

## • 论著 •

## 肢带型线粒体肌病一个家系的临床和病理特点研究

常凯杰<sup>1</sup>, 马明明<sup>1</sup>, 张晓辉<sup>1</sup>, 杨期东<sup>2</sup>, 张杰文<sup>1</sup>

1. 郑州大学人民医院神经内科, 河南省郑州市 450003

2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

**摘要:** 目的 研究肢带型线粒体肌病一个家系中患者的临床和骨骼肌病理特点。方法 对一组以进行性肌肉无力为主要特点的家系中的3名患者进行临床资料收集及肌肉活检病理分析, 对家系成员行线粒体基因检测。结果 该家系患者发病年龄为30~47岁, 主要表现为躯干肌及四肢近端肌无力和运动耐力下降, 晚期出现呼吸肌受累。血肌酸激酶水平轻度升高, 血乳酸升高, 电生理检查结果示肌源性损害。骨骼肌病理检查显示3名患者均存在典型的破碎红纤维(RRF), 且患者病程越长(分别为2年、4年和14年), 肌无力严重程度越重, RRF数量越多(分别为5%、10%和30%)。细胞色素c氧化酶(COX)染色中RRF以深染为主, 也可见阴性的RRF。琥珀酸脱氢酶(SDH)染色均未发现琥珀酸脱氢酶高反应性血管(SSVs)。基因检测发现该家系存在mtDNA A3243G突变。结论 肢带型线粒体肌病患者选择性累及躯干和四肢近端肌群, 骨骼肌中的RRF数量与患者病情进展程度呈正相关。

**关键词:** 肢带型线粒体肌病; 破碎红纤维; 线粒体基因

## Clinical and pathological features of a family with limb-girdle type mitochondrial myopathy

CHANG Kai-Jie, MA Ming-Ming, ZHANG Xiao-Hui, YANG Qi-Dong, ZHANG Jie-Wen. Department of Neurology, The People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

Corresponding Author: ZHANG Jie-Wen, Email: zhangjiwen9900@126.com

**Abstract: Objective** To investigate the clinical and pathological features of skeletal muscles in patients with limb-girdle type mitochondrial myopathy in one family. **Methods** The clinical data of three patients within a family with progressive muscular weakness as the major feature were collected, and the results of muscle biopsy were analyzed. Mitochondrial gene detection was performed for all family members. **Results** In this family, the age of onset ranged from 30 to 47 years, and the major manifestations were muscle weakness and reduced exercise tolerance in trunk muscles and proximal extremities, as well as the involvement of respiratory muscles in the advanced stage. Laboratory examination revealed mildly elevated serum creatine kinase and increased blood lactic acid, and electrophysiological results showed myogenic damage. The pathological examination of skeletal muscles showed that all the three patients had typical ragged red fibers (RRFs); with the prolonged course of the disease (2, 4, and 14 years, respectively), muscle weakness became more severe and there were more RRFs (5%, 10%, and 30%, respectively). Cytochrome C oxidase staining showed that most RRFs were hyperchromatic, while there were negative RRFs. No strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels were detected by succinodehydrogenase staining. Gene detection found the presence of mtDNA A3243G mutation in this family. **Conclusions** In the patients with limb-girdle type mitochondrial myopathy, the muscle groups in the trunk and proximal extremities are involved selectively, and the number of RRFs in the skeletal muscles is positively correlated with the progression of the disease.

**Key words:** limb-girdle type mitochondrial myopathy; ragged red fiber; mitochondrial gene

线粒体病是由线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 或核DNA (nuclear DNA, nDNA) 缺陷导致的线粒体结构和功能障碍而引起的一组疾病。该

病常同时累及多个器官, 也有少数患者仅表现为四肢肌无力或运动耐力下降, 此种类型也被命名为肢带型线粒体肌病<sup>[1]</sup> 或单纯型线粒体肌病<sup>[2]</sup>。骨骼

收稿日期: 2015-12-01; 修回日期: 2016-01-19

作者简介: 常凯杰(1990-), 男, 硕士, 主要从事周围神经及肌肉疾病的研究。Email: changkaijie@126.com。

通讯作者: 张杰文(1965-), 男, 博士, 主任医师, 主要从事老年痴呆、脑血管病和帕金森病的研究。Email: zhangjiwen9900@126.com。

