

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.035

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.035

· 临床病例讨论 ·

2例肢带型肌营养不良患者的临床、病理学、基因学研究

杨百元^{1,2}, 何度³, 杨兴隆⁴, 徐严明¹

(1. 四川大学华西医院神经内科, 成都 610041; 2. 成都市第七人民医院神经内科, 成都 610041;
3. 四川大学华西医院病理科, 成都 610041; 4. 昆明医科大学第一附属医院老年神经内科, 昆明 650032)

[摘要] 对2例肢带型肌营养不良(limb-girdle muscular dystrophy, LGMD)患者的临床特点进行分析, 并进行相应的肌肉病理学检查, 最后通过全外显子测序确定患者的致病基因。病例1进行了肌肉活检, 结果支持Dysferlin病; 并在其DYSF基因第50号外显子区域发现了c.5639G>A(p.G1880D), c.5246G>C (p.R1749P) 2个杂合突变, 进一步的验证发现2个突变分别来自于患者的母亲和父亲。在病例2的CAPN3基因上发现了2009C>A(p.A670E)纯合突变, 进一步验证发现病例2的父母均携带该杂合突变。病例1诊断为LGMD2B, 而病例2诊断为LGMD2A。对于LGMD患者, 综合临床、病理学方法以及基因学方法能对疾病做出较为明确的诊断。

[关键词] 肢带型肌营养不良; 全外显子测序; 肌肉活检

Clinical, pathological and genetic studies of 2 patients with limb-girdle muscular dystrophy

YANG Baiyuan^{1,2}, HE Du³, YANG Xinglong⁴, XU Yanming¹

(1. Department of Neurology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041; 2. Department of Neurology, Chengdu Seventh People's Hospital, Chengdu 610041; 3. Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041;
4. Department of Geriatric Neurology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

Abstract The clinical features of 2 patients with limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) were analyzed, and the corresponding muscle pathological examination was performed. Finally, the pathogenic genes were identified by whole exome sequencing. Patient 1 accepted muscle biopsy that supported Dysferlin's disease. A composite heterozygous mutation of c.5639G>A (p.G1880D) and c.5246G>C (p.R1749P) was found in exon 50 of the DYSF gene in patient 1; further validation found that the two mutations were from the patient's mother and father, respectively. A homozygous mutation of 2009C>A (p.A670E) in CAPN3 gene was found in patient 2, and it was further verified that the heterozygous mutation was carried by the parents of patient 2. The patient 1 was diagnosis

收稿日期 (Date of reception): 2018-09-05

通信作者 (Corresponding author): 徐严明, Email: neuroxym999@163.com

基金项目 (Foundation item): 四川省科技厅应用基础研究 (2014JY0247); 云南省卫生单位内设研究机构科研项目 (2018NS0102); 昆明医科大学第一附属医院博士基金 (2017BS005)。This work was supported by the Sichuan Provincial Science and Technology Department Applied Basic Research Program (2014JY0247), Yunnan Province Medical Health Research Institute Project (2018NS0102) and the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University Doctoral Research Fund Project (2017BS005), China.

as limb-type muscular dystrophy 2B, while the patient 2 was limb-type muscular dystrophy 2A. Comprehensive clinical, pathological, and genetic methods for LGMD patients can provide a more definitive diagnosis of the disease.

Keywords limb-type muscular dystrophy; whole exon sequencing; muscle biopsy

肢带型肌营养不良 (limb-girdle muscular dystrophy, LGMD) 是肌营养不良中最常见的一大类型, LGMD 囊括了一系列临床异质性较大, 但主要表现为肩带肌、腰带肌肉无力、萎缩的疾病。据文献 [1] 报道: 其世界范围内的发病率为 1/14 500~2.27/100 000。LGMD 的起病年龄也是从儿童 (LGMD1B) 到成人 (LGMD2B, 2L), 一般以上楼梯困难为首发的症状, 逐渐出现下蹲后难以站立以及频繁的摔倒。LGMD 在症状严重程度方面也具有极大的变异性。Minetti 等 [2] 研究认为: 少部分患者可能终身只有很轻微的症状 (LGMD2L, 2T), 而其他类型则进展迅速, 在疾病的早期阶段就不能行走, 或因呼吸和心脏受累而使寿命受到影响。

