

综述

NF2/Merlin的生物学功能及其在肿瘤发生中的作用

李梦瑶¹ 贾则晓¹ 雷昭莹¹ 丁雪¹ 杨树旭^{2*} 严庆丰^{1,3,4*}¹浙江大学生命科学学院, 杭州 310058; ²浙江大学医学院附属邵逸夫医院神经外科, 杭州 310016;³浙江大学医学院附属第一医院儿科, 杭州 310003; ⁴浙江省细胞与基因工程重点实验室, 杭州 310058)

摘要 神经纤维蛋白2基因(NF2)最初从II型神经纤维瘤病患者中被克隆并鉴定, 其编码抑癌蛋白Merlin(Moesin-Ezrin-Radixin-like protein), 介导细胞连接, 参与Hippo、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、Wnt/ β -catenin和受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)等信号通路的调控, 从而调控细胞生命活动。NF2基因突变或Merlin蛋白功能异常除引发神经鞘瘤、脑膜瘤和室管膜瘤等神经系统肿瘤外, 还与肝癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤相关。该文在简单介绍NF2基因及其编码蛋白Merlin的结构、变异和活性修饰等基础上, 详细综述NF2/Merlin的生物学功能及其在肿瘤发生中的作用机制等研究进展。

关键词 神经纤维蛋白2基因(NF2); Merlin; II型神经纤维瘤病; 肿瘤发生

Biological Function of NF2/Merlin and Its Role in Tumorigenesis

LI Mengyao¹, JIA Zexiao¹, LEI Zhaoying¹, DING Xue¹, YANG Shuxu^{2*}, YAN Qingfeng^{1,3,4*}¹College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;²Department of Neurosurgery, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China;³Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China;⁴Key Laboratory for Cell and Gene Engineering of Zhejiang Province, Hangzhou 310058, China)

Abstract NF2 (neurofibromin 2) was cloned and identified from patients with neurofibromatosis type 2. NF2 gene encodes tumor suppressor protein Merlin (Moesin-Ezrin-Radixin-like protein), which mediates cell junctions and participates in Hippo, PI3K/AKT/mTOR (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin), Wnt/ β -catenin and RTKs (receptor tyrosine kinases) signaling pathways. NF2 mutation or Merlin dysfunction may cause not only neurofibromatosis type 2 with schwannoma, meningioma and ependymoma, but also liver cancer, breast cancer and many other malignant tumors. This review summarizes the structure, variation and modification of NF2/Merlin, and introduces the research progress in the biological function of NF2/Merlin and its role and mechanism in tumorigenesis in detail.

Keywords neurofibromin 2 (NF2); Merlin; neurofibromatosis type 2; tumorigenesis

收稿日期: 2021-07-09

接受日期: 2021-09-18

国家自然科学基金(批准号: 32070584、31771398)和浙江省自然科学基金(批准号: LZ19C060001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88206646, E-mail: yang.sx@163.com; qfyan@zju.edu.cn

Received: July 9, 2021

Accepted: September 18, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32070584, 31771398) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.LZ19C060001)

*Corresponding authors. Tel: +86-571-88206646, E-mail: yang.sx@163.com; qfyan@zju.edu.cn

II型神经纤维瘤病 (neurofibromatosis type 2, NF2, OMIM ID: 101000)是一种常染色体显性遗传病, 发病率为1:25 000~1:40 000, 主要影响神经系统、眼和皮肤等。其早期诊断困难、临床表型多样、治疗复杂、预后效果差^[1]。早在1822年便有了关于某耳聋患者的颅骨、硬脑膜和大脑中存在肿瘤的记录^[2]; 1920年研究人员发现了一个三代患有前庭神经鞘瘤的家系, 表明该疾病具有遗传性^[3]; 1930年对一个五代共38名患者的家系分析发现, 该疾病的遗传模式呈常染色体显性遗传^[4]; 1987年遗传连锁分析区分了I型和II型神经纤维瘤病^[5]; 1993年, TROFATTER等^[6]及 ROULEAU等^[7]两个团队各自通过位置克隆和杂合性缺失研究从II型神经纤维瘤病患者中克隆鉴定出致病基因——神经纤维蛋白2基因(neurofibromin 2, *NF2*)。

*NF2*作为一种抑癌基因, 除了在施万细胞、脑膜和室管膜等神经系统的细胞/组织中高表达外^[8], 也可在免疫系统、内分泌系统以及乳房、前列腺、肝脏等器官中广泛表达。野生型Merlin参与细胞接触抑制、细胞增殖、细胞迁移和分化等过程, 调控Hippo、RTKs(receptor tyrosine kinases)、Wnt/ β -catenin等多种信号转导途径。*NF2*突变或Merlin功能异常可能导致细胞增殖异常, 甚至肿瘤发生, *NF2*杂合突变小鼠模型与II型神经纤维瘤密切相关, 有的小鼠还呈现淋巴瘤、骨肉瘤、皮肤癌等表型^[9]。本文在介绍*NF2*基因及其编码蛋白Merlin的结构和特征的基础上, 详细综述了Merlin参与调控细胞连接、信号转导等重要生物学功能及其异常于肿瘤发生相关的分子机制, 分析了本研究领域存在的困难并展望了应关注的方向。

1 基因*NF2*与蛋白Merlin

1.1 基因*NF2*

基因*NF2*是一种抑癌基因(MIM#607379), 位于22号染色体(NC-000022.11: 29603556–29698600)一区二带(22q12), 全长95 044 bp, 含有17个外显子。

基因*NF2*的前体mRNA存在复杂的可变剪接方式。至今共发现了9种剪接体, 分布在个体的不同组织、不同发育阶段(图1)。人体内主要的亚型(Isoform)是Isoform 1(经典型)和Isoform 2(通常也被称为Isoform 3)^[10], 这两种亚型是由交替剪接的转录本产生的^[11-12]。Isoform 1由外显子1~15和17拼接而成, Isoform 2由外显子1~16拼接而成^[11]。由图可知不同的Isoform主要区别在于外显子的组成和C末端结构域(图1, Isoform 10的C末端所编码的不同氨基酸已标示), 且表达具有时空特异性及组织特异性。据Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)显示, 不同Isoform的表达具有组织特异性, 成人组织中, Isoform 1和2普遍表达, Isoform 4、5、6中度表达, Isoform 8基本不表达, Isoform 7、9、10不表达; 胎儿大脑、心脏、肺、骨骼肌和脾脏中微弱表达Isoform 9; 胎儿胸腺中表达Isoform 1、7、9和10, 且各Isoform表达水平相似。