肌中出现破碎红纤维 (ragged-red fibers, RRF) 是线粒体病的特征性病理特点。肢带型线粒体肌病报道相对罕见,至今尚未有对家系患者的详细研究。本文通过对一组肢带型线粒体肌病家系中的 3 名患者进行临床资料收集、骨骼肌病理分析及基因检测,以研究家族性肢带型线粒体肌病患者的临床和

病理特点,同时分析本家系致病基因突变位点。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

2014 年 07 月至河南省人民医院就诊的一组家系,该家系 3 代共 15 名成员,出现症状的患者共 6 名(图 1)。

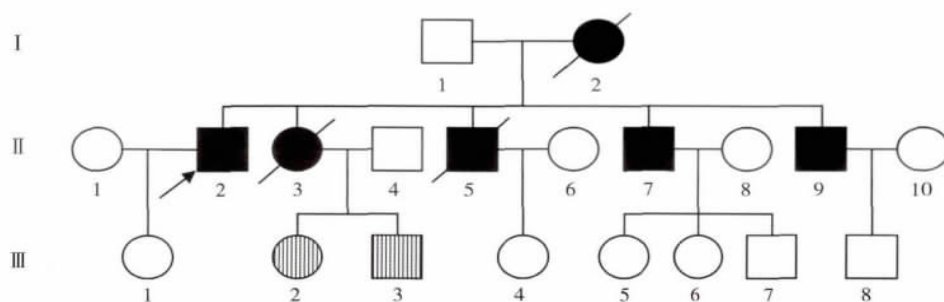


图 1 本文家系图谱。I、II、III 表示家系三代,箭头标记为先证者,□表示健康男性,■表示患病男性,○表示健康女性,●表示患病女性,阴影表示无症状的携带者,斜线标记表示已去世。

该家系患病成员主要症状均表现为逐渐进展的肢带肌与躯干肌无力,及运动不耐受症状,起病隐匿,病情逐渐加重,肌肉无力从四肢近端及躯干肌起病,逐渐发展至四肢远端,无晨轻暮重,晚期出现呼吸困难症状,均无脑卒中、癫痫症状,无头痛,无肌阵挛及视网膜变性,无眼外肌麻痹,无吞

咽困难,无肌肉疼痛。6 名患者在当地医院诊断为进行性肌营养不良,均未治疗。其中,II2、II3、II5 三名患者分别于 35 岁、30 岁和 37 岁发病,于 72 岁、44 岁和 52 岁因呼吸困难、心慌等症状去世。II2、II7、II9 三名患者临床特点见表 1。

表 1 患者临床特点

病例	性别	发病年龄 (岁)	就诊年龄 (岁)	病程 (年)	临床症状								肌萎缩	呼吸 困难	心慌
					颅面肌肌 力(级)	颈肌肌 力(级)	腰带肌肌 力(级)	上肢近端 肌力(级)	上肢远端 肌力(级)	下肢近端 肌力(级)	下肢远端 肌力(级)	肌萎缩			
II2	男	47	61	14	V	II	II	II	IV <sup>-</sup>	III	IV <sup>-</sup>	有	有	有	有
II7	男	50	54	4	V	IV	IV <sup>-</sup>	IV <sup>-</sup>	IV <sup>+</sup>	IV <sup>-</sup>	IV <sup>+</sup>	无	有	有	有
II9	男	43	45	2	V	IV <sup>+</sup>	IV <sup>-</sup>	IV	V	IV	IV <sup>+</sup>	无	无	无	无

### 1.2 方法

1.2.1 临床资料收集 与家系成员签署知情同意后,对家系成员进行详细的病史采集、体格检查,同时全面询问既往史、家系史、婚姻史、孕产史、个人史等情况。对现存三位患者 II2、II7、II9 行血肌酸激酶检测、血乳酸检测、神经电生理及头部磁共振检查。

