

基础研究

I 型神经纤维瘤病营养不良性脊柱侧凸患者
椎体生长板软骨细胞的功能变化及意义

刘学光, 邱 勇, 孙 旭, 袁 硕, 钱邦平, 王渭君, 王守丰, 王 斌, 俞 杨, 周 松

(南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008 江苏省南京市)

【摘要】目的:观察 I 型神经纤维瘤病(NF1)营养不良性脊柱侧凸患者椎体生长板软骨细胞的功能变化,探讨其在脊柱营养不良性改变中的作用。**方法:**共有 8 例 NF1 营养不良性脊柱侧凸患者纳入本研究,男 5 例,女 3 例,年龄 9~15 岁,平均 11.8 ± 2.0 岁。在矫形术中取营养不良区(顶椎区, A 组)、非营养不良区(端椎区, B 组)椎体生长板软骨及髂软骨(C 组)。采用两步酶消化结合植块法进行软骨细胞培养。应用 Real-time PCR 法检测软骨细胞中可聚蛋白多糖、II 型胶原及神经纤维瘤蛋白的 mRNA 表达。**结果:**A 组软骨细胞中可聚蛋白多糖 mRNA 的表达量为 0.04 ± 0.02 , B 组为 0.09 ± 0.04 , C 组为 0.13 ± 0.07 , A 组显著低于 B 组和 C 组($P < 0.05$)。A 组 II 型胶原的 mRNA 表达量为 0.91 ± 0.04 , B 组为 0.96 ± 0.07 , C 组为 1.03 ± 0.10 , A 组显著低于 C 组($P < 0.05$), A 组与 B 组差别无统计学意义($P > 0.05$)。A 组神经纤维瘤蛋白的 mRNA 表达量为 0.39 ± 0.30 , B 组为 1.34 ± 0.63 , C 组为 1.00 ± 0.51 , A 组较 B、C 组均明显降低($P < 0.05$)。各指标在 B 组与 C 组间均无统计学差异($P > 0.05$)。**结论:**NF1 营养不良性脊柱侧凸患者营养不良区椎体生长板软骨细胞分化功能存在明显缺陷,其可能是脊柱营养不良性改变的基础。

【关键词】神经纤维瘤病;脊柱侧凸;营养不良;神经纤维瘤蛋白;软骨细胞

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.07.15

中图分类号: R682.3, R363.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-07-0592-05

Functional change and significance of vertebral growth plate chondrocytes in patients with scoliosis secondary to type 1 neurofibromatosis/LIU Xueguang, QIU Yong, SUN Xu, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(7): 592~596

【Abstract】Objective: To investigate the biological features of the chondrocytes isolated from vertebral growth plate in patients with type 1 neurofibromatosis (NF1) and its role in the dystrophic change of vertebrae. **Method:** This study included 8 cases of NF1 complicated with dystrophic scoliosis. There were 5 boys and 3 girls, aged from 9 to 15 years (mean 11.8 ± 2.0 years). Growth plates of dystrophic vertebrae (group A) and non-dystrophic vertebrae (group B) were harvested during anterior surgery, and iliac growth plate (group C) was harvested during posterior surgery. Chondrocytes from growth plate were isolated and cultured by two-step enzymatic digestion and tissue culture system in vitro. Expressions mRNA of aggrecan and type II collagen as well as neurofibromin were assayed in P2 chondrocytes by Real-time PCR. **Result:** Expression mRNA of aggrecan was significantly lower in chondrocytes of group A (0.04 ± 0.02) than the other two groups (0.09 ± 0.04 , 0.13 ± 0.07 respectively) ($P < 0.05$). The level of type II collagen in group A (0.91 ± 0.04) was significantly lower than group C (1.03 ± 0.10) ($P < 0.05$), yet not significantly lower than group B (0.96 ± 0.07) ($P > 0.05$). Also, lower level of neurofibromin was detected in group A (0.39 ± 0.30) compared with group B (1.34 ± 0.63) and C (1.00 ± 0.51) ($P < 0.05$). Each parameter showed no difference between group B and C ($P > 0.05$). **Conclusion:** Dysfunction of vertebral growth plate chondrocytes may contribute to the dystrophic change of vertebrae in scoliosis associated with NF1.

