

赵治鹏,李善刚. DMD的肌膜损伤机制及其修复治疗的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 93-99.

Zhao ZP, Li SG. Research progress on the mechanism of sarcolemma damage and repair treatment of Duchenne muscular dystrophy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 93-99.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.014

DMD的肌膜损伤机制及其修复治疗的研究进展

赵治鹏^{1,2}, 李善刚^{1,2*}

(1. 昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 昆明 650500; 2. 省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种严重的致死性肌肉疾病,定位于肌膜的抗肌萎缩蛋白 dystrophin 功能缺失是其致病因素。目前 DMD 研究的热点聚焦于如何对疾病进行治疗,其中膜功能的恢复已经成为临床治疗的密切关注点。本综述将着重总结 dystrophin 异常引起肌膜损伤的机制及膜修复治疗的研究进展,通过从肌膜的角度理解 DMD 的病理机制来促进干预治疗的研究进程。

【关键词】 杜氏肌营养不良症;肌膜损伤;肌膜修复治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0093-07

Research progress on the mechanism of sarcolemma damage and repair treatment of Duchenne muscular dystrophy

ZHAO Zhipeng^{1,2}, LI Shangang^{1,2*}

(1. Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China.

2. State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500)

【Abstract】 Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a fatal muscle disease caused by the loss of dystrophin protein, which is localized in the sarcolemma. Currently, DMD research concentrates on how to treat the disease, and the restoration of membrane function has become a promising therapeutic approach. This review focuses on the mechanism by which muscle membrane damage is caused by dystrophin abnormality and summarizes the research progress regarding membrane repair therapy toward its clinical application.

【Keywords】 Duchenne muscular dystrophy; sarcolemma damage; sarcolemma repair treatment

杜氏肌营养不良症(DMD)是由抗肌萎缩蛋白(dystrophin)基因突变造成的一种X染色体连锁的隐性遗传病^[1],在世界上新生男婴的发病率约为1/3500~1/5000^[2]。患者会在2~3岁时开始发病,表现出肌肉退化,行走困难等症状,随着年龄的增长基本丧失行动能力,生活不能自理,在20~30岁,DMD患者会发展为严重的扩张型心肌病,出现心律失常,最终会因心脏或呼吸衰竭而亡^[3-4]。Dystrophin作为DMD的靶蛋白定位于肌膜内表面,包含四个结构域:N-末端结构域、血影样棒状结构

域、半胱氨酸丰富域及C-末端结构^[5]。在肌细胞内,N-末端结构域与F-actin结合,C-末端结构域与肌纤维膜上的抗肌萎缩蛋白相关糖蛋白(DAGs)结合^[5],DAGs与dystrophin共同组成DAPC(dystrophin associated protein complex),这样的结合使dystrophin作为分子缓震器对肌细胞胞内基质与肌细胞膜的连接及细胞膜的稳定起着至关重要的作用^[6]。DAGs作为多种蛋白质的复合物,包含以下成份:dystroglycans(α 、 β)、sarcoglycans(α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ)、sarcospan、 α -dystrobrevins、syntrophins(α_1 、

【基金项目】 国家自然科学基金(81930121)。

【作者简介】 赵治鹏(1995—),男,硕士研究生,研究方向:发育生物学。E-mail:zzpps15122@163.com

【通信作者】 李善刚(1970—),男,副教授,研究方向:遗传性疾病的基因治疗。E-mail:lisg@lpbr.cn

β_1)、syncoilin、nNOS、Laminin-2、caveolin-3、sodium channels。同样,其中部分蛋白质的缺失也与许多肌肉疾病有关,这说明了该复合物在维持肌膜完整性方面的重要作用^[7]。因为 dystrophin 定位在膜上,所以有相当一部分研究关注膜的变化,虽然我们早已发现 DMD 会发生肌膜损伤,但是具体的损伤机制还需进一步的探讨。肌膜的完整性对于肌肉功能维持具有重要作用,本文将对 DMD 肌膜损伤的机制和功能修复治疗的研究进行综述和分析。

1 DMD 肌膜损伤的机制

正常的肌肉组织具有完整的保护和修复机制。肌肉在离心收缩,也即发生拉伸的收缩时更容易引起肌肉损伤。例如,在正常的下坡过程中,股四头肌肌群反复拉伸,会导致立即无力,随后几天又会引起疼痛、肿胀和发炎(迟发性肌肉酸痛)。这种轻度的肌肉损伤通常在 1~2 周后即可完全恢复,当损伤严重时,肌纤维会发生损坏,然后激活的卫星细胞分裂产生肌细胞,从而融合并替换肌纤维的受损区域^[8]。

