

文章编号: 1004-0374(2012)04-0354-08

Duchenne肌营养不良(DMD)发病机制及治疗研究进展

刘延波, 徐乃军*, 贾飞勇

(吉林大学第一医院二部儿科, 长春 130031)

摘要: Duchenne 肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 为 X 连锁、隐性、致死性遗传病, 其致病基因位于 X 染色体的 Xp21.1-3 区, 编码抗肌萎缩蛋白 dystrophin。随着对该病研究的不断深入, 人们从宏观到微观对 DMD 的再认识不断更新, 发现其发病涉及到从基因、胞膜缺陷, 到细胞的炎性机制, 以及纤维化及肌细胞再生等多个层面。就其细胞及亚细胞水平发病机制及治疗上的进展进行综述。

关键词: Duchenne 肌营养不良; 发病机制; 治疗; 抗肌萎缩蛋白

中图分类号: R746.2 **文献标志码:** A

The research progresses of Duchenne muscular dystrophy (DMD) in it's pathogenesis and therapy

LIU Yan-Bo, XU Nai-Jun, JIA Fei-Yong

(Department of Pediatrics, the First affiliated Hospital, Jilin University, Changchun 130031, China)

Abstract: Duchenne muscular dystrophy(DMA) is an X-linked, recessive, and lethal genetic disease, and the causative gene locates in the region of Xp21.1-3, which expresses dystrophin. As the researches go on, the recognition of this disease updates from macro to micro levels, which involves many aspects from gene, to defects of cell membrane, to cellular immune mediated mechanisms, and to fibrosis and regeneration of muscle cells, etc. This review mainly focuses on the cellular and subcellular research progresses of DMD in it's pathogenesis and therapy.

Key words: Duchenne muscular dystrophy; pathogenesis; therapy; dystrophin

Duchenne肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是常见的致死性小儿神经肌肉病, 呈X连锁隐性遗传, 由DMD基因突变所致。DMD患者一般在20岁左右因心力衰竭/呼吸衰竭而死亡。患儿常于儿童期起病, 由于起病隐匿, 早期容易漏诊及误诊。

目前对DMD的基因诊断水平已日臻完善, 但治疗上, 除肾上腺糖皮质激素经循证医学被证实可延缓病程而正式应用于临床外^[1], 尚无其他有效治疗手段。但随着对该病发病机制认识的不断深入, 以及一些针对性的临床治疗实践的开展^[2-3], 人们在DMD治疗上看到了越来越多的希望。

1 针对DMD基因

1.1 致病机制

1985年, Kunkel研究小组将抗肌萎缩蛋白基

因(DMD基因)定位于Xp21, 其基因组跨度为2.4 Mb, 是目前已发现的人类最大基因。含有79个外显子和78个内含子, cDNA长14 kb, 编码3 685个氨基酸, 组成相对分子质量为 4.27×10^5 的抗肌萎缩蛋白(dystrophin)。DMD基因结构相当复杂, 至少包括8个独立的、组织特异性的启动子和2个PolyA加尾位点。

DMD基因突变率高, 约为1/10 000, 且突变形式多样, 包括缺失、重复、点突变及常规方法检测不到的基因片段缺失或重复^[4]。其中外显子缺失最常见, 占55%~65%; 点突变占25%左右; 重复

收稿日期: 2011-12-08; 修回日期: 2012-02-21

*通信作者: E-mail: najunxu2009@163.com; Tel: 0431-84808137

占8%左右。DMD患者约有1/3患者系新的突变引起^[5]。

DMD基因编码的dystrophin位于肌膜下胞质内,通过连接肌动蛋白及与之相关的跨膜糖蛋白形成复合物DAPC(dystrophin-associated protein complex)而发挥分子桥作用^[6],其缺乏至少导致两个结果,即肌细胞在离心性收缩时会被机械力破坏,以及对机械力敏感的离子通道失调。肌细胞膜因无法保持完整,出现异常蛋白和钙内流、肌酸激酶外流等,最终造成肌细胞变性、坏死。

dystrophin蛋白主要分为4个功能区:N端肌动蛋白连接区、杆状区、半胱氨酸富集区及C端选择性剪切区。研究表明,并不是DMD片段缺失越大,临床表现越重。如编码杆状区的基因即使缺失大部分重复序列,剩余的不完整蛋白仍可发挥大部分功能,患者临床表现可以很轻;与之相反,半胱氨酸富集区突变则会严重影响dystrophin功能;而N端和C端对于dystrophin蛋白的功能也不是必需的,故缺失的类型决定其表型是病情较重的DMD或病情较温和的Becker型肌营养不良(BMD)。

