

# $\gamma$ -生育三烯酚对 Duchenne 型肌营养不良症小鼠骨骼肌卫星细胞的保护作用

杨硕 赵惠文 杨娟 曾慧红 匡渤海 邵立健

**【摘要】** 目的 探讨骨骼肌卫星细胞在 Duchenne 型肌营养不良症中损伤改变以及  $\gamma$ -生育三烯酚 (GT3) 对 DMD 基因敲除小鼠卫星细胞保护作用。方法 DMD 基因敲除的 C57BL/6J 小鼠与野生型 (WT) C57BL/6J 小鼠各 18 只, 随机选取各 6 只, 流式细胞术检测卫星细胞比例、细胞老化率和凋亡率、DNA 损伤率; 剩余 12 只 DMD 基因敲除小鼠和 12 只野生型小鼠分别予以 GT3 溶液 50 mg/kg 或 GT3 溶剂 50 mg/kg 皮下注射, 流式细胞术检测卫星细胞凋亡率和 DNA 损伤率, 实时荧光定量聚合酶链反应 (FQ-PCR) 检测凋亡相关基因 *Bcl-xl*、*Puma* 和 *Bax* 表达变化。结果 与野生型组相比, DMD 基因敲除组小鼠卫星细胞数目减少 ( $t = 35.837, P = 0.000$ ), 细胞老化率 ( $t = 12.902, P = 0.000$ )、细胞凋亡率 ( $t = 6.864, P = 0.000$ ) 和 DNA 损伤率 ( $t = 10.585, P = 0.000$ ) 增加。DMD 基因敲除组和野生型组小鼠经 GT3 溶剂或 GT3 溶液处理后, 卫星细胞凋亡率 ( $F = 59.130, P = 0.000$ ), 凋亡相关基因 *Bcl-xl* ( $F = 54.480, P = 0.000$ )、*Puma* ( $F = 38.940, P = 0.000$ ) 和 *Bax* ( $F = 632.300, P = 0.000$ ) 表达量, DNA 损伤率 ( $F = 22.990, P = 0.000$ ) 差异均有统计学意义, 其中, 与 GT3 溶剂相比, DMD 基因敲除组经 GT3 溶液处理后细胞凋亡率减少 ( $q = 13.820, P = 0.000$ ), 抗凋亡基因 *Bcl-xl* 表达上调 ( $q = 12.830, P = 0.000$ ), 促凋亡基因 *Puma* ( $q = 12.920, P = 0.000$ ) 和 *Bax* ( $q = 48.050, P = 0.000$ ) 表达下调, DNA 损伤率下降 ( $q = 6.950, P = 0.000$ )。结论 DMD 基因敲除小鼠卫星细胞数目减少, 细胞老化、凋亡和 DNA 损伤较明显, GT3 可部分改善卫星细胞损伤。

**【关键词】** 肌营养不良, 杜氏; 卫星细胞, 骨骼肌; 生育三烯酚类; 细胞凋亡; DNA 损伤; 疾病模型, 动物

## Protective role of $\gamma$ -tocotrienol on muscle satellite cells of Duchenne muscular dystrophy in mice

YANG Shuo<sup>1</sup>, ZHAO Hui-wen<sup>2</sup>, YANG Juan<sup>1</sup>, ZENG Hui-hong<sup>2</sup>, KUANG Bo-hai<sup>2</sup>, SHAO Li-jian<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Grade 2019, <sup>3</sup>Jiangxi Provincial Key Laboratory of Preventive Medicine, School of Public Health, <sup>2</sup>School of Basic Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

Corresponding author: SHAO Li-jian (Email: lshao@ncu.edu.cn)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the damage of skeletal muscle satellite cells in Duchenne muscular dystrophy (DMD) and the protective effect of  $\gamma$ -tocotrienol (GT3) on muscle satellite cells in DMD knockout mice. **Methods** Total 18 DMD knockout C57BL/6J mice and 18 wild-type (WT) C57BL/6J mice, while 6 DMD knockout mice and 6 WT mice were selected to detect satellites cells proportion, cells aging rate and apoptosis rate, DNA damage rate by flow cytometry. The remaining 12 DMD knockout mice and 12 WT mice were subcutaneously injected with 50 mg/kg GT3 solution or 50 mg/kg GT3 solvent. The apoptosis rate and DNA damage rate of satellite cells were detected by flow cytometry, and the expression changes of apoptosis-related genes *Bcl-xl*, *Puma* and *Bax* were detected by real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). **Results** Compared with WT group, the number of satellite cells in the DMD knockout group was decreased ( $t = 35.837, P = 0.000$ ), while the cells aging rate ( $t = 12.902, P =$

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2022.09.009

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81760328);国家自然科学基金资助项目(项目编号:82073484);  
国家自然科学基金资助项目(项目编号:81860026)

作者单位:330006 南昌大学公共卫生学院 2019 级(杨硕、杨娟), 公共卫生学院 江西省预防医学重点实验室(邵立健), 基础医学院(赵惠文、曾慧红、匡渤海)

通讯作者:邵立健, Email: lshao@ncu.edu.cn

0.000), apoptosis rate ( $t = 6.864, P = 0.000$ ) and DNA damage rate ( $t = 10.585, P = 0.000$ ) were increased. After the mice in the *DMD* knockout group and WT group were treated with GT3 solvent and GT3 solution, the cells apoptosis rate ( $F = 59.130, P = 0.000$ ), the apoptosis-related gene *Bcl-xl* ( $F = 54.480, P = 0.000$ ), *Puma* ( $F = 38.940, P = 0.000$ ) and *Bax* ( $F = 632.300, P = 0.000$ ) expression levels and DNA damage rate ( $F = 22.990, P = 0.000$ ) were significantly different. Compared with GT3 solvent, the apoptosis rate of *DMD* knockout group was decreased treated with GT3 solution ( $q = 13.820, P = 0.000$ ), and the expression of anti-apoptotic gene *Bcl-xl* was up-regulated ( $q = 12.830, P = 0.000$ ), the expression of pro-apoptotic genes *Puma* ( $q = 12.920, P = 0.000$ ) and *Bax* ( $q = 48.050, P = 0.000$ ) were down-regulated, and the DNA damage rate was decreased ( $q = 6.950, P = 0.000$ ). **Conclusions** The proportion of satellite cells in *DMD* knockout mice was reduced, and the cells aging, apoptosis and DNA damage were more obvious. The GT3 solution could partially improve the satellite cells damage.

**[Key words]** Muscular dystrophy, Duchenne; Satellite cells, skeletal muscle; Tocotrienols; Apoptosis; DNA damage; Disease models, animal

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81760328, 82073484, 81860026).