但是,在 DMD 患者中,由于 dystrophin 的缺乏以及相关 DAGs 的丢失,肌细胞的稳态发生失衡,而对于 DMD 肌膜完整性受损的探究,定然是从 dystrophin 本身或者是 dystrophin 缺失引起的一系列次级反应着手。dystrophin 连接到多个机械转导和信号通路,这些通路共同起作用以感知和传递肌肉收缩力和膜完整性的信号。到目前为止,对肌膜脆性和通透性增加的原因有以下 4 种假设:(1) DAPC 在肌肉收缩过程中为肌膜提供了机械稳定性^[9-10];(2) dystrophin 作为拉伸激活离子通道的支架蛋白,影响了其对钙的渗透性^[11];(3) 与 dystrophin 连接的信号复合物神经元型一氧化氮合酶(nNOS)的缺失影响血管舒张和向工作肌肉的血流^[12];(4) 由于再生不完全导致的纤维分支引起肌肉变性和再生的恶性循环^[13]。

1.1 肌膜的完整性需要 DAPC 的支持

从结构的角度来看,单纯的磷脂双分子层不足以抵消肌肉收缩过程中施加在膜上的显著作用力,肌膜的结构完整性还需要各种细胞骨架蛋白的参与,比如 dystrophin、F-actin 等^[14]。dystrophin 作为肌细胞中重要的膜蛋白,它直接或者间接地与各种细胞骨架蛋白相联系,这种结构组成能够有效地将肌细胞收缩产生的压力传递出去,从而保护其免受肌肉收缩过程中产生的膜应力的影响^[15]。目前,被

广泛接受的解释膜通透性增加的理论是:dystrophin 缺乏使膜更易破碎,收缩应力导致膜撕裂,从而增加了膜通透性。作为判断肌膜是否出现破裂最为直观的方式就是进行电镜观察,早在 1975 年,Mokri 等^[16]就通过透射电镜分析直接显示了 DMD 病人股外侧肌中肌膜的破损,并将其称为 delta 损伤。在 DMD 的秀丽隐杆线虫模型中,电镜结果同样揭示了肌膜完整性的丧失^[17]。实际上,在 DMD 的临床诊断中,一般通过检测肌细胞“泄露”到血清中的可溶性肌酸激酶来判断肌肉损伤^[18]。

总之,dystrophin 在保护肌膜免受机械损伤中起着重要的作用。虽然细胞膜自身具有修复能力,但是对于 DMD 病人,由于 dystrophin 的缺失,膜破损的频率更高,反复的膜破损和修复只会加速肌细胞的稳态失调,最终导致肌肉的损伤。

1.2 Ca^{2+} 稳态失调增加肌膜透性

肌膜破损只是膜通透性增加的原因之一。为了更好的将其与膜通透性增加的其他原因区分开来,2003 年,Bansal 等^[19]直接利用激光人工破膜,通过荧光标记实时观测肌膜的自动修复过程。实验结果发现,在不到 1 min 的时间内肌膜就完成了自我修复,而且,mdx 小鼠的肌膜修复能力表现正常,与对照组相比没有差异。通过以上实验我们可以合理假设,由离心收缩引起的肌膜破损会同步导致膜通透性增加并在 1 min 左右后恢复正常。然而,Yeung 等^[20]和 Sonobe 等^[21]对 mdx 小鼠肌纤维的研究发现,细胞内钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)在拉伸收缩后缓慢增加,并在 10~20 min 后达到最大值,并且离子浓度的增加可被拉伸激活通道的阻断药物所消除,另一项实验发现 $[Ca^{2+}]_i$ 没有显示出与损伤一致的近膜局部升高,这些证据表明 $[Ca^{2+}]_i$ 升高是由通道激活而不是膜损伤引起的。

拉伸激活通道最初是由 Guharay 和 Sachs 在 1984 年提出^[22],这些通道可渗透大多数阳离子,并在正常条件下允许 Na^+ 和 Ca^{2+} 进入。这类拉伸激活通道(SAC)对非特异性阳离子(NSC)具有渗透性,因此称为 SAC_{NSC} 。已有研究表明, SAC_{NSC} 在 mdx 小鼠肌肉中更活跃^[23-24]。 SAC_{NSC} 本身的分子结构目前尚不明确,TRPC1、TRPC6 和 TRPV2(瞬时受体电位)是其潜在的分子组成。针对 SAC_{NSC} 的膜片钳实验发现, SAC_{NSC} 并不是通过拉伸收缩直接激活的,进一步的研究后,Allen 等^[25]提出了如下通路:拉伸收缩引起 ROS(活性氧)的产生,ROS 可激活 src 激酶,该激酶的活性导致 SAC_{NSC} 的开放进而增加了

