

(上接第23页)

24 Cimen I, Tunçay S, Banerjee S. 15-Lipoxygenase-1 expression suppresses the invasive properties of colorectal carcinoma cell lines HCT-116 and HT-29[J]. *Cancer Sci*, 2010, 100(12):2283-2291

25 Tao C, Zhong R, Le-Chi Y, *et al.* Factor inhibiting HIF1 α (FIH-1) functions as a tumor suppressor in human colorectal cancer by repressing HIF1 α pathway[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(2):244-252

26 Kizakakondoh S, Kuchimaru T, Kadonosono T. Pathophysiological response to hypoxia-from the molecular mechanisms of malady to drug

discovery: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)-active cells as a target for cancer therapy[J]. *J Pharmacol Sci*, 2011, 115(4):440-445

27 Hartwich J, Orr WS, Ng CY, *et al.* HIF-1 α activation mediates resistance to anti-angiogenic therapy in neuroblastoma xenografts[J]. *J Pediat Surg*, 2013, 48(1):39-46

28 Li G, Wang Z, Xu J, *et al.* The prognostic value of lactate dehydrogenase levels in colorectal cancer: a meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1):249

(收稿日期:2018-08-28)

(修回日期:2018-09-17)