

文章编号:1003-2754(2019)11-1013-04

神经丝蛋白轻链多肽在神经纤维瘤 病变组织中的表达及意义

牛学强, 刘 洋, 刘福云, 胡伟明

摘 要: **目的** 研究神经丝蛋白轻链多肽(NEFL)在 I 型神经纤维瘤病变(NF1)组织中的表达及意义。**方法** 回顾性分析 2017 年 1 月~2019 年 6 月本院收治的 I 型神经纤维瘤患者 34 例为研究对象,收集手术或病理活检切除的神经纤维瘤病变组织,另取因整容或其他皮肤疾病手术患者术中切除的正常皮肤组织 34 例为对照组,采用荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 NF1 及正常皮肤组织中 NEFL mRNA、结缔组织生长因子(CTGF) mRNA 及其下游效应分子转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) mRNA 表达水平,采用免疫印迹(WB)检测 NEFL、CTGF、TGF- $\beta 1$ 蛋白表达水平,采用 Pearson 相关性分析 NF1 组织中 NEFL 蛋白水平与 CTGF、TGF- $\beta 1$ 蛋白的相关性。**结果** 与正常皮肤组织比较,NF1 瘤变组织中 NEFL、CTGF、TGF- $\beta 1$ mRNA 及蛋白水平均显著增加($P < 0.05$)。Pearson 法分析结果显示,NF1 瘤变组织中 NEFL 蛋白水平与 CTGF、TGF- $\beta 1$ 蛋白水平均正相关($r = 0.471, 0.610, P < 0.05$)。**结论** NEFL 在 I 型神经纤维瘤组织中高表达,可能通过组织纤维化参与 NF1 发生发展。

关键词: 神经纤维瘤; 神经丝蛋白轻链多肽; 表达; 意义

中图分类号:R739.4

文献标识码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Expression and significance of neurofilament protein light-chain polypeptide in neurofibroma lesions** NIU

Xueqiang, LIU Yang, LIU Fuyun, et al. (Department of Pediatric Orthopaedics, The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: **Objective** To study the expression and significance of neurofilament protein light chain polypeptide (NEFL) in neurofibromatosis type I (NF1). **Methods** 34 patients with neurofibroma type I admitted to our hospital from January 2017 to June 2019 were retrospectively analyzed. Neurofibroma transformed tissues excised by surgical or pathological biopsy were collected, and 34 normal skin tissues excised during surgery for cosmetic or other skin diseases were taken as control group. The expression levels of NEFL mRNA, connective tissue growth factor (CTGF) mRNA and its downstream effector molecule transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) mRNA in NF1 and normal skin tissues were detected by fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR), the expression levels of NEFL, CTGF and TGF- $\beta 1$ proteins were detected by immunoblotting (WB), Pearson correlation was used to analyze the correlations between NEFL protein level and CTGF, TGF- $\beta 1$ proteins in NF1 tissue. **Results** Compared with normal skin tissue, the levels of NEFL, CTGF, TGF- $\beta 1$ mRNAs and proteins in NF1 tumorigenic tissue were significantly increased ($P < 0.05$). Pearson analysis showed that NEFL protein level in NF1 tumorigenic tissues were positively correlated with CTGF and TGF- $\beta 1$ protein levels ($r = 0.471, 0.610, P < 0.05$). **Conclusions** NEFL is highly expressed in neurofibroma type I and may be involved in the development of NF1 through tissue fibrosis.

Key words: Neurofibromatosis; Neurofilament protein light-chain polypeptide; Expression; Significance

神经纤维瘤(Neurofibromatosis, NF)是一种常染色体线性遗传病,肿瘤成分主要由雪旺氏细胞、周神经细胞和成纤维样细胞等组成,细胞外间隙由大量胶原纤维沉积,根据临床表现及基因型定位分为 NF1 和 NF2 两种亚型^[1]。I 型神经纤维瘤(neurofibromatosis type 1, NF1)是临床上一种神经皮肤综合征,目前临床多以手术治疗、放疗等手段进行治疗,但无法彻底治愈^[2]。因此寻找 NF1 发生发展中的标志性生物分子,研究 NF1 发生发展机制对患者

