

论著 · 临床研究

神经源性一氧化氮合酶对临床疑似 Becker 型肌营养不良的诊断意义

李西华¹ 赵蕾¹ 吴燕² 吴洁² 何大可² 刘晓青³

(上海交通大学医学院附属新华医院,1. 儿科研究所神经肌肉研究室,上海 200092;
2. 儿科,上海 200092; 3. 崇明分院儿科,上海 202150)

〔摘要〕 **目的** 利用免疫组织化学技术检测肌细胞膜上 Dystrophin 蛋白表达是鉴别诊断 Duchenne 型和 Becker 型肌营养不良(DMD 和 BMD)的病理学基础,然而个别病例的肌细胞膜上 Dystrophin 蛋白表达几乎接近于正常,这给临床疑似 BMD 诊断带来一定困难。本研究探讨神经源性一氧化氮合酶(nNOS)对 BMD 患者的诊断价值。**方法** 对 Dys-C 端结构域表达呈阳性的 5 例 BMD(其中已临床明确诊断 3 例,临床疑似 2 例)和作为对照的骨折患儿肌肉组织,利用免疫组织化学的方法行单克隆 Dyrophin 抗体和 nNOS 抗体染色。**结果** 与对照组比较,已临床明确诊断 BMD 3 例病例的肌细胞膜上 Dys-C、Dys-R 和 Dys-N 端结构域蛋白均有显著缺乏,nNOS 均未见表达;临床疑似 2 例 BMD 病例的肌细胞膜上,即使 Dystrophin 蛋白接近于正常表达,但 nNOS 在肌细胞膜上是缺乏的。**结论** 对 Dystrophinn 三端结构域蛋白接近于正常表达的临床疑似 BMD 患儿,可通过 nNOS 抗体染色达到明确诊断的目的。

[中国当代儿科杂志,2011,13(4):288-291]

〔关键词〕 神经源性一氧化氮合酶;抗肌萎缩蛋白;Becker 型肌营养不良;儿童
〔中图分类号〕 R72 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2011)04-0288-04

Diagnostic value of neuronal nitric oxide synthase antibody for clinically suspected Becker muscular dystrophy

LI Xi-Hua, ZHAO Lei, WU Yan, WU Jie, HE Da-Ke, LIU Xiao-Qing. Department of Neuromuscular Disease, Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China (Liu X-Q, Email: xqliu@sh163.net)

Abstract: **Objective** Immunohistochemistry using antibodies to dystrophin is the pathological basis for the differential diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD and BMD). In rare cases, however, labelling dystrophin on sarcolemma is equivocal and similar to that observed in controls. This makes the diagnosis of BMD difficult. This study aimed to explore the diagnostic value of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) antibody for clinically suspected BMD. **Methods** Immunohistochemical staining was performed on muscle specimens of 5 cases of BMD with positive expression of Dys-C (3 cases had a confirmed diagnosis of BMD, 2 cases were clinically suspected as BMD) by using dystrophin and nNOS antibodies. Normal muscle specimens from the children with fracture were used as controls. **Results** Compared with the controls, the expression of Dys-R, Dys-C and Dys-N was markedly reduced and nNOS was not expressed on sarcolemma in the three cases of definitely diagnosed BMD. The two cases of clinically suspected as BMD had a complete absence of sarcolemmal nNOS, even if had a similar expression of dystrophin on sarcolemma to the controls. **Conclusions** nNOS antibody staining can be used for a definite diagnosis in children with clinically suspected BMD who have the almost normal expression of dystrophin.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (4):288-291]

Key words: Neuronal nitric oxide synthase; Dystrophin; Becker muscular dystrophy; Child

Dystrophin 蛋白位于肌细胞膜磷脂双层结构中,是连接胞外基质和胞内纤维状肌动蛋白(F-actin)组成的细胞骨架蛋白,与 Dystroglycans、Sarcoglycans 和 Syntrophins 三种糖蛋白共同构成了 DGC(dystrophin associated glycoprotein complex)复合体。如果复合体中某一种编码蛋白质的基因发生突变,则会导致

[收稿日期]2010-05-31;[修回日期]2010-09-08
[基金项目]上海交通大学医学院科技基金项目(No. 2008XJ039)。
[作者简介]李西华,女,博士,副研究员。
[通信作者]刘晓青,主任医师。

