

杜兴型肌营养不良 50 例临床及病理分析

李秋香 杨欢 张宁 肖波 毕方方 李静

(中南大学湘雅医院神经内科,湖南 长沙 410008)

[摘 要] 目的 总结分析杜兴型肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)患儿的临床及病理特点,旨在加强对 DMD 的认识,提高 DMD 的早期诊断率。方法 对 50 例通过临床表现、骨骼肌活检并进行单克隆抗体免疫组化染色确诊的 DMD 患儿的临床资料进行回顾性分析。结果 DMD 患儿临床表现为:自幼跑步慢,爬楼、蹲起费力,逐渐出现走路姿势异常,检查发现肌酸激酶显著增高,肌电图呈肌源性损害。组织化学染色显示:50 例患儿苏木精-伊红染色均可见肌纤维大小不一,圆形化,肌纤维明显变性、坏死,肌纤维不同程度再生,结缔组织增生;部分肌纤维间可见少量炎性细胞浸润。免疫组织化学染色显示:50 例患儿均可见肌纤维膜 dystrophins 蛋白表达完全缺失,33 例患儿肌纤维膜 sarcoglycans(- α , - β , - γ , - δ)不同程度表达减弱。结论 对具有上述临床表现的患儿,建议行骨骼肌活检并进行单克隆抗体免疫组化染色,发现肌细胞膜上 dystrophins 蛋白缺失即可确诊 DMD。

[中国当代儿科杂志,2012,14(10):746-750]

[关键词] 杜兴型肌营养不良;骨骼肌活检;肌酸激酶;免疫组织化学染色;Dystrophin 蛋白;儿童
[中图分类号] R746.2 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2012)10-0746-05

Clinical and pathological features of 50 children with Duchenne’s muscular dystrophy

LI Qiu-Xiang, YANG Huan, ZHANG Ning, XIAO Bo, BI Fang-Fang, LI Jing. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Li J, Email: jing_neurology@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the clinical and pathological features of children with Duchenne muscular dystrophy (DMD), with the aim of increasing the possibility of early diagnosis. **Methods** The clinical data of 50 children who were definitely diagnosed with DMD, based on clinical manifestations and the results of skeletal muscle biopsies and monoclonal antibody immunohistochemical staining, was reviewed. **Results** The children showed similar clinical manifestations, including running slowly in the toddler period, muscle weakness when climbing stairs and standing up followed by squatting down and walking abnormalities a predominant increase in serum creatine kinase level increased dominantly, and myopathic lesions seen on electromyography. Hematoxylin-eosin staining showed similar pathological presentations in all 50 children, including different-sized muscle fibers with rounding, degeneration and necrosis in various degrees, and proliferation of connective tissues. There was some inflammatory cell infiltration in muscle fibers and interstitial tissues. Dystrophin expression was completely absent at the sarcolemma in all 50 children, and sarcoglycan- α , - β , - γ , - δ expression was reduced to various degrees in 33 of them. **Conclusions** For children with the clinical manifestations mentioned above, skeletal muscle biopsies and monoclonal antibody immunohistochemical staining are recommended as these examinations contribute to a definite diagnosis of DMD by demonstrating dystrophin deficiency at the sarcolemma.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(10):746-750]

Key words: Duchenne muscular dystrophy; Skeletal muscle biopsy; Creatine kinase; Immunohistochemistry staining; Dystrophin; Child

杜兴型肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是由于 X 染色体上 dystrophin 基因突变引起肌纤维膜 dystrophin 蛋白完全缺失的一种进行性肌营养不良^[1],为 X 连锁隐性遗传,绝大多数为男孩发病,女性一般为携带者,不出现临床症状^[2]。DMD 在出生存活男婴中发病率约为 1/3500 ~

4000^[1],本病多数患儿 3 ~ 5 岁出现走路姿势异常,易跌倒,爬楼、蹲起费力,病情缓慢进行性加重,逐渐卧床,多于 20 岁左右因心功能不全而死亡。

DMD 致病基因 DYS 位于 Xp21^[3],是目前已知人类最大的基因之一,由 79 个外显子和 78 个内含子组成。该基因突变率约为 1/10000,远高于其他

