文章编号 1006-8147(2021)05-0482-05

论 著

# B族维生素对肌肉萎缩小鼠PMO运输效率的影响

宋军[1],林曹瑞[1],贾璐璐[1],韩刚[2],尹海芳[1]
(1.天津医科大学基础医学院细胞生物学系,天津 300070;2.天津医科大学医学技术学院临床生物化学教研室,天津 300203)

**摘要** **目的:**探究B族维生素对反义寡核苷酸药物磷酸二胺吗啉代寡核苷酸(PMO)在DMD治疗中运输效率的影响以及药物安全性评价。**方法:**通过对成年的杜兴肌肉萎缩症(DMD)模型mdx小鼠胫骨前肌分别局部注射PMO和各种维生素的混合液,利用免疫荧光(IF)和Western印迹检测dystrophin蛋白表达情况,评估各维生素对PMO作用效果的影响;通过尾静脉注射PMO和维生素B12的混合液,相同方法检测维生素B12对PMO治疗效果的影响,同时利用苏木素-伊红组织染色(HE)技术检测组织病理情况,评估维生素B12联合PMO治疗的安全性。**结果:**在mdx小鼠局部给药实验中,比较不同的B族维生素对PMO药效影响时,发现维生素B12对PMO的促进效果最佳($t$=8.015,$P$<0.01);随后选择维生素B12与PMO混合对mdx小鼠进行系统治疗时,相比于PMO生理盐水组,发现维生素B12能够在胫骨前肌($t$=9.631,$P$<0.01)和股四头肌($t$=8.452,$P$<0.01)上明显提高PMO的系统治疗效果,同时对mdx小鼠不产生肌肉不良反应。**结论:**维生素B12作为营养补充剂能够显著提高PMO在mdx小鼠上的局部治疗效果,但系统治疗效果有限,且对小鼠肌肉组织无损伤。

**关键词** 维生素B12;杜兴肌肉萎缩症;PMO;外显子跳读
**中图分类号** Q7 **文献标志码** A

## Vitamin B promotes PMO drug delivery efficiency in dystrophic mice

SONG Jun[1], LIN Cao-rui[1], JIA Lu-lu[1], HAN Gang[2], YIN Hai-fang[1]
(1. Department of cell biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Clinical Biochemistry, School of Medical Technology, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the effect of vitamin B on enhancing the delivery efficiency of phosphorodiamidate morpholino oligonuclcotides (PMO) in the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and evaluate the drug safety. **Methods:** PMO in different vitamin B solutions or saline was injected into tibialis anterior of adult DMD model mdx mice. Immunofluorescence (IF) and Western blotting were used to measure the distribution and expression of dystrophin, and the local effect of vitamin B for PMO was evaluated. PMO in vitamin B12 solution was intravenously to evaluate the systemic effect of vitamin B12 on PMO by IF and Western blotting. Haematoxylin and eosin (HE) stain was utilized to examine the histopathological situation, and to evaluate the safety of vitamin B12 combined with PMO. **Results:** Local intramuscular administration experiment of mdx mice showed that vitamin B12 had the best promotion effect on PMO ($t$=8.015, $P$<0.01) compared to the effects of different B vitamins on PMO. Systemic injection of PMO in vitamin B12 for mdx mice could significantly improve the systemic therapeutic effect of PMO on tibialis anterior ($t$=9.631, $P$<0.01) and quadriceps muscles ($t$=8.452, $P$<0.01) without any detectable toxicities, compared to PMO in saline groups. **Conclusion:** Vitamin B12 as a nutritional supplement could significantly enhance the local therapeutic effect of PMO in mdx mice, but the systemic therapeutic effect is limited, and there is no damage to the muscle tissue of mice.