【Key words】 Neurofibromatosis; Scoliosis; Dystrophia; Neurofibromin; Chondrocyte

基金项目: 江苏省自然科学基金课题(编号: BK2010109)

第一作者简介: 男(1984-), 硕士研究生, 研究方向: 脊柱畸形

电话: (025) 83105121 E-mail: lxguang2003@gmail.com

通讯作者: 邱勇 E-mail: scoliosis2002@sina.com

【Author's address】The Spinal Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing, 210008, China

脊柱侧凸是 I 型神经纤维瘤病(NF1)患者最常见的骨骼系统异常表现之一^[1]。营养不良性改变是 NF1 脊柱侧凸的重要特征。伴有营养不良性改变的脊柱侧凸患者,其顶椎区营养不良性改变最为明显,而端椎区则与正常脊椎形态相近。目前这种营养不良性改变发生的机理尚不明确^[2]。虽然神经纤维瘤蛋白功能异常被认为是 NF1 各种临床表型的基础^[3],但对这一全身性改变如何造成局部特异的骨骼损害的原因并不清楚。从生长发育角度出发,脊椎的形态学改变与生长板软骨的功能异常密不可分。有研究显示,NF1 脊柱侧凸患者骺软骨细胞神经纤维瘤蛋白的表达下降,并同时存在软骨细胞功能异常^[4-6],但目前尚无直接研究 NF1 患者脊柱营养不良区椎体生长板软骨的报道。本研究拟通过体外培养 NF1 营养不良性脊柱侧凸患者椎体生长板的软骨细胞,观察软骨细胞分化功能及神经纤维瘤蛋白的表达是否存在异常,探讨其在脊柱营养不良性改变中的作用。

1 资料和方法

1.1 研究对象及分组

研究对象入选标准:①根据美国国立卫生研究所(national institutes of health,NIH)临床诊断标准^[7]诊断为 NF1;②伴脊柱侧凸畸形且需行前后路分期手术治疗;③年龄 9~15 岁,Risser 征 0~2 级;④顶椎区脊椎有营养不良性改变,端椎区无营养不良性改变。脊椎营养不良性改变的影像学表现参考以下标准:冠状面或矢状面椎体楔形变;椎体后缘扇贝形切迹(弧形顶点到椎体后缘垂线距离在胸椎大于 3mm,腰椎大于 4mm);椎体前缘扇贝形切迹;椎体侧方扇贝形切迹;横突梭形改变;椎弓根间距增大;椎管明显扩大;脊椎指数(椎管矢状径与横径的乘积与椎体矢状径与横径的乘积之比)小于 2.5;神经根管扩大;神经根管宽度增大到上方未累及脊椎的 1/3 以上^[8]。排除标准:①患有血液系统疾病;②恶性肿瘤;③有代谢性骨病及激素、抗凝药等药物应用史;④骨盆正位 X 线片示骺骨发育不良或破坏。2009 年 9 月~2010 年 10 月共有 8 例符合条件的患者纳入本研究,其中男 5 例,女 3 例,年龄 9~15 岁,平均 11.8 岁,Cobb 角 58°~85°,平均 75.5°。主胸弯 3 例,双主弯、胸腰弯

各 2 例,腰弯 1 例,其中 2 例患者同时伴有胸椎后凸增加(56°和 59°)。在行前路松解融合手术时分别取顶椎和端椎生长板,于后路取髂骨植骨融合手术时取髂骨生长板,各约 0.5~1.0g。患者本人及其父母知情同意,并取得医学伦理委员会许可。

将所取标本按取材部位分为 3 组,A 组:顶椎区生长板(营养不良性改变组);B 组:端椎区生长板(非营养不良性改变组);C 组:髂骨生长板(非营养不良性改变组)。

