维普资讯 http://www.cqvip.com

(17)
92,17(1)
66-70

神经微丝，肿瘤，诊断，病理学诊断

神经微丝的结构、性质及其在肿瘤病理诊断中的应用

病理生理教研室 杨青峰 综述 范维珂 审校

R730.4

中图分类号 R730.4

中间丝（Intermediate filament, IF）为细胞骨架成份之一，因直径（8—10nm）介于微丝和微管之间而得名[1]。中间丝有五种，分别存在于不同的组织细胞。它们是广泛存在于上皮细胞的角蛋白（Keratin），分布于间叶起源细胞的波形蛋白（Vimentin），发生于肌细胞的结蛋白（Desmin），胶质细胞特异的胶质纤维酸性蛋白（Glial fibrillary acidic proteins, GFAP）和仅存于神经细胞的神经微丝（Neurofilament, NF）。开始分化的胚胎组织和肿瘤组织中，仍然存在与相应正常组织一致的中间丝成份。由于中间丝的组织特异性分布，引起了细胞生物学、胚胎发生学、病理学工作者的广泛兴趣。根据组织中所含中间丝的不同，可以对肿瘤进行分类，并为肿瘤的诊断和鉴别诊断提供了病理学依据，为胚胎组织和培养细胞的分化表达提供了新的研究途径。

NF为神经细胞特有的中间丝成份，与微丝微管一起构成神经细胞的骨架系统，参与维持细胞形态，轴突运输等重要生理过程[2]。广泛分布于神经原组织，包括中枢神经系统、周围神经系统、神经内分泌系统的神经细胞胞体和突起，神经纤维，以及起源于神经原的肿瘤组织中，其它非神经组织NF则缺如[3,4]。自1971年Shelanski[5]首次从牛脑中分离出NF以来，NF的研究已相当广泛和深入，涉及到NF的结构组成，理化性质、生理生化特性与免疫学性质、基

(1):96
[25] Lazzaroni M, et al. Br J Clin Pract 1983; 38(3):379
[26] Oosthoek D, et al. J Drug Res 1983; 8(9):1555
[27] Ward M, et al. Med J Aust 1981; 1(2):383
[28] Kang JY, et al. Digestion 1982; 23(1):71
[29] Vantrappen G, et al. Gut 1980; 21:329
[30] Moshal MG, et al. S A Med J 1981; 70:420
[31] Bianchi Porro G, et al. Proceedings 7th World Congress of Gastroenterology, Stookholm, 1982, A 395, 99
[32] Hamilton J, et al. Gut 1984; 25; 40
[33] Ward M, et al. Soc Meeting Gastro-Ent Aus 1983
[34] Bianchi Porro G, et al. Gut 1984; 25: A565
[35] Lee FI. Lancet 1985; 1:1299
[36] Delle-Fave G. Digestion 1990; 46(2):65
[37] Bianchi Porrd G, et al. Scand J Gastroenterol 1986; 21(suppl 122):35

（收稿日期：1992—05—15）

维普资讯 http://www.cqvip.com

因编码及其进化与表达，生理功能及病理应用等方面。下面仅就NF的结构，性质及其在肿瘤病理学上的应用做一个扼要的综述。

一、NF的理化性质与形态特征

NF是由三个蛋白亚单位构成的三联蛋白体，分子量范围分别为：68-72K(NFL)、140-170K(NFM)，200-220K(NFH)[6]。不溶于水及普通生理溶液，溶于含尿素和巯基乙醇的缓冲溶液中。在Ca^{2+}存在下对蛋白水解酶极为敏感。通常采用含尿素和巯基乙醇的缓冲液溶解，在EDTA及蛋白酶抑制剂作用下，通过轴突漂浮，借助于离子交换或凝胶过滤法从哺乳动物脑、脊髓、神经中分离NF。羟基磷灰石能特异性地吸附NF，所以常采用羟基磷灰石吸附层析法来分离NF[7]。

新分离的NF，由于尿素和巯基乙醇的作用而呈变性状态，透析后可以重新组合形成中间丝。NF的重组强烈依赖溶液的离子强度、pH值和温度。37℃下，相当于0.1M NaCl，及近中性pH值（pH6.4为最佳）有利于NF的重组。温度过高或过低，降低离子强度和碱性pH值都将使NF变性[8]。重组试验表明，NFL可以单独成丝，直径10nm，但相对较短，NFM、NFH只能与NFL一起组成中间丝。可以有以下几种组合形式：NFL；NFL:NFM；NFL:NFH；NFL:NFM:NFH。在不同的温度、离子强度和pH值下可有不同的构成比例。由于NFM、NFH不能自身或相互成丝，因而有人将其视为中间丝相关蛋白。也有认为NFM、NFH能够组成中间丝，只是目前的检测方法还不能证明它，或者由于NFM、NFH形成的中间丝在形态上没有什么不同，而被认为不能成丝。免疫荧光发现，细胞内NFL、NFM、NFH分布具有一致性，表明细胞内的NF通常以三联蛋白形式存在，而非其它形式的组合。抗体相嵌试验表明：NFL位于三联蛋白的中央，抗NFL、抗NFM呈现出连续的线状相嵌，可以有螺旋结构出现，而抗NFH于NF分子的表面，呈"口哨"状或"臂"样突出，有明显的间断性，间距100nm。由于NFH的结构和位置，通常被认为是联系NF之间、NF与其它细胞骨架成份之间的桥梁[9]。