靶向治疗具有重要意义。神经丝轻链多肽(neurofilament light-chain polypeptide, NEFL)是细胞骨架的关键成分,可与细胞塑形相关蛋白发生联系发生作

收稿日期:2019-09-10;修订日期:2019-10-20

基金项目:2016 年河南省医学科技攻关计划(No. 201602134)

作者单位:(郑州大学第三附属医院,河南 郑州 450052)

通讯作者:牛学强, E-mail: lyiping113@163.com

用^[3]。研究报道,NEFL 特异表达于神经组织,其异常表达或甲基化变异与腓骨肌萎缩并、脱髓鞘疾病等多种运动神经元疾病及肿瘤有关,但表达机制尚不清楚,另 NEFL 与 NF1 的关系尚鲜有研究^[4~6]。因此本研究拟检测 NF1 瘤变组织中 NEFL 表达水平,以探究其临床意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2017 年 1 月 ~ 2019 年 6 月本院收治的 I 型神经纤维瘤(NF1)患者 34 例为研究对象,收集手术或病理活检切除的神经纤维瘤瘤变组织,患者年龄范围不限,男性 16 例,女性 18 例。另取因整容或其他皮肤疾病手术患者术中切除的正常皮肤组织 34 例,患者年龄与神经纤维瘤患者相匹配,男性 15 例,女性 19 例。两组患者年龄、性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。纳入标准:(1)符合 I 型神经纤维瘤的诊断标准,皮肤可见 6 个或以上牛奶咖啡斑,形状大小不一;(2)存在 2 个或两个以上神经纤维瘤或从状神经纤维瘤;(3)自愿参加本次调查研究。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤者;(2)临床资料不完整者。本研究经过本院道德伦理委员会批准通过,所有样品采集及资料调查均取得患者及其家属知情同意并签字确认,符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》。

1.2 主要试剂及仪器 Trizol 试剂(货号:R0016,上海碧云天);PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(编号:6210A)、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(编号:RR820A)购自 TaKaRa 生物公司;引物由上海吉玛生物科技有限公司合成;蛋白抽提试剂盒(批号:P0028)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号:P0010S),购自上海碧云天有限公司;一抗兔源 NEFL(货号:ab223343)、CTGF(货号:ab231824)、TGF- β 1(货号:ab92486)、 β -actin(货号:ab8227)抗体购自英国 Abcam 公司;二抗羊抗鼠 IgG,羊抗兔 IgG(货号分别为 B-2752, 15135, 美国 Invitrogen),紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)、RT-qPCR 仪 7500(美国 Bio-Rad 公司)、MODEL550 型酶标仪等。

1.3 方法

1.3.1 NEFL、CTGF、TGF- β 1 mRNA 水平检测

采用 Trizol 提取 NF1 瘤变及正常皮肤组织总 RNA,用紫外分光光度计检测总 RNA 浓度及纯度。反转录得到 cDNA,置于-20℃保存备用。采用(re-

al-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测 NEFL、CTGF、TGF- β 1 mRNA 表达水平。RT-qPCR 采用 20 μ l 反应体系:TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(2 $\times$) 10 μ l,ROX Reference Dye or Dye II(50 $\times$)0.4 μ l,cDNA(50 ng/ μ l)2 μ l,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ l,ddH₂O 6.0 μ l。反应采用两步法,条件设置为:95℃,30 s;95℃,5 s;60℃,34 s,40 个循环;添加溶解曲线。NEFL 上游引物序列(5'→3')为:GAA GAG GAG GCA GCT GGA AGA,下游引物序列(5'→3')为:AAG GAA ATG GGG GTT CAA TC;CTGF 上游引物序列(5'→3')为:AAC TAT GAT TAG AGC CAA CTG CCT G,下游引物序列(5'→3')为:TCA TGC CAT GTC TCC GTA CAT CTT C;TGF- β 1 上游引物序列(5'→3')为:CTT CAG CTC CAC AGA GAA GAA GAA CTG C,下游引物序列(5'→3')为:CAC GAT GAT GTT GGA CAA CTG CTC C;内参 β -actin 上游引物序列(5'→3')为:GTC GAT GGC TAG TCG TAG CAT CGA T,下游引物序列(5'→3')为:TGC TAG CTG GCA TGC CCG ATC GAT C。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对 NF1 瘤变及正常皮肤组织中 NEFL、CTGF、TGF- β 1 mRNA 的相对表达水平进行定量分析。

