

自噬在 Duchenne 型肌营养不良中的研究

周瑾瑕, 李东方, 毕方方

中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘要:目的 检测 Duchenne 型肌营养不良症 (DMD) 患者骨骼肌中 LC3 和 p62 的表达情况, 分析自噬在 DMD 骨骼肌细胞坏死中的作用。方法 收集 2008 年 1 月 ~ 2015 年 5 月在我院就诊的病理确诊为 DMD 的患者 (DMD 组, 81 例), 另以怀疑为肌病, 但肌肉病理未见明显病变者为对照组 (6 例)。所有入选者均行心肌酶学、肌电图、骨骼肌活检常规组织学和酶学染色、抗 dystrophin-N, -C, -R 和抗 dysferlin 免疫组织化学染色。检测其中 6 例 DMD 患者及对照组骨骼肌中 LC3 和 p62 的表达。结果 81 例 DMD 患者均为男性, 起病年龄 (4.60 ± 2.35) 岁, 首发症状多以双下肢起病为主。血清肌酸激酶值的高峰出现在患者年龄的 6 ~ 8 岁, 随着肌细胞明显坏死, 肌酸激酶水平下降, 但仍高于正常。在 DMD 患者骨骼肌中, 组织病理均示典型肌营养不良改变。半定量 Western blot 提示 DMD 患者骨骼肌中 LC3-II 的表达降低, 而 p62 表达显著升高。结论 自噬功能障碍可能参与了 DMD 骨骼肌细胞坏死的病理生理过程。

关键词: Duchenne 型肌营养不良症; 肌酸激酶; 自噬

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.04.005

Role of autophagy in Duchenne muscular dystrophy

ZHOU Jin-Xia, LI Dong-Fang, BI Fang-Fang. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: BI Fang-Fang, 119072898@qq.com

Abstract: Objective To investigate the expression of microtubule-associated protein I light chain 3 (LC3) and p62 in skeletal muscle in patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD) and the role of autophagy in necrosis of skeletal muscle cells. **Methods** A total of 81 patients with pathologically confirmed DMD who visited our hospital from January 2008 to May 2015 were enrolled as DMD group, and 6 patients who were suspected of myopathy and had no marked muscle lesions were enrolled as control group. Myocardial enzyme examination, electromyography, histological and enzymatic staining in skeletal muscle biopsy, and anti-dystrophin-N, -C, -R and anti-dysferlin immunohistochemical staining were performed for all subjects. The expression of LC3 and p62 in skeletal muscle was measured for 6 DMD patients and the control group. **Results** All of the 81 DMD patients were male with a mean onset age of 4.60 ± 2.35 years, and the initial symptom was mainly muscle weakness in the lower limbs. Serum creatine kinase reached a peak level at an age of 6 ~ 8 years and then gradually decreased with increased necrosis of myocytes. Histopathological examination showed typical muscular dystrophy in skeletal muscle in DMD patients. Semi-quantitative Western blot showed a reduction in the expression of LC3-II and an increase in the expression of p62 in skeletal muscle in DMD patients. **Conclusions** Autophagy dysfunction may be involved in the pathophysiological process of skeletal muscle cell necrosis in DMD.

Key words: Duchenne muscular dystrophy; creatine kinase; autophagy

Duchenne 型肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 一种罕见的全身肌肉进行性消耗和运动功能减退的 X 染色体隐性致死性遗传性肌

肉疾病^[1]。其临床特点为进行性肌无力和肌萎缩伴小腿腓肠肌假性肥大, 病理表现为线粒体肿胀及受损、蛋白质聚集物、肌浆网膨胀等。DMD 的发病

基金项目: 国家自然科学基金 (81401065; 81571256)

