

综述

假性肥大型肌营养不良的治疗进展

许田田 综述 蓝丹 审校

(广西医科大学第一附属医院儿科, 广西南宁 530021)

[摘要] 假性肥大型进行性肌营养不良是一类最常见的 X 连锁隐性遗传性肌肉疾病, 进行性肌无力是主要的临床特征, 抗肌萎缩蛋白基因的突变是致病原因。治疗方法一直是研究热点, 近年来随着分子生物学诊断治疗技术的日臻成熟, 假性肥大型进行性肌营养不良的治疗也有新的突破, 该文从传统疗法、基因疗法、细胞移植疗法等方面总结其治疗进展。
[中国当代儿科杂志, 2015, 17(3): 294-298]

[关键词] 假性肥大型肌营养不良; 基因疗法; 细胞移植; 治疗

Advance in therapy for Duchenne/Becker muscular dystrophy

XU Tian-Tian, LAN Dan. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Email: land6785@163.com)

Abstract: Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD) is the most common X-linked recessive inherited neuromuscular disease, characterized by progressive muscle weakness. Mutations in the dystrophin gene are responsible for this disease. Treatment for this disease has always been a topic of interest. With the development of diagnosis and treatment technology of molecular biology, promising therapies have been developed. This review article summarizes the advance in traditional therapy, cell transplantation and gene therapy for this disease.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(3): 294-298]

Key words: Duchenne/Becker muscular dystrophy; Gene therapy; Cell transplantation; Therapy

假性肥大型肌营养不良是一类最常见的 X 连锁隐性遗传性肌肉疾病, 分为杜氏肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 和贝氏肌营养不良症 (Becker muscular dystrophy, BMD)。DMD 临床症状较重, 患儿多在 2~5 岁发病, 表现为步态异常、易摔跤、上楼困难、起蹲困难、智力低下等临床症状^[1], 约 13 岁左右丧失行走能力, 19 岁左右死于心、肺功能衰竭^[2]。BMD 临床症状与 DMD 类似, 但相对较轻。该病主要累及男性, 女性多为无症状携带者, 但约 10% 的女性携带者可有轻度的临床表现, 极少数出现类似于男性患者的严重症状^[2]。抗肌萎缩蛋白基因 (dystrophin) 突变是本病的发病原因, 该基因定位于 Xp21, 是至今为止已知的人类最大基因 (2500 kb), 包括

79 个外显子、78 个内含子和 8 个启动子。该基因突变形式多样, 其中大片段缺失约占 DMD 的 65% 和 BMD 的 85%; 大片段重复约占 DMD/BMD 的 5%~10%, 其余的突变为微小突变, 包括碱基的缺失、插入、置换、内含子突变、复杂的染色体重排等^[3]。基因突变导致抗肌萎缩蛋白缺失或功能缺陷、损伤肌细胞膜, 使细胞内的成分如肌酸激酶逸出和钙离子内流, 造成肌肉的变性、坏死, 脂肪、结缔组织增生, 导致患儿发病。对假性肥大型肌营养不良的治疗一直是国内外学者的研究热点, 糖皮质激素及功能锻炼可改善临床症状, 延缓病情进展; 而随着分子诊断技术的发展, 治疗方面也有新的突破, 现将治疗进展情况简要归纳。