Ca²⁺的内流。为了支持通道激活理论,Allen 团队已证明对 mdx 肌肉拉伸收缩后,肌细胞对染料的摄入可逐渐增加并持续 60 min 以上,并且使用 SAC_{NSC} 阻滞剂能阻止大部分这种增加的膜渗透性。另外,使用 ROS 清除剂也可减少膜渗透性。

Ca²⁺稳态对肌细胞正常的生理功能至关重要,对于缺乏 dystrophin 的肌纤维来说,拉伸收缩将会引起 [Ca²⁺]_i 的异常升高,同时造成胞内 Ca²⁺ 相关通路的异常激活和扰动,最终导致肌细胞结构改变和功能失调。线粒体作为细胞的能量供应中心,当线粒体 Ca²⁺ 过载时,会引起线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 不可逆打开,最终导致线粒体功能失调甚至细胞死亡。此外,线粒体产生的 ROS 可以导致肌膜上相应通道开放和膜脂的过氧化,这些均会增加肌膜的通透性^[26]。

1.3 神经元型一氧化氮合酶 (nNOS) 的缺失间接加剧肌膜的损伤

nNOS 是 NO 合成的关键酶,在肌肉中,nNOS 作为 DAPC 之一定位于肌膜上。nNOS 产生的 NO 可以释放到肌细胞外引起血管扩张,确保肌肉在运动过程中能获得大量血液输送来的葡萄糖和氧气^[27]。因为 DMD 病人中 nNOS 缺失,所以其肌肉的运动并不会引起血管的扩张,继而会导致运动部位缺血,加重肌膜损伤,诱发局部坏死^[28]。

在 mdx 小鼠中 nNOS 也同样丢失,当恢复肌膜上 nNOS 的表达后,可以显著改善 mdx 小鼠的病理表型。在对 min-dystrophin 进行设计时,保留 nNOS 的结合位点对后续的治疗疗效至关重要^[29-30]。这些实验结果都说明 nNOS 在肌肉当中充当着重要的角色。总之,nNOS 虽然不是 DMD 病理的基础,但它在活动肌肉中可以对血管收缩进行调节,保证肌肉的正常工作,nNOS 的缺失间接加剧了肌膜的损伤^[12]。

1.4 肌纤维分支增加诱发损伤的易感性

很多研究已经发现,离心收缩后,mdx 小鼠的肌肉比野生型小鼠的更易受损。然而,事实并非总是如此,当使用年轻的小鼠(≤8 周)进行实验时,肌肉损伤就不再具有差异性^[31]。这两组实验的区别在于实验对象年龄的不同,那么 mdx 小鼠的年龄对其肌肉有什么影响呢?

通常纤维分支是肌纤维再生期间肌管异常融合的结果^[32],早期研究发现,随着年龄的增加,mdx 小鼠肌纤维的分支数量和复杂性均增加^[33]。同时,我们也能看到肌肉的损伤程度与纤维分支的扩张

存在明显的相关性^[31]。为了直接分析分支纤维的影响,Head 等^[34]分离出 mdx 小鼠单个的 EDL 纤维,并对分支纤维进行检测,发现分支纤维在相同收缩力下更易受损,事实上,纤维分支是肌肉萎缩症的典型病理表现。我们不难发现,分支纤维的易损性导致肌肉退化,而这又会刺激新的肌肉再生和肌管的异常融合,由此造成了一个恶性循环,加重肌肉的损伤和肌膜的不完整性。

目前来看,DMD 肌膜损伤主要来自运动的直接机械损伤、膜上离子通道的异常激活,以及肌肉缺血和纤维分支引起的间接膜损伤。随着疾病进程的发展,多种损伤途径均会加重肌肉负荷,肌膜发生撕裂不仅造成胞内物质发生泄漏,同时也促进了 Ca²⁺ 的内流,受损的肌膜同样需要 Ca²⁺ 参与激活修复途径,再加上本身就异常激活的 SAC_{NSC},这就导致了肌膜损伤的恶性循环,另外,肌肉缺血和纤维分支也只会加剧膜的损伤。因此,针对 DMD 肌膜不同的损伤途径开展相应的治疗措施具有重要意义。

2 基于改善 DMD 肌膜透性的干预治疗策略

DMD 的肌膜损伤会引起一系列的 DMD 病理表型,因此从肌膜损伤机制的阐述到治疗方式的探索研究是改善 DMD 的重要一步。不同的肌膜损伤机制需要不同的修复策略:直接的膜破损需要膜稳定剂来维持膜的完整性,肌膜通透性增加需要对应的抑制剂来调节细胞内外离子的稳态,肌肉缺血需要提高 NO 的含量来增加血管扩张,而纤维分支的增加则需要对肌纤维进行修复。