**Key words** vitamin B12; DMD; PMO; exon-skipping

杜兴肌肉萎缩症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种伴X染色体隐性遗传的致死性疾病,在新生男孩中发病率为1/3 500,是儿童最常见的肌肉萎缩症[1]。患者肌肉细胞膜严重受损,最终因膈肌或心肌纤维化或坏死而过早死亡[2-4]。

糖皮质激素是目前临床上针对DMD治疗使用最为广泛的一种药物,但由于该药物不能从根本上恢复dystrophin蛋白的表达,因此治疗效果十分有限[5-6];并且该激素药物普遍存在生长抑制等多种不良反应,使DMD的治疗仍具有重大挑战[7]。Eteplirsen是一种磷酸二胺吗啉代寡核苷酸(phosphorodiamidate morpholino oligonuclcotides, PMO),也是美国食品药品监督管理局(FDA)最早批准的用来治疗DMD的药物[8-9]。但eteplirseen在临床使用时出现治疗效果有限等问题,表明该治疗方法还需要更多的研究来改进和完善,因此寻找一种安全的小分子药物能

基金项目 国家自然科学基金(81802124);天津市自然科学基金(18JCQNJC79400)
作者简介 宋军(1995-),男,硕士在读,研究方向:基因治疗和药物运输;通信作者:尹海芳,E-mail:haifangyin@tmu.edu.cn;韩刚,E-mail:hangang@tmu.edu.cn。

够使 PMO 在较低剂量下,有效提高外显子跳读效率以及肌肉组织中 dystrophin 蛋白的表达,被认为具有巨大的临床价值。同时有报道称,6-thioguanine[10]、Dantrolene[11]等一些化学药物能够提高 DMD 模型鼠 PMO 的跳读效果,对 PMO 在 DMD 的治疗中起到显著的促进作用;并且本课题组前期发现,已糖和氨基酸等一些营养物也能够对 DMD 的外显子跳读疗法有明显的促进作用[12-13];而 B 族维生素作为人体内正常生命活动所必须的辅酶,是机体所必须的营养物质 [14]。为探究其是否能够作为辅剂来增强PMO 的治疗效果, 笔者在 DMD 模型 mdx 小鼠开展筛选和系统测试。

## 1　材料与方法

1.1　*动物与材料*　所有维生素药物购自 Sigma 公司,O.C.T 冷冻包埋剂购自 Sakura 公司,Bradford 试剂购自上海生工公司,dystrophin 抗体购自 Abcam 公司, 伊红和苏木素染色试剂购自北京中杉金桥公司,山羊血清(NGS)和胎牛血清(FBS)购于 Invitrogen 公司, 含 DAPI 荧光封片剂购自北京中杉金桥公司。SPF 级C57BL/6 小鼠购自北京维通利华公司[合格证号:1112511911004196;许可证号:SCXK(京)2017-0005];mdx 小鼠自行繁殖于天津医科大学动物中心 SPF 级实验室。

1.2　*方法*

1.2.1　小鼠分组及给药　对于局部注射实验,27 只同年龄的 mdx 小鼠通过简单随机抽样分成 9 组:PMO 生理盐水组和 PMO 联合 8 种维生素实验组,每组 3 只,2 μg 的 PMO 添加到生理盐水或其他维生素溶液(5%)中,制成 40 μL 体积的注射液,注射到各组 mdx 小鼠的胫骨前肌中,2 周后收样,Saline 表示 PMO 生理盐水组,其他为不同维生素与 PMO 混合治疗的实验组。对于系统注射实验,6 只同年龄的 mdx 小鼠通过简单随机抽样分成两组:PMO 生理盐水组和 PMO 联合维生素 B12 组,每组 3 只,将 PMO 剂量改成 25 mg/kg 添加到生理盐水和 5% B12 溶液中, 制成 120 μL 体积的注射液通过尾静脉进行注射,每周 1 次,注射 3 次,最后 1 次注射后 2 周收样。PMO-S 组表示 PMO 生理盐水组,PMO-B12 表示 PMO 与维生素 B12 混合治疗的实验组,C57 表示野生型的阳性对照,mdx 组表示不给药的空白对照,且所有实验的 C57 和 mdx 小鼠都是年龄匹配的小鼠。

1.2.2　组织蛋白提取和浓度测定　动物处死后取出肌肉组织,用 O.C.T 包埋放入液氮冰冻,用冷冻切片机切成组织碎片收集到 EP 管中,加入90 μL 组织裂解液(95% lysis buffer+5% β-mercaptoethanol)在冰上裂解 30 min,随后 13 000×*g*(*r*=40 cm) 离心 10 min,取上清即为蛋白样品。蛋白浓度测定使用 Bradford 法进行测定,取稀释 100 倍的蛋白样品和 5 个不同浓度梯度的蛋白标准品与 250 μL 的 Bradford 溶液混合,用酶标仪测量各溶液在 595 nm 处的吸光值,通过标准曲线法计算出不同样品的蛋白浓度。

