

## · Duchenne 型肌营养不良症基础与临床研究 ·

# Duchenne 型肌营养不良症模型小鼠神经肌肉接头特征研究

朱瑜龄 孙毅明 张惠丽 张誉 李亚勤 陈孟龙 王惊 张成

**【摘要】** 目的 观察 Duchenne 型肌营养不良症模型小鼠骨骼肌肌膜抗肌萎缩蛋白(dystrophin)表达变化和神经肌肉接头形态,分析其可能机制。方法 C57BL/6 和 mdx 小鼠各 8 只,HE 染色观察肌细胞组织学形态,免疫荧光染色检测腓肠肌肌膜 dystrophin 蛋白表达变化和神经肌肉接头形态。结果 C57BL/6 小鼠腓肠肌肌细胞大小基本一致,呈多角形,胞核位于细胞周边、极少数位于肌纤维中心;肌膜均匀表达 dystrophin 蛋白;神经肌肉接头形态完好。Mdx 小鼠腓肠肌肌细胞大小不一致,呈圆形,部分胞核趋中心化;仅少量或个别肌细胞表达 dystrophin 蛋白;mdx 种鼠突触后膜乙酰胆碱受体断裂成小片段,突触前膜神经末梢突起增多、变细,而 mdx 幼鼠神经肌肉接头形态与 C57BL/6 小鼠基本一致;mdx 小鼠神经肌肉接头数目明显减少,突触前膜和突触后膜横截面积明显减小,肌细胞间神经轴突明显变细。结论 Mdx 小鼠骨骼肌肌膜 dystrophin 蛋白缺失并非导致神经肌肉接头改变的直接因素,可能与病情进展有关。

**【关键词】** 肌营养不良,杜氏; 肌营养不良蛋白; 神经肌肉接头; 疾病模型,动物

## Study on skeletal muscle dystrophin and neuromuscular junction in adult and young mdx mice

ZHU Yu-ling<sup>1</sup>, SUN Yi-ming<sup>2</sup>, ZHANG Hui-li<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>1</sup>, LI Ya-qin<sup>1</sup>, CHEN Meng-long<sup>1</sup>, WANG Liang<sup>1</sup>, ZHANG Cheng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, <sup>2</sup>Department of Health, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: ZHANG Cheng (Email: zhangch6@mail.sysu.edu.cn)

**【Abstract】 Objective** To observe the skeletal muscle dystrophin expression and neuromuscular junction (NMJ) morphology in adult and young mdx mice. **Methods** Select eight 8-week-old specific pathogen free (SPF) C57BL/6 mice, four 8-week-old adult mdx mice and four 2-week-old young mdx mice. Observe the histological features of myocytes by HE staining, and detect the expression changes of gastrocnemius muscle dystrophin and morphology of NMJ by immunofluorescent staining. **Results** The gastrocnemius muscle cells of C57BL/6 mice were almost uniform in size and polygonal. The nuclei were located in the peripheral of cells, while only a few were located in the center of myofiber. The sarcolemma expressed dystrophin uniformly and NMJ were intact. The gastrocnemius muscle cells of mdx mice were not consistent in size and had round shape. Part of nuclei were centralized. Only a few muscle cells expressed dystrophin. The acetylcholine receptor (AChR) on postsynaptic membrane of adult mdx mice were broken into small fragments, and the nerve terminal of presynaptic membrane had a great increase in the number of attenuated neurites. The morphology of NMJ in young mdx mice was similar to C57BL/6 mice. In both adult and young mdx mice, the number of NMJ had a great reduction, the cross-sectional area of presynaptic and postsynaptic membrane decreased obviously, and intercellular neural axons were

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2015.05.007

基金项目:国家自然科学基金-广东省联合基金重点资助项目(项目编号:U1032004);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81471280);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81271401);国家科技支撑计划项目(项目编号:2012BAI09B04);广东省科技计划项目(项目编号:2011A030400006)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院神经科(朱瑜龄、张惠丽、张誉、李亚勤、陈孟龙、王惊、张成),保健科(孙毅明)

通讯作者:张成(Email:zhangch6@mail.sysu.edu.cn)

thinned evidently. **Conclusions** The absence of dystrophin in mdx mice is not the direct factor causing NMJ abnormalities. The degeneration of muscle in the development of DMD may lead to the changes.