1.2 研究方法

1.2.1 软骨细胞的分离、培养和表型鉴定 三组软骨细胞的分离培养均参考黄爱兵等^[9]软骨细胞体外分离培养方法。利用细胞爬片技术,将 P2 代软骨细胞按约(2~3)×10⁵ 个/孔接种于放有盖玻片的 6 孔板内培养(盖玻片提前用 75%酒精浸泡过夜),待细胞 70%融合时取出爬片,5%多聚甲醛固定 20min,蒸馏水冲洗,磷酸盐缓冲液(PBS)浸泡 5min,3%去离子 H₂O₂ 孵育 15min 以灭活内源性过氧化物酶,用山羊血清室温封闭 20min。甩去多余液体,不洗。滴加 1:100 的一抗(兔抗人 II 型胶原单克隆抗体)约 50μl,4℃过夜;阴性对照以 PBS 代替一抗。PBS 冲洗 2min×3 次,滴加 1:100 的二抗(山羊抗兔 IgG),37℃恒温箱 20min,PBS 冲洗 3min×3 次。滴加辣根酶标记链霉卵白素,37℃恒温 20min。PBS 冲洗 5min×4 次。DAB 显色试剂盒显色处理(按说明书操作),蒸馏水洗涤,0.1%茜素红复染 5min,充分水洗。中性树脂封片,镜下观察并拍照。

1.2.2 软骨细胞中可聚蛋白多糖、II 型胶原、神经纤维瘤蛋白的 mRNA 表达检测 采用 Real-time PCR 检测法。取 P2 代软骨细胞,加入 Trizol 裂解,提取总 RNA,M-MLV 法逆转录得到 100μl cDNA。采用 7500 Real-time PCR 仪(ABI 公司,美国)、荧光染料 SYBR Green Mix 法(Takara 公司)检测 3 组软骨细胞中的可聚蛋白多糖、II 型胶原、神经纤维瘤蛋白的 mRNA 表达水平。根据说明书操作,依次向 PCR 板每个孔内加入 SYBR Premix Ex Taq 酶 10μl、上游引物 0.4μl、下游引物 0.4μl、染料 Dye II 0.4μl、cDNA 模板 2.0μl、灭菌蒸馏水 6.8μl,总反应体系 20μl。内参选择管家基因 β-actin。目标基因及内参的上下游引物

由 Takara 公司设计合成,可聚蛋白多糖、Ⅱ型胶原、Ⅰ型神经纤维瘤蛋白(NF1)、内参(HBA)引物序列和扩增产物大小见表 1。每个样本做 2 个复孔。Real-time PCR 反应采用两步法,反应条件:95℃预变性 30s 后,进行 40 个循环,每个循环为 95℃变性 5s,60℃退火 34s。仪器自动生成各样本 Ct 值。目的基因表达水平采用 Livak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算^[10]。

1.3 统计学处理

将各组检测数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,3 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较用 LSD 法。所有资料采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

软骨块经两步酶消化后变得松软,2 周后软骨块周围开始有细胞爬出,刚爬出的原代细胞局簇性分布于软骨块周围(图 1)。P0 代细胞呈多角形、圆形、三角形或不规则形,再经约 1 周的增殖可见软骨细胞密度不均匀分布于培养瓶底,可以传代。P2 代软骨细胞增殖能力较强,到第 5 天时有 85%融合,形成“铺路石”样结构(图 2)。3 组软骨细胞在培养过程中细胞形态上无明显不同。