2.1 合成的膜稳定剂

因为 DMD 患者肌细胞最明显的病理特征就是肌膜破损,所以针对破损肌膜使用合成的膜稳定剂来防止膜损伤是一种独特的治疗方法。

泊洛沙姆 188 (P188) 是聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯 (PEO-PPO-PEO) 三嵌段共聚物,它作为一种非离子型表面活性剂,主要用作乳化剂、增溶剂、基因药物载体等药用辅料,并且是目前应用于静脉注射唯一人工乳化剂。另外,P188 在细胞膜的保护方面也有重要应用^[35-38]。P188 第一次在肌肉中的应用是在 1992 年,研究人员使用 P188 显著减少了由电穿孔引起的肌细胞破损^[35]。在 DMD 领域,具有开创性研究的是 Yasuda 等^[36]在 2005 年证明对于分离的 mdx 小鼠心肌细胞,P188 可以通过阻断被动拉伸介导的 Ca²⁺ 过载,改善心肌细胞的功能。体内实验同样取得了良好的结果,使用 mdx 小鼠全身给

药 P188 能够改善心室构型并预防急性心力衰竭^[36]。在经典的 DMD 狗模型 (golden retriever muscular dystrophy, GRMD) 中,长期的 P188 注射可以预防左心室重塑、减少心肌纤维化、阻止心肌肌钙蛋白 I 的释放^[39]。对于 DMD 骨骼肌,早期研究并未看到 P188 的保护效果^[40],直到最近一项研究发现给药方式在其中起着重要作用。他们通过皮下给药,便能显著改善 mdx 小鼠后肢肌肉功能,降低伊文思蓝染料的吸收^[41],此外,皮下长期注射 P188 也能改善 mdx:utr^{-/-}小鼠的膈肌功能^[42]。对应的,腹腔给药或静脉注射就无法达到这样的治疗效果^[40,43]。2015 年,Phrixus 和 Ethicor 公司就 Carmeseal-MD (P-188NF) 的欧洲准入计划 (EAP) 进行合作,将 Carmeseal-MD 作为未经许可的医药产品提供给 DMD 呼吸和心脏缺陷患者。据报道,一名治疗长达 15 个月的患者具有良好的耐受性并观察到肌酸激酶和心肌肌钙蛋白 I 的降低。在未来,需要更大规模的人类临床数据来充分评估膜稳定剂对 DMD 患者的治疗效果。

2.2 肌膜上离子通道的抑制

对于 DMD,除了肌膜破损,肌膜上拉伸激活通道的过度激活同样会引起肌膜通透性增加、Ca²⁺ 大量内流和过载。链霉素可用作 Ca²⁺ 通道的非特异阻滞剂^[44],链霉素治疗延缓了年轻 mdx 小鼠肢体肌营养不良症状的发作,但不能阻止疾病进展。而长期使用链霉素治疗 mdx 小鼠可减少肢体肌肉病理,但在膈肌和心肌的治疗中并没有效果^[44]。另外一种 SAC_{NSC} 的阻滞剂 GsMTx-4 能够改善肌力、减少肌肉退化^[20],降低心肌细胞的静息 [Ca²⁺]_i^[45]。在 DMD 骨骼肌中,TRPC 家族已被证明可以作为靶点减少胞外 Ca²⁺ 的内流。通过反义寡核苷酸抑制 TRPC1 和 TRPC4 的表达能够降低 mdx 小鼠肌纤维中 Ca²⁺ 的进入^[46]。此外,转基因抑制 TRPC3 在 mdx 和 Scgd^{-/-}小鼠中的表达,可以减少纤维化、血清肌酸激酶和核中心化等肌营养不良表型^[47]。

钠氢离子交换蛋白 1 (Na⁺/H⁺ exchanger-1, NHE-1) 是一种跨膜蛋白,它不仅能够控制细胞体积而且参与调节胞内离子浓度^[48]。在 mdx 小鼠和 DMD 病人的骨骼肌中,胞内 Na⁺ 浓度增加,而 Na⁺ 过载往往会引起肌肉水肿和肌肉的退化^[49-50]。Rimeporide 是一种 NHE-1 的抑制剂,它在 mdx 小鼠上显示出了抗炎和抗纤维化的效果^[51],也在 GRMD 狗模型上看到了对心脏的保护作用^[52]。在 2016 年开展的 I b 期临床试验中,Rimeporide 显示出良好

的剂量耐受性,同时作为一种心脏保护治疗表现出了对 DMD 的治疗潜力,这为进一步的疗效研究提供了依据^[51]。离子通道抑制剂能够针对特定的膜通道改善离子稳态,但是仍需要临床的检验来确定其疗效和安全性。另外,由于骨骼肌和心肌之间存在差异,抑制剂的具体作用也需进一步的研究。