不同类型肌营养不良。如 Dystrophin 基因突变打破阅读编码框,就会引起该蛋白缺乏,导致 Duchenne 型肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD);若该基因发生整码突变,则保留部分蛋白表达,引起 Becker 型肌营养不良 (Becker muscular dystrophy, BMD)。因此目前实验室采用免疫组织化学技术检测肌细胞膜上相关蛋白是否存在是鉴别诊断不同类型肌营养不良首选方法。由于 Dystrophin 蛋白在 BMD 患者的肌细胞膜上呈缺乏现象,因此对 Dystrophin 不同结构域抗体病理反应也有多种类型,如弱阳性、线状、点线状、镶嵌状和斑片状等。最近发现个别病例 Dystrophin 蛋白表达几乎接近于正常对照,这对临床出现血清肌酸激酶 (CK) 值升高、无明显步态异常而被临床高度疑似 BMD 患儿达不到病理诊断目的。因此寻找一种与 Dystrophin 相关蛋白在肌细胞膜上表达的“敏感元件”对临床诊断有很大的帮助。Dubowitz 等^[1]研究发现,肌营养不良患儿在肌肉病理发生发展过程中,Dystrophin 蛋白缺乏可继发的引起位于肌膜上神经源性一氧化氮

合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 活性缺乏,该酶或蛋白表达异常有助于对抗肌萎缩蛋白病 (dystrophinopathy) 发病机制的研究。基于该观点,本研究对临床怀疑 BMD 患儿能否利用单克隆 nNOS 抗体用于病理明确诊断进行了探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料及标本

2009 年 10 月至 2010 年 4 月在上海交通大学医学院附属新华医院儿科研究所肌活检标本库中,按常规检测方法^[1-3],即通过 Dystrophin (Rod domain)、Dystrophin (C-terminus) 和 Dystrophin (N-terminus) 结构域抗体 (以下分别简称 Dys-R、Dys-C 和 Dys-N) 检测 Dys-C 端结构域蛋白表达阳性者,共计 5 例患儿肱二头肌标本。其中,结合临床相关检查已明确诊断为 BMD 病例标本 3 例 (病例 1、病例 2 和病例 3),临床怀疑 BMD 2 例 (病例 4 和病例 5),见表 1。正常对照标本来源于新华医院骨折患儿。

表 1 患儿临床表现和 Dystrophin 蛋白表达

临床表现	病例 1	病例 2	病例 3	病例 4	病例 5
肌活检年龄 (岁)	10	4	8	1.5	2
最高血清 CK (U/L)	7782	12350	6020	5200	9600
独立行走年龄 (月)	14	14	16	13	12
肌张力是否低下	是	是	是	无	无
肌肥大	有	有	有	无	无
难于跑、跳或爬楼梯	是,较严重	否	是,较严重	否	否
肌挛缩	有	否	有	否	否
Gower 征	阳性	阴性	阳性	阴性	阴性
肌电图 (腓肠肌)	肌源性损害	肌源性损害	肌源性损害	未见异常	未见异常
Dys-R	(+/-)	(+/-)	(++)	(+)	(+++)
Dys-C	(+)	(+++)	(+)	(+++)	(++)
Dys-N	(+)	(-)	(+/-)	(+++)	(+)

(+++):蛋白表达正常; (++) :蛋白轻度缺乏; (+) :蛋白中度缺乏; (+/-) :蛋白严重缺乏; (-) :蛋白缺失

1.2 材料

单克隆抗 Dys-R、Dys-C 和 Dys-N 三端结构域抗体 (Novocastra),多克隆 nNOS 抗体 (Santa Cruz),生物素标记二抗 (KPL),ABC 试剂盒 (Vitctor),DAB 显色试剂盒 (长岛生物技术公司)。

1.3 免疫组化染色

5 μm 的连续冰冻切片,-20℃ 丙酮固定 10 min,PBS 洗涤 3 次,用含有 3% H₂O₂ 溶液孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次,滴加封闭血清,室温孵育 30 min。滴加一抗 (Dys-R 1:50;Dys-C 1:50;Dys-N 1:20),室温孵育 60 min,PBS 洗涤 3 次,滴加荧光素标记的二抗 (1:150),室温 30 min,PBS 洗涤 3 次