**【Key words】** Muscular dystrophy, Duchenne; Dystrophin; Neuromuscular junction; Disease models, animal

This study was supported by Joint Fund of National Natural Science Foundation of China and Natural Science Foundation of Guangdong Province of China (No. U1032004), National Natural Science Foundation of China (No. 81471280, 81271401), Supporting Program for Science and Technology Research of China (No. 2012BAI09B04) and Science and Technology Plan Project of Guangdong Province (No. 2011A030400006).

Duchenne 型肌营养不良症(DMD)是一种以进行性四肢近端肌萎缩和肌无力、腓肠肌假性肥大特征,同时累及心肌和呼吸肌,部分伴智力障碍的X连锁隐性遗传性疾病。致病原因是定位于Xp21.2-21.3的DMD基因突变致肌膜抗肌萎缩蛋白(dystrophin)缺失,使肌纤维断裂、变性、坏死<sup>[1-2]</sup>。神经肌肉接头(NMJ)是一种存在于脊髓运动神经元和肌纤维之间、控制肌肉收缩的胆碱能突触。为使神经末梢的神经递质得到有效释放,作为神经递质受体的乙酰胆碱受体(AChR)在突触后膜高度聚集,保证神经信号在运动神经元和肌纤维之间快速而有效转导<sup>[3]</sup>。因此,神经肌肉接头发育或维持异常均会影响肌肉活动,使肌肉易疲劳或无力。在本研究中,我们观察C57BL/6小鼠和mdx小鼠骨骼肌肌膜dystrophin蛋白表达变化和神经肌肉接头形态,分析其可能机制。

## 材料与方法

### 一、实验材料

1. 动物来源 无特定病原体(SPF)级C57BL/6小鼠8只,8周龄,体重为25~30g,由中山大学实验动物中心提供[许可证号:SYXK(粤)2012-0080]。8周龄mdx小鼠4只、体重为25~30g和2周龄mdx小鼠4只、体重为5~8g,系纯合子mdx种鼠[C57BL/10ScSn-DMD mdx,南京大学——南京生物医药研究院,许可证号:SCXK(苏)2010-0001]所生纯合子幼鼠,种鼠和幼鼠均于中山大学实验动物中心Ⅱ级动物室饲养,同时予消毒处理的洁净普通颗粒型饲料和水喂养,每周添加花生、葵花子、鸡蛋等营养饲料1~2次;繁殖期雌鼠予B族维生素。所有动物均于室温22~28℃、相对湿度40%~70%、12h昼-12h夜循环照明环境中饲养,每周更换垫料2次。

2. 药品与试剂 牛血清白蛋白(BSA)为瑞士Roche公司产品。封闭用正常山羊血清购自武汉博

士德生物工程有限公司。Triton-100 X液和4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)均由美国Sigma公司提供。银环蛇毒(BTX)为美国Life Technologies公司产品。冰冻切片OCT包埋剂由日本樱花株式会社提供。免疫试剂I抗工作液[包括兔抗小鼠神经微丝蛋白(NF)-200多克隆抗体(1:200)和兔抗小鼠dystrophin蛋白多克隆抗体(1:400)]购自美国Abcam公司。Alexa Flour 488标记的山羊抗兔IgGⅡ抗和Alexa Flour 555标记的山羊抗兔IgGⅡ抗(均1:1000)购自美国Cell Signaling Technology公司。

3. 仪器与设备 Leica VT1200S振荡切片机和Leica CM1950冰冻切片机为德国Leica公司产品。Olympus SZ61低倍解剖镜和Olympus BX51荧光显微镜由日本Olympus公司提供。Centrifuge 5417R低温离心机购自德国Eppendorf公司。

### 二、实验方法

1. 肌肉组织切片制备 小鼠断颈处死,取双侧腓肠肌。一侧腓肠肌迅速置-80℃冷冻,在-20℃以下的低温冰冻切片机上横向切取2~3mm肌肉组织,OCT包埋,制备层厚6μm的切片,室温干燥,冷丙酮固定10min,室温待丙酮挥发后,置-80℃保存备用。另一侧腓肠肌以质量分数为4%多聚甲醛溶液固定30min,置于振荡切片机切片槽内,沿肌纤维走行纵向切取层厚30~50μm的肌肉组织。行免疫荧光染色。