1.2.2 肌肉病理组织标本制备 经充分与患者及家属沟通且患者及家属签署知情同意后,对现存三位患者分别选取左侧肱二头肌进行活检。标本进行冰冻处理,切片行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H-E)、改良 Gomori 三色(modified Gomori Trichrome, MGT)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogen-

ase, SDH)、细胞色素 c 氧化酶(cytochrome c oxidase, COX)、还原型辅酶 I-四氮唑还原酶(NADH-tetrazolium reductase, NADH-TR)、腺苷三磷酸酶(adenosine triphosphatase, ATPase)等常规组织化学染色,以及 Dystrophin-N、Dystrophin-C、Dystrophin-R、Dysferlin、Sarcoglycan- $\alpha$ 、Sarcoglycan- $\beta$ 、Sarcoglycan- $\gamma$ 、Sarcoglycan- $\delta$  等免疫组织化学染色。

1.2.3 分子遗传学检查 患者及家属签署知情同意后对现存三位患者及家系中其余成员均抽取外周血 4 mL,采用 DNA 抽提试剂盒(北京天根生物技术有限公司)并按操作说明提取 DNA,选取正常人 DNA 作为对照组。使用 24 对具有部分片段重叠的引物<sup>[3]</sup>,其中针对 A3243G 突变设计的引物为:正向

5'-CCTCCCTGTACGAAAGGACA-3', 负向 5'-GC-CTAGGTTGAGGTTGACCA-3'。PCR 反应体积为 50  $\mu$ L, 含 Mix 25  $\mu$ L, 上游引物 2  $\mu$ L, 下游引物 2  $\mu$ L, DNA 模板 5  $\mu$ L, 去离子水 16  $\mu$ L, 94 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ 94 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存, 30 个循环, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。PCR 产物送上海生工生物公司行 Sanger 测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床资料分析

II2、II7 和 II9 三位患者血肌酸激酶均轻度升高, 分别为 369 U/L、280 U/L 和 270 U/L (正常值: 10~190 U/L)。三位患者静息血乳酸均轻度升高, 分别为 3.8 mmol/L、3.6 mmol/L 和 3.3 mmol/L (正常值: 0.5~2.0 mmol/L); 运动后即刻血乳酸明显升高, 分别为 11.2 mmol/L、8.2 mmol/L 和 8.1 mmol/L, 运动后 10 min 血乳酸水平仍较高, 分别为 8.1 mmol/L、5.2 mmol/L 和 4.7 mmol/L。II2、II7 和 II9 三位患者神经电生理均提示肌源性损害, 重复电刺激试验无衰减。II2、II7 和 II9 三位患者头颅磁共振均未见明显异常。

### 2.2 肌肉病理染色结果

3 位患者 H-E 染色、MGT 染色均可见典型的 RRF (图 2A、图 2B)。RRF 在 SDH 染色中呈蓝色深染, 亦被称为破碎蓝纤维 (ragged-blue fibers, RBF), 其在病理染色中最为灵敏。RRF 在患者 II2、II7、II9 中分别约占 30%、10% 和 5% (图 2D、图 2E、图 2F)。RRF 在 COX 染色中大部分是酶活性增强的, 少部分为酶活性减弱或缺失 (图 2C)。SDH 染色中均未见琥珀酸脱氢酶高反应性血管

(strongly succinate dehydrogenase reactive vessels, SSV)。ORO 染色及 PAS 染色未见脂肪或糖原增多。免疫组织化学 (dystrophin-N、dystrophin-C、dystrophin-R、dysferlin、sarcoglycan- $\alpha$ 、sarcoglycan- $\beta$ 、sarcoglycan- $\gamma$ 、sarcoglycan- $\delta$ ) 均未见异常。

### 2.3 线粒体基因组测序结果

对 3 位患者及家系中其余人员进行的基因测序显示, 患者 II2、II7、II9 及家系中 III2、III3 均存在 A3243G 异质性突变且杂合峰高不同 (图 3), 家系其余成员未发现 A3243G 突变。