后用甘油-PBS 液封片,荧光显微镜下观察。另外,滴加一抗 nNOS (1:200),室温孵育 60 min,PBS 洗涤 3 次,滴加生物素标记的二抗 (1:100),室温 30 min,PBS 洗涤 3 次,ABC 液作用 30 min,PBS 洗涤 3 次,DAB 显色 8 min,脱水封片后光学显微镜下观察。空白阴性对照:分别用 PBS 代替一抗、二抗。每次实验均设正常组织标本作阳性对照。

2 结果

2.1 肌肉组织的 Dystrophin 和 nNOS 检测结果
与正常对照比较,已确诊为 BMD 的病例 1、病

例2和病例3的肌细胞膜上Dys-C结构域蛋白均有不同程度的表达,而Dys-R和Dys-N端结构域蛋白均有不同程度的缺乏(表1)。对临床疑似的BMD病例,与正常对照比较,病例4肌细胞膜Dys-C和Dys-N端结构域蛋白未见明显缺乏,但Dys-R端结构

域蛋白可见中度缺乏;病例5肌细胞膜Dys-R结构域蛋白几乎接近于正常对照,而Dys-C和Dys-N结构域蛋白表达可见轻中度缺乏。nNOS在5个病例患儿的肌纤维膜上均未见表达。图1显示病例4和病例5肌细胞膜上Dystrophin和nNOS检测结果。