2. 聚合酶链反应 采集鼠尾血50~100μl,采用QIAamp DNA Blood Mini Kit(德国Qiagen公司)提取基因组DNA。上游引物序列:5'-GTGAAGGATGTCTTGAAG-3',下游引物序列:5'-TCAACTCCGAAAGAGATA-3',由美国Life Technologies公司合成。聚合酶链反应(PCR)体系:DNA模板1μl,上、下游引物各1μl,2×Taq PCR预混液12.50μl,加双蒸水至25μl。反应条件:预变性94℃3min、变性94℃30s、退火55.5℃30s、延

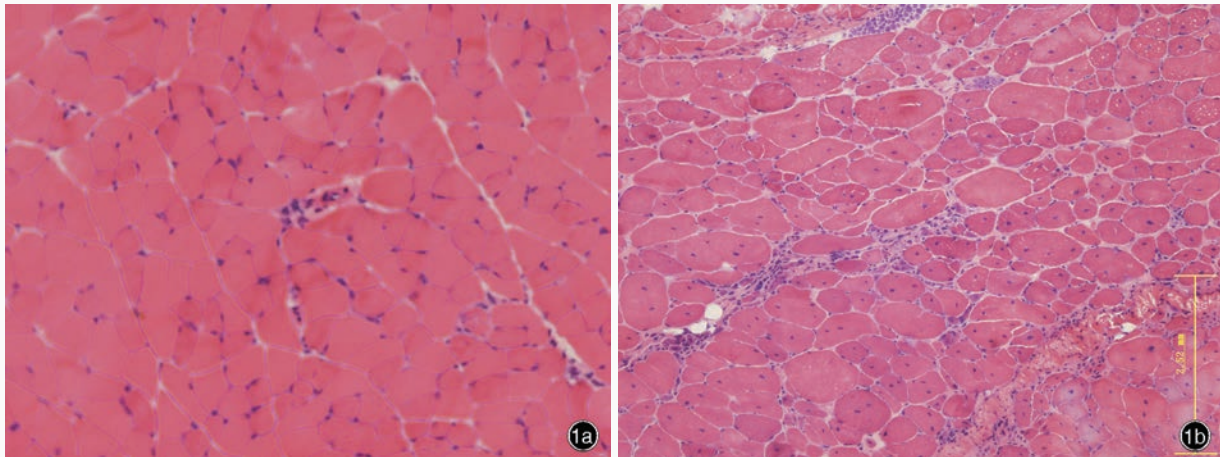


图 1 光学显微镜观察所见 HE 染色  $\times 200$  1a C57BL/6 小鼠腓肠肌肌细胞大小基本一致,呈多角形,胞核位于细胞周边,极少数位于肌纤维中心,间质无炎性细胞浸润 1b Mdx 小鼠腓肠肌肌细胞大小不一致,呈圆形,部分胞核趋中心化,可见大量炎性细胞浸润

**Figure 1** Optical microscopy findings. HE staining  $\times 200$  The gastrocnemius muscle cells of C57BL/6 mice were polygonal and uniform in size with ordered arrangement. Most nuclei of myocytes were located in the periphery, while a few were located in the center of myofiber. No inflammatory cells infiltration was observed (Panel 1a). Gastrocnemius muscle cells of mdx mice were round in shape and various in size. Part of nuclei were centralized. Inflammatory cells infiltration was observed (Panel 1b).

伸  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, 35 个循环,最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。质量分数为 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,电压 120 V。

3. 组织学形态观察 采集小鼠腓肠肌组织约  $1.00\text{ cm} \times 0.50\text{ cm} \times 0.50\text{ cm}$  大小,置预冷的异戊烷 30 s,浸入液氮冷冻, OCT 包埋,冰冻切片机制备层厚为  $6\text{ }\mu\text{m}$  的切片,行 HE 染色,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、干燥后树脂封片。光学显微镜观察骨骼肌细胞形态、排列方式、变性、坏死情况,以及肌束完整性等。

4. 免疫荧光染色检测 dystrophin 蛋白表达变化和神经肌肉接头形态 肌肉组织切片以质量分数为 5% 牛血清白蛋白封闭 30 min,滴加 I 抗工作液 [兔抗小鼠 NF-200 多克隆抗体 (1:200) 或兔抗小鼠 dystrophin 蛋白多克隆抗体 (1:400)],  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;磷酸盐缓冲液冲洗 5 min ( $\times 3$  次),滴加 II 抗 [Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG II 抗或 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗兔 IgG II 抗 (均 1:1000)] 和银环蛇毒,室温下避光孵育 1 h;磷酸盐缓冲液冲洗 5 min ( $\times 3$  次),滴加荧光衰减封片剂后,于荧光显微镜下观察。