二、NF的生化与免疫学特性

NF的一级结构尚不完全清楚，酶解分析发现其片段与其它中间丝相似，也可分为头片（N-末端），中央杆状区及尾片（C-末端）。杆状区主要由α-螺旋构成，约40K，其氨基酸组成与其它中间丝有明显的相似性，并能在种系发生和个体进化过程中保持相对稳定。抗各型中间丝的共同抗体，其相应的抗原决定簇位于杆状区，因而它包含了各型中间丝的共同特征，表明了各型中间丝的共同起源。头片和尾片是两个高变区，尤其是尾片，它的长短和氨基酸组成，是区别不同中间丝的特征。一般中间丝尾片不足5K，而NF较长，NFM、NFH多大于100K，同时含有大量的酸性氨基酸和具有特征性的银染色位点（Bodian's银染色位点）[10]。氨基酸序列分析发现，NFL、NFM所含酸性氨基酸大于30mol%，NFH大于25mol%。

NF多肽中的丝氨酸，天然情况下多以磷酸化丝氨酸形式存在，经大肠杆菌磷酸酶处理后磷酸可被去除。去磷酸化影响NF的电荷，因而SDS-PAGE可见电泳行为的改变；但去磷酸化并不影响NF的重组，电镜下仍可见10nm的重组中间丝。三个不同分子量的NF分子，去磷酸化影响最大的是NFH，而NFL几乎不受影响。原因可能是：其一，磷酸化丝氨酸含量NFH>NFM>NFL；其二，它们所处的位置不同，NFH位于最表面易于被酶消化，而NFL位于轴心，磷酸化丝氨酸隐蔽，不易受到酶的作用。去磷酸化同时影响NF的免疫学性质。免疫印迹试验表明，磷酸化与非磷酸化的NF对143

维普资讯 http://www.cqvip.com

株NF单抗表现出不同程度的亲和力，它们有各自特异性的单克隆抗体[11]。

由于NF各亚单位之间抗原性的交叉，表明它们都来源于同一原始基因编码的前体蛋白，由于进化和表达上的差异，导致了各个亚单位的不同。研究发现，在种系发生过程中[12]，个体发育的不同阶段[13]，肿瘤分化的不同时期[13]，甚至同一个体的不同部位[14]，神经原的胞体和突起之间[15]，NF各亚单位在结构和组成上存在某些微小差异，导致了抗原性的不同，构成了NF的神经型(Neurotype)[16]。NF的抗原决定簇至少可以分为4类[17]：①具有种和亚单位特异性的抗原决定簇，即只存在于某种特定动物的某种NF分子，与其它NF分子，其它中间丝蛋白，以及其它动物的NF分子，不存在交叉反应；②单纯亚单位特异性而不具有种族特异性的抗原决定簇，即各种动物相应的NF分子所共有的抗原决定簇；③NF亚单位之间共同的抗原决定簇；④与各种中间丝共同的抗原决定簇。NF复杂的神经型，是大脑结构复杂性的表现之一，通过NF结构和功能的研究，为大脑研究开辟了新的途径。

三、NF在肿瘤病理诊断中的应用

NF是神经原特有的中间丝，存在于神经细胞胞体和突起中，中枢神经系统的大多数神经原，周围神经节细胞（包括松果体、肾上腺髓质及肠道神经节，颈动脉体），视网膜神经原，嗜铬细胞均含NF。部分神经原不含NF或含量很低。Trojanowski发现中枢神经系统约有30%的神经原对NF单抗缺乏阳性染色，而周围神经系统阴性反应者不足1%。大脑和小脑的颗粒层的细胞小，胞浆少，含NF低，是导致组化染色阴性的重要原因。而周围神经节细胞胞体大，胞浆丰富，抗NF阴性反应少。轴突含有NF的全部成份，神经组织及其它组织的神经纤维成份均能被NF的抗体所染色[3]。然而，不同特异性的NF单抗，组化阳性神经原可以有不同的分布，这是由于不同亚群神经原具有不同的神经型所决定的[14,16]。