## 3 讨论

肢带型线粒体肌病相对少见, 国内自 2003 年以来陆续有报道<sup>[4-6]</sup>, 儿童与成人均可发病, 主要症状为肌肉无力及运动不耐受, 受累部位多位于肢带肌和躯干肌, 肢体近端重于肢体远端, 也可累及眼外肌和延髓肌, 可伴肌萎缩和肌张力降低。由于该病主要累及骨骼肌, 而无中枢神经系统受累, 因而极易误诊为进行性肌营养不良、多发性肌炎、脊肌萎缩症等疾病。本家系患者发病年龄为 30~47 岁, 首发表现为躯干及肢体近端肌肉无力, 运动不耐受, 病情进行性加重, 数年后肌无力进展至肢体远端, 晚期出现心肌及呼吸肌受累, 患者病史、体格检查及头部影像学排除脑部受累, 临床特点与文献报道相似<sup>[1,2,4-6]</sup>。三位患者行肌肉活检的患者肌肉病理检查均可见典型 RRF, 且肌纤维内未发现大量脂肪滴沉积, 排除了由于线粒体  $\beta$  氧化导致的脂肪累积病伴线粒体异常的可能性。对家系行线粒体基因检测, 发现了 mtDNA A3243G 突变, 因此诊断该家系患者为肢带型线粒体肌病。

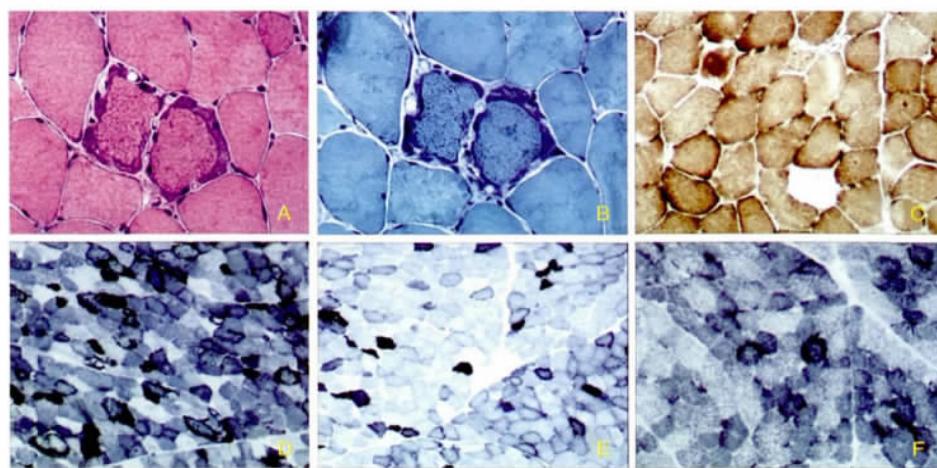


图 2 肌肉病理染色结果。A: H-E 染色示 RRF; B: MGT 染色示 RRF; C: COX 染色示 RRF 酶活性增高或缺失; D: 患者 II2 SDH 染色示 RRF 大约占 30%; E: 患者 II7 SDH 染色 RRF 大约占 10%; F: 患者 II9 SDH 染色 RRF 大约占 5%。