## 结 果

### 一、Mdx 小鼠鉴定

PCR 显示,mdx 种鼠和幼鼠均出现 1 条 340 bp 的电泳条带,提示二者均存在 *utrophin* 基因。

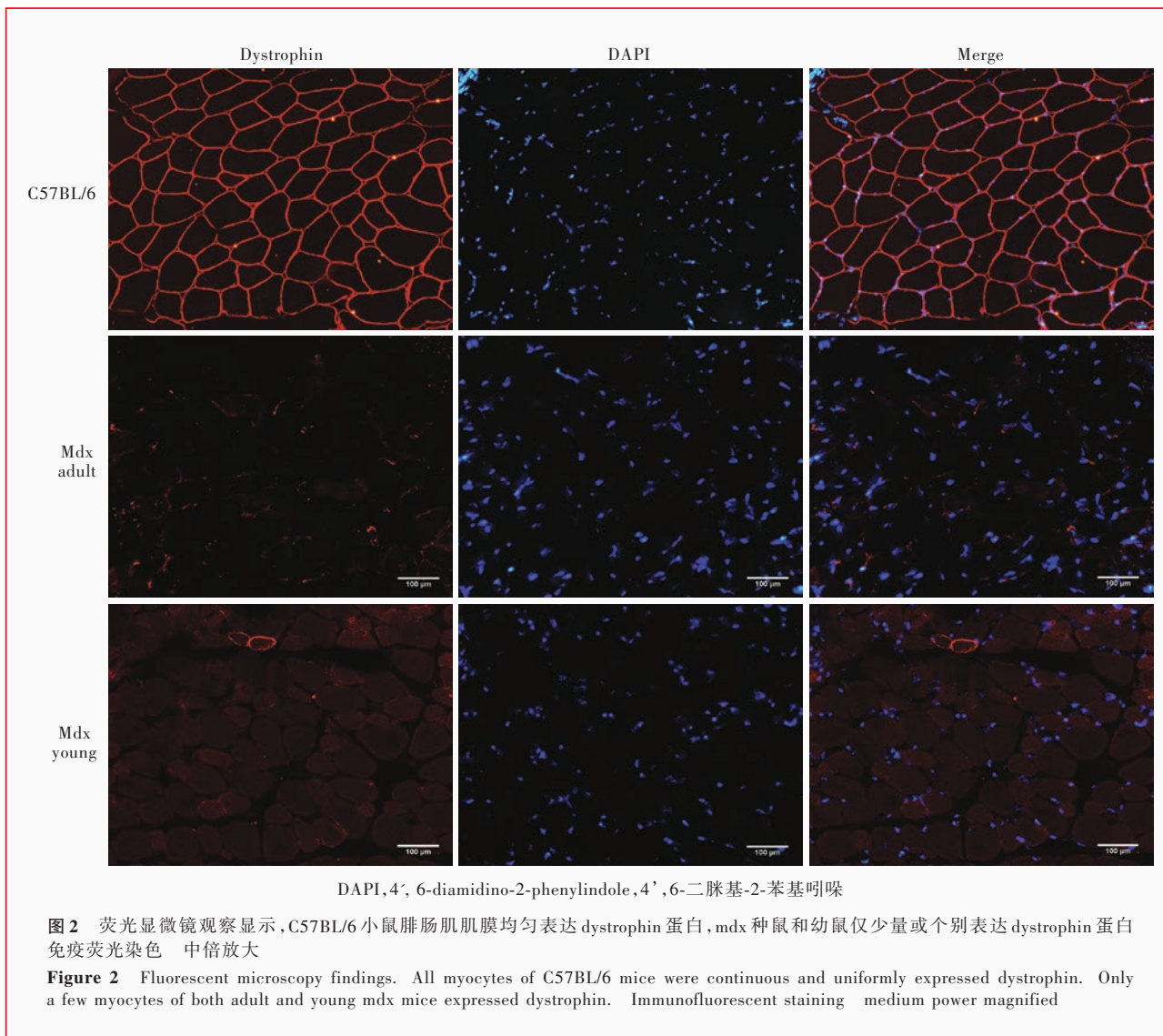
### 二、组织学形态观察

光学显微镜观察,C57BL/6 小鼠腓肠肌肌细胞大小基本一致,呈多角形,胞核位于细胞周边、极少数位于肌纤维中心,间质无炎性细胞浸润;mdx 小鼠腓肠肌肌细胞大小不一致,呈圆形,部分胞核趋中心化,可见大量炎性细胞浸润(图 1)。