[收稿日期]2012-08-14;[修回日期]2012-09-10
[基金项目]国家自然科学基金(编号 30971033)。
[作者简介]李秋香,女,硕士,技师。
[通信作者]李静,副教授。

基因的突变率^[3]。近30年来DMD的分子遗传学研究取得了巨大进展,基因检测可以发现大多数DMD基因的缺失或重复突变,但有30%~40%为点突变或常规方法检测不到的基因片段缺失或重复^[4],由于检测技术复杂,耗时长,费用高,难以在国内一般实验室开展和普及,因此在临床上很有必要寻找更简便可靠的检查方法。DYS编码蛋白为dystrophin蛋白(抗肌萎缩蛋白)^[5],DMD基因突变均可导致肌纤维膜dystrophy蛋白缺失,通过肌活检及应用单克隆抗体免疫组化染色检测dystrophy蛋白(dystrophin-R、dystrophin-C、dystrophin-N)表达,可以明确DMD的诊断,进行肌营养不良的分型,并与其他肌病进行鉴别。开展肌活检及免疫组化染色检测相关蛋白已成为诊断DMD的必需手段。

本研究通过对50例DMD患儿临床及病理资料进行回顾性分析,旨在提高对该疾病的认识,重视肌活检组织化学染色基础上的进一步免疫组化染色检测相关蛋白对DMD的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2009年1月至2012年6月于我院诊治的50例DMD患儿,均为男性,年龄1.5~13岁,平均7.2±2.6岁。其中3例患儿有类似肌无力家族史,两例为患儿舅舅,1例为患儿母亲的舅舅。1例患儿外公外婆系姨表亲结婚,其余患儿家庭均无近亲婚配及阳性家族史。

1.2 方法

1.2.1 DMD的诊断标准 目前国内尚无明确的DMD诊断标准,临床根据肌无力的症状,伴腓肠肌肥大、家族史、血心肌酶明显升高、肌电图呈肌源性改变,同时肌活检免疫组化染色dystrophin蛋白缺失诊断DMD^[1]。

1.2.2 骨骼肌活检 50例患儿肌电图呈肌源性改变,均经患儿父母签署知情同意书,局麻下行开放式腓肠肌活检,标本经液氮/异戊烷冷冻,7 μm冰冻连续切片。

1.2.3 组织化学、酶学染色 采用苏木精-伊红(HE)染色观察肌细胞形态、结构及炎细胞浸润;改良Gomori三原色染色观察破碎红纤维、边缘空泡和杆状体等;油红O(oil red O)染色观察肌细胞内脂滴;糖原(PAS)染色观察肌细胞内糖原;三磷酸腺苷脱氢酶(ATP)染色观察肌纤维类型和分布。

同时还采用以下酶学染色观察肌细胞内线粒体

代谢情况及有关酶的活性:还原型辅酶I四唑氮还原酶(NADH-TR)染色、琥珀酸脱氢酶(SDH)染色、细胞色素C氧化酶染色和酸性磷酸酶(acid phosphatase)染色。

1.2.4 单克隆抗体免疫组织化学染色(ABC法)

采用ABC法观察肌纤维膜相关蛋白表达情况:-20℃丙酮固定,甲醇封闭非特异性染色,10%羊血清稀释一抗(均1:50):抗dystrophin(-R、-C、-N)(购自Novocastra,UK)、sarcoglycan(-α、-β、-γ、-δ)(购自Vector,USA)、dysferlin(购自Novocastra,UK)行单克隆抗体免疫组织化学染色,4℃过夜;10%羊血清1:20稀释抗鼠IgG抗体(KPL,USA)作为二抗,室温30 min;ABC发色反应,0.3% 3,3-二氨基联苯胺(DAB)染色,PBS终止反应,核染,脱水固定,封片。具体方法参见文献^[6]。

1.3 统计学分析

应用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。年龄与血肌酸激酶(CK)水平的关系采用Pearson相关分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特点