正常剪接可产生上述几种剪接体, 但是剪接位点突变则会产生更多其他类型的剪接体。此外*NF2*突变的种类还包括无义突变、错义突变、大小片段缺失或插入等。据人类基因突变数据库HGMD(The Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.org>), 至今已发现450多种*NF2*基因突变, 包含110种错义/无义突变(24.5%)、90种剪接位点突变(20.0%)、114种小片段缺失(25.3%)、49种小片段插入(10.9%)、

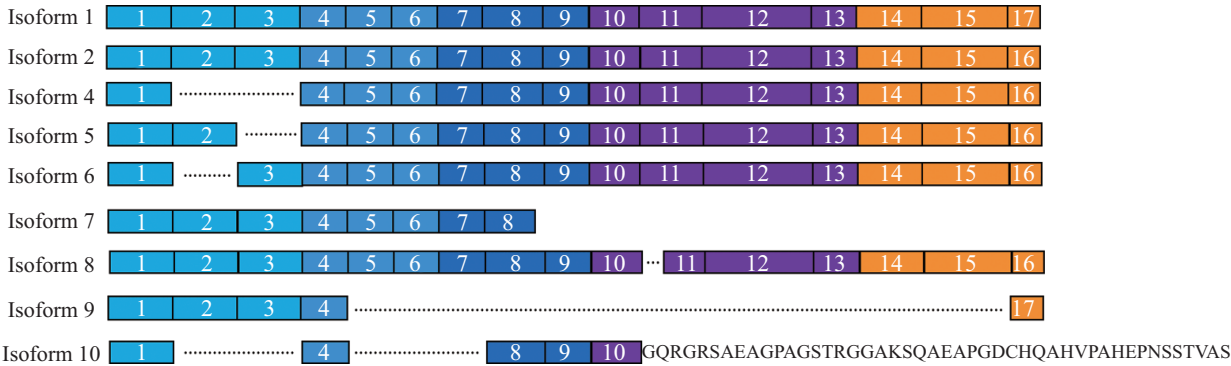


图1 不同Isoform的外显子构成(根据参考文献[11]并参考Uniprot修改)
Fig.1 Exon composition of different Isoforms (modified from reference [11] and Uniprot)



图2 蛋白Merlin-1的结构域组成(根据参考文献[15,20]修改)

Fig.2 Domain organization of Merlin-1 (modified from references [15,20])

73种大片段缺失(16.2%)、9种大片段插入(2.0%)、5种片段重组(1.1%)等。*NF2*的基因突变分布于基因的各个区段,统计分析发现其并无热点突变,但N-端相对更易发生突变并导致更严重的临床表型,C-端突变相关表型较轻^[13]。无义或错义突变常与严重疾病表型有关,多表现为早期发作且好发肿瘤^[14]。框内小片段缺失/插入通常与轻度表型有关,表现为晚期发作且不易发生肿瘤^[14]。剪接位点(AG/GT)突变通常是致病性改变,但这些区域之外的突变的影响并不清楚,且与患者临床表型的相关性不明确,具体的临床表型最终由实际剪接变异决定。

1.2 蛋白Merlin

基因*NF2*编码蛋白Merlin(Moesin-Ezrin-Radixin-like protein, 又称schwannomin),与埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白(Ezrin/Radixin/Moesin, ERM)蛋白家族高度同源。经典的Isoform 1编码的蛋白共有595个氨基酸,分子大小约70 kDa,等电点pI为6.11。Merlin由3个结构域组成: N-端的FERM结构域(4•1-ezrin-radixin-moesin domain)、中间的 α 螺旋结构域、C-端结构域(C-terminal domain, CTD)^[15]。FERM结构域进一步分为F1、F2、F3等3个亚结构域,由1~9号外显子编码,对应氨基酸1~311。 α 螺旋结构域由10~13号外显子编码,对应氨基酸313~506。C末端结构域由14、15、17号外显子编码,对应氨基酸507~595(图2)。

Merlin活性受多个氨基酸位点磷酸化修饰调节。Ser518位点的磷酸化状态是Merlin构象和功能的一个关键调节点,磷酸化的发生阻碍了Merlin蛋白N-端和C-端的首尾连接,使得它的构象转变为无活性的“开放”状态而非有活性的“闭合”状态,失去了对肿瘤的抑制作用^[16]。p21激活激酶(p21-activated kinases, PAKs)和蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)均能使Ser518位点发生磷酸化^[17]。相反,肌球蛋白磷酸酶靶标亚基1(myosin phosphatase target subunit 1, MYPT1)使P-Merlin(Ser518)去磷酸化^[18],重新恢复活性。另外, Ser518的磷酸化可以促进Thr581的磷酸化^[19], Ser518和Thr581两个位点的磷酸化是维持正常的细

胞周期所必需的。蛋白PKB/AKT和蛋白PKA均能使Ser10位点发生磷酸化,磷酸化的Merlin(Ser10)能通过修饰细胞骨架来调控细胞形态^[20]。

2 Merlin的生物学功能

蛋白Merlin可以定位在细胞膜附近与跨膜受体的胞质尾部结合,参与细胞骨架重组或者调控黏附连接形成;也可通过其N-端的肌动蛋白结合位点与细胞骨架相互作用。Merlin与不同的胞内蛋白分子相结合时参与到不同的信号通路如Hippo、PI3K/AKT/mTOR、RTKs等中,从而影响细胞的生命活动。

2.1 Merlin与细胞连接

Merlin通过与细胞膜上跨膜蛋白胞内结构域结合,介导与胞外基质组分[如纤连蛋白(laminin)、胶原和蛋白聚糖]的相互作用,以此影响下游信号通路或骨架蛋白重排,实现对细胞接触抑制的调控(图3)。Merlin与CD44的胞内段结合介导了细胞高密度下的接触抑制,小鼠神经鞘瘤细胞中的Merlin过表达抑制了胞外基质与CD44的结合,并抑制了小鼠的皮下肿瘤生长。同时,在多种肿瘤细胞类型中证实活化的CD44能激活下游Ras相关C3肉毒杆菌毒素底物(Ras-related C3 botulinum toxin substrate, Rac)信号分子并促进肌动蛋白细胞骨架重排,从而促进肿瘤细胞的迁移。在高密度的人静脉内皮细胞中,Merlin抑制了Rac向质膜的募集以及Rac下游的PAKs信号转导。反过来,PAKs的激活导致Merlin(Ser518)的磷酸化,从而抑制Merlin易位至质膜,抵消其抑癌活性。