进一步研究表明，神经细胞的胞体和突起间，NF各亚单位的分布不均一，即NFH与NFL.NFM的比值在轴突高于胞体和树突。NFH在轴突中更为丰富，而在胞体和树突中含量较低。这与轴突运输作用有关。初合成的NF先于胞体和树突中，未经磷酸化，进入轴突后，经过轴突运输过程的转移后修饰作用而成为磷酸化的、成熟的NF。经过轴突运输过程到达轴突的NF更多的是NFH，其次是NFM[6,15]。因而，轴突特异性的NF的抗体常常只染神经纤维轴突，对胞体和树突则不染色或染色很浅。

根据免疫组织化学染色的不同，NF的单抗大体可以分为三群，每一群有其共同的特征，每株抗体又具有自己的特殊性。①神经纤维型：能使中枢神经系统，周围神经系统的神经纤维，小脑分子层下部及梨状神经原表面篮状细胞纤维染色。②核周神经纤维型：也称胞体型，能使神经原胞体和突起染色。其共同特征是均能使红核神经原和梨状神经原胞体染色。③突触相关型：能使大脑灰质和小脑颗粒层的小脑岛染色[18]。

NF也存在于胚胎神经组织及神经原的肿瘤组织中。原始神经上皮最初可分化为成神经细胞和成胶质细胞，最终分化成神经原和各型胶质细胞。分化受阻，形成各种肿瘤。NF作为原始神经细胞分化的标志，存在于已分化的胚胎神经组织和较为成熟的神经母细胞瘤中，而分化较低的神经原肿瘤及未分化的神经管上皮瘤，向胶质分化的各型肿瘤，则不含NF。胚胎神经嵴衍生的各型肿瘤：节细胞瘤(Ganglioneuromas, GN)节细胞神经母细胞瘤(Ganglioneuroblastomas, GNB)神经母细胞瘤(Neuroblastomas, NB)，嗜铬细胞瘤(Pheochromocytomas)均含有共同的NF标志，有别于其它非神经系统的肿瘤[19-21]。因而，NF在神经原的发生，神经原的胚胎性肿瘤的研

维普资讯 http://www.cqvip.com

究上有重要意义。

Trojanowski用NF单抗做探针，对神经原肿瘤与正常成熟神经组织的比较研究发现，神经原肿瘤组织中间丝可能表达异常[22]。正常神经原除嗅觉神经原外，大多表达NF三联蛋白，NFH多以完全磷酸化形式存在，与角蛋白不存在共同表达，NF三联蛋白分散于核周，胞浆和轴、树突中，电镜下可见NFH形成的"侧突"或"臂"样突起。而神经原肿瘤则相反，可能表现为①NFL或NFH的缺乏或低下；②NFH磷酸化不完全；③NF与角蛋白的共同表达；④NF在核周或近核聚集成束；⑤形态上缺少正常NF三联体具有的"臂"样侧突。神经原肿瘤之所以出现NF的异常，可能与肿瘤在增殖、分化过程中，NF的合成、组装、磷酸化出现异常有关。

NB是临床上常见的实体瘤，好发于儿童，它与其它小圆细胞肿瘤如Wilm氏瘤，横纹肌肉瘤、恶性淋巴瘤、Ewing氏肉瘤在形态上很难区别，由于它们具有各自不同的起源，因而含有各自不同的生化标志。NB含有其特异的NF和神经原特异的烯醇化酶（Neuron-specific enolase, NSE）借助于免疫组化方法与其它小圆细胞肿瘤相鉴别[23]。

Mukai用三种成份的特异性抗体对30例神经原肿瘤的常规病理标本（甲醛固定，石蜡包埋）进行免疫组化检测，发现GN、GNB。均能被三种NF特异性抗体所染色，而付节瘤、NB均能被NFL特异性抗体所染色，但只有部份被NFM、NFH特异性抗体所染色[19]。Osborn报导的结果与之相似，29例NB对三种NF特异性抗体及对NFL的单抗的组化染色并非都是一致的阳性结果[23]。而Molenaar用三种NF和不同磷酸化状态的NFM、NFH特异性抗体对18例神经原肿瘤的冰冻切片的研究结果同样表明，GN、GNB均能被各种NF抗体所染色，而NB只能部份被NF特异性抗体，特别是不同磷酸化状态的NFH特异性抗体所染色[20]。原因分析表明，NF抗体阴性染色的肿瘤，可能本身来源于不含NF的细胞；或者由于细胞分化程度低，NF含量少；甲醛或酒精固定，石蜡包埋，甲醇-H_2O_2处理对NF抗原表位的破坏[24]；也可能与NF的生理状态有关，如是否处于磷酸化状态等。NFH尤其是磷酸化的NFH被认为是神经细胞分化成熟的标志。因而，低分化的肿瘤，NFH，磷酸化的NFH可能缺乏或有所改变。又由于不同部位的NF，可以有不同的神经型，因而对某种抗体并非具有一致的染色。所以，不同的个体，不同部位来源的同种肿瘤，对某种NF抗体的反应就可能出现完全相反的结果。