[收稿日期] 2014-08-04; [接受日期] 2014-09-30

[作者简介] 许田田, 女, 硕士研究生。

1 糖皮质激素治疗

糖皮质激素是治疗 DMD 患儿的传统药物，其作用的具体机制尚不明确，可能与其抗炎、免疫抑制作用有关。糖皮质激素可延缓肌力及肌肉功能的衰退，降低脊柱侧弯的发生率，维持心、肺功能^[4-6]，改善患儿智力^[7]。日本学者将 553 例 DMD 的患儿分为泼尼松治疗组（242 例）与对照组（311 例）进行观察，发现泼尼松治疗可延长患儿保持行走能力的时间^[8]。加拿大的一项研究表明，糖皮质激素加血管紧张素转换酶抑制剂可使心肌病的发生率降低 62%，延缓心功能的下降，减少心功能衰竭所致的死亡^[9]。糖皮质激素的服药方案大致如下：（1）起始用药时间：不建议在早期尤其在 2 岁之前服药治疗，因为儿童的运动能力仍处于提升阶段；建议在运动能力提升进入稳定期（平均 4~6 岁）后开始服药治疗^[2]；（2）剂量与方式：美国神经病学会和小儿神经病学会推荐泼尼松的标准剂量为每日 0.75 mg/kg，如不良反应明显可将泼尼松减量至每日 0.3 mg/kg，但效果比标准剂量差，超过标准剂量使用并不能增加药物疗效；用药方式尚无统一意见，国外一项随机双盲对照试验显示每周 10 mg/kg 和每日 0.75 mg/kg，整体疗效及不良反应相当^[10]；（3）疗程：尚无明确规定，但多项临床试验表明，治疗 6 个月后患者的临床症状可有改善^[11]。常用的口服糖皮质激素制剂为泼尼松，新型的糖皮质激素地夫可特也有较好的疗效^[5,12]，推荐剂量为每日 0.9 mg/kg^[11]。长期服用糖皮质激素可能会导致一系列的不良反应，如库欣貌、高血压、骨折、白内障、体重增加、身材矮小、行为异常等^[13]。国外学者进行的一项糖皮质激素的长期疗法的回顾性研究认为长期糖皮质激素治疗（平均治疗时间 5.5 年）可显著延缓心肺功能的恶化，延长行走时间 3~5 年，且脊柱侧弯的发生率较非治疗组降低 80%，但治疗组患儿出现身材矮小、体重增加、白内障等不良反应^[5]；Houde 等^[14]对平均治疗时间为 66 个月的患儿随访 8 年，得出类似的结论；Merlini 等^[15]对 4 例长期糖皮质激素治疗的患儿随访 14 年发现，患儿 16~18 岁时仍能独立行走，左室射血分数大于 45%，但有 2 例患儿的呼吸功能较前降低，患儿出现的不良反应主要为身材矮小、青春期延迟。长

期使用糖皮质激素治疗可取得一定的效果，治疗过程中应注意观察患儿的耐受性及激素的不良反应，及时调整用量。

2 功能锻炼

功能锻炼可使患儿的运动障碍得到改善，如可延长患儿的步行时间、登梯时间等。国外一项随机对照试验纳入 30 例研究对象，试验组（17 例）进行腿和手臂的辅助踏车训练，对照组（13 例）不采取训练，24 周后观察训练效果，提示腿和手臂的辅助踏车训练可延缓肌力的恶化^[16]；也有学者发现 DMD 患儿对振动训练的耐受性较好，该训练有助于运动功能及肌力的维持^[17]。呼吸衰竭为患儿死亡的主要原因之一，在适当的体育活动及康复锻炼的同时进行呼吸肌的锻炼，可延缓呼吸衰竭的发生^[18]；心力衰竭是该病的另一个严重的并发症，其中心肌病和心律失常最为常见，可用药物干预，如血管紧张素受体抑制剂、 β 受体阻滞剂、利尿剂^[19]。

3 治疗无义突变的忽略异常终止密码子治疗法

蛋白质合成是生物按照从脱氧核糖核酸（DNA）转录得到的信使核糖核酸（mRNA）上的遗传信息转变为蛋白质或多肽链中的氨基酸排列顺序过程。当 mRNA 出现 UAG、UGA、UAA 等终止密码子时，蛋白质合成停止。约 13% 的患者因 dystrophin 基因的无义突变使终止密码子提前出现，导致核糖体合成缩短的、无功能的抗肌萎缩蛋白^[20]。氨基糖苷类抗生素可使 mdx 小鼠降低核糖体识别异常终止密码子的能力，跳过异常的终止密码子，继续合成抗肌萎缩蛋白^[21]；随后的临床试验发现无义突变的 DMD 患者使用庆大霉素治疗后，部分患者的抗肌萎缩蛋白表达增多，血清肌酸激酶的水平降低^[22]。但庆大霉素的肾毒性、耳毒性等不良反应以及必须注射给药等特点限制了它的临床应用^[23]。

PTC124 (ataluren) 同样能使核糖体忽略终止密码子，且不良反应较少。mdx 小鼠接受 PTC124 治疗 2~8 周后，其 dystrophin 的表达水平提升为野