1.2 治疗进展

DMD发病直接根源于其DMD基因的缺陷,故如果能从基因水平纠正这一缺陷,则DMD有望得到根治。为此,科学家们在这一领域正进行着不懈的尝试,如传统的DMD基因的导入可通过干细胞移植、病毒载体及非病毒载体实现,而近年来新兴的一些基因治疗方法如外显子跳跃(exon skipping)^[2]、终止密码子通读(stop codon read-through)等^[3]也已进入临床试验阶段,是非常有希望的治疗方法。

1.2.1 干细胞移植

干细胞移植是试图将含有正常DMD基因的干细胞直接导入患者体内,进而获得dystrophin表达及疗效的治疗方法。目前研究较为深入的有成肌细胞移植、血管诱导产生的干细胞移植及间质干细胞移植等。

成肌细胞移植(myoblast transfer therapy, MTT):在1987年,Partridge等^[7]首先提出将MTT作为DMD基因治疗的策略之一,通过C57BL/10ScSn-*Dmd*^{mdx}模型小鼠实验,证实移植的成肌细胞可与宿主的肌纤维细胞融合,进而表达正常的DMD,纠正了肌纤维的变性、坏死等改变。但该方法在临床治疗时存在诸多问题,如转移细胞死亡率高,肌力改善轻微,而远期效果不明显。将MTT和基因导入联合,通过体外修饰自身成肌细胞,纠正DMD缺失后,再

回输体内,可避免免疫干扰,增加成功率;该类方法随着基因学手段的进步正在不断得到改善^[8]。

血管诱导产生的干细胞(vessel-associated stem cells, mesoangioblasts)移植:实验证实,此类干细胞可在血管内产生一些白细胞用于穿越血管壁的特殊蛋白,使之进入间充质组织中与肌膜融合,形成新的肌纤维^[9]。但在一些动物实验中,对于实验结果的相关性问题尚存争议,有待进一步验证^[10-11]。

间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)移植:又称为骨髓基质细胞,是一种具有多种分化潜能的成体干细胞。采用体外培养传3代以上的MSC均一性好,静脉移植免疫反应低,经尾静脉移植5代MSC至基因双敲除(*dko*)鼠,5~20周*dko*小鼠肌膜组织DMD/*utrn*免疫荧光强度随时间递增,15周左右肌膜荧光带光密度有显著差异,证实该途径导入并表达DMD/*utrn*基因的可行性^[12]。

干细胞移植虽理论上可行,目前还存在诸多障碍。比如DMD为全身性肌萎缩,而大面积局部注射难以实行;患者主要死因为心肺衰竭,但不能行局部注射治疗。杨晓凤等^[13]对31例DMD患者行骨髓及脐血间充质干细胞联合治疗研究表明,此法仅适合轻中度肌萎缩患者,而对肌容极度减少者疗效甚微,且远期疗效不明。因而干细胞移植治疗中还存在很多需要同时解决的难点,如给药途径、适合病例选择、移植后细胞成活率等。

1.2.2 外显子跳跃

DMD基因缺失突变有移码突变和整码突变两种类型。移码突变破坏了开放阅读框从而导致重要的抗肌萎缩蛋白不能产生,引起DMD;而整码突变不破坏开放阅读框,可以产生缩短的、有一定功能的抗肌萎缩蛋白,导致临床症状较轻的BMD。因此,采用外显子跳跃剪接技术,将DMD患儿的移码突变类型修改为整码突变类型,就有可能将症状较重的DMD转变为症状较轻的BMD。导致DMD最常见的缺失都群集在“热点区域”,即43~53号外显子缺失,如最常见的DMD基因的45~50、48~50、50、52及52~63号外显子缺失,都可通过跳跃51号外显子转变为整码突变,因整码突变不破坏阅读框因而翻译出截短的但有部分功能的dystrophin蛋白。

目前,针对外显子51已有2种生物制剂PRO-051和AVI-4658进入III期临床试验阶段^[2],结果证实肌肉局部注射或静脉注射治疗均可发生外显子跳跃作用,肌肉活检可见dystrophin在mRNA和蛋

白质水平均有显著增加。该方法无需特殊载体或辅助用药, 致癌、免疫激活等副作用相对少, 安全性好; 但缺点是只能针对特定基因缺陷类型, 且寡核苷酸进入细胞膜能效低, 可能有免疫原性。

1.2.3 终止密码子通读

约 5%~15% DMD 患者发病缘于其 DMD 基因发生无义突变, 产生错误的终止子, 使蛋白质翻译提前终止而致病。研究发现, 氨基糖甙类抗生素——庆大霉素能够在 dystrophin 翻译的过程中降低核糖体识别非正常终止子的能力, 跳过这些异常终止子继续翻译。这一结果在 mdx 小鼠动物实验中也取得明显疗效, 在横纹肌细胞膜下发现了有功能的 dystrophin 蛋白。在对 26 例 DMD 患者临床对照试验中观察到, 肌肉活检 dystrophin 蛋白水平显著上升, 血清激酶水平也明显下降, 证实在人体同样有效。但庆大霉素通读能效较低, 且长期大量应用存在较大毒副作用。为此, 研究者广泛筛查了约 80 万种化合物, 最后选出一种名为 PTC124 (ataluren) 的有机化合物, 并在 DMD 患者肌细胞和 mdx 小鼠体外实验中证实了其效能优于庆大霉素; 在健康人体临床试验中, PTC124 口服吸收良好, 无明显不良反应^[14]。在 DMD 患者 II 期临床试验中, 也观察到 dystrophin 表达增多, 肌酶下降, 以及肌肉功能改善, 且均未发生药物相关的严重副作用及试验终止。但此疗法也存在缺点, 即只针对无义突变, 以及药物可能存在短期或长期副作用。