收稿日期: 2017-03-06; 修回日期: 2017-06-08

作者简介: 周瑾瑕 (1981-), 女, 博士, 主要从事肌病及神经退行性疾病的临床研究。

通信作者: 毕方方 (1977-), 男, 博士, 副教授, 主要从事肌病及神经退行性疾病的临床研究。Email: 119072898@qq.com。

机制尚未明确,目前该疾病无法完全治愈。

自噬是一种存在于真核细胞中的“自我消化”过程,能抵御病原体的入侵,并对延缓衰老和延长寿命等均具有积极作用^[2]。当自噬被干扰,可导致异常蛋白质和细胞器的聚集,影响正常细胞生长,诱发多种急慢性疾病。微管结合蛋白轻链3(microtubule-associated protein I light chain 3, LC3)是哺乳动物常见的自噬小体标记物,其参与了自噬的形成^[3]。胞浆型LC3(即LC3-I)转化为膜型的LC3-II,从而启动自噬。LC3-II能调控自噬小体的形成,因此,其含量在某种程度上能反映细胞自噬活性。p62是哺乳动物选择性自噬的底物及调节蛋白,它与LC3相互作用,在自噬体形成和降解过程中起重要作用^[4]。

近年来有学者发现自噬功能障碍参与了DMD表型的mdx小鼠肌细胞坏死进程,从而提出调节自噬有望成为一种新的药物靶点用来治疗DMD^[5]。然而,迄今为止尚无关于DMD患者骨骼肌中自噬表达的相关研究。本研究采用半定量Western blot检测LC3和p62在DMD患者骨骼肌细胞中的表达,判断自噬功能与DMD患者骨骼肌细胞的坏死的关系,为研究调节自噬功能作为新的DMD治疗策略奠定基础。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

入选2008年1月~2015年5月在中南大学湘雅医院神经内科病理确诊DMD患者81例,对照组为同时期就诊怀疑肌病,病理学检查未见明显异常者6例。所有入选者均进行了肌电图、血清心肌酶学检查、骨骼肌活检、常规酶组织化学染色、dystrophin蛋白及dysferlin蛋白免疫组织化学染色检查。

1.2 研究方法

1.2.1 常规酶组织化学染色 所有参与者均进行肱二头肌肌肉活检术。离体新鲜骨骼肌标本快速制成冰冻标本。将DMD组和对照组的冷冻骨骼肌标本进行连续8 μm的冰冻切片,行标准化NADH-TR染色、苏木素-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)、细胞色素C氧化酶染色、改良Gomori三原色染色、琥珀酸脱氢酶染色、酸性磷酸酶染色、AT-Pase染色、油红O染色及过碘酸雪夫染色。

1.2.2 免疫组织化学染色 将前述切好的8 μm的冰冻切片自然晾干后进行免疫组化染色(ABC

法)。切片浸入-20℃丙酮溶液10 min,0.01 M PBS漂洗3次;4℃甲醇/0.3%双氧水(H₂O₂)漂洗30 min;0.01 M PBS再次漂洗3次;0.05体积分数的小牛血清/0.01 M PBS行背景封闭(37℃, 15 min);I抗(抗Dystrophin-N,-C,-R抗体1:50或抗dysferlin抗体1:50)4℃置48 h;0.01 M PBS漂洗3次;II抗(1:200)37℃置1.5 h;0.01 M PBS漂洗3次;AB复合物(1:100)37℃置1.5 h;0.01 M PBS漂洗3次;Tris-HCL缓冲液37℃孵育15 min;DAB显色5 min;蒸馏水漂洗。自来水冲洗充分后,苏木素轻度复染,用梯度乙醇脱水和二甲苯脱水、透明,最后中性树脂胶封片

1.2.3 蛋白提取及Western blot 随机挑选6例DMD及6例对照组骨骼肌组织0.05 g加入300 μl RIPA裂解液于匀浆器中反复研磨后置冰上裂解30 min,随后4℃,12000 rpm离心15 min,留取上清,-80℃保存。BCA蛋白定量试剂盒(Sigma, USA)进行蛋白浓度测定。取蛋白样本50 μg/孔,加入5X SDS-PAGE上样缓冲液,调整最终上样体积为10 μl,煮沸10 min后进行SDS-PAGE电泳,转膜,10% BSA溶液封闭,加入稀释好的抗体工作液,4℃过夜孵育,TBST洗膜3次。再加入HRP标记的抗人IgG二抗,TBST洗膜3次后,加上化学发光底物,于暗室内压片、曝光、显影和定影。