2.3 血管扩张

肌肉收缩过程中,NO 合酶产生 NO,它激活鸟苷酸环化酶合成 cGMP,NO-cGMP 通路可以引起血管扩张,增加血液流动,为运动中的肌肉提供足够的氧气和营养^[53]。因为 DMD 患者缺乏 NO 合酶,相应的 cGMP 形成也减少,所以 DMD 的一个潜在治疗策略是放大 NO-cGMP 信号来改善血管舒张^[54]。

磷酸二酯酶 5 (Phosphodiesterase 5, PDE5) 抑制剂可以抑制 cGMP 的降解,从而放大 NO-cGMP 信号通路^[55]。西地那非和他达拉非是 PDE5 的两种抑制剂,这两种药物具有血管舒张作用,最初是用于治疗勃起功能障碍和心力衰竭^[56]。通过对 mdx 小鼠使用,能够显著改善小鼠的肌营养不良病理表型^[57-58]。但是一项 III 期临床试验证明他达拉非并不能改善 DMD 病人的活动能力 (NCT01865084),因此目前已停止关于他达拉非的相关研究^[59]。同样,另外一种抑制剂西地那非在一项临床试验中未显示出对心脏功能的改善,而且由于较多的副作用,此项试验也已停止^[60]。

在正常肌肉组织中,L-精氨酸可以转化为 NO,但是 DMD 病人中高合成的非对称性二甲基精氨酸和低合成的高精氨酸导致 NO 合酶转化率降低^[61]。因此,通过提高 L-精氨酸水平也是一种治疗策略。实验证明,L-精氨酸可以减轻 mdx 小鼠的炎症、增强肌肉再生^[62]。最近的一项 III 期临床试验显示,L-精氨酸和二甲双胍联合用药能够减缓 DMD 病人肌肉功能的下降^[63]。

总的来说,通过放大 NO-cGMP 信号通路的 PDE5 抑制剂对 DMD 病人的肌肉功能改善没有积极作用,而利用 L-精氨酸向 NO 的转化,不仅在 mdx 小鼠中看到了病理表型的改善,而且临床试验也取得了良好的效果,这为将来减轻 DMD 病人的肌肉缺血提供了新方案。

2.4 肌纤维分支的降低

肌纤维分支增加属于 DMD 后期的病理表型,随着肌肉不断地再生和坏死,脆弱的分支纤维只会加剧肌膜的损伤,而降低纤维分支的发生是预防和改善 DMD 肌肉病理的一项有效措施。

嗅觉受体 (olfactory receptor, OR) 是 G 蛋白偶联

受体,主要存在于嗅觉上皮的神经元中,但它们也在大脑,舌头,睾丸,脾脏,前列腺,肾脏以及平滑肌和骨骼肌等非嗅觉组织中表达^[64-65]。早在 2009 年,Griffin 等^[66]就发现小鼠嗅觉受体 23 (mOR23, olfr16) 是小鼠肌肉中调节肌纤维分支的分子,2016 年他们通过在骨骼肌中特异性表达 mOR23,发现能够降低肌肉损伤后肌纤维分支的发生率^[67]。肌肉细胞内的 mOR23 信号通路可以作为改善 DMD 患者肌肉结构功能的有效药物靶标,不过,目前需要进一步的研究来确定 mOR23 及其相关分子的途径,才能为后续使用小分子激活信号通路提供实验基础。

DMD 肌膜损伤的修复治疗策略主要以对应信号通路的抑制或激活为切入点,或者是使用膜稳定剂直接进行膜密封。我们可以看到,针对肌膜的损伤修复能够大大改善 DMD 的病理表型,这体现了肌膜完整性对延缓 DMD 疾病进程的重要性。但是,不论是哪种治疗方法,既要验证其在动物模型上的作用,也要走上临床,保证其安全性和有效性,这是漫长的一步,但也是疾病研究到临床转化的必经之路。