1.2.3　Western 印迹检测特异性蛋白表达水平　配制浓度为 6%的 SDS-PAGE 凝胶,实验组以及阴性对照 mdx 组的每个蛋白样品取 50 μg 进行上样,阳性对照 C57 组根据标注的百分比乘以 50 μg 进行不同量的上样(2% C57 即上样 1 μg、5% C57 即上样 2.5 μg、6% C57 即上样 3 μg、8% C57 即上样 4 μg、10% C57 即上样 5 μg),80 V 恒压下电泳 30 min 后调至 120 V 恒压电泳 3 h,通过 110 mA 的恒流过夜将凝胶上的蛋白转到 PVDF 膜上,随后用 5%脱脂牛奶封闭 4 h,加入一抗孵育过夜,再用牛奶洗 3 次,每次 10 min,立即用二抗进行孵育,再用 PBST 洗 3次,每次 15 min,洗完后加上发光液(A 液:B 液=1:1),在暗室进行压片曝光。每个样品中 dystrophin 蛋白表达水平通过 Image J 软件得出灰度值与对照的百分比 C57 样品灰度值进行对比定量,计算出样品中 dystrophin 蛋白的含量。

1.2.4　组织中 dystrophin 蛋白免疫荧光染色　选择冷冻切片机切出厚度为 8 μm 的组织切片,放室温平衡, 随后用油性笔圈出组织在玻片上的范围,放入干净的 PBS 中浸泡 10 min, 取出滴入封闭液(20% NGS、20%FBS 和 60%PBS)室温封闭 1.5 h,去除封闭液后滴加 dystrophin 一抗, 室温孵育 1.5 h,PBS 洗 3 次,滴加荧光二抗,室温孵育 1 h,PBS 洗 3 次后滴加含有 DAPI 的封片剂封片并避光晾干。

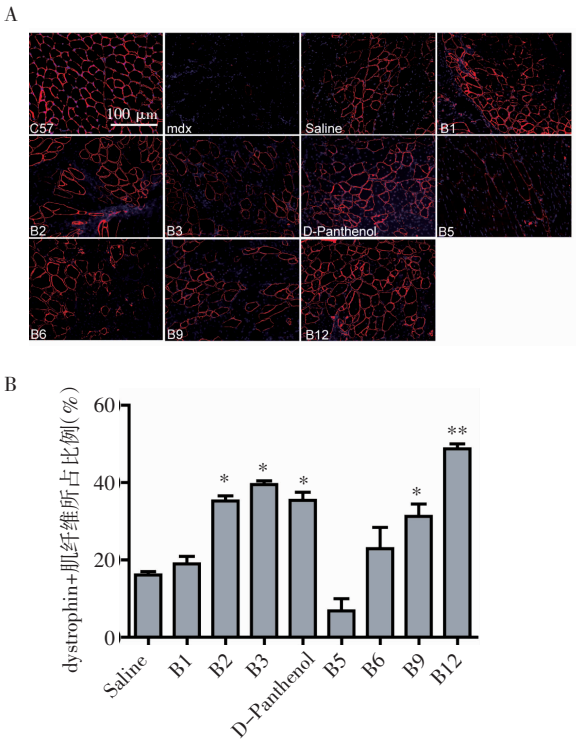
1.2.5　肌肉组织 HE 染色　选择冷冻切片机切出的 8 μm 厚的组织切片,放室温平衡,随后放入干净的 PBS 中浸泡 10 min,取出进行梯度水化(无水乙醇→95%乙醇→85%乙醇→70%乙醇各浸泡 5 min),浸入蒸馏水 15 s,取出浸泡到苏木素染液中 13 min,用蒸馏水洗去玻片背景,浸入伊红染液染色 1 min,同样用蒸馏水洗去背景后进行梯度脱水(70%乙醇→85%乙醇→95%乙醇→无水乙醇分别 15 s、30 s、1 min、3 min), 随后浸入二甲苯中通透 5~10 min,最后用中性树脂进行封片。

1.3　*统计学处理*　使用 Adobe photoshop、Adobe illustrator 和 Image J 软件对图片和数据进行处理和分析,使用 SPSS20.0 进行统计分析,符合正态分布的计量数据通过 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间比较采用 *t* 检验进