各组 P2 代软骨细胞经Ⅱ型胶原免疫组化染色可见细胞核周围出现片状或团块状的棕褐色颗粒,免疫组化染色呈阳性(图 3)。空白对照细胞胞

表 1 引物序列和扩增产物大小

目的基因	引物序列	产物大小(bp)
可聚蛋白多糖	上游:5'-AGCAGTCACACCTGAGCAGCA-3' 下游:5'-GTTTCAGGCCGATCCACTGGTA-3'	89
Ⅱ型胶原	上游:5'-AGACTGGCGAGACTTGCGTCTAC-3' 下游:5'-GTCATCTGGACGTTGGCAGTG-3'	175
神经纤维瘤蛋白	上游:5'-TTGCCCATTTCTGCGTAATTGA-3' 下游:5'-TGCATCTCCATCTGGGCAAC-3'	195
HBA	上游:5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3' 下游:5'-CTAAGTCATAGTCGCGCTAGAAGCA-3'	186

浆内无染色(图 4)。

Real-time PCR 检测各组 P2 代软骨细胞中可聚蛋白多糖、Ⅱ型胶原、神经纤维瘤蛋白的 mRNA 表达见表 2。A 组软骨细胞内可聚蛋白多糖的 mRNA 表达明显低于 B、C 组,差异有统计学意义($P<0.05$),B、C 组间无显著性差异($P>0.05$)。A 组软骨细胞内Ⅱ型胶原的 mRNA 表达显著低于 C 组($P<0.05$),略低于 B 组,但差异无统计学意义($P>0.05$),B、C 组间无显著性差异($P>0.05$)。A 组神经纤维瘤蛋白 mRNA 表达水平明显低于 B、C 组,差异有统计学意义($P<0.05$),B、C 组间无显著性差异($P>0.05$)。由此可见,NF1 脊柱侧凸患者脊柱营养不良区软骨细胞分化功能明显低于非营养不良区,而非营养不良区(端椎区和髂骨)生长板软骨细胞的分化功能无明显差异;脊柱营养不良区神经纤维瘤蛋白 mRNA 的表达显著低于非营养不良区。

