

· Duchenne 型肌营养不良症临床研究 ·

Duchenne 型肌营养不良患儿肌膜抗肌萎缩蛋白-糖蛋白复合物表达研究

赵蕾 胡超平 王艺 周水珍 施亿赞 李西华

【摘要】 研究背景 离心运动或高张力运动可以损伤骨骼肌结构,使抗肌萎缩蛋白(dystrophin)缺失,并继发性引起抗肌萎缩蛋白-糖蛋白复合物(DGC)缺乏,表明 dystrophin 蛋白表达下降是离心运动对骨骼肌损伤的关键标记之一。DMD 基因突变致 dystrophin 蛋白缺失继而导致 Duchenne 型肌营养不良症,表明 Duchenne 型肌营养不良患儿自出生起即处于骨骼肌离心运动所承载的高张力力量传递通路的自然状态。本研究探讨 Duchenne 型肌营养不良患儿骨骼肌功能进行性下降与 DGC 复合物表达水平之间的关系。方法 共 197 例 9 天至 12 岁 Duchenne 型肌营养不良患儿,采用免疫荧光染色观察肱二头肌肌膜 DGC 复合物中的肌营养不良蛋白聚糖(α -和 β -DG),肌聚糖蛋白(α -、 β -、 γ -和 δ -SG),互生蛋白(syntrophin)表达变化。结果 各年龄段 Duchenne 型肌营养不良患儿肌膜 α -和 β -DG, α -、 β -、 γ -和 δ -SG,syntrophin 蛋白均呈现不同程度缺乏,但与增龄伴随的肌力下降并无关联性。结论 DGC 复合物缺乏可能在出生前即已发生,建议 Duchenne 型肌营养不良患儿在日常生活活动和康复训练中避免离心运动和抗高阻力动作对骨骼肌的进一步损伤。

【关键词】 肌营养不良,杜氏; 肌营养不良蛋白相关蛋白复合物; 运动损伤

Expression of dystrophin-glycoprotein complex at the skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy

ZHAO Lei, HU Chao-ping, WANG Yi, ZHOU Shui-zhen, SHI Yi-yun, LI Xi-hua

Department of Neurology, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China

Corresponding author: LI Xi-hua (Email: xihual@vip.sina.com)

【Abstract】 **Background** Eccentric exercise or high tension exercise could cause damage to skeletal muscle structure, resulting in deficiency of dystrophin and secondary loss of dystrophin-glycoprotein complex (DGC) from the sarcolemma, which indicated that down-regulation of dystrophin was one of the key points of skeletal muscle injury from eccentric exercise. Duchenne muscular dystrophy (DMD) is caused by mutations of *DMD* gene, resulting in the absence of dystrophin, which means that skeletal muscles of DMD patients after birth are in the natural state of actual path of force transmission which carried high tension from eccentric exercise. This paper investigated systematically whether expression of DGC is associated with progressive muscle weakness in natural history of DMD, and analyzed the expression of DGC at the sarcolemma of 197 confirmed DMD cases (9 days–12 years old). **Methods** The expression of α - and β -dystroglycan (DG), α -, β -, γ - and δ -sarcoglycan (SG) and syntrophin at the sarcolemma of DMD patients was analyzed by immunofluorescent staining. **Results** The study showed that there was no relationship between lack of proteins and progressive muscle weakness with increasing age, although expression of α - and β -DG, α -, β -, γ - and δ -SG and syntrophin at the sarcolemma at different stages of 197 DMD patients (9 days–12 years old) had different degrees of deficiency. **Conclusions** Deficiency of DGC may occur before birth and DMD patients were recommended to avoid further damage to skeletal muscles from eccentric exercise and high-resistance movement in activities of daily life and rehabilitation training.

【Key words】 Muscular dystrophy, Duchenne; Dystrophin-associated protein complex; Athletic injuries

This study was supported by Scientific Research Plan Project of Shanghai Health Bureau (No. 210263).