目前对于 LGMD 的诊断以及准确的分型在临床上极具挑战性。特征性的临床症状能够提示诊断, 但因为不同 LGMD 以及其他类型肌营养不良之间在表型的遗传特点的重叠, 往往为正确诊断带来诸多困难。随着肌肉病理学、基因诊断的不断发展, LGMD 的诊断和准确分型有了极大的进展。本文报道 2 例 LGMD 家系的临床、病理学和基因学的研究。

1 临床资料

1.1 一般资料

病例 1, 男, 19 岁, 因“进行性双下肢无力 2 年”就诊于四川大学华西医院神经内科门诊。患者从 2015 年开始, 无明显诱因自觉下楼时双下肢酸软、无力, 但上楼梯等正常, 半年后自觉跳高变差, 跑步不如别人快, 双上肢引体向上时力气差。2016 年 6 月高考体检发现转氨酶增高, 7 月于医院复查: 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 338 U/L, 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 281 U/L, 肌酸激酶 (CK) 12 689 U/L。在外院行肌电提示肌源性损害, 肌肉活检提示: 肌肉活检符合多发性肌炎病理改变。遂诊断为多发性肌炎 (可能)。给予激素治疗, 自诉治疗 2 周后, 病情加重, 感全身肌肉疼痛, 肌肉沉重无力, 严重时走平路需要别人搀扶, 近 1 个月来, 患者上楼梯、蹲下站起、跑步、跳

高均不能自行完成, 平路自己可以慢走。父母非近亲结婚, 无家族史。专科查体: 发育可, 身高 172 cm, 体重 60 kg, 智力正常, 远近记忆力正常, 瞬时记忆力稍差, 计算力正常, Moca 评分为 26, 正常; 简易智力状态检查量表 (Mini-Mental State Examination, MMSE) 评分为 28。概括理解力可。神志清楚, 颅神经查体均未见明显异常。肌肉无明显萎缩肥大, 因服用激素可见满月脸, 颈部肌力 5 级, 三角肌肌力 3 级, 肱二、肱三头肌 4 级, 双手 4 级, 髂腰肌 3 级, 臀大肌 4 级, 股四头肌 5 级, 股二头肌 4 级, 远端 5 级。坐位站起需借助外物支撑, 蹲下站起需要别人抱起, 四肢肌张力减低, 双手轻微姿势性震颤, 共济运动正常, 行走轻微鸭步, Gower 阳性, 四肢腱反射未引出, 病理征阴性。辅助检查: ALT, AST, 乳酸脱氢酶 (LDH), 羟丁酸脱氢酶 (HBDH), 肌酸激酶 (CK, 4 次检测 6 896~9 000 U/L, 正常 19~226 U/L), 肌酸磷酸激酶同工酶 (CKMB)、肌红蛋白、肌钙蛋白-T 均增高。甲肝、戊肝及自身免疫性肝炎抗体阴性。心电图: 窦性心律, 左室高电压。胸部高分辨率 CT: 心包少量积液, 双肺未见异常。心脏、腹部及泌尿系统彩超未见异常。肌电图: 上下肢呈肌源性损害; 所检神经传导未见异常。肌炎抗体全阴性。