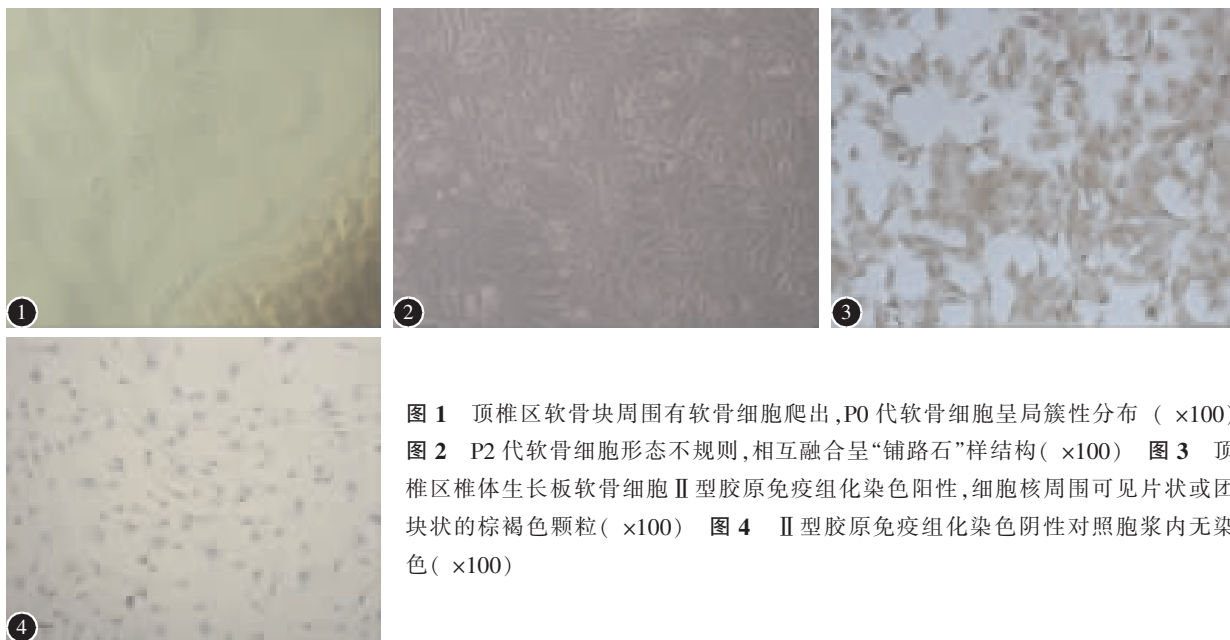


图 1 顶椎区软骨块周围有软骨细胞爬出,P0 代软骨细胞呈局簇性分布(×100) 图 2 P2 代软骨细胞形态不规则,相互融合呈“铺路石”样结构(×100) 图 3 顶椎区椎体生长板软骨细胞Ⅱ型胶原免疫组化染色阳性,细胞核周围可见片状或团块状的棕褐色颗粒(×100) 图 4 Ⅱ型胶原免疫组化染色阴性对照胞浆内无染色(×100)

表 2 NF1 脊柱侧凸患者脊柱营养不良区与非营养不良区软骨细胞可聚蛋白多糖、Ⅱ型胶原和神经纤维瘤蛋白 mRNA 表达量 (Ct 值, $n=8$)

	可聚蛋白多糖	Ⅱ型胶原	神经纤维瘤蛋白
顶椎区(A组)	0.04±0.02	0.91±0.04	0.39±0.30
端椎区(B组)	0.09±0.04 ^①	0.96±0.07	1.34±0.63 ^①
髂骨(C组)	0.13±0.07 ^{①②}	1.03±0.10 ^{①②}	1.00±0.51 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.05$;②与 B 组比较 $P>0.05$

3 讨论

NF1 是由于 17 号染色体上 NF1 基因表达异常导致神经纤维瘤蛋白缺失所致的多系统受累的单基因遗传性疾病^[1]。NF1 患者骨骼系统异常的发生率高达 50%，主要表现为脊柱侧凸或侧后凸、身材矮小、胫骨弯曲或胫骨假关节、大头畸形、蝶骨发育不良、单侧肢体异常生长、骨囊肿、骨膜下骨增生等^[2]，其中以脊柱侧凸或侧后凸最为常见。营养不良性改变是 NF1 脊柱侧凸患者的重要特征^[12,13]。朱锋等^[14]认为与特发性脊柱侧凸相比，NF1 患者营养不良性脊柱侧凸的主要特征是侧凸节段短、成角明显、侧凸进展迅速、椎体明显楔形变、脊椎严重旋转、脊膜膨出、椎管扩大、椎体的扇贝样改变和顶椎区矢状面的急剧成角畸形等。然而 NF1 如何使脊椎发生上述特殊结构性改变，进而导致脊柱侧凸的机制尚不清楚。Abdel-Wanis 等^[15]认为脊柱营养不良区椎体的上述改变可能与软骨病、内分泌紊乱、原发中胚层缺陷以及神经纤维瘤组织直接侵入骨骼有关。Alwan 等^[16]则认为 NF1 患者骨骼营养不良性改变可能是骨骼系统的内在缺陷导致椎体对外界应力刺激的异常性反应与重建的结果，即 NF1 患者椎体营养不良性改变是内因和外因共同作用的结果。

椎体生长板软骨组织结构类似于长骨骨骺，具有软骨内成骨的生长方式，在脊柱纵向生长发育过程中椎体的生长主要以此种方式完成^[17]。椎体生长板软骨组织形态异常势必导致脊柱生长发育障碍。有研究表明，青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS) 患者椎体生长板软骨内成骨异常是其发生发展的重要因素之一^[18-20]。那么，NF1 患者是否存在生长板软骨的内在缺陷，进而造成其椎体营养不良性改变呢？目前尚未见到与 NF1 脊柱侧凸患者椎体生长板软骨相关的研究。Kolanczyk 等^[21]报道 NF1 Prx1(NF1+/-)小鼠生长板软骨细胞增殖率降低，同时细胞分