50例患儿均为男性,发病多在患儿独自步行之初,缓慢隐匿起病,就诊患儿以6~9岁为多。4例以心肌酶明显升高而就诊,其中3例无明显肌无力表现,46例均因有肌无力表现而就诊,绝大部分患儿1岁后出现运动发育落后,跑跳不能,逐渐蹲下立起费力。有症状患儿表现为四肢近端肌无力、肌萎缩,尤以双下肢明显,均有腓肠肌肥大,Gowers征阳性。50例患儿均发现血CK水平显著增高,在1256~32750 U/L之间,平均为11204±7147 U/L,见表1。肌电图(EMG)呈肌源性损害,其中35例患儿已行心电图和心脏彩超检查,未见明显异常。2例患儿在腓肠肌活检之前行基因检测,1例检测到DMD基因3~21号外显子均缺失,另1例未见DMD基因79个外显子的重复和缺失突变,但不排除点突变和目前不能检测到的其他突变类型。

2.2 DMD患儿年龄与血CK值的关系

表1示DMD患儿血CK值在不同年龄有较大差异,在3~5岁儿童较高,6~7岁达到高峰,8岁以后逐渐下降。进一步统计分析发现,年龄和血CK值之间无相关性($r = 0.237, P > 0.05$)。

表 1 50 例患儿的血 CK 水平 (U/L)

病例	年龄(岁)	CK	病例	年龄(岁)	CK
1	1.5	6449	26	7	27102
2	3	12216	27	7	2282
3	3	12286	28	8	3676
4	3.5	8348	29	8	2402
5	3.5	17985	30	8	11767
6	3.5	11144	31	8	8998
7	4	8452	32	8	13743
8	4	7713	33	8	3252
9	4	11360	34	8	8140
10	4.5	19698	35	8	26589
11	5	8755	36	8	5546
12	5	11590	37	9	6670
13	5	8052	38	9	10277
14	6	32750	39	9	8571
15	6	7705	40	9	9497
16	6	7785	41	9	12386
17	6	20713	42	10	7399
18	6	25048	43	10	7166
19	7	7575	44	10	1256
20	7	17046	45	10	1291
21	7	8650	46	11	8236
22	7	16126	47	11	12710
23	7	23122	48	12	6494
24	7	5443	49	13	6412
25	7	6014	50	13	4713

2.3 免疫组织化学染色病理分析

患儿肌肉组织与阴性对照者同时行单克隆抗体免疫组化染色,结果发现,与阴性对照比较,50 例患儿肌纤维膜 dystrophin-R、dystrophin-C、dystrophin-N 其中某一种或两种或3 种蛋白表达缺失;33 例患儿肌纤维膜 sarcoglycan-α 及 sarcoglycan-β 表达减弱,sarcoglycan-γ 及 sarcoglycan-δ 表达正常,另 17 例患儿肌纤维膜 sarcoglycans-α、-β、-γ、-δ 表达均正常;50 例患儿 dysferlin 蛋白在肌纤维膜表达均正常。见图 1。

2.4 组织化学、酶学染色病理分析

50 例患儿组织学病理特点相似:HE 染色可见明显肌纤维萎缩变圆,大小不一,变性、坏死和再生肌纤维。肌纤维间和间质可见少量炎性细胞浸润,结缔组织多呈中至重度增生(图 2)。Gomori 染色可见较多不透光肌纤维。在变性、坏死肌纤维区酸性磷酸酶活性增高;部分肌纤维胞浆内 NADH-TR 酶和细胞色素 C 氧化酶染色活性局限性减低,肌原纤维发育幼稚,甚至某些肌纤维 COX 酶活性缺失。PAS 染色糖原成分正常。多数患儿肌纤维内脂滴成分大致正常。ATP 染色两型肌纤维呈镶嵌分布。