三、免疫荧光染色检测 dystrophin 蛋白表达变化和神经肌肉接头形态

1. Dystrophin 蛋白表达变化 荧光显微镜观察,C57BL/6 小鼠腓肠肌肌膜均匀表达 dystrophin 蛋白;mdx 种鼠和幼鼠绝大多数腓肠肌肌膜不表达 dystrophin 蛋白,仅少量或个别肌细胞表达 dystrophin 蛋白(图 2)。

2. 神经肌肉接头形态 (1) 腓肠肌纵切面:荧光显微镜观察,C57BL/6 小鼠腓肠肌突触后膜 AChR 为连续网状结构,神经末梢形成多个“树枝”样突起伸入 AChR,其走行与 AChR 网状结构分布一致;mdx 幼鼠神经肌肉接头形态与 C57BL/6 小鼠基本一致,腓肠肌突触后膜 AChR 呈致密网状结构,有神经支配,神经末梢有 2~3 个突起伸入 AChR,边缘光滑、锐利,突起较粗大;mdx 种鼠腓肠肌突触后膜 AChR 网状结构断裂成小片段,突触前膜神经末梢突起增多、变细(图 3)。(2) 腓肠肌横切面:荧光显微镜观察,C57BL/6 小鼠腓肠肌肌膜外呈绿色圆点状结构者为周围神经轴突,其中呈绿色长条状或圆弧状结

