

综述

肌特异性 microRNA 作为杜氏肌营养不良生物标志物的研究进展

孟琦 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] microRNA (miRNA) 是一种长度约 22nt 的非编码单链 RNA, 主要在转录后调控基因的表达。目前 miRNA 已成为多种疾病潜在的生物标志物, 如肿瘤、白血病、神经系统疾病等。肌特异性 miRNA 在杜氏肌营养不良 (DMD) 患者的骨骼肌中富集, 且在 DMD 发病机制中起重要作用。鉴于肌酸激酶诊断 DMD 的特异性有限, 如其水平与病情轻重无明显关联, 故探索肌特异性 miRNA 是否能成为理想的 DMD 生物标志物具有重要临床意义, 该文将对这一领域研究进展进行综述。 [中国当代儿科杂志, 2019, 21 (11): 1148-1152]

[关键词] microRNA; 杜氏肌营养不良; 生物标志物; 肌酸激酶; 儿童

A review on muscle-specific microRNAs as the biomarker for Duchenne muscular dystrophy

MENG Qi, LAN Dan. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Lan D, Email: land6785@163.com)

Abstract: MicroRNA (miRNA) is a non-coding single-stranded RNA with a length of approximately 22 nucleotides and is mainly responsible for the regulation of gene expression at the post-transcriptional level. At present, miRNA have become potential biomarkers for various diseases such as tumor, leukemia, and nervous system disease. Muscle-specific microRNAs are enriched in the skeletal muscle of patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD) and also play an important role in the pathogenesis of DMD. Creatine kinase has limited specificity in the diagnosis of DMD since its level is not significantly associated with disease severity, and therefore, it is of great clinical significance to explore whether muscle-specific microRNAs can be used as ideal biomarkers for DMD. This article reviews the research advances in this field.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(11): 1148-1152]

Key words: MicroRNA; Duchenne muscular dystrophy; Biomarker; Creatine kinase; Child

杜氏肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是由抗萎缩蛋白基因突变导致其编码的抗肌萎缩蛋白缺失或功能丧失引起的一种 X 连锁隐性遗传性肌病, 发病率为 1/3 500~1/5 000 活产男婴^[1]。DMD 患者的血清肌酸激酶 (creatinine kinase, CK) 水平在早期和进展期显著增高, 具有诊断意义; 在晚期, 因患者肌肉严重萎缩, 可出现血清 CK 明显下降。且血清 CK 水平易受到应激、感染、损伤等多因素影响, 多种疾病均可有血清 CK 增高表现, 故其在诊断 DMD 上特异性较

差, 因此, 寻找新的可取代或辅助 CK 的 DMD 生物标志物具有重要临床意义。microRNA (miRNA) 是一类非编码单链 RNA, 在肌肉生长发育、骨骼肌和相关肌肉疾病中的作用逐渐被报道, 如 miR-206 通过靶向作用于 Pola1、Cx43、Pax3、Pax7、PTB 等基因, 起到促进肌肉分化的作用^[2]; miR-208b 通过靶向作用于 Bax, 激活 PI3K/AKT 通路, 保护 H9c2 心肌细胞免于缺氧诱导的细胞凋亡^[3]; 过表达 miR-10b-5p 可促进 C2C12 成肌细胞增殖和肌纤维发育, 下调表达则会得到相反的结果^[4]。近

[收稿日期] 2019-07-31; [接受日期] 2019-09-03

[基金项目] 国家自然科学基金 (81760215)。

[作者简介] 孟琦, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 蓝丹, 女, 教授。Email: land6785@163.com。

年来多数研究表明, miRNA 是多种疾病的潜在生物标志物, DMD 患者的血清 / 血浆中也有相应的 miRNA 表达增加, 这些特异表达的 miRNA 有望成为一种新的生物标志物以助于 DMD 的预测、诊断和疗效监测。现本文将就 miRNA 作为 DMD 潜在新型生物标志物的研究进展进行综述。