病例 2, 女, 16 岁, 因“进行性双下肢无力 4 年”就诊于四川大学华西医院神经内科门诊。患者从 2003 年上小学六年级 (12 岁) 出现跳跃困难, 但一般的活动基本正常。当时未引起重视, 至 2004 年患者在步行尤其是下坡时易跌倒。至 2016 年, 患者出现双手上举费力, 下蹲后起立困难, 在当地医院住院治疗, CK 为 8 343.8~8 451.0 U/L。并行肌肉活检 (未行免疫组织化学染色), 考虑为肌营养不良, 症状进一步加重, 为求进一步治疗, 患者就诊于四川大学华西医院神经内科门诊。父母近亲结婚, 无家族史。专科查体: 发育可, 身高 145 cm, 体重 40 kg, 智力正常, Moca 评分为 28, 正常; MMSE 评分为 30; 远近记忆力正常, 瞬时记忆力稍差, 计算力正常, 概括理解力可。神志清楚, 颅神经查体均未见明显异常。颈部肌力 5 级, 三角肌肌力 4 级, 肱二、三头肌 4 级, 双手 5 级, 髂腰肌 4 级, 臀

大肌 4 级, 股四头肌 4 级, 股二头肌 4 级, 远端 5 级。坐位站起需借助外物支撑, 蹲下站起需要家人帮助, 四肢肌张力减低, 共济运动正常, 行走轻微鸭步, Gower 阳性, 四肢腱反射未引出, 病理征阴性。辅助检查: CK(2 次检测 8 343.8~8 451.0 U/L, 正常 19~226 U/L), CKMB, LDH 均增高。心电图: 窦性心律, 左室高电压。胸部高分辨率 CT: 心包少量积液, 双肺未见异常。心脏、腹部及泌尿系统彩超未见异常。肌电图: 右股四头肌呈肌源性损害; 所检神经传导未见异常。

1.2 肌肉活检

病例 1 进行了肌肉活检, 选择活检的肌肉为患者左侧的肱二头肌, 肌肉标本冰冻后行 8 μ L 切片, 常规进行苏木精-伊红 (HE)、三磷酸腺苷酶 (ATPase)、过碘酸 Schiff 染色 (PAS)、辅酶 I (NADH) 四氮唑还原酶染色。另外进行免疫组织化学染色: DystrophinN, C, Dysferlin, Sarcoglycan α , β , γ , δ 染色 (抗体购

自 SantaCruze 公司)。病例 1 肌肉活检提示: 送检骨骼肌呈坏死性肌病改变。免疫组织化学: 肌纤维膜 DystrophinN, C(+), Dysferlin(-), Sarcoglycan α , β , γ , δ (+)(图 1), 支持肌营养不良, Dysferlin 病。

1.3 基因检查

采集患者的全血 5 mL, 采用传统酚-氯仿法提取 DNA。进行全外显子测序。病例 1 的 DYSF 基因第 50 号外显子区域发现了 c.5639G>A(p.G1880D) (转录序列参考 ENST00000409582), c.5246G>C(p.R1749P) (转录序列参考 ENST00000258104) 2 个复合杂合突变。进一步验证发现这 2 个突变分别来自于患者的母亲和父亲 (图 2)。因此支持病例 1 诊断为 LGMD 2B 型。病例 2 的 CAPN3 基因上发现了 2009C>A(p.A670E) 纯合突变 (转录序列参考 ENST00000397163), 进一步验证发现病例 2 的父母均携带该杂合突变 (图 3)。因此考虑诊断病例 2 为 LGMD 2A 型。