**Conflicts of interest:** none declared

Duchenne 型肌营养不良症 (DMD) 是 X 连锁隐性遗传性神经肌肉病, 系定位于 Xp21.2 区编码抗肌萎缩蛋白 (dystrophin) 的 *DMD* 基因突变所致<sup>[1]</sup>, 主要为框外突变或无义突变。Dystrophin 是一种蛋白质复合物的的重要组成部分, 可以将肌肉细胞骨架与细胞外基质连接起来, 维持肌膜完整性和稳定性。其全长 mRNA 主要表达于骨骼肌和心肌, 在脑组织中也有少量表达。Dystrophin 蛋白通过胞质氨基末端 (N-端) 结构域与 F-肌动蛋白结合, 通过胞外羧基末端 (C-端) 结构域与  $\beta$ -营养不良聚糖结合, 起到桥联和锚定蛋白的作用。*DMD* 基因转录水平降低, 导致所编码的蛋白质结构和功能异常, 甚至产生无功能的 Dystrophin 蛋白, 使得肌纤维收缩时胞膜破裂及细胞内信号转导受阻, 增加肌膜脆性, 以及钙离子内流及钙稳态失衡, 激活蛋白酶和促炎因子, 导致如肌肉坏死变性、肌纤维萎缩等一系列损伤及功能障碍<sup>[2]</sup>。病理改变为肌肉坏死、变性及再生, 肌纤维萎缩, 脂肪化及炎症。临床表现为进行性肌萎缩及肌力减弱, 晚期可累及全身多系统<sup>[3]</sup>。DMD 引起的肌膜脆性增加还可导致线粒体功能障碍, 使活性氧 (ROS) 生成增多, 引起细胞肿胀、老化及死亡, 进而影响肌肉适应性及功能<sup>[4]</sup>。骨骼肌卫星细胞 (以下简称卫星细胞) 是骨骼肌的成体干细胞, 由其在肌纤维的基底板和肌膜之间的独特解剖位置所定义<sup>[5]</sup>, 在肌肉损伤后再生过程中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。研究显示, 卫星细胞与 DMD 的发生发展相关, Dystrophin 蛋白缺失使卫星细胞无法建立细胞极性、分裂异常、进入分化过程失败等<sup>[8]</sup>。酚类化合物

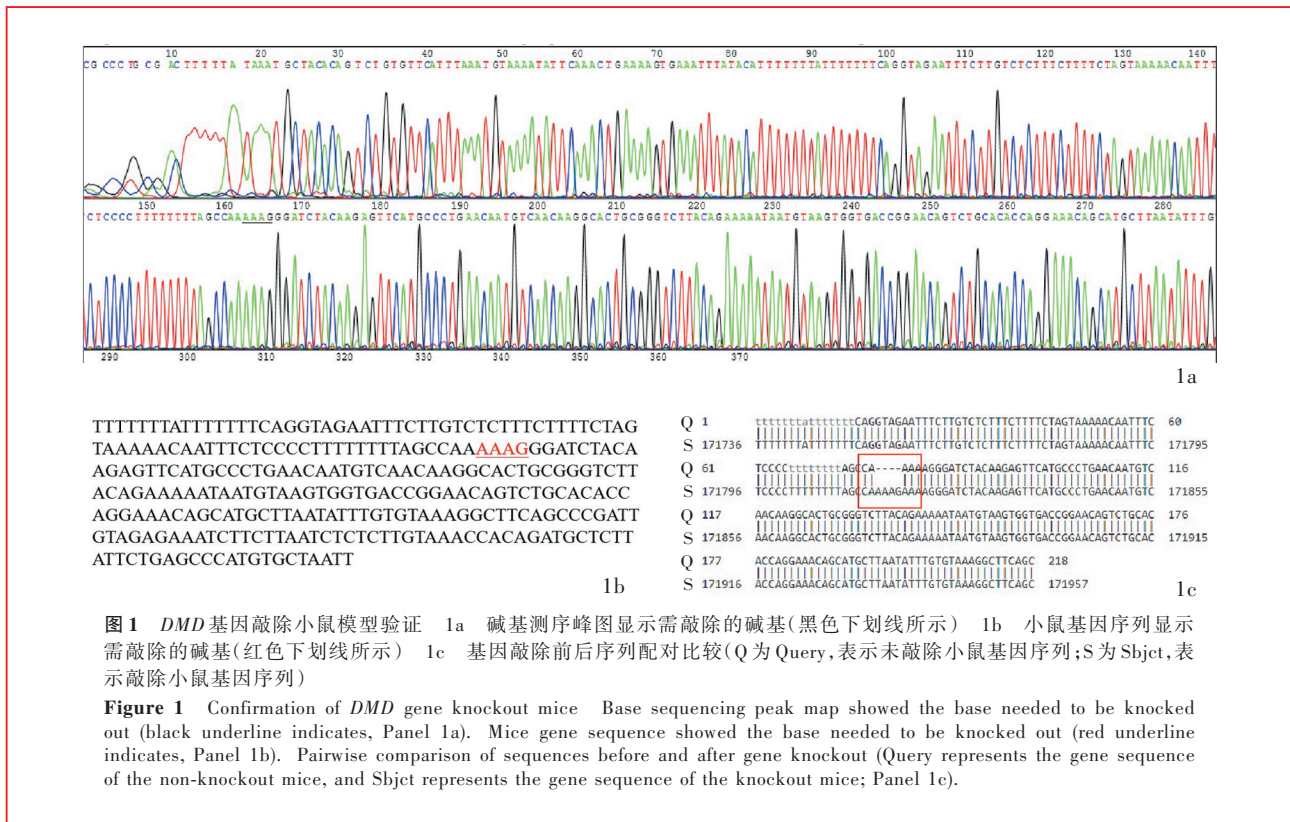
具有较强的抗氧化能力, 可控制机体氧自由基水平, 在细胞辐射暴露后的氧化应激损伤中发挥细胞保护作用<sup>[9]</sup>。生育三烯酚 (GT3) 是维生素 E 的高级亚型, 作为一种天然强抗氧化剂<sup>[10-11]</sup>, 对胃肠道及心血管系统的氧化应激损伤有较好控制效果<sup>[12]</sup>, 但尚无其应用于骨骼肌的报道。本研究探讨 *DMD* 基因敲除小鼠卫星细胞损伤变化以及经 GT3 处理后卫星细胞损伤改善, 以为临床治疗 DMD 提供新思路。

## 材料与方法

### 一、实验材料

1. 实验动物 40 周龄遗传背景为 C57BL/6J 的 *DMD* 基因敲除小鼠与野生型 (WT) C57BL/6J 小鼠各 18 只, 均为无特定病原体 (SPF) 级雄性小鼠, 体重 26 ~ 28 g, 购自南京大学模式动物研究所 [许可证号: SCXK (苏) 2018-0008]。于环境温度 24 ~ 27 °C、12 h 昼-12 h 夜循环照明环境中饲养, 自由摄食、饮水, 适应性饲养 1 周后进行动物实验。

2. 试剂与仪器 (1) 药品与试剂: GT3 (规格为 25 mg) 购自美国 Cayman 公司, 按照无水乙醇、聚山梨醇酯 80、聚乙二醇 400、超纯水体积比 2:1:1:1 配制 GT3 溶剂; 将 GT3 溶于无水乙醇 (浓度 10 mg/ml), 缓慢通入氮气使乙醇全部蒸发并吹走蒸汽, 留取 GT3 粉末, 再加入 GT3 溶剂, 配制 GT3 溶液, 终浓度为 4 mg/ml。胎牛血清 (FBS)、TransZol Up 裂解液 (规格 100 ml)、逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应 (FQ-PCR) 试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司, 胶原酶为上海全元生物科技有限公司



产品,质量分数为4%多聚甲醛溶液由武汉赛维尔生物科技有限公司提供,三氯甲烷(分析纯)购自天津市凯通化学试剂有限公司,异丙醇(分析纯)为天津恒兴化学试剂制造有限公司产品,无酶无菌水由北京索莱宝科技有限公司提供,藻红蛋白(PE)标记的仓鼠抗小鼠CD29抗体、PerCP/Cyanine5.5标记的大鼠抗小鼠CD184(CXCR4)抗体、别藻蓝蛋白(APC)标记的大鼠抗小鼠CD45抗体、APC标记的大鼠抗小鼠CD11b抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的Annexin V抗体、FITC标记的磷酸化组蛋白γH2AX抗体(Ser139,均1:100)均购自美国BioLegend公司,ImaGene Green™ C12FDG LacZ蛋白表达试剂盒购自美国Thermo Fisher公司,I抗为山羊抗小鼠Dystrophin单克隆抗体(0.20 mg/ml)购自美国Abcam公司,II抗来源山羊抗小鼠二步法检测试剂盒(PV-6002)和二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,HPRT、Bcl-xl、Puma、Bax基因引物均购自深圳华大基因科技有限公司。(2)设备与仪器:FACSVerse型流式细胞仪购自美国BD公司。NanoDrop2000微量蛋白核酸定量分析仪购自美国Thermo Scientific公司,实时FQ-PCR仪(StepOnePlus)购自美国ABI公司,光学显