1 miRNA 的分子生物学

成熟 miRNA 长度约 22nt, 广泛存在于各类真核生物中, 具有高度保守性, 转录后调控基因的表达^[5]。它与 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silence complex, RISC) 结合, 作用于靶基因 mRNA 的 3'UTR, 若 RISC 与其完全互补, 靶基因 mRNA 会降解; 若不完全互补, 则会抑制靶基因 mRNA 翻译^[6]。切割 mRNA 后, 成熟 miRNA 保持完整, 可指导识别和沉默更多信息。miRNA 作为独立转录单位参与基本生物过程, 如细胞增殖、分化、凋亡。同时 miRNA 还参与人类多种疾病的发生发展, 如 miR-641 通过降低 MDM2 表达及增加 p53 表达, 起到抑制肺癌细胞生长和诱导肺癌细胞凋亡的作用^[7]; miR-9 等抑制 FOXO1 表达, 从而促进子宫内膜癌发生^[8]; miR-29 参与改变细胞胰岛素的敏感性 / 抵抗, 影响 2 型糖尿病的发生发展^[9]。

miRNA 不仅存在于细胞中, 还通过多种方式分泌到细胞外, 广泛分布于血清、血浆、尿液、唾液、脑脊液、精液、胸腹水等各种体液中, 在这些体液中稳定存在的 miRNA, 称为循环 miRNA。循环 miRNA 有 3 种存在形式: (1) 细胞外囊泡内 miRNA, 如外泌体 miRNA^[10]; (2) 与其他分子结合为复合体 miRNA, 如 Ago2 结合式 miRNA^[11]; (3) 坏死、凋亡、炎症等被动释放的 miRNA^[12]。

近年来多项研究表明, 循环 miRNA 可作为各种疾病的潜在生物标志物, 如胰腺和胆道癌患

者的血清 miR-744 表达显著降低, miR-128 水平升高^[13]; 肾移植后肾功能延迟恢复正常的患者早期尿液中, miR-21、miR-29 和 miR-429 水平明显增加^[14]; 脑脊液 miR-221/miR-222 在胶质瘤患者中的表达水平较正常对照增高^[15]。目前研究显示 miRNA 并非在所有组织中都均一表达, 在肌肉中专门或优先表达的 miRNA 称为肌特异性 miRNA (muscle-specific microRNA, myomiR)^[16], 目前主要包括 miR-1、miR-133a、miR-133b、miR-206、miR-208a、miR-208b、miR-486 和 miR-499^[17-19]。其中 miR-206 仅在骨骼肌中特异表达, miR-208a 仅在心肌特异表达^[20], 而其他 myomiR 在心肌和骨骼肌中均表达。但也有学者认为 miR-486 只是在肌肉富集, 而不是肌肉特异性的, 因为它也在肺、脑和膀胱等组织中表达^[17]。目前已有不少研究报道 DMD 患者血清和血浆中 myomiR 水平升高, 这些研究的大部分都集中在经典的 myomiR 上, 如 miR-1、miR-133 和 miR-206^[21-27]。但也有报道 miR-499 在 DMD 患者血清中升高, 且敏感性和特异性高于经典 myomiR^[23]。

2 miRNA 参与调控 DMD 的病理生理过程

抗肌萎缩蛋白基因是目前已知的人类最大基因之一, 抗肌萎缩蛋白缺失使 DMD 患者中肌细胞脆弱, 牵拉易导致肌细胞损伤、脂肪细胞浸润、氧化应激和炎症, 最终导致严重的肌萎缩、瘫痪甚至死亡。miRNA 作为在多组织中广泛表达的调控分子, 和生肌调控因子 (myogenic regulatory factors, MRFs) 共同参与了骨骼肌的生长发育。在 DMD 的病理生理过程中, miRNA 也参与其中, 通过协调卫星细胞和 / 或成肌细胞的增殖分化而起到重要调控作用 (表 1)。