1.3.2 NEFL、CTGF、TGF- β 1 蛋白水平检测

采用蛋白抽提试剂盒提 NF1 瘤变及正常皮肤组织总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,置于-80℃保存备用。取 60 mg 蛋白样品,于 80 mV 电压下 6% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳 2 h,250 mA 下 PVDF 膜转膜 70 min。采用含 5% 脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液(PBS)室温封闭 2 h,加入适量含 2% 脱脂奶粉的 PBS 稀释,加一抗(NEFL、CTGF、TGF- β 1 抗体 1: 500;GAPDH 抗体 1: 500)4℃ 孵育过夜,TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 20 min,用适量含 2% 脱脂奶粉的 PBS 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG(1: 5000)室温孵育 1.5 h,按上述方法洗膜,用免疫印记化学发光试剂(ECL)显色,数字化多功能图像增强化学发光系统曝片,观察结果并进行分析。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 20.0 软件进行

统计分析。正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验;采用 Pearson 法分析 NF1 瘤变组织中 NEFL 蛋白表达水平与 CTGF、TGF- β 1 蛋白水平是

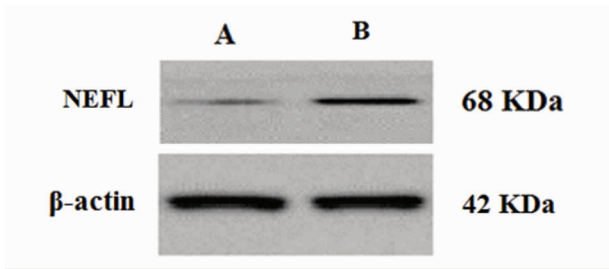
相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NEFL mRNA 及蛋白在 NF1 瘤变组织及正常组织表达情况比较 与正常皮肤组织比较,NF1 瘤变组织中 NEFL mRNA 及蛋白表达水平均显著增加,差异有统计学意义($P > 0.05$)(见图 1,表 1)。

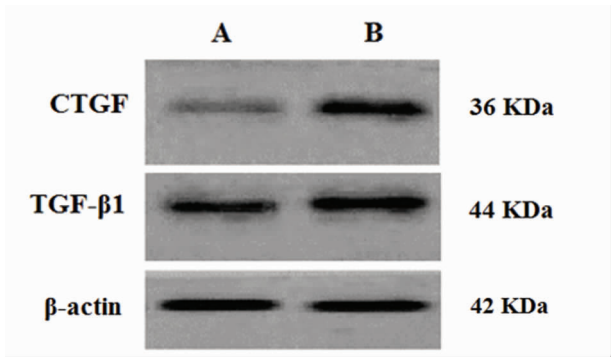
2.2 CTGF 和 TGF- β 1 mRNA 及蛋白在 NF1 瘤变组织及正常组织表达情况比较 与正常皮肤组织比较,NF1 瘤变组织中 CTGF 和 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达水平均显著增加,差异有统计学意义($P > 0.05$)(见图 2、表 2)。

2.3 NF1 患者瘤变组织中 NEFL 蛋白表达水平与 CTGF、TGF- β 1 蛋白水平的相关性 Pearson 相关性分析结果显示,NF1 患者瘤变组织中 NEFL 蛋白表达水平与 CTGF、TGF- β 1 蛋白水平均正相关($r = 0.471, 0.610, P < 0.05$)(见图 3)。



