

I 型神经纤维瘤病血管病变发病机制研究进展

叶 梦 贾冰冰 梁晨思 霍丽蓉

摘 要 I 型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 1, NF1), 也称 Von Recklinghausen 病, 是一种常见的多系统遗传病, 累及包括皮肤、中枢及周围神经系统、骨骼、脉管系统及内分泌系统等多个系统。其发病基因为 Nf1, 属于抑癌基因, 定位于 17q11.2, 其编码的神经纤维瘤蛋白是 Ras 通路的重要抑制因子, 调控多种细胞的增殖与分化。尽管血管病变较皮肤神经纤维瘤等典型症状少见, 但会导致血管的狭窄、阻塞、动脉瘤等, 甚至引起血管破裂, 是导致 NF1 患者青少年人群过早病死的主要原因, 严重影响 NF1 患者的预后。NF1 相关血管病变发病机制十分复杂, 包括血管生长因子分泌的增加、炎性细胞的参与等, 近年来对其机制的深入研究也为其治疗带来新的突破。本文就 NF1 相关血管病变机制的研究进展进行综述。

关键词 I 型神经纤维瘤病 血管病变 机制

中图分类号 R74

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.12.036

神经纤维瘤病是一组常染色体显性遗传病, 包括 I 型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 1, NF1), 2 型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 2, NF2), 神经鞘瘤(schwannomatosis)。其中, NF2 发病较少, 发病基因 NF2 位于 22 号染色体。神经鞘瘤较为罕见, 发病基因可能为 INI1/SMARCB1 或 LZTR1, 两者均位于 22 号染色体^[1]。NF1 最为常见, 发病基因 Nf1 位于 17 号染色体。

一、Nf1 基因与 Nf1 基因突变

Nf1(neurofibromatosis 1)基因定位于 17q11.2, 含 60 个外显子, 包含 3 个可变剪接(9a、23a、48a), 是人类基因组中最大的基因之一, 其 DNA 全长超过 280kb, 翻译产物——神经纤维瘤蛋白(neurofibromin)相对分子质量达 350000。在功能上, Nf1 属于抑癌基因。由外显子 21~27a 编码的 Ras-GTP 酶激活蛋白相关结构域(Ras-GTPase activating protein-related domain, GRD)能够抑制 Ras-GDP 非活性形式转化为 Ras-GTP 活性形式, 并促进其相反过程^[2]。因此, 神经纤维瘤蛋白是 Ras 信号转导通路重要的负性调节因子。在 Nf1-GRD 区域上游, 由外显子 11~17 片段编码的富含半胱氨酸/丝氨酸结构域(cysteine-serine-rich domain, GSRD)编码蛋白质 ATP 结合位点以及 3 个潜在的 cAMP 依赖性蛋白激

酶结合位点, 可以调控 cAMP-PKA 通路。另外, 由外显子 13~14 区段编码的微管相关蛋白(microtubule-associated-protein, MAP), 可与微管结合并调控微管功能。

Nf1 基因结构复杂, 突变多发。据人类基因突变库(Human Gene Mutation Database, HGMD)显示, 截至 2015 年, Nf1 基因已有超过 1400 个突变, 包括剪接突变、无义和错义突变, 以及缺失、插入、易位和移码突变。其中无义突变占多数。Nf1 基因突变患者中 50% 的患者为自发突变, 包括散发病例及家族性患者。然而 Nf1 基因突变缺乏突变热点, 这使得临床表现与基因突变位点的关系研究困难重重。

二、I 型神经纤维瘤病及其相关血管病变

Nf1 基因突变会导致 I 型神经纤维瘤病(NF1), 发生率约为 1/3000~1/2500, 无性别、民族与种族差异^[3]。其临床表现多样, 以皮肤多发牛奶-咖啡色斑(café-au-lait macules)、皮肤神经纤维瘤、虹膜错构瘤(iris lisch nodules)等为典型特征。一些 Nf1 患者还会发生骨骼异常、脑肿瘤、周围神经肿瘤、学习障碍和注意力缺陷等。部分患者的表现局限于身体的一部分, 称为“节段型”或“镶嵌型”I 型神经纤维瘤病(mosaic neurofibromatosis 1), 这可能是由 Nf1 基因发生的突变为胎儿期的体细胞突变所致。

Nf1 突变还会导致血管病变, 尽管属于 NF1 罕见并发症, 但由于后果严重, 在近年来也逐渐受到关注。在不同的统计结果显示, NF1 相关血管病变在 NF1 患者中的发生率在 0.4%~8.0%^[4, 5]。其发病多于儿童期或成年早期开始, 主要累及脑、肾脏、肠系膜、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81341036);北京市自然科学基金资助项目(面上项目)(7182065);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划“学科骨干”项目(2013-3-096)