行分析，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 免疫荧光染色检测 B 族维生素局部筛选情况 首先通过组织免疫荧光染色检测肌肉组织中 dystrophin 阳性肌纤维的数量和分布情况，结果显示：与 PMO 生理盐水组相比，PMO 与维生素 B2、B3、D-Panthenol、B9 和 B12 混合能显著提高 dystrophin 阳性肌纤维的恢复数量（图 1A），其中维生素 B12 混合治疗组 dystrophin 阳性肌纤维数量最多，达到了 49.3%（$t=8.015$，$P<0.01$，图 1B）。



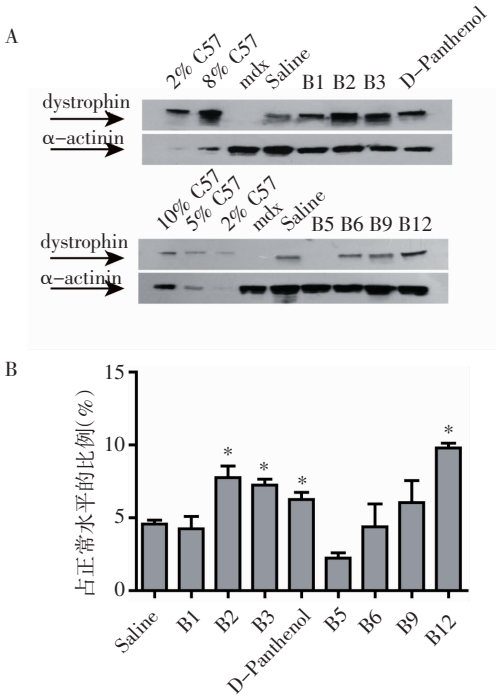

注：A：免疫荧光染色检测 dystrophin 阳性肌纤维（红色）区域，蓝色为细胞核；B：对 dystrophin 阳性区域定量比较，与 PMO 生理盐水组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$；PMO：磷酸二胺吗啉代寡核苷酸

**图 1 免疫荧光染色检测不同维生素与 PMO 在 mdx 小鼠上的局部筛选情况（100×）**

**Fig 1 Local screen of vitamins with PMO in mdx mice by immunofluorescence（100×）**

2.2 Western 印迹检测 B 族维生素局部筛选情况 PMO 与维生素 B2、B3、D-Panthenol 和 B12 混合能显著提高 dystrophin 蛋白的表达水平（图 2A），通过计算各组灰度值与对应的 2% C57（1 μg）、5% C57（2.5 μg）、8% C57（4 μg）、10% C57（5 μg）灰度值对比定量，结果显示，维生素 B12 混合治疗组表达水平最高，达到了 10.5%（$t=5.207$，$P<0.05$，图 2B）。

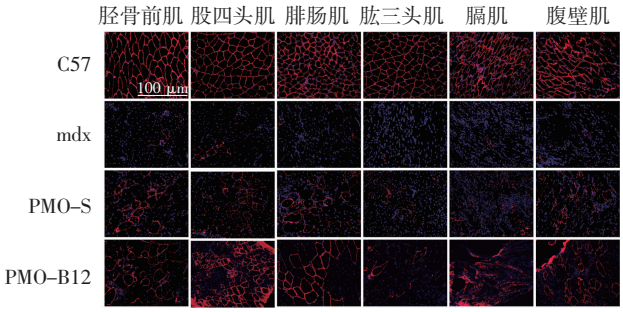
2.3 免疫荧光染色检测维生素 B12 对 PMO 系统的促进作用 相比于 PMO 生理盐水组 B12 治疗组胫骨前肌和股四头肌组织中 dystrophin 阳性肌纤维数量明显增多（图 3）。




注：A：Western 印迹检测不同治疗组 dystrophin 蛋白表达水平；α-actinin 为内参蛋白；B：对 dystrophin 蛋白表达水平定量比较，与 PMO 生理盐水组相比，*$P<0.05$；PMO：磷酸二胺吗啉代寡核苷酸