显微镜BDS200购自美国Olympus公司。

## 二、实验方法

1. 模型验证 (1)基因组测序:首先对18只*DMD*基因敲除小鼠鼠尾行基因组DNA测序,证实本研究购买的*DMD*基因敲除小鼠均通过删除4个碱基——腺嘌呤-腺嘌呤-腺嘌呤-鸟嘌呤(AAAG)的方式获得(图1)。(2)Dystrophin蛋白检测:随机选取6只*DMD*基因敲除小鼠和6只野生型小鼠,沿左侧胫骨前肌上下两端肌腱游离并完整切除胫骨前肌,取部分组织经4%多聚甲醛溶液固定过夜后,以体积分数为70%、80%、95%、100%的乙醇逐渐脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制备4 μm切片,常规脱蜡至水,以0.10 mol/L柠檬酸抗原修复液(pH值=6.0)微波(约95℃)修复15 min,体积分数3%过氧化氢室温孵育10 min,滴加I抗山羊抗小鼠Dystrophin单克隆抗体(1:100稀释),4℃过夜,再滴加山羊抗小鼠II抗(即用型),37℃水浴30 min,DAB显色;以磷酸盐缓冲液代替I抗作为空白对照。野生型小鼠胫骨前肌可见Dystrophin蛋白网格状规律分布于肌纤维表面,而*DMD*基因敲除小鼠胫骨前肌肌纤维表面Dystrophin蛋白染色呈阴性,表明*DMD*基因敲除小鼠胫骨前肌不表达Dystrophin蛋白(图2),证实本

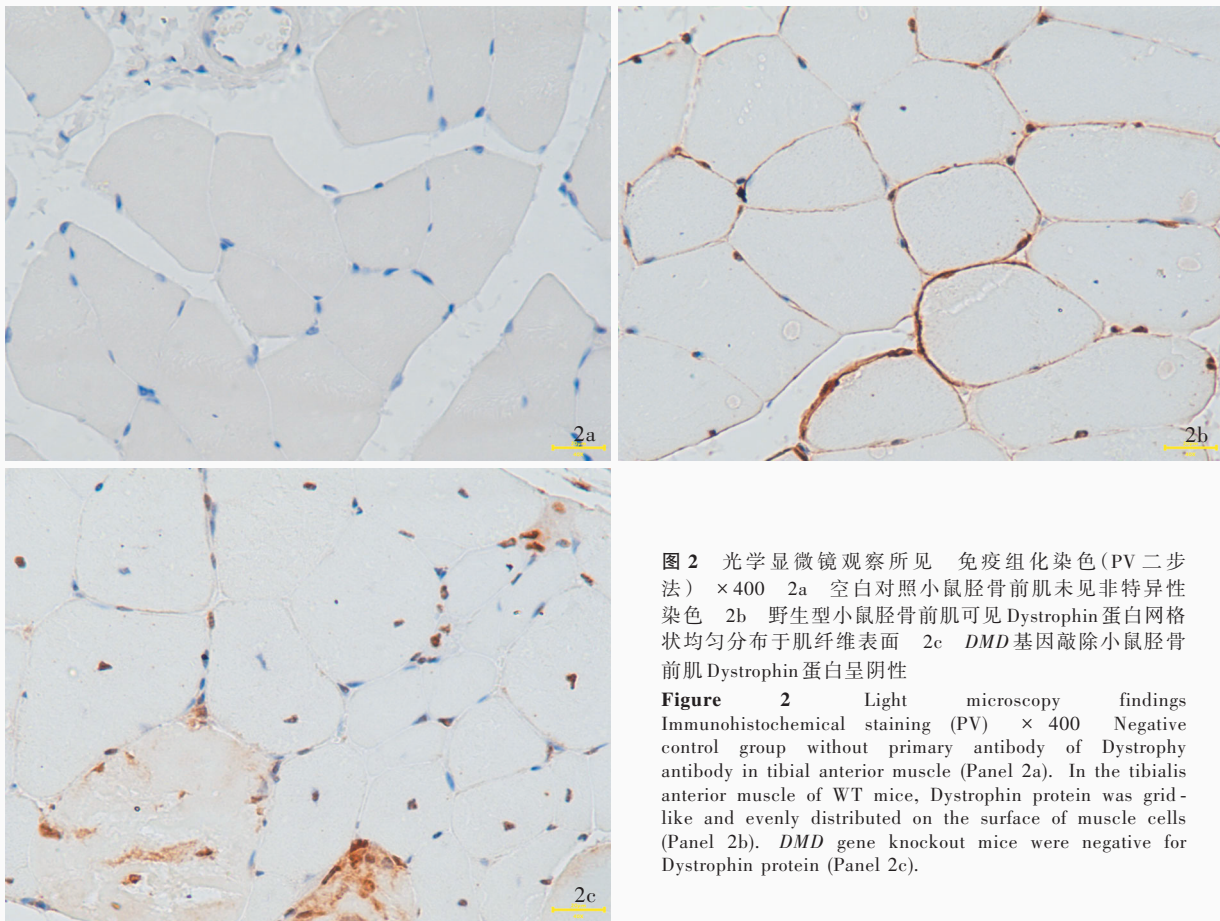


图 2 光学显微镜观察所见 免疫组化染色(PV 二步法) ×400 2a 空白对照小鼠胫骨前肌未见非特异性染色 2b 野生型小鼠胫骨前肌可见 Dystrophin 蛋白网格状均匀分布于肌纤维表面 2c *DMD* 基因敲除小鼠胫骨前肌 Dystrophin 蛋白呈阴性

**Figure 2** Light microscopy findings Immunohistochemical staining (PV) ×400 Negative control group without primary antibody of Dystrophy antibody in tibial anterior muscle (Panel 2a). In the tibialis anterior muscle of WT mice, Dystrophin protein was grid-like and evenly distributed on the surface of muscle cells (Panel 2b). *DMD* gene knockout mice were negative for Dystrophin protein (Panel 2c).