作者单位:100038 北京,首都医科大学附属复兴医院中心实验室

通讯作者:霍丽蓉, 电子信箱:huolir@ccmu.edu.cn

冠状动脉及外周小血管,且多数患者受累血管不止一处,可导致血管狭窄、闭塞、动脉瘤、动脉瘤破裂及血管痿^[6]。在这些血管病变中,肾动脉病变最为常见(41%),是导致 NF1 患者高血压的主要原因。

约 1/2 NF1 相关血管病变死亡患者是由脑血管病导致。脑血管异常多是由颈内动脉、大脑中动脉及大脑前动脉的狭窄或闭塞引起,狭窄血管周围形成的扩张的毛细血管,在脑血管造影中显示烟雾状,即为烟雾病(moya-moya syndrome, MMS),是儿童 NF1 患者最常见的脑血管病^[7]。虽然 NF1 为单基因遗传病,但有研究表明 NF1 相关 MMS 与同样位于 17 号染色体上的 RNF213 基因有密切关联^[8]。除了出现 MMS 外, NF1 患者还会出现颈内动脉、椎动脉、枕动脉的动脉瘤以及动静脉痿,但较为少见,且可以出现在老年患者中。脑部血管病变的临床症状多为因缺血导致的乏力、不自主运动、头痛及癫痫发作,儿童多见。成人也可出现类似症状,需与颅内出血鉴别诊断。

三、NF1 相关血管病变的发病机制

神经纤维瘤蛋白在血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)、内皮细胞(endothelial cells, ECs)和施万细胞(schwann cells)等中均有表达。Nf1 基因突变会导致神经纤维瘤蛋白表达发生改变,进而导致血管病变的发生。NF1 相关血管病变发病机制十分复杂,根据已发表论著,整理如下:

1. 神经纤维瘤蛋白对于心血管的正常发育有关键作用:Nf1 基因敲除小鼠因严重的心血管发育缺陷而发生胚胎致死,这曾被认为是由于神经嵴细胞 Nf1 基因的异常。但 Aaron 等发现,特异性敲除神经嵴细胞 Nf1 基因,并不会导致小鼠胚胎心脏心内膜垫和心肌发育异常,而特异性敲除 ECs 的 Nf1 基因却能够得到这样的结果,揭示了 ECs 表达的神经纤维瘤蛋白在心脏发育过程中有重要作用;另外,他们还在 Nf1^{-/-}小鼠心脏的心内膜垫上发现了大量磷酸化的 MAPK,这意味着 MAPK 重要激活通路——Ras-MAPK 通路的上调。神经纤维瘤蛋白在心外膜 EMT 过程中也起关键调控作用。心外膜在发育的过程中发生上皮-间质转化,这是冠状动脉平滑肌细胞和成纤维细胞的主要来源。Baek 等^[9]特异性地敲除心外膜 Nf1 基因后,发现会导致心脏更早地、自发地发生心外膜 EMT,从而促进成纤维细胞、冠状动脉平滑肌细胞的增殖,进而导致血管发育不良。

2. 神经纤维瘤蛋白的缺乏导致多种血管生长因子增加:肿瘤的进展多是由于各种血管生长因子的过

表达。研究表明 NF1 患者 VEGF 及 bFGF 水平明显升高。VEGF 家族是脉管系统的重要调节因子,能够诱导血管、淋巴管的生成,血管内膜重排并能趋化 VSMCs、ECs,这些都能促进新血管的形成。而 NF1 患者 VEGF 表达上调是由 Nf1 基因单倍体不足直接导致,而不是由 mTOR-HIF-1 α -VEGF 信号通路介导^[10]。bFGF 与 VEGF 相似,在介导损伤后新生血管的生成具有重要作用。Muir 等的研究也从 NF^{+/-}小鼠血管内皮细胞的培养过程中发现了过量 bFGF 的表达。