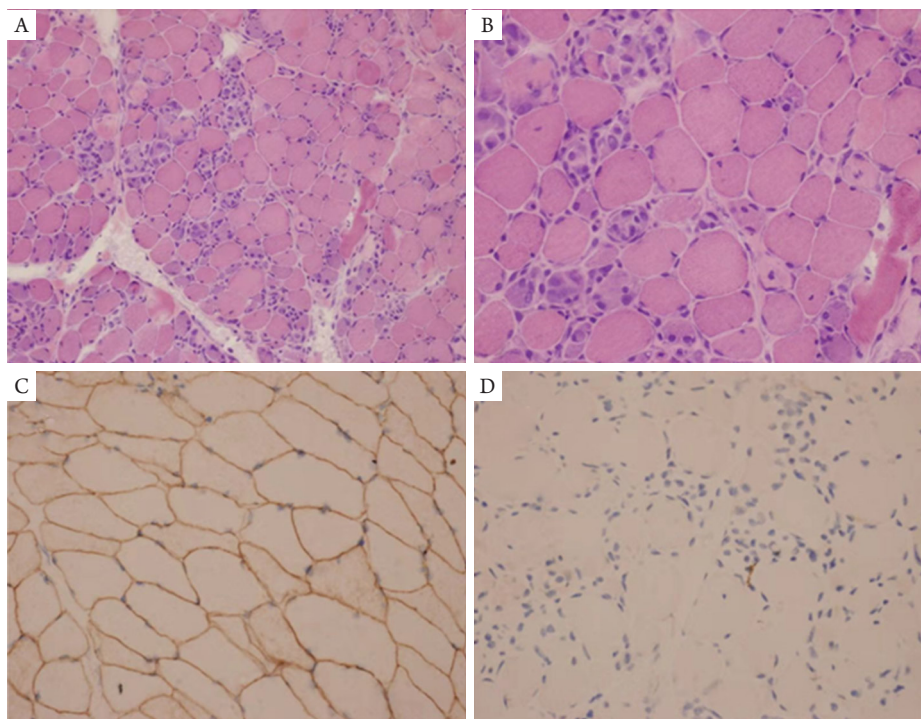


图1 病例1的肌肉组织

Figure 1 Muscle tissue of patient 1

(A, B) 肌纤维不同程度的萎缩坏死 (HE, A: $\times 200$, B: $\times 400$); (C) 正常肌膜的 Dysferlin 染色, 细胞膜可见黄褐色沿细胞膜分布的 Dysferlin 蛋白 (IHC, $\times 400$); (D) 细胞膜无 Dysferlin 蛋白显色 (IHC, $\times 400$)。

(A, B) Atrophy and necrosis of muscle fibers in different degrees (HE, A: $\times 200$, B: $\times 400$); (C) Dysferlin in normal muscle membrane was stained; the yellow-brown Dysferlin protein were distributed along the cell membrane (IHC, $\times 400$); (D) Cell membrane free of Dysferlin protein coloring (IHC, $\times 400$).

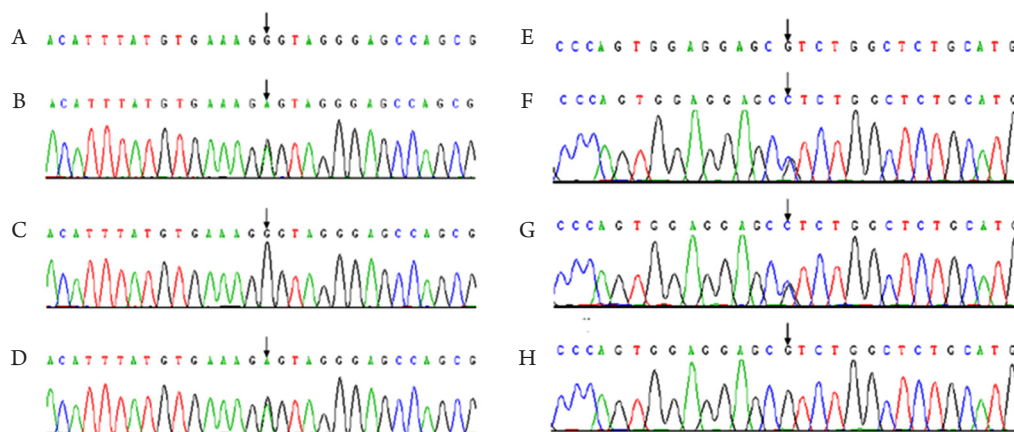


图2 病例1及其父母的基因测序图

Figure 2 Gene sequence of patient 1 and his parents

(A)国家生物技术信息中心(NCBI)参照序列;(B)患者基因序列[DYSF基因 c.5639G>A(G1880D)杂合突变];(C)患者父亲基因序列(DYSF基因c.5639野生型);(D)患者母亲基因序列[DYSF基因c.5639G>A(G1880D)杂合突变];(E)NCBI参照序列;(F)患者基因序列[DYSF基因c.5246G>C(p.R1749P)杂合突变];(G)患者父亲基因序列[DYSF基因c.5246G>C(p.R1749P)杂合突变];(H)患者母亲基因序列(DYSF基因c.5246野生型)。