研究购买的 *DMD* 基因敲除小鼠符合实验需要。

2. 模型处理 剩余的 12 只 *DMD* 基因敲除小鼠和 12 只野生型小鼠分别予以 GT3 溶液 50 mg/kg 或 GT3 溶剂 50 mg/kg 皮下注射, 饲养 48 h 后用于后续实验。实验过程中对动物的所有处置方法经南昌大学实验动物福利与伦理委员会审核通过(审批号: NCU-CLA-2019-319)。

3. 流式细胞术检测卫星细胞比例、老化率、凋亡率和 DNA 损伤率 用于模型处理的小鼠沿左侧胫骨前肌上下两端肌腱游离并完整切取胫骨前肌, 与用于模型验证的小鼠胫骨前肌剩余组织一并以胶原酶消化为单细胞悬液, 于室温、离心半径 12 cm、1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀以 300 μl、体积分数 2% 的胎牛血清-磷酸盐缓冲液重悬, 取 100 μl 加入 APC 标记的大鼠抗小鼠 CD45 抗体、APC 标记的大鼠抗小鼠 CD11b 抗体、PE 标记的仓鼠抗小鼠 CD29 抗体、PerCP/Cyanine5.5 标记的大鼠抗小鼠 CXCR4 抗体各 1 μl, 冰上孵育 30 min 以特异性标记

卫星细胞 (CD45<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD29<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> 细胞); 加入 FITC 标记的 C12FDG 抗体, 37 °C 避光孵育 30 min, 阳性细胞即为老化细胞; 加入 FITC 标记的 Annexin V 抗体, 冰上孵育 30 min, 阳性细胞即为凋亡细胞; 经 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, 加入 FITC 标记的 γH2AX 抗体, 冰上孵育 30 min, 以 γH2AX 抗体荧光强度代表 DNA 损伤程度。在流式细胞仪上计数卫星细胞数目、细胞老化数目、细胞凋亡数目和 γH2AX 抗体荧光强度, 采用 FlowjoV10 软件 (www.flowjo.com) 自动计算卫星细胞比例、细胞老化率、细胞凋亡率和 DNA 损伤率。

4. 实时荧光定量聚合酶链反应检测凋亡相关基因 *Bcl-xl*、*Puma*、*Bax* 表达 用于模型处理的小鼠沿右侧胫骨前肌上下两端肌腱游离并完整切取胫骨前肌, 取部分肌肉组织研磨为匀浆状, 加入 TransZol Up 裂解液 1 ml, 混匀, 室温静置 10 min, 加入三氯甲烷 200 μl, 剧烈摇晃后室温静置 3 min, 于 4 °C、离心半径 7.50 cm、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液

400  $\mu$ l, 加入异丙醇 400  $\mu$ l, 混匀, 室温静置 10 min, 于相同条件下离心 10 min, 弃上清液, 加入 75% 乙醇 1 ml, 相同条件下离心 5 min, 弃上清液, 室温干燥 5 min, 加入无核酸酶水 20  $\mu$ l 溶解 RNA 行逆转录, 实时 FQ-PCR 反应测定 *HPRT*、抗凋亡基因 *Bcl-xl*、促凋亡基因 *Puma* 和 *Bax* 相对表达量。*Bcl-xl* 正向引物序列 5'-GATGGAGTAAACTGGGGTCGCATCGTG-3'、反向引物序列 5'-AGTGTCCCAGCCGCCGTTCTCCTGGATC-3', *Puma* 正向引物序列为 5'-GTACGAGCGGCGAGACAAG-3'、反向引物序列 5'-GCACCTAGTTGGGCTCCATTCTG-3', *Bax* 的正向引物序列为 5'-CCTGGAACCCAACAGCATCTTGGGTC-3'、其反向引物序列为 5'-GAGTTCGTAGGCATTCCCGGCTGTGG-3', *HPRT* 正向引物序列为 5'-AGCAGTACAGCCCCAAAATGGTTA-3'、反向引物序列 5'-TCAAGGGCATATCCAACAACAAC-3', 以 *HPRT* 基因为内参照物, 采用  $2^{-\Delta Ct}$  计算各目的基因的相对表达量。

5. 统计分析方法 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据处理与分析。正态性检验行 Shapiro-Wilk 检验, 呈正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组的比较采用两独立样本的 *t* 检验; 多组的比较采用析因设计资料的方差分析, 两两比较行 SNK-*q* 检验。以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

流式细胞术显示, 与野生型组相比, *DMD* 基因敲除组小鼠胫骨前肌卫星细胞比例减少 ( $P = 0.000$ , 图 3), C12FDG 抗体阳性率 ( $P = 0.000$ , 图 4a)、Annexin V 抗体阳性率 ( $P = 0.000$ , 图 4b)、 $\gamma$ H2AX 抗体平均荧光强度 ( $P = 0.000$ , 图 4c) 增加 (表 1), 表明 *DMD* 基因敲除小鼠胫骨前肌卫星细胞数目减少, 细胞老化率和凋亡率增加, DNA 损伤加重。

流式细胞术显示, *DMD* 基因敲除组和野生型组小鼠经 GT3 溶剂与 GT3 溶液处理后, 卫星细胞凋亡率差异有统计学意义 ( $P = 0.000$ ; 表 2, 3), 特别是 *DMD* 基因敲除组经 GT3 溶液处理后细胞凋亡率较 GT3 溶剂减少 ( $q = 13.820$ ,  $P = 0.000$ ; 图 5), 提示 GT3 溶液可以减少 *DMD* 基因敲除小鼠胫骨前肌卫星细胞凋亡。

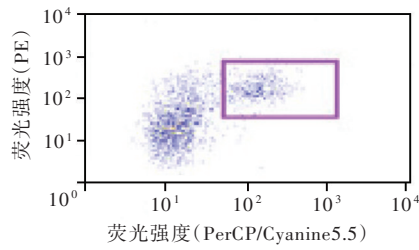
实时 FQ-PCR 显示, *DMD* 基因敲除组和野生型组小鼠经 GT3 溶剂与 GT3 溶液处理后, 凋亡相关基因 *Bcl-xl*、*Puma* 和 *Bax* 表达量差异有统计学意义 (均  $P = 0.000$ ; 表 4, 5), 特别是 *DMD* 基因敲除型组经 GT3 溶液处理后 *Bcl-xl* 基因表达量较 GT3 溶剂升高 ( $P = 0.000$ ), *Puma* ( $P = 0.000$ ) 和 *Bax* ( $P = 0.000$ ) 基因表达量较 GT3 溶剂降低 (表 6), 提示 GT3 溶液可以上调抗凋亡基因 *Bcl-xl* 的表达、下调促凋亡基因 *Puma* 和 *Bax* 的表达。

流式细胞术显示, *DMD* 基因敲除组和野生型组小鼠经 GT3 溶剂与 GT3 溶液处理后, 卫星细胞  $\gamma$ H2AX 抗体平均荧光强度差异有统计学意义 ( $P = 0.000$ ; 表 7, 8), 特别是 *DMD* 基因敲除组经 GT3 溶液处理后  $\gamma$ H2AX 抗体平均荧光强度较 GT3 溶剂降低 ( $q = 6.950$ ,  $P = 0.000$ ; 图 6), 提示 GT3 溶液可减轻 *DMD* 基因敲除小鼠卫星细胞 DNA 损伤。

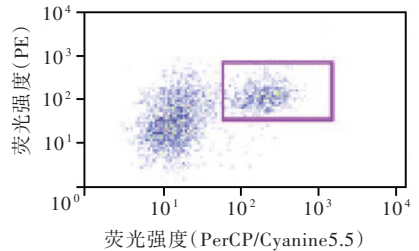
## 讨 论

*DMD* 作为一种致死性 X 染色体隐性遗传性疾病, 是肌营养不良症最常见和最严重的类型<sup>[13]</sup>。患者通常表现为肌肉损伤、消瘦并伴进行性肌力减退、活动受限等症状, 多于 30 岁左右因呼吸循环衰竭而死亡<sup>[14-16]</sup>。因此, 良好的肌肉功能对 *DMD* 患者具有重要意义, 卫星细胞对维持肌肉结构和功能具有不可替代的作用<sup>[17]</sup>, 且具有较强的自我更新能力、分化潜能、免疫特殊性、抗氧化能力和减少炎症反应能力, 可促进骨骼肌再生<sup>[18]</sup>。卫星细胞功能下降可减弱损伤肌肉的恢复能力, 其功能丧失可导致肌肉纤维化和肌萎缩<sup>[19]</sup>。研究发现, *DMD* 基因敲除模型小鼠骨骼肌萎缩、肥大、纤维化加重等病理改变与卫星细胞数目减少及干细胞活性降低有关<sup>[20]</sup>。虽然 *DMD* 患者的肌肉中卫星细胞能够被激活, 但由于其肌肉再生能力受损, 导致连续的肌肉变性和再生消耗了卫星细胞池<sup>[21]</sup>, 故卫星细胞数目减少; 此外, 由于 *DMD* 基因在卫星细胞中表达缺失, 导致细胞极性扭曲, 不对称分裂缺失, 分化早熟<sup>[22]</sup>, 故 *DMD* 患者肌肉逐渐无法生成新的肌纤维, 进一步加剧卫星细胞的损耗, 进而影响肌肉结构及功能, 最终陷入 *DMD* 进展的恶性循环。因此, 在 *DMD* 进程中卫星细胞损伤是极其重要的一环, 进一步深入研究有助于更好地控制及治疗疾病。