3. 血管细胞及骨髓源性细胞的异常增殖与迁移导致血管的狭窄与阻塞

(1) VSMCs 及 ECs 的异常增殖与迁移:NF1 相关血管病变的典型病理表现就是 VSMCs 及 ECs 的异常增殖与迁移。尽管不同血管病变的病理改变不完全相同,如动脉狭窄是平滑肌细胞增殖和向内重塑的结果,动脉瘤则是血管平滑肌细胞凋亡和向外重塑的结果。相关研究发现 NF1 杂合小鼠血管 ECs 对有丝分裂元的反应十分敏感,ECs 增殖及迁移明显增多,新血管生成增加。他们还在增殖的血管中发现了大量炎性细胞的浸润,包括巨噬细胞与肥大细胞,并认为这种变化发生在血管增生之后。Bajaj 等^[2]的研究则表明 Nf1 基因的缺失会直接导致受损 ECs 自动进入细胞周期。Li 的科研团队发现给予 Nf1^{+/-}小鼠格列卫(Gleevec, PDGF-BB-Ras-Erk 通路抑制剂)能够减少 VSMCs 的增殖与迁移及 Erk 的激活,提示神经纤维蛋白通过 PDGF-BB-Ras-Erk 信号轴维持着血管壁的稳定。Jousma 等^[11]研究表明,Erk 抑制剂不能阻止神经纤维瘤的生长,但是能够抑制肿瘤早期的生长,减少肿瘤血供。相关研究发现 VSMCs Nf1 基因特异性敲除小鼠的血管尚能够正常生长,在血管损伤时,平滑肌细胞才表现出内膜的异常,表现为内膜增厚及新血管生成。这是由于血管损伤后,Ras 及其下游效应物异常激活,而 GRD 结构域的表达能够挽救这种变化。另有研究表明,神经纤维瘤内的干细胞因子(stem cell factor, SCF,也称 KitL)过量表达,并发现其主要由施万细胞(schwann cells)产生;在 Nf1^{+/-}肥大细胞中,KitL 是促进其迁移的主要因子。在 Nf1^{-/-}造血干细胞中转染 GAP 相关结构域(GAP related domain, GRD)发现,造血干细胞的增殖显著减少。

(2) 单核-吞噬细胞参与的炎症、氧化应激机制:Li 等^[13]研究发现单独杂合 VSMCs 或 ECs 的 Nf1

基因均不会引起损伤后心血管的生成和血管壁的增厚,但骨髓源性细胞(bone marrow-derived cells, BMDCs) Nf1 基因缺失则会导致这样的后果,且在新生血管内 80% 以上的 BMDCs 为巨噬细胞,另外 VSMCs 能够促进巨噬细胞的浸润,进一步加重血管病变,这样的发现也符合临床无任何血管病变临床症状的 NF1 患者外周血炎性细胞(如巨噬细胞、肥大细胞)及炎性因子(如 IL-6、IL-1、Fractalkine)增多的现象,提示单核-吞噬细胞在 NF1 患者中血管病变中起到的核心作用^[12]。Li 等^[13]还发现髓系细胞 Nf1 基因杂合小鼠动脉瘤形成增加、髓系细胞(myeloid cells)增多以及氧化应激增强。

Bessler 等^[14]通过一系列实验阐述了炎症及氧化应激在 NF1 血管损伤中的作用机制。巨噬细胞能够直接产生活性氧(reactive oxygen species, ROS), Ras 活性增高也能提高细胞内 ROS 水平。使用 NADPH 氧化酶-2 抑制剂能够抑制 Nf1^{+/-}小鼠新内膜的形成及 VSMCs 的增殖与迁移。很多 NF1 患者尽管无血管病症状,但是外周血单核细胞增多,细胞核 DNA 氧化损伤增加,即慢性暴露于氧化应激状态,从而导致 SMCs 的增殖与迁移。Bessler 等^[15]进一步研究发现,仅敲除单核-吞噬细胞的 Nf1 基因即可构造 NF1 相关血管病变模型,且能够动员单核细胞趋化因子受体-2(CCR-2)进入外周血。CCR-2 是单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的主要受体, MCP-1 是募集和活化单核细胞最重要的趋化因子。MCP-1 越多, Nf1^{+/-}巨噬细胞增殖与迁移越多, Ras 激酶表达越多。巨噬细胞自身也分泌 VEGF, 另外, VSMCs 也表达 CCR2, 进一步促进血管的再生。给予 Nf1^{+/-}小鼠 CCR2 拮抗剂,能够有效减少新内膜的形成。这表明 MCR-1/CCR-2 信号轴对单核-吞噬细胞的募集作用在新内膜的形成及血管损伤中有重大作用,为 NF1 血管病的治疗提供了可行的靶点。Debra 等^[16]研究也证实了氧化应激在 NF1 患者新血管形成过程中的重要作用,并且抗氧化治疗能够挽救 Nf1^{+/-}小鼠血管表型。另外, Nf1 基因突变的施万细胞分泌 KIT 配体增多,促进巨噬细胞分泌转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)^[17]。TGF- β 对巨噬细胞也有极强的趋化作用,进一步证明炎性细胞在血管形成过程中的重要作用。