(A) NCBI reference sequence; (B) Gene sequence of patients 1 [DYSF gene c.5639G>A(G1880D) heterozygous mutation]; (C) Gene sequence of patients 1's father (DYSF gene c.5639 wild-type); (D) Gene sequence of patients 1's mother [DYSF gene c.5639G>A(G1880D) heterozygous mutation]; (E) NCBI reference sequence; (F) Gene sequence patients 1[DYSF gene c.5246G>c(p.1749P) heterozygous mutation]; (G) Gene sequence of patients 1's father [DYSF gene c.5246G>c(p.R1749P) heterozygous mutation]; (H) Gene sequence of patients 1's mother (DYSF gene c.5246 wild-type).

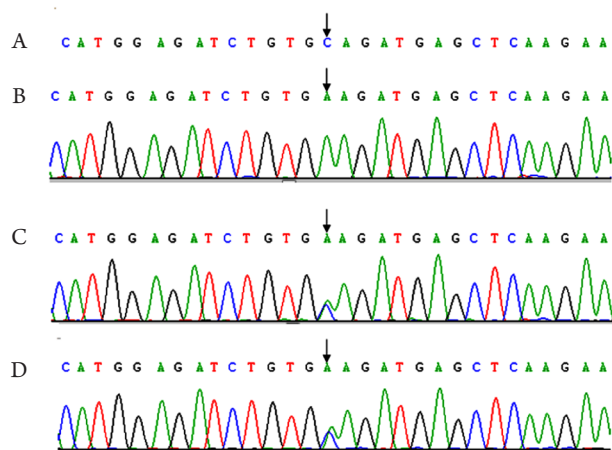


图3 病例2及其父母的基因测序图

Figure 3 Gene sequence of patient 2 and her parents

(A) NCBI参照序列;(B)患者基因序列[CAPN3 c.2009C>A(A670E)纯合突变];(C)患者父亲基因序列[CAPN3 c.2009C>A(A670E)杂合突变];(D)患者母亲基因序列[CAPN3 c.2009C>A(A670E)杂合突变]。

(A) NCBI reference sequence; (B) Gene sequence of patient 2 [CAPN3 c.2009C>A(A670E) homozygous mutation]; (C) Gene sequence of patient 2's father [CAPN3 c.2009C>A(A670E) heterozygous mutation]; (D) Gene sequence of patient 2's mother [CAPN3 c.2009C>A(A670E) heterozygous mutation].

2 讨论

LGMD 主要临床特征为四肢近端肌肉的无力和萎缩,远端的和体轴肌在某些类型中也有所累及。然而面部和球部的肌肉通常不累及。肌肉活检对于 LGMD 的诊断很有帮助, LGMD 共同的病理特征为轻重不一的肌营养不良性改变,即肌纤维大小不一、肌周核增加、肌纤维分裂和结缔组织增生。Sáenz 等^[3]研究指出:免疫组织化学法能够正确地诊断 2/3 经由基因学确诊的患者,如 LGMD 2B 可以见到 Dysferlin 蛋白明显减少,甚至完全缺失。另有文献^[4-5]报道:LGMD 1C 型可见肌纤维膜上 caveolin-3 蛋白表达缺失或减少,同时伴随 Dysferlin 蛋白的继发性表达减弱。但许多的 LGMD 是并没有一种明确的病理学诊断标志,此时则需要基因学的诊断。