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2015.06.006

基金项目:上海市卫生局科研计划项目(项目编号:210263)

作者单位:201102 上海,复旦大学附属儿科医院神经内科

通讯作者:李西华(Email:xihual@vip.sina.com)

抗肌萎缩蛋白(dystrophin)作为连接细胞外基质(ECM)和细胞内丝状肌动蛋白(F-actin)的骨架蛋白,与肌膜上的肌营养不良蛋白聚糖(α -和 β -DG),肌聚糖蛋白(α -、 β -、 γ -和 δ -SG),肌长蛋白(sarcospan),互生蛋白(syntrophin),神经元型一氧化氮合酶(nNOS)和异连蛋白(dystrobrevin)等共同组成抗肌萎缩蛋白-糖蛋白复合物(DGC),该复合物在肌纤维和肌膜反复机械收缩过程中发挥重要保护作用。研究显示,离心运动或高张力运动可以损伤骨骼肌结构,使 dystrophin 蛋白缺失,从而继发性引起 DGC 复合物缺乏,表明 dystrophin 蛋白缺失是骨骼肌损伤的关键指标之一^[1-3]。由于 DMD 基因突变致 dystrophin 蛋白缺失继而导致 Duchenne 型肌营养不良症(DMD),表明 Duchenne 型肌营养不良患儿自出生起即处于骨骼肌离心运动所承载的高张力力量传递通路的自然状态。为了探讨 Duchenne 型肌营养不良患儿骨骼肌功能进行性下降与 DGC 复合物表达水平之间的关系,本研究回顾分析 197 例 9 天至 12 岁的 Duchenne 型肌营养不良患儿临床资料,采用免疫荧光染色观察骨骼肌肌膜 DGC 复合物表达变化,以为临床提供一些参考。

对象与方法

一、研究对象

1. 病例选择 选择 2011 年 8 月-2014 年 12 月复旦大学附属儿科医院神经肌肉病理分子诊断实验室骨骼肌标本库中 Duchenne 型肌营养不良患儿 197 例,均为男性;年龄 9 天至 12 岁,中位年龄 5 岁,其中 9 天至 3 岁 38 例(19.29%)、>3~6 岁 79 例(40.10%)、>6~12 岁 80 例(40.61%);血清肌酸激酶(CK)5502~42 150 U/L,平均 15 825 U/L;肌电图呈现肌源性损害;肌肉活检呈现肌营养不良改变;Dys-R、Dys-C、Dys-N 单克隆抗体联合检测显示肌膜 dystrophin 蛋白缺失。

2. 试剂与仪器 (1)主要试剂:免疫试剂中 I 抗工作液[包括小鼠抗人 β -DG(1:100)、 α -SG(1:100)、 β -SG(1:100)、 γ -SG(1:100)、 δ -SG(1:50)单克隆抗体,小鼠抗人 α -DG(1:100)和 syntrophin(1:200)单克隆抗体,兔抗人 nNOS 单克隆抗体(1:100)]分别为英国 Leica Biosystems 公司、美国 Merck Millipore 公司和美国 Epitomics 公司产品。Alex Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG II 抗和异硫氰

酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔 IgG II 抗(均 1:200)由美国 Invitrogen 公司提供。(2)主要仪器:Leica CM1950 冰冻切片机为德国 Leica 公司产品,TS-1 型脱色摇床由海门市其林贝尔仪器制造有限公司提供。Eclipse 80i 正置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。

二、研究方法

1. 肌肉组织标本制备 肌肉组织标本均经开放式肌肉活检获得,部位为左侧肱二头肌,局部麻醉后沿肌纤维走行的肌腹切开皮肤 1~2 cm,分离皮下组织,暴露肌膜,切开肌膜沿肌纤维走行分离出直径 5 mm、长 0.30~0.50 cm 的肌束。以液氮预冷的异戊烷迅速冷冻,置 -80 °C 保存备用。