1.2.4 病毒导入剪裁后的minidystrophin基因

该方法采用免疫原性较小的腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV), 导入人工剪裁后去除大部分杆状区序列和 C 端序列的 minidystrophin 基因^[15], 在 mdx 小鼠实验中取得良好治疗效果, 并已进入 I 期临床试验, 未发现严重不良反应。该方法优点在于对 DMD 基因缺陷类型无选择性, 但也存在病毒载体固有的风险, 且因载量有限, 表达的 minidystrophin 功能存在不足, 仍可遗有轻的临床症状。

以上旨在导入外源或恢复内源性 dystrophin 蛋白表达的治疗方法面临共同的问题: 患者的免疫监控对新生成的 dystrophin 蛋白可能产生特异性抗体, 进而引发自身免疫病^[16]。

此外, 还有针对上调与 dystrophin 蛋白高度同源的 utrophin A 基因表达的研究, 以替代 dystrophin 的部分功能^[17], 但筛选出合适的药物仍是关键; 其治疗优势在于 utrophin 蛋白体内已知, 可避免免疫反应, 但在生物学特性上可能与 dystrophin 还存在

差异, 以及过度上调可能带来一些无法预测的不良生物学效应。

2 针对细胞及细胞因子介导的炎性机制

2.1 致病机制

在 DMD 发病中, 尽管机械损害及胞膜缺陷是重要的内因, 二者均不能充分解释 DMD 的发病及进展。有研究发现, DAPC 缺失, 进而引发炎症调控信号瀑布的异常, 是 DMD 患者及 mdx 小鼠模型肌肉损害的主因。在 DMD 早期阶段, 一些炎症基因 (如细胞因子、趋化因子及主要组织相容抗原 MHC) 表达上调, 并伴随有炎症细胞的浸润 (如 T 淋巴细胞和巨噬细胞), 进而在肌萎缩的进展中发挥关键作用^[18-19]。因此, 在发病前予以免疫抑制治疗能够显著钝化肌肉萎缩就不足为奇了^[20-21]。

2.1.1 炎症细胞浸润

在患肌内, T 淋巴细胞和巨噬细胞是最主要的浸润细胞。在炎症刺激下, 巨噬细胞可通过产生 NO 进而裂解肌纤维, 还可以通过吞噬及递呈抗原给 T 细胞而活化后者, CD4⁺T 细胞将炎症刺激因子 (如细胞因子) 传递给 CD8⁺T 细胞及其他免疫细胞, 而后 CD8⁺T 细胞触发肌细胞的死亡。研究还发现, 正常肌细胞表面极少测到 MHC-I 类抗原, 而 DMD 肌细胞可有 3 倍的 MHC-I 类抗原升高 (可以早至 6 月大就可检测出); 无论形态正常、坏死的及再生的或被炎症细胞侵及的肌纤维, 均可观察到 MHC-I 类抗原。以上提示免疫机制可能通过锚的与胞膜 MHC-I 类抗原结合的特异的相关抗原而致病, 尽管这些抗原还未知。

此外, 中性粒细胞、嗜酸粒细胞及肥大细胞也被认为在肌萎缩中发挥了作用。

中性粒细胞是最早浸润肌肉的细胞类型之一, 早至生后 2 周, 在 mdx 小鼠就可观察到成群的中性粒细胞, 并可通过超氧化产物介导肌肉损害及胞膜裂解。在生后 19 d 以抗体清除中性粒细胞可显著减少 21 d 时肌肉坏死及之后 28 d 时的再生^[22]。

在 mdx 小鼠生后 4 周时, 嗜酸粒细胞在股四头肌浓集可达 20 倍升高, 电镜显示 mdx 小鼠后肢肌肉内嗜酸粒细胞在肌纤维的基膜浸润, 并且离坏死纤维表面很近; 嗜酸粒细胞包含的囊泡内有棒状包涵体, 内含主要碱性蛋白 (MBP), 后者平行于非病理性肌细胞的表面; 而临近病理肌细胞的嗜酸粒细胞内的 MBP 则垂直于肌表, 且似乎突出于肌膜。嗜酸粒细胞释放的 MBP 及其他阳离子蛋白在