生型小鼠的20%~25%，血清肌酸肌酶水平也明显下降^[24]。国外学者将PTC124应用于DMD患儿(38名)的治疗试验，28d后61%的患儿dystrophin表达增加，多数患儿血清肌酸激酶水平下降，药物无明显毒副作用，遗憾的是患儿的临床症状并无明显改善^[25]，因此，PTC124的治疗效果仍需进一步探索。

4 外显子跳跃疗法

根据阅读框架学说，如抗肌萎缩蛋白基因突变破坏了三联密码子的阅读框，密码子重新组合，即发生移码突变，突变点之后翻译的氨基酸种类和序列全部改变，临床表现为症状较重的DMD；如抗肌萎缩蛋白基因突变后仍保留三联密码子的阅读框，即发生整码突变，多肽链增加或减少几个氨基酸，而突变点前后翻译的氨基酸并未改变，临床则表现为症状较轻的BMD。92%的患儿临床表现符合“阅读框架学说”的特点，外显子跳跃疗法以整码突变和移码突变的原理为基础，通过选择性剪接恢复阅读框，以表达截短的有部分功能的抗肌萎缩蛋白，从而将杜氏表型改变为临床症状较轻的贝氏表型^[1]。据报道dystrophin基因缺失突变的患儿应用外显子跳跃疗法治疗，有效率高达90%^[26]。反义寡核苷酸(AOs)是一类化学合成的单链DNA，由20~25个碱基组成，可与前体mRNA上去除的外显子序列杂交，干扰剪接机制使突变的外显子不被剪切，诱导该外显子的跳跃来恢复阅读框^[27]。经化学或基因修饰的产物如磷酸二胺吗啉代寡核苷酸(PMOS)、2-O甲基反义寡核苷酸(PROs)可提高疗效，稳定性较好。该疗法在动物实验及临床试验取得了较好的治疗效果^[28-31]，且无明显不良反应的发生。在国外一项开放性的临床试验中，将12名患儿分为4组，每周分别注射不同剂量(分别0.5、2、4、6mg/kg)2-O甲基磷硫酰反义寡核苷酸(PRO051)5周，随后所有患儿每周再注射6mg/kg PRO051共12周，结果发现患儿6min步行距离较前增加，10名患儿的肌活检显示60%~100%的肌纤维可观察到抗肌萎缩蛋白的表达，且呈现剂量依赖性，治疗期间无明显不良反应，该治疗方法安全、有效、耐

受性好^[32]。

尽管反义寡核苷酸的应用已进入临床试验阶段并取得了一定的临床效果，但有其局限性：

(1)采用该疗法治疗，心肌的抗肌萎缩蛋白表达较骨骼肌低^[33]，有研究报道注射富含精氨酸的肽共轭PMO可增强抗肌萎缩蛋白在骨骼肌、心肌的表达，但药物毒性尚不确定^[28]；(2)每种反义寡核苷酸药物都只能针对1个外显子，如病人存在一个或多个外显子的缺失，需联合应用多种反义寡核苷酸药物进行治疗，但多个外显子跳跃疗法疗效欠佳、药物不良反应较大^[26,34]；(3)若患儿的基因突变导致抗肌萎缩蛋白的重要功能区破坏，例如缺失破坏了N端肌动蛋白的连接位点，外显子跳跃剪接疗法不能改善该类患儿的临床症状^[35]。

5 骨髓干细胞移植疗法

干细胞是一种具有多向分化潜能的细胞，在体外特定的环境下可分化为肌细胞、骨细胞、脂肪细胞及神经细胞等，参与肌肉的修复。干细胞可快速生长、增殖、融合，通过血管到达相应的组织和器官发挥作用^[36]，而骨髓是干细胞的一个来源。研究表明将骨髓间质干细胞经静脉移植入mdx小鼠内，可促进肌纤维的再生及抗肌萎缩蛋白的表达，改善运动功能^[37]。许忆峰等^[38]对332例患者行自体骨髓间质干细胞移植，经静脉及四肢肌肉双途径移植，移植后12个月，评估临床效果，发现患者的肌力增强率46.1%，日常生活活动能力增加率81.8%，运动功能好转率70.8%，显示自体骨髓干细胞移植疗法可在近期增加患者肌力、提高生活能力、改善运动功能。吕乃武等^[39]对269例患者行自体骨髓间质干细胞(BMSCs)和脐血间质干细胞(CMSCs)联合移植，移植后6个月评估，结果显示患者的肌力有不同程度增加，步行10米及推轮椅10米所需时间明显缩短，肌酸激酶水平较移植前明显下降，肌电图波幅不同程度增高、运动单位增多、多相波减少，患者的运动功能同样得到改善。但是，此疗法也存在明显的缺点，如移植费用较高，易发生出血、感染等并发症；另外如采用异体移植则会产生免疫排斥反应、移植后免疫重建迟缓等。