2. 免疫荧光染色 冰冻组织制备厚度 8 μ m 的切片,于 -20 °C 丙酮固定 10 min,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(\times 3 次)。以体积分数为 3% 的过氧化氢-甲醇溶液孵育 30 min,去除内源性过氧化物酶,以磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(\times 3 次)。肌肉组织切片以体积分数为 10% 的山羊血清封闭 30 min。滴加 I 抗(小鼠抗人 α -和 β -DG, α -、 β -、 γ -和 δ -SG, syntrophin 单克隆抗体,以及兔抗人 nNOS 单克隆抗体),室温下孵育 60 min,以磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(\times 3 次)。滴加 II 抗(Alex Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG II 抗和 FITC 标记的山羊抗兔 IgG II 抗),室温孵育 30 min,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(\times 3 次),甘油-磷酸盐缓冲液封片,荧光显微镜下观察,肌膜呈现环形红色荧光视为阳性。同时设阴性对照和阳性对照,阴性对照以磷酸盐缓冲液分别替代 I 抗和 II 抗,阳性对照为复旦大学附属儿科医院骨科提供的非神经肌肉病患者的正常肌肉组织。

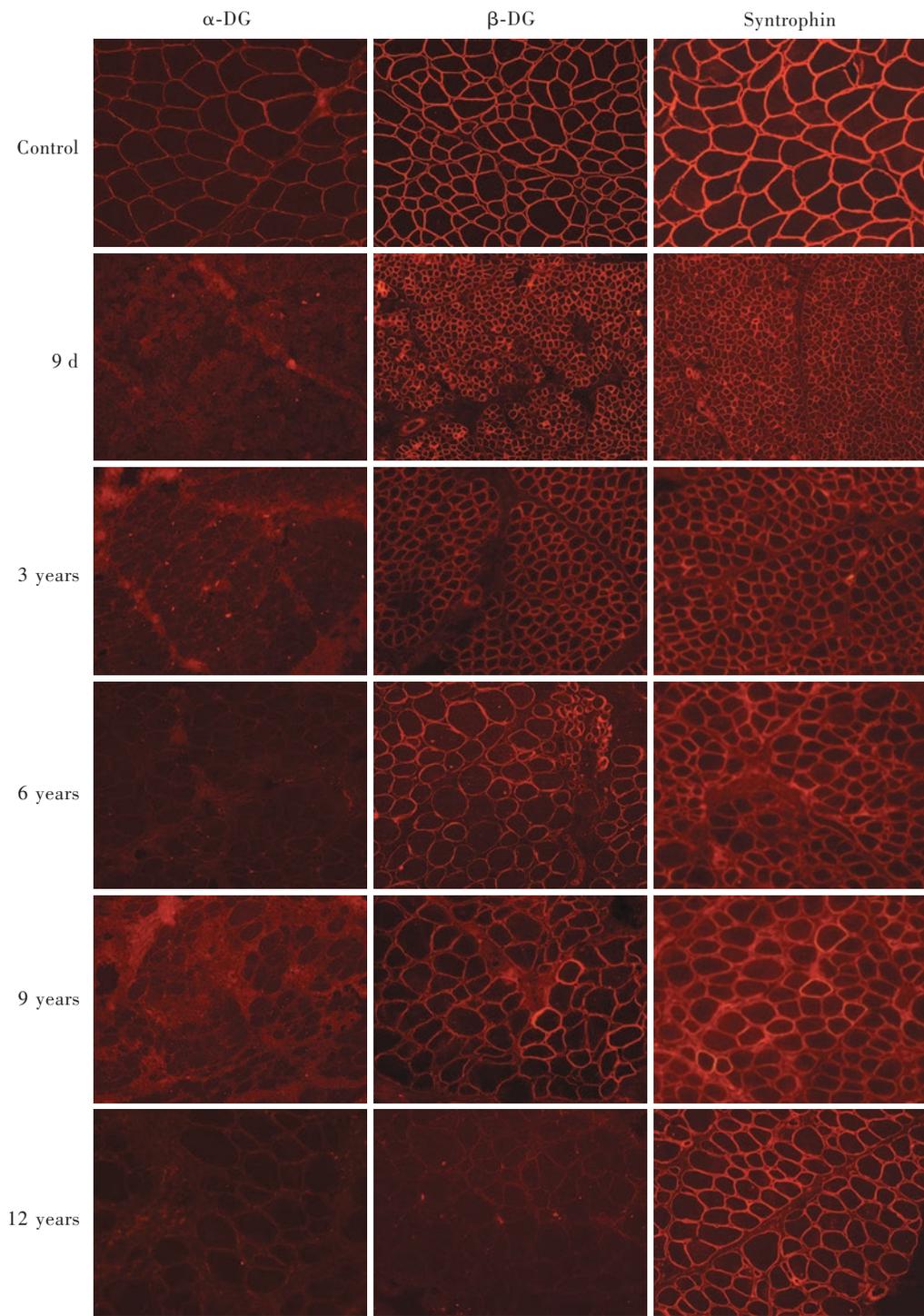
结 果

一、Duchenne 型肌营养不良患儿肌膜肌营养不良蛋白聚糖检测

免疫荧光染色,各年龄段 Duchenne 型肌营养不良患儿肌膜 α -和 β -DG 蛋白均呈现不完整的、表达较低的环形红色荧光条带,表明 α -和 β -DG 蛋白均出现不同程度缺乏,但与增龄伴随的肌力下降并无关联性(图 1)。