化也存在缺陷，他认为这可能是小鼠生长迟滞的主要原因。陈晖等^[22]研究认为 NF1 脊柱侧凸患者营养不良性改变在成骨细胞功能缺陷的基础上还可能受某些局部因素影响。Ⅱ型胶原和可聚蛋白多糖是由软骨细胞分泌到软骨基质中的重要成分。本研究通过软骨细胞体外培养，采用 Real-time PCR 检测了软骨细胞Ⅱ型胶原和可聚蛋白多糖等特异性指标，结果显示 NF1 脊柱侧凸患者营养不良区椎体生长板软骨细胞可聚蛋白多糖和Ⅱ型胶原的表达量明显低于髂软骨细胞表达量，也低于作为非营养不良区的端椎生长板软骨细胞的表达量。提示 NF1 脊柱侧凸患者营养不良区生长板软骨细胞分化能力低于非营养不良区。由于端椎区和髂骨生长板软骨细胞可聚蛋白多糖与Ⅱ型胶原的表达量相近，可以认为此二区生长板软骨细胞分化功能无差别，营养不良性脊柱侧凸的端椎区不仅在形态学属于非营养不良性，在生长板软骨细胞功能的角度上也可以认为是非营养不良性。

神经纤维瘤蛋白是由 NF1 基因编码的由 2818 个氨基酸组成的蛋白质。目前认为，神经纤维瘤蛋白表达下降和功能异常可能是 NF1 各种临床表型的共同基础^[23,24]。关于神经纤维瘤蛋白功能异常如何造成脊椎营养不良性改变这种局部表现尚无合理的解释。Abdel-Wanis 等^[15]猜想营养不良性脊柱侧凸可能缘于骨骼中神经纤维瘤蛋白缺乏导致的发育缺陷，他认为神经纤维瘤蛋白缺乏可能导致血小板衍生生长因子(PDGF)和转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)等生长因子的成骨作用消失，且通过 Ras 和 MAPK 的上调干扰核心结合转录因子(Cbfa1)及骨钙素作用。

Chen 等^[25]的研究证实 NF1 脊柱侧凸患者神经纤维瘤蛋白在软骨和成骨细胞中均有表达，且同时伴有明显的细胞功能缺陷，而这种细胞功能缺陷可能是 NF1 患者骨密度降低的原因之一。Kuorilehto 等^[26]应用免疫组化方法发现小鼠生长板软骨细胞中存在神经纤维瘤蛋白表达，尤其以肥大层细胞明显。陈晖等^[27]研究发现 NF1 脊柱侧凸患者髂软骨细胞中神经纤维瘤蛋白表达明显降低，软骨细胞分化程度和活性水平降低而增殖相对活跃，证明该类患者软骨细胞存在明显功能缺陷。本研究发现神经纤维瘤蛋白 mRNA 在 NF1 脊柱侧凸患者椎体生长板软骨细胞中也存在表达，

与非营养不良区相比,营养不良区软骨细胞中神经纤维瘤蛋白的 mRNA 表达量明显降低,提示 NF1 脊柱侧凸患者营养不良区软骨细胞存在神经纤维瘤蛋白表达缺陷。这种神经纤维瘤蛋白表达缺陷可能与该区域的营养不良性改变有关。由于端椎区生长板软骨神经纤维瘤蛋白表达与髂骨相当,故营养不良区生长板软骨中神经纤维瘤蛋白表达缺陷可能与某种局部因素有关。这种局部因素具体由何引起,是否与生长板软骨的分化功能下降有关,还有待于进一步研究。

本研究通过体外培养椎体生长板软骨细胞的方法,揭示了 NF1 脊柱侧凸患者营养不良区软骨细胞分化功能存在明显缺陷,并伴有神经纤维瘤蛋白 mRNA 表达降低。二者可能是造成 NF1 脊柱侧凸患者脊柱营养不良性改变的原因之一。