在本文的 2 个病例中,病例 1 以下肢无力起病,随后因为体检而发现肌酶升高(CK 12 689 U/L),肌电图提示肌源性改变,但遗憾的是并没有进行免疫组织化学染色。因此外院按照“多发性肌炎”治疗,病情无缓解。患者的肌肉无力以骨盆带肌肉无力为主,走路呈鸭步,且 Gower 征阳性。行肌肉活检

发现患者 Dysferlin 蛋白缺失, 因此考虑为 Dysferlin 病。Dysferlin 病主要包括 LGMD 2B, Miyoshi 远端型肌营养不良以及胫骨前肌起病的远端肌病。根据患者以下肢近端肌肉受累为主的特点, 考虑为 LGMD 2B 的可能性大。随后基因检测的结果也支持 LGMD 2B 的诊断。病例 2 也是以双下肢无力起病, 逐渐发展至上肢。住院检查多次发现 CK 显著升高, 肌电图提示肌源性损害, 活检提示肌营养不良可能。但因为当地医院条件限制, 并没有进一步行免疫组织化学染色。至四川大学华西医院神经内科门诊后患者不同意再次行肌肉活检, 于是予患者行相关的基因检测进一步明确为 LGMD2A。

Magri 等^[6]认为: 如果采用合适的基因测序方法, 约 75% 的 LGMD 患者能够在基因水平上确诊。而二代测序的逐渐推广也有利于发现新的疾病亚型。对于那些采用基因诊断试剂盒不能确诊的患者, 建议进一步行全外显子测序或者全基因组测序以提高 LGMD 的基因诊断率。最近中国的一项较大的研究^[7]也发现: 通过二代测序可使得 LGMD 致病基因的检出率达到 68.3%。有研究^[8]指出: LGMD 可根据遗传方式的不同分为常染色体显性遗传(LGMD1)、常染色体隐性遗传(LGMD2)以及 X 连锁遗传方式 3 种类型。在本文中, 2 例患者均是家族中唯一的患者, 而病例 2 的父母是近亲结婚。因此考虑这 2 个患者隐性遗传的可能性较大。通过全外显子测序最终确诊了 2 例患者分别为 LGMD 2B 以及 LGMD 2A 型, 遗传方式均为常染色体隐性遗传。病例 1 携带 DYSF 基因的 2 个杂合突变, 且这 2 个杂合突变分别来自于患者的父母。而病例 2 则为 CAPN3 基因的纯合突变, 源于患者的父母。

LGMD 2A 是 LGMD 最常见的类型, 占 9%~30%。LGMD 2A 在临床特征和病情进展的速度方面具有很大的变异性, 其发病年龄为 2~40(平均 14)岁。LGMD 2A 一般以骨盆带的肌肉受累最为明显, 髂内收肌、臀大肌可能是最早受累的肌群, 使得患者出现“鸭步”。远端的体轴肌肉相对较少受累。随着疾病的发展可累积到肩胛带的肌肉, 从而出现“肩胛翼”。这些和本文中的病例 2 的临床特点相似。Fanin 等^[9]研究认为: LGMD 2A 是由 CAPN3 基因突变导致, CAPN3 基因编码一种肌肉特异性的蛋白水解酶钙蛋白酶 3(Calpain 3)。在各型 LGMD2 致病基因的表达产物中, Calpain 3 是唯一的一种酶蛋白, 而其余均为肌纤维膜上的结构蛋白。Kramerova 等^[10]指出: Calpain 3 是一种半胱氨酸蛋白酶, 在肌节蛋白的分解中起作用,