6 成肌细胞移植疗法

DMD 患儿的肌活检显示, 随着年龄的增长, 成肌细胞再生能力逐渐下降, 约 4~5 岁时肌肉失去再生潜能, 被破坏的肌纤维逐渐被脂肪和结缔组织代替。成肌细胞移植疗法是将正常的成肌细胞(体外扩增培养的卫星细胞)直接注射到受损肌肉, 以达到修复的目的。在早期的试验中由于免疫排斥反应、肌注细胞死亡及迁徙受限常导致移植无效, 通过增加肌注细胞的数目、使用免疫抑制剂等方法, 这些困难正逐步被克服^[40], 但目前尚无大样本的研究。有学者将来自患儿父亲的正常骨骼肌细胞注射到 3 例 DMD 患儿的左侧胫前肌内, 同时在他们的右侧胫前肌注射等量生理盐水作为对照, 并服用免疫抑制剂, 4 周后病理检查发现 3 例患儿左侧胫前肌抗肌萎缩蛋白表达量均高于对侧^[41]。但该疗法的长期疗效并不确切, 国外学者对 1 例实施成肌细胞移植的女性患儿进行术后随访, 随访 20 年并未发现此疗法有长期的疗效^[42]。另外, 假性肥大型肌营养不良患者表现为全身性肌萎缩及肌无力, 主要死亡原因为呼吸肌无力和心力衰竭所致的呼吸衰竭和心力衰竭, 临床难以施行大面积成肌细胞移植, 所以该技术在临床上的应用有限。

7 结语

假性肥大型进行性肌营养不良目前尚无治愈方法, 治疗主要还以药物疗法及对症支持疗法为主, 但这些治疗手段只能延缓病情的进展, 并不能阻止病情的恶化, 基因疗法作为一种新的治疗手段, 给患儿带来了希望, 我们期待将来会取得新的进展。

[参 考 文 献]

- [1] Nakamura A, Takeda S. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Neuropathology*, 2009, 29(4): 494-501.
- [2] Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(1): 77-93.
- [3] Kerr R, Robinson C, Essop FB, et al. Genetic testing for Duchenne/Becker muscular dystrophy in Johannesburg, South Africa[J]. *S Afr Med J*, 2013, 103(12 Suppl 1): 999-1004.
- [4] Lebel DE, Corston JA, McAdam LC, et al. Glucocorticoid treatment for the prevention of scoliosis in children with Duchenne muscular dystrophy: long-term follow-up[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95(12): 1057-1061.
- [5] Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, et al. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade[J]. *Neuromuscul Disord*, 2006, 16(4): 249-255.
- [6] Barber BJ, Andrews JG, Lu Z, et al. Oral corticosteroids and onset of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Pediatr*, 2013, 163(4): 1080-1084.
- [7] Sato Y, Yamauchi A, Urano M, et al. Corticosteroid therapy for Duchenne muscular dystrophy: improvement of psychomotor function[J]. *Pediatr Neurol*, 2014, 50(1): 31-37.
- [8] Takeuchi F, Yonemoto N, Nakamura H, et al. Prednisolone improves walking in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients[J]. *J Neurol*, 2013, 260(12): 3023-3029.
- [9] Schram G, Fournier A, Leduc H, et al. All-cause mortality and cardiovascular outcomes with prophylactic steroid therapy in Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(9): 948-954.
- [10] Escolar DM, Hache LP, Clemens PR, et al. Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Neurology*, 2011, 77(5): 444-452.
- [11] Moxley RT 3rd, Ashwal S, Pandya S, et al. Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society[J]. *Neurology*, 2005, 64(1): 13-20.
- [12] Biggar WD, Politano L, Harris VA, et al. Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols[J]. *Neuromuscul Disord*, 2004, 14(8-9): 476-482.
- [13] Ricotti V, Ridout DA, Scott E, et al. Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013, 84(6): 698-705.
- [14] Houde S, Filiatrault M, Fournier A, et al. Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow-up[J]. *Pediatr Neurol*, 2008, 38(3): 200-206.
- [15] Merlini L, Gennari M, Malaspina E, et al. Early corticosteroid treatment in 4 Duchenne muscular dystrophy patients: 14-year follow-up[J]. *Muscle Nerve*, 2012, 45(6): 796-802.
- [16] Jansen M, van Alfen N, Geurts AC, et al. Assisted bicycle training delays functional deterioration in boys with Duchenne muscular dystrophy: the randomized controlled trial "no use is disuse"[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2013, 27(9): 816-827.
- [17] Myers KA, Ramage B, Khan A, et al. Vibration therapy tolerated in children with Duchenne muscular dystrophy: a pilot study[J]. *Pediatr Neurol*, 2014, 51(1): 126-129.
- [18] 李志平, 黄建强, 姚晓黎, 等. 康复锻炼对假肥大型进行性肌营养不良患者肺功能的影响[J]. *重庆医学*, 2006, 35(15): 1440-1441.
- [19] Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(2): 177-189.