Lund 等<sup>[23]</sup>发现, *DMD* 老年模型小鼠胫骨前肌端粒长度缩短, 提示卫星细胞增殖能力降低、细胞



3a

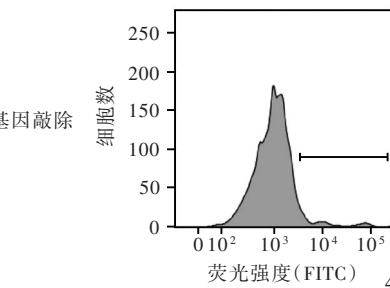
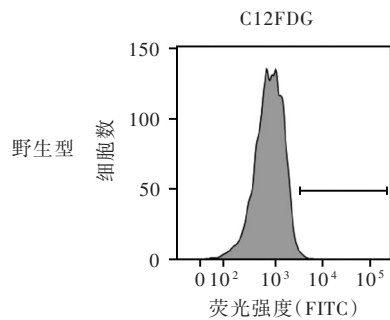


3b

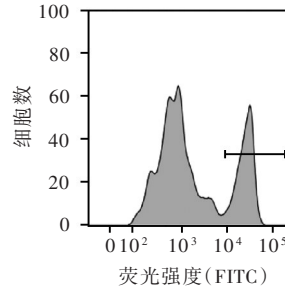
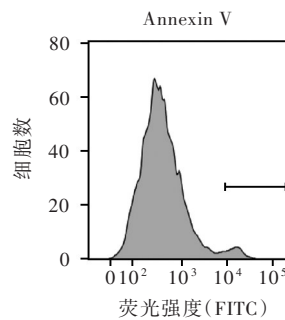
PE,藻红蛋白

**图 3** 流式细胞术检测特异性标记卫星细胞 (CD45<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD29<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞)比例 3a *DMD* 基因敲除组小鼠卫星细胞比例为 (11.28 ± 0.40)% (矩形区域所示) 3b 野生型组小鼠卫星细胞比例为 (21.83 ± 0.60)% (矩形区域所示)

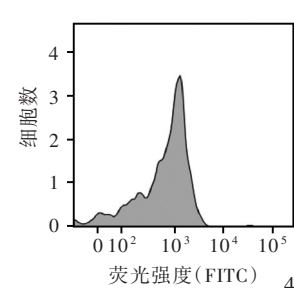
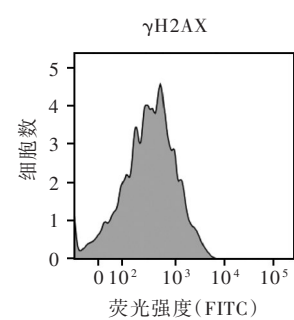
**Figure 3** Flow cytometry was used to compare the proportion of specific marked satellite cells (CD45<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CXCR4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>). The proportion of satellite cells in *DMD* knockout mice was (11.28 ± 0.40)% (rectangular area indicates, Panel 3a). The proportion of satellite cells in WT mice was (21.83 ± 0.60)% (rectangular area indicates, Panel 3b).



4a



4b



4c

FITC,异硫氰酸荧光素。下图同

**图 4** 流式细胞术检测所见 4a 野生型组小鼠 C12FDG 抗体阳性率为 (0.96 ± 0.29)% , *DMD* 基因敲除组小鼠为 (6.49 ± 1.01)% 4b 野生型组小鼠 Annexin V 抗体阳性率为 (2.67 ± 0.55)% , *DMD* 基因敲除组小鼠为 (24.03 ± 7.60)% 4c 野生型组小鼠  $\gamma$ H2AX 抗体平均荧光强度为 575.33 ± 55.30 , *DMD* 基因敲除组小鼠为 950.00 ± 66.78

**Figure 4** Flow cytometry findings The positive rate of C12FDG antibody in WT mice was (0.96 ± 0.29)%, the positive rate in *DMD* knockout mice was (6.49 ± 1.01)% (Panel 4a). The positive rate of Annexin V antibody in WT mice was (2.67 ± 0.55)%, the positive rate in *DMD* knockout mice was (24.03 ± 7.60)% (Panel 4b). The mean fluorescence intensity (MFI) of  $\gamma$ H2AX antibody in WT mice was 575.33 ± 55.30, the MFI in *DMD* knockout mice was 950.00 ± 66.78 (Panel 4c).

**表 1** *DMD* 基因敲除组与野生型组小鼠卫星细胞比例、老化率、凋亡率和 DNA 损伤率的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 1.** Comparison of satellite cells proportion, aging rate, apoptosis rate and DNA damage rate between *DMD* knockout group and WT group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	卫星细胞比例 (%)	C12FDG 抗体阳性率 (%)	Annexin V 抗体阳性率 (%)	$\gamma$ H2AX 抗体平均荧光强度
野生型组	6	21.83 ± 0.60	0.96 ± 0.29	2.67 ± 0.55	575.33 ± 55.30
<i>DMD</i> 基因敲除组	6	11.28 ± 0.40	6.49 ± 1.01	24.03 ± 7.60	950.00 ± 66.78
<i>t</i> 值		35.837	12.902	6.864	10.585
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

**表 2** GT3 溶剂与 GT3 溶液处理的 *DMD* 基因敲除组与野生型组小鼠卫星细胞凋亡率的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

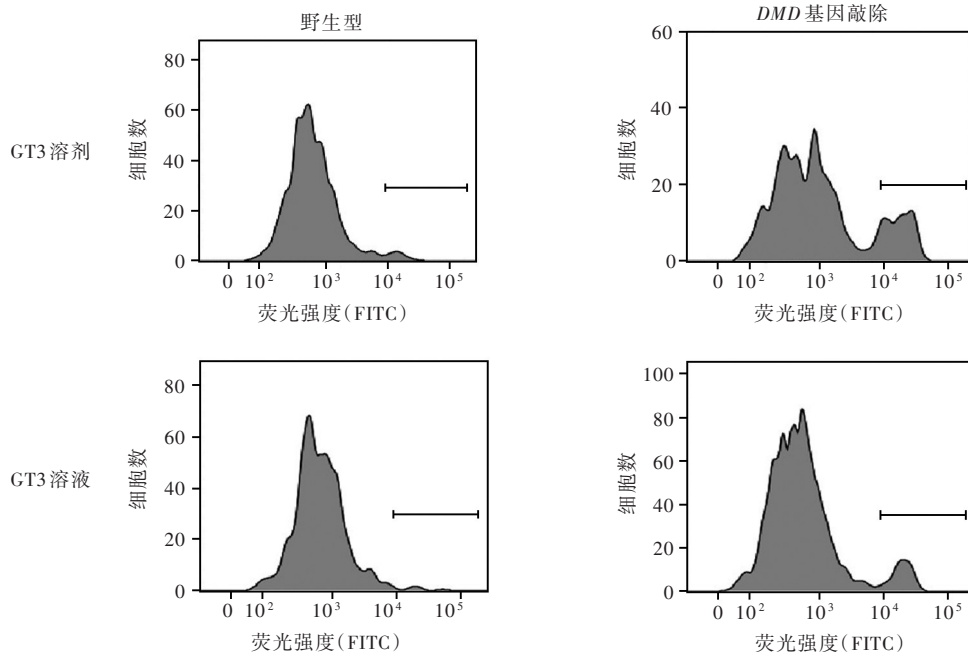
**Table 2.** Comparison of satellite cells apoptosis rate between *DMD* knockout group and WT group treated with GT3 solvent or GT3 solution ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