1.3 统计学分析

运用SPSS 19.0进行统计学分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,临床资料组间比较采用Mann-Whitney U检验,半定量Western blot组间比较采用t检验。当P<0.05时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料分析

DMD组在年龄、性别与对照组无明显统计学差异(P>0.05);但DMD组分别有3.7%、14.8%和7.4%患者有早产史、缺氧史和阳性家族史,而对照组均无相关个人史。见表1。

表1 DMD组与对照组基本临床信息比较 [n(%); $\bar{x} \pm s$]

项目	DMD(n=81)	对照组(n=6)	P值
年龄	10.11±3.08	12.24±4.29	0.47
性别(男/女)	81/0	6/0	1.0
起病年龄	4.60±2.35	-	-
早产儿	3(3.70)	0	-
出生时缺氧史	12(14.81)	0	-
家族史	6(7.41)	0	-

2.2 临床资料

DMD 患者首发症状表现多以双下肢起病为主,其中双下肢无力 51 例(62.96%),四肢无力 3 例(3.70%)。另以发现转氨酶升高为主诉者 9 例(11.11%),肌酶升高为主诉者 3 例(3.70%)。78 例患者有不同程度的腓肠肌肥大坚韧、翼状肩胛、“鸭步”步态和 Gower 征阳性(96.29%)。39 例患者出现程度不同的肌萎缩(48.15%),以肢体近端萎缩多见。

对照组首发症状表现为双上眼睑下垂 3 例,四肢乏力 2 例,肝功能异常 1 例。所有对照组患者均无肌萎缩、腓肠肌肥大坚韧、翼状肩胛、步态异常、Gower 征及病理征。6 例对照组患者肌电图检查提示无异常者 1 例,肌源性损害 2 例,类肌源性损害 3 例。

2.3 血清肌酸激酶水平检测

81 例 DMD 患者血清肌酸激酶(creatine kinase, CK)均显著升高,位于 5547~26589 U/L 之间(正常值:24~190 U/L)。DMD 患者血清 CK 值在发病初期随病程增加呈上升趋势,持续约 3~4 年,随后呈整体下降趋势。对照组中除 1 例患者 CK 值轻度升高(205.5 U/L)外,余 5 例 CK 值均在正常范围。见图 1。

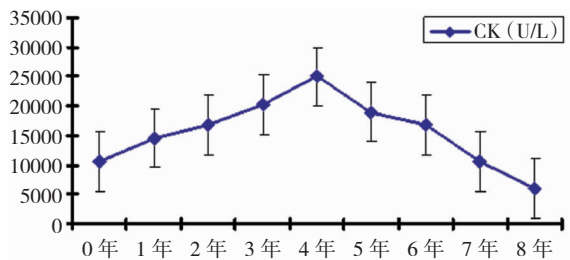


图 1 DMD 患者血清 CK 值与病程变化趋势图

2.4 常规酶组织化学染色

81 例 DMD 患者骨骼肌活检均呈慢性肌营养不良改变。光镜下 HE 染色见大量萎缩肌纤维,变性、坏死和再生肌纤维,以及炎性细胞浸润(图 2A 和图 2B)。ATPase 染色可见呈镶嵌式分布的两型肌纤维,无同型肌纤维群化现象。细胞色素 C 氧化酶染色、NADH 脱氢酶(图 3A 和图 3B)和琥珀酸脱氢酶染色均可见部分肌纤维酶活性局限性增高或减低。12 例油红 O 染色可见部分肌纤维内脂滴增多。酸性磷酸酶染色可见其中 57 例在炎性细胞浸润区和肌细胞变性坏死区可见酶活性增高