- [20] Dent KM, Dunn DM, von Niederhausern AC, et al. Improved molecular diagnosis of dystrophinopathies in an unselected clinical cohort[J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 134(3): 295-298.
- [21] Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, et al. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(4): 375-381.
- [22] Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, et al. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Ann Neurol*, 2010, 67(6): 771-780.
- [23] Perez B, Rodriguez-Pombo P, Ugarte M, et al. Readthrough strategies for therapeutic suppression of nonsense mutations in inherited metabolic disease[J]. *Mol Syndromol*, 2012, 3(5): 230-236.
- [24] Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations[J]. *Nature*, 2007, 447(7140): 87-91.
- [25] Finkel RS, Flanigan KM, Wong B, et al. Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81302.
- [26] Aoki Y, Yokota T, Wood MJ. Development of multiexon skipping antisense oligonucleotide therapy for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 402369.
- [27] Aartsma-Rus A, van Vliet L, Hirschi M, et al. Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(3): 548-553.
- [28] Yin H, Moulton HM, Seow Y, et al. Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function[J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(24): 3909-3918.
- [29] Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study[J]. *Lancet*, 2011, 378(9791): 595-605.
- [30] Malerba A, Sharp PS, Graham IR, et al. Chronic systemic therapy with low-dose morpholino oligomers ameliorates the pathology and normalizes locomotor behavior in mdx mice[J]. *Mol Ther*, 2011, 19(2): 345-354.
- [31] Yokota T, Lu QL, Partridge T, et al. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs[J]. *Ann Neurol*, 2009, 65(6): 667-676.
- [32] Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, et al. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(16): 1513-1522.
- [33] Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, et al. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(1): 198-203.
- [34] Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, et al. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(3): 293-299.
- [35] 李亚勤, 张成. 外显子跳跃剪接法治疗 Duchenne 型肌营养不良的机制研究进展 [J]. *中华神经科杂志*, 2011, 44(6): 419-422.
- [36] Meregalli M, Farini A, Colleoni F, et al. The role of stem cells in muscular dystrophies[J]. *Curr Gene Ther*, 2012, 12(3): 192-205.
- [37] Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration[J]. *Science*, 2005, 309(5732): 314-317.
- [38] 许忆峰, 杨晓凤, 吴雁翔, 等. 自体骨髓间充质干细胞移植改善进行性肌营养不良症患者运动功能的研究 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(10): 1770-1773.
- [39] 吕乃武, 杨晓凤, 许忆峰, 等. 骨髓和脐间质干细胞联合移植治疗杜氏型进行性肌营养不良症 269 例疗效研究 [J]. *中国全科医学*, 2010, 13(14): 1525-1528.
- [40] Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, et al. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(5): 867-877.
- [41] Skuk D, Roy B, Goulet M, et al. Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells[J]. *Mol Ther*, 2004, 9(3): 475-482.
- [42] Hogrel JY, Zagnoli F, Canal A, et al. Assessment of a symptomatic Duchenne muscular dystrophy carrier 20 years after myoblast transplantation from her asymptomatic identical twin sister[J]. *Neuromuscul Disord*, 2013, 23(7): 575-579.

(本文编辑: 邓芳明)