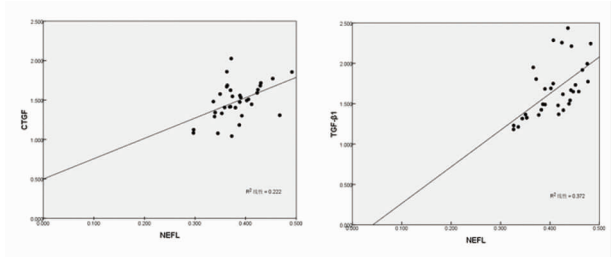
A:正常皮肤组织;B:NF1 瘤变组织

图 1 WB 检测 NF1 瘤变组织及正常组织中 NEFL 蛋白表达



A:正常皮肤组织;B:NF1 瘤变组织

图 2 WB 检测 NF1 瘤变组织及正常组织中 CTGF 和 TGF- β 1 蛋白表达



左图:NEFL 与 CTGF 蛋白表达水平的相关性;右图:NEFL 与 TGF- β 1 蛋白表达水平的相关性

图 3 NF1 患者瘤变组织中 NEFL 蛋白表达水平与 CTGF、TGF- β 1 蛋白水平的相关性

表 1 NEFL mRNA 及蛋白在 NF1 瘤变组织及正常组织表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NEFL mRNA	NEFL / β -actin
正常皮肤组织	34	1.10 $\pm$ 0.16	0.02 $\pm$ 0.01
瘤变组织	34	3.09 $\pm$ 0.54	0.39 $\pm$ 0.05
<i>t</i> 值	—	20.603	42.311
<i>P</i> 值	—	<0.001	<0.001

表 2 CTGF 和 TGF- β 1 mRNA 及蛋白在 NF1 瘤变组织及正常组织表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CTGF mRNA	CTGF / β -actin	TGF- β 1 mRNA	TGF- β 1 / β -actin
正常皮肤组织	34	0.99 $\pm$ 0.13	0.57 $\pm$ 0.11	1.04 $\pm$ 0.12	1.02 $\pm$ 0.18
瘤变组织	34	2.65 $\pm$ 0.29	1.49 $\pm$ 0.23	2.84 $\pm$ 0.31	1.73 $\pm$ 0.31
<i>t</i> 值	—	30.457	21.041	31.574	11.549
<i>P</i> 值	—	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨 论

神经纤维丝包括 NEFL、神经丝中链多肽及神经丝重链多肽 3 个亚型,其中 NEFL 是唯一可以自我组装的亚单位,大量表达于轴突白质中,在维持神经细胞形态及使有髓鞘的轴突再生方面发挥重要作用^[7]。NEFL 编码基因位于常染色体 8p21,这一区域富含抑癌基因,且此区域是与多种癌症发生机制

有关的基因失杂合性多发区^[8,9]。李全春等^[10]研究报道,NEFL 在轴索中高表达,神经元损伤后,NEFL 进入细胞外液,导致颅脑损伤患者血清 NEFL 水平显著高于正常对照组,且不良预后组血清 NEFL 水平高于预后良好组。研究报道^[11,12],NEFL 在脑胶质瘤多形性细胞瘤组织及细胞中均显著下调,是 miR-183、miR-25 的直接靶基因,可通过 mTOR 信号通路促进脑胶质瘤多形性细胞瘤细胞的增殖和侵

袭。Sainio 等^[13] 研究报道,早期发作的神经病年腓骨肌萎缩病患者的特异性神经元内缺乏 NEFL。本研究结果发现,与正常皮肤组织比较,NF1 瘤变组织中 NEFL mRNA 及蛋白水平均显著升高,推测 NEFL 正常情况下特异表达于神经组织,在皮肤组织中几乎无表达,瘤变组织 NEFL 异常增加可能与 NF1 发生有关。

神经纤维瘤发源于雪旺氏细胞 NF1 基因的突变、缺失或不表达,NF1 基因异常不仅导致细胞本身的癌化,还可使组织中神经纤维素浓度降低,导致神经细胞及其它细胞间微环境失衡,破坏雪旺氏细胞与肥大细胞的负反馈机制,引起肥大细胞向肿瘤组织迁移并分泌转化生长因子- β (Transforming growth factor-beta, TGF- β 1),促进纤维母细胞增殖,导致组织纤维沉积增加^[14,15]。神经纤维瘤的病理显示有大量梭形细胞和成纤维样细胞等沉积,结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)是主要致纤维化因子和 TGF- β 1 的直接下游效应分子,可促进成纤维细胞增殖、细胞外基质沉积,刺激胶原合成^[16,17]。余文林等^[18] 研究报道,NF 组织中 CTGF、TGF- β 1 mRNA 水平及蛋白阳性表达率均显著高于瘢痕疙瘩及正常皮肤组织,可促进神经纤维瘤发生发展。本研究结果发现,CTGF 和 TGF- β 1 mRNA 及蛋白在 NF1 瘤变组织中表达水平均高于正常皮肤组织,且与 NEFL 呈正相关,提示 NEFL 可能通过纤维化作用,与 NF1 发生发展有关。