处理	组别	
	野生型组	<i>DMD</i> 基因敲除组
GT3 溶剂	3.19 ± 0.06	26.93 ± 7.09
GT3 溶液	0.92 ± 0.59	6.77 ± 0.69

**表 3** GT3 溶剂与 GT3 溶液处理的 *DMD* 基因敲除组与野生型组小鼠卫星细胞凋亡率的析因设计的方差分析表

**Table 3.** ANOVA for factorial design of satellite cells apoptosis rate in *DMD* knockout group and WT group treated with GT3 solvent or GT3 solution

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
组别	1313.000	1	1313.000	102.900	0.000
处理	754.700	1	754.700	59.130	0.000
组别 × 处理	480.400	1	80.400	37.640	0.000
误差	255.300	20	12.760		
总	2803.400	23			



**图 5** 流式细胞术检测卫星细胞凋亡率:经 GT3 溶剂处理的 *DMD* 基因敲除小鼠卫星细胞 Annexin V 抗体阳性率为 (26.93 ± 7.09)%, 经 GT3 溶液处理者为 (6.77 ± 0.69)%

**Figure 5** Flow cytometry was used to detected satellite cell apoptosis proportion: the Annexin V antibody positive rate of satellite cells in *DMD* knockout mice treated with GT3 solvent was (26.93 ± 7.09)%, and the positive rate treated with GT3 solution was (6.77 ± 0.69)%.

老化。*DMD* 基因敲除小鼠存在卫星细胞损伤,导致卫星细胞增殖、分化及干性维持等功能受损<sup>[24-26]</sup>。DNA 损伤增加可触发细胞内 DNA 损伤修复反应,包括 *ATM* 和 *p53* 激活,而 *p53* 激活可导致细胞凋亡相关基因如 *Puma*、*Bax* 表达升高和 DNA 损伤以及增殖相关基因如 *p21* 表达升高,引起细胞凋亡和老化<sup>[27]</sup>。本研究流式细胞术显示,*DMD* 基因敲除小鼠胫骨前肌卫星细胞数目减少, C12FDG 抗体阳性率、Annexin V 抗体阳性率、 $\gamma$ H2AX 抗体平均荧光强度增加,表明 *DMD* 基因敲除小鼠胫骨前肌卫星细胞数目减少,细胞老化率和凋亡率增加, DNA 损伤程度加重,与上述研究结果相一致。此外, Lund 等<sup>[23]</sup>还

在 *DMD* 老年模型小鼠中发现卫星细胞老化现象,但在 *DMD* 模型青年小鼠和幼年小鼠中未观察到此现象,推测可能与老年小鼠卫星细胞池随时间推移而出现耗竭等损伤,而其他年龄段小鼠干细胞池拥有一定代偿,对损伤因素有较高的抵御能力有关。

基于卫星细胞损伤与 *DMD* 进程的关系密切,研究者们开始关注 *DMD* 的干细胞治疗,即从未受影响的个体中分离卫星细胞体外扩增并移植至患者体内<sup>[28]</sup>,该疗法可以在一定程度上缓解干细胞损伤导致的自身功能受损和肌纤维损伤;但该疗法移植的干细胞在患者骨骼肌中的传递效率很低,且难以保护自身已受损的干细胞<sup>[29]</sup>。GT3 作为一种天然的

**表 4** GT3 溶剂与 GT3 溶液处理的 *DMD* 基因敲除组与野生型组小鼠凋亡相关基因相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 4.** Comparison of apoptosis - related genes expression between *DMD* knockout group and WT group treated with GT3 solvent or GT3 solution ( $\bar{x} \pm s$ )

处理	组别	
	野生型组	<i>DMD</i> 基因敲除组
<i>Bcl-xl</i>		
GT3 溶剂	0.186 ± 0.003	0.076 ± 0.011
GT3 溶液	0.175 ± 0.009	0.133 ± 0.005
<i>Puma</i>		
GT3 溶剂	0.080 ± 0.017	0.230 ± 0.038
GT3 溶液	0.084 ± 0.027	0.098 ± 0.008
<i>Bax</i>		
GT3 溶剂	0.102 ± 0.006	0.305 ± 0.006
GT3 溶液	0.094 ± 0.009	0.142 ± 0.011

**表 6** *DMD* 基因敲除组与野生型组小鼠凋亡相关基因相对表达量的处理间两两比

**Table 6.** Pairwise comparison of apoptosis-related genes expression between *DMD* knockout group and WT group treated with GT3 solvent or GT3 solution

处理间两两比	野生型组		<i>DMD</i> 基因敲除组	
	<i>q</i> 值	<i>P</i> 值	<i>q</i> 值	<i>P</i> 值
<i>Bcl-xl</i>	2.387	0.151	12.830	0.000
<i>Puma</i>	0.445	0.989	12.920	0.000
<i>Bax</i>	2.241	0.410	48.050	0.000

**表 5** GT3 溶剂与 GT3 溶液处理的 *DMD* 基因敲除组与野生型组小鼠凋亡相关基因相对表达量的析因设计的方差分析表

**Table 5.** ANOVA for factorial design of apoptosis-related genes expression between *DMD* knockout group and WT group treated with GT3 solvent or GT3 solution

变异来源	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
<i>Bcl-xl</i>					
组别	0.035	1	0.035	579.500	0.000
处理	0.003	1	0.003	54.480	0.000
组别 × 处理	0.006	1	0.006	115.700	0.000
误差	0.001	20	0.000		
总	0.045	23			
<i>Puma</i>					
组别	0.040	1	0.040	63.970	0.000
处理	0.024	1	0.024	38.940	0.000
组别 × 处理	0.028	1	0.028	44.680	0.000
误差	0.013	20	0.001		
总	0.105	23			
<i>Bax</i>					
组别	0.094	1	0.094	1353.000	0.000
处理	0.044	1	0.044	632.300	0.000
组别 × 处理	0.037	1	0.037	524.700	0.000
误差	0.001	20	0.000		
总	0.176	23			

维生素 E 亚型,较维生素 E 具有更好的活性、营养作用、抗炎反应等功能<sup>[30]</sup>。此外,其一大优势是即使在较高剂量下,GT3 也几乎没有副作用<sup>[31]</sup>。GT3 可以选择性抑制磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT)信号转导通路、Ras/Raf/细胞外信号调节激酶(ERK)信号转导通路、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGCR)和转录因子核因子-κB(NF-κB),参与调节机体的各种生理活动<sup>[32]</sup>。转录组学分析表明,GT3 调节炎症、蛋白转运和细胞氧化还原相关基因的表达<sup>[33]</sup>,具有诱导细胞凋亡、抑制克隆形成、抑制细胞存活和细胞增殖的功能<sup>[34]</sup>。本研究结果显示,*DMD* 基因敲除模型小鼠经 GT3 溶液处理后卫星细胞凋亡率和 DNA 损伤率降低,抗凋亡基因 *Bcl-xl* 表达上调,促凋亡基因 *Puma* 和 *Bax* 表达下降。*DMD* 基因敲除小鼠的肌肉干细胞具有高水平的衰老细胞和活性氧产生的特征。*DMD* 基因敲除小鼠的这些异常可以通过营养药物得到部分改善<sup>[26]</sup>。Vitiello 等<sup>[35]</sup>发现,胺氧化酶抑制剂沙芬酰胺