(图 3A 和图 3B),24 例未见明显异常。Gomori 染色及过碘酸雪夫染色未见明显异常。

6 例对照组光镜下 HE 染色肌纤维无明显变性、坏死,其形态大小正常,结缔组织无明显增生,常规酶组织化学均未见明显异常。

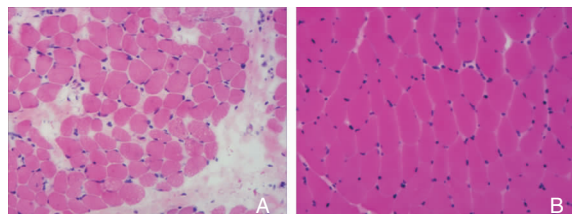


图 2 HE 染色($\times 100$)

注:A:DMD 组,肌纤维大小不等,圆形化,肌间隙增宽;B:对照组,肌纤维大小形态基本一致。

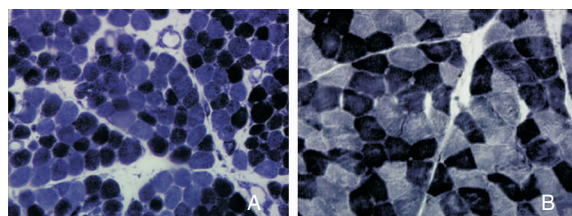


图 3 NADH 脱氢酶染色($\times 100$)

注:A:DMD 组,部分肌纤维酶活性局限性增高或减低;B:对照组,未见明显异常。

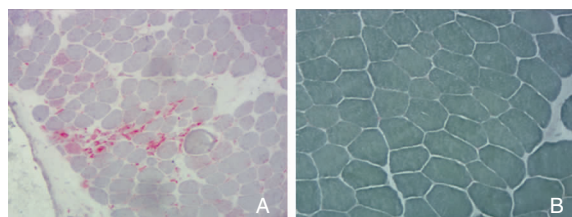


图 4 酸性磷酸酶染色($\times 100$)

注:A:DMD 组,肌纤维变性、坏死,炎性细胞浸润区域酶活性增高;B:对照组,未见明显异常。

2.5 免疫组织化学染色

81 例 DMD 患者抗 dystrophin-N,-C,-R 染色中均有一型或两型肌纤维膜完全缺失(图 5A)。所有 DMD 患者抗 dysferlin 染色均正常。所有对照组骨骼肌抗 dystrophin-N,-C,-R 和抗 dysferlin 染色均未见明显异常(图 5B)。

2.6 半定量 Western blot

半定量 Western blot 表明在 DMD 患者骨骼肌中 LC3-I 的表达量高于对照组骨骼肌,但 LC3-II 在

DMD 患者骨骼肌中的表达显著低于对照组骨骼肌 (图 6 和图 7); 而 DMD 患者骨骼肌中 p62 蛋白的表达明显高于对照组 (图 8 和图 9)。

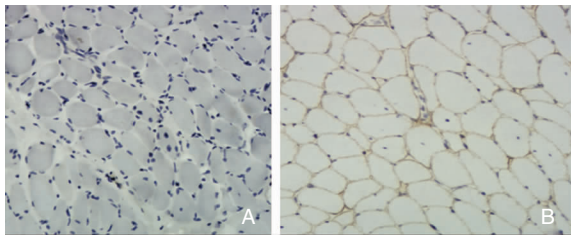


图 5 抗 Dys-N 染色 (×100)