在人类神经鞘瘤细胞中,细胞基质黏附性增加,依赖整联蛋白(integrin)的SRC和黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)信号的激活,当Merlin行使正常功能时,直接作用于FAK的上游从而阻断信号的转导(图3)。在*NF2*^{-/-}神经胶质细胞中, SRC通过调节FAK和细胞骨架蛋白活性来调节细胞生长,同时影响肿瘤细胞的黏附与转移。

Merlin可与跨膜的E/N-钙黏蛋白(E/N-cadherin)、

胞内的 β -catenin形成复合物, 共同组成细胞间黏附连接(adheren junctions, AJs)。Merlin与 β -catenin形成复合物时, 可将 β -catenin定位在质膜上使其无法入核, 阻止下游基因的转录^[21], 实现对细胞增殖的调节(图3)。

2.2 Merlin与信号转导

2.2.1 Merlin激活Hippo信号通路 Hippo信号通路最初是在果蝇中被发现并进行研究的, 是一条高度保守且至关重要的信号通路, 它通过调节细胞的增殖和凋亡来控制组织和器官的大小并抑制肿瘤

发生。Merlin是Hippo信号通路的上游调控因子(图4), 定位于质膜上的Merlin招募了大肿瘤抑制因子1/2(large tumor suppressor 1/2, LATS1/2), 在哺乳动物Ste20样激酶1/2(mammalian Ste20-like kinases 1/2, MST1/2)等作用下, LATS1/2发生磷酸化, 激活Hippo信号通路, 进而使Yes相关蛋白1/转录共激活剂与PDZ结合基序(Yes-associated protein 1/transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, YAP/TAZ)磷酸化保留在细胞质中, 不能入核^[22-23], 从而抑制细胞增殖。而Merlin功能异常便不能启动Hippo通路, 导

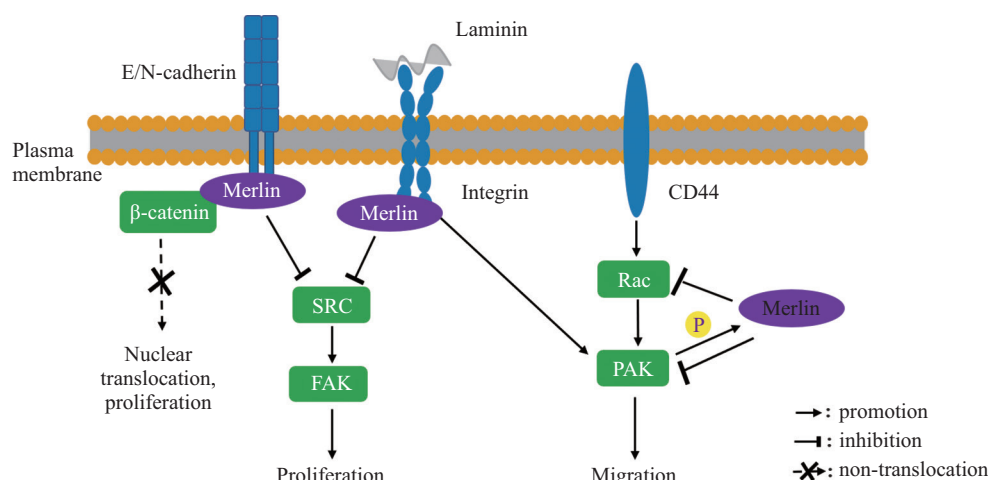


图3 Merlin与细胞连接(根据参考文献[20]修改)

Fig.3 Merlin mediates cell junction (modified from reference [20])

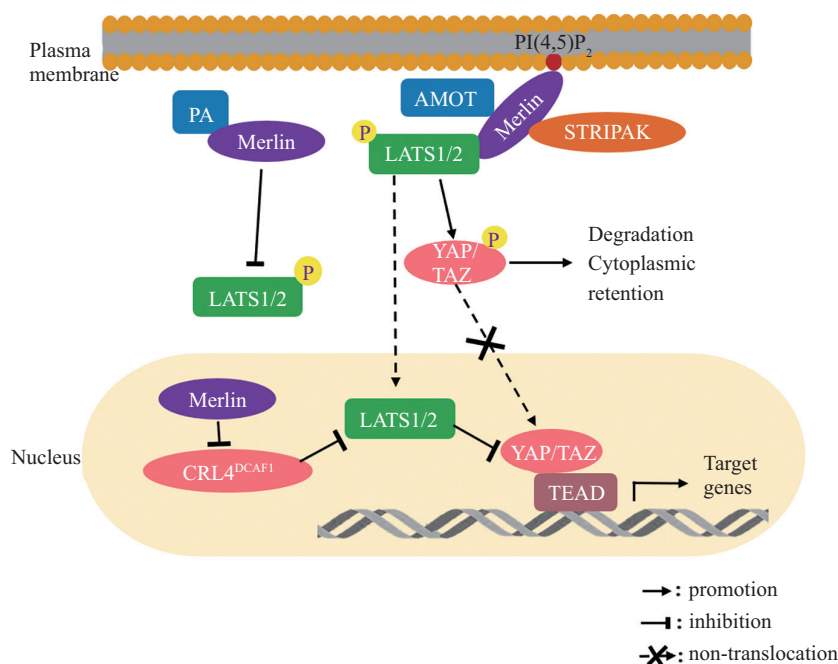


图4 Merlin激活Hippo信号通路(根据参考文献[8,20]修改)

Fig.4 Merlin activates Hippo signaling pathway (modified from references [8,20])

致未磷酸化的YAP/TAZ进入细胞核,并与转录增强子相关域(transcription enhancer associate domain, TEAD)等转录因子结合,从而激活*CYR61*、*CTGF*等细胞增殖及组织生长相关基因的表达,导致肿瘤发生。F2亚结构域是其与LATS1互作所必需的结构域^[24],整个FERM区域对于Merlin发挥功能是必需的,而C末端结构域对Hippo信号通路的影响较小^[25]。关于Hippo信号通路中Merlin的上游调控因子研究的较少。血管动蛋白(angiomotin, AMOT)通过结合Merlin的CTD区域,导致Merlin的FERM区域完全暴露,促进Merlin和LATS的结合,且有新报道指明,AMOT家族蛋白Motins能抑制YAP/TAZ活性,不过这种调节依赖Merlin的存在,因为当存在溶血磷脂酸(lysobisphosphatidic acid, LPA)刺激时,Merlin可招募E3连接酶RNF146以促进Motins的泛素化降解^[35]。磷脂酸(phosphatidic acid, PA)也可以直接结合Merlin,抑制Merlin-LATS1复合体的形成,减少LATS的磷酸化^[26]。在哺乳动物中,4,5-二磷酸磷脂酰肌醇[phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PI(4,5)P₂]直接结合Merlin并将其招募到细胞膜上,随后启动Hippo信号通路^[25]。纹状蛋白互作的磷酸酶和激酶[Striatin (STRN)-interacting phosphatase and kinase, STRIPAK]是一个大型的蛋白复合物,包含催化亚基PP2AC、支架亚基PP2AA和招募其他蛋白质的调节亚基STRN, STRIPAK负责整合上游信号来控制MST1/2和丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶-4(mitogen-activated protein kinase kinase kinase-4, MAP4Ks)的响应,从而启动Hippo信号通路^[27]。