在转录因子的修饰中亦有调节作用。Calpain 功能的丧失将激活包括其他 Calpain 在内的蛋白酶, 导致肌肉的降解从而致病。LGMD 2B 是中国最常见的类型, 最近中国一项相对大样本的研究^[7](纳入 180 例患者)显示: LGMD 2B 占到所有 LGMD 的 49.5%。LGMD 2B 的始发症状多为近端肌肉营养不良, 病程进展缓慢, 临床表现为奔跑、上楼等运动障碍, 多表现为骨盆带和腰带肌肉无力, 即使到疾病后期也很少累及下肢远端肌肉和上肢肌肉。LGMD 2B 的致病基因为 DYSF, 编码 Dysferlin 蛋白。Dysferlin 主要表达于骨骼肌肌膜, 在靠近肌膜的细胞质中, Dysferlin 在 Ca²⁺ 离子诱导的细胞膜融合和修复上具有一定的作用。在 LGMD 2B 患者中, 由于缺乏 Dysferlin, 肌纤维膜破裂后不能被修复, 肌纤维易坏死。LGMD 2B 患者一般在儿童期活动正常, 20 岁左右起病, 以近端肌营养不良为主, 进展缓慢, 肢体远端前部肌肉到疾病晚期也很少受累。本文中的病例符合该表型: 患者中患者起病 17 岁, 近端肌无力为主, 进展相对缓慢。

目前对于 LGMD 的治疗主要包括支持治疗, 尤其注意患者的呼吸功能和心律失常。Godfrey 等^[11]曾尝试将皮质内固醇激素用于 LGMD, 然而仅仅是在 LGMD 2M 的患者中显示出获益。对于 LGMD 2B 类型的患者, 激素治疗无效。文献^[12-13]认为: 基因疗法目前在个别亚型的 LGMD 患者中进行探索, 可能是未来治疗 LGMD 极具希望的方法。

参考文献

1. Piccolo F, Moore SA, Ford GC, et al. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies[J]. *Ann Neurol*, 2000, 48(6): 902-912.
2. Minetti C, Sotgia F, Bruno C, et al. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy[J]. *Nat Genet*, 1998, 18(4): 365-368.
3. Sáenz A, Leturcq F, Cobo AM, et al. LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene[J]. *Brain*, 2005, 128(Pt 4): 732-742.
4. Norwood FL, Harling C, Chinnery PF, et al. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population[J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 11): 3175-3186.
5. Domingos J, Sarkozy A, Scoto M, et al. Dystrophinopathies and limb-girdle muscular dystrophies[J]. *Neuropediatrics*, 2017, 48(4): 262-272.
6. Magri F, Nigro V, Angelini C, et al. The italian limb girdle muscular

- dystrophy registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis[J]. *Muscle Nerve*, 2017, 55(1): 55-68.
7. Yu M, Zheng Y, Jin S, et al. Mutational spectrum of Chinese LGMD patients by targeted next-generation sequencing[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175343.
 8. Vissing J. Limb girdle muscular dystrophies: classification, clinical spectrum and emerging therapies[J]. *Curr Opin Neurol*, 2016, 29(5): 635-641.
 9. Fanin M, Angelini C. Protein and genetic diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A: the yield and the pitfalls[J]. *Muscle Nerve*, 2015, 52(2): 163-173.
 10. Kramerova I, Beckmann JS, Spencer MJ. Molecular and cellular basis of calpainopathy (limb girdle muscular dystrophy type 2A)[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(2): 128-144.
 11. Godfrey C, Escolar D, Brockington M, et al. Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy[J]. *Ann Neurol*, 2006, 60(5): 603-610.
 12. Barthélémy F, Wein N, Krahn M, et al. Translational research and therapeutic perspectives in dysferlinopathies[J]. *Mol Med*, 2011, 17(9/10): 875-882.
 13. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Rosales XQ, et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D[J]. *Ann Neurol*, 2010, 68(5): 629-638.

本文引用: 杨百元, 何度, 杨兴隆, 徐严明. 2例肢带型肌营养不良患者的临床、病理学、基因学研究[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(12): 2724-2729. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.035

Cite this article as: YANG Baiyuan, HE Du, YANG Xinglong, XU Yanming. Clinical, pathological and genetic studies of 2 patients with limb-girdle muscular dystrophy[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(12): 2724-2729. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.035