注: A: DMD 组, 肌纤维膜 Dys-N 蛋白表达缺失; B: 对照组表达正常。

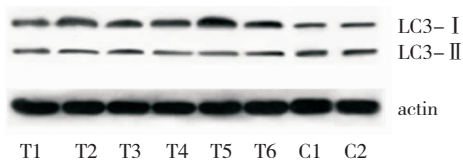


图 6 Western blot 显示 DMD 患者骨骼肌和对照组骨骼肌中 LC3 蛋白表达

注: T1 ~ T6 为 DMD 组; C1、C2 为对照组; actin 为内参蛋白。

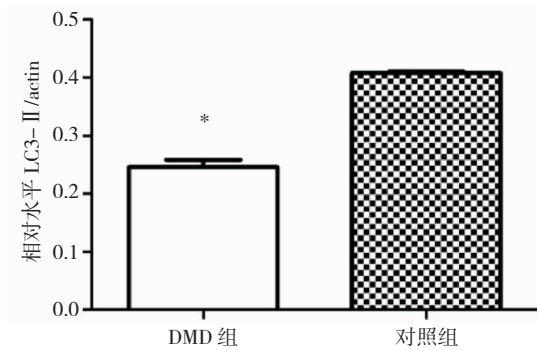


图 7 DMD 组和对照组骨骼肌中 LC3-II 表达统计图

注: * $P < 0.05$ 。

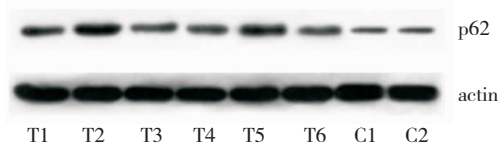


图 8 Western blot 显示 DMD 患者骨骼肌和对照组骨骼肌中 p62 蛋白表达

注: T1 ~ T6 为 DMD 组; C1、C2 为对照组; actin 为内参蛋白。

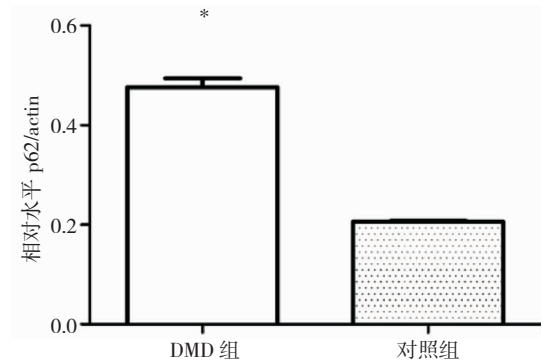


图 9 DMD 组和对照组骨骼肌中 p62 表达统计图

注: * $P < 0.05$ 。

3 讨论

自噬是真核细胞中广泛存在的降解/再循环系统。一方面它可以帮助细胞清除不正常构型的大分子蛋白质、降解受损的细胞器及入侵微生物,维持细胞的自稳态;另一方面自噬作为一种降解途径,在生长因子不足、营养物质缺乏时,通过降解自身坏死和功能失调物质来生成核苷酸和氨基酸等,实现细胞内物质的再循环和再利用。

LC3 是酵母 ATG8 基因在哺乳动物细胞中的同源物,与其它自噬基因共同参与前自噬泡形成。LC3 除定位在自噬体分隔膜上,还存在于自噬体形成各阶段的内外膜上。目前,LC3 被认为是自噬比较特异的诊断指标^[3]。LC3 有可溶形式的 LC3-I 和脂化形式的 LC3-II 之分。当自体吞噬发生时,LC3 的表达上调,生成有活性的 LC3-I,并经泛素样加工修饰,与磷脂酰乙醇胺结合,生成 LC3-II 并与溶酶体融合实现降解。LC3-II 的数量或者 LC3-II/LC3-I 的比值与自噬泡的数量成正比关系,在某种程度上反映了细胞的自噬活性。

p62 是哺乳动物选择性自噬的底物及调节蛋白,同时也是细胞信号传导中心,它能调节不同的细胞进程。选择性自噬可降解蛋白聚集体、异常折叠蛋白、受损细胞器、病毒、细菌以及核糖体,在自噬的初始阶段,p62 能招募无法被正常转运的异常折叠蛋白,使其在细胞浆形成聚集小体,并通过泛素化聚集体后形成更大的聚合体,被可以和 ATG8 蛋白结合的调节蛋白或受体识别^[6],发挥自噬降解作用。