4 参考文献

- Albarnia BA, Gabriel KR, Beckman E, et al. Prevalence of scoliosis in neurofibromatosis[J]. *Spine*, 1992, 17(8): 244-248.
- Korf BR. Diagnosis and management of neurofibromatosis type 1[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2001, 1(2): 162-167.
- Crawford AH. Neurofibromatosis. In: *The Pediatric Spine*[M]. New York: Raven Press, Ltd, 1994. 619-649.
- Daston MM, Ratner N. Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development [J]. *Dev Dyn*, 1992, 195 (3): 216-226.
- Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs) [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85(8): 1544-1552.
- 陈晖, 邱勇, 王斌, 等. I 型神经纤维瘤病软骨细胞生物学特性的研究[J]. *实用骨科杂志*, 2008, 14(4): 214-217.
- Crawford AH. Pitfalls of spinal deformities associated with neurofibromatosis in children[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1989, 245: 29-42.
- Sirois JL III, Drennan JC. Dystrophic spinal deformity in neurofibromatosis[J]. *J Pediatr Orthop*, 1990, 10(4): 522-526.
- 黄爱兵, 邱勇, 孙光权, 等. 人髂骨生长板软骨细胞的体外培养及鉴定[J]. *中国矫形外科杂志*, 2008, 16(11): 856-859.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP[J]. *Cell*, 1990, 62(3): 599-608.
- Vitale MG, Guha A, Skaggs DL. Orthopaedic manifestations of neurofibromatosis in children: an update [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2002, 401: 107-118.
- 王亨, 邱贵兴. 神经纤维瘤病在骨科中的表现及治疗[J]. *中华骨科杂志*, 2005, 25(4): 245-247.
- 朱锋, 邱勇, 王斌, 等. 神经纤维瘤病致营养不良性脊柱侧凸的影像学特征和临床意义[J]. *脊柱外科杂志*, 2003, 1(2): 68-71.
- Abdel-Wanis ME, Kawahara N. The role of neurofibromin and melatonin in pathogenesis of pseudarthrosis after spinal fusion for neurofibromatous scoliosis [J]. *Med Hypotheses*, 2002, 58(5): 395-398.
- Alwan S, Tredwell SJ, Friedman JM. Is osseous dysplasia a primary feature of neurofibromatosis 1 (NF1)[J]? *Clin Genet*, 2005, 67(5): 378-390.
- Farnum CE, Wilsman NJ. Converting a differentiation cascade into longitudinal growth: stereology and analysis of transgenic animals as tools for understanding growth plate function [J]. *Curr Opin Orthop*, 2001, 12(5): 428-433.
- Porter RW. The pathogenesis of idiopathic scoliosis: uncoupled neuro-osseous growth[J]? *Eur Spine J*, 2001, 10(6): 473-481.
- Enneking WF, Harrington P. Pathological changes in scoliosis [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1969, 51(1): 165-184.
- 马兆龙, 邱勇, 朱锋. 青少年特发性脊柱侧凸患者终板软骨的组织形态学研究 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2008, 18 (9): 660-664.
- Kolanczyk M, Kossler N, Kühnisch J, et al. Multiple roles for neurofibromin in skeletal development and growth [J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(8): 874-886.
- 陈晖, 邱勇, 王斌, 等. I 型神经纤维瘤病成骨细胞生物学特性的研究[J]. *中华骨科杂志*, 2006, 26(5): 327-331.
- Kim HA, Ling B, Ratner N. Nf1-deficient mouse Schwann cells are angiogenic and invasive and can be induced to hyperproliferate; reversion of some phenotypes by an inhibitor of farnesyl protein transferase [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(2): 862-872.
- Hiatt KK, Ingram DA, Zhang Y, et al. Neurofibromin GTPase-activating protein-related domains restore normal growth in Nf1-/- cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(10): 7240-7245.
- Chen H, Qiu Y, Chen L, et al. The expression of neurofibromin in human osteoblasts and chondrocytes [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2008, 38(1): 25-30.
- Kuorilehto T, Nissinen M, Koivunen J, et al. NF1 tumor suppressor protein and mRNA in skeletal tissues of developing and adult normal mouse and NF1-deficient embryos [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(6): 983-989.

(收稿日期: 2011-03-31 修回日期: 2011-05-04)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)