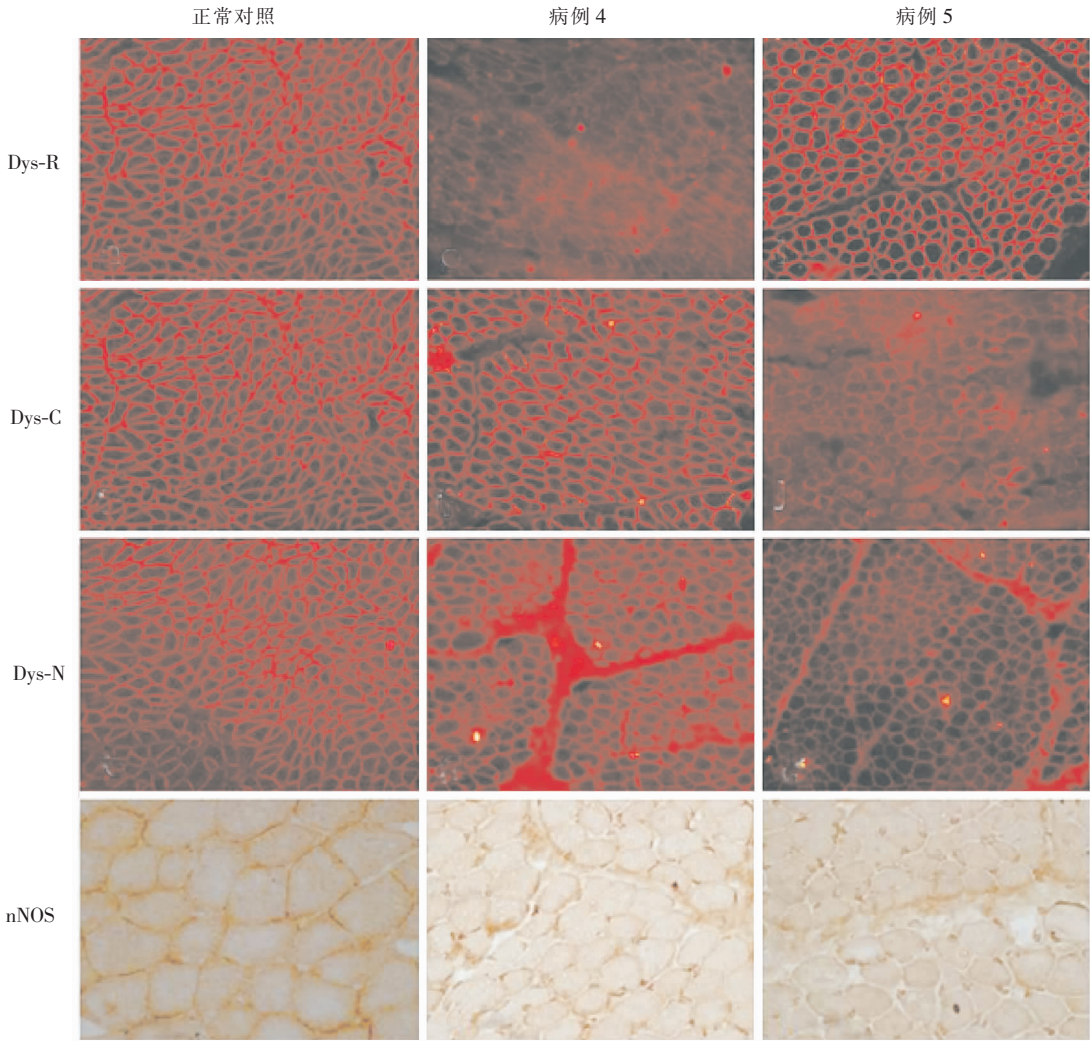


图1 肌细胞膜上Dys-R、Dys-C及Dys-N三端结构域和nNOS蛋白在临床疑似BMD病例中的表达(Dys-R、Dys-C和Dys-N, ×200; nNOS, ×400) 正常对照组Dys-R、Dys-C和Dys-N蛋白在肌细胞膜上呈红色均匀的荧光环带, nNOS为棕色的环带。与正常对照比较, 病例4肌细胞膜Dys-C和Dys-N端结构域蛋白未见明显缺乏, 但Dys-R端结构域蛋白可见中度缺乏; 病例5肌细胞膜Dys-R端结构域蛋白几乎接近于正常对照, 而Dys-C和Dys-N端结构域蛋白表达可见轻中度缺乏; nNOS在病例4和病例5患儿的肌纤维膜上均未见表达。

3 讨论

Dystrophin 位于肌细胞膜磷脂双层结构中, 是连接胞外基质和细胞内的骨架蛋白之一, 为保护肌纤维和肌膜在反复机械收缩过程中免受损伤起到了重要的保护作用。Dystrophin 蛋白由3685个氨基酸组成, 分子质量为427 Kda, 分为4个区域: ①与

actin 结合的氨基端区域, 包含第14~240氨基酸, 跨越1~8号外显子; ②中央棒状区: 包含第253~3040氨基酸, 跨越9~63号外显子; ③含半胱氨酸富含区域: 第3080~3360氨基酸, 跨越64~68号外显子, 该区域与肌膜上DGC相连; ④羧基端区域: 第3361~3685氨基酸, 跨越68~79号外显子, 与细胞内的Syntrophin蛋白相连。因此根据4个结构域, 目前联合应用Dys-N端、Dys-R端、Dys-C端3种成

份的商品化抗体,分别识别氨基酸 321~494 区域、1181~1388 区域和最后 17 个氨基酸区域中的抗原表位,对鉴别诊断 DMD 和 BMD 具有重要的临床意义。如果半胱氨酸富含区或羧基端区域受累(即 Dys-C 端结构域蛋白不表达),即使氨基端区域或中央棒状区蛋白表达,通常归为 Duchenne 型;若氨基端区域或中央棒状区同时受累或一端受累(即 Dys-N 端和 Dys-R 端蛋白表达均缺乏或其中一端缺乏),但依然保留半胱氨酸富含区或羧基端区域,Dystrophin 蛋白仍可部分合成,则为 Becker 型^[2-3]。也就是说,肌细胞膜上 Dys-C 端结构域蛋白表达与否,是区别 DMD 和 BMD 的一个重要标尺。本研究的 5 个病例中,Dys-C 端结构域蛋白均有表达,排除了 DMD。

由于 BMD 患儿 Dystrophin 仍可部分合成,因此对 Dystrophin 三端结构域抗体行免疫组化检测时,则呈多种类型表达^[2-3]。本研究 5 个病例中,病例 1、病例 2 和病例 3 患儿肌细胞膜上 Dys-R 端和 Dys-N 端结构域蛋白均有明显的缺乏,进一步结合患儿的肌肉病理和临床相关辅助检查即可准确诊断;而病例 4 的 Dys-R 端结构域和病例 5 的 Dys-N 端结构域蛋白几乎接近于正常人,加之年龄较小、临床表型不典型和肌肉病理表现较轻,对临床怀疑 BMD 患儿进行准确诊断有一定的困难。既往研究报告,利用 Western blot 可精确定量大片段的基因缺失和重复所造成的 Dystrophin 蛋白缺乏程度以及残留 Dystrophin 大小和降解产物的性质,但对小片段的基因缺失和重复及点突变造成的不显著 Dystrophin 蛋白的改变,利用 Western blot 技术进行病理诊断很难检测到,加之活检标本所限,因此建议利用组织切片行免疫组织化学的方法,可检测相关蛋白发生继发性的变化,对鉴别诊断有一定的帮助^[4-5]。