Merlin还可以进入细胞核发挥抑癌功能(图4)。Merlin的外显子2起细胞质保留的作用[野生型Merlin的Isoform 4、6、10缺失外显子2(图1)],通过可变剪接调节Merlin的细胞核定位,同时外显子15能编码一段核输出序列[野生型Merlin的Isoform 7、9、10缺失外显子15(图1)],完善了Merlin细胞核-细胞质的穿梭过程^[28]。一方面,核内Merlin通过FERM结构域与E3泛素连接酶CRL4^{DCAF1}结合,抑制了CRL4^{DCAF1}泛素化靶蛋白的能力,从而保留了LATS的激酶活性,使YAP/TAZ磷酸化并使之失活^[29]。另一方面,与Merlin结合之后的CRL4^{DCAF1},失去了调节表观遗传修饰因子和转录因子的能力,进一步阻断致癌基因的表达^[15]。Merlin和CRL4^{DCAF1}之间的相互作用

取决于Merlin的激活,缺少肿瘤抑制活性的Merlin S518D突变体和L64P突变体均未结合CRL4^{DCAF1},而且突变体还会影响野生型Merlin与CRL4^{DCAF1}的正常结合。

2.2.2 Merlin抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路 PI3K/AKT/mTOR信号通路在细胞的生长、存活、增殖、凋亡、血管生成、自吞噬等过程中发挥着极其重要的生物学功能。在不合Merlin的情况下(图5),当胞外配体(ligands)与RTKs家族相结合时,刺激触发活化的复合物将引起下游PI3K产生3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇[phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate, PI(3,4,5)P₃],质膜下游AKT磷酸化并活化,激活PI3K/AKT/mTOR信号通路,使得mTORC1活化,进而通过翻译调控复合物eIF4E启动蛋白的翻译,促进细胞生长。当Merlin存在时,它能结合磷脂酰肌醇3-激酶增强剂-L(phosphatidylinositol 3-kinases enhancement-Pike-L),二者的相互作用能抑制PI3K的激活,即在上游便抑制了PI3K/AKT/mTOR信号通路,抑制细胞的生长。同时,Merlin还能直接充当mTORC1的抑制剂,Hippo信号通路中Merlin的下游信号分子LATS1/2可磷酸化Raptor的S606,削弱Raptor与Rheb的相互作用来减弱mTORC1的激活能力,于是Merlin失活会进一步释放mTORC1的活化信号,加速细胞生长^[30]。

2.2.3 Merlin抑制Wnt/β-catenin信号通路 Wnt/β-catenin信号通路是一种进化保守的信号通路,在胚胎发育和组织稳态中起着重要作用,而过度激活的Wnt/β-catenin信号通路会导致癌症的发生发展,如II型神经纤维瘤、结直肠癌、前列腺癌和乳腺癌等,这些肿瘤在一定程度上表现出Merlin的功能异常^[8]。Merlin可以直接结合脂蛋白受体相关蛋白(lipoprotein receptor-related protein, LRP)(图6),抑制LRP的磷酸化,Wnt/β-catenin信号通路被抑制,此时β-catenin与降解复合物[支架蛋白(Axin)、APC(adenomatous polyposis coli)、酪蛋白激酶1(casein kinase 1, CK1)和糖原合成激酶3(glycogen synthase kinase 3, GSK3)]结合,通过蛋白酶体被降解^[31]。当细胞缺失Merlin后,LRP磷酸化,此时Wnt结合Frizzled家族受体(frizzled class receptor, FZD)和LRP,激活胞内蛋白Dvl(Dishevelled),Dvl通过抑制GSK3等蛋白形成的β-catenin降解复合物的降解活性,稳定细胞质中游离状态的β-catenin,胞质中稳

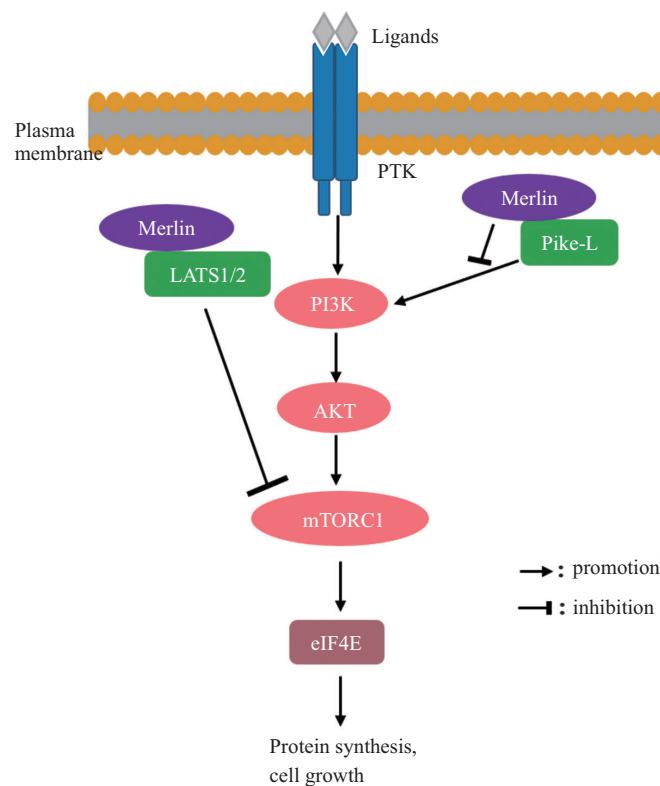


图5 Merlin抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路(根据参考文献[20,30]修改)

Fig.5 Merlin inhibits PI3K/AKT/mTOR signaling pathways (modified from references [20,30])