DMD 是因抗肌萎缩蛋白基因突变导致肌无力和肌萎缩,肌变性、坏死、再生循环,最终肌细胞再生疲乏,剩余肌细胞数目减少,同时慢性炎症引起

肌纤维被脂肪组织及结缔组织替代。DMD 患者存在连续性和进展性的骨骼肌损伤。目前较多研究均强调了自噬在肌肉组织调控中起了至关重要的作用^[7],如:维持细胞结构和成分,应激反应等,而自噬功能障碍可引起肌纤维的变性、坏死。Bonaldo 等研究曾提出:自噬功能障碍是各型肌营养不良症肌细胞坏死机制^[8]。而 Palma 等^[5]通过观察 4 个月大的 mdx 小鼠和野生型(WT)小鼠胫骨前肌(TA)和隔膜肌肉中自噬标记物的表达发现:脂化形式的 LC3(LC3-II)在 mdx 小鼠的胫骨前肌和隔膜肌的表达与 WT 小鼠相比是减少的,p62 在 mdx 小鼠的胫骨前肌和隔膜肌的表达与 WT 小鼠相比是增加的,提示自噬降解的异常导致了异常蛋白质和细胞器的聚集,证实了自噬在 mdx 小鼠中是减少的。进而科学家们通过一系列动物实验发现重新激活自噬可改善 DMD 表型的 mdx 小鼠骨骼肌细胞。

本研究 DMD 患者骨骼肌与对照组骨骼肌相比:LC3-II 的表达明显降低,p62 的表达明显增高。此结果与 mdx 小鼠胫骨前肌和隔膜肌中自噬标记物的表达一致,因此,我们认为:存在于 mdx 小鼠骨骼肌中的自噬功能障碍同样存在于 DMD 患者骨骼肌中。

LC3-II 的减少是自噬受损的一个明确信号,而 p62 水平的增加进一步证实了自噬潮的减少,同时在超微结构下也能观察到受损细胞器的积累。而有效的重新激活自噬,能使受损骨骼肌中 LC3-II 的水平较前增加和 p62 的水平较前降低,且超微结构下可见骨骼肌病理表现得到纠正。因此,我们认为:自噬功能障碍存在于 DMD 患者骨骼肌中,并参与了 DMD 骨骼肌细胞的坏死过程,重新激活自噬有望能扭转 DMD 骨骼肌细胞坏死进程,从而产生有益影响。

综上所述,本研究发现 DMD 患者骨骼肌细胞

中 LC3-II 的表达较对照组明显降低,p62 的表达较对照组明显增高,提示 DMD 患者骨骼肌自噬异常可能是自噬潮受到抑制导致的自噬减少。因此,调整合适的自噬潮,有望延缓 DMD 的肌细胞死亡,成为一种新的 DMD 治疗策略。

参 考 文 献

- [1] Viggiano E, Ergoli M, Picillo E, et al. Determining the role of skewed X-chromosome inactivation in developing muscle symptoms in carriers of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Hum Genet*, 2016, 135(7): 685-698.
- [2] Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, et al. Aging and Autophagy in the Heart [J]. *Circ Res*, 2016, 118(10): 1563-1576.
- [3] Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatio-temporal regulation of autophagy [J]. *BMB Rep*, 2016, 49(8): 424-430.
- [4] Moscat J, Karin M, Diaz-Meco MT. p62 in Cancer: Signaling Adaptor Beyond Autophagy [J]. *Cell*, 2016, 167(3): 606-609.
- [5] De Palma C, Perrotta C, Pellegrino P, et al. Skeletal muscle homeostasis in duchenne muscular dystrophy: modulating autophagy as a promising therapeutic strategy [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6: 188.
- [6] Zhang H, Chang JT, Guo B, et al. Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Autophagy*, 2015, 11(1): 9-27.
- [7] Fiacco E, Castagnetti F, Bianconi V, et al. Autophagy regulates satellite cell ability to regenerate normal and dystrophic muscles [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(11): 1839-1849.
- [8] Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy [J]. *Dis Model Mech*, 2013, 6(1): 25-39.