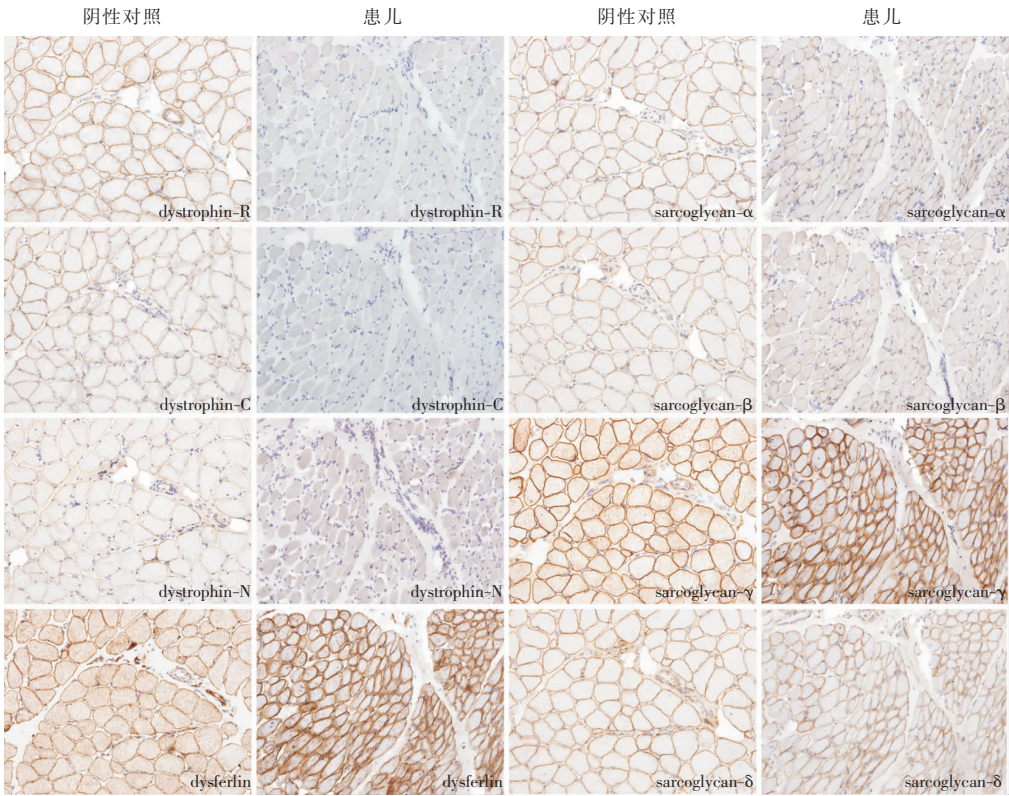


图 1 骨骼肌活检结果(免疫组织化学染色,×200) 阴性对照 dystrophin-R、dystrophin-C、dystrophin-N、sarcoglycan-α、-β、-γ、-δ 及 dysferlin 蛋白均在肌纤维膜正常表达。与阴性对照比较,DMD 患儿 dystrophin-R、dystrophin-C 及 dystrophin-N 在肌纤维膜均表达缺失;sarcoglycan-α 及 sarcoglycan-β 表达减弱,sarcoglycan-γ 及 sarcoglycan-δ 表达正常;dysferlin 蛋白在肌纤维膜表达正常。