表1 miRNA参与调控DMD的病理生理

miRNA	是否肌特异性	作用	参考文献
miR-1	是	下调G6PD的表达,增加HDAC2亚基化,影响抗肌萎缩蛋白的形成	[28-29]
miR-133a/b	是	参与组成HDAC-myomiR-BAF60网络,从而影响营养不良肌肉中FAP的分化	[30-31]
miR-206	是	促进骨骼肌再生;抑制Pax7表达,促进肌卫星细胞分化,延缓DMD进展;下调miR-206可增强utrophin表达并改善肌肉病理学	[29,32-34]
miR-486	是	过表达miR-486能改善抗肌萎缩蛋白缺陷型骨骼肌疾病的进展	[35-36]
miR-499	是	恢复miR-499表达可激活慢氧化肌纤维程序,减少肌营养不良小鼠模型的肌肉损伤,显著改善肌营养不良表型	[37]

注: [G6PD] 6-磷酸葡萄糖脱氢酶; [HDAC] 组蛋白去乙酰化酶; [BAF60] BRG1相关60千道尔顿因子; [FAP] 纤维脂肪形成祖细胞; [Pax7] 配对盒基因7; [utrophin] 抗肌萎缩蛋白相关蛋白,是抗肌萎缩蛋白结构和功能上的同源物。

3 miRNA可作为DMD的新型生物标志物

当前DMD诊断标准主要包括以下几点^[38]:

(1) 出现双下肢无力、鸭步、Gower征、起蹲困难和腓肠肌肥大等临床表现;(2) 血清CK显著升高至正常值的数十倍至上百倍;(3) 心电图显示肌源性受损;(4) 肌肉活检呈典型的肌源性损伤,且抗肌萎缩蛋白抗体免疫组织化学染色呈阴性;(5) 超声心动图可提示左心室扩大,肌肉MRI提示受累肌肉出现不同程度的水肿、脂肪浸润和间质增生;(6) DMD基因检测为外显子缺失、重复、微小突变或点突变。血清CK作为目前诊断DMD最简单易行的标志物仍有不少局限性:(1) 血清CK水平易受到应激、感染、损伤等多因素影响^[39];(2) 能引起血清CK增高的疾病太多,以至于血清CK在诊断DMD上的特异性差^[40]。肌肉活检及免疫组化则会对患者造成一定程度的创伤,因此患儿及家长的配合度欠佳。MRI虽然可以监测疾病进展且无侵入性,但其成本高,且检测时间长,患儿配合度低,容易影响成像质量。基因检测也存在费用昂贵、检测周期长等缺点,以及各种基因测序方法在覆盖面上都有其缺陷,故仍会有一定比例的突变位点无法被检测到^[41-42]。Hathout等^[43]提出,理想的DMD生物标志物应满足以下标准:(1) 容易测量且方便重复;(2) 能作为诊断工具;(3) 可作为药效学生物标志物来监测疗效;(4) 可预测干预后的临床益处。miRNA作为参与肌肉分化增殖和DMD疾病过程的影响因子,其成为DMD新型生物标志物的可能性主要体现在以下几点。

3.1 血清/血浆miRNA稳定存在并易于检测

自Mitchell等^[44]提出血清/血浆miRNA能对

抗RNA酶活性,并且在血清/血浆中表达量稳定的观点后,又有文献验证:(1) 血清/血浆在一定条件下长时间(4℃条件下2周、-20℃条件下3~5年)放置后miRNA表达仍恒定^[45];(2) 用金标准Trizol/TRI-Reagent法提取RNA所含的miRNA在-80℃长时间(约10个月)保存后的表达量依旧恒定^[46];(3) 血清/血浆反复冻融后,miRNA的表达水平仍无明显差异^[44-45]。总之,血清/血浆中miRNA稳定性高,不易受外界环境影响,这些特点为其成为新型生物标志物提供了条件。经过多年研究,miRNA检测手段已趋于精确、简便。目前常用检测方法有miRNA微阵列/芯片、LNA-ELF-FISH探针、Northern blot及改进法和实时荧光定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)。其中RT-qPCR拥有操作简便、省时高效、结果精确、重复性好、灵敏度和特异性高、自动化高、无污染和实时监测等优点,使其成为检测循环miRNA最常用的方法^[47]。