**图 2 Western 印迹检测不同维生素与 PMO 在 mdx 小鼠上的局部筛选情况**

**Fig 2 Local screen of vitamins with PMO in mdx mice by Western blotting**




注：PMO：磷酸二胺吗啉代寡核苷酸

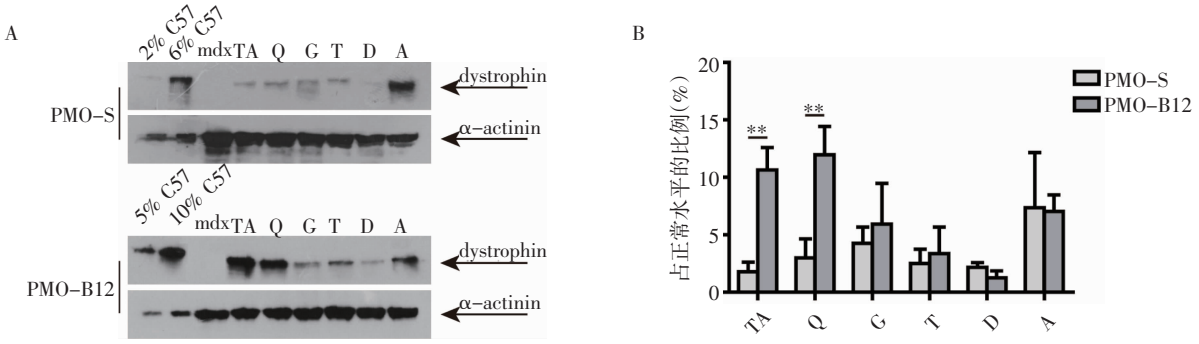
**图 3 免疫荧光染色检测维生素 B12 与 PMO 在 mdx 小鼠上的系统治疗情况（100×）**

**Fig 3 Systemic evaluation of vitamin B12 and PMO in mdx mice by immunofluorescence（100×）**

2.4 Western 印迹检测维生素 B12 对 PMO 系统促进作用 同样选择小鼠肌肉组织蛋白检测 dystrophin 蛋白表达水平，结果显示，B12 治疗后蛋白表达水平有所提高（图 4A），而通过计算各组灰度值与对应的 2% C57（1 μg）、5% C57（2.5 μg）、6% C57（3 μg）、10% C57（5 μg）灰度值对比定量，结果发现辅助添加 B12 联合治疗后胫骨前肌（$t=9.631$，$P<0.01$）

和股四头肌（$t$=8.452，$P$<0.01）dystrophin 蛋白表达水平得到了显著的提高（图 4B）。

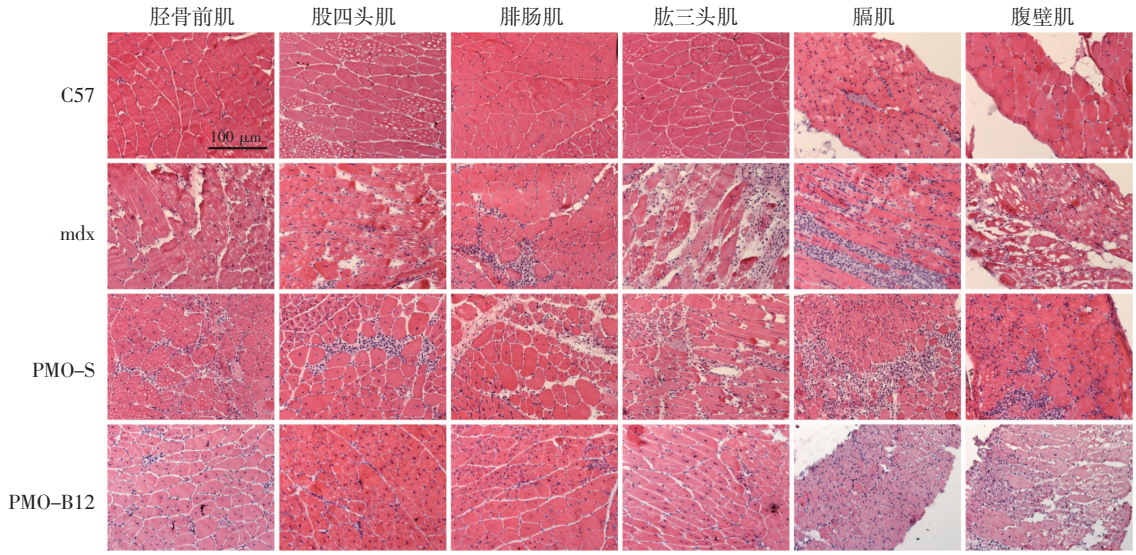
2.5　PMO-B12 对 mdx 小鼠肌肉病理的影响　PMO-B12 联合治疗组没有出现肌肉的不良反应（图 5）。