二、Duchenne 型肌营养不良患儿肌膜肌聚糖蛋白检测

免疫荧光染色,各年龄段 Duchenne 型肌营养不



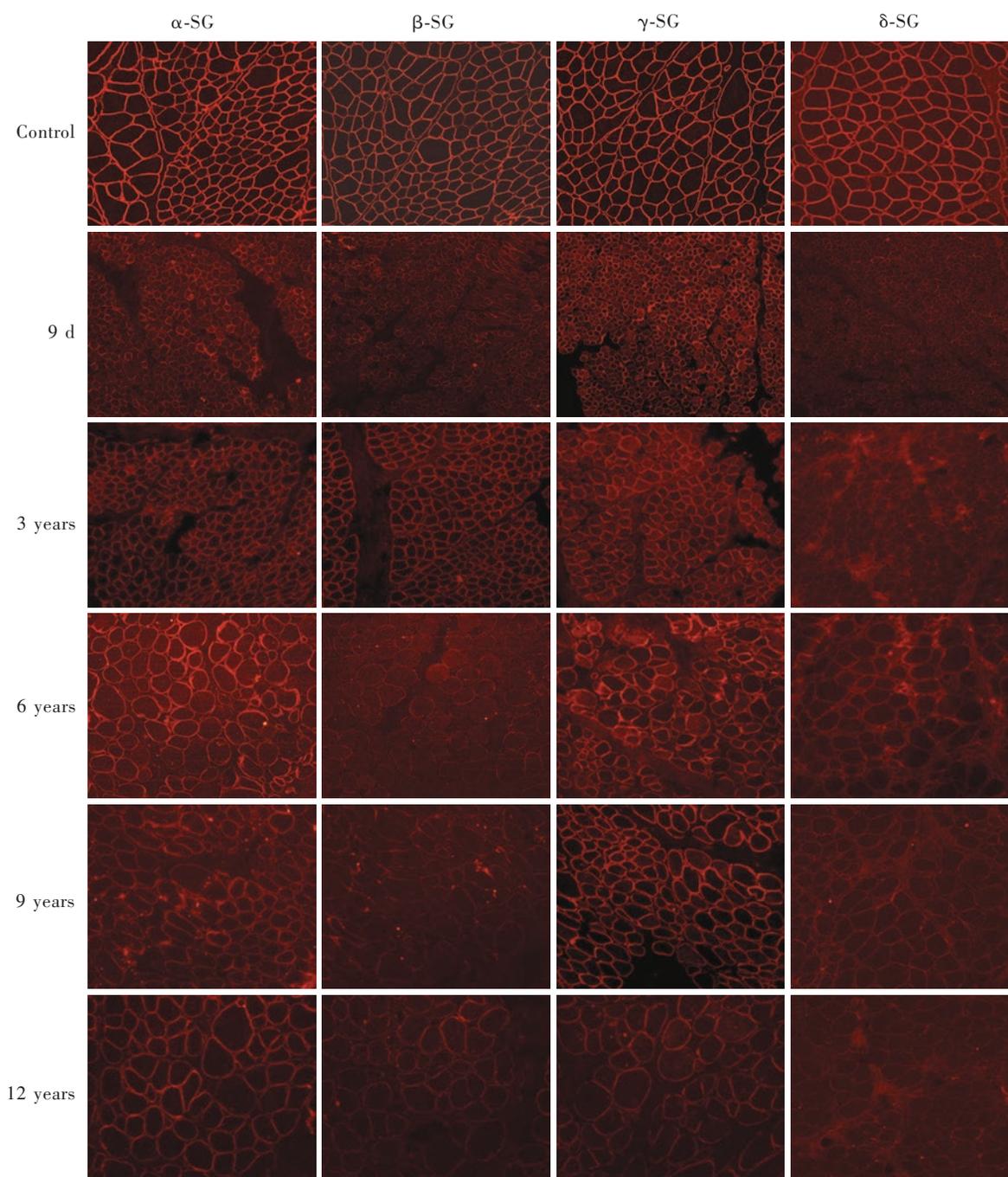
DG, dystroglycan, 肌营养不良蛋白聚糖

图1 荧光显微镜观察显示,Duchenne型肌营养不良症患儿肌膜 α -和 β -DG均呈现不同程度缺乏,syntrophin仅轻度缺乏 免疫荧光染色 中倍放大

Figure 1 Fluorescent microscopy findings. Expression of α - and β -DG at the sarcolemma at different stages of DMD patients (9 days-12 years old) had different degrees of deficiency. Expression of syntrophin at the sarcolemma at different stages of DMD patients (9 days-12 years old) was slightly reduced. Immunofluorescent staining medium power magnified

良症患儿肌膜 α -、 β -、 γ -和 δ -SG蛋白均呈现不完整的、表达较低的环形红色荧光条带,表明上述蛋白

均出现不同程度缺乏,但与增龄伴随的肌力下降并无关联性(图2)。



SG, sarcoglycan, 肌聚糖蛋白

图2 荧光显微镜观察显示, Duchenne 型肌营养不良症患儿肌膜α-、β-、γ-和δ-SG 均呈现不同程度缺乏 免疫荧光染色 中倍放大