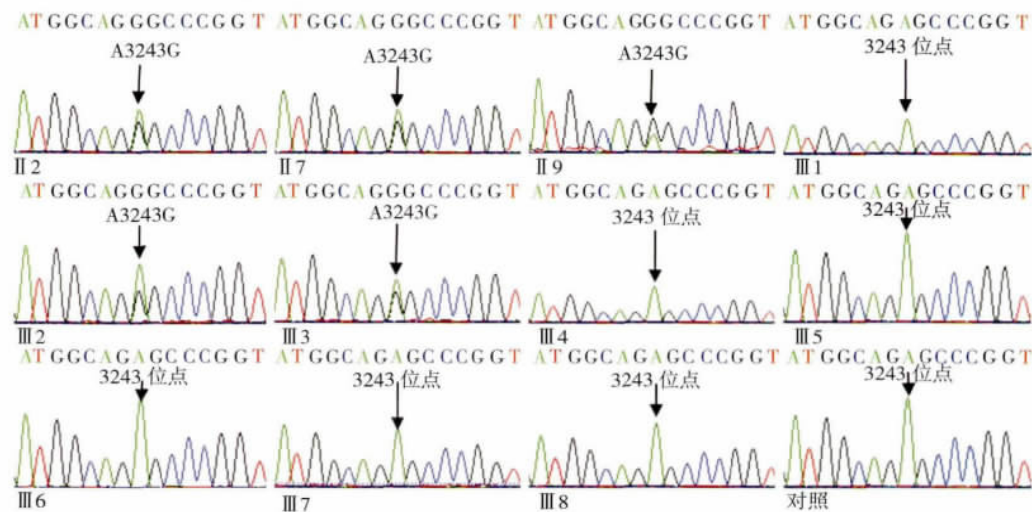


图3 A3243G 位点 Sanger 测序结果。

Kamakura 等<sup>[7]</sup>曾报道一例肢带型线粒体肌病反复出现呼吸衰竭,基因检测发现 mtDNA A3243G 突变。本家系患者晚期均出现了呼吸衰竭,说明此家系患者病变累及到了膈肌,这表明膈肌受累也是肢带型线粒体肌病的临床特点。本家系患者起病年龄为 30~47 岁,较其它相关报道的肢带型线粒体肌病患者的发病时间偏晚,有报道<sup>[6]</sup>发现某些肢带型线粒体肌病可转化为线粒体脑肌病,特别是早发型的肢带型线粒体肌病。我们推测晚发型的肢带型线粒体肌病不容易出现中枢神经系统受累。血清 CK 水平可反映肌纤维坏死程度。高珊珊等<sup>[5]</sup>总结了 17 例肢带型线粒体肌病的 CK 水平,发现除 1 例正常外,余 16 例 CK 均有不同程度增高。本家系患者血 CK 均轻度升高(270~369 U/L),提示肢带型线粒体肌病可存在轻度肌纤维坏死。血乳酸和运动乳酸试验对线粒体病的诊断有重大价值。本家系患者静息血乳酸水平均增高,运动后血乳酸明显升高,为正常值的 4~5 倍,运动后休息 10 min 血乳酸水平仍不能降低至正常。由此可见,血乳酸测定和运动乳酸试验可以辅助诊断肢带型线粒体肌病。国内外文献<sup>[1,2,4-6]</sup>报道,肢带型线粒体肌病神经电生理大多为肌源性损害,少部分为神经源性损害或神经源性肌源性混合性损害,有学者推测神经源性损害可能与神经肌肉接头处的肌纤维变性坏死有关。本家系 3 例患者神经电生理均呈肌源性损害,与文献报道相符。

RRF 是线粒体病的特征性病理特点,虽然在老年男性或者代谢性中毒性肌病、肌营养不良等患者

中有时也可以观察到 RRF,但是数量很少且同时伴有各自病理学特征。Morgan-Hughes 等<sup>[8]</sup>认为,RRF 超过 4% 可以诊断线粒体肌病或脑肌病。本家系行肌肉活检的三名患者肌肉病理中均发现了典型的 RRF,且结合临床来看,患者发病时间越长,肌无力程度越重,肌肉病理中 RRF 数量越多。国内高素琴等<sup>[4]</sup>通过对 9 例肢带型线粒体肌病研究,发现肢带型线粒体肌病患者肌肉病理中 RRF 数量与肌无力严重程度呈正相关。本报道首次在同一家系中进行研究,患者致病基因相同,排除了不同基因突变位点对病情严重程度产生的干扰。此外,国内外报道与本研究均未发现患者肌肉病理中的 RRF 数量与患者发病年龄、进展速度或 CK 水平有明显相关。由此可以推测,在肢带型线粒体肌病患者中,随着疾病的进展,肌无力程度逐渐加重,肌肉中 RRF 数量也逐渐增加。本家系 3 位患者骨骼肌 COX 染色中 RRF 以深染为主,少部分为酶活性缺失。一般认为 RRF 的产生是细胞能量供应下降、线粒体受刺激后增生并大量聚集的结果,是影响线粒体内蛋白质合成的 mtDNA 受损的形态学表现<sup>[9]</sup>。RRF 使肌细胞中线粒体的数量增多,但是由于突变线粒体的功能异常,环氧化酶的活性降低或消失<sup>[10]</sup>。SSV 提示小动脉的平滑肌细胞内线粒体异常增多,在线粒体脑肌病伴高乳酸及卒中样发作(MELAS)和肌阵挛性癫痫伴破碎红纤维综合征(MERRF)患者的肌肉活检中比较常见。国内高珊珊等<sup>[5]</sup>研究了 18 例肢带型线粒体肌病患者的肌肉病理,均未发现 SSV。而赵丹华<sup>[6]</sup>等则认为肌肉病