可以减弱 *DMD* 基因敲除小鼠卫星细胞的氧化应激损害。另一方面,研究表明 GT3 能够提高肌肉干细胞的增殖能力以修复 *DMD* 基因敲除小鼠的肌肉损伤<sup>[36]</sup>。此外,*DMD* 基因敲除小鼠肌纤维 CD45<sup>+</sup> 细胞增加,表明肌纤维炎性浸润,这种炎症反应可以通过药物改善<sup>[37]</sup>。这些研究均表明,通过药物的营养作用可以直接对自体干细胞进行保护,减少干细胞凋亡和 DNA 损伤等危险因素,从而达到保护干细胞的功能,提供了一种通过控制干细胞损伤以治疗 *DMD* 的新措施。

本研究尚存不足之处:一方面,本研究采用的 *DMD* 基因敲除小鼠模型尚无法很好地模拟人类疾病进程<sup>[38]</sup>;另一方面,GT3 作为一种抗氧化营养保护剂,虽然对控制卫星细胞的凋亡及 DNA 损伤具有一定作用,但如何寻找到一种更广泛有效的控制干细胞损伤的物质,尚待更多探究。综上所述,*DMD* 疾病进程卫星细胞数目减少,细胞老化率、凋亡率和 DNA 损伤率增加,通过予以 GT3 溶液可以减轻卫



**表 7** GT3 溶剂与 GT3 溶液处理的 *DMD* 基因敲除组与野生型组小鼠卫星细胞 DNA 损伤率的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

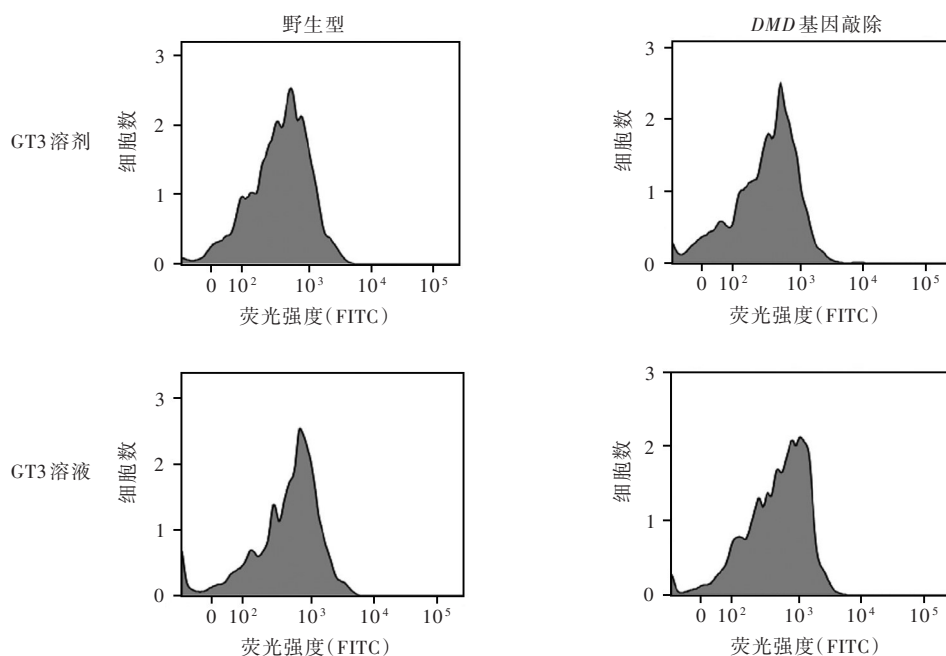
**Table 7.** Comparison of satellite cells DNA damage rates between *DMD* knockout group and WT group treated with GT3 solvent or GT3 solution ( $\bar{x} \pm s$ )

处理	组别	
	野生型组	<i>DMD</i> 基因敲除组
GT3 溶剂	651.67 ± 143.41	979.00 ± 154.35
GT3 溶液	535.33 ± 35.25	672.67 ± 31.47

**表 8** GT3 溶剂与 GT3 溶液处理的 *DMD* 基因敲除组与野生型组小鼠卫星细胞 DNA 损伤率的析因设计方差分析表

**Table 8.** ANOVA for factorial design of satellite cells DNA damage rates in *DMD* knockout group and WT group treated with GT3 solvent or GT3 solution

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
组别	323 873.000	1	323 873.000	27.790	0.044
处理	267 971.000	1	267 971.000	22.990	0.000
组别 × 处理	54 149.000	1	54 149.000	4.464	0.000
误差	233 109.000	20	11 655.000		
总	879 102.000	23			



**图 6** 流式细胞术检测卫星细胞 DNA 损伤率: 经 GT3 溶剂处理的 *DMD* 基因敲除小鼠卫星细胞  $\gamma$ H2AX 抗体平均荧光强度为  $979.00 \pm 154.35$ , 经 GT3 溶液处理者为  $672.67 \pm 31.50$

**Figure 6** Flow cytometry was used to detect satellite cells DNA damage rate: the MFI of satellite cells in *DMD* knockout mice treated with GT3 solvent was  $979.00 \pm 154.35$ , and the MFI of satellite cells treated with GT3 solution was  $672.67 \pm 31.47$ .

星细胞凋亡和 DNA 损伤, 为延缓疾病进展提供一种新的可能。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] Practice Guidelines for Diagnosis and Treatment of Genetic Diseases Writing Group, Medical Genetics Branch, Chinese Medical Association. Clinical practice guidelines for Duchenne muscular dystrophy [J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2020, 37:258-262.[中华医学会医学遗传学分会遗传病临床实践指南撰写组. 杜氏进行性肌营养不良的临床实践指南 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, 37:258-262.]

[2] Thomas GD. Functional muscle ischemia in Duchenne and Becker muscular dystrophy[J]. Front Physiol, 2013, 4:381.

[3] Zhang S, Wu SW. Therapeutic progress of Duchenne muscular dystrophy[J]. Shi Yong Yao Wu Yu Lin Chuang, 2019, 22:897-

903.[张淑, 吴士文. 杜氏型肌营养不良症治疗进展[J]. 实用药物与临床, 2019, 22:897-903.]

[4] Sebori R, Kuno A, Hosoda R, Hayashi T, Horio Y. Resveratrol decreases oxidative stress by restoring mitophagy and improves the pathophysiology of dystrophin-deficient mdx mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018:ID9179270.

[5] MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers [J]. J Biophys Biochem Cytol, 1961, 9:493-495.

[6] von Maltzahn J, Jones AE, Parks RJ, Rudnicki MA. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110:16474-16479.

[7] Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration [J]. Development, 2011, 138:3625-3637.

[8] Chang NC, Chevalierm FP, Rudnicki MA. Satellite cells in muscular dystrophy: lost in polarity[J]. Trends Mol Med, 2016, 22:479-496.