靶细胞膜表形成孔道, 而导致细胞肿胀, 钙离子内流及胞质蛋白外泄。

肥大细胞在肌病时也参与了致病, 在成群的坏死肌组织中经常见到肥大细胞增殖及脱颗粒, 后者导致蛋白酶释放, 进而使附近的细胞膜裂解及局部小区域缺血。在发病前 (19 d) 给予 mdx 小鼠色苷酸钠治疗, 可使胫前肌损害降低 59%^[23]。

2.1.2 细胞因子激活

DMD 发病中, 可见许多与致炎及抗炎有关的趋化因子及细胞因子的表达上调。如单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) 在 2 岁之前就有表达上调^[24]。在 mdx 小鼠, TNF α 和 IL-1 β 在 16~60 d 也有表达的增加, 早于肌肉降解之前发生, 因此被认为参与了此病理过程。研究提示, 这些改变可能源于 NF- κ B 活性的改变, 而后者则缘于 DAPC 信号通路的障碍^[18,25]。由于 DAPC 信号通路不完整、钙离子内流以及活性氧产物 (ROS), 其细胞内的信号途径被持续激活, 肌细胞在受到机械力拉伤的同时, 也激活了转录因子 NF- κ B, 而后者则通过调控许多 (包括在免疫细胞及肌细胞内) 炎性基因的表达, 调控着细胞生与死的平衡。

MCP-1 被认为在肌肉再生及巨噬细胞趋化时发挥重要作用, 缺少会导致肌肉再生及力量恢复的受损^[26-27]。卫星细胞可通过释放 MCP-1 诱发巨噬细胞趋化, 而一旦巨噬细胞到达病灶就会扩大趋化及肌肉修复。因此, MCP-1 及巨噬细胞浸润虽是在尝试修复损伤, 却因为过多的巨噬细胞浸润而造成额外的肌损害。

IL-1 也参与了肌肉的炎症过程^[28], 因其对肌肉功能、蛋白质合成及代谢具有负性作用。研究显示, 极低浓度的 IL-1 β 就可以抑制胰岛素样生长因子-1(IGF-1) 诱发的蛋白质合成及成肌细胞分化作用, 而 IGF-1 还具有调节卫星细胞向损伤处聚集及平息炎症的重要作用。

TNF α 在肌病的许多免疫过程均有参与, 其大部分由巨噬细胞合成, 也可由肌细胞产生。肌细胞在其表面表达 TNF α 受体 I 和 II, 进而结合 TNF α 而激活胞内信号通路。TNF α /NFR1/NF- κ B 信号通路被认为可以增加 ROS 的产生及增加泛素蛋白酶体途径的活性, 而 ROS 也可调节 TNF α /NF- κ B 信号, 进而影响成熟肌细胞代谢过程 (如蛋白的丢失)。对生后 7 d 的 mdx 小鼠用 TNF α 中和抗体药物 Remicade 阻断其功能^[22,29], 可显著减少其 21 d 时肌纤维的坏死。与 mdx/TNF α ^{-/-} 小鼠相比发现, TNF α 似

乎还具有双相作用, 即在未分化肌细胞中促进再生及在成熟肌纤维中增加代谢作用。

此外, 在 DMD 患儿, 可见转化生长因子 β (TGF- β) 的表达增加。研究表明, 其作用除可导致纤维化疤痕进而影响肌肉的功能外, 还可以通过阻止增殖及下调 MHC-I 和 II 类抗原表达及炎性细胞因子的活性进而抑制免疫系统^[30]。

综上, 在 DMD 患者及 mdx 小鼠, 炎症在肌肉病变中占有重要作用, 尽管炎症是修复过程的必要部分, 同时也会导致损伤的发生。

2.2 治疗进展

DMD 治疗中, 糖皮质激素因其抗炎作用在治疗 DMD 中取得了一定的成功而应用最多, 但其副作用常常超出其益处。因而许多抗炎治疗方法相继出现, 如免疫抑制剂、干细胞移植、抗细胞因子药物及 NF- κ B 活性抑制剂等。

Kirschner 等^[31] 的最近一项应用免疫抑制剂环孢素 A 的随机、双盲的临床对照试验研究显示, 该药单独或联合强的松治疗对 DMD 轮椅依赖儿的肌力或功能没有改善作用, 但安全性及耐受良好。而同期 Wissing 等^[32] 另一项动物实验却发现, 亲环素抑制剂 Debio-025 在减轻 mdx 小鼠肌肉病理损害上要优于强的松。分析其矛盾原因, 因前者病例选择上均为 5 岁及以上患儿, 此时患儿可能已发生较明显的肌肉萎缩及纤维增生, 是否因错过了炎症发生早期的干预时机而导致结果不理想, 或还存在其他机制, 还需进一步研究证实。