3 总结与展望

杜氏肌营养不良症作为一种严重的神经肌肉疾病,虽然我们早已确定 dystrophin 缺失是该疾病的发生原因,但是目前还没有完全治愈的方法。dystrophin 是肌细胞中重要的膜结构蛋白,它的缺失直接影响了肌膜的稳态并触发下游多种病理途径。DMD 肌膜破损和 Ca^{2+} 稳态失调是引起肌膜损伤的直接原因,除此之外,nNOS 的缺失和纤维分支的增加也间接加剧了膜损伤。根据不同的损伤机制,我们可以采取相应的药物来改善肌膜的功能,不论是使用 P188 直接稳定肌膜还是使用 Rimeporide 等改善胞内外离子稳态,相比于基因疗法,这些药理学的治疗策略不用考虑患者的突变类型,适用于所有的 DMD 患者。目前,关于 DMD 肌膜修复的研究发展迅速,比如最近徐浩新团队利用小分子激活溶酶体上的 TRP 通道,促进溶酶体胞吐来修复肌膜损伤,改善了 mdx 小鼠的病理表型^[68-69]。此外,有关肌细胞损伤修复的研究也在不断发展,除了依赖于肌卫星细胞,Roman 等^[70]最近还发现肌细胞损伤后可以触发钙离子、Cdc42 和磷酸激酶 C 的信号级联反应,通过微管和动力蛋白,肌核能够迁移到损伤区域在局部递送 mRNA 加快肌细胞的修复。由此我们可以看到肌膜的损伤修复机制仍在不断完善中,肌膜本身的复杂性以及 dystrophin 这个重要膜

蛋白的缺失使得 DMD 中的膜损伤受到多方面的影响,因此在未来需要更多的研究去探索新的 DMD 肌膜损伤机制。同时我们可以看到,DMD 肌膜完整性的维持与整体组织健康之间有着重要的联系,DMD 病理的开始和进展也以膜损伤为特征,因此膜修复机制的调节具有巨大的治疗潜力。

参考文献:

- [1] Mercuri E, Muntoni F. Muscular dystrophies [J]. *Lancet*, 2013, 381(9869): 845-860.
- [2] Crisafulli S, Sultana J, Fontana A, et al. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2020, 15(1): 141.
- [3] Meyers TA, Townsend D. Cardiac pathophysiology and the future of cardiac therapies in duchenne muscular dystrophy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17): 4098.
- [4] Silva IS, Pedrosa R, Azevedo IG, et al. Respiratory muscle training in children and adults with neuromuscular disease [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 9(9): 11711.
- [5] Nakamura A, Takeda S. Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 184393.
- [6] Whitmore C, Morgan J. What do mouse models of muscular dystrophy tell us about the DAPC and its components? [J]. *Int J Exp Pathol*, 2014, 95(6): 365-377.
- [7] Dowling JJ, Weihl CC, Spencer MJ. Molecular and cellular basis of genetically inherited skeletal muscle disorders [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(11): 713-732.
- [8] 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(5): 267-279.
- [9] Claffin DR, Brooks SV. Direct observation of failing fibers in muscles of dystrophic mice provides mechanistic insight into muscular dystrophy [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(2): 651-658.
- [10] Ervasti JM. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(2): 108-117.
- [11] Allen DG, Whitehead NP, Froehner SC. Absence of dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: roles of Ca^{2+} , reactive oxygen species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(1): 253-305.
- [12] Timpani CA, Hayes A, Rybalka E. Therapeutic strategies to address neuronal nitric oxide synthase deficiency and the loss of nitric oxide bioavailability in Duchenne Muscular Dystrophy [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2017, 12(1): 100.
- [13] Kiriaev L, Kueh S, Morley JW, et al. Branched fibers from old fast-twitch dystrophic muscles are the sites of terminal damage in muscular dystrophy [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 314(6): C662-C674.
- [14] Sitarska E, Diz-Muñoz A. Pay attention to membrane tension: Mechanobiology of the cell surface [J]. *Curr Opin Cell Biol*,