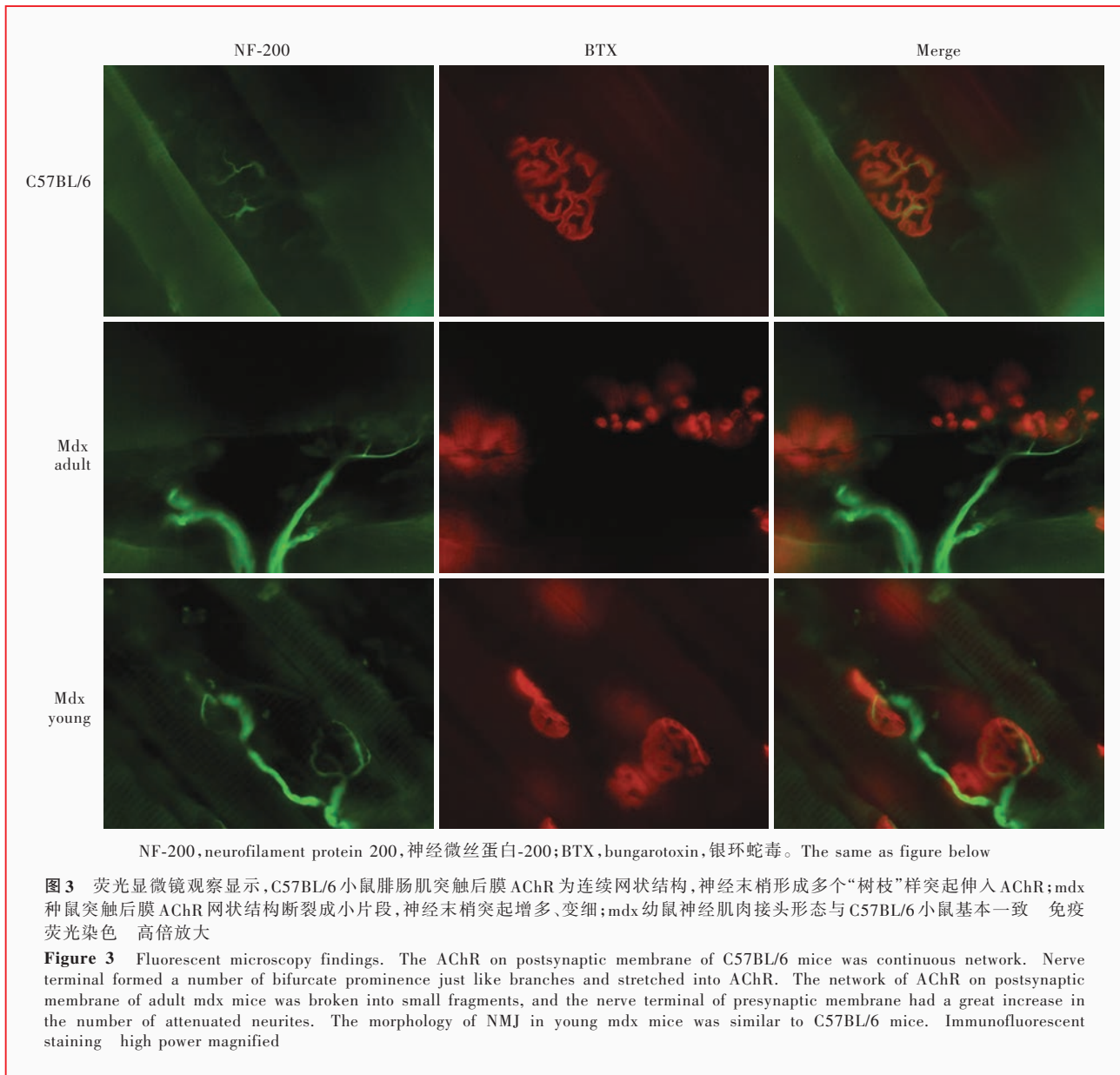


构者为突触前膜、呈红色长条状或圆弧状结构者为突触后膜,二者叠加后显示骨骼肌神经肌肉接头形态完好;mdx 种鼠和幼鼠腓肠肌神经肌肉接头数目均明显减少,突触前膜和突触后膜横截面积明显减小,形成圆点状结构,肌细胞间神经轴突明显变细(图 4)。

### 讨 论

目前,大多数关于 Duchenne 型肌营养不良症的研究均侧重各种干预措施对肌细胞病理学机制和再生机制的研究,而作为支配骨骼肌运动和收缩的神经肌肉接头变化易被忽视。有研究显示,mdx 小鼠神经肌肉接头存在结构重塑,但具体机制尚未阐明<sup>[4-6]</sup>。目前,主要有两种观点,一种认为是 dystrophin 蛋白缺失所致,另一种认为与肌肉病理改

变加重有关。Dystrophin 蛋白作为肌细胞重要骨架蛋白之一,具有细胞支架、抗牵拉、防止肌膜撕裂等重要作用。研究显示,dystrophin 蛋白在神经肌肉接头处的肌膜表达上调,提示 dystrophin 蛋白可能参与形成突触后膜上的某些成分<sup>[7]</sup>。Dmytrenko 等<sup>[8]</sup>和 Porter 等<sup>[9]</sup>于体外培养正常骨骼肌原代肌母细胞,结果显示,肌细胞 dystrophin 蛋白表达上调部位有 AChR 聚集,并可见其他细胞骨架蛋白,这些蛋白质按一定比例有序排列,每个 dystrophin 蛋白周围排列 5 个 AChR、5 个 Rapsyn、5 个  $\alpha$ -肌营养不良蛋白聚糖( $\alpha$ -DG)和 20~35 个  $\beta$ -膜收缩蛋白( $\beta$ -spectrin)。这种稳定而有序的排列方式进一步证实 dystrophin 蛋白是形成上述结构的关键。Kong 等<sup>[10]</sup>原代培养 mdx 小鼠和 C57BL/6 小鼠肌卫星细胞,结果显示,mdx 小鼠肌管自然产生和集聚蛋白(agrins)诱导产生



的 AChR 数目和大小均低于 C57BL/6 小鼠, 因此认为 dystrophin 蛋白的主要作用是将小片段 AChR 组成大片网状结构。Kong 等<sup>[4]</sup>比较 mdx 小鼠和 dko 小鼠骨骼肌神经肌肉接头形态和结构特点, 结果显示, 由于 dko 小鼠肌膜同时缺乏 dystrophin 蛋白和 Utrophin 蛋白, 病情更重、存活期更短; 尽管二者病情严重程度不同, 但神经肌肉接头形态和结构无明显差异, 故认为神经肌肉接头形态和结构改变主要与 dystrophin 蛋白缺失有关, 而与病情严重程度无关。多项动物实验结果显示, mdx 小鼠神经肌肉接头形态与 C57BL/6 小鼠明显不同, 并且肌肉损伤后可进一步加重神经肌肉接头变化<sup>[5-6]</sup>。Lyons 和 Slater<sup>[11]</sup>检测 8 周龄 mdx 小鼠膜终板电位和微终板