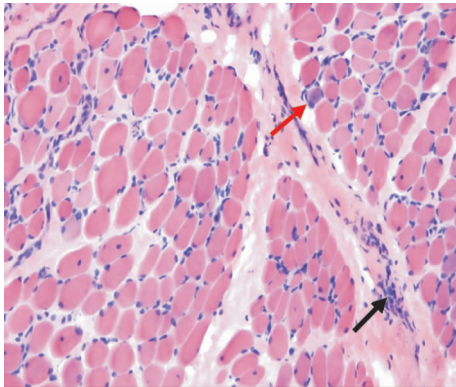


图2 骨骼肌活检组织化学染色结果(HE染色, ×200) 肌纤维大小不一,可见变性、坏死肌纤维(红色箭头所示),肌内膜炎症细胞浸润(黑色箭头所示)。

3 讨论

DMD 又称假肥大型肌营养不良,是 X 连锁隐性遗传的进行性肌营养不良中的一种^[3],因 DMD 基因突变导致肌纤维膜 dystrophin 蛋白缺失所致^[1]。DMD 致病基因 DYS 位于 Xp21^[3],长度为 24 Mb,约占人类基因组的 1%。DYS 编码蛋白为 dystrophin 蛋白即抗肌萎缩蛋白,该蛋白为多聚体蛋白复合物,是一个细长杆状细胞结构蛋白,由 3685 个氨基酸组成,含 4 个结构域,分别为氨基端结构域(N 端)、中央杆状结构域(R 端)、半胱氨酸富集区结构域(CR 端)和羧基端结构域(C 端)^[5]。dystrophin 蛋白为细胞骨架蛋白,位于肌细胞膜下,与分布于肌细胞膜上的其他蛋白共同组成肌营养不良糖蛋白复合物(dystrophin glycoprotein complex, DGC)^[7],包括 α 、 β -dystroglycan, α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ -sarcoglycan, dystrobrevins, syntrophins, sarcospan, caveolin-3 和一氧化碳合酶 thase。在 dystrophin 蛋白缺陷的骨骼肌细胞中,这些蛋白也相应地出现继发性缺失。dystrophin 蛋白也与细胞外基质中层黏连蛋白 2 (laminin-2, 又称 Merosin) 及肌膜内细胞骨架相连接,形成细胞内外的蛋白链,具有保持细胞结构完整性、介导细胞内外信号传导和细胞膜功能稳定性的作用。本研究中的 50 例 DMD 患儿,有 33 例 sarcoglycan 蛋白中的一种或两种出现继发性表达减弱,提示 dystrophin 蛋白和 sarcoglycan 蛋白在结构上存在一定相关性。

Dystrophin 基因突变导致的 dystrophin 蛋白缺陷,临床表型包括 DMD、贝克型肌营养不良(Becker muscular dystrophy, BMD)、X 连锁扩张型心肌病、dystrophin 基因变异携带者,统称为 dystrophinopathy^[8]。其中 BMD 与 DMD 相比,肌无力症状出现较

晚,多在 5 ~ 10 岁时出现症状,临床表现较轻,病情进展缓慢,成人后多数患者仍可以步行,预后远比 DMD 好。另外 BMD 和 DMD 突变基因相同,但两者 dystrophin 蛋白缺陷程度并不同,DMD 为肌纤维膜 dystrophin 蛋白完全缺失,而 BMD 为部分缺失,因此免疫组化染色检测 dystrophin 蛋白表达情况,可进一步鉴别 BMD 和 DMD,对判断患儿预后也非常重要。

肌活检冰冻切片行多种组织化学、酶学染色能更直观地观察患儿肌细胞破坏程度及炎细胞浸润情况,与多发性肌炎、皮肌炎和其他有特殊病理结构的肌病进行鉴别,如代谢性肌病(脂质沉积病和糖原累积病)、先天性肌病(中央轴空病、杆状体肌病、肌管肌病等)。在此基础上行免疫组化染色检测相关肌纤维膜蛋白,就能确诊或完全排除 DMD,同时与 BMD 及其他类型肢带型肌营养不良进行鉴别诊断。肌活检虽有一定创伤性,但其对于 DMD 及相关肌病的诊断价值远大于基因检测。骨骼肌活检结合单克隆抗体免疫组化染色检测 dystrophin 蛋白的表达,可以在蛋白水平进行 dystrophinopathy 的诊断并进行分型,dystrophin 蛋白表达缺失是确诊 DMD 的依据^[1]。本研究免疫组织化学染色显示,50 例患儿均可见肌纤维膜 dystrophins 蛋白表达完全缺失,提示基因检测后仍不能明确诊断的患儿,应在肌活检后行单克隆抗体免疫组织化学染色检查以明确诊断。

对于 DMD 患儿,父母往往有再生育要求,须进行遗传优生咨询和检查,尤其患儿母亲须明确是否为 DMD 相关基因携带者,此时基因检测必不可少,主要用于检出携带者、进行产前基因诊断和提供正确的遗传咨询。