3.2 myomiR表达与DMD临床指标的相关性

目前大部分DMD诊断主要还是在患儿出现运动功能减退、腓肠肌肥大等临床表现后,依靠血清CK、心电图、肌肉活检、MRI以及基因检测等方法协助诊断^[38]。在DMD整个疾病过程中,血清CK增高,但到一定年龄后,其会随着年龄增长而降低,这可能是由于肌肉量的减少或因失去行走能力导致活动量下降所致。因此,CK水平不一定和肌肉功能相关。多篇文献报道了myomiR在DMD患者的全血、血清和血浆中表达增加,且与临床指标有一定相关性^[21,23-24,26,48]:(1) myomiR水平随着DMD患者年龄增长呈现减退趋势^[21];(2) miR-499和miR-208b在区别DMD和正常对照时,ROC曲线下面积分别为0.99和0.93^[23];(3) myomiR

的表达量与肌力(采用10分制分级系统肌力评分法)、肌肉功能(采用步行10 min、登4级台阶时间、Gower征时间进行评定)呈正相关^[21]; (4)血清miR-499水平与快肌纤维成分呈负相关, miR-133水平与快肌纤维成分呈正相关, 而与慢肌纤维成分呈负相关^[23]; (5)血清CK与患者年龄呈负相关, 但与肌力和肌肉功能无相关性^[23-24]。Hu等^[24]研究显示, miR-1、miR-133和miR-206水平与肌力和肌肉功能存在相关性, 这表明myomiR参与DMD病理生理过程且能监测肌肉的病理变化, 这是血清CK所不具备的优势。miRNA表达与DMD临床指标的相关性, 能更好显示出与DMD病理状况相关的波动, 将有助于预测和监测疗效。

3.3 myomiR在其他肌病中的表达

根据2016年发布的《中国假肥大型肌营养不良症诊治指南》^[38], 需与DMD进行鉴别诊断的疾病主要有Becker肌营养不良(Becker muscular dystrophy, BMD)、肢带型肌营养不良(Limb-girdle muscular dystrophy, LGMD)、脊肌萎缩症2型(spinal muscular atrophy II, SMA II)、皮炎和多发性肌炎。

BMD与DMD相似, 也是由Xp21上的抗肌萎缩蛋白基因突变引起的, 发病率约为DMD的1/5, 为1/17500~1/50000。但BMD临床表现更为温和, 平均发病年龄为12岁, 失去行走能力延迟至30岁左右, 总体预期寿命也 longer^[49]。研究表明, 与健康对照组相比, miR-1和miR-133在DMD患者血液样品中的富集是BMD患者的5~10倍^[50]。而Li等^[23]研究中, 与正常对照相比, DMD患者血清中miR-1、miR-133、miR-206、miR-208a、miR-208b和miR-499表达水平显著升高, 这6种myomiR在BMD患者中也升高, 但只有miR-499表达水平差异有统计学意义。此外, DMD组中miR-206和miR-499表达水平显著高于BMD组且差异有统计学意义, 虽然另外4个myomiR在DMD组水平也高于BMD组, 但差异无统计学意义。Matsuzaka等^[51]通过研究发现BMD患者血清miR-1、miR-133a和miR-206表达量与正常对照相比显著升高, 但经Bonferroni法校正后, 这些差异均无统计学意义。

LGMD是一组常染色体遗传的肌肉疾病, 主要导致肩胛带肌和骨盆带肌的萎缩无力。最

初由Walton和Natrass分为常染色体显性遗传的LGMD1型和常染色体隐性遗传的LGMD2型, 其中以LGMD2型更常见^[52]。总体患病率为1/14500~2.27/100000^[53]。Matsuzaka等^[51]研究表明, 与正常对照相比, 尽管LGMD2B患者血清miR-1、miR-133a和miR-206表达量有所增加, 但差异无统计学意义。

上述结果提示检测部分myomiR可能有助于DMD、BMD和LGMD等肌病的相互鉴别, 但由于缺乏大规模样本验证, myomiR能否真正区分DMD和其他肌病还有待更多的实验和临床研究来验证。