注：A：Western 印迹检测治疗后各肌肉组织中dystrophin 蛋白表达水平，α-actinin 为内参蛋白；B：对 dystrophin 蛋白表达水平定量比较，与 PMO 生理盐水组相比，**$P$<0.01；PMO：磷酸二胺吗啉代寡核苷酸；TA：胫骨前肌；Q：股四头肌；G：腓肠肌；T：肱三头肌；D：膈肌；A：腹壁肌

**图 4　Western 印迹检测维生素 B12 与 PMO 在 mdx 小鼠上的系统治疗情况**

**Fig 4　Systemic evaluation of vitamin B12 and PMO in mdx mice by Western blotting**




注：PMO：磷酸二胺吗啉代寡核苷酸

**图 5　维生素 B12 与 PMO 在 mdx 小鼠上的系统治疗病理检测（100×）**

**Fig 5　Muscle pathology of mdx mice treated with vitamin B12 and PMO systemically（100×）**

## 3　讨论

DMD 是一种常见的遗传性肌肉萎缩症，患病儿童在少年时便开始发病，并随着年龄增加，症状不断加重，到青少年时便失去独自行动能力，最终由于膈肌或心肌病变导致呼吸衰竭或心脏功能受损而过早死亡，患者平均寿命只有 21 岁[1,15]。而本研究所使用的 DMD 模型小鼠 mdx 是其 dystrophin 基因外显子 23 发生点突变，形成终止密码子，使蛋白不能正常表达，与疾病的发病机制相同，因此这种模型小鼠在一定程度上很好的体现了 DMD 的一些病症[16-17]。

近年来关于 DMD 的治疗也取得了一定的进展，FDA 批准上市了多款外显子跳读疗法的反义寡核苷酸药物[18-19]。尽管如此，但在临床使用时发现核酸药物存在着难以解决的如用药量大、靶向性差及系统运输效率低等问题，前期的报道称 Dantrolene[11]、己糖GF[12,20]以及 glycine 等[13]小分子分别通过影响剪接频率、能量供给以及组织新生角度去促进反义寡核苷酸药物引起的外显子跳读，都取得了较好的治疗效果，但现有的这些小分子辅剂对 DMD 患者心脏功能的改善效果非常有限。因此笔者通过动物模型对生活中常见的营养分子维生素进行筛选。

本研究首先在局部筛选过程中使用 PMO 与不同维生素混合进行治疗，以单独的 PMO 治疗效果为基准，评价维生素带来的促进效果，结果发现，维生素 B12 能将 dystrophin 蛋白恢复水平从 5%作用提高到接近 12%，展现出了巨大的潜力。在随后的系统治疗中，维生素 B12 作为营养补充剂单独治疗

并不能显示出对 dystrophin 蛋白的恢复，这与 6-thioguanine[10]和 glycine 等[13]小分子辅剂类似，因此在系统治疗中未设置单独维生素 B12 实验组，但通过与 PMO 生理盐水组进行比较，发现维生素 B12 联合治疗能够显著提高 PMO 在胫骨前肌和股四头肌上的治疗效果，但治疗效果主要体现在占比较大的骨骼肌上面，推测维生素 B12 在通过尾静脉注射进入循环系统后，很快随血流进行全身系统的分布，但由于脂溶性较差很难在组织内部进行停留，快速被机体清除出去[21-22]。因此针对占比较大的骨骼肌更能受到维生素带来的影响，这也导致 PMO 的治疗效果在大多数的肌肉组织非常有限，因此后续改变维生素 B12 的给药途径，例如口服给药或者给药频率改成每日补充，可能会显著提高维生素 B12 的治疗效果。同时通过 HE 染色检测肌肉组织病理情况发现，维生素 PMO- B12 联合治疗在提高原有的 PMO 治疗效果的同时，并未检测到肌肉的损伤，推测是由于水溶性维生素不会在体内进行蓄积，会被快速清除，因此避免了因为频繁给药而带来一定的不良反应在后续研究中，将会在 mdx 小鼠上对 PMO 联合维生素 B12 进行一个长期的系统治疗，进一步探究维生素 B12 对 PMO 治疗的促进作用，为 DMD 的临床治疗提供新的治疗手段。