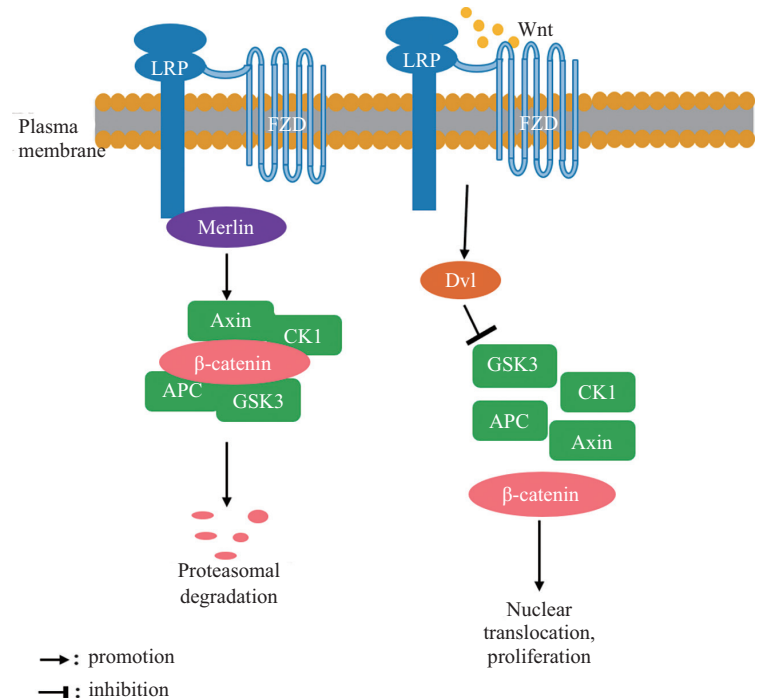


图6 Merlin抑制Wnt/β-catenin信号通路(根据参考文献[8]修改)

Fig.6 Merlin inhibits Wnt/β-catenin signaling pathway (modified from reference [8])

定积累的β-catenin易位到细胞核中与转录因子TCF/LEF结合,细胞增殖加快。在人类神经鞘瘤细胞中,确实可观察到因Wnt信号激活导致的核β-catenin表

达水平的升高及靶基因的上调^[20]。同时,Merlin缺失会断开其与质膜上E/N-cadherin的结合,进一步释放细胞膜上的β-catenin(图3)。因此,Merlin通过直接/间

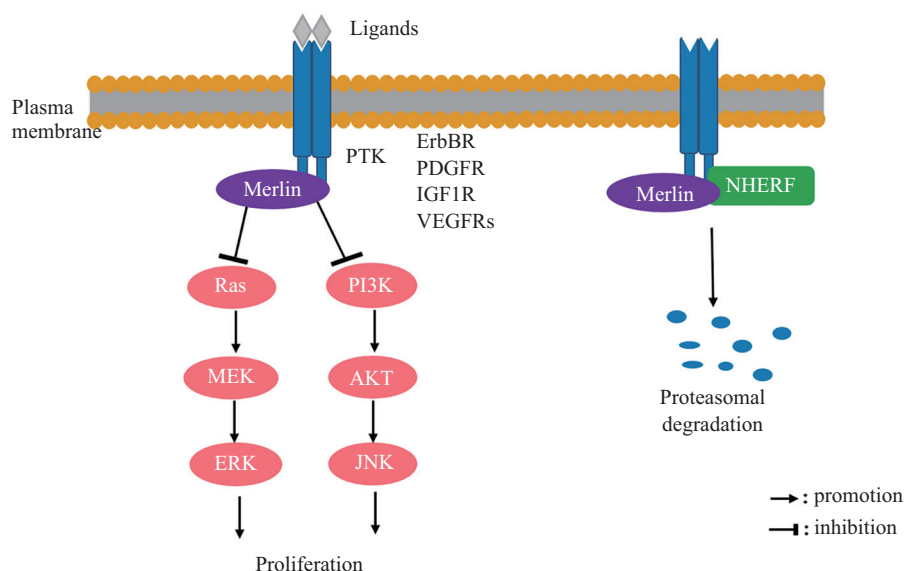


图7 Merlin调控RTKs信号途径(根据参考文献[8,20]修改)

Fig.7 Merlin mediates RTKs signaling pathways (modified from references [8,20])

接作用来影响 β -catenin的细胞质积累及细胞核转运,从而调控细胞增殖和组织生长。

2.2.4 Merlin参与RTKs信号途径 RTKs是一类跨膜受体,配体与受体结合可导致受体二聚化,激活受体的酪氨酸蛋白激酶活性,随即引起一系列磷酸化级联反应,但RTKs的过度激活会损害细胞,甚至引发癌症。Merlin与RTKs的相互作用可影响蛋白活性(图7),甚至影响RTKs的质膜定位,从而调控下游信号通路^[20]。RTKs血小板衍生生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)和人类表皮生长因子受体家族Her(也称ErbB受体家族)的细胞膜定位,以及它们的下游信号,都由Merlin调节。与肿瘤发展前的野生型相比, *NF2*^{-/-}外周小鼠神经中Merlin的缺失导致这些生长因子受体水平升高,同样在人类神经鞘瘤中这些生长因子受体也存在过度表达,且下游通路PI3K/AKT/c-Jun N-端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、MEK/ERK被激活;相反,在神经鞘瘤细胞系HEI193中,Merlin呈现过表达状态,PI3K/AKT信号通路被抑制,主要原因是Merlin通过与Na⁺/H⁺交换调节辅因子(Na⁺/H⁺ exchange regulatory cofactor, NHERF)的互作来促进PDGFR的胞质定位引发溶酶体降解,下游通路PI3K/AKT、MEK/ERK信号继而衰减,抑制细胞的异常增殖^[32]。

在*NF2*^{-/-}小鼠和神经鞘瘤患者中观察到ErbB2和ErbB3的膜定位水平和蛋白活性均增加,并促进肿瘤生长;此外,肾小管特异性*NF2*^{-/-}小鼠所发展的肾癌

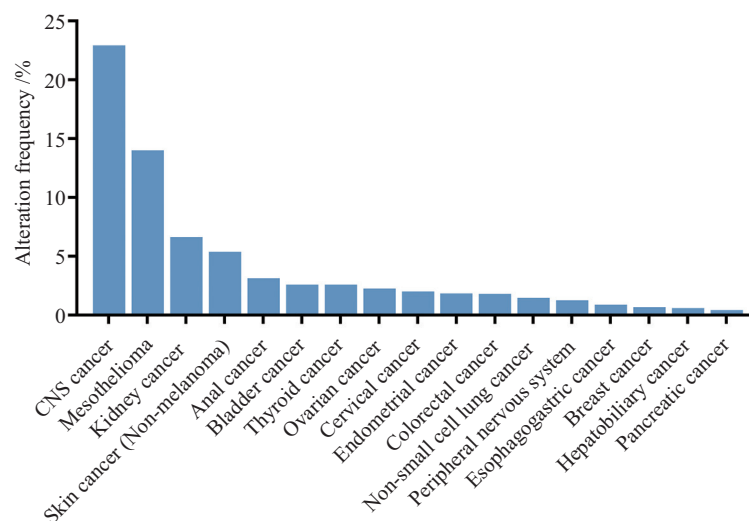
细胞中, ErbB1/EGFR信号强度也增强,细胞增殖加快。与Merlin对PDGFR的调节类似,Merlin也可通过促进ErbB的胞质转移及降解从而阻断ErbB的信号转导^[20]。在*NF2*^{-/-}的施万细胞中,重新表达Merlin之后生长因子受体ErbB2/ErbB3表达量减少、胰岛素样生长因子1受体(insulin-like growth factor receptor 1, IGF1R)和PDGFR定位至膜上。