- 2020, 66: 11–18.
- [15] Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, et al. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(8): 3710–3714.
- [16] Mokri B, Engel AG. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber [J]. *Neurology*, 1975, 25(12): 1111–1120.
- [17] Brouilly N, Lecroisey C, Martin E, et al. Ultra-structural time-course study in the *C. elegans* model for Duchenne muscular dystrophy highlights a crucial role for sarcomere-anchoring structures and sarcolemma integrity in the earliest steps of the muscle degeneration process [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(22): 6428–6445.
- [18] De Freitas Nakata KC, Da Silva Pereira PP, Salgado Riveros B. Creatine kinase test diagnostic accuracy in neonatal screening for Duchenne Muscular Dystrophy: A systematic review [J]. *Clin Biochem*, 2021, 98: 1–9.
- [19] Bansal D, Miyake K, Vogel SS, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy [J]. *Nature*, 2003, 423(6936): 168–172.
- [20] Yeung EW, Whitehead NP, Suchyna TM, et al. Effects of stretch-activated channel blockers on $[Ca^{2+}]_i$ and muscle damage in the mdx mouse [J]. *J Physiol*, 2005, 562(2): 367–380.
- [21] Sonobe T, Inagaki T, Poole DC, et al. Intracellular calcium accumulation following eccentric contractions in rat skeletal muscle *in vivo*: role of stretch-activated channels [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(4): R1329–R1337.
- [22] Guharay F, Sachs F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle [J]. *J Physiol*, 1984, 352: 685–701.
- [23] Franco-Obregón A, Lansman JB. Changes in mechanosensitive channel gating following mechanical stimulation in skeletal muscle myotubes from the mdx mouse [J]. *J Physiol*, 2002, 539(2): 391–407.
- [24] Ducret T, Vandebrouck C, Cao ML, et al. Functional role of store-operated and stretch-activated channels in murine adult skeletal muscle fibres [J]. *J Physiol*, 2006, 575(3): 913–924.
- [25] Allen DG, Gervasio OL, Yeung EW, et al. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(2): 83–91.
- [26] Zabłocka B, Górecki DC, Zabłocki K. Disrupted calcium homeostasis in duchenne muscular dystrophy: a common mechanism behind diverse consequences [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20): 11040.
- [27] Meconell GK, Rattigan S, Lee-Young RS, et al. Skeletal muscle nitric oxide signaling and exercise: a focus on glucose metabolism [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 303(3): E301–E307.
- [28] Tidball JG, Wehling-Henricks M. Nitric oxide synthase deficiency and the pathophysiology of muscular dystrophy [J]. *J Physiol*, 2014, 592(21): 4627–4638.
- [29] Lai Y, Thomas GD, Yue Y, et al. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(3): 624–635.
- [30] Zhang Y, Yue Y, Li L, et al. Dual AAV therapy ameliorates exercise-induced muscle injury and functional ischemia in murine models of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(18): 3720–3729.
- [31] Chan S, Head SI, Morley JW. Branched fibers in dystrophic mdx muscle are associated with a loss of force following lengthening contractions [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293(3): C985–C992.
- [32] Pichavant C, Pavlath GK. Incidence and severity of myofiber branching with regeneration and aging [J]. *Skelet Muscle*, 2014, 4: 9.
- [33] Head SI, Williams DA, Stephenson DG. Abnormalities in structure and function of limb skeletal muscle fibres of dystrophic mdx mice [J]. *Proc Biol Sci*, 1992, 248(1322): 163–169.
- [34] Head SI. Branched fibres in old dystrophic mdx muscle are associated with mechanical weakening of the sarcolemma, abnormal Ca^{2+} transients and a breakdown of Ca^{2+} homeostasis during fatigue [J]. *Exp Physiol*, 2010, 95(5): 641–656.
- [35] Lee RC, River LP, Pan FS, et al. Surfactant-induced sealing of electroporabilized skeletal muscle membranes *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(10): 4524–4528.
- [36] Yasuda S, Townsend D, Michele DE, et al. Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer [J]. *Nature*, 2005, 436(7053): 1025–1029.
- [37] Maskarinec SA, Wu G, Lee KY. Membrane sealing by polymers [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1066: 310–320.
- [38] Moloughney JG, Weisleder N. Poloxamer 188 (p188) as a membrane resealing reagent in biomedical applications [J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2012, 6(3): 200–211.
- [39] Townsend D, Turner I, Yasuda S, et al. Chronic administration of membrane sealant prevents severe cardiac injury and ventricular dilatation in dystrophic dogs [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(4): 1140–1150.
- [40] Quinlan JG, Wong BL, Niemeier RT, et al. Poloxamer 188 failed to prevent exercise-induced membrane breakdown in mdx skeletal muscle fibers [J]. *Neuromuscul Disord*, 2006, 16(12): 855–864.
- [41] Houang EM, Haman KJ, Filareto A, et al. Membrane-stabilizing copolymers confer marked protection to dystrophic skeletal muscle *in vivo* [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2015, 2: 15042.
- [42] Markham BE, Kernodle S, Nemzek J, et al. Chronic dosing with membrane sealant poloxamer 188 NF improves respiratory dysfunction in dystrophic Mdx and Mdx/Utrophin^{-/-} mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134832.
- [43] PLOS ONE Staff. Correction; poloxamer 188 has a deleterious effect on dystrophic skeletal muscle function [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119252.