总之, Nf1 基因对于血管的发育及生长极其重要,作为 Ras 转导通路的重要负性调节因子,神经纤维瘤蛋白的减少直接或间接促进各种生长因子和炎

性因子的激活,从而导致血管壁的增厚和新血管的形成,造成血管的各种病变。

四、动物模型

随着研究的深入, NF1 相关血管病变动物模型不断建立,每一种新模型的建立都意味着对 NF1 相关血管病变形成机制更深入、更全面的理解。1990 年, Nf1 基因被成功克隆,随后成功构建 Nf1 基因的突变体。1994 年发现 Nf1^{-/-}小鼠由于心脏发育异常导致胚胎致死。2003 年, Aaron 等通过 cre/loxp 系统,特异性敲除血管内皮 Nf1 基因(Nf1^{ec}),也发现 Nf1^{ec}小鼠及 Nf1 基因敲除小鼠胚胎致死,并且发现两者心脏出现了相同的改变,由此构建了 NF1 血管病的小鼠模型,并证明内皮细胞在血管形成中有重要作用。有相关研究通过 Nf1^{+/-}小鼠的颈总动脉内皮剥离及血管拉伸,成功构造 Nf1^{+/-}小鼠血管损伤模型。Bessler 等^[15]还通过敲除单核-吞噬细胞 Nf1 基因,也成功构造了小鼠 NF1 相关血管病变模型。

除了小鼠模型, Padmanabhan 等^[18]在斑马鱼 15 号染色体(Nf1a)和 10 号染色体(Nf1b)中发现了与人类 Nf1 基因十分相似的基因片段。而斑马鱼的结构特点允许对其血管异常的进展情况从胚胎期开始进行观测,便于对 NF1 相关血管病变的结构-功能进行分析及遗传筛选。

另外,小型猪具有与人类十分相似的心血管系统,可以作为研究 NF1 相关血管病变发病机制及药物筛选的理想动物模型。然而国内外对此仍研究较少, Meyerholz 等^[19]通过对 NF1 可能的生物标记进行免疫组化,包括 β -tubulin III, PCNA 及 caspase-3 等 15 种生物标记,填补了 Nf1 转化猪研究的空白。

五、展望

随着研究的深入,人们对 I 型神经纤维瘤病血管病变的临床、病理特点及发病机制的了解在过去的 25 年发生了突破性的进展,也为其治疗带来了众多指导性建议,例如口服辛伐他汀或抗氧化夹竹桃麻素(antioxidant apocynin)能够减少 Nf1^{+/-}小鼠动脉瘤形成;给予 Nf1^{+/-}小鼠 NO 合酶(NOS)拮抗剂 NG-硝基-L-精氨酸甲酯或抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸能够改善小鼠 NF1 血管表型等。另外,也有很多关于 NF1 相关血管病变外科治疗成功的报道,例如通过使用血管内栓塞线圈和医用黏合剂(N-丁基-2-氰基丙烯酸酯)成功治疗腰动脉动脉瘤破裂, Bargiela 等也证实血管内治疗(包括栓塞线圈、血管内支架、球囊扩张器等)对于不同年龄段 NF1 相关血管病变

患者是安全而有效的。

尽管这些治疗手段多停留在实验阶段或只是少数的病例报道,但随着对 NF1 相关血管病变发病机制不断深入地了解,必将揭开 NF1 相关血管病变的神秘面纱,从而获得有效的治疗途径。