3 基因*NF2*突变与肿瘤发生

根据cBioPortal(<https://www.cbioportal.org/>)的MSK临床测序数据集,我们统计了多种癌症类型中基因*NF2*的突变频率(图8)。其中,在突变频率最高的中枢神经系统中,基因*NF2*突变会引发一种常见的肿瘤综合征——NF2。此外, *NF2*突变与其他癌症例如间皮瘤、乳腺癌、肝癌等有关,但是在这些癌症中的突变频率显著低于在中枢神经系统中的突变频率,这种在组织上呈现的突变差异目前还未知原由。同时*NF2*在肿瘤细胞中还存在表达差异,一般在相关肿瘤细胞中呈现低表达状态,但不乏高表达的情况出现,其中Merlin的具体功能有待阐释。

3.1 II型神经纤维瘤

NF2是一种常染色体显性遗传综合征。半数以上的NF2患者携带新发突变,大约三分之一的患者携带镶嵌突变,通常在20岁时症状出现,常伴随神经鞘瘤、脑膜瘤、错构瘤和室管膜瘤的形成,这些肿瘤可能会影响神经元功能,难以完全切除,并且预后

图8 多种癌症类型中*NF2*的突变频率Fig.8 Mutation frequencies of *NF2* in multiple cancer types

效果差。在*NF2*常伴随的几种肿瘤当中,神经鞘瘤、脑膜瘤较为普遍,错构瘤和室管膜瘤相对较少,下面主要介绍神经鞘瘤、脑膜瘤中*NF2*遗传基础及疾病表型特征等。

*NF2*相关的神经鞘瘤的主要致病基因是*NF2*。*NF2*异常的患者有95%的几率患双侧前庭神经鞘瘤^[33],主要涉及Hippo、mTOR等信号通路。一项对9例脊髓神经鞘瘤血液样本的全基因组测序报告显示,*NF2*等位基因变异/Merlin失活在肿瘤发生过程中出现的频率更高。对信号通路的分析表明,Hippo信号通路可能是控制脊髓神经鞘瘤发生发展的关键途径^[34]。在神经鞘瘤细胞中Merlin功能缺失导致Hippo通路被抑制,并通过抑制LATS1/2磷酸化导致YAP/TAZ入核发挥作用。最近研究表明还有Hippo通路上游因子Angiomotin蛋白家族Motins以依赖Merlin的方式调节Hippo信号通路,当存在LPA刺激时,Merlin招募多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶TNKS1/2、E3泛素连接酶RNF146以及Motins,使其在细胞连接处形成复合物,这一过程促进了Motins的泛素化修饰及其后续的降解过程。而在Merlin缺失时,Motins同TNKS1/2以及RNF146的结合减弱,这一过程导致了细胞内Motins蛋白的大量积累,促使其与YAP/TAZ结合后滞留在细胞质中并抑制其活性,防止肿瘤快速发生,这可以解释神经鞘瘤表现为良性肿瘤的原因^[35]。

肿瘤发生的直接因素除基因*NF2*突变外,其他的调控机制如表观遗传学改变、转录本稳定性和

翻译后修饰也具有重要意义。研究发现,约60%的前庭神经鞘瘤*NF2*启动子元件中的3个顺式调控元件CpG位点的甲基化,这种表观修饰与启动子活性、mRNA表达活性的降低均有关^[36]。神经鞘瘤由多种细胞类型组成,除施万细胞之外还有轴突、巨噬细胞、T细胞、成纤维细胞、血管和细胞外基质等,涉及的所有细胞类型构成了复杂的“肿瘤微环境”^[37]。因此在探讨神经鞘瘤的发病机制时,除了关注施万细胞本身的变化以外,还要关注肿瘤微环境在神经鞘瘤发生发展中的影响作用。

基因*NF2*是*NF2*相关脑膜瘤最主要的致病基因。在50%~60%的脑膜瘤患者总人群中发现了*NF2*基因的无义突变、剪接位点突变和染色体易位等突变类型;在40%~80%的脑膜瘤初期患者中可见22号染色体的缺失^[33]。除了家族遗传性突变外,散发突变在脑膜瘤患者中也很常见。基因突变导致的脑膜瘤在分子特征、临床表型(性别、年龄、肿瘤级别、疾病程度等)多方面表现出差异^[38]。大样本脑膜瘤分子特征-临床信息的统计报告中显示,男性患者中更多出现*NF2*突变的脑膜瘤,且*NF2*突变更容易导致脊髓型脑膜瘤^[39]。*NF2*相关脑膜瘤的全外显子测序(WES)研究显示,来自同一个患者的I级肿瘤和II级肿瘤的生长速度呈现较大差异,测序结果显示基因组不稳定性是II级肿瘤高增长率的主要原因^[40],基因剂量改变和多个基因结构完整性受损都会导致基因组不稳定。

在成人脑膜瘤中,*NF2*基因失活是肿瘤发生的

早期标志,但小儿脑膜瘤的分子和临床特征均不清楚。对40例小儿脑膜瘤(36例散发性脑膜瘤和4例NF2相关脑膜瘤)的研究发现,所有NF2相关的脑膜瘤均具有22q缺失,75%患者显示Merlin表达缺失^[41]。对677例小儿脑膜瘤的荟萃分析(即Meta分析)显示,与散发性脑膜瘤相比,NF2相关脑膜瘤的患病率为10.2%,生存率明显降低,多灶性脑膜瘤患病率更高^[42]。