电位、微终板电位振幅和时间, 以及肌细胞 AChR 数目, 结果显示, 上述指标均与 8 周龄 C57BL/6 小鼠无明显差异, 故认为神经肌肉接头形态改变与肌膜 dystrophin 蛋白缺失无直接关系, 但肌细胞再生和坏死可以导致神经肌肉接头突触前膜和突触后膜部分结构重塑。

本研究结果显示, mdx 种鼠神经肌肉接头变化明显, 突触后膜 nAChR 断裂成小片段, 突触前膜神经末梢突起增多、变细且局部肿大形成球状或“串珠”样结构; 而 mdx 幼鼠未发现明显神经肌肉接头形态异常, 与 C57BL/6 小鼠基本一致。进一步检测 mdx 种鼠和幼鼠肌细胞 dystrophin 蛋白表达变化则无明显差异。因此认为, mdx 小鼠肌膜 dystrophin 蛋

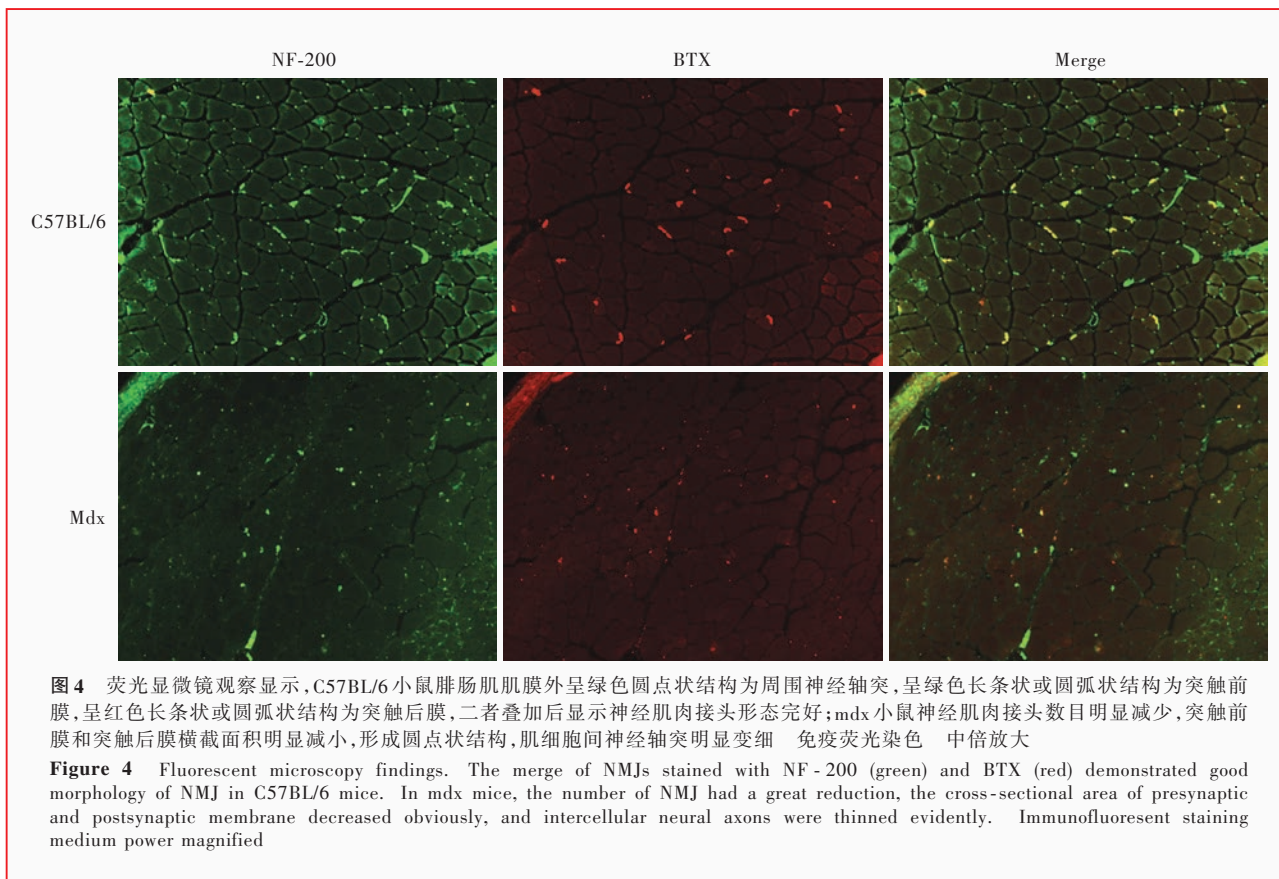


图 4 荧光显微镜观察显示, C57BL/6 小鼠腓肠肌肌膜外呈绿色圆点状结构为周围神经轴突, 呈绿色长条状或圆弧状结构为突触前膜, 呈红色长条状或圆弧状结构为突触后膜, 二者叠加后显示神经肌肉接头形态完好; mdx 小鼠神经肌肉接头数目明显减少, 突触前膜和突触后膜横截面积明显减小, 形成圆点状结构, 肌细胞间神经轴突明显变细 免疫荧光染色 中倍放大

Figure 4 Fluorescent microscopy findings. The merge of NMJs stained with NF-200 (green) and BTX (red) demonstrated good morphology of NMJ in C57BL/6 mice. In mdx mice, the number of NMJ had a great reduction, the cross-sectional area of presynaptic and postsynaptic membrane decreased obviously, and intercellular neural axons were thinned evidently. Immunofluorescent staining medium power magnified

白缺失并非导致神经肌肉接头改变的直接因素, 可能与病情进展有关。

#### 参 考 文 献

- [1] Emery AE. Duchenne muscular dystrophy. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1993: 1-10.
- [2] Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. Nat Genet, 1993, 3:283-291.
- [3] Sanes JR, Lichtman JW. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. Nat Rev Neurosci, 2001, 2:791-805.
- [4] Kong J, Yang L, Li Q, Cao J, Yang J, Chen F, Wang Y, Zhang C. The absence of dystrophin rather than muscle degeneration causes acetylcholine receptor cluster defects in dystrophic muscle. Neuroreport, 2012, 23:82-87.