近期研究揭示, 某些类型的干细胞具有强烈抑制免疫反应的能力, 如间质干细胞、造血干细胞及胎盘来源的多能干细胞在用于自身免疫病时就表现出免疫抑制或免疫调节的特性^[33]。因此, 研究移植治疗时干细胞与患者自体免疫细胞间的相互作用, 将为移植治疗的成功开辟道路。

针对致炎的细胞因子, 目前已有几种应用于患者的抗细胞因子药物, 如 Remicade 及 Enbrel, 已经被用来通过阻断 TNF α ^[12,29] 来治疗类风湿性关节炎及克隆病。因为 TNF α 可以抑制肌肉的收缩并诱发肌萎缩, 所以逻辑上讲, 对 DMD 患者阻断这一因子不失为一种治疗上的选择; 动物实验也证实其能够减轻肌肉的病变。IL-1 受体拮抗剂 Anakinra 已经用于类风湿性关节炎及其他炎性疾患的治疗^[34], 因而也具有治疗 DMD 的潜能。其他一些新型药物, 如 MCP-1 阻滞剂^[35] (Bindarit) 及 TGF- β 拮抗剂, 也已在初始评估阶段。

针对 NF- κ B 途径,目前前沿研究热点集中在蛋白酶抑制剂局部注射^[36]、黄酮类提取物^[37]、NF- κ B 必需调节结合域多肽 (NBD peptide)^[38]、AAV 介导的 shRNA 微基因沉默技术^[39],以及针对脂质过氧化来抑制 NF- κ B 途径的活化等方面。比如,通过 AAV 介导的 shRNA 微基因沉默技术,可以抑制 NF- κ B 途径重要亚单位蛋白 p65 的 mRNA 表达,进而达到抑制 NF- κ B 途径活化的目的。在 mdx 小鼠实验表明,治疗后 1 个月, NF- κ B/p65 水平较对照显著性降低,同时伴有肌细胞坏死减少。此外,某些具有抑制 NF- κ B 活化的成分,比如姜黄素 (curcumin),一种来源于生姜的提取物成分,同时具有抗氧化及调节 NF- κ B 活化的能力^[40]。腹腔注射姜黄素可以促进肌膜完整性并改善肌力,而且免疫组化还显示肌纤维的结构性损害减轻,伴之以血清的肌酸激酶降低,以及血清 TNF α 、IL-1 β 及可诱导性 NO 合成酶 (iNOS) 水平也降低。另一种来源于绿茶的提取物 EGCG (epigallocatechin gallate) 也有类似功能^[41],其改善肌力及肌肉病变的功能已在 mdx 小鼠实验中得到验证,而在人体尚无报道。另外,一些抗氧化剂如 PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) 及 NAC (N-acetylcysteine) 也已经用于治疗人类疾患,其也可阻抑 NF- κ B 的激活^[42]。在 mdx 小鼠实验中证实,其均有显著改善肌力的作用,组织病理也显示肌坏死减少,再生增加。

3 针对纤维化

3.1 致病机制

在 DMD 患儿, TGF- β 的过表达在 6 月龄后就已见到,而在此过程中, T 细胞起了重要作用。研究提示 T 淋巴细胞及巨噬细胞是 TGF- β 1 的主要来源,这些细胞在疾病早期活化对炎症及纤维化起了重要作用。去除 mdx 小鼠 T 及 B 细胞后可见 TGF- β 1 表达及肌间纤维化显著减少,而以抗体去除 TGF- β 1 则导致 12 周龄鼠结缔组织显著减少到接近正常水平。可见,疾病早期 TGF- β 1 的表达可能是一种免疫反应抑制机制,但最终却导致了肌纤维化的发生。

究其原因,可能为 DAPC 缺陷导致胞膜通透性增加,钙离子内流及蛋白酶激活进而导致肌纤维坏死和降解;进而激发了炎症反应来促进修复,但这种遗传上的缺陷导致慢性的炎症,出现促纤维化细胞因子的持续产生及胞外基质 (ECM) 蛋白的过度合成和沉积。

ECM 蛋白主要由活化的组织成纤维细胞产生,而激活后者需要促纤维化的细胞因子参与,包括 TGF- β 1 及血小板源性生长因子 (PDGF) 等^[43]。纤维化主要由 TGF- β 1 亚型调控,此因子通过自分泌及旁分泌方式及跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体(包含 3 种: T β RI~III) 信号途径发挥作用。TGF- β 直接与异源二聚体受体的 T β RII 结合,通过磷酸化允许 T β RII 激活 T β RI,后者促进下游的 Smad 蛋白磷酸化,导致 Smad 复合体移位进入胞核;在胞核内, Smad 复合体通过序列特异方式与 DNA 结合,进而调节许多目标基因的转录,其中就包含促纤维化基因。TGF- β 刺激基质蛋白合成及胞外沉积,减少基质降解蛋白酶的合成,并调节胞膜表面 ECM 受体的表达。