3.2 其他恶性肿瘤

NF2突变也与其他恶性肿瘤如间皮瘤、乳腺癌、肝癌等相关^[20]。在大多数类型的肿瘤中,NF2表达下调。通过对11种恶性间皮瘤细胞系的分析发现,Merlin的缺失导致mTORC1被激活,进而诱导Cyclin D1表达来加快细胞增殖。同时在一组人类间皮瘤细胞系中,Merlin的缺失伴随着LATS1表达减少及YAP磷酸化降低,这揭示间皮瘤发生与Hippo通路的联系^[43]。间皮瘤中Merlin缺失不仅与细胞增殖变快有关,而且与肿瘤细胞侵袭、扩散和迁移的增加有关,在间皮瘤细胞系Meso-17和Meso-25中重新表达Merlin降低了P-FAK(Tyr397)水平,从而破坏了SRC-FAK复合物和下游分子的相互作用,抑制了细胞连接处的效应分子的响应。乳腺癌中NF2体细胞突变的频率较低,对22种乳腺癌突变分析发现,三分之一的样本中PAKs表达升高,通过对PAKs的抑制有助于肿瘤的发展。另外在NF2^{-/-}乳腺癌MDA-MB-231细胞系中,Merlin重新表达抑制了YAP/TEAD活性,这揭示了Hippo通路在乳腺癌细胞中的功能^[20]。

但在某些肿瘤中Merlin也可能存在高表达,此时Merlin不再具备抑癌活性。科研人员在肝癌组织中发现了一种新的肿瘤发展模式,即在炎症微环境下,通过响应雌激素-表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)信号轴(独立于Hippo信号通路),Merlin呈现高表达状态,当雌激素与Merlin对肝脏干细胞调节异常时,反而会加速肝硬化组织向肝癌细胞的发展^[44];NF2作为抑癌基因出现的异常剪接,会导致细胞增殖异常,外显子2、3和4缺失的Merlin剪接变体Merlin^{A2-4},在肝脏肿瘤组织中高表达且干扰野生型Merlin的功能,在这些肿瘤细胞中Wnt/ β -catenin信号增强,同时干性相关基因被激活,促进体外细胞迁移和体内肝癌向肺转移^[45]。

虽然Merlin可参与多种机制来调控细胞生命活动,但目前Merlin在这些恶性肿瘤中的作用尚不明确,且Merlin在肿瘤组织中的不同表达状态更增

加了功能探索的难度。一方面,这些恶性肿瘤中的Merlin可通过信号通路来影响肿瘤细胞的增殖,在胰腺癌细胞中磷酸化失活的Merlin经信号转导途径可以促进细胞的净酸排出、增殖和侵袭^[46],又或者在肝癌细胞中肠道激素FGF15可以激活Hippo信号来抑制胆汁酸代谢、肝脏过度生长和肿瘤发生^[47]。另一方面,Merlin还能以特定的机制影响细胞代谢,乳腺癌组织中Merlin的缺失能使代谢向有氧糖酵解转变,为细胞增殖提供充足的物质保障^[48]。总之,Merlin的缺失与肿瘤发生发展密切相关,在肿瘤中的作用复杂且多样,其深层机制有待明确。

4 结语与展望

NF2作为一种抑癌基因已受到广泛关注和深入研究。目前大量工作主要聚焦于结构的解析与功能的探索、突变的发现与鉴定、疾病的临床表型、突变细胞模型的构建、相关肿瘤的致病机制及其治疗方式探索(小分子抑制剂、有关通路上除Merlin外其他因子的靶向药物)、手术的预后评估等。未来对NF2/Merlin的研究还可以从以下几个方面展开:(1) NF2作为抑癌基因在某些癌细胞呈现低表达状态,或者呈现高表达,突变相关肿瘤发生的差异依赖肿瘤微环境及组织特异性,这有助于解释不同肿瘤间的Merlin表达差异情况;(2) Merlin的差异表达影响信号通路中Merlin的具体机制,对机制的深入探索有助于揭示Merlin在细胞增殖和不同类型肿瘤中的具体作用;(3) Merlin的生物学功能多样,与肿瘤发生发展的关系复杂,充分利用蛋白组学分析、单细胞测序、空间转录组学分析等新方法、新技术,有助于发现并阐明其作用的新机制;(4) 基于Merlin异常与肿瘤的密切相关性,在深入阐明其致病机制的基础上,积极推进NF2/Merlin相关靶向药物研发是一个值得关注的方向。

参考文献 (References)

- [1] EVANS D G. Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review [J]. Orphanet J Rare Dis, 2009, 4: 16.
- [2] WISHART J H. Case of tumours in the skull, Dura mater, and brain [J]. Edinb Med Surg J, 1822, 18(72): 393-7.
- [3] GARDNER W J, FRAZIER C H. Bilateral acoustic neurofibromas: a clinical study and field survey of a family of five generations with bilateral deafness in thirty-eight members [J]. Archives Neurol Psych, 1930, 23(2): 266-302.
- [4] ROULEAU G A, WERTELECKI W, HAINES J L, et al. Genetic

- linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22 [J]. *Nature*, 1987, 329(6136): 246-8.
- [5] COY S, RASHID R, STEMMER-RACHAMIMOV A, et al. An update on the CNS manifestations of neurofibromatosis type 2 [J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 139(4): 643-65.
 - [6] TROFATTER J A, MACCOLLIN M M, RUTTER J L, et al. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor [J]. *Cell*, 1993, 72(5): 791-800.
 - [7] ROULEAU G A, MEREL P, LUTCHMAN M, et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2 [J]. *Nature*, 1993, 363(6429): 515-21.
 - [8] MOTA M, SHEVDE L A. Merlin regulates signaling events at the nexus of development and cancer [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 63.
 - [9] GIOVANNINI M, ROBANUS-MAANDAG E, VAN DER VALK M, et al. Conditional biallelic *Nf2* mutation in the mouse promotes manifestations of human neurofibromatosis type 2 [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(13): 1617-30.
 - [10] ZOCH A, MAYERL S, SCHULZ A, et al. Merlin isoforms 1 and 2 both act as tumour suppressors and are required for optimal sperm maturation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e129151.
 - [11] GUSELLA J F, RAMESH V, MACCOLLIN M, et al. Merlin: the neurofibromatosis 2 tumor suppressor [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1423(2): M29-36.
 - [12] PYKETT M J, MURPHY M, HARNISH P R, et al. The neurofibromatosis 2 (NF2) tumor suppressor gene encodes multiple alternatively spliced transcripts [J]. *Hum Mol Genet*, 1994, 3(4): 559-64.
 - [13] HALLIDAY D, EMMANOUIL B, PRETORIUS P, et al. Genetic Severity Score predicts clinical phenotype in NF2 [J]. *J Med Genet*, 2017, 54(10): 657-64.
 - [14] KRESAK J L, WALSH M. Neurofibromatosis: a review of NF1, NF2, and Schwannomatosis [J]. *J Pediatr Genet*, 2016, 5(2): 98-104.
 - [15] COOPER J, GIANCOTTI F G. Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(16): 2743-52.
 - [16] LOOK A, LONER R R. Inherited genetic syndromes and meningiomas [J]. *Handb Clin Neurol*, 2020, 169: 121-9.
 - [17] ALFTHAN K, HEISKA L, GRONHOLM M, et al. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates merlin at serine 518 independently of p21-activated kinase and promotes merlin-ezrin heterodimerization [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18559-66.
 - [18] SHER I, HANEMANN C O, KARPLUS P A, et al. The tumor suppressor merlin controls growth in its open state, and phosphorylation converts it to a less-active more-closed state [J]. *Dev Cell*, 2012, 22(4): 703-5.
 - [19] MANDATI V, DEL M L, DINGLI F, et al. Phosphorylation of Merlin by Aurora A kinase appears necessary for mitotic progression [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(35): 12992-3005.
 - [20] PETRILLI A M, FERNANDEZ-VALLE C. Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology [J]. *Oncogene*, 2016, 35(5): 537-48.
 - [21] YEUNG Y T, GUERRERO-CASTILLA A, CANO M, et al. Dysregulation of the Hippo pathway signaling in aging and cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 143: 151-65.
 - [22] RAUSCH V, HANSEN C G. The Hippo pathway, YAP/TAZ, and the plasma membrane [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(1): 32-48.
 - [23] MARTINEZ B, YANG Y, HARKER D, et al. YAP/TAZ related biomechanical signal transduction and cancer metastasis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 199.
 - [24] LI Y, ZHOU H, LI F, et al. Angiomotin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway [J]. *Cell Res*, 2015, 25(7): 801-17.
 - [25] HONG A W, MENG Z, PLOUFFE S W, et al. Critical roles of phosphoinositides and NF2 in Hippo pathway regulation [J]. *Genes Dev*, 2020, 34(7/8): 511-25.
 - [26] HAN H, QI R, ZHOU J J, et al. Regulation of the Hippo pathway by phosphatidic acid-mediated lipid-protein interaction [J]. *Mol Cell*, 2018, 72(2): 328-40.
 - [27] CHEN R, XIE R, MENG Z, et al. STRIPAK integrates upstream signals to initiate the Hippo kinase cascade [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(12): 1565-77.
 - [28] KRESSEL M, SCHMUCKER B. Nucleocytoplasmic transfer of the NF2 tumor suppressor protein merlin is regulated by exon 2 and a CRM1-dependent nuclear export signal in exon 15 [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(19): 2269-78.
 - [29] LI W, YOU L, COOPER J, et al. Merlin/NF2 suppresses tumorigenesis by inhibiting the E3 ubiquitin ligase CRL4 (DCAF1) in the nucleus [J]. *Cell*, 2010, 140(4): 477-90.
 - [30] GAN W, DAI X, DAI X, et al. LATS suppresses mTORC1 activity to directly coordinate Hippo and mTORC1 pathways in growth control [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(2): 246-56.
 - [31] KIM S, JHO E H. Merlin, a regulator of Hippo signaling, regulates Wnt/beta-catenin signaling [J]. *BMB Rep*, 2016, 49(7): 357-8.
 - [32] FRAENZER J T, PAN H, MINIMO L J, et al. Overexpression of the NF2 gene inhibits schwannoma cell proliferation through promoting PDGFR degradation [J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(6): 1493-500.
 - [33] BACHIR S, SHAH S, SHAPIRO S, et al. Neurofibromatosis Type 2 (NF2) and the implications for vestibular Schwannoma and meningioma pathogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 690.
 - [34] GAO X, ZHANG L, JIA Q, et al. Whole genome sequencing identifies key genes in spinal Schwannoma [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 507816.
 - [35] WANG Y, ZHU Y, GU Y, et al. Stabilization of Motin family proteins in NF2-deficient cells prevents full activation of YAP/TAZ and rapid tumorigenesis [J]. *Cell Rep*, 2021, 36(8): 109596.
 - [36] KINO T, TAKESHIMA H, NAKAO M, et al. Identification of the cis-acting region in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in Schwannoma [J]. *Genes Cells*, 2001, 6(5): 441-54.
 - [37] HELBING D L, SCHULZ A, MORRISON H. Pathomechanisms in Schwannoma development and progression [J]. *Oncogene*, 2020, 39(32): 5421-9.
 - [38] GOUTAGNY S, KALAMARIDES M. Meningiomas and neurofibromatosis [J]. *J Neurooncol*, 2010, 99(3): 341-7.
 - [39] YOUNGBLOOD M W, DURAN D, MONTEJO J D, et al. Correlations between genomic subgroup and clinical features in a

- cohort of more than 3000 meningiomas [J]. *J Neurosurg*, 2019: doi: 10.3171/2019.8.JNS191266.
- [40] DEWAN R, PEMOV A, DUTRA A S, et al. First insight into the somatic mutation burden of neurofibromatosis type 2-associated grade I and grade II meningiomas: a case report comprehensive genomic study of two cranial meningiomas with vastly different clinical presentation [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 127.
- [41] BATTU S, KUMAR A, PATHAK P, et al. Clinicopathological and molecular characteristics of pediatric meningiomas [J]. *Neuropathology*, 2018, 38(1): 22-33.
- [42] KOTACHA R S, PASCOE E M, RUSHING E J, et al. Meningiomas in children and adolescents: a meta-analysis of individual patient data [J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(13): 1229-39.
- [43] LI W, COOPER J, ZHOU L, et al. Merlin/NF2 loss-driven tumorigenesis linked to CRL4 (DCAF1)-mediated inhibition of the hippo pathway kinases Lats1 and 2 in the nucleus [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(1): 48-60.
- [44] COCCIADIFERRO L, MICELI V, GRANATA O M, et al. Merlin, the product of NF2 gene, is associated with aromatase expression and estrogen formation in human liver tissues and liver cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 172: 222-30.
- [45] LUO Z L, CHENG S Q, SHI J, et al. A splicing variant of Merlin promotes metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8457.
- [46] MALINDA R R, ZEEBERG K, SHARKU P C, et al. TGFbeta signaling increases net acid extrusion, proliferation and invasion in Panc-1 pancreatic cancer cells: SMAD4 dependence and link to Merlin/NF2 signaling [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 687.
- [47] JI S, LIU Q, ZHANG S, et al. FGF15 activates Hippo signaling to suppress bile acid metabolism and liver tumorigenesis [J]. *Dev Cell*, 2019, 48(4): 460-74.
- [48] MOTA M, JACKSON W P, BAILEY S K, et al. Deficiency of tumor suppressor Merlin facilitates metabolic adaptation by cooperative engagement of SMAD-Hippo signaling in breast cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2018, 39(9): 1165-75.