因 DMD 起病隐匿,早期临床表现轻微者常被忽视。本研究中有 1 例父母发现其自幼体弱,一直予以补钙,但未正规诊治。另有 5 例偶然发现血 CK 升高,4 例为在入园前常规体检发现转氨酶升高,1 例因 B 超发现“右侧精索鞘膜积液”,随后的检查发现心肌酶明显升高。2 例因转氨酶升高曾以“病毒性肝炎”在当地入院诊治。CK 是骨骼肌中最丰富的可溶性酶之一,虽然血 CK 值增加是非特异性的,但极度升高却是 DMD 所特有的,常常高出正常值 50 倍以上。血 CK 在病程早期即有显著增高,但因患儿年幼体弱,常被误诊或漏诊,甚至有些患儿因走路姿势异常,在未确诊的情况下已在基层医院行臀肌和跟腱挛缩术。3 ~ 4 岁多为入园阶段,常在入园体检中发现患儿血 CK 升高;5 ~ 8 岁为小学时期,

此间患儿运动量较平常增加,走路异常表现更易引起家长关注,此为该年龄段患儿就诊多的主要原因。经仔细追问病史,发现本组患儿中大多数患儿在独自步行初期即有临床表现,但因早期临床表现轻,常不易被患儿家长察觉重视。因 DMD 为 X 连锁隐性遗传,患儿多为男性,因此建议对小男孩入园时保健医生需仔细追问运动发育情况,并常规体检查心肌酶,以便及时、早期发现可疑 DMD 患儿。

本研究发现 DMD 疾病早期血 CK 值呈上升趋势,在 3~5 岁逐渐升高,6~7 岁达到高峰,8 岁以后逐渐下降。DMD 患儿血 CK 值明显升高,表明该时期肌纤维变性、坏死严重,随年龄增大,肌纤维变性坏死后出现代偿性结缔组织增生,正常肌纤维明显减少,此时血 CK 值降低,但临床症状明显加重。血 CK 值的高低结合年龄及症状轻重,是应用激素治疗的基础,在病情较轻的早期应用小剂量激素可以保护肌细胞膜^[9],减少肌细胞破坏,减慢病情发展。但血 CK 明显下降,症状明显加重的患儿,残存的相对正常肌细胞明显减少,此时激素治疗的副作用明显大于其治疗效果,反而不主张应用激素。

综上所述,早期确诊、早期积极合理治疗对 DMD 患儿非常重要。对具有 DMD 临床表现的患儿,建议早期行骨骼肌活检单克隆抗体免疫组化染色,发现肌细胞膜上 dystrophin 蛋白完全缺失即可确诊为 DMD。

[参 考 文 献]

[1] 胡静. 骨骼肌疾病临床病理诊断[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011:1-274.

[2] Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies [J]. Muscle Nerve, 2000, 23(10): 1456-1471.

[3] Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985, 82(14): 4778-4782.

[4] 申本昌, 张成, 陈松林, 孙筱放, 李少英, 姚晓黎, 等. 非缺失/重复型 Duchenne 肌营养不良症患者的致病点突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23(4): 392-396.

[5] Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, et al. Cloning of the breakpoint of an X; 21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy [J]. Nature, 1985, 318(6047): 672-675.

[6] 胡静, 袁军辉, 李娜, 赵哲, 沈宏锐, 梅丽, 刘彦. dysferlinopathy 患者八例临床及分子病理学特点[J]. 中华神经科杂志, 2007, 40(12): 807-811.

[7] Petrof BJ. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2002, 81(11 Suppl): S162-S174.

[8] Kakulas BA. The differential diagnosis of the human dystrophinopathies and related disorders [J]. Curr Opin Neurol, 1996, 9(5): 380-388.

[9] Fairclough RJ, Bareja A, Davies KE. Progress in therapy for Duchenne muscular dystrophy [J]. Exp Physiol, 2011, 96(11): 1101-1113.

(本文编辑:邓芳明)