Figure 2 Fluorescent microscopy findings. Expression of α-, β-, γ- and δ-SG at the sarcolemma at different stages of DMD patients (9 days-12 years old) had different degrees of deficiency or complete deficiency. Immunofluorescent staining medium power magnified

三、Duchenne 型肌营养不良症患儿肌膜 syntrophin 蛋白检测

免疫荧光染色, 各年龄段 Duchenne 型肌营养不

良症患儿肌膜 syntrophin 蛋白均呈现完整但表达稍低的环形红色荧光条带, 表明 syntrophin 蛋白轻度缺乏, 但与增龄伴随的肌力下降并无关联性(图1)。

讨 论

Dystrophin 蛋白系肌动蛋白-dystrophin-DG-层黏连蛋白的连接轴,连接细胞内骨架蛋白(肌动蛋白)与细胞外基质(层黏连蛋白),对骨骼肌在收缩过程中保护肌膜对抗机械拉力以及对细胞外基质信号转导发挥双重作用^[4]。本研究采用免疫荧光染色对 197 例 9 天至 12 岁的 Duchenne 型肌营养不良患儿骨骼肌肌膜 DGC 复合物进行分析,结果显示,组成 DGC 复合物的 α -、 β -DG 和 α -、 β -、 γ -、 δ -SG、syntrophin 均发生不同程度缺乏,表明 dystrophin 蛋白缺失影响细胞膜完整性;而且,上述蛋白缺乏程度与增龄伴随的肌力下降并无明显关联性,推测 Duchenne 型肌营养不良患儿肌膜 DGC 复合物中相关蛋白缺乏可能发生在胚胎期。