3.4 myomiR应用于监测疗效

糖皮质激素治疗是目前临床上应用最广泛的治疗DMD方法, 可以延长行走时间、延缓呼吸功能不全和减少DMD患儿出现脊柱侧凸等。两种常用给药方案分别是每日服药和间歇给药(连续用药10 d后间断10 d)。Zaharieva等^[25]检测了未治疗患儿、每日服药患儿和间歇服药患儿的血清myomiR水平。与未治疗患儿相比, 每日服药患儿血清中检测到更高水平的miR-1、miR-31和miR-133b, 提示这几种myomiR可以监测患儿治疗后病情的好转情况, 这可能是肌肉生长和再生的结果, 进一步提示了myomiR与肌肉质量之间存在联系。另外, Cacchiarelli等^[50]研究表明, 经过外显子跳跃策略治疗后的mdx小鼠, 抗肌萎缩蛋白的合成可恢复至野生型水平, 肌纤维的完整性也得到恢复, 而且, 该小鼠相关血清miRNA也恢复到了近似野生水平。目前关于此方面的研究仍很少且处于动物实验阶段, 若未来能有更多研究支持myomiR监测DMD的疗效, 将是myomiR作为DMD新型生物标志的重要突破。

3.5 miRNA在DMD女性携带者中的表达

由于DMD是X连锁隐性遗传性疾病, 因此女性携带者的检测对遗传咨询有重要意义。女性亲属通过基因检测和遗传咨询可以避免更多受累男性后代的出生。但是, 对于某些高风险女性的遗传咨询和产前诊断仍存在挑战, 如采用二代测序也难以检测DMD基因中深部内含子突变^[54]。由于女性携带者可能有亚临床的肌肉受累, 循环miRNA可能有检测携带者的潜力。近期有研究表明, 血清/血浆miR-206可用于区别DMD/BMD女性携带者和非携带者, 除miR-206外, 与正常女

性对照组相比,还有5个miRNA(miR-222、miR-26a、miR-342、miR-378-3p和miR-378-5p)在携带者血浆中表达明显上调,2个miRNA(miR-144和miR-29a)表达明显下调^[55-56]。此外,Florian等^[55]研究表明,心血管磁共振(cardiovascular magnetic resonance, CMR)检查异常的DMD携带者和CMR正常的携带者相比,血浆miR-29c表达水平明显下调,若结合CK水平,不进行CMR检查也可高效地诊断出有心肌病的携带者。然而,类似报道目前还很少,miRNA作为DMD携带者的新型生物标志物还有待更多的实验验证。

4 展望

综上所述,miRNA作为一种创伤性小、特异性和灵敏性均较高的检测方法,有取代或辅助CK诊断DMD的潜力。myomiR与DMD的发生发展密切相关,其参与调控DMD病理生理的机制也正在被逐步挖掘。myomiR作为DMD新型生物标志物已经有动物实验支撑,但其在诊断、预测和疗效监测等方面的临床证据仍很少,这可以作为未来关于miRNA作为生物标志物研究的重点方向。

[参 考 文 献]