- [5] Pratt SJ, Shah SB, Ward CW, Inacio MP, Stains JP, Lovering RM. Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. J Physiol, 2013, 591:559-570.
- [6] Pratt SJ, Shah SB, Ward CW, Kerr JP, Stains JP, Lovering RM. Recovery of altered neuromuscular junction morphology and muscle function in mdx mice after injury. Cell Mol Life Sci, 2015, 72:153-164.
- [7] Huard J, Fortier LP, Dansereau G, Labrecque C, Tremblay JP. A light and electron microscopic study of dystrophin localization at the mouse neuromuscular junction. Synapse, 1992, 10:83-93.
- [8] Dmytrenko GM, Pumplin DW, Bloch RJ. Dystrophin in a membrane skeletal network: localization and comparison to other proteins. J Neurosci, 1993, 13:547-558.
- [9] Porter GA, Dmytrenko GM, Winkelmann JC, Bloch RJ. Dystrophin colocalizes with beta - spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. J Cell Biol, 1992, 117:997-1005.
- [10] Kong J, Anderson JE. Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptor aggregates. Brain Res, 1999, 839: 298-304.
- [11] Lyons PR, Slater CR. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. J Neurocytol, 1991, 20:969-981.

(收稿日期: 2015-04-30)

下期内容预告 本刊 2015 年第 6 期报道专题为 Duchenne 型肌营养不良症临床研究, 重点内容包括: 加强我国 Duchenne 型肌营养不良症研究; Duchenne 型肌营养不良症运动功能评价及其临床应用研究进展; 针刺肌肉活检术及其应用; Duchenne 型肌营养不良症患儿大腿肌肉 T<sub>2</sub> mapping 成像研究; DMD 基因点突变致 Becker 型肌营养不良症临床研究; Duchenne 型肌营养不良症患儿肌膜抗肌萎缩蛋白-糖蛋白复合物表达研究; Duchenne 型肌营养不良症心脏损害与基因型相关分析; Duchenne 型肌营养不良症胚胎植入前遗传学诊断及随访研究