3.2 治疗进展

纤维化是 DMD 患者肌肉活检所见的一种显著病理特征,其可导致肌肉功能的紊乱并最终致命;而抗纤维化治疗则不仅可提高肌肉功能,还可促进肌再生、基因导入及干细胞的定植效能,成为将来基因及细胞治疗的必要补充。近期在 mdx 小鼠实验中,测试了几种针对纤维化的药物,结果表明其可以改善肌肉功能及肌损害的表型。

研究发现,一种小分子富含亮氨酸的糖蛋白 decorin^[44] 可以结合 TGF- β 并抑制其活性,在 mdx 小鼠腹腔注射 decorin 可减少其膈肌 I 型胶原 mRNA 的表达;同时也可阻止受伤的骨骼肌内成肌细胞向纤维细胞的转化。Andreotta 等^[45] 通过腹腔注射 TGF- β 1 中和抗体,观察到 mdx 小鼠膈肌纤维化显著减少伴随 TGF- β 1 mRNA 及其蛋白表达的减少,而对肌肉降解和再生则无明显影响。然而,该试验却观察到 CD4⁺T 细胞的增多,提示长期抑制 TGF- β 的方法治疗需要权衡其对纤维化和炎症影响的综合效果。

Losartan 作为血管紧张素 II 的 I 型受体拮抗剂,也具有抑制 TGF- β 信号的功能。Cohn 等^[46] 给 mdx 小鼠口服 Losartan,从 7 周至 9 个月,结果显示可显著减少膈肌纤维化,且无明显副作用。

其他可抑制 TGF- β 途径的药物还有 Halofuginone、ancrod 等。

研究发现,在许多实验鼠模型,如肺纤维化、肝硬化及肾硬化等,通过阻止 c-abl 及 PDGF 信号途径也可减少纤维化的发生。Imatinib 作为一种抗肿瘤药物,可以选择性竞争抑制几种酪氨酸激酶的 ATP 结合位点,包括 c-abl、c-kit 及 PDGF 受体^[47]。

自8~14周, 予mdx小鼠每日腹腔注射Imatinib, 可以显著减少骨骼肌坏死、炎症及膈肌纤维化, 并可以提高肌肉的功能。

此外, 因嗜酸粒细胞源性MBP-1可促进mdx鼠膈肌的纤维化, 因而其也成为DMD患者抗纤维化的靶标^[48]。最近, Vetrone等^[49]发现, 多细胞源性分泌的骨桥素(osteopontin)也可通过调节细胞亚群类型及肌内的TGF- β 进而促进纤维化的发生。

综上所述, TGF- β 在肌肉纤维化中起到了关键作用, 锚定TGF- β 及其他致纤维化因子如PDGF可能成为DMD治疗的一个有效途径。

4 针对肌细胞再生

4.1 致病机制

如前所述, DMD发病中, 因基因水平的缺陷无可逆转, 机体无法通过肌细胞再生代偿来修复损伤, 所以逐渐导致骨骼肌、心肌等部位大量纤维化的晚期改变, 最终因严重影响患儿心肺功能而致命。研究表明, 肌细胞再生涉及细胞及细胞因子水平的调节。

最近在mdx小鼠发现, 巨噬细胞存在两个亚群M1及M2, 可能通过其比例来影响肌肉的退化及再生^[50]。其中, M1亚群通过iNOS依赖机制产生致炎及裂解肌细胞的作用, 而M2亚群则通过诱导卫星细胞增殖来促进肌肉再生。而细胞因子在调控巨噬细胞的这两个亚群中发挥了重要作用, TNF α 和IFN γ 激活M1中的iNOS表达, IL-4和IL-10则可减少iNOS表达及促进M2活化。尽管在肌肉中存在促进再生的M2亚群, 由于抗体介导的巨噬细胞的消耗, 自出生后6d持续至4周, 可导致超过75%的肌肉受损。

研究发现, 某些细胞因子, 如IGF-1、丝氨酸蛋白酶抑制剂(BBIC)等^[51], 可以促进肌肉的再生及蛋白质的合成。在14月龄mdx小鼠外源性表达IGF-1可以显著增加肌容并减少膈肌纤维化; 而给mdx小鼠喂服1%BBIC可以增加肌容、肌力及其完整性, 更重要的是, 还可显著减少肌肉对收缩拉伤的易感性。

Li等^[52]发现, 作为TGF- β 家族的成员之一, Myostatin可以负性调节骨骼肌的生长, 直接结合成纤维细胞表达的受体(activin receptor IIB)而促进成纤维细胞增殖, 还通过激活Smad、p38MAPK和Akt途径刺激成纤维细胞内ECM蛋白的合成。Myostatin缺乏时, 可导致肌容、肌纤维直径及肌力