- [1] Mendell JR, Shilling C, Leslie ND, et al. Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Ann Neurol*, 2012, 71(3): 304-313.
- [2] Ma G, Wang Y, Li Y, et al. MiR-206, a key modulator of skeletal muscle development and disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(3): 345-352.
- [3] Zhou YL, Sun Q, Zhang L, et al. miR-208b targets Bax to protect H9c2 cells against hypoxia-induced apoptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 1751-1759.
- [4] Ge G, Yang D, Tan Y, et al. miR-10b-5p regulates C2C12 myoblasts proliferation and differentiation[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(2): 291-299.
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [6] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. *Nature*, 2000, 404(6775): 293-296.
- [7] Kong Q, Shu N, Li J, et al. miR-641 functions as a tumor suppressor by targeting MDM2 in human lung cancer[J]. *Oncol Res*, 2018, 26(5): 735-741.
- [8] Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1): 367-377.
- [9] Yarbeygi H, Katsiki N, Behnam B, et al. MicroRNAs and type 2 diabetes mellitus: molecular mechanisms and the effect of antidiabetic drug treatment[J]. *Metabolism*, 2018, 87: 48-55.
- [10] Manna I, Iaccino E, Dattilo V, et al. Exosome-associated miRNA profile as a prognostic tool for therapy response monitoring in multiple sclerosis patients[J]. *FASEB J*, 2018, 32(8): 4241-4246.
- [11] Biró O, Fóthi Á, Alaszics B, et al. Circulating exosomal and Argonaute-bound microRNAs in preeclampsia[J]. *Gene*, 2019, 692: 138-144.
- [12] Singh R, Ramasubramanian B, Kanji S, et al. Circulating microRNAs in cancer: hope or hype?[J]. *Cancer Lett*, 2016, 381(1): 113-121.
- [13] Kim K, Yoo D, Lee HS, et al. Identification of potential biomarkers for diagnosis of pancreatic and biliary tract cancers by sequencing of serum microRNAs[J]. *BMC Med Genomics*, 2019, 12(1): 62.
- [14] Khalid U, Newbury LJ, Simpson K, et al. A urinary microRNA panel that is an early predictive biomarker of delayed graft function following kidney transplantation[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3584.
- [15] 张青. 胶质瘤患者脑脊液中 miRNA-221/miRNA-222 的异常表达及其潜在诊断价值分析 [D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
- [16] Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development[J]. *Dev Biol*, 2016, 410(1): 1-13.
- [17] Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, et al. Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(9): 4218-4223.
- [18] van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance[J]. *Dev Cell*, 2009, 17(5): 662-673.
- [19] Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation[J]. *Genome Biol*, 2004, 5(3): R13.
- [20] Siracusa J, Koulmann N, Banzet S. Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018, 9(1): 20-27.
- [21] 金东东. 肌肉特异性 microRNAs 在 Duchenne 型肌营养不良全血中的表达 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [22] Coenen-Stass AM, Betts CA, Lee YF, et al. Selective release of muscle-specific, extracellular microRNAs during myogenic differentiation[J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(18): 3960-3974.
- [23] Li X, Li Y, Zhao L, et al. Circulating muscle-specific miRNAs in Duchenne muscular dystrophy patients[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e177.
- [24] Hu J, Kong M, Ye Y, et al. Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Neurochem*, 2014, 129(5): 877-883.
- [25] Zaharieva IT, Calissano M, Scoto M, et al. Dystromirs as serum biomarkers for monitoring the disease severity in Duchenne muscular dystrophy[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80263.
- [26] Koutsoulidou A, Mastroiannopoulos NP, Furling D, et al. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206