理检查中出现 SSV 的线粒体肌病患者易发展为线粒体脑肌病。我们推测肌肉病理中无 SSV 可能是肢带型线粒体肌病与线粒体脑肌病不同之处,且 SSV 可能与线粒体病患者的中枢神经系统受累有关。

遗传异质性是线粒体病的特点,即同一临床表型可由不同的基因突变引起<sup>[11]</sup>,肢带型线粒体肌病亦如此。目前国内外已报道的该病的致病性突变主要包括线粒体 tRNA 和 CYTB 基因突变<sup>[12]</sup>,其中 tRNA 基因突变的种类最多,既可见于散发患者,也可见于家族性线粒体肌病患者,包括 mtDNA A3243G 突变、mtDNA A8344G 突变、mtDNA A3276G 突变和 mtDNA A9567G 突变等,其中以 mtDNA A3243G 突变最为常见<sup>[6]</sup>。为研究本家系致病基因突变位点,对患者行线粒体基因测序,本家系患者检测出 mtDNA A3243G 突变,与有关报道相符。mtDNA A3243G 突变是最常见的线粒体脑肌病致病基因突变,可引起 80% 的线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作 (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS),而引起的肢带型线粒体肌病罕见<sup>[6]</sup>。我们推测 mtDNA A3243G 突变的临床异质性与 mtDNA 突变比例有关,当 mtDNA 突变比例高时,临床表现为线粒体脑肌病,而 mtDNA 突变比例较低时,临床表现为肢带型线粒体脑肌病。这同时提示线粒体 tRNA 基因突变可能为家族性肢带型线粒体肌病的热点突变区域。

#### 参 考 文 献

- [1] Hirata K, Nakagawa M, Higuchi I, et al. Adult onset limb-girdle type mitochondrial myopathy with a mitochondrial DNA np8291 A-to-G substitution. *J Hum Genet*, 1999, 44 (3): 210-214.
- [2] Mori M, Momoi M Y. Pure mitochondrial myopathy. *Nihon Rinsho*, 2002, 60 (suppl 4): 302-305.
- [3] Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, et al. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26 (4): 967-973.
- [4] 高素琴,焉传祝,刘淑萍,等.单纯线粒体肌病九例的临床与病理研究. *中华神经科杂志*, 2003, 6 (6): 481-482.
- [5] 高珊珊.单纯型线粒体肌病及 CPEO 的临床、病理和预后随访研究. *山东大学*, 2008.
- [6] 赵丹华,栾兴华,陈彬,等.8 例肢带型线粒体肌病患者的临床、病理特点和线粒体基因突变分析. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2010, 17 (5): 334-337.
- [7] Kamakura K, Abe H, Tadano Y, et al. Recurrent respiratory failure in a patient with 3243 mutation in mitochondrial DNA. *J Neurol*, 1995, 242 (4): 253-255.
- [8] Petty RKH, Harding AE, Morganhughes JA. The clinical features of mitochondrial myopathy. *Brain*, 1986, 109 pt 5 (6): 915-938.
- [9] Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, et al. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (Mitochondrial abnormalities): Disease entity or a syndrome. *J Neurol Sci*, 1980, 47 (1): 117-133.
- [10] Moraes C. The mitochondrial tRNA mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. *Am J Hum Genet*, 1992, 50 (5): 934-949.
- [11] 王朝霞,栾兴华,张英,等.97 例线粒体肌病/脑肌病患者的线粒体 DNA 突变分析. *中华医学杂志*, 2008, 88 (46): 3254-3256.
- [12] Andreu AL, Bruno C, Shanske S, et al. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology*, 1998, 51 (5): 1444-1447.