Dystrophin 蛋白半胱氨酸区域是 Dystrophin 与 DGC 复合体相连的区域,其中 nNOS 是 DGC 复合体元件之一^[1, 4-5]。在 DMD 或 BMD 患儿肌肉病理发生发展过程中,Dystrophin 蛋白缺乏可继发性引起肌膜上 nNOS 蛋白或酶的活性缺乏^[1, 4-6]。导致 nNOS 缺乏的原因到目前为止有多种解释,一是由于 Dystrophin 蛋白半胱氨酸区域受到累及导致 DGC 复合体松动,致使肌膜上 nNOS、糖聚蛋白(sarcoglycan,SG)α-SG、β-SG、γ-SG、δ-SG 等复合体中相关蛋白发生继发性丢失^[6];二是由于 nNOS 通过 Syntrophin 的 PDZ(postsynaptic density protein,PDZ)

结构域与 dystrophin 蛋白羧基端连接,如果 Syntrophin 的 PDZ 区域受到累及会导致肌膜上 nNOS 的缺乏^[7];三是推测肌膜上 Dystrophin 与 nNOS 的定位是一个三元关系,即除了 Syntrophin 和 nNOS 的联系外,Dystrophin 的分子区域有 1 个或多个区域受到累及可直接或间接影响 Syntrophin-nNOS 稳定性,导致 nNOS 的错位以致造成肌膜上 nNOS 缺乏^[7-8]。本研究中,病例 4 Dys-R 端和病例 5 的 Dys-C 和 Dys-N 端蛋白发生不同程度的缺乏均可引起 nNOS 的丢失,为 Dystrophin 的分子区域有 1 个或多个区域受到累及可直接导致肌膜上 nNOS 缺乏理论假设提供了证据。

本研究结果提示,对 Dystrophin 蛋白三端结构域表达接近于正常、血清 CK 值升高、没有明显步态异常和肌力下降的而临床高度怀疑 BMD 患儿,可进一步利用组织切片行单克隆 nNOS 抗体实施病理诊断,为临床提供正确的诊断信息。

[参 考 文 献]

[1] Dubowitz V, Sewry CA. Muscle biopsy: a practical approach[M]. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier, 2006: 157-180.

[2] Deburgrave N, Daoud F, Liense S, Barbot JC, Récan D, Peccate C, et al. Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene [J]. Hum Mutat, 2007, 28(2): 183-195.

[3] Gualandi F, Neri M, Bovolenta M, Martoni E, Rimessi P, Fini S, et al. Transcriptional behavior of DMD gene duplications in DMD/BMD males[J]. Hum Mutat, 2009, 30(2): E310-E319.

[4] Torelli S, Brown SC, Jimenez-Mallebrera C, Feng L, Muntoni F, Sewry CA. Absence of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) as a pathological marker for the diagnosis of Becker muscular dystrophy with rod domain deletions [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2004, 30(5): 540-545.

[5] Arechavala Gomeza V, Kinali M, Feng L, Brown SC, Sewry C, Morgan JE, et al. Immunohistological intensity measurements as a tool to assess sarcolemma-associated protein expression[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2010, 36(4): 265-274.

[6] 李西华,徐苓,刘晓青,赵蕾,吴燕,沈莹,等. 对不同年龄阶段 DMD 患儿肌细胞膜上 DGC 关联复合物蛋白的分析[J]. 临床儿科杂志,2009,11(26):1040-1044.

[7] Lai Y, Thomas GD, Yue Y, Yang HT, Li D, Long C, 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.

[8] Ségalat L, Grisoni K, Archer J, Vargas C, Bertrand A, Anderson JE. CAPON expression in skeletal muscle is regulated by position, repair, NOS activity, and dystrophy[J]. Exp Cell Res, 2005, 302(2): 170-179.

(本文编辑:王 霞)