来源于神经嵴的嗜铬细胞，具有神经原和内分泌细胞的双重特性，过去认为嗜铬细胞不含NF，现已被组化染色所否定，已经在组织和培养的嗜铬细胞中发现了NF。嗜铬细胞瘤与亲代细胞一样表达NF，Trojanowski发现[21]，15例嗜铬细胞瘤中有13例能被NF特异性抗体所染色。组织培养的嗜铬细胞瘤PC12（鼠嗜铬细胞瘤），在神经生长因子作用下，可向神经原方向分化，可见胞浆增多，轴突延长，同时表达大量的NF，可以是NFL、NFM、或NFH[25]。

另一种具有神经内分泌特性的肿瘤—小细胞肺癌，也能表达NF，有别于其它类型的肺癌，后者可能表达角蛋白，而NF阴性。Lehto对28例各型肺癌的研究表明，6例小细胞肺癌无一例外地均被NF特异性抗体所染色，而角蛋白、波形蛋白、结蛋白特异性抗体染色阴性。22例其它各型肿瘤均能表达角蛋白，与其它中间丝抗体无反应[26]。可见中间丝分类法对于各型肺癌的诊断和鉴别诊断亦有重要意义。

成神经管细胞瘤[22]和视网膜母细胞瘤[27]，通常拥有神经原和神经胶质的双重标志，NF或GFAP可能同时出现。被认为起源于原始的多能细胞，可能向神经原和

维普资讯 http://www.cqvip.com

神经胶质分化。也有倾向认为，它们更多的向神经原方向分化，因为在组织培养的肿瘤细胞中仅有NF和其它的神经细胞标志而没有GFAP等胶质标志的出现。组织中GFAP的表达可能由于反应性胶质增生所致，而非肿瘤细胞所表达。

还有一些肿瘤，如支气管类癌，皮肤Merkel氏细胞瘤、畸胎瘤、部份小细胞肺癌、它们在表达NF的同时还表达角蛋白，它们可能来源于具有表皮分化趋向的干细胞[4]。周围神经鞘的肿瘤包括雪旺氏细胞瘤、神经纤维瘤，由于其胶质起源，NF抗体染色多为阴性，肿瘤中的轴突纤维也可以出现阳性染色[28]。

参 考 文 献

[1] Osborn, M, et al, Lab, Invest, 1983; 48:372

[2] Lasek, RJ, et al, Ann, NY, Acad, Sci, 1985; 455:462

[3] Trojanowski, JQ, et al, J, Neurosci, 1986; 6:650

[4] Trojanowski, JQ, Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunohistochemistry ed, Wick, MR, et al, Marcel Dekker, Inc, New York, 1988; 115

[5] Shelanski, ML, et al, Science 1971; 174:1242

[6] Nixon, RA, et al, J, Cell Biol, 1982; 94:150

[7] 杨青峰,等.免疫学杂志, 1990; 6:92

[8] Angelides, KJ, et al, J, Cell Biol, 1989; 108:1495

[9] Geisler, N, et al, J, Mol, Biol, 1981; 151:565

[10] Weber, K, et al, Ann, NY, Acad, Sci, 1985; 455:126

[11] Carden, MJ, et al, J, Bio, Chem, 1985; 260:9805

[12] Show, G, et al, Nature 1982; 298: 277

[13] Velasco, ME, et al, Surg, Neurol, 1985; 23:177

[14] Compbell, MJ, et al, J, Comp, Neurol, 1989; 282:191

[15] Matus, A, Trends Neurosci, 1988; 11:291

[16] Goldstein, ME, et al, Proc, Natl, Acad, Sci, USA 1983; 80:3101

[17] Lee, V, et al, Proc, Natl, Acad, Sci, USA 1982; 79:6089

[18] Sternberger, LA, Immunocytochemistry ed, Polak, JM, et al, Wright, PSG, 1983; 1

[19] Mukai, M, et al, Am, J, Pathol, 1986; 122:28

[20] Molenaar, WM, et al, Am, J, Pathol, 1990; 136:375

[21] Trojanowski, JQ, et al, New Eng, J, Med, 1985; 313:101

[22] Trojanowski, JQ, et al, J, Histochem, Cytochem, 1987; 35:999

[23] Osborn, M, et al, Am, J, Pathol, 1986; 122:433

[24] Hittmair, A, et al, J, Immunol, Methods 1989; 116:199

[25] Derer, M, et al, Neuroscience 1989; 31:471

[26] Lehto, VP, et al, Am, J, Pathol, 1983; 110:113

[27] Herman, MM, et al, Am, J, Pathol, 1989; 134:115

[28] Kawahara, E, et al, Am, J, Surg, Pathol, 1988; 12:115

(收稿日期：1990—09—25)