长期的离心运动可以造成骨骼肌肌力下降和 II 型肌纤维损伤^[1,3,5]。为探讨离心运动与肌力下降之间的关系,Lovering 和 De Deyne^[1]将正常大鼠骨骼肌经离心运动损伤后,采用相关骨架蛋白抗体进行标记,结果显示,离心运动后 dystrophin 蛋白最先受损,如果不阻止离心运动,DGC 复合物将相继受损,表明 dystrophin 蛋白表达下调是离心运动对骨骼肌损伤的关键标记之一,进一步阐明 dystrophin 蛋白不仅在保持肌膜完整性、柔韧性和力量传递过程中占重要地位,而且对肌腱、韧带、骨骼重建同样发挥重要作用^[1]。此外,Blaauw 等^[6]和 Tegeler 等^[7]对 Duchenne 型肌营养不良症模型 mdx 小鼠和金毛狗研究发现,dystrophin 蛋白不仅与骨骼肌离心运动密切相关,而且是控制骨骼肌运动方式的关键蛋白。

Duchenne 型肌营养不良症患儿 3 岁前通常未表现出步态异常,至 4~6 岁时出现明显足尖行走、走路向双侧摇摆的典型鸭步步态,至 7~12 岁时表现

为上下楼和蹲起困难、腰椎前凸和脊柱侧弯并逐渐丧失行走能力,结合本研究显示的 DGC 复合物逐渐缺失,表明 Duchenne 型肌营养不良患儿自出生起即处于骨骼肌离心运动所承载的高张力力量传递通路的自然状态。

综上所述,本研究结果显示,对临床疑似 Duchenne 型肌营养不良患儿应早期明确诊断,选择正确康复运动方式,以延长患儿行走时间,避免离心运动和抗高阻力动作对骨骼肌的进一步损伤。

志谢 感谢上海市慈善基金会关爱杜氏肌营养不良儿童专项基金资助

参 考 文 献

- [1] Lovering RM, De Deyne PG. Contractile function, sarcolemma integrity, and the loss of dystrophin after skeletal muscle eccentric contraction-induced injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286:C230-238.
- [2] Gumerson JD, Michele DE. The dystrophin - glycoprotein complex in the prevention of muscle damage. *J Biomed Biotechnol*, 2011, ID:210797.
- [3] Armstrong SC, Latham CA, Shivell CL, Ganote CE. Ischemic loss of sarcolemmal dystrophin and spectrin: correlation with myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33:1165-1179.
- [4] Zhang C. Research highlights of partial neuromuscular disorders. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2014, 14:382-385.[张成. 神经肌肉病研究新亮点. *中国现代神经疾病杂志*, 2014, 14:382-385.]
- [5] Fridén J, Lieber RL. Eccentric exercise - induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. *Acta Physiol Scand*, 2001, 171:321-326.
- [6] Blaauw B, Agatea L, Toniolo L, Canato M, Quarta M, Dyar KA, Danielli-Betto D, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C. Eccentric contractions lead to myofibrillar dysfunction in muscular dystrophy. *J Appl Physiol* (1985), 2010, 108:105-111.
- [7] Tegeler CJ, Grange RW, Bogan DJ, Markert CD, Case D, Kornegay JN, Childers MK. Eccentric contractions induce rapid isometric torque drop in dystrophin - deficient dogs. *Muscle Nerve*, 2010, 42:130-132.

(收稿日期:2015-04-30)

· 小 词 典 ·

中英文对照名词词汇(三)

抗肌萎缩蛋白-糖蛋白复合物

dystrophin-glycoprotein complex(DGC)

抗原呈递细胞 antigen-presenting cell(APC)

快速血浆反应素试验 rapid plasma reagin(RPR)

快速自旋回波序列 turbo spin echo(TSE)

扩散加权成像 diffusion-weighted imaging(DWI)

辣根过氧化物酶 horseradish peroxidase(HRP)

酪氨酸羟化酶 tyrosine hydroxylase(TH)

X 连锁脊肌萎缩症 X-chain spinal muscular atrophy(CBMA)

链霉亲和素-生物素标记法

labeled streptavidin biotin(LSAB)

淋巴滞留性脑病 lymphostatic encephalopathy(LE)

硫酸乙酰肝素蛋白多糖

heparan sulfate proteoglycan(HSPG)