增加, 肌肉再生改善, 而膈肌纤维化减轻; 其缺乏时抑制纤维化的作用, 不仅通过促进肌再生, 还通过抑制肌内成纤维细胞生长及其功能来实现, 因而其也成为促进肌再生治疗的靶点^[53]。

4.2 治疗进展

目前, 针对肌细胞再生研究最多的就是异体或自体干细胞移植; 而对于将来很可能应用于临床的一些新的基因修改治疗策略, 如外显子跳跃及终止密码子通读等, 其成功后也可能伴随一些后续的障碍, 如可能出现的自体免疫问题、dystrophin改变后的自体肌细胞存活问题等, 其相关研究还很少见。

因此, 未来也应侧重于找寻可以促进肌细胞再生的细胞因子, 或抑制肌细胞再生因子拮抗剂, 以及开展促进M1向M2亚群转变的研究。

5 展望

DMD虽然是一个遗传病因已经研究得很明确的疾病, 但其发病在生后早期即已发生, 是一个逐渐进展的过程, 其发病机制涉及到基因、细胞及细胞因子等诸多层面, 且目前在早期诊断及相关治疗上还存在很多障碍。患儿从发病到确诊可能存在较大的时间差, 使患儿错过必要的早期干预治疗时机, 病情进展到较难控制直至不可逆转的地步。所以, 做好初生, 甚至产前筛查, 争取早确诊、早干预, 建好病儿档案, 从疾病发展时间链上的各个重要环节入手, 根据患儿不同阶段病情特点选择适合的病例开展近年来国际上有所突破的临床试验, 进一步加强国内外交流与合作, 才能最终为该病的彻底治愈带来希望。

[参 考 文 献]

- [1] Moxley RT 3rd, Pandya S, Ciafaloni E, et al. Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J Child Neurol*, 2010, 25(9): 1116-29
- [2] Kinali M, Arechavala-Gomez V, Feng L, et al. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol*, 2009, 8(10): 918-28
- [3] Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 2007, 447(7140): 87-91
- [4] 申本昌, 张成, 黄文, 等. 非缺失/重复型Duchenne肌营养不良症患者的致病点突变分析. *中华医学遗传学杂志*, 2006, 23(4): 392-6
- [5] 吴志英, 陈雪娇. 肌营养不良分子遗传学研究现状和对

- 策. 中华神经科杂志, 2010, 43: 313-6
- [6] 肖楠, 苏玉虹. 杜氏肌营养不良(DMD)及其动物模型研究进展. 生命科学, 2007, 19(4): 438-45
- [7] Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, et al. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to-positive by injection of normal myoblasts. *Nature*, 1989, 337(6203): 176-9
- [8] Skuk D, Goulet M, Roy B, et al. Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006, 65(4): 371-86
- [9] Galvez BG, Sampaolesi M, Brunelli S, et al. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol*, 2006, 174(2): 231-43
- [10] Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*, 2006, 444(7119): 574-9
- [11] Davies KE, Grounds MD. Treating muscular dystrophy with stem cells? *Cell*, 2006, 127(7): 1304-6
- [12] 李中, 张成, 谢有梅, 等. 骨髓间质干细胞移植治疗DMD模型鼠的肌组织dystrophin/utrophin表达. 中国医学科学院学报, 2004, 26(31): 294-7
- [13] 杨晓凤, 许忆峰, 张轶斌, 等. 骨髓和脐血间充质干细胞联合移植治疗杜氏型肌营养不良. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(36): 7015-9
- [14] Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol*, 2007, 47(4): 430-44
- [15] Reay DP, Niizawa GA, Watchko JF, et al. Effect of NF- κ B inhibition on AAV9 minidystrophin gene transfer to the mdx mouse. *Mol Med*, 2012, doi: 10.2119/molmed.2011.00404. [Epub ahead of print]
- [16] Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, et al. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neural*, 2010, 67(6): 771-80
- [17] Sonnemann KJ, Heun-Johnson H, Turner AJ, et al. Functional substitution by TAT-utrophin in dystrophin-deficient mice. *PLoS Med*, 2009, 6(5): e1000083
- [18] Kumar A, Boriek AM. Mechanical stress activates the nuclear factor- κ B pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J*, 2003, 17(3): 386-96
- [19] Kumar A, Khandelwal N, Malya R, et al. Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers. *FASEB J*, 2004, 18(1): 102-13
- [20] St-Pierre SJ, Chakkalakal JV, Kolodziejczyk SM, et al. Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. *FASEB J*, 2004, 18(15): 1937-9
- [21] De Luca A, Nico B, Liantonio A, et al. A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine a in dystrophic mdx mice. *Am J Pathol*, 2005, 166(2): 477-89
- [22] Hodgetts S, Radley H, Davies M, et al. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF α function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord*, 2006, 16(9-10): 591-602
- [23] Radley HG, Grounds MD. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol Dis*, 2006, 23(2): 387-97
- [24] Pescatori M, Broccolini A, Minetti C, et al. Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *FASEB J*, 2007, 21(4): 1210-26
- [25] Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, et al. Interplay of IKK/NF- κ B signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*, 2007, 117(4): 889-901
- [26] Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, et al. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(3): 775-85
- [27] Shireman PK, Contreras-Shannon V, Reyes-Reyna SM, et al. MCP-1 parallels inflammatory and regenerative responses in ischemic muscle. *J Surg Res*, 2006, 134(1): 145-57
- [28] Dennis RA, Trappe TA, Simpson P, et al. Interleukin-1 polymorphisms are associated with the inflammatory response in human muscle to acute resistance exercise. *J Physiol*, 2004, 560(Pt 3): 617-26
- [29] Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNF α (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J*, 2004, 18(6): 676-82
- [30] Zhou L, Porter JD, Cheng G, et al. Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF- β 1, 2, 3 and T β RI, II, III in skeletal muscles of mdx mice. *Neuromuscul Disord*, 2006, 16(1): 32-8
- [31] Kirschner J, Schessl J, Schara U, et al. Treatment of Duchenne muscular dystrophy with ciclosporin A: a randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial. *Lancet Neurol*, 2010, 9(11): 1053-9
- [32] Wissing ER, Millay DP, Vuagniaux G, et al. Debio-025 is more effective than prednisone in reducing muscular pathology in mdx mice. *Neuromuscul Disord*, 2010, 20(11): 753-60
- [33] Palmieri B, Tremblay JP, Daniele L Past, present and future of myoblast transplantation in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Transplant*, 2010, 14(7): 813-9
- [34] Kalliolias GD, Liossis SN. The future of the IL-1 receptor antagonist anakinra: from rheumatoid arthritis to adult-onset Still's disease and systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, 17(3): 349-59
- [35] Mirolo M, Fabbri M, Sironi M, et al. Impact of the anti-inflammatory agent bindarit on the chemokine: selective inhibition of the monocyte chemotactic proteins. *Eur Cytokine Netw*, 2008, 19(3): 119-22
- [36] Bonuccelli G, Sotgia F, Capozza F, et al. Localized treatment with a novel FDA-approved proteasome inhibitor