- increases during development of human skeletal muscle[J]. BMC Dev Biol, 2011, 11: 34.
- [27] Llano-Diez M, Ortez CI, Gay JA, et al. Digital PCR quantification of miR-30c and miR-181a as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy[J]. Neuromuscul Disord, 2017, 27(1): 15-23.
- [28] He C, Yang J, Ding J, et al. Downregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by microRNA-1 inhibits the growth of pituitary tumor cells[J]. Oncol Rep, 2018, 40(6): 3533-3542.
- [29] Cacchiarelli D, Martone J, Girardi E, et al. MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway[J]. Cell Metab, 2010, 12(4): 341-351.
- [30] Saccone V, Consalvi S, Giordani L, et al. HDAC-regulated myomiRs control BAF60 variant exchange and direct the functional phenotype of fibro-adipogenic progenitors in dystrophic muscles[J]. Genes Dev, 2014, 28(8): 841-857.
- [31] Goljanek-Whysall K, Mok GF, Fahad Alrefaei A, et al. myomiR-dependent switching of BAF60 variant incorporation into Brg1 chromatin remodeling complexes during embryo myogenesis[J]. Development, 2014, 141(17): 3378-3387.
- [32] Liu N, Williams AH, Maxeiner JM, et al. microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice[J]. J Clin Invest, 2012, 122(6): 2054-2065.
- [33] Amirouche A, Jahnke VE, Lunde JA, et al. Muscle-specific microRNA-206 targets multiple components in dystrophic skeletal muscle representing beneficial adaptations[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2017, 312(3): C209-C221.
- [34] Bulaklak K, Xiao B, Qiao C, et al. MicroRNA-206 downregulation improves therapeutic gene expression and motor function in mdx mice[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 12: 283-293.
- [35] Alexander MS, Casar JC, Motohashi N, et al. MicroRNA-486-dependent modulation of DOCK3/PTEN/AKT signaling pathways improves muscular dystrophy-associated symptoms[J]. J Clin Invest, 2014, 124(6): 2651-2667.
- [36] Dey BK, Gagan J, Dutta A. miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7[J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(1): 203-214.
- [37] Liu J, Liang X, Zhou D, et al. Coupling of mitochondrial function and skeletal muscle fiber type by a miR-499/Fnrip1/AMPK circuit[J]. EMBO Mol Med, 2016, 8(10): 1212-1228.
- [38] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会神经肌肉病学组, 中华医学会神经病学分会心电图与临床神经生理学组. 中国假肥大型肌营养不良症诊治指南[J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(1): 17-20.
- [39] Nicholson GA, Morgan GJ, Meerkinn M, et al. The effect of aerobic exercise on serum creatine kinase activities[J]. Muscle Nerve, 1986, 9(9): 820-824.
- [40] 熊晖. 儿童血清肌酸激酶升高的鉴别诊断[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(8): 557-559.
- [41] 田培超, 王越, 史丹丹, 等. 二代测序技术在杜氏肌营养不良症家系中的分子诊断应用[J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(3): 244-248.
- [42] 王晶, 贺勇. 杜氏肌营养不良分子诊断技术的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(10): 1307-1309.
- [43] Hathout Y, Seol H, Han MH, et al. Clinical utility of serum biomarkers in Duchenne muscular dystrophy[J]. Clin Proteomics, 2016, 13: 9.
- [44] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [45] Ge Q, Zhou Y, Lu J, et al. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions[J]. Molecules, 2014, 19(2): 1568-1575.
- [46] Mraz M, Malinova K, Mayer J, et al. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390(1): 1-4.
- [47] 赵莹莹, 邢卉春. 循环 miRNA 检测方法研究进展及其临床应用[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2015, 9(1): 111-115.
- [48] Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, et al. Identification of muscle-specific microRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: promising novel blood-based markers for muscular dystrophy[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18388.
- [49] Wilson K, Faelan C, Patterson-Kane JC, et al. Duchenne and Becker muscular dystrophies: a review of animal models, clinical end points, and biomarker quantification[J]. Toxicol Pathol, 2017, 45(7): 961-976.
- [50] Cacchiarelli D, Legnini I, Martone J, et al. miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy[J]. EMBO Mol Med, 2011, 3(5): 258-265.
- [51] Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, et al. Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy[J]. Environ Health Prev Med, 2014, 19(6): 452-458.
- [52] Walton JN, Nattrass FJ. On the classification, natural history and treatment of the myopathies[J]. Brain, 1954, 77(2): 169-231.
- [53] Domingos J, Sarkozy A, Scoto M, et al. Dystrophinopathies and limb-girdle muscular dystrophies[J]. Neuropediatrics, 2017, 48(4): 262-272.
- [54] Giliberto F, Ferreiro V, Massot F, et al. Prenatal diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy by short tandem repeat segregation analysis in Argentine families[J]. Muscle Nerve, 2011, 43(4): 510-517.
- [55] Florian A, Patrascu A, Tremmel R, et al. Identification of cardiomyopathy-associated circulating miRNA biomarkers in muscular dystrophy female carriers using a complementary cardiac imaging and plasma profiling approach[J]. Front Physiol, 2018, 9: 1770.
- [56] Anaya-Segura MA, Rangel-Villalobos H, Martínez-Cortés G, et al. Serum levels of microRNA-206 and novel mini-STR assays for carrier detection in Duchenne muscular dystrophy[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(8): pii: E1334.

(本文编辑: 王颖)