- [44] Jørgensen LH, Blain A, Grealley E, et al. Long-term blocking of calcium channels in mdx mice results in differential effects on heart and skeletal muscle [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(1): 273–283.
- [45] Ward ML, Williams IA, Chu Y, et al. Stretch-activated channels in the heart: contributions to length-dependence and to cardiomyopathy [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008, 97(2–3): 232–249.
- [46] Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M, et al. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers [J]. *J Cell Biol*, 2002, 158(6): 1089–1096.
- [47] Millay DP, Goonasekera SA, Sargent MA, et al. Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(45): 19023–19028.
- [48] Chen L, Chen CX, Gan XT, et al. Inhibition and reversal of myocardial infarction-induced hypertrophy and heart failure by NHE-1 inhibition [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(1): H381–H387.
- [49] Weber MA, Nagel AM, Wolf MB, et al. Permanent muscular sodium overload and persistent muscle edema in Duchenne muscular dystrophy: a possible contributor of progressive muscle degeneration [J]. *J Neurol*, 2012, 259(11): 2385–2392.
- [50] Mijares A, Altamirano F, Kolster J, et al. Age-dependent changes in diastolic Ca^{2+} and Na^{+} concentrations in dystrophic cardiomyopathy: Role of Ca^{2+} entry and IP3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(4): 1054–1059.
- [51] Previtali SC, Gidaro T, Díaz-Manera J, et al. Rimeporide as a first-in-class NHE-1 inhibitor: Results of a phase Ib trial in young patients with Duchenne Muscular Dystrophy [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104999.
- [52] Ghaleh B, Barthélemy I, Wojcik J, et al. Protective effects of rimeporide on left ventricular function in golden retriever muscular dystrophy dogs [J]. *Int J Cardiol*, 2020, 312: 89–95.
- [53] Percival JM, Adamo CM, Beavo JA, et al. Evaluation of the therapeutic utility of phosphodiesterase 5A inhibition in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011, 204: 323–344.
- [54] Ennen JP, Verma M, Asakura A. Vascular-targeted therapies for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Skelet Muscle*, 2013, 3(1): 9.
- [55] Dombrowsky NW, Ölmestig JNE, Witting N, et al. Role of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in Duchenne and Becker muscular dystrophies—Still a possible treatment modality? [J]. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28(11): 914–926.
- [56] Barroso F, Ribeiro JC, Miranda EP. Phosphodiesterase type 5 inhibitors and visual side effects: a narrative review [J]. *J Ophthalmic Vis Res*, 2021, 16(2): 248–259.
- [57] Khairallah M, Khairallah RJ, Young ME, et al. Sildenafil and cardiomyocyte-specific cGMP signaling prevent cardiomyopathic changes associated with dystrophin deficiency [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(19): 7028–7033.
- [58] Kobayashi YM, Rader EP, Crawford RW, et al. Sarcolemma-localized nNOS is required to maintain activity after mild exercise [J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 511–515.
- [59] Victor RG, Sweeney HL, Finkel R, et al. A phase 3 randomized placebo-controlled trial of tadalafil for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Neurology*, 2017, 89(17): 1811–1820.
- [60] Leung DG, Herzka DA, Thompson WR, et al. Sildenafil does not improve cardiomyopathy in Duchenne/Becker muscular dystrophy [J]. *Ann Neurol*, 2014, 76(4): 541–549.
- [61] Hafner P, Bonati U, Erne B, et al. Improved muscle function in duchenne muscular dystrophy through L-arginine and metformin: an investigator-initiated, open-label, single-center, proof-of-concept-study [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147634.
- [62] Hnia K, Gayraud J, Hugon G, et al. L-arginine decreases inflammation and modulates the nuclear factor- κ B/matrix metalloproteinase cascade in mdx muscle fibers [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(6): 1509–1519.
- [63] Hafner P, Bonati U, Klein A, et al. Effect of combination l-citrulline and metformin treatment on motor function in patients with duchenne muscular dystrophy: a randomized clinical trial [J]. *JAMA Netw Open*, 2019, 2(10): e1914171.
- [64] Kang N, Koo J. Olfactory receptors in non-chemosensory tissues [J]. *BMB Rep*, 2012, 45(11): 612–622.
- [65] Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(11): 4410–4415.
- [66] Griffin CA, Kafadar KA, Pavlath GK. MOR23 promotes muscle regeneration and regulates cell adhesion and migration [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(5): 649–661.
- [67] Pichavant C, Burkholder TJ, Pavlath GK. Decrease of myofiber branching via muscle-specific expression of the olfactory receptor mOR23 in dystrophic muscle leads to protection against mechanical stress [J]. *Skelet Muscle*, 2016, 6: 2.
- [68] Cheng X, Zhang X, Gao Q, et al. The intracellular Ca^{2+} channel MCOLN1 is required for sarcolemma repair to prevent muscular dystrophy [J]. *Nat Med*, 2014, 20(10): 1187–1192.
- [69] Yu L, Zhang X, Yang Y, et al. Small-molecule activation of lysosomal TRP channels ameliorates Duchenne muscular dystrophy in mouse models [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(6): 2736.
- [70] Roman W, Pinheiro H, Pimentel MR, et al. Muscle repair after physiological damage relies on nuclear migration for cellular reconstruction [J]. *Science*, 2021, 374(6565): 355–359.