- blocks the degradation of dystrophin and dystrophin-associated proteins in mdx mice. *Cell Cycle*, 2007, 6(10): 1242-8
- [37] Messina S, Bitto A, Aguenouz M, et al. Flavocoxid counteracts muscle necrosis and improves functional properties in mdx mice: a comparison study with methylprednisolone. *Exp Neurol*, 2009, 220(2): 349-58
- [38] Reay DP, Yang M, Watchko JF, et al. Systemic delivery of NEMO binding domain/IKK γ inhibitory peptide to young mdx mice improves dystrophic skeletal muscle histopathology. *Neurobiol Dis*, 2011, 43(3): 598-608
- [39] Yang Q, Tang Y, Imbrogno K, et al. AAV-based shRNA silencing of NF- κ B ameliorates muscle pathologies in mdx mice. *Gene Ther*, 2012, doi: 10.1038/gt.2011. 207. [Epub ahead of print]
- [40] Pan Y, Chen C, Shen Y, et al. Curcumin alleviates dystrophic muscle pathology in mdx mice. *Mol Cells*, 2008, 25(4): 531-7
- [41] Feng WY. Metabolism of green tea catechins: an overview. *Curr Drug Metab*, 2006, 7(7): 755-809
- [42] Sen CK, Roy S. Relief from a heavy heart: redox-sensitive NF- κ B as a therapeutic target in managing cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(1): H17-9
- [43] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008, 214(2):199-210
- [44] Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J*, 2002, 19(4-5): 249-55
- [45] Andreetta F, Bernasconi P, Baggi F, et al. Immunomodulation of TGF- β 1 in mdx mouse inhibits connective tissue proliferation in diaphragm but increases inflammatory response: implications for antifibrotic therapy. *J Neuroimmunol*, 2006, 175(1-2): 77-86
- [46] Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF- β -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med*, 2007, 13(2): 204-10
- [47] Druker BJ. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res*, 2004, 91: 1-30
- [48] Wehling-Henricks M, Sokolow S, Lee JJ, et al. Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(15): 2280-92
- [49] Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, et al. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF- β . *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1583-94
- [50] Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, et al. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(3): 482-96
- [51] Morris CA, Selsby JT, Morris LD, et al. Bowman-Birk inhibitor attenuates dystrophic pathology in mdx mice. *J Appl Physiol*, 2010, 109(5): 1492-9
- [52] Li ZB, Kollias HD, Wagner KR. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem*, 2008, 283(28): 19371-8
- [53] Kemaladewi DU, Hoogaars WM, van Heiningen SH, et al. Dual exon skipping in myostatin and dystrophin for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genomics*, 2011, 4: 36