综上所述,NEFL 在 I 型神经纤维瘤组织中高表达,可能通过组织纤维化参与 NF1 发生发展。由于此病发病率低,样本采集不易,本研究纳入患者较少,可能结果具有局限性,另关于 NEFL 参与 NF1 发生发展的具体作用机制及相关作用分子及通路尚不清楚,有待进一步深入探究。

[参考文献]

- [1] Rodriguez FJ, Graham MK, Brosnan-Cashman JA, et al. Telomere alterations in neurofibromatosis type 1-associated solid tumors[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7(1): 139.
- [2] Wang W, Qin W, Ge H, et al. Clinical and molecular characteristics of thirty NF1 variants in Chinese patients with neurofibromatosis type 1 [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(4): 4349-4359.
- [3] Kalatha T, Arnaoutoglou M, Koukoulidis T, et al. Does cognitive dysfunction correlate with neurofilament light polypeptide levels in the CSF of patients with multiple sclerosis[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(5): 2187-2198.
- [4] 喻才元, 何艳婷, 周 宇. 神经丝轻链多肽与疾病的关系研究进展[J]. *医学综述*, 2015, 21(11): 1959-1961.
- [5] Shen Z, Chen B, Gan X, et al. Methylation of neurofilament light polypeptide promoter is associated with cell invasion and metastasis in NSCLC [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(3): 627-634.
- [6] Adebola AA, Di Castri T, He CZ, et al. Neurofilament light polypeptide gene N98S mutation in mice leads to neurofilament network abnormalities and a Charcot-Marie-Tooth Type 2E phenotype [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(8): 2163-2174.
- [7] 李全春. 血清神经丝蛋白轻链多肽水平预测急性颅脑损伤患者临床预后的研究[J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14(2): 104-106.
- [8] Imbert A, Chaffanet M, Essieux L, et al. Integrated map of the chromosome 8p12-p21 region, a region involved in human cancers and Werner syndrome [J]. *Genomics*, 1996, 32(1): 29-38.
- [9] Horga A, Laura M, Jaunmuktane Z, et al. Genetic and clinical characteristics of NEFL-related Charcot-Marie-Tooth disease [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2017, 88(7): 575-585.
- [10] 李全春. 血清神经丝蛋白轻链多肽水平预测急性颅脑损伤患者临床预后的研究[J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14(2): 104-106.
- [11] Wang ZY, Xiong J, Zhang SS, et al. Up-regulation of microRNA-183 promotes cell proliferation and invasion in glioma by directly targeting NEFL [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(8): 1303-1310.
- [12] Peng G, Yuan X, Yuan J, et al. miR-25 promotes glioblastoma cell proliferation and invasion by directly targeting NEFL [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 409(1-2): 103-111.
- [13] Sainio MT, Ylikallio E, Maenpää L, et al. Absence of NEFL in patient-specific neurons in early-onset Charcot-Marie-Tooth neuropathy [J]. *Neurol Genet*, 2018, 4(3): 244.
- [14] Temelkova I, Tchernev G. Giant pelvic neurofibroma in patient with plexiform sciatic neurofibroma and neurofibromatosis type 1 [J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 7(8): 1346-1349.
- [15] Hong F, Wu N, Ge Y, et al. Nanosized titanium dioxide resulted in the activation of TGF-beta/Smads/p38MAPK pathway in renal inflammation and fibrosis of mice [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(6): 1452-1461.
- [16] Kinashi H, Toda N, Sun T, et al. Connective tissue growth factor is correlated with peritoneal lymphangiogenesis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12175.
- [17] Ma T, Dong L J, Du XL, et al. Research progress on the role of connective tissue growth factor in fibrosis of diabetic retinopathy [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(9): 1550-1554.
- [18] 余文林, 李 勤, 曾 东, 等. 神经纤维瘤组织中致纤维化生长因子和胶原的表达 [J]. *中国美容医学*, 2009, 18(9): 1286-1289.