- [9] Singh VK, Wise SY, Fatanmi OO, Scott J, Romaine PL, Newman VL, Verma A, Elliott TB, Seed TM. Progenitors mobilized by gamma-tocotrienol as an effective radiation countermeasure[J]. *PLoS One*, 2014, 9:e114078.
- [10] Zhao L, Ha JH, Okla M, Chung S. Activation of autophagy and AMPK by gamma-tocotrienol suppresses the adipogenesis in human adipose derived stem cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58:569-579.
- [11] Peh HY, Tan WSD, Chan TK, Pow CW, Foster PS, Wong WSF. Vitamin E isoform  $\gamma$ -tocotrienol protects against emphysema in cigarette smoke-induced COPD[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 110:332-344.
- [12] Pathak R, Ghosh SP, Zhou D, Hauer-Jensen M. The vitamin E analog gamma-tocotrienol (GT3) and statins synergistically up-regulate endothelial thrombomodulin (TM) [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17:1937.
- [13] He RJ, Zhang C. Immune mechanism and treatment of skeletal muscle damage in Duchenne muscular dystrophy [J]. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2016, 49:574-578. [何若洁, 张成. Duchenne型肌营养不良症骨骼肌损害的免疫机制及其治疗研究[J]. *中华神经科杂志*, 2016, 49:574-578.]
- [14] Bella P, Farini A, Banfi S, Parolini D, Tonna N, Meregalli M, Belicchi M, Erratico S, D'Ursi P, Bianco F, Legato M, Ruocco C, Sitzia C, Sangiorgi S, Villa C, D'Antona G, Milanese L, Nisoli E, Mauri P, Torrente Y. Blockade of IGF2R improves muscle regeneration and ameliorates Duchenne muscular dystrophy[J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12:e11019.
- [15] Hollinger K, Chamberlain JS. Viral vector-mediated gene therapies[J]. *Curr Opin Neurol*, 2015, 28:522-527.
- [16] Li Z. Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Er Ke Yao Xue Za Zhi*, 2018, 24:49-52. [李竹. Duchenne型进行性肌营养不良症药物治疗研究进展[J]. *儿科药理学杂志*, 2018, 24:49-52.]
- [17] Evano B, Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cells in comfort and stress[J]. *NPJ Regen Med*, 2018, 3:24.
- [18] Zhang HY, Liu ZX, Li ZP, Liu JY. Research progress of muscle derived stem cells[J]. *Yi Xue Lin Chuang Yan Jiu*, 2015, 32:191-193. [张洪雨, 刘志鑫, 李兆鹏, 刘建宇. 肌源干细胞的研究进展[J]. *医学临床研究*, 2015, 32:191-193.]
- [19] Sousa-Victor P, Gutarra S, García-Prat L, Rodríguez-Ubrea J, Ortet L, Ruiz-Bonilla V, Jardí M, Ballestar E, González S, Serrano AL, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence [J]. *Nature*, 2014, 506:316-321.
- [20] Almada AE, Wagers AJ. Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17:267-279.
- [21] Lu A, Poddar M, Tang Y, Proto JD, Sohn J, Mu X, Oyster N, Wang B, Huard J. Rapid depletion of muscle progenitor cells in dystrophic mdx/utrophin-/- mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23:4786-4800.
- [22] Dumont NA, Wang YX, von Maltzahn J, Pasut A, Bentzinger CF, Brun CE, Rudnicki MA. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division [J]. *Nat Med*, 2015, 21:1455-1463.
- [23] Lund TC, Grange RW, Lowe DA. Telomere shortening in diaphragm and tibialis anterior muscles of aged mdx mice [J]. *Muscle Nerve*, 2007, 36:387-390.
- [24] Lin C, Han G, Ning H, Song J, Ran N, Yi X, Seow Y, Yin H. Glycine enhances satellite cell proliferation, cell transplantation, and oligonucleotide efficacy in dystrophic muscle [J]. *Mol Ther*, 2020, 28:1339-1358.
- [25] Hall A, Fontelonga T, Wright A, Bugda Gwilt K, Widrick J, Pasut A, Villa F, Miranti CK, Gibbs D, Jiang E, Meng H, Lawlor MW, Gussoni E. Tetraspanin CD82 is necessary for muscle stem cell activation and supports dystrophic muscle function [J]. *Skelet Muscle*, 2020, 10:34.
- [26] Zhang H, Ryu D, Wu Y, Gariani K, Wang X, Luan P, D'Amico D, Ropelle ER, Lutolf MP, Aebbersold R, Schoonjans K, Menzies KJ, Auwerx J. NAD<sup>+</sup> repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice [J]. *Science*, 2016, 352:1436-1443.
- [27] Han Y, Chen DX, Guo HL. Advances in DNA damage response [J]. *Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi*, 2013, 20:1775-1778. [韩悦, 陈德喜, 郭洪亮. DNA损伤应答通路研究现状[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20:1775-1778.]
- [28] Sun C, Serra C, Lee G, Wagner KR. Stem cell-based therapies for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Exp Neurol*, 2020, 323:113086.
- [29] Verhaart IEC, Aartsma-Rus A. Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15:373-386.
- [30] Niu LL, Xu WL, Liu L, He SH, Mi YQ, Liu QH, Lu ZX. Advances in biological activity of  $\gamma$ -tocotrienol and its mechanism [J]. *Shi Pin Gong Ye Ke Ji*, 2016, 37:374-377. [牛玲玲, 徐伟丽, 刘蕾, 何胜华, 米雅清, 刘巧红, 鲁兆新.  $\gamma$ -生育三烯醇的生物活性及其作用机理研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37:374-377.]
- [31] Suman S, Datta K, Chakraborty K, Kulkarni SS, Doiron K, Fornace AJ Jr, Sree Kumar K, Hauer-Jensen M, Ghosh SP. Gamma-tocotrienol, a potent radioprotector, preferentially upregulates expression of anti-apoptotic genes to promote intestinal cell survival [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60:488-496.
- [32] Ahsan H, Ahad A, Iqbal J, Siddiqui WA. Pharmacological potential of tocotrienols: a review [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2014, 11:52.
- [33] Tang KD, Liu J, Russell PJ, Clements JA, Ling MT. Gamma-tocotrienol induces apoptosis in prostate cancer cells by targeting the Ang-1/Tie-2 signalling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20:1164.
- [34] Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB.  $\gamma$ -Tocotrienol suppresses growth and sensitises human colorectal tumours to capecitabine in a nude mouse xenograft model by down-regulating multiple molecules [J]. *Br J Cancer*, 2016, 115:814-824.
- [35] Vitiello L, Marabita M, Sorato E, Nogara L, Forestan G, Mouly V, Salviati L, Acosta M, Blaauw B, Canton M. Drug repurposing for Duchenne muscular dystrophy: the monoamine oxidase B inhibitor safinamide ameliorates the pathological phenotype in mdx mice and in myogenic cultures from DMD patients [J]. *Front Physiol*, 2018, 9:1087.
- [36] Chen CC, Liu TY, Huang SP, Ho CT, Huang TC. Differentiation and apoptosis induction by lovastatin and  $\gamma$ -tocotrienol in HL-60 cells via Ras/ERK/NF- $\kappa$ B and Ras/Akt/NF- $\kappa$ B signaling dependent down-regulation of glyoxalase 1 and HMG-CoA reductase [J]. *Cell Signal*, 2015, 27:2182-2190.
- [37] Ouisse LH, Remy S, Lafoux A, Larcher T, Tesson L, Chenouard V, Guillonnet C, Brussele L, Vimond N, Rouger K, Péréon Y, Chenouard A, Gras-Le Guen C, Braudeau C, Josien R, Huchet C, Anegón I. Immunophenotype of a rat model of Duchenne's disease and demonstration of improved muscle strength after Anti-CD45RC antibody treatment [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2131.
- [38] Chamberlain JS, Metzger J, Reyes M, Townsend D, Faulkner JA. Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma [J]. *FASEB J*, 2007, 21:2195-2204.

(收稿日期:2022-09-08)

(本文编辑:袁云)