**参考文献：**


[1] VAN DER PIJL E, VAN PUTTEN M, NIKS E, et al. Low dystrophin levels are insufficient to normalize the neuromuscular synaptic abnormalities of mdx mice[J]. Neuromuscul Disord, 2018, 28(5): 427

[2] TUFFERY-GIRAUD S, MIRO J, KOENIG M, et al. Normal and altered pre-mRNA processing in the DMD gene[J]. Hum Genet, 2017, 136(9): 1155

[3] GUIRAUD S, AARTSMA-RUS A, VIEIRA N, et al. The pathogenesis and therapy of muscular dystrophies[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2015, 16: 281

[4] 卜鑫珏，奚鑫，刘松青，等. 治疗杜兴肌肉萎缩症的新药及其开发[J]. 中国新药杂志，2020，29(2)：165

[5] MATTHEWS E, BRASSINGTON R, KUNTZER T, et al. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy[J]. Cocharne Db Syst Rev, 2016(5): CD003725

[6] PEVERELLI L, TESTOLIN S, VILLA L, et al. Histologic muscular history in steroid-treated and untreated patients with Duchenne dystrophy[J]. Neurology, 2015, 85(21): 1886

[7] HEIER C, DAMSKER J, YU Q, et al. VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects[J]. EMBO Mol Med, 2013, 5(10): 1569

[8] LIM K, MARUYAMA R, YOKOTA T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy[J]. Drug Des Devel Ther, 2017, 11: 533

[9] CIRAK S, ARECHAVALA-GOMEZA 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

[10] HU Y, WU B, ZILLMER A, et al. Guanine analogues enhance antisense oligonucleotide-induced exon skipping in dystrophin gene *in vitro* and *in vivo*[J]. Mol Ther, 2010, 18(4): 812

[11] KENDALL G, MOKHONOVA E, Moran M, et al. Dantrolene enhances antisense-mediated exon skipping in human and mouse models of Duchenne muscular dystrophy[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(164): 164

[12] HAN G, GU B, CAO L, et al. Hexose enhances oligonucleotide delivery and exon skipping in dystrophin-deficient mdx mice[J]. Nat Commun, 2016, 7: 1098

[13] LIN C, HAN G, NING H, et al. Glycine eenhances satellite cell proliferation, cell transplantation, and oligonucleotide efficacy in dystrophic muscle[J]. Mol Ther, 2020, 28(5): 1339

[14] CHAWLA J, KVARNBERG D. Hydrosoluble vitamins[J]. Handb Clin Neurol, 2014, 120: 891

[15] RAHIMOV F, KUNKEL L. The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy[J]. J Cell Biol, 2013, 201(4): 499

[16] KLEIN S, PRANTL L, GEIS S, et al. Circulating serum CK level *vs.* muscle impairment for in situ monitoring burden of disease in mdx-mice[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2017, 65(4): 327

[17] LEWON M, PETERS C, VAN RY P, et al. Evaluation of the behavioral characteristics of the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy through operant conditioning procedures[J]. Behav Processes, 2017, 142: 8

[18] STEIN C. Eteplirsen approved for Duchenne muscular dystrophy: the FDA faces a difficult choice[J]. Mol Ther, 2016, 24(11): 1884

[19] ANWAR S, YOKOTA T. Golodirsen for Duchenne muscular dystrophy[J]. Drugs Today (Barc), 2020, 56(8): 491

[20] 宁含含，顾犇，韩刚，等. 己糖对杜兴肌肉萎缩症核酸药物 Pip5e-PMO 跳读活性研究[J]. 天津医科大学学报，2019，25(3)：215

[21] VOLKOV I, PRESS Y, RUDOY I. Vitamin B12 could be a "master key" in the regulation of multiple pathological processes[J]. J Nippon Med Sch, 2006, 73(2): 65

[22] ERFANPARAST A, Escort M, Tamaddonfard E, et al. Systemic and local peripheral injections of vitamin B12 suppressed orofacial nociception induced by formalin in rats[J]. Drug Res, 2014, 64(2): 85


（2021-01-10 收稿）