参考文献

- Piotrowski A, Xie J, Liu YF, *et al.* Germline loss - of - function mutations in LZTR1 predispose to an inherited disorder of multiple schwannomas[J]. *Nat Genet*,2014, 46(2): 182 - 187
- Bajaj A, Li QF, Zheng QX, *et al.* Loss of NF1 expression in human endothelial cells promotes autonomous proliferation and altered vascular morphogenesis[J]. *PLoS One*,2012, 7(11): e49222
- Johnson KJ, Hussain I, Katherine W, *et al.* Development of an international internet - based neurofibromatosis Type 1 patient registry[J]. *Contemp Clin Trials*, 2013, 34(2): 305 - 311
- Kaas B, Huisman TA, Tekes A, *et al.* Spectrum and prevalence of vasculopathy in pediatric neurofibromatosis type 1[J]. *J Child Neurol*,2013, 28(5): 561 - 569
- Ghosh PS, Rhotner AD, Emch TM, *et al.* Cerebral vasculopathy in children with neurofibromatosis type 1[J]. *J Child Neurol*,2013, 28(1): 95 - 101
- Jett K, Friedman JM. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1[J]. *Genet Med*,2010, 12(1): 1 - 11
- Santoro C, Rocco FD, Manoelle K, *et al.* Moyamoya syndrome in children with neurofibromatosis type 1: Italian - French experience[J]. *Am J Med Genet: Part A*, 2017, 173(6): 1521 - 1530
- Phi JH, Choi JW, Seong MW, *et al.* Association between moyamoya syndrome and the RNF213 c.14576G > A variant in patients with neurofibromatosis type 1[J]. *J Neurosurg Pediatr*, 2016, 17(6): 717 - 722
- Baek ST, Tallquist MD. Nfl limits epicardial derivative expansion by regulating epithelial to mesenchymal transition and proliferation[J]. *Development*,2012, 139(11): 2040 - 2049
- Kawachi Y, Maruyama H, Ishitsuka Y, *et al.* NF1 gene silencing in-

- duces upregulation of vascular endothelial growth factor expression in both Schwann and non - Schwann cells[J]. *Exp Dermatol*,2013, 22(4): 262 - 265
- Jousma E, Rizvi TA, Wu JQ, *et al.* Preclinical assessments of the MEK inhibitor PD - 0325901 in a mouse model of Neurofibromatosis type 1[J]. *Pediatr Blood Cancer*,2015, 62(10): 1709 - 1716
- Lasater EA, Li F, Bessler WK, *et al.* Genetic and cellular evidence of vascular inflammation in neurofibromin - deficient mice and humans [J]. *J Clin Invest*,2010, 120(3): 859 - 870
- Li F, Downing BD, Smiley LC, *et al.* Neurofibromin - deficient myeloid cells are critical mediators of aneurysm formation in vivo[J]. *Circulation*,2014, 129(11): 1213 - 1224
- Bessler WK, Hudson FZ, Zhang HF, *et al.* Neurofibromin is a novel regulator of Ras - induced reactive oxygen species production in mice and humans[J]. *Free Radical Biol Med*,2016, 97:212 - 222
- Bessler WK, Kim G, Hudson FZ, *et al.* Nfl^{+/-} monocytes/macrophages induce neointima formation via CCR2 activation[J]. *Human Mol Genet*,2016, 25(6): 1129 - 1139
- Mayes DA, Rizvi TA, Titus M, *et al.* Nfl loss and Ras hyperactivation in oligodendrocytes induce NOS - driven defects in myelin and vasculature[J]. *Cell Rep*,2013, 4(6): 1197 - 1212
- Gutmann DH, Ferner RE, Titus - Mitchell H, *et al.* Neurofibromatosis type 1[J]. *Nat Rev Dis primers*,2017, 3:17004
- Padmanabhana A, Lee JS, Fraz AI, *et al.* Cardiac and vascular functions of the zebrafish orthologues of the type I neurofibromatosis gene NFI[J]. *PNAS*, 2009, 106(52):22305 - 22310
- Meyerholz DK, Ofori - Amanfo GK, Leidinger MR, *et al.* Immunohistochemical markers for prospective studies in neurofibromatosis - 1 porcine models[J]. *J Histochem Cytochem*,2017, 65(10): 607 - 618
- Ishigaki J, Kawasaki R, Matsuda H, *et al.* Endovascular treatment for a ruptured lumbar artery aneurysm in a patient with von recklinghausen disease[J]. *EJVES Short Rep*,2018, 38:1 - 3

(收稿日期:2019 - 02 - 25)

(修回日期:2019 - 04 - 22)

三氧化二砷在髓母细胞瘤治疗中对 SHH 通路抑制机制的研究进展

方黄毅 张 哲 庞 晨 盛汉松

摘 要 髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)是小儿中枢神经系统常见的恶性肿瘤之一。SHH(sonic hedgehog signaling pathway)信号通路是小脑的发育形成过程中重要的信号通路,它可以调控神经细胞发育和增殖,维持小脑正常的功能结构。当 SHH

基金项目:浙江省科技厅基金资助项目(2016C33SA300055);温州市科技局科研基金资助项目(Y20180665)

作者单位:325035 温州医科大学(方黄毅、张哲、庞晨);325027 温州医科大学附属第二医院神经外科(盛汉松)

通讯作者:盛汉松,副主任医师,电子信箱:shs951052@163.com